

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 957 421**

21 Número de solicitud: 202230491

51 Int. Cl.:

**A01N 37/50** (2006.01)

**A01N 43/38** (2006.01)

**A01N 37/44** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**06.06.2022**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**18.01.2024**

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (50.0%)**  
**Ctt-Otri- Casa del Estudiante, C/ Real de Burgos, s/n**  
**47001 Valladolid (Valladolid) ES y**  
**COMERCIAL QUÍMICA MASSÓ, S.A. (50.0%)**

72 Inventor/es:

**ANDRÉS JUAN, Celia;**  
**PÉREZ LEBEÑA, Eduardo y**  
**VIRGILI OLIVÉ, Albert**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **COMPLEJO DE INCLUSIÓN DE TRIPTÓFANO Y ARGININA, COMPOSICIÓN FERTILIZANTE, BIOESTIMULANTE Y ANTIMICROBIANA QUE LO COMPRENDE, SU MÉTODO DE OBTENCIÓN Y SU USO**

57 Resumen:

Complejo de inclusión de triptófano y arginina, composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana que lo comprende, su método de obtención y su uso.

En un primer aspecto, la invención se refiere a un método para obtener un complejo de inclusión de triptófano y arginina. Además, la presente invención se refiere a dicho complejo de inclusión de triptófano y arginina, la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana que lo comprende y al método de obtención de dicha composición. Por último lugar, se describe el uso y forma de aplicación de la composición objeto de la invención en cultivos agrícolas, silvicultura y/o jardinería.

ES 2 957 421 A1

## DESCRIPCIÓN

### COMPLEJO DE INCLUSIÓN DE TRIPTÓFANO Y ARGININA, COMPOSICIÓN FERTILIZANTE, BIOESTIMULANTE Y ANTIMICROBIANA QUE LO COMPRENDE, SU MÉTODO DE OBTENCIÓN Y SU USO

5

#### SECTOR TÉCNICO

10 La presente invención se encuadra en el ámbito general de la Química, más en concreto en la Química Orgánica, y tiene su aplicación en los sectores agrícola, silvícola y/o de jardinería. De forma más particular, se encuadra en el sector de composiciones que actúan como inductores de la defensa auxínica en las plantas y/o para controlar plagas fúngicas y/o bacterianas en la agricultura, silvicultura y/o jardinería.

15

#### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La Química en general y la Química Orgánica en particular es un campo de gran amplitud y en continuo progreso tecnológico, que se puede aplicar a varias ramas de la Ciencia y de la Industria, y que necesita evolucionar para satisfacer nuevas demandas de la  
20 legislación y de los consumidores, proporcionando soluciones adaptadas a unas necesidades muy estrictas. Su gran potencial permite generar nuevos compuestos biológicamente activos que tengan una actividad mejorada respecto a los actuales.

25 En agricultura, el crecimiento de las plantas suele estar limitado por la disponibilidad de nutrientes y, en muchos casos, el nitrógeno es el elemento esencial limitante. Su escasez tiene efectos perjudiciales en la productividad agrícola, pero su fertilización excesiva también puede tener efectos medioambientales negativos. La mejora de la eficiencia en el uso del nitrógeno representa un reto importante para la agricultura y cada vez es más  
30 importante investigar los mecanismos de captación, almacenamiento y reciclaje del mismo y comprender la interacción de estos procesos con la regulación del desarrollo de las plantas y la defensa frente al estrés.

En sus entornos naturales, las plantas están sometidas a un continuo estrés biótico  
35 causado por diferentes ataques (bacterias, hongos, virus, oomicetos e insectos), que

comprometen la supervivencia de la planta y su descendencia. Las plantas han evolucionado a lo largo de millones años, por lo que han desarrollado una variedad de mecanismos de resistencia que se expresan constitutivamente o pueden inducirse tras el ataque de patógenos. Su sistema inmune innato se basa en la detección específica de proteínas llamadas patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP). Los patógenos exitosos secretan proteínas que desregulan la inmunidad y para contrarrestarlo, las plantas activan la inmunidad desencadenada por proteínas efectoras. Esta inmunidad está regulada por fitohormonas, que son pequeñas moléculas que trabajan en una compleja red que regula las condiciones del crecimiento, desarrollo, reproducción y la respuesta de las plantas a las señales ambientales.

En la resistencia a los patógenos, las vías de señalización mediadas por el ácido salicílico (AS) y el etileno (ET)/ácido jasmónico (AJ) están bien descritas. El AS regula positivamente la defensa de la planta contra los patógenos biotróficos, que necesitan tejido vivo para completar su ciclo de vida y las vías de ET/AJ son inducidas en la resistencia a los patógenos que degradan el tejido de la planta durante la infección.

Otras hormonas como las auxinas y el ácido abscísico (ABA), originalmente descritas por regular los procesos de crecimiento de las plantas y la respuesta al estrés abiótico, son actores cruciales en las interacciones planta-patógeno. Las vías fitohormonales están vinculadas entre sí en una enorme y compleja red; por ejemplo, las vías de ET, ABA, auxinas, giberelinas y citoquininas se consideran moduladores hormonales de la columna vertebral de la señalización AS-AJ.

Las auxinas, entre las que se encuentra el ácido indol-3-acético (AIA), regulan muchos aspectos del desarrollo, como la dominancia apical (tendencia a mostrar un mayor crecimiento en la punta o ápice de cada rama principal y en la punta del tallo principal), el gravitropismo de las raíces (crecimiento basípeto de las raíces, que deben hundirse en el suelo para su correcto funcionamiento y crecimiento de los tallos hacia el medio aéreo), la formación de pelos radicales y raíces laterales y el desarrollo de hojas, flores y de la vasculatura en general. También se han descrito efectos directos e indirectos en la regulación de las respuestas de resistencia a los patógenos. Los efectos indirectos pueden ser causados por la regulación por parte de las auxinas de los procesos asociados al desarrollo, como la arquitectura de la pared celular, la morfología de la raíz y el patrón de los estomas.

El ácido indol-3-butírico (AIB) es también un regulador del crecimiento vegetal de la familia de las auxinas y forma parte de muchos productos comerciales utilizados para facilitar el enraizamiento de estacas de especies hortícolas y frutales. En un estudio en  
5 *Camellia sinensis* se midió el efecto de tres diferentes auxinas (ácido indolbutírico, ácido indolacético y ácido 1-naftalenacético) en la formación de raíces. Según los autores, el ácido indolbutírico produjo un mayor rendimiento de raíces en comparación con las otras auxinas (Rout, G.R., “*Effect of auxins on adventitious root development from single node cuttings of Camellia sinensis (L.) Kuntze and associated biochemical changes*”, Plant  
10 Growth Regulation 48 (2): 111-117, 2006).

Una de las rutas biosintéticas de las auxinas parte de la biosíntesis de los antimicrobianos derivados del triptófano, como los indol-glucosinolatos y la camalexina. Una respuesta deficiente se asocia a una mala regulación de los derivados del triptófano  
15 (niveles más bajos de auxina e indol-glucosinolatos), específicamente en las raíces. En conjunto, se demuestra que las auxinas desempeñan un papel central en el equilibrio de las respuestas de resistencia de las plantas.

El triptófano es un precursor de dos clases importantes de reguladores del crecimiento de  
20 las plantas: (a) la fitohormona clásica auxina, a través de vías dependientes e independientes de la triptamina y (b) las indol-aminas melatonina y serotonina.

En cambio, la adición de triptófano durante el periodo de enraizamiento y crecimiento de las plantas tiene problemas de biodisponibilidad, ya que es poco soluble en agua, del  
25 orden de 0.23 g/l a 0°C, 2.2 g/l a 10 °C, 11.4 g/l a 25°C, 17.1 g/l a 50°C y 27.95 g/l a 75°C. Por lo tanto, para formular un producto concentrado que posteriormente pueda ser diluido para ser aplicado en la agricultura es obligatorio aumentar su solubilidad, como mínimo 20 veces. En el mercado existen un par de productos que consiguen concentrar el triptófano en aceites grasos. Sin embargo, estos productos tienen la dificultad de  
30 requerir el empleo de emulsionantes para solubilizarse en agua, lo que encarece el coste del producto final concentrado y, al mismo tiempo, se alejan de las soluciones más cercanas a la agricultura orgánica.

Por tanto, existe la necesidad de desarrollar nuevos productos que garanticen el aumento  
35 de la solubilidad del triptófano en agua y que no comprometan el carácter orgánico y/o

ecológico del producto final, evitando el uso de emulsionantes químicos, ya que la agricultura irá progresivamente desplazándose a este tipo de prácticas en los cultivos.

5 Por otra parte, la L-arginina es un aminoácido importante y único en las plantas. En las proteínas presentes en las semillas de diferentes especies de plantas, entre el 40 y el 50% de la reserva total de nitrógeno está representada por la arginina. Este aminoácido también representa el 50% del nitrógeno en los embriones en desarrollo de la soja y el guisante. La arginina suele ser una de las principales formas de almacenamiento de nitrógeno también en los órganos de almacenamiento subterráneo y en las raíces de los  
10 árboles y otras plantas. Por lo tanto, el metabolismo de la arginina desempeña un papel clave en la distribución y el reciclaje del nitrógeno en las plantas.

Sin embargo, la arginina no sólo sirve como una importante reserva de nitrógeno, sino que también actúa como precursor de la biosíntesis de poliaminas, óxido nítrico (NO),  
15 etc., e interviene en casi todos los procesos fisiológicos y bioquímicos, en el crecimiento, el desarrollo y en la adaptación de las plantas al estrés biótico y abiótico. La arginina descarboxilasa, la arginasa y la óxido nítrico sintasa son las enzimas clave en el catabolismo de la L-arginina, formando poliaminas, mientras que el óxido nítrico se forma a través de la vía Oxido Nítrico Sintasa (NOS, del inglés *Nitric Oxide Synthase*). La  
20 actividad de estas tres enzimas controla la dirección del metabolismo de la arginina. Las poliaminas (putrescina, espermidina y espermina) son esenciales para el desarrollo y la respuesta al estrés de las plantas. La embriogénesis, la organogénesis y, en particular, la iniciación y el desarrollo de las flores, el cuajado y la maduración de los frutos, así como la senescencia de las hojas, requieren poliaminas. Su rol en la tolerancia al estrés  
25 abiótico y la regulación de la asimilación del nitrógeno está bien establecido. La acumulación de poliaminas en grandes cantidades en la célula apunta hacia funciones de regulación metabólica de la toxicidad del amoníaco, la producción de NO y el equilibrio del metabolismo del nitrógeno orgánico en la célula.

30 El zinc, uno de los micronutrientes esenciales y un importante componente de varias enzimas y proteínas, sólo lo necesitan las plantas en pequeñas cantidades. Sin embargo, es crucial para su desarrollo, ya que desempeña un papel importante en una amplia gama de procesos. El rango normal de zinc en el tejido vegetal es de 15 a 60 ppm y en el medio de cultivo entre 0.10 y 2.0 ppm. La deficiencia o la toxicidad del zinc no se  
35 producen con frecuencia. Sin embargo, ambas tienen un impacto negativo en el

crecimiento y la calidad de los cultivos y deben abordarse antes de que los daños en los cultivos sean irreversibles. El zinc activa las enzimas responsables de la síntesis de ciertas proteínas, participa en la formación de clorofila y de algunos hidratos de carbono, en la conversión de almidones en azúcares y su presencia en los tejidos vegetales ayuda  
5 a la planta a soportar las bajas temperaturas. El zinc es esencial, además, en la formación de auxinas.

Como la mayoría de los micronutrientes, el zinc es inmóvil, lo que significa que los síntomas de carencia se producen en las hojas nuevas y varían en función del cultivo.  
10 Normalmente, se manifiestan como un patrón variable de clorosis de las hojas nuevas y pueden formarse manchas necróticas en los márgenes o en las puntas de las hojas. Las hojas nuevas son de menor tamaño y a menudo se ahuecan hacia arriba o se distorsionan. Los entrenudos se acortan, dando a la planta un aspecto de roseta, y el desarrollo de los brotes es deficiente, dando lugar a una floración y ramificación  
15 reducidas.

En la agricultura se verifica el impacto de varias plagas bacterianas, esencialmente del tipo gramnegativo. Los fitopatógenos gramnegativos constituyen una importante amenaza para los cultivos alimentarios y son responsables de una plétora de enfermedades de las  
20 plantas, con pérdidas devastadoras en cultivos como los tomates, los pimientos, las patatas, las aceitunas o el arroz. Los medios por los que las bacterias fitopatógenas causan enfermedades son tan variados como los tipos de síntomas que provocan. Estas bacterias fitopatógenas producen toxinas o inyectan proteínas especiales que provocan la muerte de las células del huésped, o bien producen enzimas que descomponen  
25 componentes estructurales clave de las células vegetales y sus paredes. La mayoría de las bacterias fitopatógenas pertenecen a los siguientes géneros: *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Xylella*, *Spiroplasma* y *Phytoplasma*. Las bacterias patógenas de las plantas causan muchos tipos diferentes de síntomas que  
30 incluyen agallas y sobrecrecimientos, marchitamiento, manchas en las hojas, motas y tizones, podredumbres blandas, así como costras o canchales. A diferencia de los virus, que están dentro de las células del huésped, las bacterias amparadas crecen en los espacios entre las células y no las invaden. Las bacterias que causan las enfermedades de las plantas se propagan de muchas maneras: pueden ser salpicadas por la lluvia o  
35 transportadas por el viento, los pájaros o los insectos. Las personas también pueden

propagar enfermedades bacterianas al podar árboles frutales infectados y transmitirse a través de las herramientas utilizadas o en los cortes de poda. Dentro de los géneros de hongos que atacan a los cultivos se encuentran, entre otros, los siguientes: *Fusarium*, *Giberella*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Alternaria* y *Botrytis*.

5

En base a lo anteriormente expuesto, existe la necesidad en este campo técnico de desarrollar nuevas composiciones de carácter orgánico y/o ecológico que superen los inconvenientes mencionados y que aumenten la biodisponibilidad de sus componentes activos, evitando el uso de emulsionantes químicos que puedan resultar tóxicos para las plantas o el suelo y que, de forma paralela, estimulen el sistema de defensa propio de las plantas.

10

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

15 Es un primer objeto de la invención un método para obtener un complejo de inclusión de triptófano y arginina en solución acuosa que comprende las siguientes etapas:

20

a) mezclar entre un 3% y un 6% p/v de triptófano en agua y agitar hasta obtener una mezcla dispersada;

b) añadir entre un 6 y un 10% p/v de arginina con respecto al total de la mezcla dispersada obtenida en la etapa anterior;

c) calentar hasta una temperatura de entre 50 y 70°C, agitar preferentemente a una velocidad de agitación de entre 300 y 1000 rpm y aplicar ultrasonidos con una frecuencia preferentemente comprendida entre 15 y 25 kHz, y más preferentemente entre 20 y 25 HZ, hasta completar la disolución total del triptófano y la formación del complejo de inclusión; y

25

d) dejar enfriar hasta alcanzar una temperatura por debajo de 25°C.

Es un segundo objeto de la invención un complejo de inclusión de triptófano y arginina en solución acuosa, que comprende, en peso con respecto al volumen total:

30

a) entre un 3% y un 6% de triptófano,

b) entre un 6% y un 10% de arginina, y

c) entre un 84% y un 92% de agua,

y donde dicho complejo de inclusión no contiene ningún surfactante o emulsionante químico.

35

Una de las principales ventajas que ofrece el complejo de inclusión objeto de la invención frente a otros productos descritos en el estado de la técnica es la sorprendente mejora que presenta en cuanto a la solubilidad de sus principios activos, el triptófano y la arginina, en agua. En particular, se ha demostrado que el complejo de inclusión reivindicado permite multiplicar por 20 el porcentaje de solubilización del triptófano en agua.

Adicionalmente, ofrece la ventaja de que se trata de un producto inocuo, basado en compuestos naturales y que no requiere el empleo de compuestos químicos, como surfactantes o emulsionantes, a diferencia de otros productos habituales del estado de la técnica. Es importante señalar que los componentes del complejo de inclusión reivindicado son generalmente reconocidos como seguros (GRAS), favoreciendo así su empleo en el tratamiento de cultivos. Se trata por tanto de un producto que respeta el medio ambiente y que no daña los ecosistemas, al no incluir sustancias tóxicas, basándose en compuestos que incluso son de grado alimentario humano.

Es un tercer objeto de la invención una composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana que comprende en peso con respecto al volumen total:

- a) entre un 9% y un 16% del complejo de inclusión en solución acuosa objeto de la invención, según ha sido definido anteriormente, y
- b) entre un 4% y un 8% de al menos un compuesto quelante seleccionado entre un compuesto quelante de zinc y un compuesto quelante de hierro, así como cualquiera de sus combinaciones.

En una realización alternativa de la invención, la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana puede comprender, en peso con respecto al volumen total:

- a) entre un 9% y un 16% del complejo de inclusión en solución acuosa objeto de la invención, según ha sido definido anteriormente, y
- b) entre un 0.5% y un 5% de un extracto seco de alga roja.

En una realización adicional alternativa de la invención, la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana puede comprender, en peso con respecto al volumen total:

- a) entre un 9% y un 16% del complejo de inclusión en solución acuosa objeto de la invención, según ha sido definido anteriormente,



- b) entre un 4% y un 8% de al menos un compuesto quelante seleccionado entre un compuesto quelante de zinc y un compuesto quelante de hierro, así como cualquiera de sus combinaciones; y
- c) entre un 0.5% y un 5% de un extracto seco de alga roja.

5

En el contexto de la presente invención, se entiende por fertilizante una composición que comprende los nutrientes esenciales para el crecimiento y desarrollo de un vegetal. La composición objeto de la invención tiene función fertilizante debido a la presencia de los aminoácidos en la propia composición. De este modo, cumple la función fertilizante *per se*, evitando que la planta tenga que producir los nutrientes a partir del nitrógeno fijado a través de sus raíces, con el consiguiente ahorro económico que ello conlleva. Adicionalmente, son numerosos los beneficios adicionales asociados a la presencia de los aminoácidos en la composición, actuando en aspectos diversos como la resistencia al estrés, la fotosíntesis, la polinización, la activación de las fitohormonas y otras sustancias de crecimiento, el equilibrio de la flora en los suelos y el sistema de absorción y translocación de los microelementos a nivel de la planta.

10  
15

Además, en el contexto de la presente invención, se entiende por bioestimulante una sustancia que altera los procesos vegetales mejorando su rendimiento. En particular, la composición objeto de la invención tiene la capacidad de estimular el sistema de defensa en que intervienen las auxinas de los vegetales.

20

Por otro lado, se entiende por antimicrobiano una sustancia que interviene en la protección de un vegetal frente a enfermedades producidas por hongos y/o bacterias.

25

Es un cuarto objeto de la invención un método para obtener una composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según ha sido anteriormente descrita, caracterizado por que comprende mezclar por sonicación aplicando ultrasonidos con una frecuencia preferentemente comprendida entre 15 y 25 kHz, más preferentemente entre 20 y 25 HZ, los siguientes componentes:

30

- a) entre un 9% y un 16% en peso del complejo de inclusión en solución acuosa según ha sido anteriormente descrito, y
- b) entre un 4% y un 8% en peso de al menos compuesto quelante seleccionado entre un compuesto quelante de zinc y un compuesto quelante de hierro, así como cualquiera de sus combinaciones,

35

donde la mezcla se lleva a cabo preferentemente a una temperatura entre 50° a 70°C, durante un tiempo de entre 5 y 15 minutos, hasta obtener una composición homogénea.

De manera alternativa, dicho método de obtención de una composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según ha sido anteriormente descrita, se caracteriza por que comprende mezclar por sonicación aplicando ultrasonidos con una frecuencia preferentemente comprendida entre 15 y 25 kHz, más preferentemente entre 20 y 25 HZ, los siguientes componentes:

5 a) entre un 9% y un 16% del complejo de inclusión en solución acuosa objeto de la invención, según ha sido definido anteriormente, y

b) entre un 0.5% y un 5% en peso de un extracto seco de alga roja, donde la mezcla se lleva a cabo preferentemente a una temperatura entre 50° a 70°C, durante un tiempo de entre 5 y 15 minutos, hasta obtener una composición homogénea.

15 Adicionalmente, el método para obtener una composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana objeto de la invención se caracteriza por que comprende mezclar por sonicación aplicando ultrasonidos, los siguientes componentes:

a) entre un 9% y un 16% del complejo de inclusión en solución acuosa objeto de la invención, según ha sido definido anteriormente,

20 b) entre un 4% y un 8% en peso de al menos compuesto quelante seleccionado entre un compuesto quelante de zinc y un compuesto quelante de hierro, así como cualquiera de sus combinaciones, y

c) entre un 0.5% y un 5% en peso de un extracto seco de alga roja, donde la mezcla se lleva a cabo a una temperatura entre 50° a 70°C, durante un tiempo de entre 5 y 15 minutos, hasta obtener una composición homogénea.

Es un quinto objeto de la invención el uso de la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana anteriormente descrita para inducir la defensa auxínica en vegetales de cultivos agrícolas, silvicultura y/o jardinería que comprende aplicar en dichos cultivos una cantidad máxima de un 23% en peso de la composición en agua.

30 Como se ha descrito anteriormente, una de las ventajas principales de la invención es que se trata de una composición basada en sustancias naturales, seguras y biodegradables, al tiempo que mejora de manera muy significativa la biodisponibilidad del

triptófano, eliminando la presencia de otros productos químicos imprescindibles para su disolución como los que se emplean actualmente en el sector agrícola.

5 En una realización particular alternativa, la composición reivindicada podrá utilizarse como fertilizante.

En otra realización particular alternativa, la composición reivindicada podrá ser empleada como bioestimulante.

10 Finalmente, en otra realización particular alternativa, la composición reivindicada podrá ser empleada como antimicrobiano, al tener la capacidad de prevenir, tratar y/o eliminar plagas de microorganismos que pueden ser hongos y/o bacterias de las plantas.

15 De manera particular, los hongos patógenos pueden consistir en un género de hongos seleccionado del grupo que consiste en *Fusarium*, *Giberella*, *Rhizoctonia*, *Verticillium*, *Phytophthora*, *Colletotrichum*, *Alternaria*, *Botrytis*, así como cualquiera de sus combinaciones.

20 A su vez, las bacterias patógenas pueden consistir en bacterias gramnegativas. De manera preferente, las bacterias patógenas pueden consistir en un género de bacterias seleccionado del grupo que consiste en *Erwinia*, *Pectobacterium*, *Pantoea*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas*, *Ralstonia*, *Burkholderia*, *Acidovorax*, *Xanthomonas*, *Clavibacter*, *Streptomyces*, *Xylella*, *Spiroplasma*, *Phytoplasma*, así como cualquiera de sus combinaciones.

25 En cualquiera de los usos anteriormente descritos, la composición reivindicada puede aplicarse diluida en agua mediante pulverización sobre el cultivo, a nivel foliar o a nivel radicular mediante riego. De manera preferente, su aplicación se llevará a cabo a nivel foliar, al lograrse una mayor absorción por parte de la planta. Dicha dilución en agua  
30 podrá comprender una cantidad de composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana de entre 14 a 23%, más preferentemente entre un 15% y un 20% y aún más preferentemente entre un 18% y un 20% en peso con respecto al total.

35 Es un sexto objeto de la invención la dilución acuosa que comprende la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana reivindicada, preferentemente, en un

porcentaje en peso comprendido entre un 14% y un 23%, más preferentemente entre un 15% y un 20% y aún más preferentemente entre un 18% y un 20% en peso respecto al total.

## 5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Acompañando a la presente descripción se incluyen una serie de figuras donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se muestran estructuras químicas de la composición objeto de la invención. En particular, dichas figuras son las siguientes:

- 10 • Figura 1.- a) Imagen de la estructura de las formas resonantes del grupo guanidinio; y b) estructura promedio espacial del guanidinio.
- Figura 2.- a) Estructura molecular y b) estructura conformacional (promedio) del triptófano.
- Figura 3.- a) Estructura molecular y b) estructura conformacional (promedio) de la  
15 arginina.
- Figura 4.- a) Estructura molecular y b) estructura conformacional (promedio) del complejo triptófano y arginina en el primer estudio de formación de puentes de hidrógeno.
- Figura 5.- a) Estructura molecular y b) estructura conformacional (promedio) del  
20 complejo triptófano y arginina en el segundo estudio de formación de puentes de hidrógeno.
- Figura 6.- a) Estructura molecular y b) estructura conformacional (promedio) de  
complejo triptófano y arginina en el tercer estudio de formación de puentes de hidrógeno.
- 25 • Figura 7.- a) Estructura molecular y b) estructura conformacional (promedio) del complejo triptófano y arginina en el cuarto estudio de formación de puentes de hidrógeno.
- Figura 8.- a) Estructura molecular y b) estructura conformacional (promedio) del  
complejo triptófano y arginina en el quinto estudio de formación de puentes de  
30 hidrógeno.
- Figura 9.- a) Estructura molecular y b) estructura conformacional (promedio) del  
complejo triptófano y arginina en el sexto estudio de formación de puentes de  
hidrógeno.
- 35 • Figura 10.- Espectros RMN del: (a) L-Triptófano; (b) L-Arginina y (c) complejo Triptófano-Arginina.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 Tal y como se ha descrito previamente, la presente invención ofrece un nuevo proceso para incrementar la solubilización del triptófano en agua, no habiendo sido descrito hasta el momento en la literatura técnica. El nuevo complejo de inclusión reivindicado consigue aumentar la solubilidad del triptófano en agua hasta 20 veces y está especialmente indicado para su empleo en la elaboración de composiciones fertilizantes, bioestimulantes y antimicrobianas naturales y biodisponibles.

10

En particular, el método desarrollado permite obtener un complejo de triptófano/arginina mediante un proceso de mezcla en caliente con aplicación de ultrasonidos. El complejo de inclusión obtenido mediante dicho proceso puede comercializarse de forma concentrada, o bien se puede diluir en agua hasta un porcentaje que faculte su empleo en la agricultura, silvicultura y/o jardinería.

15

En el contexto de la presente invención, la formación del complejo se produce como consecuencia de la pérdida del protón por parte de ambos grupos carboxílicos de los aminoácidos, que se deslocan, en el caso del triptófano, hasta el grupo amino libre de la parte alifática de la molécula (no el grupo indólico) y, en el caso de la arginina, hasta la estructura resonante del grupo guanidinio, que queda cargada positivamente.

20

Como se ha descrito anteriormente, el complejo de inclusión reivindicado se caracteriza por que comprende entre un 3% y un 6% en peso de triptófano, si bien en realizaciones preferidas de la invención, la cantidad de triptófano será de un 4% o un 5% en peso respecto al volumen total.

25

Por su parte, la cantidad de arginina presente en el complejo de inclusión se encuentra comprendida entre un 6% y un 10% en peso, si bien en realizaciones preferidas puede estar presente en un 7%, un 8% o un 9% en peso respecto al volumen total.

30

La eficacia del producto objeto de la presente invención, unido a su elevada biodisponibilidad, hace que sea un producto realmente ventajoso en comparación con los fertilizantes, bioestimulantes y/o agentes antimicrobianos conocidos en el mercado, que apenas llegan a disolver un 0.5% de triptófano en agua. Junto a esto, el complejo de

35

inclusión reivindicado está constituido por componentes naturales eficaces, evitando así el uso de químicos responsables de efectos tóxicos para el medioambiente.

5 Como se ha descrito anteriormente, cabe destacar que, gracias a la composición química del complejo de inclusión reivindicado, se ha incrementado de manera sorprendente la solubilidad del triptófano. De hecho, se ha demostrado que la solubilidad del triptófano se incrementa con la concentración de la arginina, presente entre un 6% y un 10% en peso, facilitando así la formación del complejo de inclusión entre ambos aminoácidos por interacciones moleculares débiles o de corto alcance entre las moléculas de ambos  
10 compuestos en agua. En particular, dichas interacciones consisten en enlaces por puentes de hidrógeno entre los dos aminoácidos descritos, es decir, la soluble en agua y la insoluble. El enlace de hidrógeno es una fuerza electrostática que proporciona gran estabilidad, pero es más débil que el enlace covalente o el enlace iónico. En la aparición de estos enlaces es esencial la acción de los ultrasonidos que se aplican durante el  
15 método de obtención del complejo de inclusión.

Una de las principales ventajas de la composición reivindicada es que permite solventar el problema al que se tiene que enfrentar el sector agrícola en relación a las plagas microbianas actuales, particularmente en el caso de las bacterias, en cuyo caso no está  
20 permitido el empleo de antibióticos habituales, de uso humano, para evitar la aparición de bacterias resistentes.

En realizaciones particulares de la presente invención, la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana comprende el complejo de inclusión formado por los dos  
25 aminoácidos descritos, dando lugar a una composición en solución acuosa con un pH comprendido entre 8 y 11 y con carácter catiónico, derivado de la presencia del grupo guanidinio de la arginina, según se muestra en la Figura 1, con gran tendencia a captar el protón del grupo carboxílico del triptófano y quedar cargado positivamente, lo que otorga el carácter catiónico al complejo formado. En realizaciones preferidas, el pH de la  
30 solución acuosa estará comprendido entre 9 y 10 y será más preferentemente de entre 9.3 y 9.5.

Como se ha descrito anteriormente, la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana reivindicada puede comprender entre un 4 y un 8% en peso de al menos  
35 un compuesto quelante seleccionado preferentemente entre un compuesto quelante de

zinc o de hierro de aplicación en agricultura. De manera más preferente, el compuesto quelante de zinc de aplicación en agricultura puede seleccionarse del grupo que consiste en sulfato de zinc, gluconato de zinc, heptagluconato de zinc, acetato de zinc, etilendiaminotetraacetato de zinc (EDTA)Zn, hidroxietilendiaminotriacetato de zinc (HEEDTA)Zn, dietilentriaminopentaacetato de zinc (DTPA)Zn, etilen-diamino di-orto-hidroxi-fenil-acetato de zinc (o,p-EDDHA)Zn, etilendiaminodisuccinato de zinc (EDDS)Zn, etilendiamina-N y N'-disuccinato de zinc (EDDS)Zn, así como cualquiera de sus combinaciones.

10 En realizaciones preferidas de la invención, la cantidad del quelante de zinc de aplicación en la agricultura en la composición será de un 4.5%, 5%, 5.5%, 6%, 6.5%, 7% o 7.5% en peso respecto al volumen total.

Una gran ventaja del complejo de inclusión reivindicado es que no precisa de la incorporación de emulsionantes o surfactantes para mejorar su solubilidad y biodisponibilidad en solución acuosa, a diferencia de otros productos alternativos del estado de la técnica, los cuales llevan asociado un importante riesgo de toxicidad en cultivos, así como en los suelos destinados a la agricultura, silvicultura y jardinería en general.

20 Por lo tanto, se trata de una solución muy ventajosa con respecto a los compuestos que existen actualmente en el mercado, ya que con una simple elaboración del complejo de inclusión se obtiene un producto muy estable, el cual se vehicula de forma más elemental que otras alternativas basadas en aceites y emulsionantes, polielectrolitos, así como otros productos más complicados de encapsulación, con el consiguiente ahorro económico. Aunque es conocido que la estabilidad de las soluciones se puede mejorar mediante la adición de un agente surfactante, por razones de sostenibilidad medioambiental el producto objeto de la invención no los contiene en su composición.

30 En una realización preferida, la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana puede comprender adicionalmente al menos un aditivo, preferentemente un conservante, y más preferentemente metabisulfito potásico. De manera preferente, dicho aditivo estará presente en una cantidad comprendida entre 0.1% y 0.5% en peso con respecto al total de la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana. En realizaciones aún más preferidas, la cantidad de aditivo (preferentemente, conservante y más preferentemente

metabisulfito potásico) puede ser de un 0.2%, 0.3% o 0.4% en peso respecto al total. Dicho aditivo puede ser añadido en una última etapa del proceso, tras la formación del complejo de inclusión.

5 Respecto al uso de la composición reivindicada, en realizaciones particulares de la invención la composición podrá ser diluida en agua para su aplicación en agricultura, silvicultura y/o jardinería, pudiendo estar comprendida en la dilución en una cantidad de 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% o 9% en peso respecto al total del volumen de la solución final acuosa.

10

En realizaciones preferidas de la invención, la dilución acuosa puede comprender entre 140 y 230 gramos de la composición respecto a un litro de agua.

En realizaciones preferidas de la presente invención, el complejo de inclusión fertilizante, bioestimulante y antimicrobiano permite diluciones sucesivas del triptófano, es decir, 15 permite realizar diluciones con cantidades de agua muy elevadas, y tiene el efecto sorprendente de que los aminoácidos del complejo de inclusión se mantienen solubles, sin precipitar dentro del agua o sin formar un polvo aislado en la superficie libre del líquido.

20

Debido a que la arginina forma un complejo de inclusión que aumenta al menos 20 veces la solubilidad del triptófano, en realizaciones particulares de la invención el complejo de inclusión mantendrá su solubilidad en agua aún en cantidades de 1 litro de complejo de inclusión diluido en agua en una cantidad de entre 50 litros y 200 litros. De forma 25 sorprendente, se ha comprobado cómo el complejo reivindicado no acaba precipitando en la mezcla a medida que se aumenta la cantidad de agua en la solución. Ello se debe al fenómeno que se ha descrito anteriormente, referente a la biodisponibilidad del complejo de inclusión para poder aplicarse en los cultivos y poder tener un mayor efecto fertilizante, bioestimulante y antimicrobiano, como es el caso de la presente invención.

30

En base a lo descrito en el presente documento, se concluye que la composición que comprende el complejo de inclusión reivindicado es un producto fertilizante, bioestimulante y antimicrobiano óptimo para su aplicación en la agricultura, silvicultura y jardinería, tal y como se demuestra en los resultado experimentales llevados a cabo con



dichos productos, en los cuales se ha observado una disminución de las plagas de al menos el 90% respecto a las inicialmente existentes.

Como base para explicar este fenómeno, se ofrece en el presente documento un modelo  
5 teórico de formación del complejo de inclusión entre ambos aminoácidos, que es una realización preferente de la presente invención. En este caso preferido, la energía interna del complejo de inclusión objeto de la invención es de -952.8 kcal/mol, que es muy inferior al contenido energético de los aminoácidos por separado, demostrándose la formación del complejo y su estabilidad.

10 En realizaciones particulares de la presente invención, el uso de la composición reivindicada implica su aplicación de la composición acuosa fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana en una dilución en agua. En una realización particular, puede emplearse 1 litro de la composición (concentrado del complejo) por 50, 100 o hasta 200 litros de agua,  
15 aunque lógicamente, como el efecto no se ve alterado por el volumen de disolución, puede aplicarse en cualquiera de las concentraciones que han sido previamente descritas.

## EJEMPLOS

20 1. Procedimiento de obtención y caracterización de un complejo de inclusión según ha sido reivindicado, con triptófano y arginina

25 Se parte de la producción del complejo entre ambos aminoácidos, de acuerdo con la siguiente composición y procedimiento:

A 1 litro de agua se añaden 50 gramos del aminoácido triptófano sólido en polvo y después de 5 minutos de agitación, de forma que el polvo se encuentre "mojado" y distribuido uniformemente en el agua, se añaden 100 gramos del aminoácido arginina  
30 bajo intensa agitación. Se calienta hasta alcanzar una temperatura de 50° a 70°C y se aplican ultrasonidos, siendo estas condiciones necesarias y suficientes para la formación del complejo de inclusión en agua. Se mezclan mediante agitación ambas sustancias (triptófano y arginina) y la mezcla resultante se homogeneiza introduciendo directamente en la solución el cabezal del sonicador del equipo de ultrasonidos (con una frecuencia de  
35 20 kHz). La sonicación se lleva a cabo durante periodos de 2 minutos cada uno, y un

tiempo total de 10 minutos, no dejando que la solución se caliente por encima de 70°C. Una vez formado y estabilizado el complejo, se procede a añadir 40 gramos del quelante de zinc. La solución resultante, protegida de la luz, cambia de color hasta adquirir un color amarillo ocre. Posteriormente, se puede envasar el complejo de inclusión ya  
5 formado. No se puede alterar el pH de la solución resultante para evitar que se formen precipitados no deseables.

## 2. Análisis y determinación teórica de la formación del complejo de inclusión

10 La verificación teórica de la formación del complejo se fundamenta en el estudio del contenido energético del mismo, que se calculó utilizando el software ChemBio3D Ultra 16.0 (Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA, USA) y el método de cálculo de Mecánica Molecular (MM2). Se realizaron cálculos para obtener la energía de la estructura 3D molecular, analizando y exponiendo la energía del estado basal. Cuanto menor es la  
15 energía final, mayor es la estabilidad de la molécula. El MM2 es un método que sirve para determinar la geometría, las energías moleculares, los espectros vibracionales y las entalpías de formación de moléculas en su estado basal y se utiliza habitualmente para determinar el comportamiento de grandes moléculas de importancia biológica y farmacéutica. Suele utilizarse para determinar las geometrías de grandes moléculas,  
20 como las de importancia biológica y farmacéutica, que están fuera del alcance de métodos más intensivos basados en los orbitales moleculares. Por esta razón, el MM2 no es útil para modelar estados de transición de procesos químicos con un gran espectro de pasos experimentales.

25 Se realizaron cálculos para obtener la energía de diferentes conformaciones de un mismo complejo 3D, analizando y exponiendo aquellas con menor energía de formación. Se estimaron diferentes conformaciones tridimensionales para el complejo formado. El contenido energético total, expresado en kcal/mol, de cada molécula se describe mediante la suma de las siguientes interacciones:

30

$$E_{\text{Total}} = E_{\text{Estiramiento("stretching")}} + E_{\text{Doblamiento("Bending")}} + E_{\text{Torsión("Torsion")}} + E_{\text{Interacción no vinculada("Non-bonded inte")}}$$

Para verificar el contenido energético de los dos aminoácidos por separado y del complejo formado entre ambos, se estudiaron su estructura conformacional y su

interrelación mediante formación de puentes de hidrógeno. Los resultados fueron los siguientes:

5 Para el triptófano se obtuvo un contenido energético de 4.5 kcal/mol. La estructura molecular y conformacional del triptófano se muestra en la figura 2.

Para la arginina se obtuvo un contenido energético de -3.3 kcal/mol. La estructura molecular y conformacional de la arginina se muestra en la figura 3.

10 Se llevó a cabo un primer estudio de formación de puentes de hidrógeno en el complejo de inclusión triptófano-arginina, obteniéndose un contenido energético de -8.4 kcal/mol. La estructura molecular y conformacional del complejo triptófano y arginina de este primer estudio se muestran en la figura 4.

15 Se llevó a cabo un segundo estudio de formación de puentes de hidrógeno del complejo de inclusión triptófano-arginina, obteniéndose un contenido energético de -132.2 kcal/mol. La estructura molecular y conformacional del complejo triptófano y arginina de este segundo estudio se muestran en la figura 5.

20 Se llevó a cabo un tercer estudio de formación de puentes de hidrógeno, obteniéndose un contenido energético de -342.7 kcal/mol. La estructura molecular y conformacional del complejo triptófano y arginina de este tercer estudio se muestran en la figura 6.

25 Se llevó a cabo un cuarto estudio de formación de puentes de hidrógeno, obteniéndose un contenido energético de -118.5 kcal/mol. La estructura molecular y conformacional del complejo triptófano y arginina de este cuarto estudio se muestran en la figura 7.

30 Se llevó a cabo un quinto estudio de formación de puentes de hidrógeno, obteniéndose un contenido energético de -110.6 kcal/mol. La estructura molecular y conformacional del complejo triptófano y arginina de este quinto estudio se muestran en la figura 8.

35 Se llevó a cabo un sexto caso de estudio de formación de puentes de hidrógeno, obteniéndose un contenido energético de -952.8 kcal/mol. La estructura molecular y conformacional del complejo triptófano y arginina de este sexto estudio se muestran en la figura 9.

Del estudio energético de las diferentes posibilidades de formación del complejo entre el triptófano y la arginina mediante formación de enlaces por puente de hidrógeno, se concluye que el quinto estudio es el más favorable energéticamente y por lo tanto es el que ocurre, ya que se produce la protonación del grupo guanidinio de la arginina y del grupo amino libre del triptófano, mediante la cesión de protones de los grupos carboxílicos presentes en ambos aminoácidos.

3. Uso de las soluciones acuosas del complejo descritas en el Ejemplo 1 y de los resultados obtenidos como compuesto antimicrobiano.

Se aporta en esta solicitud de patente un resumen de los resultados obtenidos en las pruebas in vitro realizadas con varios microorganismos, que se han efectuado en las instalaciones del CSIC, en concreto en el IPNA-CSIC.

15

Para determinar la capacidad antimicrobiana, se llevó a cabo el siguiente ensayo: en 100 ml de agua se sintetizó el complejo de inclusión según se ha descrito en el ejemplo 1. Posteriormente, se analizó su capacidad antimicrobiana en *Cándida albicans*, *Campilobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphiloccocus aureus* y *Salmonella entérica*, determinando el grado de crecimiento y de inhibición en diferentes diluciones consecutivas, a 1/2, 1/4, y así sucesivamente hasta 1/32. En la siguiente tabla 1 se explicitan estos valores, donde el primer valor se corresponde con el tanto por ciento de crecimiento y el segundo valor con el tanto por ciento de inhibición, siendo complementarios:

25

Tabla 1

Grado de dilución/ Organismo analizado	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
<i>Cándida albicans</i>	0/100	0.31/ 99.69	2.74/ 97.26	14.82/ 85.18	100/0	100/0
<i>Campilobacter jejuni</i>	0/100	8.83/ 91.17	9.1/ 90.9	10.2/ 89.8	14.8/ 85.2	20.72/ 79.28
<i>Escherichia coli</i>	0/100	0/100	0.62/ 99.38	0.65/ 99.35	0.72/ 99.28	50.41/ 49.59
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	0/100	1.82/ 98.18	0.43/ 99.57	0.72/ 99.28	74.12/ 25.88	87.18/ 12.82
<i>Staphiloccocus aureus</i>	0/100	0.16/ 99.84	3.68/ 96.32	6.58/ 93.42	50.46/ 49.54	65.33/ 34.67
<i>Salmonella entérica</i>	0/100	0/100	0/100	0/100	0/100	60.39/ 39.61

#### 4. Determinación espectros RMN

- 5 Con objeto de demostrar la formación del complejo de inclusión reivindicado se realizaron los espectros RMN de los dos aminoácidos independientes (el triptófano y la arginina), los cuales fueron comparados con el espectro RMN del complejo de triptófano-arginina. Los resultados se muestran en la figura 10.

10 En particular, en la figura 10(a) se muestra el espectro RMN del L-Triptófano, en la figura 10(b) se muestra el espectro RMN de la L-Arginina y en la figura 10(c) se muestra el espectro RMN del complejo-Triptófano/L-Arginina. En dicha figura 10(c) se observa una diferencia importante en la geometría y altura de los picos respecto a los espectros de los aminoácidos por separado, lo que indica la presencia del complejo de inclusión, confirmando los resultados de los estudios energéticos realizados (ejemplo 2).

## REIVINDICACIONES

1. Método para obtener un complejo de inclusión de triptófano y arginina en solución acuosa que comprende las siguientes etapas:
  - a) mezclar entre un 3% y un 6% p/v de triptófano en agua y agitar hasta obtener una mezcla dispersada;
  - b) añadir entre un 6 y un 10% p/v de arginina con respecto al total de la mezcla dispersada obtenida en la etapa anterior;
  - 10 c) calentar hasta una temperatura de entre 50 y 70°C, agitar y aplicar ultrasonidos hasta completar la disolución total del triptófano y la formación del complejo de inclusión; y
  - d) dejar enfriar hasta alcanzar una temperatura por debajo de 25°C.
  
- 15 2. Método de acuerdo con la reivindicación 1, donde los ultrasonidos se aplican con una frecuencia comprendida entre 15 y 25 kHz.
  
3. Complejo de inclusión de triptófano y arginina en solución acuosa obtenido mediante el método descrito en la reivindicación 1 o 2, caracterizado por que comprende,  
20 en peso con respecto al volumen total:
  - a) entre un 3% y un 6% de triptófano,
  - b) entre un 6% y un 10% de arginina, y
  - c) entre un 84% y un 92% de agua,y donde dicho complejo de inclusión no contiene ningún surfactante o emulsionante  
25 químico.
  
4. Composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana, caracterizada por que comprende, en peso con respecto al volumen total:
  - a) entre un 9% y un 16% del complejo de inclusión en solución acuosa según se  
30 define en la reivindicación 3, y
  - b) entre un 4% y un 8% de al menos un compuesto quelante seleccionado entre un compuesto quelante de zinc y un compuesto quelante de hierro, así como cualquiera de sus combinaciones.

5. Composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana de acuerdo a la reivindicación 4, donde el agente quelante de zinc selecciona del grupo que consiste en sulfato de zinc, gluconato de zinc, heptagluconato de zinc, acetato de zinc, etilendiaminotetraacetato de zinc (EDTA)Zn, hidroxietilendiaminotriacetato de zinc (HEEDTA)Zn, dietilentriaminopentaacetato de zinc (DTPA)Zn, etilen-diamino di-orto-hidroxi-fenil-acetato de zinc (o,p-EDDHA)Zn, etilendiaminodisuccinato de zinc (EDDS)Zn, etilendiamina-N y N'-disuccinato de zinc (EDDS)Zn, así como cualquiera de sus combinaciones.
- 10 6. Composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana, caracterizada por que comprende, en peso con respecto al volumen total:
- a) entre un 9% y un 16% del complejo de inclusión en solución acuosa según se define en la reivindicación 3, y
  - b) entre un 0.5% y un 5% de un extracto seco de alga roja.
- 15 7. Composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana puede comprender, en peso con respecto al volumen total:
- a) entre un 9% y un 16% del complejo de inclusión en solución acuosa según se define en la reivindicación 3,
  - 20 b) entre un 4% y un 8% de al menos un compuesto quelante seleccionado entre un compuesto quelante de zinc y un compuesto quelante de hierro, así como cualquiera de sus combinaciones; y
  - c) entre un 0.5% y un 5% de un extracto seco de alga roja.
- 25 8. Composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde la composición comprende adicionalmente metabisulfito potásico en una cantidad comprendida entre 0,1 a 0,5 % en peso con respecto al total de la composición.
- 30 9. Método para obtener una composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según se describe en las reivindicaciones 4, 5 u 8, caracterizado por que comprende mezclar por sonicación aplicando ultrasonidos, los siguientes componentes:
- a) entre un 9% y un 16% en peso del complejo de inclusión en solución acuosa según se define en la reivindicación 3, y

- b) entre un 4% y un 8% en peso de al menos compuesto quelante seleccionado entre un compuesto quelante de zinc y un compuesto quelante de hierro, así como cualquiera de sus combinaciones,

5 donde la mezcla se lleva a cabo a una temperatura entre 50° a 70°C, durante un tiempo de entre 5 y 15 minutos, hasta obtener una composición homogénea.

10. Método para obtener una composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según se describe en la reivindicación 6, caracterizado por que comprende mezclar por sonicación aplicando ultrasonidos, los siguientes componentes:

10 a) entre un 9% y un 16% del complejo de inclusión según se define en la reivindicación 3, y

b) entre un 0.5% y un 5% en peso de un extracto seco de alga roja, donde la mezcla se lleva a cabo a una temperatura entre 50° a 70°C, durante un tiempo de entre 5 y 15 minutos, hasta obtener una composición homogénea.

15

11. Método para obtener una composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según se describe en la reivindicación 7, caracterizado por que comprende mezclar por sonicación aplicando ultrasonidos, los siguientes componentes:

20 a) entre un 9% y un 16% del complejo de inclusión según se define en la reivindicación 3,

b) entre un 4% y un 8% en peso de al menos compuesto quelante seleccionado entre un compuesto quelante de zinc y un compuesto quelante de hierro, así como cualquiera de sus combinaciones, y

25 c) entre un 0.5% y un 5% en peso de un extracto seco de alga roja, donde la mezcla se lleva a cabo a una temperatura entre 50° a 70°C, durante un tiempo de entre 5 y 15 minutos, hasta obtener una composición homogénea.

12. Método de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11, donde los ultrasonidos se aplican con una frecuencia comprendida entre 15 y 25 kHz.

30

13. Uso de la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, para inducir la defensa auxínica en vegetales de cultivos agrícolas, silvicultura y/o jardinería.



14. Uso de la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 como fertilizante.
15. Uso de la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 como bioestimulante.
16. Uso de la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8 como antimicrobiano.
- 10 17. Uso de la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, caracterizado por que comprende aplicar la composición diluida en agua, donde el porcentaje en peso de la composición en la dilución acuosa se encuentra comprendido entre un 14 y un 23% en peso.
- 15 18. Dilución acuosa caracterizada por que comprende entre un 14% y un 23% en peso de la composición fertilizante, bioestimulante y antimicrobiana según se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8.

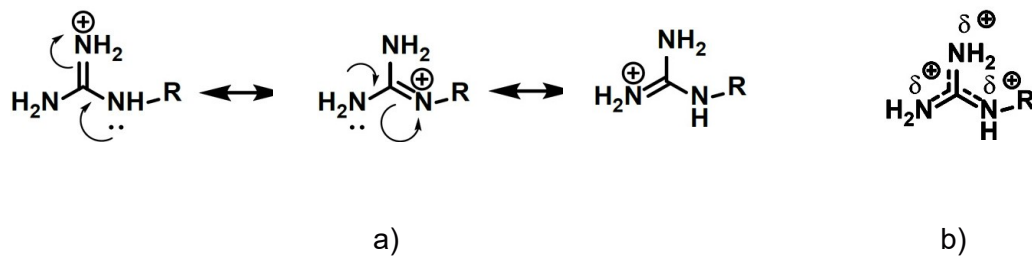


FIG. 1



FIG. 2

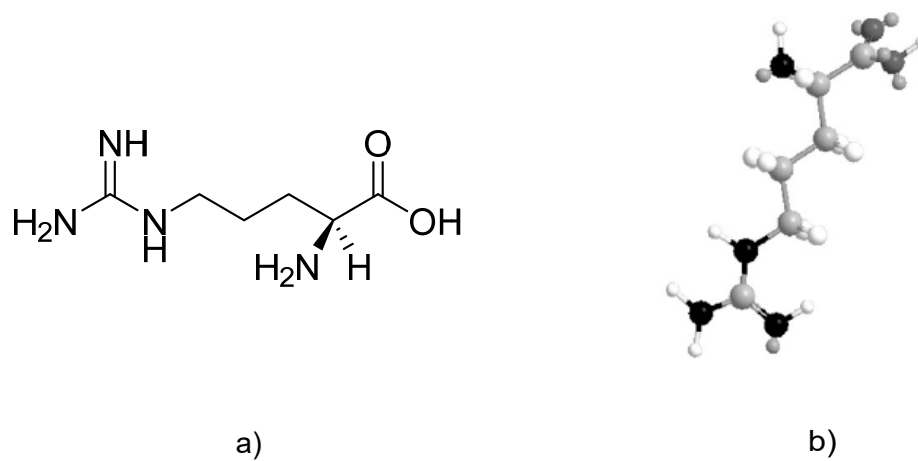


FIG. 3

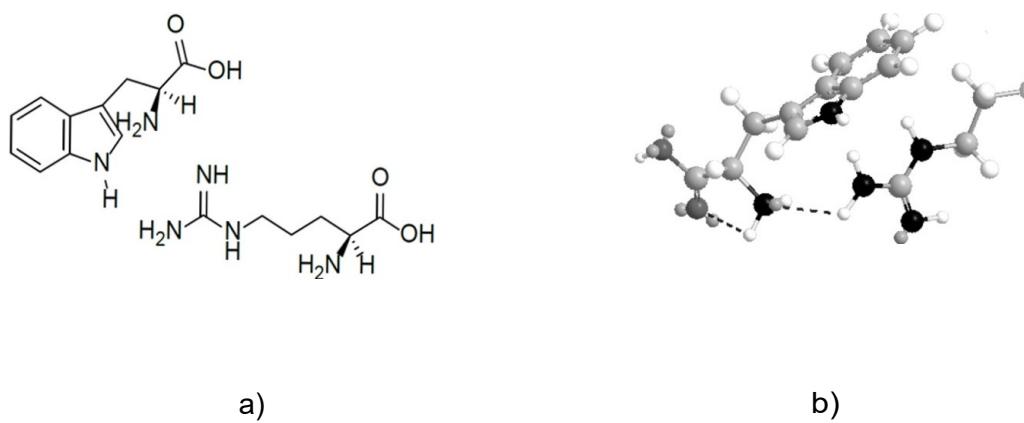
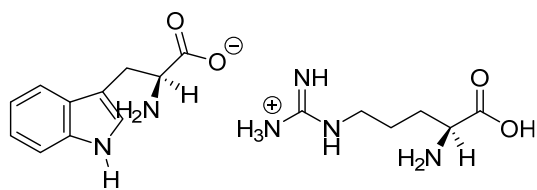
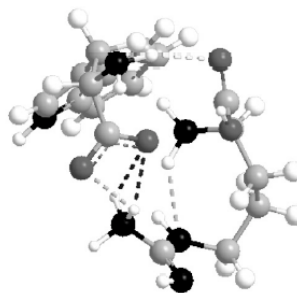


FIG. 4

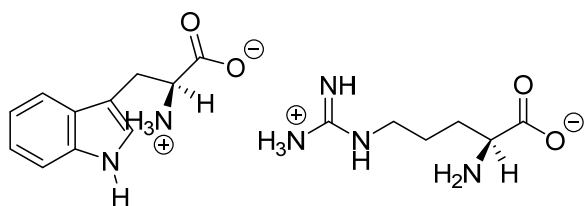


a)

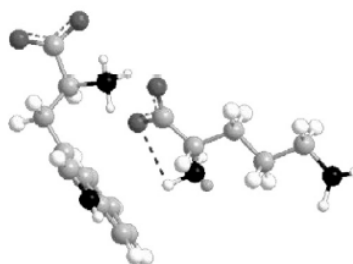


b)

FIG. 5



a)



b)

FIG. 6

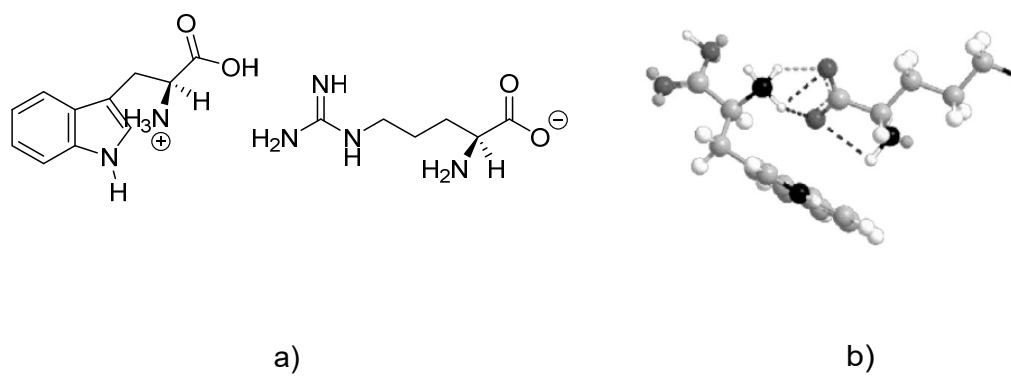


FIG. 7

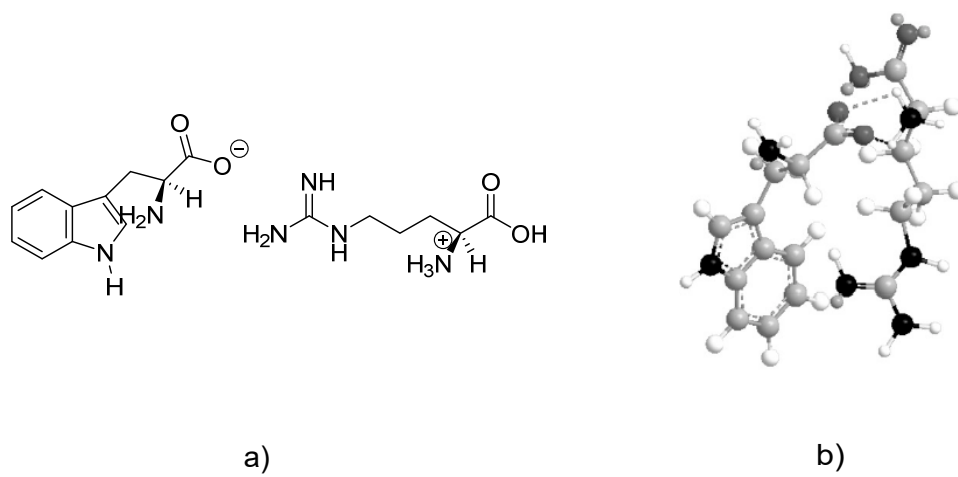


FIG. 8

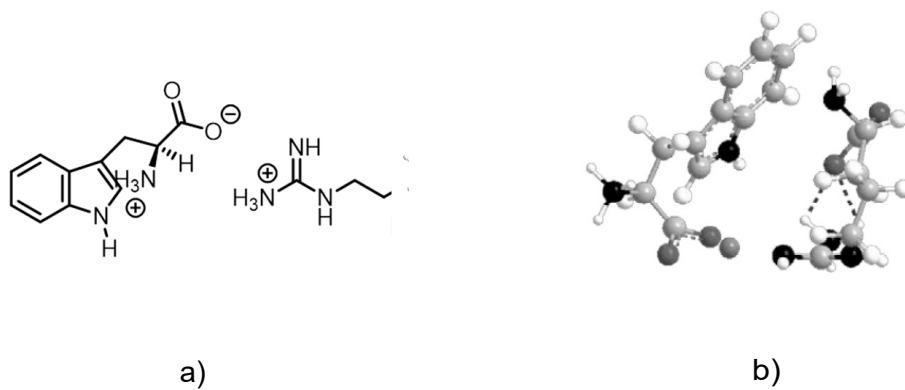


FIG. 9

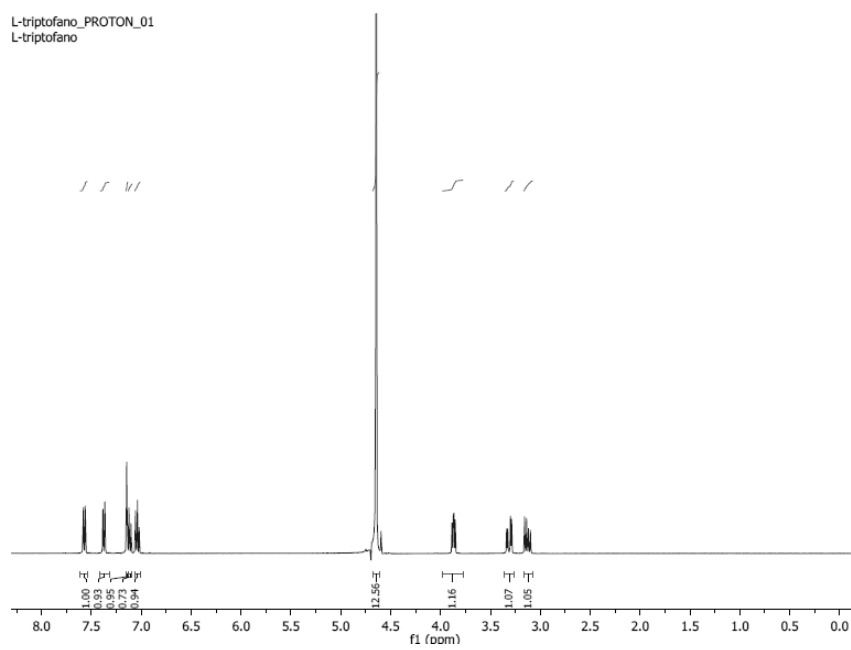


FIG. 10(a)

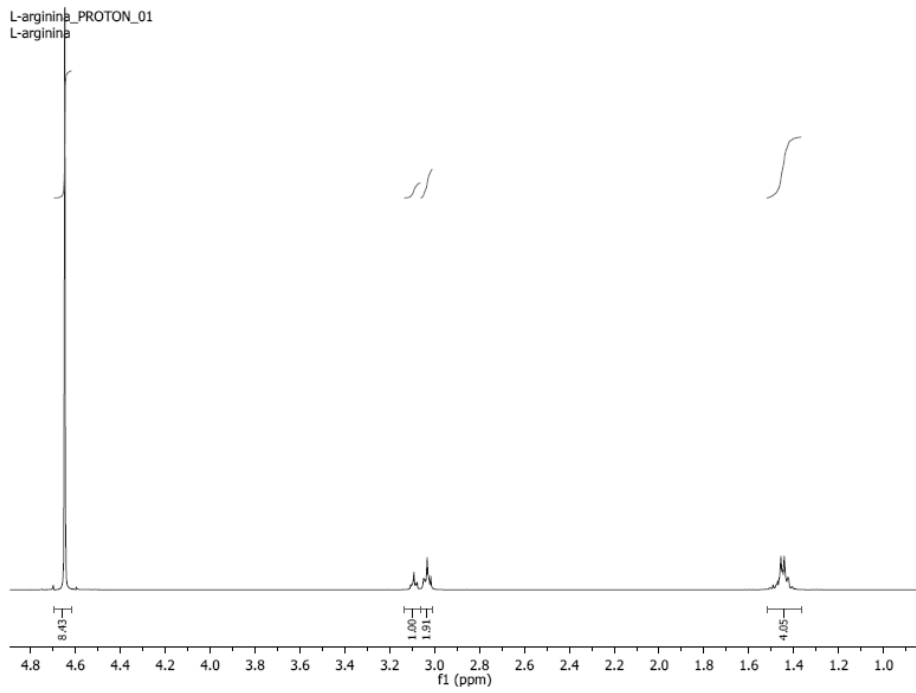


FIG. 10(b)

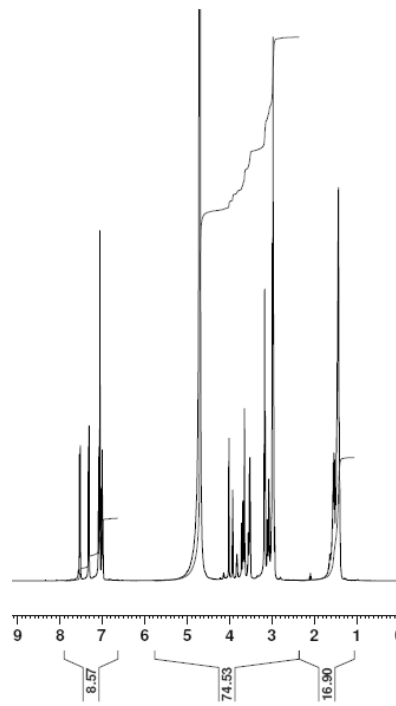


FIG. 10(c)



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②① N.º solicitud: 202230491

②② Fecha de presentación de la solicitud: 06.06.2022

③② Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CN 107827559 A (YANHE XINYAN ECOLOGICAL AGRICULTURE AND ANIMAL HUSBANDRY CO LTD) 23/03/2018, párrafos 9-21; ejemplos 1-3.	1-18
A	EP 3987931 A1 (UNIV VALLADOLID) 27/04/2022, párrafos 12-15; página 10, línea 20; reivindicaciones 1-15.	1-18
A	US 2018343860 A1 (SHIROTAKE SHOICHI) 06/12/2018, párrafos 4-30; reivindicaciones 1-5.	1-18
A	WO 2018164487 A1 (CJ CHEILJEDANG CORP) 13/09/2018, reivindicaciones 1-7.	1-18

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe  
11.04.2023

Examinador  
N. Martín Laso

Página  
1/2



CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**A01N37/50** (2006.01)

**A01N43/38** (2006.01)

**A01N37/44** (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

A01N

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXT-DB, NPL, XPESP, BIOSIS, CAS