

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 979 408**

21 Número de solicitud: 202330156

51 Int. Cl.:

A01N 43/16 (2006.01)

A01N 29/02 (2006.01)

A01N 25/02 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A01P 3/00 (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

23.02.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

25.09.2024

Fecha de concesión:

05.05.2025

45 Fecha de publicación de la concesión:

12.05.2025

73 Titular/es:

INNOVACIONES AGRONÓMICAS, S.L. (100.00%)
Pol. Ind. Los Prados, Parcela 3-11 a 3-14
30530 CIEZA (Murcia) ES

72 Inventor/es:

NAVARRO VARA, Cristian y
VÁZQUEZ MARÍN, Beatriz

74 Agente/Representante:

ABELLAN PÉREZ, Almudena

54 Título: **Producto derivado de ciclodextrinas**

57 Resumen:

Producto derivado de ciclodextrinas, para tratamiento antibacteriano y antifúngico en cultivos, que comprende un componente derivado de ciclodextrinas en un porcentaje entre el 15 y el 35%, agua en un porcentaje entre el 45 y el 65%, un coadyuvante en un porcentaje entre el 2 y el 8% y, un polisacárido en un porcentaje entre el 2 y el 8%, donde el componente derivado de ciclodextrinas es un producto de la reacción de una ciclodextrina en un porcentaje comprendido entre el 5 y el 15%, un catalizador en un porcentaje comprendido entre el 2 y el 8%, y un ácido en un porcentaje comprendido entre el 70 y el 80%.

ES 2 979 408 B2

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

DESCRIPCIÓN

Producto derivado de ciclodextrinas

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención corresponde al campo técnico agrícola, en concreto a los productos utilizados con una función antibacteriana y antifúngica, para la protección de los cultivos.

10 **Antecedentes de la Invención**

En las explotaciones agrícolas son múltiples los organismos fitopatógenos (hongos y bacterias) que pueden afectar a los cultivos, ocasionando una merma en la producción o incluso la muerte de la planta.

15

Para un correcto funcionamiento de la explotación es necesario mantenerla libre del ataque de plagas y enfermedades.

20

Estos organismos, tales como hongos y bacterias, son especialmente dañinos cuando atacan a nivel de las raíces y el cuello del cultivo, pues no se visibiliza la existencia de un problema hasta observar síntomas anómalos en tallos y hojas, siendo tarde para reaccionar. Es por ello que resulta imprescindible lograr una prevención eficaz de estas plagas.

25

En el caso de las bacterias, el control es una tarea complicada y casi imposible, que se centra en la cura de las plantas afectadas y en la prevención, la cual consiste normalmente en la rotación de cultivos, las solarizaciones de suelo, aplicación de calor, eliminación de plantas afectadas, control del riego..., siendo estas actuaciones insuficientes en muchas ocasiones, por lo que finalmente se requiere una acción sobre la planta afectada.

30

Por su parte, los hongos viven naturalmente en el suelo y por tanto se ven implicados de manera directa en el crecimiento de las plantas. Sin embargo, el desequilibrio que ocasiona la presencia de estos organismos en el cultivo es el principal causante de determinadas enfermedades en las plantas, por lo que eliminarlos es una preocupación constante y una tarea vital. Es tanto el impacto de los hongos en los cultivos, que se estima que causan la

35

pérdida de un tercio de las cosechas producidas.

En la actualidad, para el control de estos microorganismos patógenos existen dos formas, bien mediante la aplicación de fitosanitarios vía foliar o bien mediante microorganismos vía fertirriego. No obstante, ambos modos de actuación presentan desventajas.

- 5 En el caso de utilizar fitosanitarios, como ya se ha indicado, se aplican vía foliar, pues en caso contrario pueden afectar enormemente a la microbiota del suelo. Es por ello que su uso es meramente para la eliminación de patógenos en partes aéreas de los cultivos.

10 En un principio, el uso de fitosanitarios para el tratamiento de hongos y bacterias estaba muy extendido, pero dada su agresividad con el medio ambiente, actualmente existe un gran control, incluso la prohibición del uso agrícola de la mayoría de los bactericidas químicos, así como restricciones en los fungicidas, haciendo muy complicada la elección de los productos adecuados para una desinfección del suelo o sustrato de cultivo.

- 15 Por otro lado, en el caso de la utilización de microorganismos, éstos por sí solos no son capaces de eliminar la presencia de otros microorganismos, sino que lo que realizan es un control y una reducción de su número. Estos microorganismos se aplican vía fertirriego y no de manera foliar, por lo que si existen otras especies de microorganismos que afecten a partes vegetales aéreas, no se pueden reducir de este modo.

20

Como ejemplo del estado de la técnica puede mencionarse el documento de referencia WO8603939 en el que se define un compuesto fitosanitario fungicida que comprende entre un 3-90% en peso de un fungicida y 1-90% en peso de una ciclodextrina (alfa, beta o gamma). En este caso se determina que la proporción de ingrediente activo fungicida y ciclodextrina es 25 90:1-1:5, siendo el ingrediente activo fungicida preferentemente benomilo, BCM, metomeclan o fenarimol.

- 30 La ciclodextrina genera una sinergia en la actividad de activos fungicidas conocidos en parte debido a su propia actividad fungistática y en parte debido a su solubilidad. Por lo tanto, se puede lograr la misma eficiencia utilizando menor dosis de ingrediente activo.

En este compuesto se utiliza la ciclodextrina con su función principal y conocida ampliamente, de generar un encapsulado de fármacos u otras sustancias, en este caso el compuesto fitosanitario, para realizar su liberación de forma uniforme. Además, se menciona que la 35 ciclodextrina tiene actividad fungicida, por lo que realiza una acción sinérgica que permite

obtener la misma capacidad antifúngica del activo fitosanitario con una menor cantidad del mismo.

Ello significa que este compuesto así obtenido logra su efecto antifúngico a base de seguir utilizando ingredientes fitosanitarios, y aunque el uso de la ciclodextrina permita reducir la cantidad del mismo, sigue siendo un compuesto fitosanitario en el que recae la acción antifúngica del compuesto, por lo que su uso queda restringido a la aplicación foliar, no pudiendo aplicarse sobre afecciones que requieran de una desinfección del suelo o sustrato de cultivo por su agresividad con el mismo. Además, su uso estará sujeto a limitaciones, pues como ya se ha indicado, el uso de fungicidas está muy controlado.

Por tanto, dado que el uso de fitosanitarios está restringido por las consecuencias que comportan, el objetivo de encontrar un modo de actuar sobre los microorganismos patógenos en los cultivos evitando el uso de los mismos no se logra con este producto.

Por otra parte, este compuesto se define como un compuesto fitosanitario fungicida por haberse probado su efectividad sobre microorganismos tales como los hongos, pero no resulta adecuado para el tratamiento de bacterias. Se han realizado pruebas de laboratorio para constatar este hecho y el resultado ha sido de una nula acción bactericida (los datos del ensayo se aportan más adelante), por lo que no resulta un compuesto apropiado para el caso del tratamiento de bacterias en cultivos.

Por tanto, por una parte existe una limitación en el uso de fitosanitarios, y por otra, el resto de opciones existentes no logran un resultado totalmente satisfactorio, únicamente consiguen un control pero no una prevención, o no son capaces de actuar sobre ambos tipos principales de microorganismos, hongos y bacterias, por lo que cada temporada se repiten los mismos problemas. Es necesario encontrar una solución para control de este tipo de microorganismos en los cultivos, poniendo especial foco en la prevención de plagas futuras.

Descripción de la invención

El producto derivado de ciclodextrinas, para tratamiento antibacteriano y antifúngico en cultivos que aquí se presenta, comprende un componente derivado de ciclodextrinas en un porcentaje comprendido entre el 15 y el 35%, agua en un porcentaje comprendido entre el 45 y el 65%, un coadyuvante en un porcentaje comprendido entre el 2 y el 8% y, un polisacárido en un porcentaje comprendido entre el 2 y el 8%.

El derivado de ciclodextrinas es el componente responsable de aportar la función antimicrobiana al producto así obtenido.

5 Las ciclodextrinas son utilizadas como un aditivo capaz de acoger en su cavidad al principio activo, como un fármaco, para su transporte hasta la ubicación determinada (órgano o tejido), protegiéndolo de su degradación y permitiendo por tanto que actúe en la ubicación determinada con todas sus propiedades intactas. En este caso, al ser la propia ciclodextrina la que actúa como principio activo, posee elevada estabilidad para su actuación en disolución
10 sin necesidad de ningún otro elemento que la proteja.

Es especialmente importante destacar que algunos de los fitosanitarios actualmente utilizados, no ecológicos, proceden de rutas sintéticas químicas con elevado gasto de disolventes orgánicos para su síntesis y, una vez aplicados al caldo de cultivo, pueden
15 generarse reacciones secundarias como la ruptura de piretrinas en presencia de calcio. En este caso no existe este problema, pues no se utiliza ningún tipo de fitosanitario.

Además, la posterior hidrólisis de los derivados de ciclodextrina son moléculas de glucosa, que son compuestos orgánicos que tienen una fácil descomposición, que no son considerados
20 metabolitos secundarios de fitosanitarios y que además pueden cumplir otras funciones, como atrayentes de insectos polinizadores.

Por su parte, el agua presenta la función de servir de medio en el que disolver el resto de componentes de este producto, ya que en estado sólido no puede llevarse a cabo la mezcla
25 de los mismos.

El coadyuvante actúa como antiespumante, con la función de que el resto de componentes mantengan una buena tensión, evitando que pierdan propiedades mediante la aparición de espuma al entrar en actuación.

30 Finalmente, el polisacárido aporta cualidades mojantes al producto, es decir, presenta la función de disminuir el ángulo de contacto de la gota del producto derivado de ciclodextrinas así obtenido, una vez aplicado en la hoja del cultivo. Con esto se logra la propiedad de permitir la penetrabilidad de dicho producto en parte de los tejidos vegetales, especialmente hojas,
35 aumentando su eficacia y actuando sobre microorganismos capaces de reproducirse dentro de los tejidos vegetales, como ciertos hongos.

En este producto, el componente derivado de ciclodextrinas es producto de la reacción de una ciclodextrina en un porcentaje comprendido entre el 5 y el 15%, de un catalizador en un porcentaje comprendido entre el 2 y el 8%, y de un ácido en un porcentaje comprendido entre el 70 y el 80%.

Con el producto derivado de ciclodextrinas que aquí se propone se obtiene una mejora significativa del estado de la técnica.

Esto es así pues, a partir de un producto comercial como son las ciclodextrinas, que se usan generalmente para la creación de encapsulados de fármacos y aromas, se ha logrado desarrollar un producto derivado de las mismas a través de reacciones químicas de manera que este producto resulta capaz de limitar el crecimiento de determinados microorganismos, tanto bacterias como hongos, presentando por tanto una función antibacteriana y antifúngica.

Este producto aplicado vía foliar en los cultivos consigue erradicar las infecciones bacterianas y fúngicas que presentan los cultivos, e incluso, previene la aparición de estas infecciones en los mismos, es decir, presenta una doble función pues en aquellos cultivos que ya están infectados, actúa eliminando la bacteria u hongo responsable, mientras que en los cultivos que no presentan una infección, actúa previniéndola.

Además, realizados los ensayos oportunos se ha demostrado que este producto derivado de ciclodextrinas no presenta ningún tipo de efecto adverso sobre la planta.

Este producto así obtenido no contiene ningún componente formado por un fitosanitario, por lo que es completamente respetuoso con el medio ambiente. Por otra parte, presenta la ventaja de tener menos rutas sintéticas que los fitosanitarios actuales, en concreto presenta un único paso de síntesis, con lo cual tiene menores costes energéticos.

Como no se usan disolventes orgánicos en el proceso de obtención del producto, el medio de síntesis es el agua no resulta agresivo con el medio ambiente.

Por otra parte, la materia prima utilizada, es decir, las ciclodextrinas, es renovable y no tiene ninguna relación con los compuestos orgánicos obtenidos a base de reacciones químicas de productos procedentes del petróleo, por lo que son inocuas y pueden utilizarse con el objetivo

de control y prevención de plagas sin que ello suponga un efecto negativo en el medio ambiente.

Por tanto, con este producto eficaz para actuar contra microorganismos tales como bacterias y hongos en los cultivos de un modo completamente inocuo, al no contener productos fitosanitarios ni derivados de los mismos, lo que permite poder actuar tanto de modo foliar sobre las hojas de las plantas como sobre el propio suelo o sustrato de cultivo, dado que no son sustancias contaminantes.

10 Descripción detallada de un modo de realización preferente de la invención

En un modo de realización preferente de la invención, el producto derivado de ciclodextrinas, para tratamiento antibacteriano y antifúngico en cultivos que aquí se propone comprende un componente derivado de ciclodextrinas en un porcentaje comprendido entre el 15 y el 35%, agua en un porcentaje comprendido entre el 45 y el 65%, un coadyuvante en un porcentaje comprendido entre el 2 y el 8% y, un polisacárido en un porcentaje comprendido entre el 2 y el 8%.

Por su parte, el componente derivado de ciclodextrinas es producto de la reacción de una ciclodextrina en un porcentaje comprendido entre el 5 y el 15%, de un catalizador en un porcentaje comprendido entre el 2 y el 8%, y de un ácido en un porcentaje comprendido entre el 70 y el 80%.

En este modo de realización preferente de la invención, el ácido está formado por un ácido clorhídrico (HCl), siendo la relación en peso entre la ciclodextrina y el ácido una relación de 1:2.

En otros modos de realización preferida, el ácido está formado por un ácido bromhídrico (HBr), siendo la relación en peso entre la ciclodextrina y el ácido una relación de 1:3.

En otros casos, el ácido está formado por un ácido yodhídrico (HI), siendo la relación en peso entre la ciclodextrina y el ácido una relación de 1:8.

Así mismo, en otros modos de realización el ácido está formado por un ácido acético (CH_3COOH), siendo la relación en peso entre la ciclodextrina y el ácido una relación de 1:1,5, aunque puede utilizarse cualquier otro ácido que se desee para realizar esta reacción.

En este modo de realización aquí propuesto, el catalizador está formado por cloruro de zinc (ZnCl_2). En otros modos de realización puede estar formado por sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO_4), cloruro de níquel (NiCl_2), Tricloruro de hierro (FeCl_3) o una combinación de cualquiera de ellos.

Además, en este modo de realización preferente de la invención, el coadyuvante está formado por alquilpoliglucósido, aunque en otros modos de realización puede utilizarse un coadyuvante diferente, mientras que la ciclodextrina está formada por β -ciclodextrina.

En otros modos de realización preferida, la ciclodextrina puede estar formada por α -ciclodextrina, γ -ciclodextrina o δ -ciclodextrina.

Así pues, en nuestro modo de realización, en el que se utiliza β -ciclodextrina y el ácido está formado por un ácido clorhídrico (HCl), el componente derivado de ciclodextrina es cloro- β -ciclodextrina y su formulación se corresponde con $\text{C}_{42}\text{H}_{63}\text{O}_{28}\text{Cl}_7$.

Se han realizado diferentes ensayos tanto cuantitativos como cualitativos para analizar la sensibilidad de diferentes microorganismos frente al producto derivado de ciclodextrinas aquí propuesto, analizando para ello la efectividad del componente derivado de ciclodextrinas que contiene.

Se han llevado a cabo al mismo tiempo los mismos ensayos referentes a la sensibilidad de estos mismos microorganismos frente a una ciclodextrina, para poder comparar de este modo, la efectividad del producto derivado de una ciclodextrina aquí propuesto, que contiene cloro- β -ciclodextrina, con un producto que utiliza una ciclodextrina, como es el caso del documento mencionado en el estado de la técnica.

Se realizan ensayos de ambos productos sobre diferentes cepas de hongos y bacterias para analizar cómo afecta al crecimiento de los mismos.

En concreto, se han realizado ensayos sobre los siguientes microorganismos:

Bacterias:

- *Escherichia coli*
- *Bacillus amyloliquefaciens*

- *Bacillus subtilis*
- *Bacillus lichenniformis*
- *Xanthomonas campestris*

5 Hongos:

- *Fusarium oxysporum*
- *Sclerotinia sclerotiorum*
- *Verticillium dahliae*

10 1- Ensayos cuantitativos de sensibilidad de las bacterias frente a la cloro-β-ciclodextrina y a la ciclodextrina:

Para llevar a cabo estos ensayos se preparó la siembra de diluciones seriadas y una posterior cuantificación de UFC/ml, siendo UFC/ml las unidades formadoras de colonias por mililitro.

15

Para ello se realizó un preincóculo de la bacteria correspondiente en medio líquido rico LB (Luria-Bertani) que se incubó a 37° durante 24 horas, con agitación a 150rpm. Posteriormente, la densidad óptica del cultivo medida a 600 nm de longitud de onda se ajusta a 0,6 unidades de absorbancia ya que es el valor que corresponde a una concentración celular de 1,107

20 UCF/ml.

A continuación, partiendo de dicha alícuota a esa concentración, se realizaron diluciones seriadas hasta una dilución 10-5 y se sembraron 100µl de esta en la placa correspondiente mediante siembra por extensión. Se incuban las placas a 37°C durante 24h o hasta

25 crecimiento de colonias aisladas y se procedió al recuento de UFC/ml.

Para la preparación de las placas, se utilizó medio rico LB-agar en el que se incorpora tras autoclavado los compuestos analizados a una concentración final de 1,5mg/ml de materia activa. Se prepararon 3 repeticiones o réplicas para cada tratamiento y control:

30

- Una placa de control (sin materia activa)
- Una placa con Cloro-β-ciclodextrinas, con una concentración de 1,5mg/ml de materia activa
- Una placa con β-ciclodextrinas, con una concentración de 1,5mg/ml de materia activa.

35 En la siguiente tabla 1 se representan las medias de las UFC/ml obtenidas de las 3 réplicas, resultados mediante los cuales se ha calculado el % de inhibición de crecimiento de la bacteria

estudiada, tratada con los compuestos β -ciclodextrinas y cloro- β -ciclodextrina con respecto a la no tratada (control).

Los resultados obtenidos en estos ensayos son los siguientes:

5

<i>Escherichia coli</i>	Control LB	β -ciclodextrinas	Cloro- β -ciclodextrinas
UFC/ml	$3,9 \cdot 10^9$	$3,7 \cdot 10^9$	0
% Inhibición del crecimiento	0%	5,12%	100%
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Control LB	β -ciclodextrinas	Cloro- β -ciclodextrinas
UFC/ml	$9,55 \cdot 10^7$	$1,1 \cdot 10^7$	0
% Inhibición del crecimiento	0%	3,14%	100%
<i>Bacillus subtilis</i>	Control LB	β -ciclodextrinas	Cloro- β -ciclodextrinas
UFC/ml	$5,95 \cdot 10^8$	$5,63 \cdot 10^8$	0
% Inhibición del crecimiento	0%	4,58%	100%
<i>Bacillus lichenniformis</i>	Control LB	β -ciclodextrinas	Cloro- β -ciclodextrinas
UFC/ml	$3,6 \cdot 10^8$	$3,52 \cdot 10^8$	0
% Inhibición del crecimiento	0%	2,22%	100%
<i>Xanthomonas campestris</i>	Control LB	β -ciclodextrinas	Cloro- β -ciclodextrinas
UFC/ml	$4,81 \cdot 10^8$	$4,73 \cdot 10^8$	0
% Inhibición del crecimiento	0%	1,66%	100%

Los resultados obtenidos en todas las cepas bacterianas analizadas (*Escherichia coli*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis* y *Xanthomonas campestris*) comparados con la muestra de control, y a una concentración de 1,5mg/ml de materia activa reflejan que, para un caso del tratamiento con un producto que utiliza β -ciclodextrinas de forma

10

similar a lo que ocurre con el documento mencionado en el apartado del estado de la técnica, el resultado obtenido es un número muy similar de unidades formadoras de colonias (UFC/ml) y un porcentaje de inhibición de dicho crecimiento muy reducido.

5 Por el contrario, para un caso del tratamiento con un producto derivado de ciclodextrinas como el que aquí se propone, es decir que contiene cloro- β -ciclodextrinas, tras el tratamiento con el mismo se observa una letalidad total (ausencia de crecimiento) de bacterias en la muestra. Esto nos lleva igualmente a un 100% del porcentaje de inhibición del crecimiento de dichas bacterias analizadas tras el tratamiento.

10

Este resultado era esperable en el caso del producto a base de β -ciclodextrinas utilizado en el documento del estado de la técnica, pues en el mismo se determina su capacidad antifúngica, pero no se menciona que tenga efectividad alguna en el tratamiento sobre bacterias y, se ha demostrado tras realizar estos ensayos, que efectivamente no tiene poder antibacteriano, al contrario de lo que ocurre con el producto derivado de las ciclodextrinas con cloro- β -ciclodextrinas aquí propuesto.

15

2- Ensayos cuantitativos de sensibilidad de los hongos frente a la cloro- β -ciclodextrina y a la ciclodextrina:

20

En el caso de los hongos, la respuesta a los compuestos analizados en este estudio se clasifica en función del índice de crecimiento radial (ICR) de las colonias, atendiendo a la escala propuesta por Matheron and Porchas (2000) y que se muestra a continuación:

25 Escala de tolerancia al compuesto:

>70% ICR	Sensible
10-70% ICR	Moderadamente sensible
0-10% ICR	Insensible

30

Para la elaboración de este ensayo se colocaron cubos de 5x5mm con micelio del patógeno fúngico en el centro de la placa Petri contenido en un medio formado por potato dextrose agar (PDA) más el compuesto correspondiente, es decir en un caso con β -ciclodextrinas y en otro con cloro- β -ciclodextrinas.

35

Además, se ha realizado igualmente unas muestras de control para las cuales se han utilizado cubos de 5x5mm del patógeno sobre un medio PDA sin ninguno de los dos compuestos.

5 Todas las placas sembradas se incubaron a temperatura ambiente con ciclos de día y noche y se evaluaron periódicamente midiéndose el crecimiento radial del patógeno en milímetros (mm).

La evaluación concluyó cuando el micelio del patógeno cubrió totalmente la placa del control. Para la preparación de las placas, se utiliza medio rico PDA en las que se incorpora, tras autoclavado, los compuestos analizados a una concentración final de 1,5mg/ml de materia activa, es decir:

- Una placa de control (sin materia activa)
- Una placa con Cloro-β-ciclodextrinas, con una concentración de 1,5mg/ml de materia activa
- 15 - Una placa con β-ciclodextrinas, con una concentración de 1,5mg/ml de materia activa.

Se prepararon tres repeticiones o réplicas para cada tratamiento y control. La eficacia de los compuestos en el control del patógeno se ha expresado como el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (PICM). Para esto se emplea la fórmula de Pandey et al. (1982), que se muestra a continuación:

$$I = \frac{R1 - R2}{R1} * 100$$

Se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de los diferentes patógenos tratados con ambos compuestos, comparándolos con el resultado obtenido en la placa de control. Dichos resultados se muestran en la tabla siguiente:

Tratamiento	% ICM		
	Fusarium oxysporum	Sclerotinia sclerotiorum	Verticillium dahliae
β-ciclodextrinas	2	11	5
Cloro-β-ciclodextrinas	93	100	100

Como puede observarse, estos resultados muestran una ligera inhibición del crecimiento micelial de las cepas fúngicas estudiadas tratadas con β -ciclodextrinas, como es el caso del documento mencionado en el apartado del estado de la técnica, a una concentración final de 1,5mg/ml con respecto al control sin tratar, mientras que en el caso del tratamiento con Cloro- β -ciclodextrinas a la misma concentración, el porcentaje de ICM es de casi el 100% en todos los casos analizados con respecto al control. Por lo tanto, estos resultados sugieren un aumento de la eficacia de acción fungicida o fungistática del compuesto Cloro- β -ciclodextrinas frente a las β -ciclodextrinas a la misma concentración.

3- Ensayo cualitativo de sensibilidad para la bacteria *Escherichia coli* frente a la cloro- β -ciclodextrina.

En lo que respecta a los ensayos cualitativos, se prepararon las placas de medio de cultivo sólido con el producto derivado de ciclodextrinas, cloro- β -ciclodextrinas, a diferentes concentraciones, y sin el producto, actuando este último como control.

En el caso de bacterias y en este caso en concreto, la bacteria *Escherichia coli*, los ensayos cualitativos se llevaron a cabo mediante diluciones seriadas. Para ello se realiza un precultivo de dicha bacteria en medio líquido (LB) que se incubó a 35° durante 24 horas y posteriormente la densidad óptica medida a 600 nm de longitud de onda se ajustó a 0,6 unidades de absorbancia, pues este es el valor que corresponde a una concentración celular de $1 \cdot 10^7$ UCF/ml.

A continuación, partiendo de dicha alícuota a esa concentración, se realizaron diluciones seriadas hasta una concentración 10^{-2} y se sembraron en orden de concentración 10 μ l de cada una de las diluciones en la placa depositándolo en forma de gota.

Se incubaron a 35°C durante un rango de 24 a 72 horas. Las concentraciones utilizadas del producto fueron 50, 100, 125 y, 150 μ l en 25 ml de medio.

La conclusión obtenida de la observación cualitativa de las muestras es que existe un claro aumento de la sensibilidad bacteriana al producto derivado de ciclodextrinas con respecto a la muestras de control, a partir de una concentración del mismo de 100 μ l, llegando a producir incluso la letalidad de la bacteria.

En este caso el ensayo se lleva a cabo mediante un producto en el que el componente derivado de ciclodextrinas está formado por β -ciclodextrina y el ácido utilizado es yodo, es decir, yodo- β -ciclodextrina.

- 5 4- Ensayo cualitativo de sensibilidad para el hongo *Fusarium oxysporum* frente a la cloro- β -ciclodextrina.

En este caso, nuevamente se prepararon las placas de medio de cultivo sólido con el producto derivado de ciclodextrinas, cloro- β -ciclodextrinas, a diferentes concentraciones, y sin el
10 producto, actuando este último como control.

En el caso de los hongos, y en concreto, el hongo *Fusarium oxysporum*, los ensayos se realizaron mediante la colocación en el centro de la placa de un cubo de 5x5 mm de agar con el hongo crecido previamente y se incubó a temperatura ambiente durante el tiempo necesario
15 para cada cepa.

De nuevo, las concentraciones consideradas del producto son 50, 100, 125 y, 150 μ l en 25 ml de medio.

- 20 Se inocularon las diferentes placas, incluida la de control, y se observó en el ensayo cualitativo que, según aumenta la concentración del producto derivado de las ciclodextrinas va disminuyendo el crecimiento del hongo y por lo tanto actúa como un antifúngico.

En este caso en concreto el producto está formado mediante un componente derivado de una
25 β -ciclodextrina siendo el ácido un ácido clorhídrico (HCl), es decir, cloro- β -ciclodextrina.

REIVINDICACIONES

- 1- Producto derivado de ciclodextrinas, para tratamiento antibacteriano y antifúngico en cultivos, **caracterizado por que** comprende un componente derivado de ciclodextrinas en un porcentaje comprendido entre el 15 y el 35%, agua en un porcentaje comprendido entre el 45 y el 65%, un coadyuvante en un porcentaje comprendido entre el 2 y el 8% y, un polisacárido en un porcentaje comprendido entre el 2 y el 8%, donde el componente derivado de ciclodextrinas es producto de la reacción de
 - una ciclodextrina en un porcentaje comprendido entre el 5 y el 15%;
 - un catalizador en un porcentaje comprendido entre el 2 y el 8%, y;
 - un ácido en un porcentaje comprendido entre el 70 y el 80%.
- 2- Producto según la reivindicación 1, donde el ácido está formado por un ácido clorhídrico (HCl), siendo la relación en peso entre la ciclodextrina y el ácido una relación de 1:2.
- 3- Producto según la reivindicación 1, donde el ácido está formado por un ácido bromhídrico (HBr), siendo la relación en peso entre la ciclodextrina y el ácido una relación de 1:3.
- 4- Producto según la reivindicación 1, donde el ácido está formado por un ácido yodhídrico (HI), siendo la relación en peso entre la ciclodextrina y el ácido una relación de 1:8.
- 5- Producto según la reivindicación 1, donde el ácido está formado por un ácido acético (CH₃COOH), siendo la relación en peso entre la ciclodextrina y el ácido una relación de 1:1,5.
- 6- Producto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el catalizador está formado por cloruro de zinc (ZnCl₂) y/o sulfato de zinc heptahidratado (ZnSO₄) y/o cloruro de níquel (NiCl₂) y/o Tricloruro de hierro (FeCl₃).
- 7- Producto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el coadyuvante está formado por alquilpoliglucósido.
- 8- Producto según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la ciclodextrina está formada por β-ciclodextrina.
- 9- Producto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la ciclodextrina está formada por α-ciclodextrina, γ- ciclodextrina o δ- ciclodextrina.