

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 645 757**

21 Número de solicitud: 201630592

51 Int. Cl.:

**A01G 17/18** (2006.01)

**A01N 25/34** (2006.01)

**A01N 63/02** (2006.01)

**A61L 15/28** (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

**06.05.2016**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**07.12.2017**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2017/070278**

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)  
C/ Serrano, 117  
28006 Madrid ES y  
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
AGRIGENÓMICA (50.0%)**

72 Inventor/es:

**LAROMAINE SAGUÉ, Anna y  
SÁNCHEZ COLL, Nuria**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **MÉTODO PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS VEGETALES DAÑADOS**

57 Resumen:

Método para la regeneración de tejidos vegetales dañados.

La presente invención proporciona un método para regenerar tejidos vegetales dañados. Dicho método está basado en el uso de celulosa, preferiblemente celulosa bacteriana (CB), la cual se aplica directamente sobre la zona dañada permitiendo su rápida cicatrización. La presente invención demuestra así el potencial regenerador de la celulosa, preferiblemente celulosa bacteriana, sobre heridas en plantas. En una realización preferida del método de la invención, se emplea la celulosa en combinación con nanopartículas de plata para, además de regenerar el tejido, prevenir y/o tratar infecciones bacterianas en el mismo.

**ES 2 645 757 A1**

**MÉTODO PARA LA REGENERACIÓN DE TEJIDOS VEGETALES DAÑADOS**

**DESCRIPCIÓN**

5 La presente invención se encuadra dentro del campo de la agricultura y la botánica, específicamente dentro de los métodos y materiales útiles para la regeneración de heridas en plantas.

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

10

Las heridas en plantas se producen frecuentemente por cortes durante los procesos de recolección de sus frutos y, en general, durante la actividad de la industria agrícola. Aunque dichas heridas pueden también producirse por otras diversas causas como, por ejemplo, agresiones naturales, infecciones por organismos fitopatógenos o  
15 manipulación humana. Las heridas en plantas representan una peligrosa vía de entrada para organismos patógenos, facilitando así el desarrollo de graves infecciones en los tejidos vegetales que pueden hacerse extensibles a la totalidad de la planta, lo que puede conducir en último término a graves pérdidas en los cultivos agrícolas. La curación de heridas en tejidos vegetales es, por tanto, un desafío de gran relevancia  
20 para la industria agrícola y de injertos.

20

En este sentido, se han desarrollado diversas aproximaciones para solventar este problema. Una de ellas es la descrita en ES2163977A1, donde se divulga una composición impermeabilizante-sellante de cortes en árboles, que tiene como  
25 productos principales una emulsión copolimérica eteno-vinílica, productos aislante-barrera respecto al ozono, triésteres de ácidos grasos y glicerina; un coloide protector a base de un coloide de éter hidroxietílico de celulosa y un tapa-poros a base de cuarzo. Por otro lado, JPH1033069A describe un parche para tratar heridas de plantas, que se obtiene mezclando polvo de quitina con un caucho natural no  
30 vulcanizado, además de componentes tales como un agente antibacteriano, un agente antifúngico, un plastificante y un material natural como polvo de celulosa como material de relleno. EP0290155A2 se refiere a un material absorbente en forma laminar para aplicación en heridas de plantas que comprende varias capas de diferentes materiales. Por último, CN102334514A se refiere a un agente para curar  
35 heridas en árboles que, entre otros componentes, contiene hidroxietil celulosa, carboximetil celulosa y hidroxipropil celulosa.

35

La celulosa constituye un biopolímero casi inagotable, siendo el polisacárido natural más abundante de la biosfera. La celulosa, con una estructura jerárquica compleja, y más recientemente la nanocelulosa o los nanocristales de celulosa, están siendo activamente investigados en el diseño de nuevos (bio)nanocompuestos.

5

Aunque la celulosa se obtiene predominantemente a partir de plantas, también puede ser sintetizada por bacterias, algas y hongos. En particular, la celulosa bacteriana (CB) producida por microbios tiene la misma fórmula molecular que la celulosa vegetal pero tiene la particularidad de ser un biopolímero puro que presenta un mayor grado de polimerización y una mejor cristalinidad. La CB también presenta alta porosidad, es transparente en el UV-NIR y tiene una alta capacidad de retención de agua. Además, una característica singular de la CB es la posibilidad de modificar durante la biosíntesis su estructura micro (nano) y su forma.

10

15

Se ha observado que la CB tiene efectos importantes en la regeneración de heridas en humanos, sobre todo en recuperación de quemaduras (Czaja W., *et al.*, 2006, *Biomaterials*, 27: 145; Rajwade JM., *et al.*, 2015, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99: 2491).

20

Se requieren, por tanto, nuevos tratamientos para la regeneración de heridas en tejidos vegetales que permitan una correcta cicatrización del tejido y que, preferiblemente, ayuden también a prevenir y/o tratar infecciones provocadas por organismos patógenos que se puedan ver favorecidas por la existencia de daños en la estructura tisular.

25

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

30

La presente invención proporciona un método para regenerar eficazmente tejidos vegetales dañados. Dicho método está basado en el uso de celulosa, preferiblemente celulosa bacteriana (CB), la cual se aplica directamente sobre la zona dañada permitiendo su rápida curación o cicatrización. La presente invención demuestra así el potencial regenerador de la celulosa, preferiblemente de la celulosa bacteriana, sobre heridas en plantas. El método descrito en la presente invención aporta un material de composición química a la estructura de la planta.

35

Este método presenta la ventaja de que permite una correcta y completa cicatrización del área dañada en un periodo corto de tiempo ya que, como demuestran los ejemplos descritos más adelante, la creación de nuevo tejido en las áreas dañadas se puede observar al cabo de aproximadamente, aunque sin limitarnos, 48h.

5

Además, dicho método es de aplicación en la regeneración de heridas provocadas por cualquier causa, desde cortes hasta daños provocados por abrasión, en cualquier tipo de tejido, aunque preferiblemente en tejidos no lignificados, y en cualquier tipo de planta.

10

Por otro lado, la celulosa empleada en el método de la invención puede utilizarse en combinación con uno o varios componentes antibacterianos, antifúngicos y/o antivirales, tales como nanopartículas de plata, permitiendo así adicionalmente la prevención y/o tratamiento de infecciones bacterianas, fúngicas o víricas sobre la zona dañada de la planta.

15

Así, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un método para la curación, cicatrización o regeneración de heridas en plantas, para la regeneración tisular vegetal o para regenerar tejidos vegetales dañados, de ahora en adelante “método de la invención”, que comprende:

20

- a. poner en contacto, preferiblemente directo, el tejido vegetal dañado con celulosa, preferiblemente con una lámina de celulosa, y
- b. permitir la regeneración del tejido vegetal dañado.

25

Preferiblemente, en el paso (a) del método de la invención la celulosa se aplica directamente sobre el tejido vegetal dañado, *ex vivo* o *in vivo*, de manera que dicha celulosa cubra total o parcialmente, más preferiblemente totalmente, el área afectada.

30

La “celulosa” es el principal componente de las paredes celulares vegetales. Desde el punto de vista bioquímico, la celulosa  $(C_6H_{10}O_5)_n$  con un valor mínimo de  $n = 200$ , es un polímero natural, constituido por una larga cadena de carbohidratos polisacáridos. La estructura de la celulosa se forma por la unión de moléculas de  $\beta$ -glucosa a través de enlaces  $\beta$ -1,4-glucosídico, lo que hace que sea insoluble en agua. La celulosa

35 tiene una estructura lineal o fibrosa, en la que se establecen múltiples puentes de hidrógeno entre los grupos hidroxilo de distintas cadenas yuxtapuestas de glucosa,

5 haciéndolas muy resistentes e insolubles al agua. De esta manera, se originan fibras compactas que constituyen la pared celular de las células vegetales, dándoles así la necesaria rigidez. La celulosa se puede extraer u obtener de fuentes vegetales, particularmente de plantas leñosas, tales como por ejemplo aunque sin limitarnos, árboles, como el pino o el eucalipto, u otras plantas, tales como pastos, bambúes, almidón, trigo, maíz, cebada, sorgo, bagazo de caña de azúcar, algodones, linos, cáñamos u otros. La celulosa se puede también obtener de otras fuentes no vegetales, tales como bacterias, algas u hongos, o por síntesis enzimática *in vitro* o síntesis química *in vitro* a partir de derivados de glucosa bencilados. Ejemplos de bacterias a partir de las cuales se puede obtener celulosa bacteriana son, aunque sin limitarnos, bacterias de los géneros *Dictyostelium*, *Acetobacter*, *Alcali-genes*, *Pseudomonas*, *Aerobacter*, *Achromobacter*, *Azotobacter*, *Salmonella*, *Sarcina*, *Agrobacterium*, *Rhizobium* o *Gluconacetobacter*. Un ejemplo de hongos a partir de los cuales se puede obtener celulosa fúngica es, aunque sin limitarnos, *Trichoderma reesei*. Ejemplos de algas a partir de las cuales se puede obtener celulosa son, aunque sin limitarnos, *Cladophora*, *Rhodophyta*, *Pyrrophyta*, *Chrysophyceae*, *Xanthophyceae*, *Phaeophyta* o *Chlorophyta*.

20 La celulosa tal y como se define en la presente invención puede ser, aunque sin limitarnos, lignocelulosa, celulosa vegetal, celulosa de origen bacteriano, celulosa de origen fúngico, fibras de celulosa, celulosa nanocompuesta o cristales de celulosa, preferiblemente nanocelulosa, celulosa microcristalina o nanocristales de celulosa.

25 En una realización preferida del método de la invención, la celulosa es celulosa vegetal o bacteriana. La celulosa bacteriana, producida por microorganismos, tiene la misma fórmula molecular que la celulosa vegetal, por lo que ambas pueden ser aplicadas indistintamente en el método descrito en la presente invención al presentar propiedades físico-químicas similares. Los ejemplos mostrados más adelante demuestran la utilidad de ambos tipos de celulosa, vegetal y bacteriana, en la curación de heridas en tejidos vegetales. Sin embargo, la celulosa bacteriana presenta las ventajas de que tiene un mayor grado de polimerización que la celulosa vegetal y una mejor cristalinidad y pureza. Además, presenta alta porosidad y una alta capacidad de retención de agua. Por todo ello, este tipo de celulosa es la preferiblemente empleada en el método de regeneración de tejido vegetal dañado descrito en la presente invención. Así, en una realización más preferida, la celulosa es celulosa bacteriana.

La “celulosa bacteriana” o “CB” es aquella celulosa formada y secretada por bacterias, preferiblemente en cultivo. La CB, por su pureza y estructura altamente cristalina, destaca como fuente alternativa a la de origen vegetal. La producción de CB en el reino Monera está diversificada, la síntesis se observa en especies dentro de los  
5 géneros, pero sin limitarnos, *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Sarcina*, *Zoogloea* y *Gluconacetobacter*, a este último pertenece *G. xylinus*, la especie con mayor capacidad productora. Esta bacteria permite la biogénesis de CB a partir de una gran variedad de sustratos, rindiendo un producto de alta pureza (libre de lignina y hemicelulosa) y de estructura similar a la de origen vegetal. Este microorganismo  
10 presenta además la ventaja de una fácil manipulación. Por ello, en una realización aún más preferida, la celulosa bacteriana es producida por bacterias del género *Gluconacetobacter*. En una realización particular, la bacteria del género *Gluconacetobacter* se selecciona de entre *Gluconacetobacter xylinus* o *Gluconacetobacter europaeus*. De entre estas dos bacterias, *G. xylinus* es la más  
15 preferida en la presente invención, ya que presenta una elevada velocidad de producción de celulosa.

*Gluconacetobacter xylinus* (anteriormente *Acetobacter xylinum*), es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Acetobacteraceae*; aerobio estricto que realiza la  
20 oxidación incompleta de diversos azúcares y alcoholes (proceso conocido como fermentación oxidativa). Su hábitat natural son frutas y vegetales en proceso de descomposición; es capaz de producir CB sobre medios líquidos y sólidos formando una “película” o “nata” sobre la superficie. La película de CB funciona como mecanismo de “flotación”, permitiéndole a *G. xylinus* estar en la interfase aire/líquido  
25 para obtener con mayor facilidad el O<sub>2</sub> necesario para su crecimiento. La película es una barrera física que protege a la bacteria de la radiación UV, aumenta la capacidad de colonizar sustratos y su carácter altamente higroscópico le permite retener humedad previniendo la desecación del sustrato. Dos características son particulares de las microfibrillas de CB: su polaridad es unidireccional y son de grosor variable. El  
30 mecanismo de cristalización de las microfibrillas en *G. xylinus* puede dar origen a dos aloformas de celulosa: si las microfibrillas se orientan en forma paralela se sintetiza celulosa I, mientras que si el arreglo de las microfibrillas es antiparalela se obtiene celulosa II. Tanto la celulosa I como la celulosa II se encuentran dentro del alcance de la presente invención. La microestructura de la CB está conformada por microfibrillas  
35 con un diámetro de 4 a 7 nm y un grado de polimerización de 2.000 hasta 14.000 moléculas de glucosa. Las microfibrillas a su vez cristalizan en paquetes y cintas, las

5 cuales alcanzan un grosor de 1 a 9  $\mu\text{m}$  y forman una extensa estructura reticulada estabilizada por puentes de hidrógeno. La condensación de las cintas da lugar a la estructura tridimensional o macroestructura de la CB. La macroestructura de la CB es totalmente dependiente de las condiciones de cultivo; así, en condiciones de cultivo  
10 estático se genera una “película” o “nata” en la interfase aire/líquido del medio de cultivo. Las microfibrillas, que son continuamente liberadas por la bacteria, se cristalizan en cintas, las cuales se solapan formando planos paralelos. En cultivo agitado, se logra un menor grado de agrupamiento, la cantidad de planos paralelos es menor y en consecuencia se forman gránulos irregulares, cadenas fibrosas o ramificadas de CB. En el contexto de la presente invención, la CB se produce preferiblemente en condiciones de cultivo estático, generándose así una “película” en la interfase aire/sustrato del medio de cultivo.

15 Como ya se ha comentado, la CB presenta una pureza superior a la presente en la celulosa procedente de cualquier fuente vegetal, lo cual le otorga una serie de características ventajosas, tales como, alto grado de cristalización, alta resistencia a la presión, elasticidad y durabilidad. La celulosa tiene alta capacidad para absorber agua y debido a un menor diámetro de las microfibrillas, la CB posee una mayor área superficial que la presente en la celulosa de madera. Además de estas propiedades  
20 fisicoquímicas de importancia industrial, la CB es inerte metabólicamente, no tóxica, ni provoca reacción alérgica al contacto, propiedades de particular importancia para el fin descrito en la presente invención.

25 La CB se puede producir por síntesis química *in vitro* o bien mediante, por ejemplo aunque sin limitarnos, el cultivo de la bacteria productora en presencia de un medio de cultivo y de unas condiciones de cultivo (pH, T°, oxigenación, luz/oscuridad, CO<sub>2</sub>, etc.) adecuados para la producción de celulosa. Los expertos en la materia reconocerán los medios de cultivo bacterianos y las condiciones de cultivo que pueden ser empleados para tal fin.

30 El “medio de cultivo” es un medio nutritivo adecuado, es decir, que comprende los nutrientes necesarios para el mantenimiento y crecimiento *in vitro* de la bacteria productora, para el desarrollo de su actividad metabólica y, por tanto, para la producción de CB. Dicho medio de cultivo puede ser líquido, sólido o semisólido,  
35 aunque preferiblemente es líquido. Para que la bacteria crezca adecuadamente en el medio de cultivo, éste debe reunir una serie de condiciones como son temperatura,

grado de humedad, luz/oscuridad y presión de oxígeno adecuadas, así como un grado correcto de acidez o alcalinidad (pH). Asimismo, el medio de cultivo debe estar exento de todo microorganismo contaminante.

5 Por tanto, la bacteria productora se puede cultivar en un medio de cultivo sólido, semisólido o líquido, preferiblemente líquido, en presencia de las sales y nutrientes adecuados para favorecer el crecimiento y proliferación de las células bacterianas. El medio nutritivo adecuado comprende, por ejemplo aunque sin limitarnos, agar o  
10 gelatina o albúmina, fuentes de carbono (por ejemplo, glucosa, sacarosa o manitol), fuentes de nitrógeno (por ejemplo, peptonas), azufre, fósforo, fuentes de vitaminas, aminoácidos y hormonas y/o factores de crecimiento (por ejemplo, extracto de carne o extracto de levadura), sales inorgánicas (por ejemplo, sodio o potasio), iones de hidrógeno, ácido cítrico, etc.

15 La bacteria se puede cultivar, por ejemplo, aunque sin limitarnos, mediante cultivo en matraz o Erlenmeyer y crecimiento a pequeña o a gran escala llevada a cabo en un biorreactor de laboratorio o industrial, en un medio adecuado y en condiciones que permitan la producción de CB. Preferiblemente, la bacteria se cultiva inicialmente en medio sólido, por ejemplo aunque sin limitarnos, en agar, y posteriormente se  
20 transfiere el cultivo a un medio líquido para ser ampliado.

El cultivo de la bacteria, preferiblemente de *G. xylinus*, para la producción de celulosa se practica más preferiblemente en condiciones estáticas. El rango de temperatura óptima para los cultivos es de 20 a 35° C, temperatura a la cual se lleva a cabo la  
25 producción. El pH del medio de cultivo puede variar de preferiblemente 4.0 a 6.0, siendo el pH óptimo dependiente de la cepa productora. La composición del medio de cultivo es variable acorde con la cepa utilizada, los carbohidratos son la fuente de carbono adecuada para la síntesis de CB, así la producción de CB puede darse en medios conteniendo, por ejemplo aunque sin limitarnos, sacarosa, glucosa, fructosa,  
30 lactosa o manitol. La bacteria puede sintetizar glucosa *de novo* a partir de ácido láctico o ácido succínico. El extracto de levadura es la fuente de nitrógeno de mayor empleo para el crecimiento de *G. xylinus*, y por tanto la preferida en la presente invención; peptona, polipeptona, triptona, licor de maíz y sulfato de amonio pueden ser también utilizados en la producción de CB. Es común, además, la adición de fosfato de sodio o  
35 potasio para amortiguar los cambios de pH, y la adición de sulfato o cloruro de magnesio. Los periodos de incubación son dependientes del sistema de cultivo, en

cultivo estático se prefieren largos periodos de cultivo que van, preferiblemente, de una a dos semanas, aunque periodos de 5 o más días son también adecuados.

5 La celulosa se forma así en el medio nutritivo, preferiblemente en forma de película, y se puede recuperar directamente del medio, de la interfaz aire/líquido en el caso de que el cultivo se desarrolle en medio líquido. Así, en otra realización preferida del método de la invención, la celulosa está en forma de película o lámina.

10 Preferiblemente, la película de CB formada se recoge y se somete a un tratamiento que comprende los pasos de lavado y opcionalmente secado. Más preferiblemente, el lavado comprende la inmersión de la película de CB en alcohol, preferiblemente etanol, su transferencia a un medio acuoso desionizado y un paso en el que se hierve la CB y posteriormente se neutraliza. El paso de hervido tiene lugar durante un tiempo de preferiblemente entre 30 y 50 min, más preferiblemente 40 min. Dicho paso puede  
15 repetirse varias veces, preferiblemente cuatro veces más, en presencia de NaOH a una temperatura de entre 80 y 100°C, preferiblemente 90°C, durante un tiempo de entre 10 y 30 min, preferiblemente 20 min.

20 La CB puede a continuación someterse a un paso opcional de secado, en el que se corta la celulosa con la forma y tamaño deseados y se seca a temperatura ambiente durante entre preferiblemente 3 y 5 días, más preferiblemente 4 días.

25 El método de la invención también permite regenerar tejidos vegetales dañados como consecuencia de una infección por parte de algún patógeno. Este efecto se verá particularmente potenciado si la celulosa empleada se combina con uno o varios agentes antimicrobianos, antifúngicos y/o antivirales, ya que esta aproximación permitirá no solo la regeneración del tejido afectado por la infección sino también la desaparición o reducción de la carga patogénica presente en el área afectada. Por ello, en otra realización preferida, la celulosa además comprende un agente  
30 antibacteriano, antifúngico y/o antiviral. Dicho agente puede encontrarse, aunque sin limitarnos, recubriendo la pieza de celulosa o puede estar embebido en ella.

35 En una realización más preferida, dicho agente es un agente antibacteriano, como por ejemplo aunque sin limitarnos, antibióticos, nanopartículas, micropartículas, milipartículas, perlas o esferas, etc., cargadas con al menos un agente antibacteriano, productos naturales, como ácido láctico, ácido cítrico, acético, y sus sales, aceites

esenciales, etc. En una realización aún más preferida, el agente antibacteriano son nanopartículas, aún más preferiblemente nanopartículas de plata y/o cobre.

5 Las nanopartículas, como por ejemplo las nanopartículas de plata y/o cobre, se pueden producir mediante procedimientos bien conocidos por los expertos en la materia. Por ejemplo, aunque sin limitarnos, las nanopartículas de Ag se pueden fabricar por ablación láser o por descomposición térmica de  $\text{AgNO}_3$  *in situ* bajo irradiación con microondas, como se describe en los ejemplos más adelante.

10 Por otro lado, las películas de celulosa, preferiblemente de CB, tal y como se describen en la presente invención, se adhieren mejor a la superficie vegetal dañada si éstas se encuentran humedecidas. Por ello, en otra realización preferida del método de la invención, la celulosa está mojada o húmeda.

15 Cuando la celulosa empleada en el método de la invención es celulosa vegetal ésta debe presentar una humedad relativa alta, entendiéndose por “humedad relativa alta” un alto contenido en agua, preferiblemente una humedad relativa superior al 60%, más preferiblemente una humedad relativa superior al 80% o al 90%, aún más preferiblemente una humedad relativa en torno al 99% o del 99%. Por el contrario,  
20 cuando la celulosa empleada en el método de la invención es celulosa bacteriana ésta puede presentar una humedad relativa alta o baja, entendiéndose por “humedad relativa baja” un bajo contenido en agua, preferiblemente una humedad relativa inferior al 60% o del 60%, más preferiblemente una humedad relativa del 60%.

25 En otra realización preferida, el tejido vegetal al que se refiere el método de la invención es tejido vegetal no lignificado.

Se entiende por “tejido vegetal no lignificado” o “tejido no leñoso” aquel tejido vegetal que no ha sufrido lignificación, o depósito de lignina o derivados oxigenados de la  
30 celulosa y xilanasas, en la pared celular. Es decir, aquel tejido vegetal que no comprende lignina. En una realización más preferida, el tejido vegetal se selecciona de la lista que consiste en: hoja, fruto, tallo, rama, flor o raíz. En una realización aún más preferida, el tejido vegetal son hojas.

35 El método de la invención es útil para la curación o regeneración de heridas o de tejido vegetal dañado en cualquier planta, sin embargo, en otra realización preferida el

tejido vegetal pertenece a una planta de la familia *Solanaceae*. Más preferiblemente, el tejido vegetal pertenece a *Nicotiana benthamiana* o *Solanum lycopersicum*.

5 El método de la invención es útil para la curación o regeneración de heridas o de tejido vegetal dañado por cualquier causa, sin embargo, en otra realización preferida el daño en el tejido es provocado por corte, abrasión, punción, presión, rotura o infección, más preferiblemente por corte o infección.

10 Como ya se ha comentado anteriormente, cuando la celulosa se encuentra asociada a un agente antibacteriano, antifúngico y/o antiviral, ésta es de utilidad no solo en la regeneración del daño tisular causado como consecuencia de una infección bacteriana, fúngica y/o vírica, sino también en el tratamiento y/o prevención de la infección en sí misma. Particularmente, cuando la celulosa se encuentra unida a nanopartículas de plata y/o cobre como se describe más arriba, ésta es capaz de  
15 regenerar el daño producido en el tejido como consecuencia de una infección bacteriana y además de prevenir y/o tratar dicha infección en el sentido de provocar la desaparición o reducción de la carga bacteriana en el tejido. Por ello, en una realización más preferida, el daño en el tejido es provocado por una infección, más preferiblemente por una infección bacteriana, aún más preferiblemente por una  
20 infección bacteriana provocada por una o más bacterias Gram-negativas. En una realización aún más preferida, la infección bacteriana es provocada por *E. coli* o *Pseudomonas syringae*. Como muestran los ejemplos descritos más adelante, la celulosa, preferiblemente CB, asociada a nanopartículas de Ag en contacto con el tejido vegetal en presencia de una infección por *P. syringae* previene y trata dicha  
25 infección, detectándose baja carga bacteriana, regeneración tisular y poco tejido necrotizado.

Las “infecciones” a las que se refiere la presente invención son aquellas provocadas por cualquier organismo fitopatógeno.

30

En el paso (b) del método de la invención se deja cicatrizar el tejido vegetal dañado en presencia (en contacto, preferiblemente directo) de la celulosa durante el tiempo necesario. Este paso, por tanto, tendrá lugar durante un periodo de tiempo tal que permita que se produzca la cicatrización, preferiblemente total, del área dañada. Así,  
35 el experto en la materia sabrá reconocer cuál es el tiempo necesario durante el cual el tejido vegetal dañado y la celulosa deben mantenerse en contacto. El grado de

regeneración tisular podrá determinarse, por ejemplo aunque sin limitarnos, mediante visualización de la cantidad de nuevo tejido creado en el área afectada. En los ejemplos mostrados más adelante, se demuestra regeneración tisular al cabo de, pero sin limitarnos, 48h. Por ello, en otra realización preferida del método de la invención, el paso (b) tiene lugar durante un periodo de tiempo de al menos 24 horas. En una realización más preferida, el paso (b) tiene lugar durante un periodo de tiempo de al menos 48h.

Otro aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende celulosa, preferiblemente CB, más preferiblemente en forma de una o varias lámina/s o película/s, y nanopartículas, preferiblemente nanopartículas de plata y/o cobre. En una realización preferida, la celulosa se encuentra recubierta con dichas nanopartículas, aunque también podrían estar en cualquier otra disposición, como por ejemplo embebidas en dicha celulosa. En otra realización preferida, la CB se obtiene de bacterias del género *Gluconacetobacter*. En una realización particular, la bacteria del género *Gluconacetobacter* se selecciona de entre *Gluconacetobacter xylinus* o *Gluconacetobacter europaeus*, más preferiblemente *G. xylinus*.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición como se describe en el párrafo anterior para la regeneración de tejidos vegetales dañados, preferiblemente de tejidos no lignificados, más preferiblemente de tejidos seleccionados de la lista que consiste en: hoja, fruto, tallo, rama, flor o raíz, aún más preferiblemente de hojas. Preferiblemente el daño en el tejido es provocado por una infección, más preferiblemente bacteriana, aún más preferiblemente por *E. coli* o *Pseudomonas syringae*.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición como se describe más arriba para el tratamiento y/o prevención de infecciones, preferiblemente bacterianas, más preferiblemente por *E. coli* o *Pseudomonas syringae*, en plantas o tejidos vegetales, preferiblemente no lignificados, más preferiblemente en hoja, fruto, tallo, rama, flor o raíz, aún más preferiblemente en hojas.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la

invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

## DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

**FIG. 1. Imágenes TEM de las películas de celulosa bacteriana (CB) recubiertas con nanopartículas de Ag (Ag-CB) (arriba y abajo-izquierda). Abajo-derecha, distribución por tamaño de las nanopartículas de Ag (AgNPs).**

10

**FIG. 2. Ensayo de toxicidad utilizando el biomarcador *Escherichia coli*. El grado de toxicidad de las diferentes sustancias / materiales se determina en función de su capacidad de eliminar la bacteria (aura).**

15

**FIG. 3. Ensayo de regeneración de cortes en hojas de *Nicotiana benthamiana*, a las 48h post-tratamiento con películas de celulosa bacteriana (CB).**

**FIG. 4. Ensayo de regeneración de daños provocados por punción en hoja de *Nicotiana benthamiana* en presencia y ausencia de celulosa bacteriana (CB).**

20

**FIG. 5. Microscopía electrónica de barrido (SEM) mostrando regeneración de daños provocados por corte en hojas de *Nicotiana benthamiana* en presencia y ausencia de celulosa bacteriana (CB).**

25

**FIG. 6. Efectos de la celulosa bacteriana (CB) o de la celulosa bacteriana con nanopartículas de plata (Ag-CB) sobre cortes en hojas de *Nicotiana benthamiana* que además comprenden infección por *Pseudomonas syringae*. Sobre los cortes se añadió cinta adhesiva de microporos (3M Deutschland GmbH, Neuss, Alemania) (Tape), Ag-CB, CB o nada.**

30

**FIG. 7. Efectos de la celulosa bacteriana (CB) y de la celulosa vegetal sobre cortes en hojas de *Nicotiana benthamiana*. Sobre los cortes se añadió cinta adhesiva de microporos (3M Deutschland GmbH, Neuss, Alemania) (Tape), papel de filtro (celulosa vegetal), CB o nada.**

## EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores que ponen de manifiesto la efectividad de las películas de celulosa, preferiblemente de celulosa bacteriana, en la regeneración de tejidos vegetales dañados como consecuencia de diversas agresiones de diferente naturaleza.

### EJEMPLO 1. Producción de películas de celulosa bacteriana (CB).

Las cepas bacterianas utilizadas fueron: *Gluconacetobacter xylinum* (GX) (ATCC 11142) (Yamada Y, Hoshino K, Ishikawa T (1997) Biosci, Biotechnol, Biochem 61 (8):1244-1251) y *Gluconacetobacter europaeus* (GE) (MF03) (Yamada Y, Hoshino K, Ishikawa T (1997) Biosci, Biotechnol, Biochem 61 (8):1244-1251) y se adquirieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (España).

La glucosa, peptona, extracto de levadura y agar fueron adquiridos de Conda Lab, el NaOH,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  y ácido cítrico monohidrato se compraron a Sigma Aldrich y se usaron tal y como se recibieron.

GX es la bacteria más extensamente utilizada para producir celulosa, debido a su elevada velocidad de producción. GX fue cultivada en agar sólido y una colonia aislada se amplió en medio líquido durante 3 días. Después, 8 ml de solución de GX se transfirieron a un Erlenmeyer con 200 ml de medio líquido. Una fina capa de celulosa bacteriana creció en la parte superior de los medios líquidos de más de 5 días para GX. Los medios de cultivo para GX consistieron en 20 g/l de glucosa, 5 g/l de peptona, 5 g/l de extracto de levadura, 1,15 g/l de monohidrato de ácido cítrico y 6,8 g/L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ . Las condiciones de cultivo fueron 25°C y pH 7 inicialmente.

Las películas de CB cosechadas a partir de la interfaz aire / líquido se sumergieron en etanol. Posteriormente, se transfirieron a agua desionizada (DI) y se hirvieron durante 40 min, cuatro veces más con NaOH 0,1 M a 90 ° C durante 20 min y, finalmente, se neutralizaron con agua DI durante 24 h.

Films de celulosa bacteriana no secada previamente, se cortaron en forma de piezas rectangulares de 1 x 2 cm.

Secado a temperatura ambiente (RD)

Las películas de CB se mantuvieron a temperatura ambiente durante 4 días hasta que se secaron por completo. Al secar a temperatura ambiente (RD), las presiones capilares del menisco de agua ejercen una fuerza compresiva en los poros de las películas que puede inducir la modificación de la estructura, la densidad y la porosidad de las películas de CB.

Síntesis de nanopartículas de plata

10

Las nanopartículas de plata fueron fabricadas por descomposición térmica de  $\text{AgNO}_3$  *in situ* bajo irradiación con microondas de la siguiente manera:  $\text{AgNO}_3$  y pirrolidona de polivinilo (PVP) se mezclaron en la proporción 1:10 en 4,5 ml de agua DI.

15

Los experimentos en Microondas (MW) se llevaron a cabo utilizando un reactor de CEM Discover (Explorador de 12-Hybrid) que opera a una frecuencia de 2,45 GHz y con una potencia máxima de 300 W. Convencionalmente, la potencia se ajustó automáticamente para calentar la muestra a los parámetros de reacción (temperatura y tiempo). La temperatura y la presión se controlaron mediante el uso de un sensor de infrarrojos volumen-independiente.

20

Las soluciones conteniendo  $\text{AgNO}_3$  y PVP se calentaron a 90°C durante 2 minutos en el microondas. Después, la solución se enfrió automáticamente a 50 °C mediante el uso de nitrógeno comprimido durante aproximadamente 3 min. Las películas de plata-celulosa (Ag-CB) fueron cosechadas de la solución, se limpiaron en 10 ml de agua y se sonicaron durante 3 min. La película de CB cambió de color transparente-blanco a marrón, indicando la incorporación de la AgNP (nanopartícula de Ag) en la estructura. Las nanopartículas en suspensión se separaron mediante la adición de 40 ml de acetona con 20  $\mu\text{l}$  de PVP (utilizado como surfactante electrostático) y centrifugación a 6000 rpm durante 20 min.

30

Técnicas de caracterización

Análisis termogravimétrico (TGA): el TGA de las películas de Ag-celulosa se realizó con un analizador de TGA-DSC / DTA (NETZSCH STA 449 F1 Jupiter, ICMAB) con una velocidad de calentamiento de 10 °C / min desde temperatura ambiente hasta 800

35

°C en aire. Se obtuvo una disminución de peso 96,79%, lo que indicó un peso de Ag-NPs de aprox. 0,047mg. Dado que se utilizó una banda de celulosa de 1cm<sup>2</sup> para este análisis, con un peso ponderado de 1 mg, se puede estimar que la concentración de AgNPs por unidad de superficie de es de 0,0321mg / cm<sup>2</sup> de celulosa.

5

Microscopía electrónica de barrido (SEM): Las muestras colocadas en un sustrato de aluminio SEM sobre un adhesivo de cinta de carbono permitieron la obtención de imágenes con un microscopio electrónico de barrido (QUANTA FEI 200 FEG-ESEM) en condiciones de alto vacío, un voltaje de aceleración de 10 a 30 kV, un punto del haz de electrones de 3,0, una presión de  $2-9 \times 10^{-4}$  Pa, y una distancia de 4-4,5 mm. Se pudo confirmar la distribución homogénea de AgNPs a lo largo de la superficie de la CB.

10

Microscopía electrónica de transmisión (TEM): las imágenes TEM se obtuvieron con un microscopio electrónico JEOL JEM-1210, que opera a 120 kV. El tamaño medio de las NPs se calculó mediante el ajuste a un histograma de las tallas (de al menos 200 nanopartículas) a una función de Gauss. La desviación estándar ( $\sigma$ ) se define como la raíz de la media de los cuadrados de las diferencias de todas las observaciones del tamaño medio, y la polidispersidad de la distribución (P) se define como el porcentaje de la desviación estándar ( $\sigma$ ) relacionado con el tamaño medio ( $P = \sigma / (\text{media} \cdot \text{valor}) \times 100$ ). Se obtuvo una distribución de tamaño de CB:  $17,3 \pm 8.9$  nm (Fig. 1).

15

20

UV-Vis Spectroscopy: películas Ag-CB y soluciones de Ag se analizaron en un rango de 300 a 800 nm y se observó un pico alrededor de 407- 415 nm, indicativo de la presencia de las nanopartículas. En base a la literatura, este pico indica la presencia de Ag-NPs de 15 nm.

25

### **EJEMPLO 2. Ensayo de toxicidad de las películas de celulosa bacteriana.**

*Escherichia coli* se hizo crecer en medio LB-agar durante una noche a 37 °C. Se recogió una colonia y se incubó en 4 ml de medio LB-agar líquido una noche a 37 °C. Se sembraron 2 ml del cultivo líquido con un esparcidor en medio LB-agar y se incubaron una noche a 37 °C. Se añadieron los siguientes materiales/soluciones:

30

35

- Antibiótico: 5  $\mu$ l de una solución de 10 mg / ml de gentamicina.
- Agua: 5  $\mu$ l.

- Ag-CB: una pieza de Ag-CB.
- CB: una pieza de CB.
- Ag nano: 5  $\mu$ l de una solución 62,7 mg/ml de nanopartículas de Ag (15 nm de diámetro).
- 5 - Ag nano 1:10: 5  $\mu$ l de una dilución 1:10 de la solución anterior de nanopartículas de Ag.
- AgNO<sub>3</sub>: 5  $\mu$ l de una solución de 635 mg / ml de AgNO<sub>3</sub>.
- AgNO<sub>3</sub> 1:10: 5  $\mu$ l de una dilución 1:10 de la solución de AgNO<sub>3</sub> de 635 mg / ml.
- AgNO<sub>3</sub> 1: 100: 5  $\mu$ l de una dilución 1: 100 de la solución de AgNO<sub>3</sub> de 635 mg / ml.

10

Se tomaron fotografías digitales después de 24 horas. Los resultados se muestran en la Fig. 2, donde se observa claramente que la CB sola no es tóxica para las células vivas. El experimento de toxicidad consistió en aplicar sobre una placa con crecimiento confluyente de *Escherichia coli*, bacteria biomarcadora, CB, nanopartículas de plata (Ag nano), Ag-CB o el compuesto AgNO<sub>3</sub>. Como control positivo de toxicidad se utilizó el antibiótico gentamicina y como control negativo agua. Mientras que el antibiótico, Ag nano o AgNO<sub>3</sub> son tóxicos para las bacterias –se observa un halo alrededor del lugar de aplicación-, ni el agua ni la CB lo son, no alterándose el crecimiento de la bacteria tras su aplicación.

20

### **EJEMPLO 3. Ensayo de regeneración tisular vegetal con películas de celulosa bacteriana.**

#### Cortes

25

Plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron sembradas en bandeja de alveolos durante una semana. Las plántulas se transfirieron a macetas individuales (5 ") llenas de sustrato de turba de Sphagnum (Gramoflor) durante 3 semanas bajo condiciones constantes: 23-26°C día y 21-22°C en oscuridad, 50-60% de humedad y un régimen de oscuridad-fotoperíodo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. Dos hojas por planta fueron utilizadas para el ensayo.

30

Los cortes se realizaron con cuchillas quirúrgicas estériles número 10 (Albion Surgicals Limited, Sheffield, Inglaterra). Particularmente se hizo un corte de 1 cm.

Cada corte se cubrió inmediatamente con una banda de 1 cm de longitud del material a ensayar:

- Celulosa bacteriana (CB).
- 5 - Cinta de microporos (3M Deutschland GmbH, Neuss, Alemania).
- Ningún material.

La observación se realizó a diario y se tomaron fotografías a las 48 horas de hacer los cortes, con una cámara digital o con una cámara LCD conectada a una Olympus  
10 DP71 binocular (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Los resultados se muestran en la Figura 3. Los cortes cubiertos con CB muestran una regeneración tisular completa, llegándose a sellar la herida. En cambio, aquellos cortes en los cuales no se aplicó la CB quedaron abiertos y sin regenerar.

15 Microscopía electrónica de barrido (SEM): Después del proceso de curación, las muestras fueron cortadas y colocadas en un sustrato de aluminio SEM sobre un adhesivo de cinta de carbono. Luego, se metalizaron usando (Au / Pd, 25 mA, 4 '). Posteriormente, se tomaron imágenes con un microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta 200 FEG-ESEM) en condiciones de alto vacío o condiciones de bajo vacío.  
20 Se realizó un análisis elemental mediante el microscopio SEM en las áreas seleccionadas. Los resultados se muestran en la Fig. 5, donde se puede observar la aparición de tejido nuevo en la zona adyacente al corte en la muestra tratada con CB.

### Punción

25

Plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron sembradas en bandeja de alveolos durante una semana. Las plántulas se transfirieron a macetas individuales (5 ") llenas de sustrato de turba de Sphagnum (Gramoflor) durante 3 semanas bajo condiciones constantes: 23-26°C día y 21-22°C en oscuridad, 50-60% de humedad y un régimen  
30 de oscuridad-fotoperíodo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. Dos hojas por planta fueron utilizadas para el ensayo.

Las punciones se realizaron con agujas 21G x 1<sup>1/2</sup>" (Terumo, Shibuya, Japan). Cada punción se cubrió inmediatamente con una banda de 1 cm de longitud del material a  
35 ensayar:

- Celulosa bacteriana (CB).
- Cinta de microporos (3M Deutschland GmbH, Neuss, Alemania).
- Ningún material.

5 Microscopía electrónica de barrido (SEM): Después del proceso de curación, las muestras fueron cortadas y colocadas en un sustrato de aluminio SEM sobre un adhesivo de cinta de carbono. Luego, se metalizaron usando (Au / Pd, 25 mA, 4 '). Posteriormente, se tomaron imágenes con un microscopio electrónico de barrido (FEI Quanta 200 FEG-ESEM) en condiciones de alto vacío o condiciones de bajo vacío. Se realizó un análisis elemental mediante el microscopio SEM en las áreas  
10 seleccionadas. Los resultados se muestran en la Fig. 4, donde se puede observar la aparición de tejido nuevo en la zona adyacente a la punción en la muestra tratada con CB.

#### Corte e infección

15 Plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron sembradas en bandeja de alveolos durante una semana. Las plántulas se transfirieron a macetas individuales (5 ") llenas de sustrato de turba de Sphagnum (Gramoflor) durante 3 semanas bajo condiciones constantes: 23-26°C día y 21-22°C en oscuridad, 50-60% de humedad y un régimen de oscuridad-fotoperíodo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. Dos hojas por planta  
20 fueron utilizadas para el ensayo.

Los cortes se realizaron con cuchillas quirúrgicas estériles número 10 (Albion Surgical Limited, Sheffield, Inglaterra). Particularmente se hizo un corte de 1 cm.

25 A través del corte se inoculó la bacteria virulenta *Pseudomonas syringae* DC3000 utilizando una jeringa con émbolo. El contorno de la zona inoculada se marcó con un rotulador resistente al agua. Cada corte inoculado se cubrió inmediatamente con una banda de 1 cm de longitud del material a ensayar:

- 30
- Celulosa bacteriana (CB).
  - Celulosa bacteriana con nanopartículas de Ag (Ag-CB)
  - Cinta de microporos (3M Deutschland GmbH, Neuss, Alemania) (Tape).
  - Ningún material.

La observación se realizó a diario y se tomaron fotografías a las 48 horas de hacer los cortes, con una cámara digital o con una cámara LCD conectada a una Olympus DP71 binocular (Zeiss, Oberkochen, Alemania). Los resultados se muestran en la Figura 6. Los cortes infectados cubiertos con Ag-CB muestran unos niveles de infección más bajos, como se puede observar por la menor clorosis en la zona inoculada. La CB sin plata o la cinta de microporos (Tape) no mostraron ningún efecto sobre la infección.

**EJEMPLO 4. Ensayo de regeneración tisular vegetal con películas de celulosa vegetal.**

Plantas de *Nicotiana benthamiana* fueron sembradas en bandeja de alveolos durante una semana. Las plántulas se transfirieron a macetas individuales (5 ") llenas de sustrato de turba de Sphagnum (Gramoflor) durante 3 semanas bajo condiciones constantes: 23-26°C día y 21-22°C en oscuridad, 50-60% de humedad y un régimen de oscuridad-fotoperíodo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad. Dos hojas por planta fueron utilizadas para el ensayo.

Los cortes se realizaron con cuchillas quirúrgicas estériles número 10 (Albion Surgical Limited, Sheffield, Inglaterra). Particularmente se hizo un corte de 1 cm. Cada corte se cubrió inmediatamente con una banda de 1 cm de longitud del material a ensayar:

- Celulosa vegetal: papel de filtro (PrimeSource, Morgan Scott Group Inc., USA).
- Cinta de microporos: tape (3M Deutschland GmbH, Neuss, Alemania).
- CB.
- Ningún material

Después de 5 días, la cinta de microporos no mostró recuperación de la herida y el papel de filtro mostró recuperación de la herida bajo una humedad relativa controlada del 99% (como se muestra en la Fig. 7).

Sin embargo, bajo humedad relativa baja (crecimiento en cámara, 60%) solo la CB permaneció unida a la hoja y fue capaz de regenerar la herida. El papel de filtro se desprendió de la herida rápidamente y no pudo producirse regeneración.

Por lo tanto, estos estudios indican que el porcentaje de humedad tiene un gran impacto en el agua dentro de la estructura y en la regeneración tisular. La celulosa vegetal (papel de filtro) cuando se empleó bajo condiciones de humedad relativa alta (alto contenido en agua) fue también capaz de regenerar heridas en plantas (Fig. 7).

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para regenerar tejidos vegetales dañados que comprende:
- 5           a. poner en contacto el tejido vegetal dañado con celulosa, y  
          b. permitir la regeneración del tejido vegetal dañado.
2. El método según la reivindicación 1, donde la celulosa es celulosa vegetal o bacteriana.
- 10
3. El método según la reivindicación 2, donde la celulosa es celulosa bacteriana.
4. El método según la reivindicación 3, donde la celulosa bacteriana es producida por bacterias del género *Gluconacetobacter*.
- 15
5. El método según la reivindicación 4, donde la bacteria del género *Gluconacetobacter* se selecciona de entre *Gluconacetobacter xylinus* o *Gluconacetobacter europaeus*.
- 20
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la celulosa está en forma de película.
7. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde la celulosa además comprende un agente antibacteriano, antifúngico y/o antiviral.
- 25
8. El método según la reivindicación 7, donde el agente son nanopartículas de plata y/o cobre.
9. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde la celulosa está
- 30           mojada.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde el tejido vegetal es tejido vegetal no lignificado.
- 35
11. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, donde el tejido vegetal se selecciona de la lista que consiste en: hoja, fruto, tallo, rama, flor o raíz.

12. El método según la reivindicación 11, donde el tejido vegetal son hojas.

13. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, donde el tejido vegetal pertenece a una planta de la familia *Solanaceae*.

5

14. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, donde el tejido vegetal pertenece a *Nicotiana benthamiana* o *Solanum lycopersicum*.

10

15. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, donde el daño en el tejido es provocado por corte, abrasión, punción, presión, rotura o infección.

16. El método según la reivindicación 15, donde la infección es bacteriana.

15

17. El método según la reivindicación 16, donde la infección bacteriana es provocada por *E. coli* o *Pseudomonas syringae*.

18. El método según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, donde el paso (b) tiene lugar durante un periodo de tiempo de al menos 24 horas.

20

19. El método según la reivindicación 18, donde el paso (b) tiene lugar durante un periodo de tiempo de al menos 48h.

FIG. 1

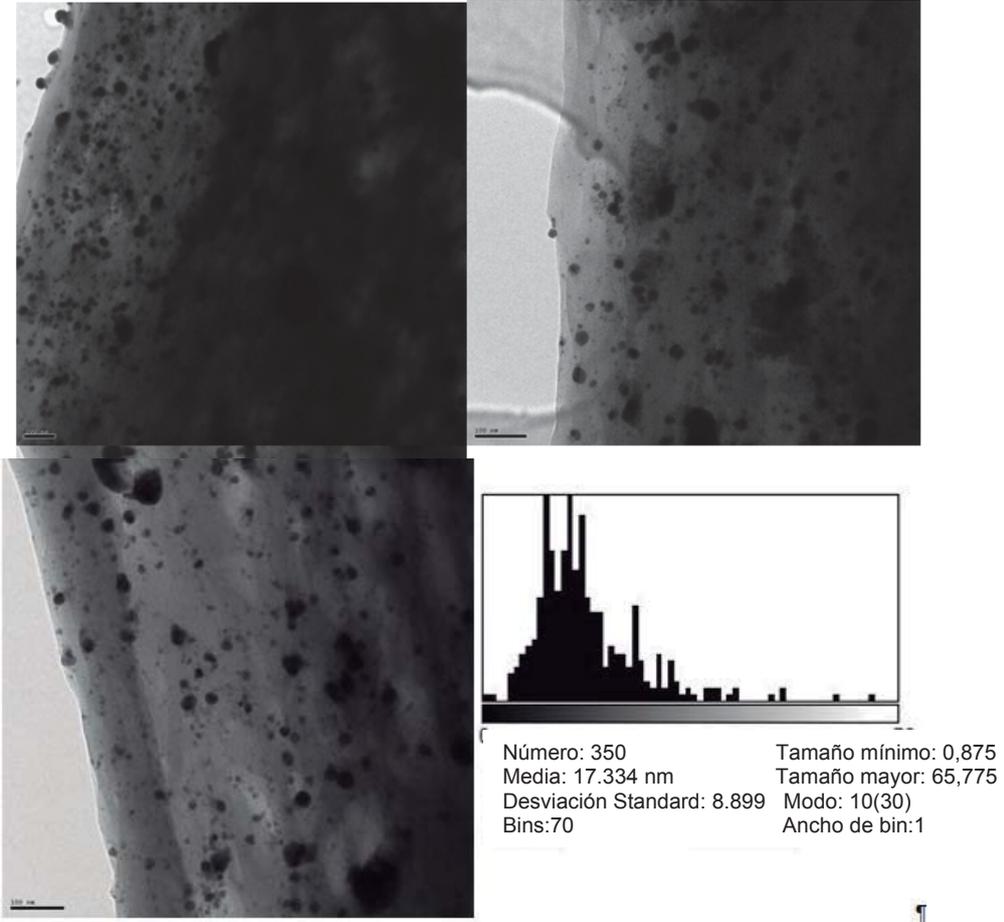


FIG. 2

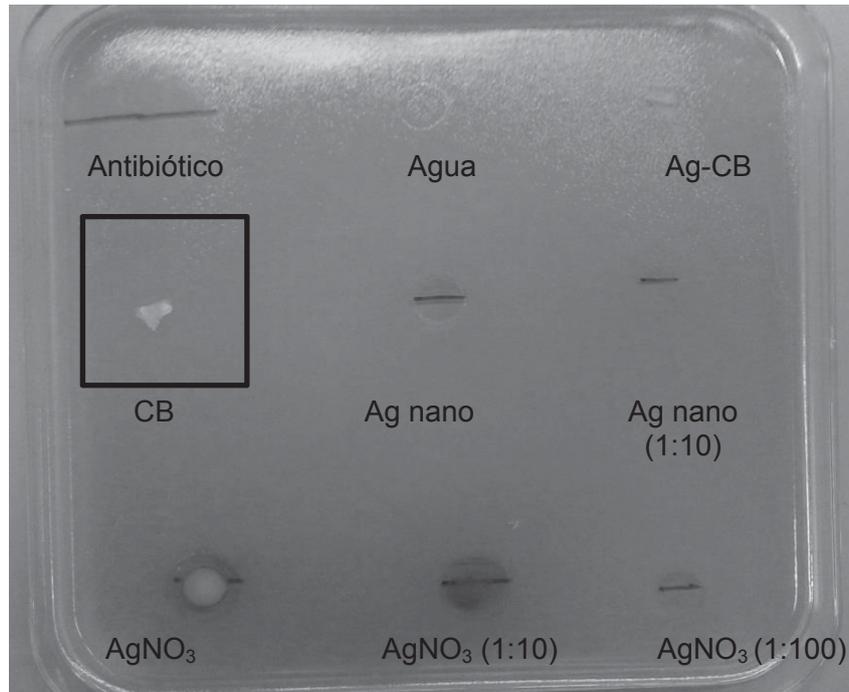


FIG. 3

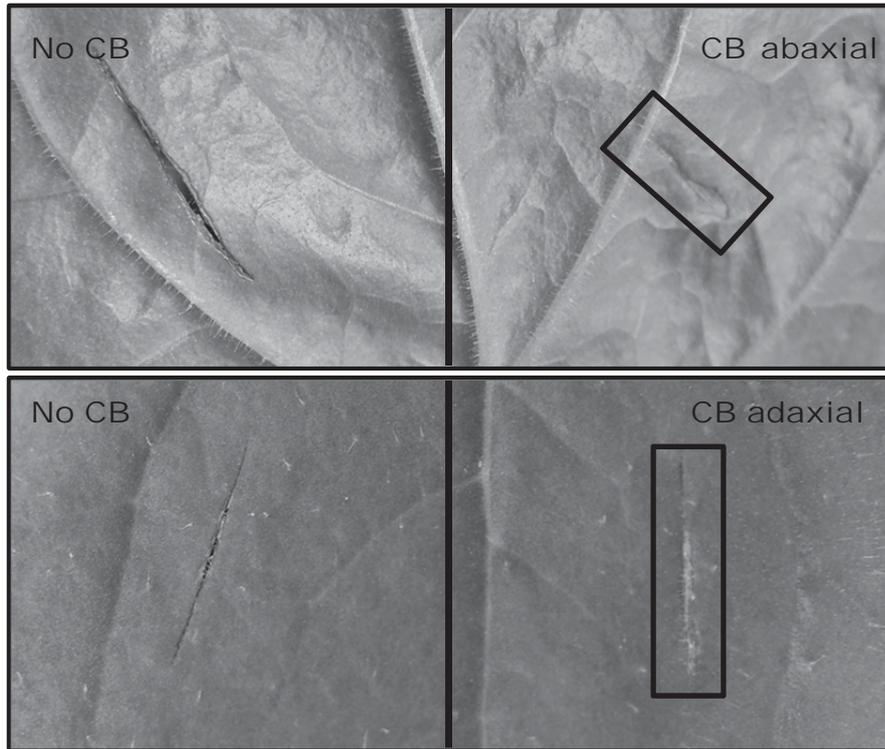


FIG. 4

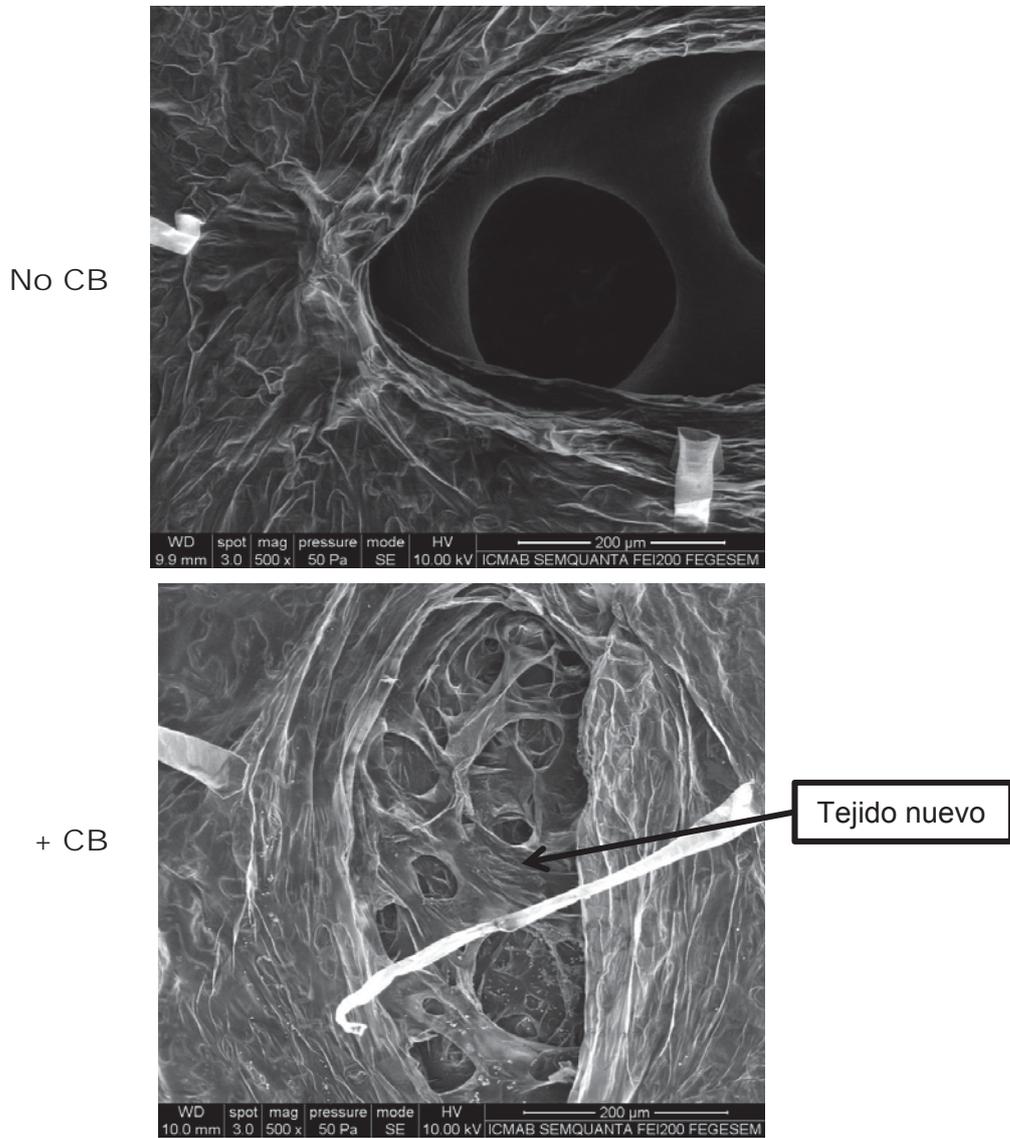


FIG. 5

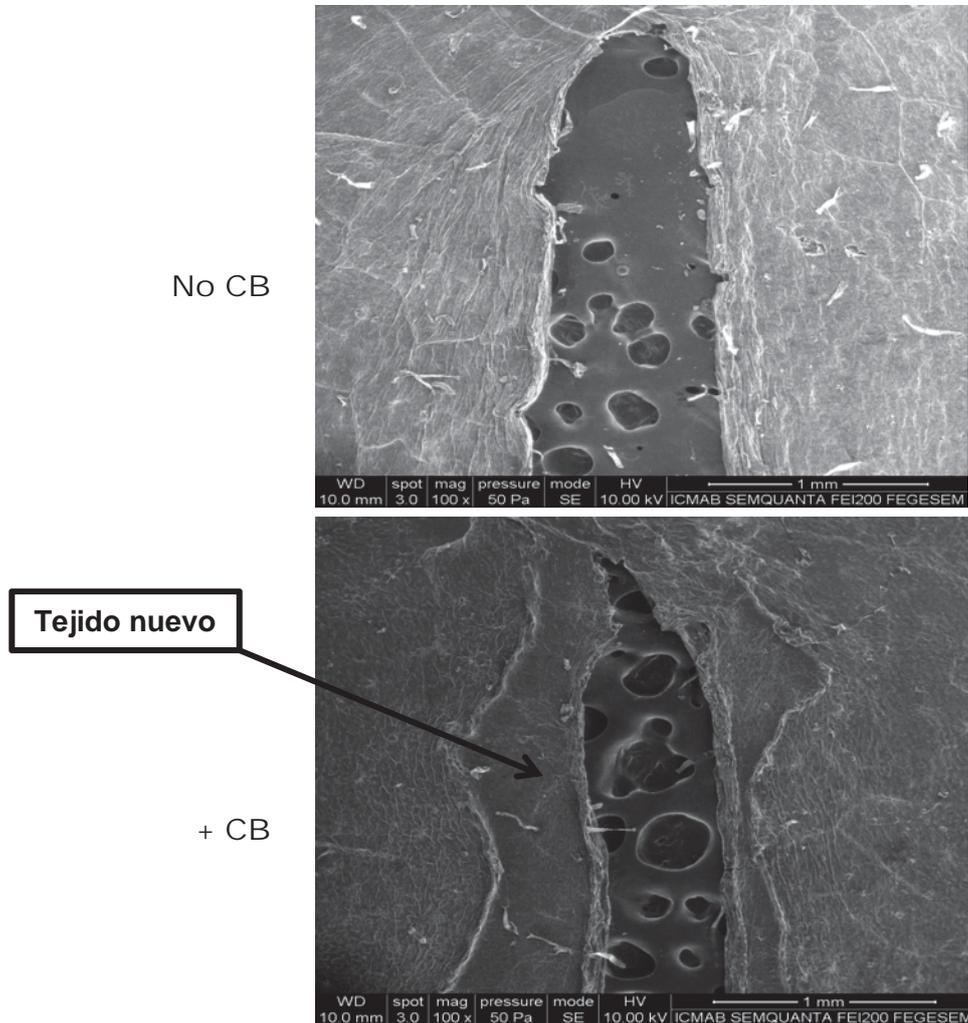


FIG. 6

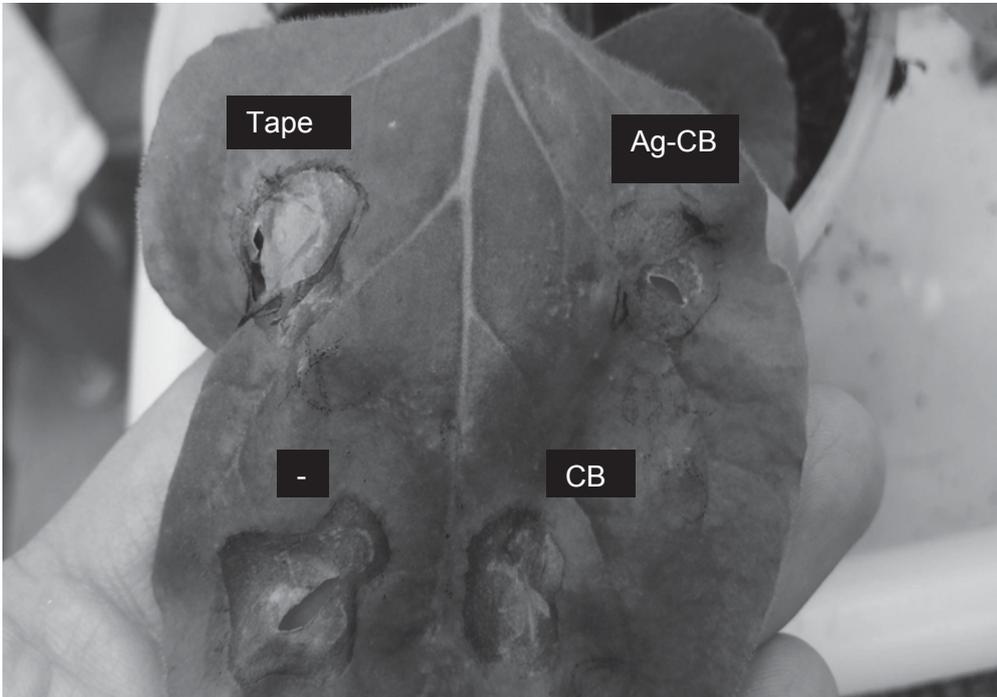


FIG. 7

