

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 692 426**

51 Int. Cl.:

C08L 5/06 (2006.01)

A61L 26/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.11.2007 PCT/EP2007/062968**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2008 WO08065151**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.11.2007 E 07847485 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.08.2018 EP 2115066**

54 Título: **Composición que comprende oligogalacturonanos y sacáridos policatiónicos**

30 Prioridad:

28.11.2006 EP 06124918

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

03.12.2018

73 Titular/es:

UNIVERSITÉ DE NAMUR (100.0%)

Rue de Bruxelles 61

5000 Namur, BE

72 Inventor/es:

CABRERA PINO, JUAN CARLOS y

VAN CUTSEM, PIERRE

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 692 426 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composición que comprende oligogalacturonanos y sacáridos policatiónicos

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a una composición "bioactiva" que comprende uno o más oligogalacturonanos ((1→4)-α-D-galacturonano) o cualquier otro oligosacárido (oligoguluronanos) que puede presentar una conformación de "huevera", estabilizándose adicionalmente esta conformación mediante uno o más sacáridos policatiónicos, preferentemente un oligosacárido de quitosano o un polisacárido de quitosano.

La presente invención también se refiere a un método para la preparación de esta composición y su uso, en aplicaciones médicas, farmacéuticas, agrícolas, nutraceuticas, alimentarias, piensos, textiles, cosméticas, industriales y/o medioambientales.

15 **Antecedentes de la invención**Pectina y fragmentos de pectina

20 Los polisacáridos naturales, tales como almidón, celulosa, quitina, alginato y pectina, son de gran importancia tecnológica porque están disponibles en grandes cantidades y presentan características específicas que por lo general no están presentes en los polímeros sintéticos.

25 La pectina constituye una red molecular densa que explica gran parte de las propiedades mecánicas de la pared celular vegetal.

30 Las regiones vellosas de las pectinas (Ramnogalacturonano) coexisten con dominios homopoligalacturónicos (galacturonano) lisos que pueden dimerizarse de acuerdo con el denominado "modelo de huevera" (Grant, *FEBS letters*, volumen 32, páginas 195-198, 1973). Mediante difracción circular, se ha confirmado la existencia de esta conformación de "huevera" de la quelación de calcio entre cadenas (POWELL et al., *Journal of Molecular Biology*, volumen 155, páginas 517-531, 1982).

35 La extensión de dichas zonas de unión en la pared celular depende en gran medida de la densidad de carga del polianión, la disponibilidad de cationes divalentes y se inhibe mediante metilsterificación y acetilsterificación (Liners et al., *Plant Physiology*, volumen 90, páginas 1090-1104, 1992).

40 La pectina también es una diana privilegiada implicada en procesos morfológicos y en interacciones hospedador-patógeno. Las enzimas pectolíticas liberan oligogalacturonanos que pueden modular diferentes procesos fisiológicos dentro de la matriz de la pared celular y el protoplasto.

También se sabe que a diferentes concentraciones estos oligogalacturonanos pueden modificar la actividad biológica de las células.

45 Por tanto, estos oligogalacturonanos son adecuados para el tratamiento de plantas, especialmente en métodos de cultivo y protección de plantas basados en el uso de estos productos naturales. Más en particular, estos oligogalacturonanos son adecuados para la inducción de un aumento de las defensas innatas de las plantas contra los patógenos.

50 Van Cutsem y Messiaen (*Planta*, volumen 208, páginas 246-256, 1999) describen la adsorción de poliaminas sobre ácido poligalacturónico en presencia de cationes mono y divalentes competidores (Na⁺, Ca²⁺). Entre las poliaminas, se sometieron a ensayo la putrescina, la espermidina y la espermina. Los autores demuestran que la cascada de transducción de señales iniciada en células vegetales por (1→4)-α-D-oligogalacturonano unido a Ca²⁺ fue bloqueada por espermidina y espermina, pero no por putrescina. Se plantea la hipótesis de que la alteración por espermidina y espermina de la conformación supramolecular inducida por Ca²⁺ de fragmentos pécticos fue la causa de la inhibición de la señal péctica. Por tanto, parece que las poliaminas pueden actuar sobre la fisiología de las células vegetales modulando la transducción de la señal péctica. Otros oligosacáridos tales como el alginato pueden presentar esta conformación de "huevera" y pueden actuar sobre la fisiología de la planta.

60 La quitina y el quitosano

La quitina es un polímero natural de alto peso molecular que se encuentra ampliamente en la naturaleza (el segundo biopolímero en importancia después de la celulosa) y es el componente principal de la cutícula de los insectos y de los crustáceos. La quitina también forma parte de las paredes celulares de algunos hongos y otros organismos. El quitosano se produce a nivel industrial mediante modificaciones químicas de la quitina y también se encuentra naturalmente en algunos organismos.

El quitosano es el copolímero aleatorio de N-acetil (D)-glucosamina y (D)-glucosamina. La solicitud de patente internacional WO 03/068824 describe la estructura química del quitosano y diversos métodos para obtener este quitosano. Además, la presente solicitud de patente también describe un método para aislar derivados de la pared celular de biomasa de hongos y levaduras y un método para obtener quitosano a partir de este método. Esta solicitud de patente también describe el uso del quitosano en aplicaciones médicas, farmacéuticas, agrícolas, nutracéuticas, alimentarias, textiles, cosméticas, industriales y/o medioambientales.

Sin embargo, el quitosano aún presenta varios inconvenientes, tales como las altas concentraciones necesarias para obtener un efecto fisiológico (superiores a 1 g por litro) y podría ser tóxico a concentraciones tan altas.

Combinaciones de pectina y quitosano

El documento US 5 919 574 describe películas laminadas biodegradables fabricadas a partir de pectina y quitosano. Esta patente afirma que la propiedad catiónica del quitosano ofrece una oportunidad para aprovechar las interacciones electrostáticas con la pectina aniónica parcialmente desmetilada. Los inventores de esta presente patente afirman que existe una combinación de enlaces de hidrógeno y fuerzas electrostáticas entre los grupos carboxilato de pectina y los grupos amino protonados de quitosano y que la actividad de agua compatible hace posible una superficie de contacto estable entre una película péctica y una película de quitosano. Esta patente también describe el uso de las películas laminadas obtenidas en una serie de aplicaciones, incluyendo aplicaciones médicas (producción de parches, bolsas biodegradables o bolsas, encapsulación de células vivas, etc.).

La solicitud de patente internacional WO01/82724 describe una composición que contiene aminopolisacáridos y polisacáridos cargados negativamente. Entre los aminopolisacáridos sometidos a ensayo, los inventores describen quitosano y derivados de quitosano combinados con polisacáridos cargados negativamente, tales como pectina.

Sin embargo, ninguno de estos documentos describe que sea posible mejorar la bioactividad de los fragmentos de pectina (oligogalacturonanos). Tampoco describen ningún efecto de las moléculas de quitosano sobre la conformación bioactiva inducida por calcio del galacturonano. Más en particular, ninguno de estos documentos describe ningún efecto inductor ni fertilizante para una combinación de fragmentos de pectina y quitosano.

Se sabe que la producción de plantas se consigue clásicamente mediante el uso de productos químicos sintéticos que no siempre son respetuosos con el medio ambiente y generalmente son caros.

Por tanto, el uso de estos productos naturales podría reducir la cantidad de productos químicos fitosanitarios o fertilizantes aplicados a los cultivos, permitiendo una agricultura orgánica adecuada y minimizando el impacto ambiental de la agricultura.

En las últimas décadas, las ventas de productos orgánicos han mostrado un aumento anual de al menos el 20 %. El sector agrícola de más rápido crecimiento en ventas minoristas de alimentos y bebidas orgánicas generó aproximadamente 12.800 millones de dólares. Los alimentos orgánicos también están ganando aceptación internacional dentro de naciones como Japón y Alemania, convirtiéndose en importantes mercados internacionales de alimentos orgánicos.

Objetivos

Un primer objetivo es proporcionar una composición que comprenda galacturonanos con propiedades mejoradas, tales como una conformación de huevera estabilizada detectable preferentemente mediante el anticuerpo 2F4 (F. LINERS, J.-J. LETESSON, C. DIDEMBOURG y P. VAN CUTSEM (1989) *Monoclonal antibodies against pectin: recognition of a conformation induced by calcium. Plant Physiol.* 91, 1419-1424), especialmente propiedades mejoradas de bioactividad para el crecimiento y la protección de las plantas.

Otro objetivo es proponer una composición fabricada a partir de productos naturales.

Un objetivo adicional es proporcionar una composición que presente nuevas propiedades para los oligogalacturonanos y que pueda usarse en aplicaciones médicas, farmacéuticas, nutracéuticas, alimentarias, textiles, cosméticas, industriales y/o medioambientales.

Sumario de la invención

La presente invención se define mediante las reivindicaciones adjuntas. Se desvela una composición que comprende uno o más oligogalacturonanos (preferentemente (1→4)-α-D-oligogalacturonano), oligoguluronanos (tales como oligómeros de alginato) o cualquier oligómero que pueda presentar una conformación de "huevera" (con la adición de uno o más cationes (Ca²⁺, Na⁺...)), detectándose esta conformación preferentemente mediante el anticuerpo 2F4 y se estabiliza adicionalmente ventajosamente mediante (la adición de) uno o más sacáridos policatiónicos. Un sacárido policatiónico significa un sacárido que tiene múltiples cargas positivas, preferentemente al menos 6 (seis) cargas.

Ventajosamente, estos sacáridos son productos naturales (diferentes de un polímero u oligómero sintético) lo que significa que pueden obtenerse a partir de fuentes renovables naturales con pocas o ninguna modificación.

5 Ventajosamente, el sacárido policatiónico es un oligosacárido o un polisacárido, preferentemente un oligosacárido de quitosano o un polímero de quitosano. Más preferentemente, los oligosacáridos o polisacáridos de quitosano utilizados tienen un grado de acetilación inferior al 50 %, preferentemente comprendido entre el 0 y aproximadamente el 50 % y un grado de polimerización superior a 5 (cinco).

10 Además, los oligogalacturonanos tienen preferentemente un grado de polimerización (GP) superior a 8 (ocho), preferentemente comprendido entre 9 (nueve) y 20 (veinte) o entre 9 (nueve) y 15 (quince).

15 Los inventores han descubierto inesperadamente que dicha composición se caracteriza por un efecto sinérgico que significa que mejora los oligogalacturonanos y/o posiblemente los oligoguluronanos (por ejemplo, oligómeros de alginato) u otras características de oligosacáridos (especialmente propiedades agronómicas), pero también reduce los posibles efectos secundarios de sacáridos policatiónicos, especialmente si estos sacáridos policatiónicos son oligosacáridos de quitosano o polímeros de quitosano. En particular, dicha composición reduce inesperadamente las posibles propiedades tóxicas de las moléculas de quitosano y, por tanto, controla y reduce la muerte celular (inducida por estas moléculas de quitosano a alta concentración).

20 Esta composición aumenta sinérgicamente la bioactividad de cada oligosacárido y combina sus efectos potenciadores individuales en diversos campos, incluyendo aplicaciones médicas, farmacéuticas, agrícolas, nutracéuticas, alimentarias, piensos, textiles, cosméticas, industriales, textiles o de papel y/o medioambientales. Esta composición podría unirse a una superficie de soporte sólida a través de un enlace covalente o no covalente.

25 En particular, esta composición es una composición inductora que podría usarse para proteger plantas (aumentar la defensa natural de las plantas contra los patógenos) y para estimular el crecimiento y la diferenciación de las plantas. La inducción puede explicarse como un mecanismo o mecanismos mediante los cuales las células y los tejidos esencialmente de todos los organismos responden y se adaptan a los cambios en condiciones ambientales externas. En muchos casos, estos mecanismos usan las vías de receptores específicos para determinados
30 productos químicos. Cuando dichos productos químicos entran en contacto con las superficies celulares, se unen específicamente a receptores particulares. Esta unión desencadena una cascada de eventos dentro de las células, incluyendo la regulación positiva y negativa de los genes y la activación o represión de vías específicas dentro de las células. Esos procesos dan como resultado cambios sustanciales en la fisiología celular. Por tanto, estos inductores son desencadenantes de respuestas fisiológicas drásticas. Además, una cantidad muy pequeña de la molécula
35 inductora es con frecuencia suficiente para provocar cambios importantes en la fisiología celular. Un ejemplo de actividad basada en el inductor incluye la inducción de respuestas inmunitarias o de resistencia en plantas o animales.

40 La respuesta más temprana a los inductores se indica mediante cambios en la permeabilidad de la membrana y la activación de canales iónicos específicos que conduce al flujo de entrada de Ca^{2+} y H^+ y el flujo de salida de Cl^- y K^+ (Cervone et al., (1997) "*Perception of fungal elicitors and signal transduction*" En Aducci P, ed. *Signal transduction in plants*, Basilea, Suiza: Birkhäuser Verlag, 153-177). Esta etapa también se caracteriza por cambios rápidos en el potencial transmembrana. En numerosos casos, se observó la despolarización de la membrana (Kuchitsu et al., (1993) "*N-acetylchitooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells*" *Protoplasma* 174, 79-81). Estos efectos localizados en la membrana van seguidos del estallido oxidativo, la síntesis de fitoalexinas y la activación de genes de defensa (Templeton y Lamb, (1988) "*Elicitors and defense gen activation*" *Plant, Cell and Environment* 11, 395-401). En el pasado, se han encontrado problemas con los enfoques existentes para estimular la resistencia como método práctico de control de la enfermedad. Estos problemas han incluido la fitotoxicidad (amarillamiento, necrosis y mal estado general de la planta), falta de niveles significativos de control de la enfermedad y falta de reproducibilidad/sostenibilidad. La composición desvelada en el presente documento alivia ventajosamente estas limitaciones.

55 Adicionalmente, esta composición es una composición fertilizante que podría usarse para aumentar, por ejemplo, los rendimientos de las plantas, a través del aumento de la altura, el espesor (del tallo, las hojas, las raíces...), la biomasa o la cantidad de flor/fruto por planta. Se sabe que una medida de "biomasa", que es básicamente la densidad o cantidad de vida de la planta, está directamente relacionada con el rendimiento del cultivo.

60 Sin embargo, la composición desvelada en el presente documento también puede comprender otros elementos, tales como otros oligosacáridos, reguladores del crecimiento (o factores de crecimiento), minerales, iones, nutrientes, aditivos alimentarios, aromatizantes, colores, vitaminas, minerales, fragancias, fitonutrientes y otras moléculas bioactivas para mejorar la bioactividad de la composición, especialmente la bioactividad de cada oligosacárido en estas diversas aplicaciones.

65 Por tanto, la composición como se desvela en el presente documento corresponde a una composición farmacéutica (incluyendo una vacuna), un adyuvante, una composición cosmética, una composición alimentaria o de pienso

(incluyendo alimentos funcionales o piensos funcionales), un aditivo alimentario, una bebida (especialmente vino, cerveza o zumo de fruta) o un adyuvante de una bebida, un producto fitosanitario (preferentemente una composición fungicida), un fertilizante, un inductor o un adyuvante de estos productos.

5 Por ejemplo, la composición desvelada en el presente documento podría usarse para recuperar de dicha bebida partículas orgánicas, microorganismos, coloides, proteínas, metales pesados, pesticidas residuales, micotoxinas y endotoxinas.

10 La composición desvelada en el presente documento también podría usarse como aditivo alimentario natural para obtener actividades antimicrobianas y antifúngicas contra una amplia gama de hongos (incluyendo levaduras) y bacterias y también podría usarse como adyuvante para conservantes alimentarios convencionales y agentes antipardeamiento, como componente para películas comestibles permeables al gas adecuadas para el almacenamiento de fruta/verdura, como agente espesante, estabilizante o emulsionante, como agentes tixotrópicos o como prolongador de sabor natural. También puede usarse en diversos procesos de alimentación, ya que puede, 15 por ejemplo, aplicarse como agente espumante, como espesante o como estabilizador.

20 La actividad antimicrobiana y antifúngica (para la protección de semillas o frutos de plantas) de la composición desvelada en el presente documento puede usarse en la industria de alimentos o piensos para obtener un mayor período de caducidad, retraso en la maduración y descomposición de frutas o verduras, para la preservación de carne, crustáceos (ostras), frutas, verduras y productos terminados, posiblemente en combinación con conservantes convencionales (sulfito o benzoato de sodio) o como alternativa a estos conservantes.

25 La composición desvelada en el presente documento también puede aplicarse sobre fibras textiles en forma de una película o mediante impregnación de esta fibra o tejido con una solución que comprende la composición desvelada en el presente documento. Por tanto, la propiedad de la fibra de un producto textil puede modificarse (propiedades antibacterianas y/o antifúngicas mejoradas). Este producto textil también puede corresponder a productos textiles médicos para el tratamiento de heridas.

30 Las aplicaciones cosméticas de la composición desvelada en el presente documento son particularmente adecuadas para formulaciones para el cuidado de la piel (crema, loción) o para formulaciones para el cuidado del cabello (como pulverizaciones, champús o formulaciones para después del champú), en composición de maquillaje o en pastas de dientes y también pueden usarse por sus propiedades anti-UV, en la preparación de desodorantes, en composiciones de higiene oral y en composiciones para la encapsulación de pigmentos. Ventajosamente, debido a su origen no animal, es posible usar la composición sin inducir los riesgos de alergias. 35

40 En aplicaciones medioambientales, la composición desvelada en el presente documento podría usarse como agente quelante (quelación de metales pesados) o para el tratamiento de aguas residuales, especialmente en técnicas de purificación de agua para la segregación de compuestos orgánicos y metales pesados. También pueden usarse para precipitar determinados compuestos de desecho u otros contaminantes, como DDT y policlorobencenos o para fijar radicales.

45 Ventajosamente, la composición desvelada en el presente documento también podría usarse en el proceso de fabricación de papel. Pueden reemplazar algunos sustituyentes amino tales como goma o polisacáridos polisintéticos y son adecuados para reducir el uso de aditivos químicos y para mejorar los resultados.

También es posible que el papel obtenido mediante el uso de la composición desvelada en el presente documento pueda presentar una superficie más lisa y una mejor resistencia a la humedad. También pueden usarse para la producción de papel higiénico, papel de embalaje y cartón.

50 Otra aplicación ventajosa de la composición desvelada en el presente documento es en el campo de la medicina y la aplicación farmacéutica.

55 Debido a estas buenas propiedades de bioadherencia, la composición desvelada en el presente documento podría aplicarse como ayuda quirúrgica antiadherente, para evitar la adhesión entre los tejidos durante la cirugía y como adyuvante para vacunas, gracias a una buena mucoadhesión.

60 La presente invención también se refiere, por tanto, a cualquier biomaterial que comprenda la composición desvelada en el presente documento para aplicaciones médicas, de diagnóstico o de investigación específicas de compuestos que se han de liberar en los intestinos, debido a la no digestión de la composición desvelada en el presente documento en el estómago (liberación retardada).

65 La composición desvelada en el presente documento puede formularse como un aditivo para aplicaciones de liberación controlada oral y parenteral y también puede mejorar la eficacia de vehículos orales mediante modificaciones químicas y unión de fármacos y otras moléculas biofuncionales, y también puede usarse para mejorar las propiedades de formación de películas y geles de compuestos conocidos y puede usarse para fabricar membranas transdérmicas.

5 Sus propiedades mucoadhesivas también pueden usarse para obtener un buen contacto con las capas de la piel y para mejorar el sistema innovador de entrega de fármacos a través de la administración local y sistémica. También pueden usarse en la fabricación de excipientes en la formación de comprimidos, la granulación de polvos, la preparación de emulsiones, como agentes humectantes y de recubrimiento. También pueden usarse sus diversas características ventajosas, tales como su bioadherencia y su capacidad para formar complejos (aniónicos, catiónicos o anfífilos) y polímeros en el sistema farmacológico para mejorar la solubilidad de fármacos poco hidrosolubles, para mejorar la absorción de fármacos a través de tejidos de mucosas y para potenciar (mejorar o modular) la respuesta inmunitaria de las vacunas (como coadyuvantes de vacunas).

10 Las propiedades farmacéuticas conocidas del quitosano, especialmente en la cicatrización de heridas permiten el uso de la composición para prevenir o tratar la formación de fragmentos de fibrina en las heridas, para prevenir la formación de cicatrices y para soportar la regeneración celular.

15 La composición también puede usarse para ingeniería de tejidos, trasplante de células y encapsulación de células. Puede usarse en películas permeables al aire, para soportar la regeneración celular, protegiendo al mismo tiempo el tejido de las agresiones microbianas, para formar suturas y vendajes, para la fabricación de piel artificial, en sistemas para la reconstrucción de tejidos y órganos y/o el trasplante de células (posiblemente suturas y vendajes biodegradables).

20 Por tanto, estas aplicaciones farmacéuticas podrían combinarse ventajosamente con compuestos conocidos, para reparaciones de tejidos, tales como biomateriales que contienen partículas de huesos o partículas de cartílagos, iones y sales, factores de crecimiento y hormonas y derivados de plasma, tales como fibrinógeno, factores de coagulación, plaquetas, incluyendo plasma rico en plaquetas y plasma pobre en plaquetas (PRP y PPP), antibióticos, vitaminas, factores de diferenciación, citocinas, interferones, proteínas de tejidos blandos (tales como cartílagos, elastina, fibrina o sus precursores), etc.

La composición desvelada en el presente documento presenta características de hidratación ventajosas, propiedades de cicatrización de heridas, propiedades regeneradoras y propiedades antimicrobianas y/o antifúngicas.

30 La composición desvelada en el presente documento podría presentarse en diversas formas, especialmente en forma líquida (por ejemplo, soluciones acuosas), en forma de partículas (nanopartículas, microesferas y suspensiones o emulsiones de las mismas, gránulos) y en forma sólida porosa o no porosa. Cuando se tienen en cuenta las aplicaciones agrícolas y agroquímicas de la presente composición, normalmente contendrá componentes adicionales que se sabe que son útiles para aplicar materiales a cultivos en crecimiento, tales como uno o más vehículos, materiales tamponantes para el control del pH y similares. Con frecuencia se usará agua como vehículo, pero también pueden usarse otros vehículos convencionales. Se apreciará que la cantidad de solución necesaria para el tratamiento del cultivo dependerá del cultivo particular que se trate. Dicha cantidad es una que puede determinarse fácilmente por un experto en la materia.

40 La composición desvelada en el presente documento también podría aplicarse fácilmente en sistemas agrícolas y agroquímicos, como un recubrimiento conservante y agente bioestático cuando se aplica sobre frutas, verduras y cultivos, como un fertilizante, como un agente que aumenta el número de microorganismos del suelo útiles y disminuye los daños ("control biológico"). Control biológico significa la reducción de la cantidad de inóculo o actividad productora de enfermedad de un patógeno conseguida por o a través de uno o más organismos distintos del ser humano (Harman et al., "*Enzymes, Biological Control and Commercial Applications*", *Trichoderma and Gliocladium*, vol. 2, capítulo 6 (1998)). Las cepas de control biológico son conocidas en la técnica y son eficaces en una gran diversidad de hábitats y frente a una variedad de patógenos (Harman et al., véase anteriormente). Los ejemplos de organismos de control biológico pueden ser cualquiera de los identificados como útiles para el control biológico de enfermedades vegetales, incluyendo, sin limitación, los de los siguientes géneros: *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Botrytis* y *Sclerotinia* (Harman et al., véase anteriormente y las Patentes de los EE.UU. N.º 5.474.926 y 6.512.166). Las semillas de plantas pueden empaparse en soluciones acuosas de la composición desvelada en el presente documento para evitar infecciones fúngicas y/o microbianas y aumentar la producción de plantas. La composición desvelada en el presente documento también puede usarse para obtener un recubrimiento eficiente de semillas.

55 En concentraciones adecuadas, la composición desvelada en el presente documento puede usarse para desencadenar mecanismos de defensa de plantas contra infecciones parasitarias y agresiones (efecto inductor) a través de aplicaciones sistémicas y/o tópicas. Un efecto desencadenante de este tipo puede medirse a través de ciertas actividades enzimáticas inducidas en las plantas tratadas con la composición desvelada en el presente documento, tales como las actividades de glucanasa, quitinasa y Fenilalanina Amoníaco Liasa (PAL).

65 Además de sus propiedades inductoras, bioestáticas, fertilizantes y/o conservantes, la composición desvelada en el presente documento podría usarse para reforzar raíces de plantas y para engrosar el tallo de plantas. La composición desvelada en el presente documento también puede usarse como reemplazo, potenciador o modulador de fitohormonas.

La composición desvelada en el presente documento también puede usarse para estimular la síntesis de agentes protectores por la propia planta, para acelerar la germinación y el crecimiento de plantas. Son ejemplos de agentes protectores sintetizados por las plantas: óxido nítrico (NO), especies de oxígeno reactivo (EOR), ácido salicílico, ácido jasmónico, proteínas relacionadas con la patogenicidad y fitoalexinas.

5 La composición desvelada en el presente documento puede aplicarse a las semillas, hojas, flores/frutos y/o raíces de las plantas mediante pulverización, maceración, empapamiento, inmersión, inyección y a través de sistemas de irrigación fertilizante. Como fertilizante, la composición desvelada en el presente documento puede aplicarse indiferentemente a través de la alimentación del suelo o la alimentación foliar con el fin de acelerar la germinación y el crecimiento de las plantas. La composición desvelada en el presente documento puede extenderse en forma seca o como una dilución de una solución. Como inductor, la composición deseada desvelada en el presente documento puede aplicarse en forma de una pulverización o como un sólido, en el que el inductor está presente junto con un vehículo adhesivo agrícolamente aceptable, por ejemplo, metilcelulosa o goma arábiga, y se aplica como un polvo. La aplicación de la formulación puede realizarse de acuerdo con técnicas bien conocidas por los expertos en la materia, tal como mediante la preparación de una pulverización para la aplicación al cultivo en crecimiento. Se apreciará que la cantidad de solución necesaria para el tratamiento del cultivo dependerá del cultivo particular que se trate. Dicha cantidad es una que puede determinarse fácilmente por un experto en la materia.

20 Las plantas afectadas son dicotiledóneas y monocotiledóneas, preferentemente plantas económicamente importantes seleccionadas entre el grupo que consiste en tomates, zanahorias, pepinos, guisantes, lechugas, pimientos, remolachas azucareras, patatas, trigo, maíz, arroz, alfalfa, cebada, centeno, algodón, girasol, cacahuete, boniato, judía, achicoria, escarola, repollo, coles de Bruselas, chirivía, nabo, coliflor, brócoli, rábano, espinaca, cebolla, ajo, berenjena, pimiento, apio, calabaza, calabacín, manzana, pera, melón, cítricos, fresa, uva, frambuesa, piña, soja, tabaco, sorgo y caña de azúcar. Son ejemplos de plantas ornamentales adecuadas: Saintpaulia, petunia, geranio, flor de Pascua, crisantemo, clavel, zinnia y céspedes.

30 La composición desvelada en el presente documento puede usarse también para obtener un recubrimiento de productos fitosanitarios conocidos tales como fungicidas, pesticidas, herbicidas, etc. Debido a sus características mejoradas, puede usarse para obtener una disminución en la cantidad de pesticidas utilizados por lo general para el tratamiento de estas plantas.

Las características adhesivas ventajosas de la composición desvelada en el presente documento también permiten su uso en otros campos (química, metalurgia, electrónica, textil, etc.) para el recubrimiento de soportes sólidos.

35 Otro aspecto desvelado en el presente documento se refiere al proceso de preparación de la composición de acuerdo con la invención, en el que se añade una cantidad suficiente de uno o más sacáridos policatiónicos a oligogalacturonanos (o cualquier otro oligosacárido adecuado (oligoguluronanos) que puede presentar una conformación de "huevera"). Esta cantidad suficiente se define ventajosamente de acuerdo con la concentración de los oligogalacturonanos (o dichos otros oligosacáridos) presentes inicialmente y en el grado de polimerización de estos sacáridos.

45 En el proceso de preparación de la composición desvelada en el presente documento, los diversos elementos se mezclan a condición de que se obtenga una solución acuosa uniforme, es decir, que no se observe ninguna formación de polímeros o gel. Adicionalmente, el pH de la composición se mantiene preferentemente entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0 (para obtener una solubilidad eficiente del componente y para mantener la seguridad de la planta tratada), cuando sea aplicable. La composición desvelada en el presente documento puede prepararse, por ejemplo, mediante la dilución de una solución madre en agua o cualquier otro disolvente apropiado, o mediante la mezcla de una forma sólida de la composición en agua o cualquier otro disolvente apropiado. Las composiciones preparadas de este modo son adecuadas para la entrega a través de vías de administración tópicas o sistémicas.

50 Para este proceso de preparación, también hay presente una cantidad adecuada de iones para obtener esta conformación de huevera preferentemente detectable mediante el anticuerpo 2 F4. Como los diferentes elementos contienen iones monovalentes y divalentes, en una relación molar divalente/monovalente, preferentemente entre aproximadamente 1/50 y aproximadamente 1/300 (o aproximadamente 1/25 y aproximadamente 1/250 miliequivalentes), pueden usarse para obtener la conformación bioactiva de "huevera" de estos oligogalacturonanos (u otros oligosacáridos) estabilizados adicionalmente mediante la adición de estos sacáridos policatiónicos. La relación de cationes divalentes/monovalentes puede disminuirse en condiciones no fisiológicas (tales como ELISA) o puede aumentarse en condiciones fisiológicas (tales como cultivos celulares) donde, por ejemplo, una concentración alta de Na⁺ sería perjudicial. Se usa preferentemente Ca²⁺ como ion divalente. También son adecuados otros cationes divalentes (Mn²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺...).

65 Para los oligogalacturonanos que presentan altos grados de polimerización (más de 8) se añade una mayor cantidad de sacáridos policatiónicos. Esta concentración también se define de acuerdo con el número de cargas positivas presentes en los sacáridos policatiónicos.

Esta concentración se caracteriza por el grado de polimerización de los sacáridos policatiónicos añadidos. Preferentemente, los oligosacáridos añadidos tienen un grado de polimerización superior a 5.

5 Ventajosamente, la cantidad de los dos componentes se define de acuerdo con las características de la composición que se ha de obtener, preferentemente para obtener una estabilización eficiente necesaria para la conformación de "huevera" que se caracteriza preferentemente por su capacidad para unirse al anticuerpo PP-2F4 (Ig G1 de ratón) específico vendido por la empresa PlantProbes (Reino Unido) (www.plantprobes.co.uk).

10 Otro aspecto de la divulgación se refiere al envejecimiento de la mezcla con el fin de aumentar la proporción de moléculas de galacturonano en la conformación bioactiva como se ejemplifica a continuación.

15 Los sacáridos de alginato (oligoguluronanos) se unen a iones de Ca^{2+} en un proceso cooperativo, que también se ha explicado de acuerdo con el «modelo de huevera». Se pueden estabilizar estas hueveras de alginato con los oligosacáridos de quitosano u otros polímeros policatiónicos (poliaminas o sacáridos policatiónicos).

20 Otro aspecto de la presente divulgación se refiere al uso de esta composición en la aplicación mencionada anteriormente, especialmente en aplicaciones médicas, farmacéuticas, nutracéuticas, alimentarias, piensos, textiles, cosméticas, industriales, agronómicas y/o medioambientales, especialmente en aplicaciones donde se observa el efecto sinérgico de los dos componentes de la composición o en aplicaciones en las que se reducen los posibles inconvenientes de uno o ambos componentes individuales; por ejemplo, para modular la muerte celular inducida por un componente individual, para obtener una reducción de la reacción de estrés oxidativo inducida por la adición de un componente individual (por ejemplo, para obtener una acumulación menor de especies reactivas de oxígeno, tales como peróxido de hidrógeno) y para obtener una mayor actividad en sistemas celulares (tales como la actividad de fenilalanina amoniaco liasa implicada en la defensa contra estreses bióticos inducidos por patógenos).

25 Otro aspecto más de la presente divulgación es un método de aumento de la resistencia de las plantas a las enfermedades. Este método implica aplicar una composición desvelada en el presente documento a plantas en condiciones eficaces para aumentar la resistencia de la planta a las enfermedades. La aplicación de la composición deseada desvelada en el presente documento se realiza como se ha descrito anteriormente, usando una cantidad suficiente de la composición deseada desvelada en el presente documento apropiadamente preparada para el modo de aplicación seleccionado.

30 Un aspecto adicional de la presente divulgación es un método de aumento de los rendimientos de plantas, a través del aumento de la altura, el espesor (de tallo, de hojas, de raíces...), la biomasa o el número de flores/frutos por planta. Este método implica la aplicación de una composición desvelada en el presente documento a plantas en condiciones eficaces para obtener mayores rendimientos. La aplicación de la composición deseada desvelada en el presente documento se realiza como se ha descrito anteriormente, usando una cantidad suficiente de la composición deseada desvelada en el presente documento apropiadamente preparada para el modo de aplicación seleccionado.

40 La presente invención se describirá con más detalle en los ejemplos adjuntos, en referencia a las figuras adjuntas que se presentan como una ilustración no limitante de las diversas realizaciones de la presente invención.

45 Ejemplos

Ejemplo 1: Preparación de quitooligosacáridos

50 Se disolvió quitosano a una concentración de aproximadamente 10,0 g/l mediante agitación durante la noche a temperatura ambiente en tampón de acetato aproximadamente 0,175 M a un pH de aproximadamente 5,5. Esta solución de quitosano (aproximadamente 90 ml) se mezcló con 10 ml de Pectinex Ultra SPL (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Dinamarca). La mezcla de reacción se incubó a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 24 h. Los quitooligosacáridos se aíslan por precipitación selectiva en metanol al 90 % del hidrolizado de quitosano neutralizado. La composición del conjunto quitooligosacárido obtenido se presenta en la Tabla 1.

55 **TABLA 1:** Composición iónica asignada de espectros de MALDI-TOF-EM de quitooligosacáridos con grados de polimerización (GP) de 6 o superior preparados mediante hidrólisis enzimática y fraccionados mediante precipitación selectiva en metanol al 90 %.

<i>m/z</i>	Composición de iones	Tipos
1007,4	(GlcN) ₆	[M+Na] ⁺
1023,4		[M+K] ⁺
1049,9	(GlcN) ₅ -GlcNAc	[M+Na] ⁺
1109,9	(GlcN) ₃ -(GlcNAc) ₃	[M+H] ⁺
1168,4	(GlcN) ₇	[M+Na] ⁺
1184,4		[M+K] ⁺

<i>m/z</i>	Composición de iones	Tipos
1210,7	(GlcN) ₆ -GlcNAc	[M+Na] ⁺
1226,4		[M+K] ⁺
1270,7	(GlcN) ₄ -(GlcNAc) ₃	[M+H] ⁺
1329,5	(GlcN) ₈	[M+Na] ⁺
1345,5		[M+K] ⁺
1371,8	(GlcN) ₇ -GlcNAc	[M+Na] ⁺
1387,5		[M+K] ⁺
1490,5	(GlcN) ₉	[M+Na] ⁺
1506,5		[M+K] ⁺
1532,8	(GlcN) ₈ -GlcNAc	[M+Na] ⁺
1651,6	(GlcN) ₁₀	[M+Na] ⁺
1812,7	(GlcN) ₁₁	[M+Na] ⁺

Ejemplo 2: Preparación de oligogalacturonanos

5 Se obtuvieron oligómeros pécticos mediante hidrólisis enzimática de ácido poligalacturónico. Se hidrolizó solución de
 10 PGA (aproximadamente al 2 % p/v, pH 6,0, 90 ml) con aproximadamente 10 ml de solución Pectinex Ultra SPL
 (1:3000) durante 60 minutos. Después de que se hirviera la solución durante aproximadamente 10 minutos, los
 oligosacáridos pécticos se fraccionaron mediante precipitación selectiva de su sal de bario. La composición del
 conjunto de oligogalacturonano obtenido se presenta en la figura 1 que es un patrón de elución de HPAEC-PAD de
 la mezcla de oligogalacturonanos del hidrolizado péctico. Los picos se etiquetan como su grado correspondiente de
 polimerización.

Ejemplo 3: Estabilización de la conformación de huevera

15 Los quitoooligosacáridos son capaces de estabilizar la conformación de huevera de los oligogalacturonanos inducidos
 por iones de calcio. Este efecto depende del grado de polimerización de los quitoooligosacáridos, el grado de
 acetilación (GA) y la relación molar del quitoooligosacárido/ácido galacturónico en la mezcla. Se usó un anticuerpo
 monoclonal (denominado 2F4), que reconoce la conformación de huevera inducida por calcio de la pectina.

20 Recubrimiento de micropocillos con inmunoglobulina anti-ratón: se dispensaron cincuenta µl de inmunoglobulina
 anti-ratón (molécula completa, SIGMA) (aproximadamente 0,05 mg/ml en tampón de carbonato 50 mM pH 9,5) en
 cada pocillo de microplacas de Alta Capacidad de Unión NUNC (MAXISORP) y se dejaron durante la noche a 4 °C.
 La unión no específica se bloqueó mediante la incubación de los pocillos durante aproximadamente 2 h a
 25 aproximadamente 37 °C con aproximadamente 250 µl de albúmina de suero bovino (aproximadamente 30 mg/ml
 preparada en tampón de acetato 50 mM pH 5,7 que contiene aproximadamente CaCl₂ 0,5 mM y aproximadamente
 NaCl 150 mM). Esta solución, cuando se expresa en miliequivalentes, corresponde a 1 miliequivalente de calcio, ya
 que el calcio es un catión divalente, y 150 miliequivalentes de sodio, ya que el sodio es un catión monovalente.
 Después de la retirada del exceso de albúmina, se añadieron soluciones competitivas a los pocillos.

30 Preparación de soluciones competitivas e incubación con anticuerpos: se prepararon soluciones competitivas con
 100 µl de ascitis de 2F4 diluida 177 veces en el tampón de acetato que contenía la solución de Ca²⁺/Na⁺ que se ha
 descrito anteriormente y se preincubaron con aproximadamente 100 µl de la solución de mezcla de material péctico
 y quitoooligosacáridos durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 25 °C. Después, estas mezclas de
 oligosacáridos y anticuerpos se centrifugaron durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 7500 g
 35 antes de dispensar los sobrenadantes en micropocillos recubiertos con inmunoglobulina anti-ratón y bloqueados
 como se ha descrito anteriormente. Las microplacas que contenían sobrenadantes de los ensayos competitivos se
 incubaron durante aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 37 °C. Después, las microplacas se lavaron
 ocho veces con el tampón que contenía la solución de Ca²⁺/Na⁺ que se ha descrito anteriormente y que contenía
 40 adicionalmente aproximadamente el 0,1 % de Tween 20 antes de la adición de aproximadamente 50 µl de
 inmunoglobulina anti-ratón de oveja marcada con peroxidasa de rábano picante (aproximadamente 1:5000 en
 tampón de acetato 50 mM que contenía la solución de Ca²⁺/Na⁺ que se ha descrito anteriormente) durante 60
 minutos a 37 °C. Después de un segundo ciclo de lavado, la unión de los anticuerpos se reveló mediante
 aproximadamente 100 µl de sustrato de TMB K-blue potenciado (Neogen Corporation, Lexington, KY, EE.UU.)
 45 incubado durante aproximadamente 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. El proceso revelador se
 detuvo mediante aproximadamente 50 µl de HCl 1 N. La absorbancia de la solución se midió después de 15 minutos
 con un Titertek multiscan® a 405 nm.

La Figura 2 representa la estabilización de la dimerización de oligogalacturonanos inducidos por calcio (GP9-GP15)
 mediante quitoooligosacáridos de bajo GA y diferentes grados de polimerización. Los MoAb 2F4 se incubaron con
 oligogalacturonanos y diferentes concentraciones de quitoooligosacáridos con GA ~ 10 % de GP bajo y alto. Las
 50 mezclas resultantes se centrifugaron y los sobrenadantes se dispensaron en micropocillos recubiertos con Ig anti-
 ratón. Los resultados se expresan como porcentaje de la absorbancia del control sin quitoooligosacáridos.

Ejemplo 4: Experimentos in vitro

A. Las moléculas pécticas obstaculizan la muerte celular inducida por concentraciones altas de quitooligosacáridos totalmente desacetilados en suspensiones de células de *Arabidopsis thaliana*. La viabilidad celular se expresa como una función del contenido de proteína de las células (mg de proteína/peso fresco (PF)). La Figura 3 representa el contenido de proteína de las suspensiones de células de *Arabidopsis* 24 horas después del tratamiento con quitooligosacáridos (totalmente desacetilados, GP entre 5 y 9), oligogalacturonanos (GP superior a 8) y su combinación. Los datos son la media \pm DT de muestras por triplicado de un representante de dos experimentos independientes.

Se cultivaron células cultivadas en suspensión derivadas de hojas de *Arabidopsis thaliana* cepa L-MM1 ecotipo *Landsberg erecta* en medio de Murashige y Skoog (aproximadamente 4,43 g/l) con sacarosa (aproximadamente 30 g/l) y aproximadamente 0,5 μ g/ml de NAA y aproximadamente 0,05 μ g/ml de Kinetina, pH 5,7. Los cultivos se mantuvieron en un fotoperíodo de luz/oscuridad de 16 h/8 h, a aproximadamente 25 °C, en un agitador rotatorio a 100 rpm. Las células se diluyeron 10 veces en medio recién preparado cada 7 días.

Los quitooligosacáridos que se han de ensayar se disolvieron en 250 μ l de agua destilada, se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,22 μ m (MILLIPORE) y se añadieron asépticamente a aproximadamente 10 ml de células cultivadas en suspensión de 3 días de antigüedad y se incubaron aproximadamente 24 horas a aproximadamente 25 °C con agitación suave. Se centrifugaron cinco ml de la mezcla de reacción durante aproximadamente 5 minutos a aproximadamente 100 g y a aproximadamente 4 °C para recoger las células. Las células se homogeneizaron a aproximadamente 4 °C en aproximadamente 1 ml de tampón de borato aproximadamente 0,1 M (pH 8,8) que contenía mercaptoetanol aproximadamente 2 mM. El homogeneizado se centrifugó a 4000 rpm durante aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 4 °C. La concentración de proteína de los extractos se determinó mediante el ensayo de proteína Bradford (BIO-RAD).

B. Los quitooligosacáridos en combinación con oligogalacturonanos estimulan el crecimiento celular en la suspensión de células de zanahoria. Este experimento se realizó como se ha descrito anteriormente, pero usando una suspensión de células de zanahoria (*Daucus carota*). La densidad celular se midió en peso (g de células/ml).

La Figura 4 representa la densidad celular de la suspensión de células de zanahoria 24 h después del tratamiento con quitooligosacáridos (totalmente desacetilados, GP entre 5 y 9), oligogalacturonanos (GP superior a 8) y su combinación. Los datos son media \pm DT de muestras por triplicado de un representante de dos experimentos independientes.

C. Las combinaciones específicas de oligogalacturonanos y quitooligosacáridos tienen mayor actividad inductora de la reacción de defensa de la planta que los oligosacáridos individuales.

Este experimento se realizó como se ha descrito anteriormente. La actividad de PAL (EC 4.3.1.5) se determinó en 0,125 ml de sobrenadante en presencia de aproximadamente 1,37 ml de tampón de borato 0,1 M (pH 8,8) complementado con L-Fenilalanina aproximadamente 60 mM como se describe por Beaudoin-Eagan y Thorpe (*Plant. Physiol* 78: 438-441, 1985) y se expresó como micromol de ácido cinámico producido por mg de proteína por hora).

La Figura 5 representa la inducción de actividad de PAL en la suspensión de células de *Arabidopsis* 24 h después del tratamiento con quitooligosacáridos (totalmente desacetilados, GP entre 5 y 9), oligogalacturonanos (GP superior a 8) y su combinación. Los datos son media \pm DT de muestras por triplicado de un representante de dos experimentos independientes.

D. Las combinaciones específicas de oligogalacturonanos y quitooligosacáridos inducen un menor estrés oxidativo en las plantas que la aplicación individual de estos oligosacáridos.

Las condiciones de cultivo celular son similares a las descritas anteriormente.

Medición de H₂O₂: Los quitooligosacáridos que había que someter a ensayo se disolvieron en aproximadamente 50 μ l de agua destilada, se filtraron a través de un filtro de membrana de 0,22 μ m (MILLIPORE) y se añadieron a aproximadamente 5 ml de células cultivadas en suspensión de 3 días de antigüedad y se incubaron a 25 °C con agitación. Se retiraron partes alícuotas de aproximadamente 100 μ l cada 4 minutos durante 30 minutos, se centrifugaron con vueltas rápidas y la concentración de H₂O₂ se midió en el sobrenadante usando el Kit de Ensayo de peróxido de hidrógeno/peroxidasa Amplex Red (Molecular Probes) de acuerdo con las instrucciones del proveedor.

La Figura 6 representa la acumulación de peróxido de hidrógeno en la suspensión de células de *Arabidopsis* 24 h después del tratamiento con quitooligosacáridos (totalmente desacetilados, GP entre 5 y 9), oligogalacturonano (GP superior a 8) y su combinación. Los datos son media \pm DT de muestras por triplicado de un representante de dos experimentos independientes.

EJEMPLO 5: Las semillas de tomate pueden absorber combinaciones específicas de oligogalacturónidos y quitooligosacáridos y estimular el crecimiento de las plantas.

Se sumergieron semillas de planta de tomate (*Lycopersicon esculentum*) de la variedad "Moneymaker" en una solución que contenía una mezcla de oligogalacturónidos y quitooligosacáridos en condiciones iónicas adecuadas para inducir la formación de dímeros pécticos (cationes Ca²⁺/Na⁺ a una relación de aproximadamente Ca²⁺

0,5 mM/Na⁺ 150 mM) o una solución que contenía todos los elementos de la mezcla excluyendo la mezcla de oligosacáridos (Control) durante 4 horas. Los quitooligosacáridos utilizados tenían un grado de acetilación del 25 %. Después, las semillas se secaron antes de sembrar y se cultivaron durante 30 días en un arriate de siembra de 6 cavidades en el suelo a 25 °C en un régimen de 16 h de luz diurna/8 h de oscuridad.

5 La Figura 7 representa la biomasa (fresca y seca) de las plantas de tomate de 30 días de edad obtenidas de las semillas tratadas con quitooligosacáridos, oligogalacturónidos y su combinación, expresada como porcentaje de la biomasa de las plantas de control. Se informan los valores de la media ± SE (n = 3). Las letras mayúsculas y minúsculas se refieren a dos ensayos ANOVA independientes. Los datos con las mismas letras no son estadísticamente diferentes (P < 0.05).

EJEMPLO 6: La aplicación foliar de combinaciones específicas de oligogalacturónidos y quitooligosacáridos induce sinérgicamente reacciones de defensa en plantas de tomate.

15 Se cultivaron plantas de tomate de la variedad "moneymaker" en suelo en condiciones controladas con un régimen de luz/oscuridad de 16h/8h respectivamente, a 25 °C, durante 20 días antes de ser pulverizadas con soluciones que contenían la mezcla de oligogalacturónidos y quitooligosacáridos a 250 mg.l⁻¹ disuelta en una solución a pH 5,5 que contenía Tween 20 al 0,01 % y cationes Ca²⁺/Na⁺ a una relación de aproximadamente Ca²⁺ 0,5 mM/Na⁺ 150 mM. Los quitooligómeros utilizados en la mezcla tenían un grado de acetilación (GA) del 25 %. Como control, se pulverizó agua que contenía Tween 20 aproximadamente al 0,01 % sobre las hojas.

25 Después de 24 horas, las hojas verdaderas de las plantas tratadas mediante pulverización se recolectaron y molieron en nitrógeno líquido. Las hojas en polvo se extrajeron en tampón de acetato de sodio 50 mM pH 5,2 que contenía EDTA aproximadamente 5 mM, β-mercaptoetanol aproximadamente 14 mM y NaCl aproximadamente 1,0 M a la velocidad de aproximadamente 1 g de hojas en polvo por 2 ml de tampón. Después, el extracto se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4 °C. El sobrenadante se analizó para determinar la actividad de dos proteínas relacionadas con la patogenicia: glucanasa (actividad expresada como mg de glucosa liberada/mg de proteína.min) (Boudart et al. (1998) *Planta* 206: 86-94) y quitinasa (actividad expresada como picomoles de p-nitrofenol liberado/mg de proteína.min) (kit de Ensayo de Quitinasa, Sigma).

30 La Figura 8 representa la inducción de actividad de glucanasa y quitinasa en plantas de tomate después de 24 horas de una aplicación foliar de la mezcla de oligogalacturónidos y quitooligosacáridos. Se notifican valores de la media ± DT (n = 3). Los ensayos de ANOVA indican diferencias estadísticamente significativas (P < 0,05) entre las plantas tratadas con la solución de control y la mezcla.

EJEMPLO 7: Combinaciones específicas de oligogalacturónidos y quitooligosacáridos inducen defensa sinérgicamente reacciones en plantas de Arabidopsis.

40 Se cultivaron plantas de *Arabidopsis thaliana* a 25 °C en un régimen de 16 h de luz diurna/8 h de oscuridad, en medio semisólido que contenía aproximadamente 4,4 g/l de nutrientes de Murashige y Skoog, aproximadamente 30 g/l de sacarosa y aproximadamente 0,3 g/l de agar. Las plantas completamente desarrolladas se retiraron del medio, se lavaron con tampón MES aproximadamente 0,05 M a pH 5,7 y se transfirieron al mismo tampón con cationes Ca²⁺/Na⁺ a una relación de aproximadamente Ca²⁺ 0,5 mM/Na⁺ 150 mM, que contenía oligogalacturónidos (GP 9-20) solos, quitooligómeros (GP 5-9, GA del 25 %) solos o una mezcla de oligogalacturónidos y quitooligómeros. La actividad de la fenilalanina amoniaco liasa (PAL) se sometió a ensayo 24 horas después (se produjeron micromoles de ácido cinámico/mg de proteína.h).

50 La Figura 9 representa la inducción de actividad PAL en plantas de Arabidopsis tratadas con oligogalacturónidos, quitooligómeros o su combinación. Se notifican los valores de la media ± DT (n = 3). El ensayo de ANOVA indica diferencias estadísticamente significativas (P < 0,05) para las plantas tratadas con quitooligómeros o mezcla.

Ejemplo 8: FLUJO DE SALIDA DE POTASIO Y ALCALINIZACIÓN DEL MEDIO

55 Se cultivaron células cultivadas en suspensión derivadas de hojas de *Arabidopsis thaliana* cepa L-MM1 ecotipo *Landsberg erecta* en medio de Murashige y Skoog (aproximadamente 4,43 g l⁻¹) con sacarosa (aproximadamente 30 g l⁻¹), NAA aproximadamente 0,5 µg ml⁻¹, Cinetina aproximadamente 0,05 µg ml⁻¹, pH 5.7. Los cultivos se mantuvieron en un fotoperíodo de luz/oscuridad de 16 h/8 h, a aproximadamente 25 °C, en un agitador rotatorio a 100 rpm. Las células se diluyeron 10 veces en medio recién preparado cada siete días. Se usaron células de siete días de antigüedad para los experimentos.

60 Se disolvieron quitooligosacáridos (aproximadamente 30 mg l⁻¹), oligogalacturónidos (aproximadamente 40 mg l⁻¹) y una mezcla de ambos oligosacáridos aproximadamente 70 mg l⁻¹ en una solución que contenía sacarosa aproximadamente 10 mM, Ca²⁺ aproximadamente 0,5 mM, Na⁺ aproximadamente 50 mM y MES aproximadamente 0,5 mM ajustado a pH 5,7 con Tris-(hidroximetil)-aminometano.

65

Se colocaron alícuotas de células lavadas (100 mg de peso fresco (PF) ml⁻¹) en viales de vidrio y el medio de incubación se cambió por un volumen igual de soluciones de ensayo y se agitó en un agitador rotatorio a 150 rpm. El pH y las concentraciones de K⁺ extracelulares se determinaron en alícuotas del medio de incubación obtenido por filtración rápida de las células a través de Miracloth® (Calbiochem).

5 Los cambios de pH extracelular se controlaron con un electrodo de pH y las concentraciones de K⁺ extracelulares se determinaron en HCl 1 N usando un espectrofotómetro de absorción atómica (PU 9200X, Pye-Unicam, Cambridge, RU).

10 La Figura 10 muestra el flujo de salida de potasio de células en suspensión de Arabidopsis tratadas con quitooligómeros, oligogalacturónidos o la mezcla. La mezcla controla el flujo de salida de potasio hasta valores similares a los oligogalacturónidos solamente.

15 La Figura 11 muestra la alcalinización del medio de células en suspensión de Arabidopsis tratadas con quitooligómeros, oligogalacturónidos o la mezcla. La mezcla induce una alcalinización sostenida del medio, mientras que los componentes individuales tienen un efecto durante menos de una hora después del tratamiento.

20 La Figura 12 representa la alcalinización media de las células en suspensión de Arabidopsis 24 horas después del tratamiento con quitooligómeros, oligogalacturónidos o la mezcla. La mezcla induce una alcalinización del medio claramente más alta que los componentes individuales.

Ejemplo 9: ANÁLISIS DE PROTEÓMICA/GENÓMICA/TRANSCRIPTÓMICA

Para estos análisis, se realizaron cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana* como se ha descrito anteriormente.

25 A. Análisis proteómico de proteínas expresadas diferencialmente.

Después de cuatro horas de incubación con tampón de control, oligogalacturonanos, oligoquitosanos o la mezcla, las células se recogieron mediante centrifugación y las proteínas se extrajeron y se analizaron mediante electroforesis en gel bidimensional usando el protocolo descrito por Valot et al. 2005 (*Plant Molecular Biology* 59: 565-580).

35 El análisis proteómico mostró 59 proteínas reguladas significativamente en al menos un tratamiento en comparación con los otros tres. De entre estas 59 proteínas, se identificaron 44.

40 Las proteínas sobreexpresadas se asociaron principalmente a mecanismos de defensa, como PAL (Fenilalanina Amoníaco Liase). Es interesante ver que una cuarta parte de las proteínas reguladas estaban relacionadas con el metabolismo energético. Sorprendentemente, el análisis de conglomerados indicó que las células inducidas con la mezcla bioactiva indujeron un patrón de expresión de proteínas solubles diferente del de las células inducidas con componentes individuales que estaban más estrechamente relacionados entre sí. En la Tabla 2 se representan ejemplos de proteínas cuyos niveles de expresión son diferentes entre los tratamientos:

Tabla 2:

	Control	Quitooligosacáridos	Composición	Oligogalacturonanos
Succinato deshidrogenasa	1,00*	2,00*	0,93	1,53
WD40-proteína de repetición	1,00	0,75*	1,12*	0,85
Enzima málica dependiente de NADP	1,00	1,14*	0,71*	0,82
Translocador de fosfato mitocondrial	1,00	0,88*	1,51*	1,12
Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH)	1,00*	1,62*	1,13	1,56

45 Las proteínas cuyos niveles de expresión son estadísticamente diferentes entre sí están marcadas con un asterisco (*).

B. Análisis transcriptómico de genes expresados diferencialmente.

50 El análisis transcriptómico se realizó mediante la técnica de micromatrices de ADNc en células de Arabidopsis muestreadas cuatro horas después del tratamiento con inductores. El ARN total de células tratadas con Arabidopsis se extrajo usando el Mini Kit RNeasy QIAGEN (Darlington Lab).

55 El análisis transcriptómico de Arabidopsis mostró 96 genes significativamente regulados ($P < 0,05$) con al menos una relación de 3 veces, en al menos 2 de los 3 tratamientos (oligogalacturónidos, quitooligosacáridos, mezcla de ambos). Al contrario que el análisis proteómico, el análisis transcriptómico reveló que el tratamiento de células cultivadas con oligómeros de quitosano o con la mezcla indujo una respuesta muy similar. El tratamiento con

oligómeros de pectina parece inducir una respuesta limitada, cercana a los cultivos de control. Los tratamientos con oligómeros de quitosano, oligómeros de pectina o con su mezcla regulan la expresión de los genes 95 (57 abajo, 38 arriba), 25 (16 abajo, 9 arriba) y 92 (56 abajo, 36 arriba), respectivamente.

- 5 Entre los genes regulados, varios presentan patrones de expresión distintos dependiendo del tratamiento. Algunos de esos genes se enumeran en la Tabla 3, donde los niveles de expresión génica se proporcionan como relación sobre el nivel de expresión en el control. Las diferencias estadísticamente significativas se indican con un asterisco.

Tabla 3

Nombre	N.º de acceso	Quitooligosacáridos	Composición	Oligogalacturonanos
Clavata3/1 Relacionado con ESR	At1g73165	-3,60*	-1,15	3,35*
Familia similar a extensina rica en prolina	At5g49080	3,15	2,51*	-3,68*
proteína de la familiar de repetición WD-40	At5g40880	3,38*	1,77	-2,24*
Proteína relacionada con la defensa	At3g44870	5,46*	-2,06*	-1,15
Familia de la co-chaperona grpE	At4g26780	-1,15	3,16*	1,03
Proteína de unión a AMP	Atlg75960	1,61	3,87*	1,95

10

Ejemplo 10: inducción de resistencia a *Venturia inaequalis* en plántulas de manzano

15

Se pusieron a vernalizar semillas de manzano (aproximadamente 1400), variedad «Golden Delicious» durante 90 o 120 días a 4 °C después de la desinfección con lejía. Después, las semillas se sembraron en tierra vegetal a una densidad de 40 semillas por arriate. Después, cada arriate se cubrió con tierra vegetal, se regó e incubó a una temperatura cercana a 10 °C durante una semana antes de transferirse a un invernadero a 18 °C.

20

Se trataron grupos de 40 plántulas mediante pulverización con una solución de control (agua más Tween 20 al 0,01 %) o inductores en soluciones acuosas (composición desvelada en el presente documento a 0,25 g.l⁻¹ en la "etapa de 3 hojas" a los 10 y 3 días antes de la inoculación con *Venturia inaequalis* (150.000 conidios viables por ml). El porcentaje de área de superficie de esporulación se evaluó 14 días después de la inoculación en la última hoja desarrollada antes del tratamiento con inductores (F1) y la primera hoja se desarrolló después del tratamiento con inductores (F0). Los resultados se expresan como porcentaje de área de superficie de la hoja de esporulación (media ± DT de 200 plántulas por tratamiento) para F1 y F0 como se muestra en la Figura 13.

25

Ejemplo 11: Propiedades fungicidas de la combinación de KH₂PO₄ con una mezcla de oligogalacturónidos y quitooligosacáridos.

30

Se inocularon tres manchas de 20 µl que contenían cada una 2.10⁴ esporas de *Penicilium expansum* en placas de Petri de 39 g.l⁻¹ de agar de dextrosa de patata (PDA) sembradas en extensión con una de las siguientes soluciones: agua + Tween 20 al 0,01 % (control), mezcla de oligogalacturonanos y oligoquitosanos (0,5 g.l⁻¹), KH₂PO₄ (5 g.l⁻¹), mezcla de oligogalacturonanos y oligoquitosanos (0,5 g.l⁻¹) + KH₂PO₄ (5 g.l⁻¹). Las placas de Petri se incubaron 48 h a 25 °C y las esporas resultantes se cuentan usando una célula de Neubauer. Los resultados, expresados como promedios de 3 experimentos, se muestran en la Figura 14.

35

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende uno o más oligogalacturonanos con un grado de polimerización comprendido entre 9 y 20 y que tiene una conformación de huevera dimérica, o uno o más oligoguluronanos en una conformación de huevera, estabilizada adicionalmente mediante uno o más sacáridos policatiónicos.
2. La composición de la reivindicación 1, en la que dicha conformación de huevera dimérica de dicho uno o más oligogalacturonanos se detecta mediante el anticuerpo 2F4.
- 10 3. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sacárido policatiónico es un oligosacárido de quitosano o un polisacárido de quitosano, preferentemente un oligo o polisacárido de quitosano que tiene un grado de polimerización superior a 5.
- 15 4. La composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que el oligo o polisacárido de quitosano tiene un grado de acetilación inferior al 50 %.
5. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es una solución acuosa.
- 20 6. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende adicionalmente uno o más elementos seleccionados entre el grupo que consiste en otros sacáridos, reguladores de crecimiento o factores de crecimiento, minerales, iones, nutrientes, aditivos alimentarios, aromatizantes, colores, vitaminas, fitonutrientes o una molécula bioactiva.
- 25 7. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores que es un producto seleccionado entre el grupo que consiste en una composición farmacéutica, una composición nutracéutica, una composición alimentaria o de pienso que incluye un alimento funcional o un pienso funcional, un producto fitosanitario, un inductor, un fertilizante, un adyuvante de estos productos, un reemplazo de fitohormonas, una potenciación de fitohormonas o un modulador de fitohormonas.
- 30 8. La composición de la reivindicación 7, en la que el producto fitosanitario es un fungicida.
9. Un biomaterial que comprende la composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 35 10. Un producto textil que comprende la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8.
11. Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 en aplicaciones alimentarias, piensos, textiles, cosméticos, industriales y/o medioambientales.
- 40 12. Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 para inducir la protección de plantas contra la infección por patógenos de plantas.
13. Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 como promotor del crecimiento vegetal.
- 45 14. Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 como recubrimiento para semillas.
15. Uso de la composición de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 8 como adyuvante antifúngico.

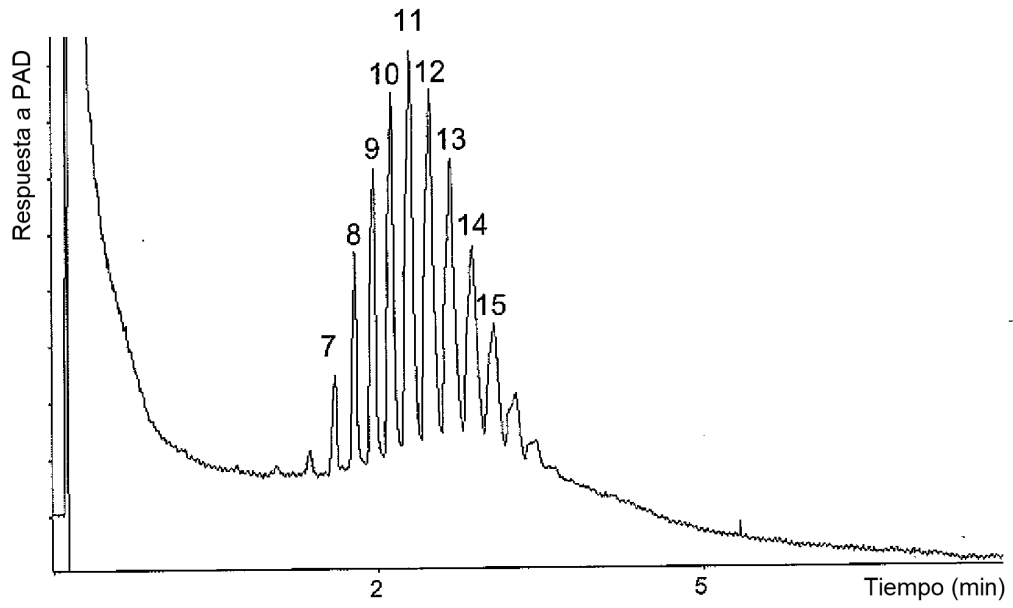


Fig. 1

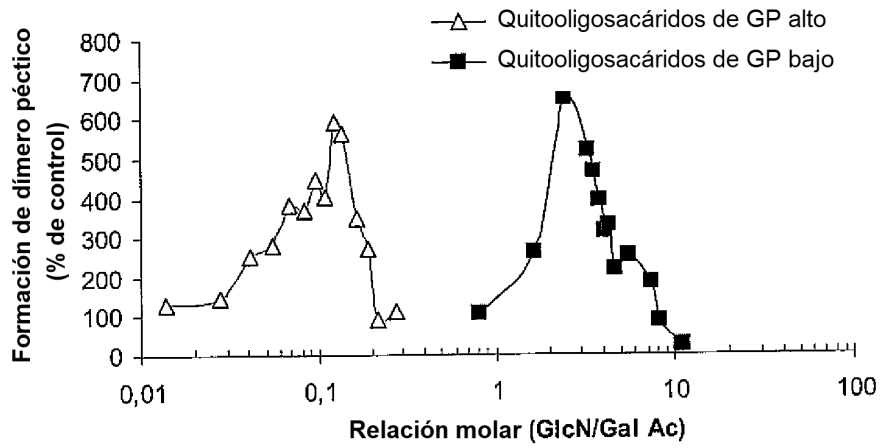


Fig. 2

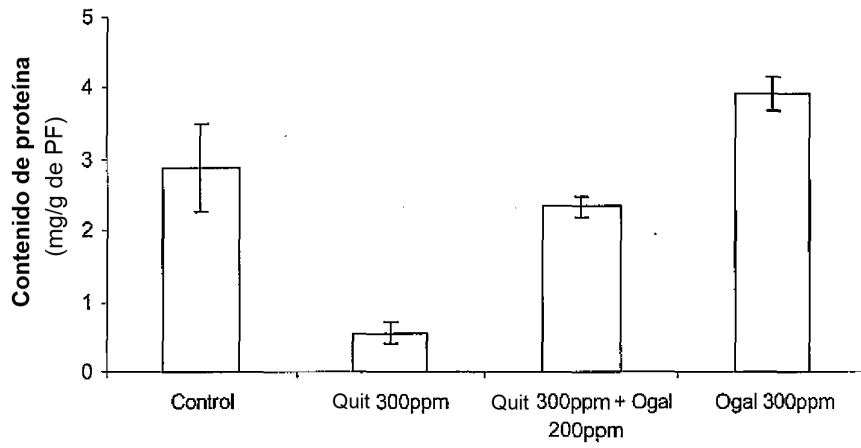


Fig. 3

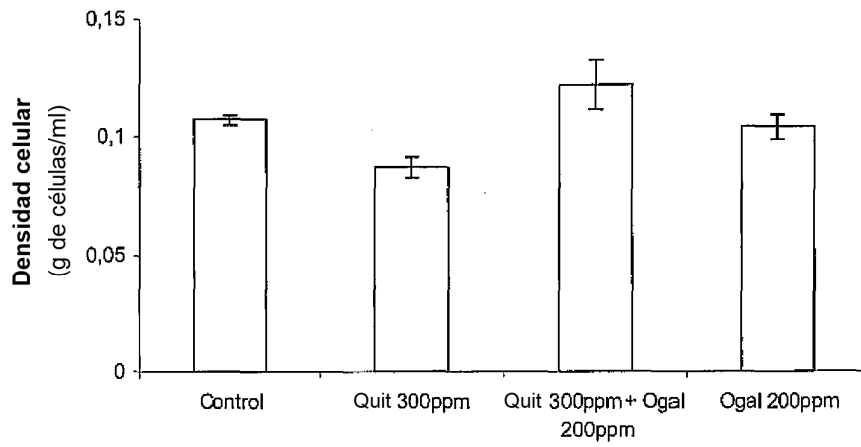


Fig. 4

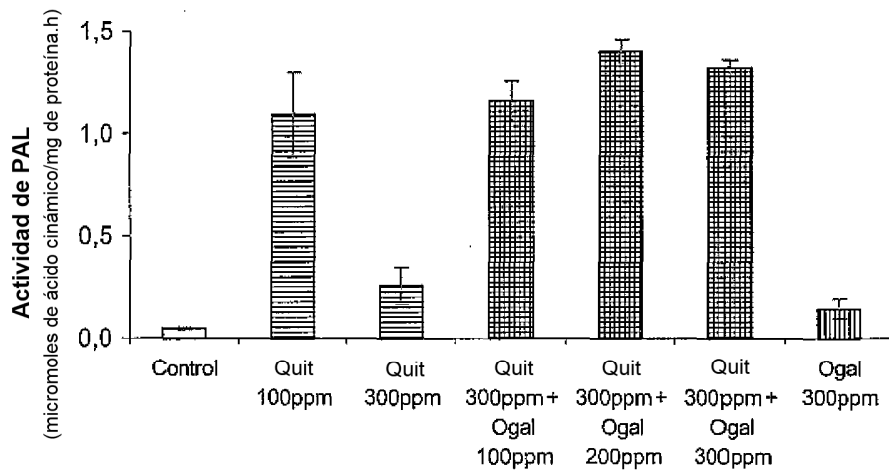


Fig. 5

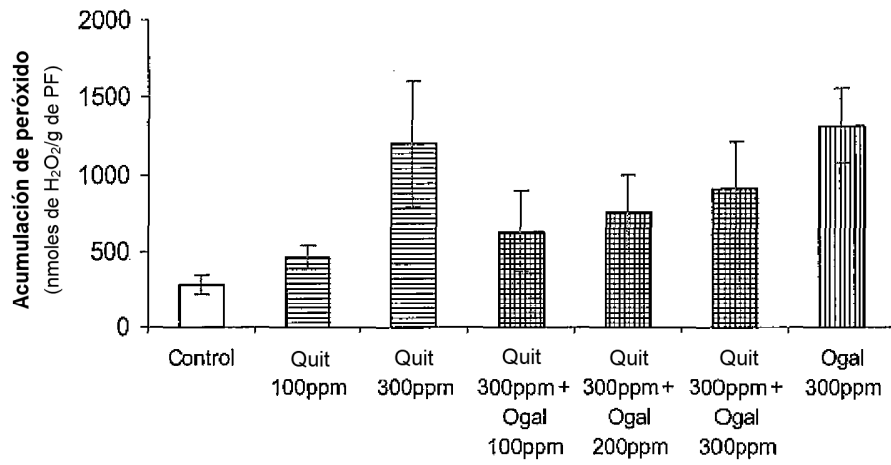


Fig. 6

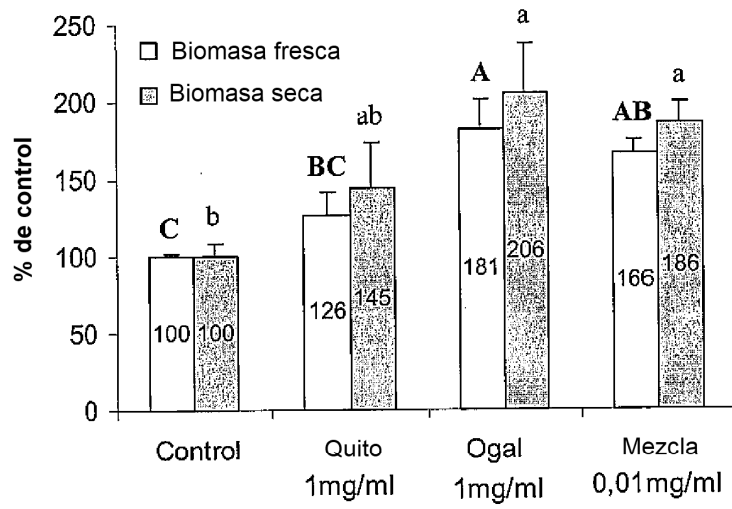


Fig. 7

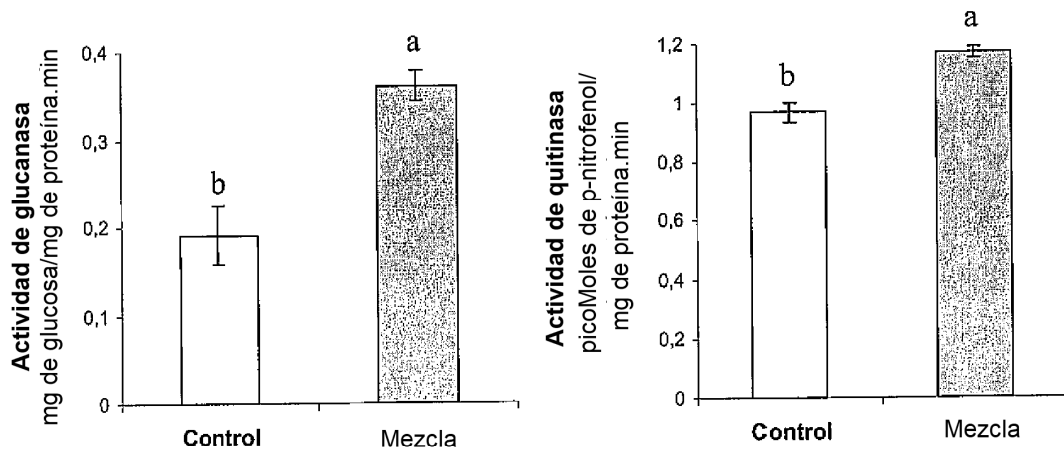


Fig. 8

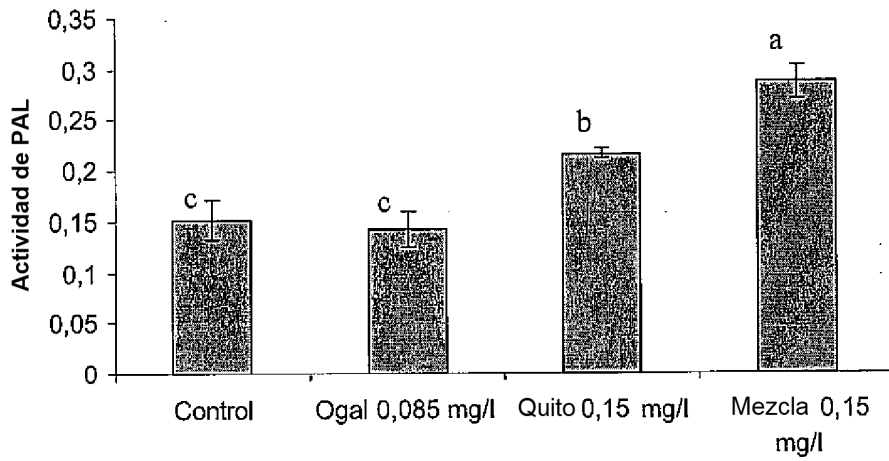


Fig. 9

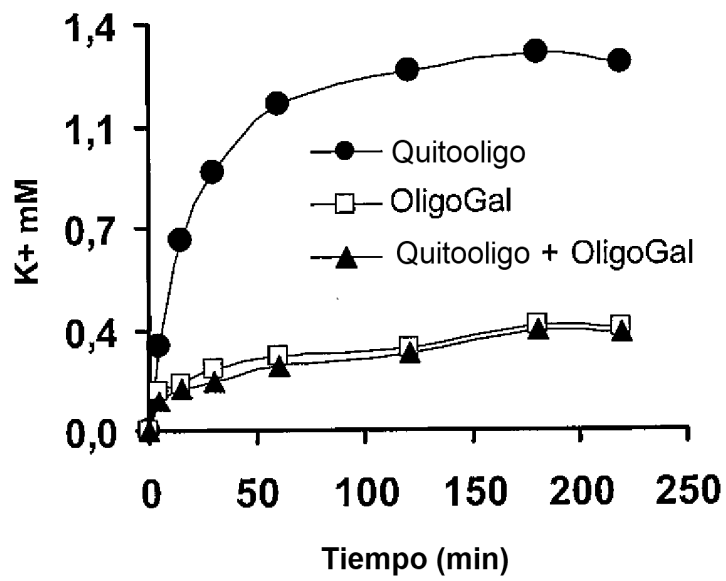


Fig. 10

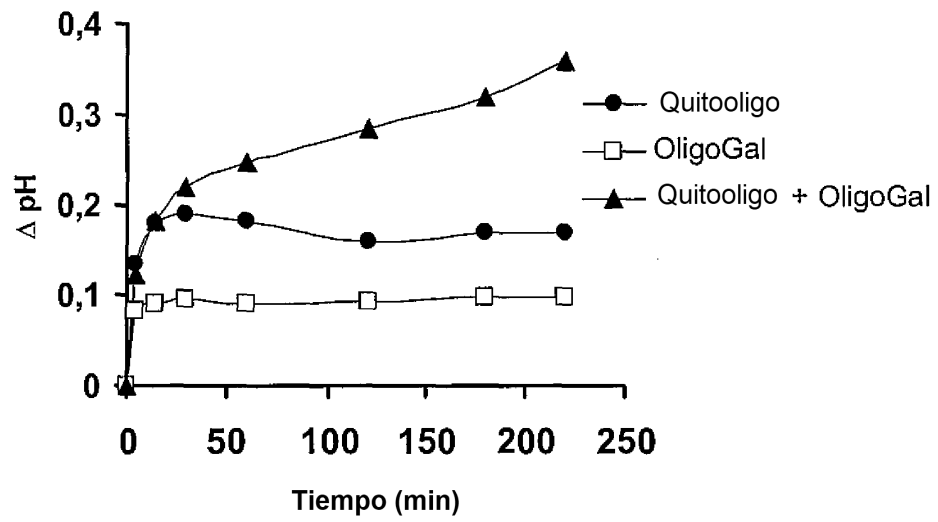


Fig. 11

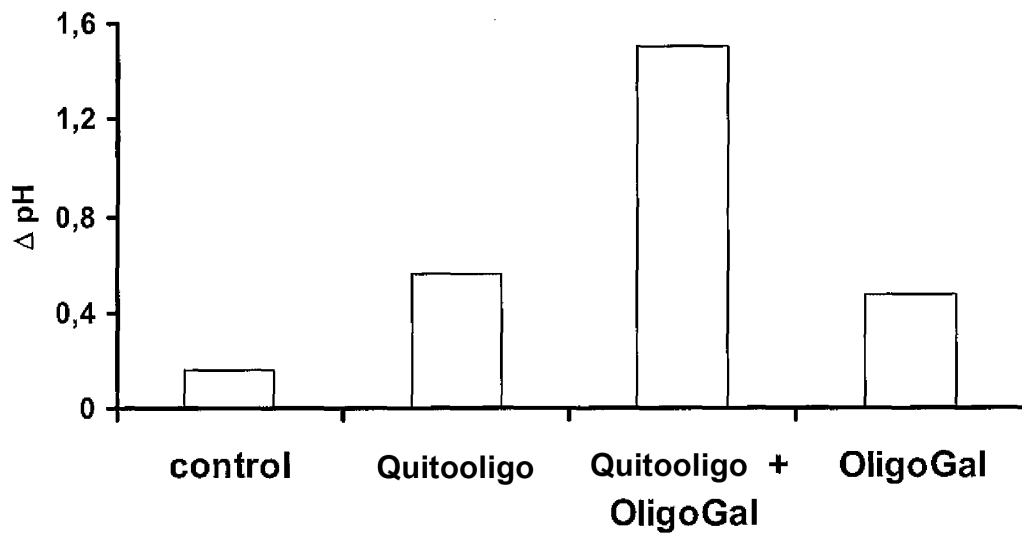


Fig. 12

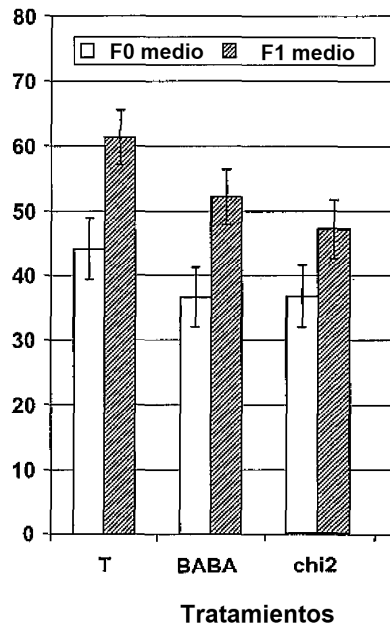


Fig. 13

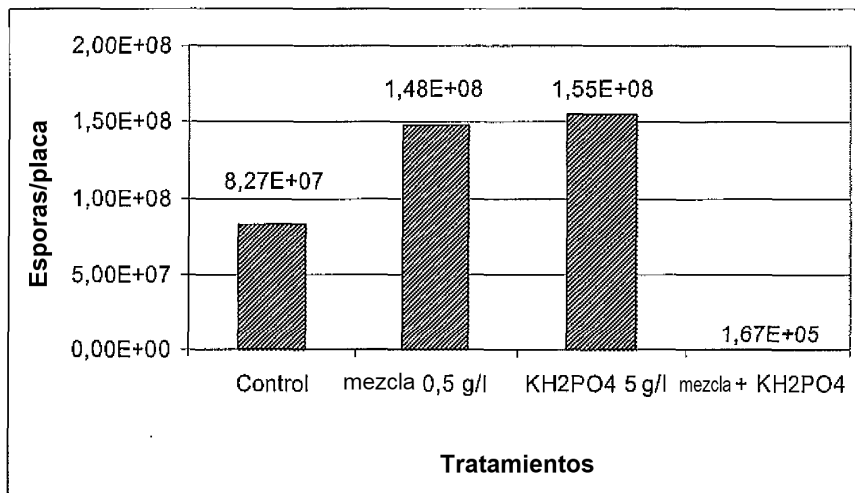


Fig. 14