

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 445 491**

21 Número de solicitud: 201231248

51 Int. Cl.:

A01N 35/02 (2006.01)

A61K 31/121 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

01.08.2012

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.03.2014

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**Serrano, 117
28006 Madrid ES**

72 Inventor/es:

**SOTO MISFFUT, María José;
NOGALES DÍAZ, Joaquina;
OLIVARES PASCUAL, José y
SANJUAN PINILLA, Juan**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **Método para prevenir y/o controlar infecciones bacterianas**

57 Resumen:

Método para prevenir y/o controlar infecciones bacterianas.

La presente invención se refiere a un método para prevenir y/o controlar infecciones bacterianas en una planta y/o cultivo, así como en productos (alimentos crudos, soluciones de lavado, material de uso hospitalario) e instalaciones susceptibles de contaminación por bacterias, mediante aplicación de metilcetonas alifáticas de cadena larga, fundamentalmente 2-tridecanona pero también 2-undecanona, 2-dodecanona, y 2-pentadecanona, en formas y concentraciones del orden micromolar no tóxicas tales que permiten evitar dicha infección sin producir un efecto bactericida (destrucción de bacterias). Asimismo, la presente invención se refiere a estas metilcetonas citadas para uso en medicina, mediante administración de dicho compuesto a un animal o un ser humano.

ES 2 445 491 A1

DESCRIPCIÓN

MÉTODO PARA PREVENIR Y/O CONTROLAR INFECCIONES BACTERIANAS

5

Campo de la invención

La presente invención se engloba en múltiples áreas de aplicación, como puede ser el de Química y Farmacia, concretamente en el campo de la Agricultura, empleándose el producto en cuestión como fitosatinario destinado a reducir enfermedades en plantas causadas por bacterias, y prevenir enfermedades alimentarias causadas por la ingestión de productos vegetales frescos contaminados con bacterias patógenas. La invención también tiene aplicación en el campo de la Medicina y en el de Sanidad, para prevenir y tratar infecciones bacterianas de importancia clínica y veterinaria en animales y personas, así como en instalaciones susceptibles de contaminación por bacterias, como es la Industria alimentaria.

15

Estado de la técnica**Control de enfermedades de plantas causadas por bacterias (bacteriosis)**

La forma más frecuente y habitual de proteger las plantas frente al ataque de patógenos ha estado basada en el uso masivo de pesticidas. El daño que ocasionan estos compuestos químicos al medio ambiente así como sus riesgos potenciales para la salud animal y humana, obligan a la búsqueda de soluciones alternativas para la protección de los cultivos.

Las bacterias fitopatógenas son el agente causal de numerosas enfermedades en plantas. Dichas enfermedades son normalmente difíciles de controlar por lo que las medidas van dirigidas fundamentalmente a la prevención. Entre los agentes químicos que se usan para controlar este tipo de infecciones se encuentran los basados en cobre como el caldo bordelés, oxiclóruo de cobre o hidróxido cúprico. Sin embargo, estos compuestos no dan resultados satisfactorios cuando las condiciones ambientales son las óptimas para el desarrollo y la diseminación del patógeno. Además es frecuente la aparición de bacterias resistentes a estos compuestos. Otra forma de combatir las infecciones bacterianas en plantas consiste en usar antibióticos como la estreptomina y la oxitetraciclina. El inconveniente de estos tratamientos es que no pueden usarse en plantas destinadas al consumo humano y animal, así como la aparición frecuente de resistencias (Agrios 2005. *Plant Pathology*, 5ª edición, Academic Press).

35

Una alternativa a estos tratamientos que está siendo investigada en los últimos años es el uso de péptidos antimicrobianos bien producidos por organismos vivos, bien sintéticos (Marcos et al. 2008. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46:273-301). Los principales inconvenientes de su uso en el control de bacteriosis están en su limitada eficacia in vivo ya que son degradados por proteasas de los tejidos vegetales, o bien en su alto coste económico en el caso de los sintéticos.

40

Prevención de enfermedades alimentarias causadas por la ingestión de productos vegetales frescos contaminados con bacterias patógenas

En los últimos años se han constatado numerosas evidencias que indican que frutas, hierbas, hortalizas, y en especial las verduras de hoja verde, son auténticos reservorios de bacterias enteropatógenas como *Salmonella enterica* o *Escherichia coli* (Berger et al. 2010. *Environ. Microbiol.* 12:2385-2397). El origen de la infección puede ser diverso, siendo el agua de riego, la principal vía de contaminación. Puesto que este tipo de alimentos se suelen consumir crudos o con muy poca elaboración, la presencia en ellos de este tipo de patógenos constituye un riesgo para la salud humana. Un ejemplo cercano de este problema lo hemos tenido en la crisis alimentaria que tuvo lugar en Alemania en el año 2011 causada por una cepa agresiva de *E. coli* que provocó la muerte de varias personas y la intoxicación de varios centenares. El origen de esta intoxicación fue inicialmente atribuido a partidas de pepino de origen español, lo que ocasionó una alarma que, aunque posteriormente desmentida, causó graves pérdidas en el sector hortofrutícola español.

55

La prevención doméstica de este tipo de infecciones se basa fundamentalmente en lavar abundantemente con agua y pelar siempre y cuando sea posible. El uso de zumo de limón y/o vinagre antes del consumo, parecen ser eficaces en reducir el nº de células viables de algunos de estos patógenos. Productores y distribuidores suelen incluir prácticas para eliminar este tipo de contaminantes basadas en tratamientos desinfectantes post-cosecha con cloro (20-200 µg/ml), ozono o una combinación de ambos, o radiaciones ionizantes. Otra alternativa sugerida para disminuir el riesgo de contaminación consiste en el desarrollo de prácticas agrícolas que incrementen poblaciones bacterianas en la filósfera que sean buenas competidoras frente a los potenciales patógenos (revisado en Berger et al. 2010. *Environ. Microbiol.* 12:2385-2397).

60

65

Control de las enfermedades infecciosas en animales y humanos causadas por bacterias

El procedimiento más habitual y efectivo en el tratamiento de infecciones bacterianas en animales y humanos consiste en la administración de antibióticos. Los antibióticos actúan provocando la muerte de la bacteria o bien impidiendo su multiplicación. El uso, a veces indiscriminado, de estos fármacos está dando lugar a la aparición de bacterias resistentes a la acción de los antibióticos más habituales (*super-bugs*). Las enfermedades causadas por bacterias resistentes suelen ser muy graves porque son difíciles de tratar. En el mejor de los casos, conllevan a un incremento en el coste del tratamiento, ya que hay que hacer uso de productos antibióticos de nueva generación frente a los cuales aún no hayan aparecido resistencias. En el caso de resistencias a antibióticos beta-lactámicos, está dando buen resultado el tratamiento conjunto del beta-lactámico con un inhibidor de beta-lactamasas, enzimas producidas por la bacteria que inactivan el antibiótico. También parecen ser efectivas las terapias con fagos o productos de fagos, para tratar o incluso prevenir infecciones bacterianas (Hermoso et al. 2007. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:461-472).

2-tridecanona

La 2-tridecanona (2-TDC, metil undecil cetona) es una metilcetona de larga cadena alifática (Fig. 1). Las metil cetonas alifáticas son compuestos naturales volátiles que han sido identificados en microorganismos, plantas, insectos y en animales (Forney and Markovetz. 1971. The biology of methyl ketones. *J. Lipid Res.* 12:383-395).

La 2-TDC es especialmente abundante en hojas de especies silvestres de tomate *Solanum habrochaites* subsp. *glabratum* en las que se puede acumular en concentraciones hasta 70 veces superiores (9.4 µg de 2-TDC por mg peso fresco de hoja) a las encontradas en la variedad cultivable de tomate (Williams et al. 1980. 2-Tridecanone: A Naturally Occurring Insecticide from the Wild Tomato *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. *Science* 207:888-889; Anthonius. 2001. Production and quantification of methyl ketones in wild tomato accessions. *J. Environ. Sci Health B* 36:835-848). No obstante, la 2-TDC no parece ser exclusiva de tomate y se ha identificado como un componente relativamente abundante en las raíces de *Glossocalyx staudtii*, en semillas de *Pilocarpus microphyllus* y en hojas de *Zanthoxylum armatum* (Agnaniet et al. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of leaves, roots and bark of *Glossocalyx staudtii*. *Nat. Prod. Commun.* 4:1127-1132; Braga et al. 2007. Insecticidal activity of 2-tridecanone against the cowpea weevil *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) *An.Acad.Bras.Cienc.* 79:35-39; Bisht and Chanotiya. 2011. 2-undecanone rich leaf essential oil from *Zanthoxylum armatum*. *Nat Prod. Commun.* 6:111-114). También se ha identificado 2-TDC en animales: como componente mayoritario en la secreción de las glándulas interdigitales del ciervo *Odocoileus hemionus columbianus*, donde podría participar en comunicación semioquímica (Wood et al. 1995. Volatile ketones from interdigital glands of black-tailed deer, *Odocoileus hemionus columbianus*. *J. Chem Ecol.* 21:1401-1408), y en glándulas mandibulares de abejas obreras donde parece actuar como feromona que induce respuestas agresivas en el insecto (Schorkopf et al. 2009. Mandibular gland secretions of meliponine worker bees: further evidence for their role in interspecific and intraspecific defence and aggression and against their role in food source signalling. *J. Exp. Biol.* 212:1153-1162). Más recientemente, la 2-TDC se ha identificado como un compuesto orgánico volátil (VOC) producido por bacterias de la rizosfera pertenecientes a los géneros *Burkholderia*, *Serratia* y *Escherichia* (Blom et al. 2011. Production of plant growth modulating volatiles is widespread among rhizosphere bacteria and strongly depends on culture conditions. *Environ. Microbiol.* 13:3047-3058).

La capacidad de las especies silvestres de tomate de producir cantidades significativas de 2-TDC, se ha relacionado con la alta resistencia innata de estas plantas frente al ataque de insectos herbívoros y ácaros (Williams et al. 1980. 2-Tridecanone: A Naturally Occurring Insecticide from the Wild Tomato *Lycopersicon hirsutum* f. *glabratum*. *Science* 207:888-889; Weston et al. 1989. Trichome secretion composition, trichome densities, and spider mite resistance of 10 accessions of *Lycopersicon hirsutum*. *Journal of American Horticultural Science*, 114, 492-498; Chatzivasileiadis and Sabelis (1997) Toxicity of methylketones from tomato trichomes to *Tetranychus urticae* Koch. *Experimental and Applied Acarology*, 21, 473-484; Goncalves, et al. 1998. Variation of 2-tridecanone level in tomato plant leaflets and resistance to two mite species (*Tetranychus* sp.). *Euphytica*, 104,33-38).

Existen estudios que demuestran la actividad insecticida y acaricida de la 2-TDC (Antonious et al. 2003. Insecticidal and acaricidal performance of methyl ketones in wild tomato leaves. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* 71:400-407). Se sabe que la aplicación de esta metilcetona no induce fitotoxicidad cuando es aplicada en spray a concentraciones de 0.44 g por litro de agua (Antonious. 2004. Persistence of 2-tridecanone on the leaves of seven vegetables. *Bull. Environ. Contam Toxicol.* 73:1086-1093).

La 2-TDC ha sido descrita como repelente de mosquitos y garrapatas (Roe (2004) Method of repelling insects. U.S. Patent Application 20040242703, Kina code A.I. Myers, Bisel, Sibley, & Sajovec, Raleigh, NC.). También se ha divulgado el uso de 1 ó más metilcetonas, entre ellas la 2-TDC, para el control de infestaciones por nemátodos en plantas así como la construcción y empleo de plantas transgénicas y bacterias modificadas genéticamente para ser aplicadas en plantas capaces de producir 2-TDC o una combinación de metilcetonas y compuestos relacionados para el control de ataques por insectos y nemátodos (Bradley et al. 2009, solicitud de patente WO 2009/100433 "Methods and compositions for plant pest control"; Bradley et al. 2011, solicitud de patente WO 2011/100650 "Improved compositions and methods for pathogen control in plants").

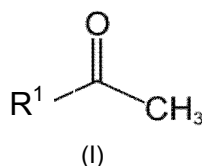
Sin embargo, aunque la 2-TDC se ha demostrado ser efectiva en el control de plagas (insectos y nemátodos) que atacan a las plantas, nunca ha sido probado su efecto en el control de infecciones bacterianas. Aunque se ha descrito el efecto antimicrobiano frente a ciertas bacterias y hongos de los aceites esenciales de *Glossocalyx staudtii*, algunos de los cuales contienen un alto porcentaje de 2-TDC, como es el caso del extraído de la raíz de esta planta donde la 2-TDC constituye el 55.2% (Agnaniet et al. 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of leaves, roots and bark of *Glossocalyx staudtii*. *Nat. Prod. Commun.* 4:1127-1132), nunca se ha demostrado que el efecto bactericida de estos aceites esenciales sea debido a la presencia de la metilcetona; De hecho, los propios autores sugieren que este componente del aceite no es tan eficiente como podría pensarse (página 1130). Además, existe al menos otra referencia bibliográfica que podría sugerir que la 2-TDC no fuera efectiva frente a infecciones bacterianas, ya que se ha demostrado que no muestra actividad antimicrobiana ni frente a hongos ni frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, o *Bacillus* ni Gram negativas como *Pseudomonas*, *Escherichia*, o *Proteus* (Wood et al. 1995. Volatile ketones from interdigital glands of black-tailed deer, *Odocoileus hemionus columbianus*. *J. Chem Ecol.* 21:1401-1408).

En definitiva, las infecciones bacterianas pueden causar enfermedades más o menos graves en plantas y animales, incluyendo al ser humano. La importancia de la prevención, control y en su caso tratamiento de las infecciones causadas por bacterias patógenas en seres humanos es obvia. Igualmente importante es prevenir y controlar las enfermedades causadas por bacterias en animales ya que algunas de estas infecciones pueden generar desde grandes pérdidas en el sector ganadero, a intoxicaciones alimentarias o incluso la transmisión de la enfermedad al hombre. Por otro lado, las enfermedades de plantas causadas por bacterias o bacteriosis son responsables de importantes pérdidas en agricultura. Aunque las bacterias fitopatógenas generalmente no pueden causar enfermedades en animales, en los últimos años se han acumulado las evidencias que indican que frutas, hierbas, hortalizas, y en especial las verduras de hoja verde, son auténticos reservorios de bacterias enteropatógenas como *Salmonella enterica* o *Escherichia coli*. El origen de la infección puede ser diverso, siendo el agua de riego, la principal vía de contaminación. Puesto que este tipo de alimentos se suelen consumir crudos o con muy poca elaboración, la presencia en ellos de este tipo de patógenos constituye un riesgo para la salud humana.

El control de las enfermedades de animales y vegetales causadas por bacterias se ha conseguido fundamentalmente mediante el tratamiento químico con antibióticos. Para la prevención de bacteriosis vegetales, también se usan agentes químicos basados en cobre como el caldo bordelés. El efecto negativo que potencialmente tienen estos compuestos tanto en el medio ambiente como en la salud de animales y humanos, así como el desarrollo de resistencias en bacterias patógenas que hacen muy difícil el tratamiento o en el mejor de los casos lo encarece, hace conveniente la búsqueda de soluciones alternativas más seguras. Se han presentado escasas alternativas hasta la fecha. El caso más llamativo es el de la 2-tridecanona, compuesto producido por variedades silvestres de tomate, lo que les confiere una resistencia innata al ataque por insectos herbívoros y ácaros. Esta observación fue el inicio que llevaría posteriormente a demostrar la actividad insecticida y acaricida de la 2-TDC, y a patentar su uso como i) repelente de mosquitos y garrapatas, y ii) control de infestaciones de plantas por insectos y nemátodos. Sin embargo, nunca ha sido probado su efecto en el control de infecciones bacterianas. En este sentido, la presente invención proporciona un nuevo agente para la prevención y control de infecciones bacterianas que causan enfermedades tanto en plantas como en animales y seres humanos. El compuesto es 2-tridecanona (2-TDC), una metilcetona de larga cadena alifática (Fig. 1), producida de forma natural por plantas, animales y bacterias. De esta forma, la presente invención ofrece una alternativa muy ventajosa que también tiene aplicación en la higiene de instalaciones susceptibles de contaminación por bacterias. Además, este uso de la 2-tridecanona es inesperado y sorprendente, en primer lugar porque existen documentos como el citado en el párrafo anterior, que sugiere un resultado negativo en este tipo de tratamientos con 2-tridecanona. En segundo lugar, como se comentará más adelante, porque el control de las infecciones bacterianas se produce sin efecto bactericida, es decir, sin destruir ni atacar al crecimiento bacteriano, pero sí a su actividad infectiva.

Descripción general de la invención

La presente invención se refiere, en un primer objeto, a un método para prevenir y/o controlar infecciones bacterianas en una planta y/o cultivo, caracterizado porque comprende administrar una metilcetona de cadena alifática larga de fórmula general (I):



donde R¹ representa una cadena alifática C₉-C₁₃, es decir formada por un número comprendido entre 9 y 13 átomos de carbono, o lo que es lo mismo R¹ representa una cadena CH₃(CH₂)_nCH₂ donde n=7-11, como es la 2-tridecanona (2-TDC).

En el ámbito de la presente invención, la acción de “controlar” se entiende como evitar infecciones adicionales a las ya existentes, no habiéndose constatado que el compuesto en cuestión tenga un efecto de tratamiento por el cual se eliminen infecciones ya establecidas. Como se infiere de la definición anterior, el término “cadena alifática larga” se refiere en la presente invención a una cadena formada por un número comprendido entre 9 y 13 átomos de carbono.

Un segundo objeto de protección está constituido por un método para prevenir y/o controlar infecciones causadas por bacterias patógenas de animales y humanos que pudieran encontrarse contaminando alimentos instalaciones de producción y tratamiento de alimentos, instalaciones de contención, transporte y cuidado de animales, y en materiales e instalaciones médicos susceptibles de estar contaminados con bacterias patógenas, mediante aplicación de las metilcetonas de larga cadena alifática descritas anteriormente.

Un tercer objeto de protección consiste en el uso de las metilcetonas de larga cadena alifática de fórmula general (I) antes definidas, como es la metilcetona 2-tridecanona, en la prevención y/o control de infecciones bacterianas tanto en el campo fitosanitario, como en el campo de la Higiene y la Sanidad de instalaciones, alimentos o en la fabricación de productos consumibles, entre otros usos.

Un cuarto objeto de protección se refiere a la metilcetona de larga cadena alifática de fórmula general (I) antes definidas, como es la metilcetona 2-tridecanona, para uso en medicina, y más concretamente de manera particularmente preferida a su uso en la prevención y/o tratamiento de infecciones bacterianas en un sujeto. Cuando en la presente memoria se describe la metilcetona, y más concretamente la 2-tridecanona, para uso en medicina, y realizaciones preferentes de dicha metilcetona, debe entenderse que la invención se refiere o cubre igualmente el uso de la metilcetona en medicina.

En la presente memoria debe entenderse que un objeto sobre el que se aplica la 2-tridecanona u otra metilcetona de larga cadena alifática de fórmula general (I) es “susceptible de estar contaminado por bacterias” cuando dicho objeto, sea una planta, un animal, un ser humano, un producto o una instalación presenta riesgo de contagio, por cualquier razón (sensibilidad, exposición...).

Como se deriva de este apartado, la invención se basa en la aplicación/administración del compuesto orgánico natural metilcetona de larga cadena alifática de fórmula general (I), siendo su mejor ejemplo la 2-tridecanona (2-TDC), a individuos (plantas, animales, humanos), productos o instalaciones con riesgo de contaminación bacteriana que pueda dar lugar al desarrollo de una enfermedad. Con ella se pretende fundamentalmente aminorar los efectos adversos generados en el medioambiente y en la salud animal y humana de los tratamientos clásicos con agentes químicos contaminantes y antibióticos que pueden favorecer la aparición de microorganismos resistentes. De esta forma, la invención trata acerca del uso de la 2-tridecanona u otra metilcetona de larga cadena alifática de fórmula (I) en la prevención y tratamiento de infecciones bacterianas, tanto en plantas, como en animales, seres humanos e incluso instalaciones y alimentos susceptibles de verse afectados por contaminación de bacterias. En la presente memoria se trata cada una de estas aplicaciones de manera separada, en función del objeto de aplicación.

La principal ventaja del uso de metilcetonas de larga cadena alifática definidas por la fórmula (I) es la de ser compuestos naturales producidos por numerosos organismos, entre ellos plantas y animales, de bajo o nulo impacto en el medio ambiente. Hasta el momento no se han descrito efectos nocivos de estos compuestos, en especial de la 2-TDC sobre organismos vivos. Este compuesto se halla disponible en el mercado y no es un producto caro (Alfa Aesar 83.6 euros/100 g).

Además, las metilcetonas descritas en la presente memoria, en concreto la 2-TDC, son biodegradables (existen bacterias capaces de utilizar 2-TDC como fuente de carbono). Todo ello implica que el uso de los mismos no genera problemas desde el punto de vista medioambiental y está exento de riesgos para la salud humana y animal.

Este resultado es de doble interés en el campo de la técnica por las siguientes razones: en primer lugar, es inesperado por cuanto existen documentos en el estado de la técnica que sugieren la inexistencia de un efecto significativo y de interés de las metilcetonas de larga cadena alifática en bacterias y las infecciones que provocan. Así, Wood et al (1995; Volatile ketones from interdigital glands of black-tailed deer, *Odocoileus hemionus columbianus*. *J. Chem Ecol.* 21:1401-1408) comprueban que la 2-tridecanona no muestra actividad antimicrobiana ni frente a hongos ni frente a bacterias Gram positivas como *Staphylococcus*, *Streptococcus*, o *Bacillus* ni Gram negativas como *Pseudomonas*, *Escherichia*, o *Proteus*. En segundo lugar, el resultado obtenido con la presente invención es sorprendente, en la medida en que se ha comprobado que el mecanismo por el que la 2-TDC limita la infección bacteriana no se debe a un efecto bactericida (que consiste en la destrucción/muerte de bacterias). El hecho de que el crecimiento de la bacteria no se vea afectado en presencia de 2-TDC a determinadas concentraciones, compuesto que por el contrario sí limita la infección, reduce la presión selectiva y por tanto, la aparición de posibles resistencias, es un resultado totalmente inesperado, sobre todo en vista de lo indicado por otros autores.

Las investigaciones que han conducido a la presente invención han permitido comprobar que efectivamente la adición de una metilcetona de larga cadena alifática de fórmula (I), siendo el mejor ejemplo la 2-TDC, a distintas concentraciones (preferiblemente en el intervalo de 1 μM y 10 mM, y más preferentemente dentro del intervalo de 5-500 μM) no afectó al crecimiento de distintas bacterias (tanto bacterias que interaccionan con plantas como *Sinorhizobium meliloti* (mutualista) y *Pseudomonas syringae* (patógena) o bacterias patógenas de animales como *Salmonella typhimurium*). Sin embargo, en todos los casos ensayados, sí que afectó a un comportamiento bacteriano que está muy relacionado con la virulencia de bacterias patógenas: la motilidad *swarming*, un tipo de translocación bacteriana que ocurre en superficies y que requiere actividad flagelar. Concretamente, la adición de 2-TDC comercial (SIGMA) en concentraciones del orden micromolar indujo motilidad en superficie en bacterias que interaccionan con plantas (como *S. meliloti* que forma simbiosis fijadora de nitrógeno con plantas de alfalfa (Fig. 2A), y en la bacteria fitopatógena *P. syringae* (Fig. 2B)), mientras que anuló el movimiento en superficie de una bacteria patógena de animales como *S. typhimurium* (Fig. 2C). Resultados similares a los obtenidos con 2-TDC en la motilidad *swarming* de *S. meliloti* y de *P. syringae* se han obtenido con las metilcetonas 2-dodecanona, 2-pentadecanona, y 2-undecanona, resultados que demuestran la potencialidad de estas metilcetonas para los usos descritos en la presente memoria (Fig. 7). Además, en algunos casos, la adición de 2-TDC no sólo alteró la motilidad *swarming* sino que además interfirió negativamente con la formación de biofilm (Fig. 3), otro fenómeno multicelular asociado a superficie, que muestra conexión con la motilidad *swarming*, y que es responsable de la persistencia de algunas infecciones bacterianas. Estos resultados sugieren que la 2-TDC y otras metilcetonas muy similares pueden ser reconocidas como molécula señal en bacterias, interfiriendo con fenotipos como la motilidad y la formación de biofilm que tienen un papel relevante en las interacciones que estos microorganismos establecen con hospedadores eucariotas.

Descripción detallada de la invención

De manera preferida, la cadena alifática larga de la metilcetona de fórmula general (I) es una cadena alifática lineal. El término "cadena lineal" se refiere en la presente invención a una cadena formada por un número comprendido entre 9 y 13 átomos de carbono unidos entre sí mediante enlaces covalentes C-C, complementada su estructura con uniones a hidrógenos.

De manera más preferida, la cadena alifática lineal es saturada. El término "cadena saturada" se refiere en la presente invención a una cadena carbonada en la que no hay ningún doble o triple enlace.

Preferiblemente, la metilcetona de larga cadena alifática de fórmula general (I) es seleccionada dentro del grupo compuesto por 2-tridecanona, 2-dodecanona, 2-pentadecanona y 2-undecanona. En la realización más preferida, la metilcetona es 2-tridecanona.

La utilización de la invención como producto fitosanitario tiene especial interés, aunque no es limitativo de la invención, en la aplicación de las metilcetonas de larga cadena alifática definidas en la presente memoria, como es la 2-TDC, en plantas o cultivos que no producen cantidades significativas de estos compuestos durante épocas de riesgo, para protegerlas de infecciones bacterianas que potencialmente pueden causarles daño o enfermedad. Puesto que son pocas las plantas en las que se ha descrito la producción significativa de estos compuestos, la invención es potencialmente útil para todo tipo de plantas.

La metilcetona descrita puede administrarse en forma diluida en un líquido. Preferentemente, se administra en forma de solución. Más preferentemente todavía, la metilcetona de larga cadena alifática de fórmula general (I) está diluida en la solución en una concentración comprendida entre 1 μM y 10 mM, incluidos ambos límites, y en el caso más preferido está comprendida entre 5 μM y 500 μM , incluidos ambos límites. De manera preferida también, la solución que contiene el compuesto en cuestión es una solución etanólica. Dicha solución etanólica es preferentemente etanólica 0.1% (v/v, etanol/agua), de tal forma que 1 L de solución conteniendo el compuesto activo metilcetona a una concentración de 50 μM contendría 999 ml de agua, 1 ml de etanol y: 10 mg de 2-TDC previamente disuelta en el etanol, ú 8.5 mg de 2-undecanona; o 9.2 mg para la 2-dodecanona; y 11.32 mg para la 2-pentadecanona.

En una realización preferida, la metilcetona de larga cadena alifática de fórmula (I), como puede ser la 2-tridecanona, se aplica mediante pulverización (spray) de la parte aérea de la planta con la solución, que es preferentemente etanólica 0.1% (v/v, etanol/agua), conteniendo concentraciones efectivas del compuesto. Se pulveriza intentando que la superficie a tratar quede homogéneamente humedecida.

En otra realización preferida, la solución se inyecta directamente en el tallo de la planta, mediante métodos convencionales.

En otra realización preferida, la invención implica la administración directa de la solución de la metilcetona definida anteriormente al suelo o a otro medio de crecimiento de la planta. La administración puede ser indirectamente a través del agua de riego o de una solución nutritiva para la planta, o por inmersión del sistema radicular o de la totalidad de la planta (o de semillas) en la solución con 2-tridecanona u otra metilcetona de larga

cadena alifática de fórmula general (I). La solución se prepararía como se ha indicado anteriormente, pudiendo sustituir el agua por solución nutritiva de crecimiento para plantas.

En cualquiera de los casos comentados, las aplicaciones del compuesto sobre la planta o el suelo de cultivo u otro medio de crecimiento se realizarán en concentraciones no fitotóxicas, preferiblemente en las épocas del año de máximo riesgo, y pudiéndose realizar varias aplicaciones espaciadas en el tiempo. La concentración fitotóxica a emplear va a depender del tipo de planta y del modo de administración, ya que por ejemplo se ha comprobado que a concentraciones similares, en forma hidropónica el efecto fitotóxico es más pronunciado que en la pulverización aérea, siempre dentro de los intervalos definidos en esta memoria.

De esta forma, la máxima efectividad de la metilcetona de fórmula general (I) se obtuvo utilizando concentraciones entre 1 μ M y 10 mM, incluidos ambos límites, aunque obviamente la concentración óptima del compuesto para ejercer su efecto protector dependió del tipo de planta, fase de desarrollo de la misma, así como de la frecuencia y forma de aplicación. Así, se ha demostrado con la presente invención el efecto de la metilcetona de fórmula general (I) en la limitación de infecciones bacterianas a concentraciones inferiores (mínimo 4.4 veces inferior) a las descritas como no fitotóxicas tras su aplicación en spray, lo que supone una gran ventaja.

Asimismo, la 2-TDC u otra metilcetona de fórmula general (I) puede aplicarse sola o se puede mezclar con otros aditivos conocidos y empleados comúnmente en el campo de la Agricultura, por ejemplo fertilizantes orgánicos y/o inorgánicos, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas y herbicidas, y cualquier combinación de los mismos. La metilcetona puede ser aplicada a las plantas antes, después o simultáneamente a los mencionados pesticidas, herbicidas o similares.

En lo que respecta al método de prevención y/o control de infecciones bacterianas mediante 2-tridecanona u otra metilcetona de fórmula general (I) con fines higiénicos y sanitarios dentro del campo de la higiene y la alimentación, cabe indicar que las formas de administración y concentraciones descritas para el uso fitosanitario se aplican del mismo modo aquí. Así, también en este caso la efectividad de la metilcetona, concretamente de la 2-TDC, se observó utilizando concentraciones entre 1 μ M y 10 mM incluidos ambos límites en una solución, preferentemente etanólica, y más preferentemente en una concentración comprendida entre 5 μ M y 500 μ M, incluidos ambos límites. Dicha solución etanólica es preferentemente etanólica 0.1% (v/v, etanol/agua).

El producto a tratar puede ser de muy diversa índole: alimentos, material quirúrgico... o puede ser una instalación susceptible de contaminación por bacterias (instalación de producción y tratamiento de alimentos, de contención, transporte y cuidado de animales, hospitales y centros sanitarios, cocinas, sistemas o torres de refrigeración, humidificadores...). Este método se dirige sobre todo, aunque no limitativamente, a productos del sector hortofrutícola, con objeto de interferir con los mecanismos de infección de potenciales patógenos que estuvieran contaminando el material vegetal comestible. Sin embargo, este método puede emplearse también en otros productos susceptibles de estar contaminados, como son los de origen animal: cáscara de huevos...

Cuando se trata de un producto alimentario, como son los productos hortofrutícolas, la administración del compuesto puede realizarse tras su recolección, y siempre en concentraciones no tóxicas para el consumo humano. En otra realización preferida, el método se lleva a cabo mediante la inmersión de la totalidad del producto en una solución del compuesto activo tal como se describe en esta memoria, en cualquiera de sus variantes.

Como en el método anterior, la forma recomendada y más preferible incluye la pulverización del producto destinado a consumo o de la instalación pertinente con una solución etanólica conteniendo concentraciones entre 1 μ M y 10 mM o más específicas, tal cual se han descrito en la presente memoria.

En otra realización preferida, para administrar la solución que contiene la 2-tridecanona u otra metilcetona de fórmula general (I) se emplea el sistema de aire acondicionado y/o el sistema de refrigeración de la instalación a tratar.

Como se ha afirmado en el apartado anterior, la presente invención se dirige asimismo al uso de la metilcetona de fórmula general (I), como es por ejemplo la 2-tridecanona, para prevenir y/o tratar infecciones bacterianas con fines fitosanitarios, es decir en plantas y/o cultivos. Preferentemente, el uso de la 2-tridecanona u otra metilcetona de larga cadena alifática está dirigido a la prevención y/o control de infecciones frente a patovares de *Pseudomonas syringae*, *P. savastanoi*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris*, *X. citri*, *Xylella fastidiosa*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens* o *Erwinia amylovora*.

También está contemplado aquí el uso de la 2-tridecanona u otra metilcetona de fórmula general (I) para prevenir y/o controlar infecciones causadas por bacterias patógenas de animales y humanos que pudieran encontrarse contaminando productos alimentarios y/o instalaciones de producción de dichos alimentos. Más específicamente, estos productos pueden ser de origen vegetal, como son los hortofrutícolas, o de origen animal, como son los huevos.

El uso de la metilcetona de fórmula general (I), como es la 2-tridecanona, cubre asimismo la prevención de infecciones causadas por bacterias que se pudieran encontrar contaminando instalaciones de contención y transporte de animales, al igual que en instalaciones de uso médico y hospitalario y al material que en ellas se utiliza (por ejemplo, material quirúrgico, catéteres...) o en otros espacios susceptibles de contaminación por bacterias, como son las cocinas.

Otro uso previsto para la metilcetona de fórmula general (I) es para la prevención de biofilms en superficies, mediante administración sobre dicha superficie de un material.

Constituye otro objeto de la presente invención el uso de la 2-tridecanona u otra metilcetona de fórmula (I) como aditivo frente a infecciones bacterianas en productos de higiene oral (dentífricos, colutorios) o de higiene corporal (jabón de manos).

Respecto a la metilcetona de fórmula (I) para uso en medicina (o lo que es lo mismo, el uso de la metilcetona de larga cadena alifática de fórmula (I) para tal fin), debe señalarse que el sujeto susceptible de estar contaminado por bacterias puede ser un ser humano o un animal.

La 2-tridecanona u otra metilcetona de larga cadena alifática se administra preferentemente en forma de solución, siendo ésta más preferentemente una solución etanólica. De manera preferida, la metilcetona de fórmula (I) está contenida en la solución en una concentración comprendida entre 1 μM y 10 mM, incluidos ambos límites, estando más preferiblemente comprendida entre 5 μM y 500 μM , incluidos ambos límites. Dicha solución etanólica es preferentemente etanólica 0.1% (v/v, etanol/agua).

Preferentemente, la metilcetona de fórmula general (I), especialmente la 2-tridecanona, se administra frente a *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* enteropatógenas, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Legionella pneumophila*.

De este uso de la 2-tridecanona u otra metilcetona de fórmula general (I) en medicina debe entenderse que la presente invención cubre asimismo:

- El uso de la metilcetona de fórmula (I) en la preparación de una composición farmacéutica o un medicamento para medicina, y más preferentemente para la prevención y/o control de infecciones bacterianas; y
- un método de prevención y/o control de infecciones bacterianas en un sujeto mediante administración de dicha metilcetona de larga cadena alifática de fórmula (I). Dicha administración puede realizarse por ejemplo por aplicación tópica de heridas abiertas, por vía oral (para evitar infecciones gastrointestinales) o mediante dispositivos de inhalación (evitar infecciones respiratorias), aunque se puede realizar mediante cualquier método conocido y habitual en el campo para este tipo de compuestos. La administración se realiza preferentemente en las cantidades y formatos antes comentados: en solución que es preferiblemente etanólica, a una concentración comprendida entre 1 μM y 10 mM, incluidos ambos límites, más preferentemente comprendida entre 5 μM y 500 μM , incluidos ambos límites, etc.

Descripción de las figuras

Figura 1.- Estructura química de la metilcetona, 2-tridecanona (2-TDC).

Figura 2.- Efecto de la 2-TDC sobre la motilidad en superficie de bacterias que causan infecciones en plantas y animales: *Sinorhizobium meliloti*, cepas GR4 y GR4fadD; *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (Pss) cepa BT111 y *P. syringae* pv. *tomato* (Pst) cepa DC3000, y *Salmonella typhimurium* cepas LT2 y 4155. En todos los casos se muestra el comportamiento de cada bacteria sin tratamiento (M), en presencia de 20 μL de etanol (M + E), o en presencia de 20 μL de una solución etanólica de 2-TDC (M + T). Se indica la concentración usada en cada caso.

Figura 3.- Efecto de la 2-TDC sobre la capacidad de formación de biofilm de *P. syringae* pv. *syringae* BT111. El biofilm formado en la superficie de un tubo de vidrio tras crecimiento en medio conteniendo sólo etanol (M+E) o medio conteniendo 2-TDC (M+T) a una concentración final de 50 μM , se detectó mediante tinción con cristal violeta.

Figura 4.- Efecto protector de la 2-TDC en el desarrollo de la mancha negra del tomate. Desarrollo de necrosis en folíolos de plantas de tomate tratadas con las mezclas control C+Mb y E+ Eb, y tratadas con 2 concentraciones distintas de 2-TDC (T+MT1b y T+MT10b).

Figura 5.- Efecto del tratamiento de plantas de tomate con 2-TDC sobre la supervivencia a lo largo del tiempo de la bacteria *P. syringae* pv *tomato* DC3000 en tejido foliar (expresada como unidades formadoras (cfu) de colonia por cm^2). Los símbolos representan supervivencia en plantas tratadas con C+Mb (círculo), E+Mb (rombo), T+MT1b (cuadrado), o T+MT10b (triángulo).

Figura 6.- Efecto inhibitor de la 2-TDC en la formación de nódulos en plantas de alfalfa por la bacteria *Sinorhizobium meliloti*, cepa GR4.

5 **Figura 7.-** Efecto causado por distintas metilcetonas en la motilidad en superficie de *Sinorhizobium meliloti* GR4 y *Pseudomonas syringae* pv *syringae* BT111. En la gráfica se muestra el halo medio de dispersión en superficie de Sm GR4 (barras grises) y Pss BT111 (barras negras) tras 24 horas de incubación en ausencia de metilcetonas (control), en presencia de etanol (E), o en presencia de 2-undecanona (2-UDC), 2-dodecanona (2-DDC), 2-tridecanona (2-TDC) o 2-pentadecanona (2-PDC). Las barras de error representan el error estándar y letras distintas indican diferencias estadísticamente significativas según un test de ANOVA ($P < 0.05$).

Ejemplos

15 **Ejemplo 1. Eficacia protectora de la aplicación de 2-TDC en la aparición de la mancha negra del tomate causada por la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000.**

20 Como material vegetal se empleó tomate (*Solanum lycopersicum* "MoneyMaker"). Las semillas se germinaron y crecieron en semilleros con turba composana en una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de luz, Tª y humedad durante 3 semanas. Posteriormente se transplantaron individualmente en macetas de plástico de 14 cm de diámetro y 13 cm de altura, rellenas de turba, donde se mantuvieron 2 semanas más, antes de proceder a la infección con la bacteria.

25 Como bacteria fitopatógena se utilizó la cepa DC3000 de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Pst). La bacteria se creció a 28°C en medio LB sólido (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, agar bacteriológico 1.5%), adicionado de rifampicina (Rif) (10 mg/L). A partir de estas placas, se preparó una suspensión bacteriana en una solución de 10 mM MgCl₂ resuspendiendo masa bacteriana hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.3-0.4 (corresponde aproximadamente a 10⁸ unidades formadoras de colonia (UFC)/ml).

30 El tratamiento químico con 2-TDC se realizó en 2 etapas: i) Adición de 40 mg de 2-TDC (equivalente a unos 26 kg del compuesto/Hectárea) al sustrato (turba) de cada maceta, 24 horas antes de la aplicación del patógeno y ii) aplicación foliar mediante pulverización de dos concentraciones distintas del compuesto (50iM y 500iM) en el mismo momento de aplicación de la bacteria patógena. Se ha comprobado que estas concentraciones de 2-TDC no generan efectos adversos apreciables en el crecimiento bacteriano en cultivo puro. Tampoco se han observado efectos nocivos en el desarrollo de la planta.

35 Para la aplicación al sustrato se prepararon las siguientes soluciones:

- 40 -Solución T: solución conteniendo 2-TDC preparada como se describe: 40 mg del compuesto se disolvieron en 1 ml de etanol (EtOH). Una vez conseguida la disolución, la mezcla se añadió a 24 ml de H₂O.
- Solución E, solución control conteniendo EtOH en la misma concentración en la que se encuentra en Sol. T (EtOH al 4% (v/v)), y preparada añadiendo 1 ml de EtOH en 24 ml de H₂O.
- Solución C, control de riego consistente en 25 ml de H₂O.

45 Las macetas se regaron con 25 ml de solución T, E o C que se aplicó alrededor del tallo de la planta. Inmediatamente después, se aplicaron 25 ml adicionales de agua estéril para permitir una buena penetración de los tratamientos en el sustrato.

En todos los casos, el riego se realizó 24 horas antes de la aplicación del fitopatógeno.

50 Para la aplicación foliar, se prepararon las siguientes mezclas:

- Mezcla M: 40 ml de una solución de MgCl₂ 10 mM
- Mezcla ME: 40 ml de mezcla M conteniendo 40 µl de etanol.
- 55 -Mezcla MT1: 40 ml de mezcla M conteniendo 40 µl de una solución madre de 2-TDC 50 mM (preparada disolviendo 10 mg de 2-TDC por ml de EtOH).
- Mezcla MT10: 40 ml de mezcla M conteniendo 40 µl de una solución madre de 2-TDC 500 mM (preparada disolviendo 100 mg de 2-TDC por ml de EtOH).
- Mezcla Mb: 40 ml de una solución de MgCl₂ 10 mM conteniendo la bacteria Pst DC3000 (10⁸ UFC/ml) preparada como se ha indicado anteriormente.
- 60 -Mezcla MEB: 40 ml de mezcla Mb conteniendo 40 µl de etanol.
- Mezcla MT1b: 40 ml de mezcla Mb conteniendo 40 µl de una solución madre de 2-TDC 50 mM (preparada disolviendo 10 mg de 2-TDC por ml de EtOH).
- Mezcla MT10b: 40 ml de mezcla Mb conteniendo 40 µl de una solución madre de 2-TDC 500 mM (preparada disolviendo 100 mg de 2-TDC por ml de EtOH).

65

En este ejemplo se utilizaron 20 macetas que se sometieron a los siguientes tratamientos:

24 horas antes de la pulverización de la parte aérea, se procedió al riego del sustrato con Sol. T (10 macetas), Sol. E (5 macetas) y Sol. C (5 macetas).

5 Antes de llevar a cabo la pulverización de la parte aérea con las distintas mezclas, todas las hojas de todas las macetas se pulverizaron con agua para favorecer la apertura de estomas. La pulverización de cada una de las mezclas se realizó por el haz y envés de 5 foliolos de 2 hojas de cada planta, previamente seleccionadas y debidamente marcadas.

10 De las 10 macetas regadas con Sol. T, se pulverizó con: mezcla MT1 control (1 planta), mezcla MT10 control (1), mezcla MT1b (4) y mezcla MT10b (4)

De las 5 macetas regadas con Sol. E, se pulverizó con: mezcla ME control (1 planta), y mezcla MEb (4).

15 De las 5 macetas regadas con Sol. C, se pulverizó con: mezcla M control (1 planta), y mezcla Mb (4).

20 El efecto de cada uno de los tratamientos sobre la infección bacteriana en plantas de tomate se determinó mediante 2 aproximaciones: evaluación de síntomas 10 días después de haber realizado la infección, así como mediante determinación de supervivencia bacteriana a lo largo del tiempo mediante recuento de CFU. Se realizó un primer recuento 3 horas después de la infección para conocer el inóculo original y posteriormente se realizaron recuentos 3, 6, y 10 días después de la inoculación.

25 Para el recuento de CFU de hojas infectadas con Pst DC3000, con ayuda de un sacabocados de 1 cm de diámetro, se aislaron 5 discos por hoja tratada, 1 por cada uno de los foliolos pulverizados (equivalente a una superficie total de hoja 3.9 cm²). Los 5 discos se maceraron y homogenizaron en 1 ml de Cl₂Mg 10 mM estéril, suspensión de la que se hicieron diluciones seriadas que se sembraron en placas de LB Rif10. El proceso se repite en la misma hoja tantas veces como el tamaño de la misma lo permita (3-6 veces), y se procede de la misma manera con la segunda hoja de la misma planta que también fue pulverizada. Así por cada tratamiento y tiempo de infección se realiza el recuento de 6-12 réplicas de las que se obtiene una media y error estándar.

30 En la Fig. 4 se muestra la apariencia de las plantas transcurridos 10 días después de haber realizado los distintos tratamientos. Las plantas que se trataron con 2-TDC (MT1b y MT10b) desarrollaron muchas menos manchas necróticas en la hojas que las plantas control (Mb y Eb). El efecto además era dependiente de dosis, ya que las plantas tratadas con la solución de 2-TDC más concentrada (MT10b), mostraron mejor aspecto que las tratadas con una dosis de menor concentración, siendo casi inapreciable el desarrollo de manchas necróticas.

35 El tratamiento con 2-TDC además tuvo efecto en la supervivencia bacteriana en los tejidos vegetales (Fig. 5). Cuando la bacteria se aplicó en ausencia de 2-TDC (con agua o con etanol), la población alcanzó un máximo en torno a 10⁷ unidades formadoras de colonia (CFU) por cm² de hoja entre los 3 (agua) y 6 (etanol) días tras su aplicación, para posteriormente disminuir aproximadamente un orden de magnitud a los 10 días. En cambio, en las plantas tratadas con 2-TDC, la población bacteriana nunca llegó a alcanzar la densidad de 10⁷ CFU por cm², siendo especialmente llamativo el tratamiento con 500 µM de 2-TDC, que no permitió crecimiento bacteriano por lo que la densidad poblacional al final del experimento en plantas sometidas a este tratamiento, fue significativamente inferior en comparación con las demás.

45 Por tanto, el tratamiento con 2-TDC protege a las plantas de tomate del desarrollo de una enfermedad causada por una bacteria.

50 **Ejemplo 2.- Aplicación de 2-TDC en solución nutritiva para reducir la infección causada por la bacteria *Sinorhizobium meliloti* en plantas de alfalfa.**

55 Como material vegetal se empleó alfalfa (*Medicago sativa* var. Aragón). Las semillas se esterilizaron en superficie y se germinaron tal y como se describe en Olivares et al. (1980). Las semillas germinadas se colocaron en tubos de vidrio (2 x 20 cm) conteniendo un papel de filtro y 10 ml de solución nutritiva para plantas carente de nitrógeno (Rigaud and Puppo, 1975). Tras pasar 2 días en oscuridad, las plantas se trasladaron a una cámara de crecimiento bajo condiciones controladas de luz, T^a y humedad, en la que se incubaron 1 semana antes de proceder a la inoculación con la bacteria.

60 Como bacteria capaz de infectar alfalfa, se utilizó la cepa GR4 de *Sinorhizobium meliloti*. El inóculo se preparó creciendo la bacteria en medio TY líquido (Beringer, 1974) a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.5-0.6 (aproximadamente 5 x 10⁹ ufc/ml). Este inóculo se diluyó en agua estéril para obtener una densidad de inóculo de 5 x 10⁶ ufc/ml, suspensión con la que se realizaría la inoculación de las plantas.

65 Transcurridos 9-10 días de haber colocado las plántulas de alfalfa en los tubos, se procedió a la inoculación con la bacteria, adicionando a cada tubo/planta 1 ml de la suspensión bacteriana preparada como se ha mencionado previamente.

En este ejemplo, la aplicación de los tratamientos con 2-TDC o tratamientos control (sólo etanol) se realizó al mismo tiempo de la inoculación con la bacteria. Para ello, se prepararon dos soluciones stock de 2-TDC utilizando etanol como disolvente: a 25 mM (5 mg de 2-TDC/ ml de etanol) y 5 mM (1 mg de 2-TDC/ ml de etanol). 10 µl de una de estas soluciones se aplicaron a los 10 ml de solución nutritiva (dilución 1:1000) en que crecen las plantas, quedando por tanto el compuesto en una concentración de 25 µM y 5 µM, respectivamente.

El éxito de la infección bacteriana se determinó realizando un conteo diario de los nódulos (órgano inducido y colonizado por *S. meliloti*) desarrollados por planta. En la Fig. 6 de esta memoria se muestran los resultados obtenidos en 2 experimentos independientes.

Los datos sugieren que la aplicación de etanol a una concentración de 0.1% a la solución nutritiva en que crecen las plantas puede provocar un retraso en la aparición de nódulos, así como una reducción significativa en el nº medio de nódulos por planta, que no obstante se recupera con el tiempo, hasta alcanzar valores similares a los obtenidos en plantas en las que no se ha aplicado ningún tratamiento. No obstante, e interesantemente, la aplicación de la solución etanólica que contiene 2-TDC provoca un retraso y una reducción en el nº de nódulos, efectos que son significativamente superiores a los obtenidos con el tratamiento control, y además dependientes de dosis. La aplicación de la solución más concentrada de 2-TDC provocó un retraso de 4-6 días en la aparición de los primeros nódulos, así como una reducción de casi el 50% en el nº de nódulos desarrollados.

Resultados similares se han obtenido aplicando 2-TDC a una concentración final de 25 µM 2 y 4 días antes de llevar a cabo la inoculación con la bacteria, así como aplicando el producto 2 días después de haber realizado la inoculación bacteriana.

Por el contrario el efecto protector no es observable cuando la aplicación se realiza 4 días después de haber puesto la bacteria en contacto con la planta.

Ejemplo 3.- Comparación del efecto causado por las metilcetonas 2-undecanona, 2-dodecanona y 2-pentadecanona con el generado por la 2-tridecanona en la motilidad swarming de las bacterias *Sinorhizobium meliloti* GR4 y *Pseudomonas syringae* patovar *syringae* BT111.

Para comprobar si metilcetonas similares a la 2-tridecanona pueden tener el mismo efecto, y por tanto aplicaciones similares, se realizaron ensayos de motilidad en superficie de las bacterias *S. meliloti* GR4 y *P. syringae* pv. *syringae* BT111, en ausencia y presencia de estos compuestos.

El ensayo de motilidad en superficie se realizó básicamente como se describe en Nogales et al. 2010 BMC Genomics 11:157, con la única salvedad de que el medio mínimo (MM) semisólido se preparó añadiendo 0.6% de agar noble Difco (BD) en lugar de 0.6% agar purificado (Pronadisa). Las placas se dejaron solidificar y secar durante 15 minutos en una cabina de flujo laminar con la tapa abierta antes de aplicar el inóculo.

Las soluciones conteniendo cada una de las metilcetonas se prepararon disolviendo en 1 ml de etanol 50 µmoles de cada compuesto, o sea, 8,5 mg de 2-undecanona (2-UDC), 9,2 mg de 2-dodecanona (2-DDC), 10 mg de 2-tridecanona (2-TDC) o 11,32 mg de 2-pentadecanona (2-PDC).

Para la preparación del inóculo, las bacterias se crecieron en medio TY líquido (Beringer, 1974) a 30°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO_{600nm}) de 0.9-1. Bajo condiciones asépticas, se tomó 1 mL de estos cultivos y se recogieron las células mediante centrifugación (2 min, 10.000 rpm en una microcentrifuga), desechándose el medio de cultivo libre ya de células. El precipitado de células se lavó 2 veces con 1 ml de MM líquido (Robertsen et al. 1981) y se resuspendió finalmente en 100 µl del mismo medio. Una alícuota de 2 µl de esta suspensión celular se colocó sobre la superficie del MM semisólido (preparado como se ha indicado anteriormente) y se dejó secar durante 10 min en cabina de flujo laminar con la tapa abierta. Transcurrido ese tiempo, se colocó en la tapa de la placa 20 µl de etanol o 20 µl de una solución conteniendo la metilcetona de larga cadena alifática, preparada como se ha indicado anteriormente. En el control no se aplicó nada. Se cerró la placa petri, se selló con parafilm, y se llevó a incubación a 28°C en oscuridad. Transcurridas 24 horas de incubación se midió el diámetro de dispersión de la colonia. Se han realizado al menos 3 réplicas técnicas.

En la Fig. 7 se muestran los resultados obtenidos. Se puede observar que salvo en el caso de 2-PDC que no promovió motilidad en la bacteria Pss BT111, las demás metilcetonas indujeron motilidad en superficie tanto en Sm GR4 como en Pss BT111, siendo la 2-DDC y 2-TDC las que provocaron mayor halo de dispersión de la colonia. Puesto que 2-UDC, 2-DDC y dependiendo de la bacteria también 2-PDC parecen tener un efecto promotor de la motilidad bacteriana en superficie similar al observado para 2-TDC, es esperable que el efecto preventivo de infecciones bacterianas pueda ser extrapolable a estas otras metilcetonas.

Ejemplo 4.- Aplicación de 2-TDC en superficie de alimentos de consumo humano o animal para evitar enfermedades causadas por bacterias patógenas que se encuentran contaminando el alimento.

5 Se recolecta el alimento que en este caso puede ser un producto hortofrutícola (frutas, verduras, hierbas...) o un producto de origen animal como el huevo susceptibles de estar contaminados con bacterias enteropatógenas como *Salmonella*. Posterior a un lavado con agua, los productos se hacen pasar por una cinta sobre la cual se aplica una lluvia de una solución acuosa que contiene 2-TDC a una concentración final de 50-500 μM . Cada litro de solución contiene 999 ml de agua, 1 ml de etanol y 10-100 mg de 2-TDC previamente disuelta en el etanol.

Alternativamente al método de la cinta, los alimentos pueden ser sumergidos en cubetas conteniendo la misma solución. Una vez impregnados, se dejan secar a temperatura ambiente antes de proceder a su envasado.

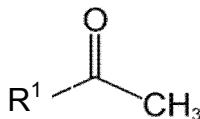
10 **Ejemplo 5.- Empleo de inhaladores conteniendo 2-TDC en la prevención de enfermedades respiratorias bacterianas en pacientes con riesgo (inmunodeprimidos, infecciones recurrentes...)**

Preparar una suspensión de 2-TDC con concentración final entre 50-500 μM para su inhalación a través de un dispositivo a presión.

15 Inhalar el preparado 1 o 2 veces al día.

REIVINDICACIONES

5 **1. Un método para prevenir y/o controlar infecciones bacterianas en una planta y/o cultivo**, caracterizado porque comprende administrar al menos una metilcetona alifática de fórmula general (I)



(I)

10 donde R¹ representa una cadena alifática formada por un número comprendido entre 9 y 13 átomos de carbono.

15 **2.** El método según la reivindicación anterior, donde la metilcetona es seleccionada dentro del grupo compuesto por 2-tridecanona, 2-dodecadona, 2-pentadecanona y 2-undecanona.

20 **3.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, donde la metilcetona se administra en una solución que contiene dicha metilcetona en una concentración comprendida entre 1 µM y 10 mM, incluidos ambos límites.

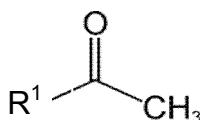
25 **4.** El método según la reivindicación anterior, donde la metilcetona se administra en una solución que contiene dicha metilcetona en una concentración comprendida entre 5 µM y 500 µM, incluidos ambos límites.

30 **5.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 3 ó 4, donde la solución es etanólica.

35 **6.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la metilcetona se administra mediante un procedimiento de aplicación seleccionado dentro del grupo compuesto por: pulverización de la parte aérea de la planta, inyección directa en el tallo de la planta, administración directa al sustrato de crecimiento de la planta, administración a través del agua de riego o de una solución nutritiva, inmersión del sistema radicular o de la totalidad de la planta (o de semillas) en una solución que contiene la metilcetona, y cualquier combinación de dichos procedimientos.

40 **7.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la metilcetona se administra mezclada con aditivos seleccionados dentro del grupo compuesto por: fertilizantes orgánicos y/o inorgánicos, insecticidas, nematocidas, fungicidas, bactericidas y herbicidas, y cualquier combinación de los mismos; o bien se administra antes, después o simultáneamente a la administración de dichos aditivos.

45 **8. Un método para prevenir y/o controlar infecciones bacterianas en alimentos, instalaciones de producción y tratamiento de alimentos, instalaciones de contención, transporte y cuidado de animales, materiales e instalaciones médicas, y en materiales e instalaciones de hostelería**, caracterizado porque comprende aplicar al menos una metilcetona alifática de fórmula general (I)



(I)

50 donde R¹ representa una cadena alifática formada por un número comprendido entre 9 y 13 átomos de carbono.

55 **9.** El método de la reivindicación anterior, donde la metilcetona es seleccionada dentro del grupo compuesto por 2-tridecanona, 2-dodecadona, 2-pentadecanona y 2-undecanona.

60 **10.** El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 ó 9, donde la metilcetona se administra en una solución que contiene dicha metilcetona en una concentración comprendida entre 1 µM y 10 mM, incluidos ambos límites.

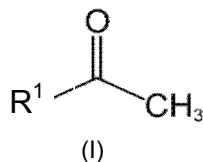
65 **11.** El método según la reivindicación anterior, donde la metilcetona se administra en una solución que contiene dicha metilcetona en una concentración comprendida entre 5 µM y 500 µM, incluidos ambos límites.

12. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, donde la solución es etanólica.

13. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, donde la metilcetona se administra mediante un procedimiento de aplicación seleccionado dentro del grupo compuesto por: pulverización, inmersión, o dispersión mediante sistema de aire acondicionado y/o sistema de refrigeración.

14. Uso de al menos una metilcetona alifática de fórmula general (I):

5

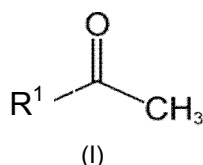


10 donde R¹ representa una cadena alifática formada por un número comprendido entre 9 y 13 átomos de carbono, **en la prevención y/o tratamiento de infecciones bacterianas en el campo fitosanitario o de la salud y la higiene de alimentos, materiales e instalaciones susceptibles de contaminación por bacterias patógenas.**

15 **15.** Uso de la reivindicación anterior frente a patógenos de una de las especies seleccionadas dentro del grupo compuesto por *Pseudomonas syringae*, *P. savastanoi*, *Clavibacter michiganensis*, *Xanthomonas campestris*, *X. citri*, *Xylella fastidiosa*, *Ralstonia solanacearum*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Erwinia amylovora*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* enteropatógenas, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella pneumophila*.

20 **16.** Uso de al menos una metilcetona alifática de fórmula general (I):

20

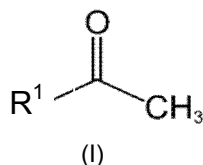


25

donde R¹ representa una cadena alifática formada por un número comprendido entre 9 y 13 átomos de carbono, **en la prevención de biofilms en superficies**, mediante administración sobre dicha superficies de un material.

30 **17.** Uso de al menos una metilcetona alifática de fórmula general (I):

30



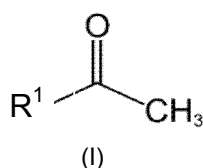
35

donde R¹ representa una cadena alifática formada por un número comprendido entre 9 y 13 átomos de carbono, **como aditivo frente a infecciones bacterianas en productos de higiene oral o corporal.**

40 **18.** Uso de la reivindicación anterior, donde el producto es seleccionado dentro del grupo compuesto por un dentífrico, un colutorio y un jabón de manos.

45 **19.** Uso de al menos una metilcetona alifática de fórmula general (I):

45



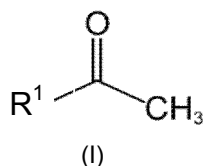
50 donde R¹ representa una cadena alifática formada por un número comprendido entre 9 y 13 átomos de carbono, **en la preparación de una composición farmacéutica o un medicamento para medicina.**

20. Uso según la reivindicación anterior, en la prevención y/o tratamiento de infecciones bacterianas.

55 **21.** Uso definido en una cualquiera de las reivindicaciones 14 a 20, donde la metilcetona es seleccionada dentro del grupo compuesto por 2-tridecanona, 2-dodecanona, 2-pentadecanona y 2-undecanona.

22. Una metilcetona alifática de fórmula general (I):

60



donde R¹ representa una cadena alifática formada por un número comprendido entre 9 y 13 átomos de carbono,
para uso en medicina.

5 **23.** Metilcetona según la reivindicación anterior, que es seleccionada dentro del grupo compuesto por 2-tridecanona, 2-dodecadona, 2-pentadecanona y 2-undecanona.

24. Metilcetona según una cualquiera de las reivindicaciones 22 ó 23, para uso en la prevención y/o control de infecciones bacterianas en un sujeto.

10 **25.** Metilcetona según la reivindicación anterior, donde el sujeto es un animal o un ser humano.

26. Metilcetona según una cualquiera de las reivindicaciones 22 a 25, donde la metilcetona se aplica en una solución que contiene dicha metilcetona en una concentración comprendida entre 1 µM y 10 mM, incluidos ambos límites.

15 **27.** Metilcetona según la reivindicación anterior, donde la metilcetona se aplica en una solución que contiene dicha metilcetona en una concentración comprendida entre 5 µM y 500 µM, incluidos ambos límites.

28. Metilcetona según una cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27, donde la solución es etanólica.

20 **29.** Metilcetona según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la metilcetona se administra frente a una de las especies seleccionadas dentro del grupo compuesto por *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli* enteropatógenas, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Legionella pneumophila*.

...

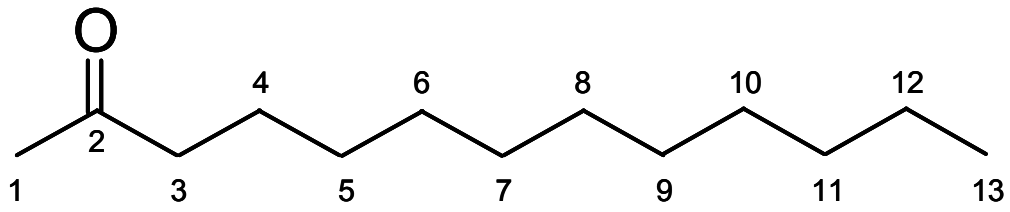


FIG. 1

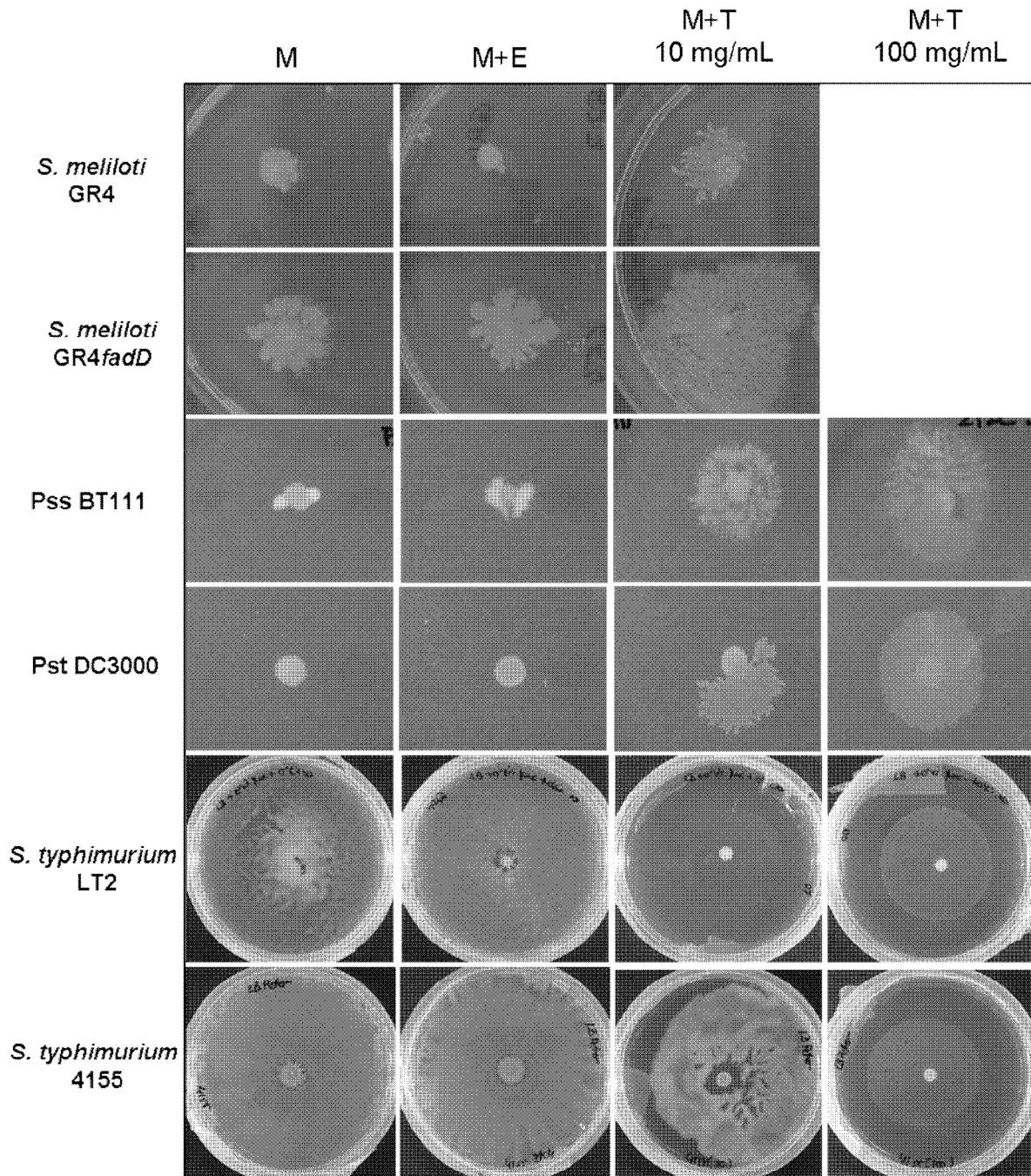


FIG. 2

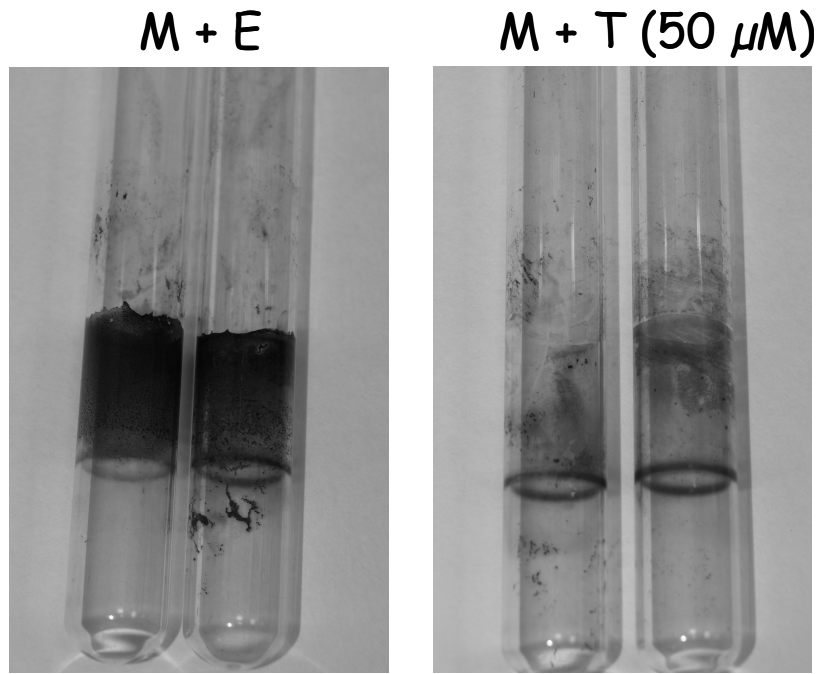


FIG. 3

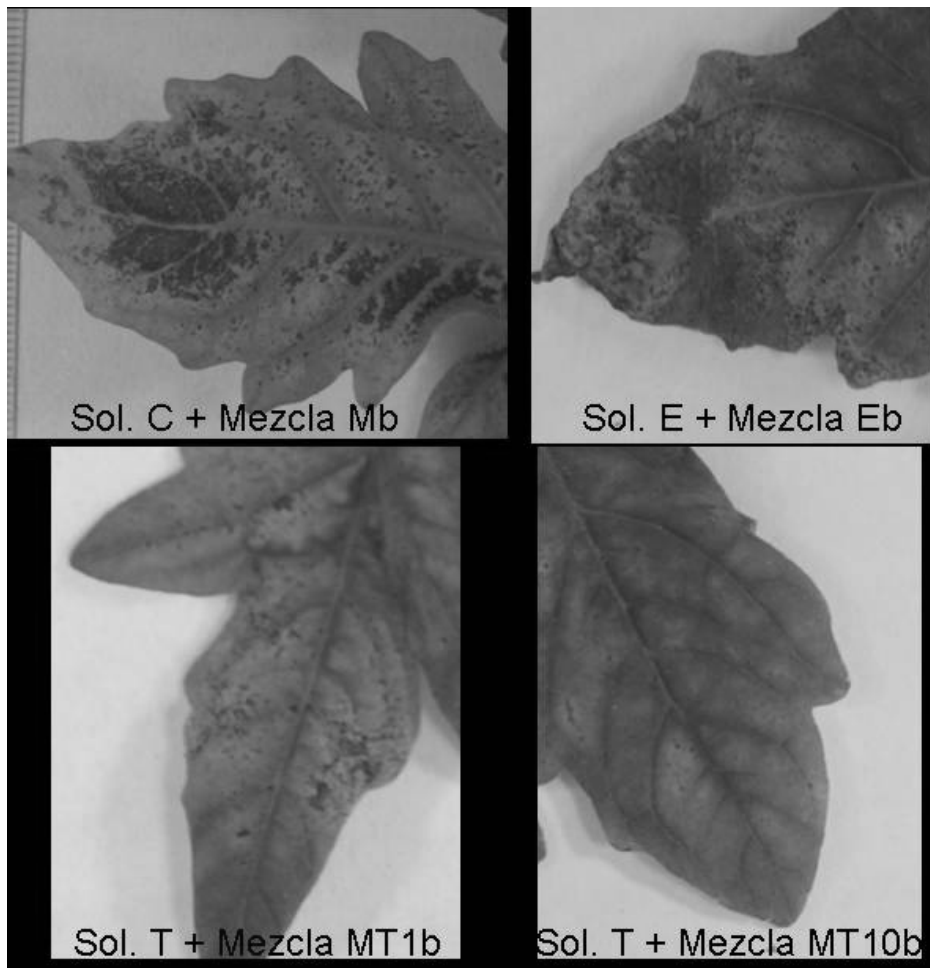


FIG. 4

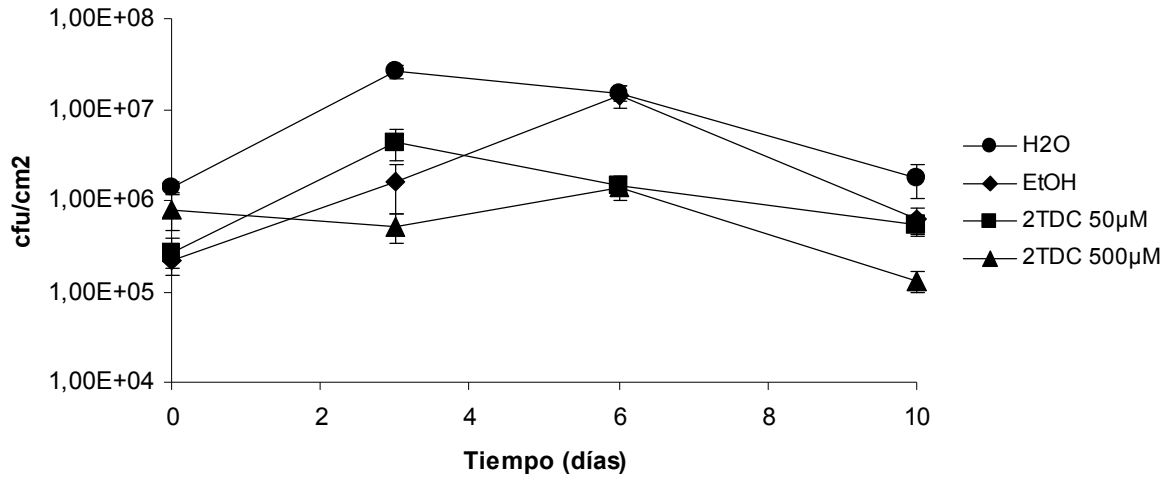


FIG. 5

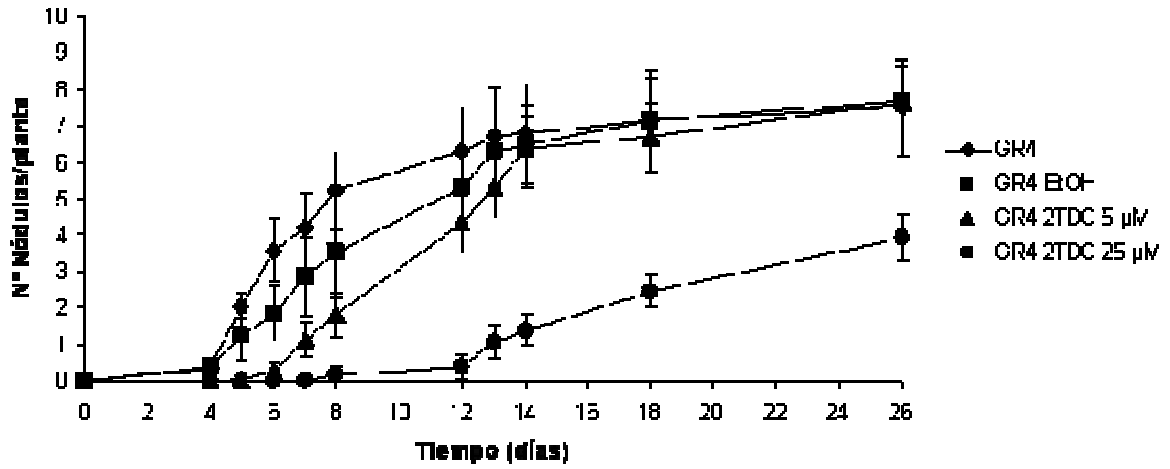


FIG. 6

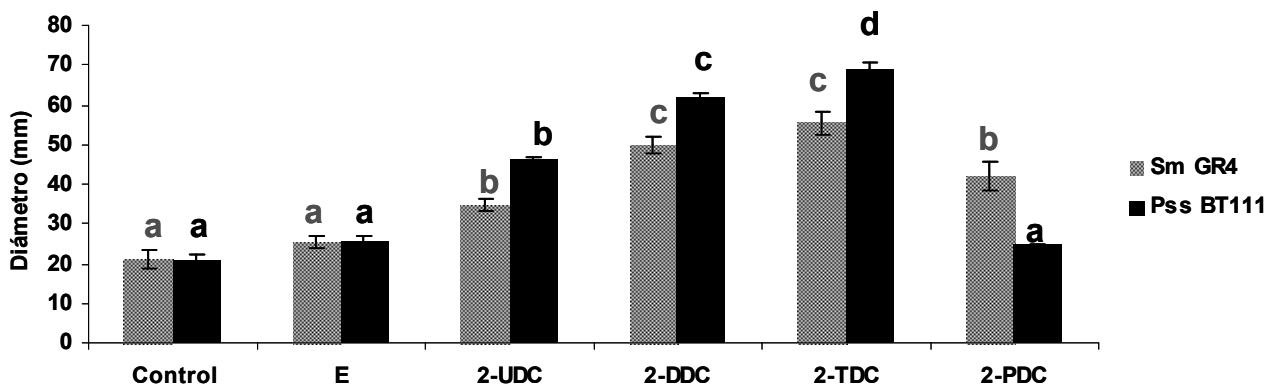


FIG. 7



- ②① N.º solicitud: 201231248
②② Fecha de presentación de la solicitud: 01.08.2012
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: **A01N35/02** (2006.01)
A61K31/121 (2006.01)

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	Base de datos WPI, semana 201153, Thomson Scientific, Londres, GB [recuperado el 10.10.2013] Recuperado de: EPOQUE; N° de acceso 2011-J80472 & JP 2011148775 A (KATOKICHI KK) 04.08.2011	1-29
X	Base de datos WPI, semana 200230, Thomson Scientific, Londres GB, [recuperado el 11.10.2013] Recuperado de: EPOQUE; N° de acceso: 2002-247345 & JP2001348308 A (LION CORP) 18.12.2001	1-29
X	HADJ FREDJ et al., Analysis of tunisian Ruta graveolens L. oils from Jemmel, Journal of Food Agriculture and Environment, Vol. 5 (1) páginas 52-55, (2007).	1-29

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia
Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría
A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita
P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud
E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
18.10.2013

Examinador
M. Ojanguren Fernández

Página
1/4

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

A01N, A61K

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

INVENES, EPODOC, WPI, CAS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 18.10.2013

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-7	SI
	Reivindicaciones 8-29	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones	SI
	Reivindicaciones 1-29	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	Base de datos WPI, semana 201153, Thomson Scientific, Londres, GB [recuperado el 10.10.2013] Recuperado de: EPOQUE; N° de acceso 2011-J80472 & JP 2011148775 A (KATOKICHI KK) 04.08.2011	
D02	Base de datos WPI, semana 200230, Thomson Scientific, Londres GB, [recuperado el 11.10.2013] Recuperado de: EPOQUE; N° de acceso: 2002-247345 & JP2001348308 A (LION CORP) 18.12.2001	
D03	HADJ FREDJ et al., Analysis of tunisian <i>Ruta graveolens</i> L. oils from Jemmel, Journal of Food Agriculture and Environment, Vol. 5 (1) páginas 52-55, (2007)	

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

El objeto de la presente invención es una metil cetona de fórmula general I donde R1 representa una cadena alifática formada por un número comprendido entre 9 y 13 átomos de carbono. También se reivindica su uso para prevenir y/o controlar infecciones bacterianas en plantas y cultivos, alimentos, instalaciones de la industria hostelera, alimentaria y médica, en productos de higiene oral y corporal, en productos cosméticos y en definitiva en todo tipo de materiales susceptibles de ser contaminados por bacterias patógenas. En concreto los compuestos preferidos dentro de la fórmula general son la 2-tridecanona, 2-undecanona, 2-dodecanona y 2-pentadecanona.

El documento D1 divulga el uso de compuestos de fórmula general I entre los que se encuentran la 2-undecanona, 2-nonanona y 2-decanona como inhibidores del crecimiento bacteriano y en concreto como antisépticos para el tratamiento de alimentos.

El documento D2 divulga el uso de la 2-tridecanona como agente antimicrobiano en preparaciones cosméticas y farmacéuticas.

Por último en el documento D3 se estudia el uso como agente antibacteriano del aceite de *Ruta graveolens* tunecina, cuyos componentes mayoritarios son metil cetonas, en concreto la 2-nonanona y la 2-undecanona pero además en su composición se incluyen otras cetonas como la 2-tridecanona y la 2-dodecanona (ver tabla 1, pág. 53). Se ensayó la actividad antimicrobiana frente a bacterias como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y cepas bacterianas hospitalarias. En este artículo se sugiere el uso de este aceite como agente de conservación de productos cosméticos y alimentarios así como el uso como compuesto activo en productos de uso médico.

Por lo tanto, a la vista de estos documentos las reivindicaciones 8 a 29 de la presente solicitud carecen de novedad y de actividad inventiva (Art. 6.1 y 8.1 LP).

En cuanto a las reivindicaciones 1 a 7 de la presente solicitud, relativas al uso de los compuestos reivindicados para el tratamiento de infecciones bacterianas en plantas y cultivos, carecen de actividad inventiva ya que si bien no se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica el uso de estos compuestos para ese fin en concreto, sería obvio para un experto en la materia realizar sin esfuerzo inventivo alguno el ensayo de la actividad de estos compuestos frente a distintas bacterias patógenas con expectativas razonables de éxito dado que han resultado efectivos en el caso de bacterias patógenas en diferentes campos e industrias. (Art. 8.1 LP).