

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 379 017**

51 Int. Cl.:  
**C12P 3/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **07765165 .1**  
96 Fecha de presentación: **05.07.2007**  
97 Número de publicación de la solicitud: **2035567**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **18.03.2009**

54 Título: **Método para producir nanopartículas de plata u oro**

30 Prioridad:  
**05.07.2006 US 818579 P**  
**30.11.2006 GB 0623925**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.04.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.04.2012**

73 Titular/es:  
**JANSSEN PHARMACEUTICA N.V.**  
**TURNHOUTSEWEG 30**  
**2340 BEERSE, BE**

72 Inventor/es:  
**DE WINDT, Wim;**  
**VERCAUTEREN, Tom y**  
**VERSTRAETE, Willy**

74 Agente/Representante:  
**Linage González, Rafael**

ES 2 379 017 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

Método para producir nanopartículas de plata u oro.

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a métodos para producir partículas de tamaño nanométrico de plata u oro mediante un proceso biológico. En particular, la invención se refiere al uso de bacterias probióticas seleccionadas entre *Lactobacillus* en condiciones específicas en la producción de nanopartículas de plata u oro con el fin de mejorar su eficacia antimicrobiana.

Antecedentes de la invención

10 Es necesario disponer de procesos de desinfección eficaces para tratar grandes cantidades de materiales contaminados, tales como el agua, especialmente el agua de circulación industrial y doméstica, y efluentes acuosos (tales como los presentes en la industria de procesado de alimentos) que contienen microorganismos que no se pueden verter ni reutilizar sin tratar por motivos higiénicos, operacionales o medioambientales. Los procesos de desinfección eficaces también son necesarios para tratar superficies tales como establecimientos, equipos, contenedores, sistemas de aire acondicionado y análogos. Los procesos de desinfección que respetan el  
15 medioambiente se basan principalmente en el uso de compuestos de oxígeno activo, tales como el peróxido de hidrógeno, o compuestos de amonio cuaternario monoméricos.

El peróxido de hidrógeno es un desinfectante suave moderadamente activo con propiedades bactericidas. Existe constancia de que concentraciones de peróxido de hidrógeno de 25 mg/L inhiben el crecimiento de algunas bacterias, sin embargo, una reducción eficaz del recuento de gérmenes, incluso empleando una concentración  
20 mucho más elevada de peróxido de hidrógeno, tarda muchas horas o requiere radiación ultravioleta adicional. Sin embargo, la generación de esta última requiere equipos caros y costes de electricidad sustanciales. Por lo tanto, cuando se desinfectan grandes cantidades de materiales contaminados, tales como el agua, por ejemplo, para el tratamiento del agua en trabajos de depuración de aguas residuales y sus producciones, dichas medidas son en la práctica inadecuadas y/o no viables económicamente. Por lo tanto, en la materia ya se han probado otros métodos  
25 para resolver estos inconvenientes.

Existe constancia en la materia de que los iones de plata y los compuestos basados en plata son muy tóxicos para los microorganismos y, por lo tanto, presentan efectos bactericidas potentes en muchas especies comunes de bacterias, que incluyen *Escherichia coli*. También se ha demostrado que los híbridos de nanopartículas de plata con macromoléculas anfifílicas hiperramificadas presentan recubrimientos de superficie antimicrobianos eficaces. Se ha  
30 descubierto que las dispersiones acuosas estables de nanopartículas de plata en forma de hidrosoles de plata elementales atóxicos presentan una gran actividad bactericida para *E. coli*; una concentración de 50 µg/cm<sup>3</sup> provoca un 100% de inhibición del crecimiento bacteriano. Se ha descubierto que las nanopartículas de plata se acumulan en las membranas bacterianas, interaccionando de cierta manera con determinados elementos estructurales de la membrana bacteriana, de manera que provocan modificaciones estructurales, degradación y, finalmente, muerte  
35 celular. Se ha descrito que la superficie de las bacterias está en general cargada negativamente para valores de pH biológicos, debido a la disociación de un número en exceso de grupos carboxílicos y otros grupos de la membrana. Se ha sugerido que las nanopartículas de plata embebidas en la matriz carbonada de la membrana generan una carga superficial debido a su movimiento y fricción dentro de la matriz y, de esta manera, las fuerzas electrostáticas podrían ser una causa de la interacción de las nanopartículas con las bacterias. Además, la plata tendrá tendencia a  
40 presentar una mayor afinidad para reaccionar con compuestos de fósforo y azufre contenidos en la membrana bacteriana, así como también en el ADN. Un tercer posible modo de acción consiste en la liberación de iones de plata, que puede contribuir adicionalmente al efecto bactericida de las nanopartículas de plata. Se ha descrito que varias especies de microorganismos, p. ej., *Lactobacillus* sp., bioabsorben Ag(I) a su superficie celular y destoxifican este ión por reducción a Ag(0), ya sea por acción de una reductasa o por quinonas que transfieren electrones o  
45 ambas.

En la materia ya existe constancia de una formulación antimicrobiana no citotóxica que comprende nanopartículas de plata biológicamente estabilizadas con un tamaño comprendido en el intervalo de 1 a 100 nm, y un portador, en la cual la concentración de dichas nanopartículas de plata biológicamente estabilizadas está comprendida en el intervalo de 1 a 6 ppm.

50 También existe constancia de un método para preparar un complejo coloidal de biomoléculas de plata, que comprende:

- proporcionar una mezcla de una biomolécula, una sal de plata y una fuente de iones haluro en una única solución; e
- irradiar la mezcla con luz que tenga una longitud de onda en la región visible, donde la sal de plata y la fuente de iones haluro sean hidrosolubles; siendo las cantidades de la biomolécula, la sal de plata y la fuente de iones  
55

haluro tales que el paso de irradiación proporcione como resultado la formación de complejos coloidales de biomoléculas de plata.

5 También se ha descrito un proceso para preparar partículas metálicas coloidales de tamaño nanométrico, comprendiendo dicho proceso el tratamiento de un extracto fúngico u hongos húmedos con una solución de un ión metálico a una temperatura comprendida en el intervalo de 15 a 40 °C durante un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 120 horas, y la separación de la biomasa para obtener las partículas metálicas coloidales de tamaño nanométrico.

10 Los métodos de producción convencionales para obtener nanopartículas de plata presentan varios inconvenientes, tales como unos costes de producción elevados, la producción de una proporción significativa de productos secundarios o la existencia de un límite superior para la concentración de nanopartículas obtenidas. Por ejemplo, el último método de producción requiere un tiempo de producción significativamente elevado y se basa en el uso de hongos, los cuales pueden ser patógenos. Por lo tanto, en la materia se necesita desarrollar un método para obtener nanopartículas de plata que sea fiable, económico y que reduzca o evite la formación de productos secundarios.

15 También se han estudiado un proceso de biosorción de Ag(I) mediante *Lactobacillus*, su dependencia del pH dentro del intervalo de pH de 2 a 6 y su dependencia de la temperatura dentro del intervalo de 10 a 60 °C, así como el mecanismo de reducción de  $Ag^+$  a  $Ag^0$  por parte de *Lactobacillus*.

En la materia también existe constancia de un proceso para preparar nanopartículas de plata mediante biorreducción empleando *Aeromonas* sp. en una mezcla con iones de plata, amoníaco e hidróxido de sodio a 60 °C durante un par de horas.

20 Los procesos mencionados anteriormente presentan inconvenientes, tales como la necesidad de una temperatura elevada, un pH ácido y/o un tiempo de incubación elevado, o la actividad bactericida insuficiente de las nanopartículas de plata obtenidas en dichos procesos.

Por lo tanto, en la materia se necesita producir nanopartículas de plata u oro mediante un método que no presente estos inconvenientes.

25 También se necesita en la materia un método simple, ecológico y reproducible para producir nanopartículas de plata u oro con potentes propiedades antimicrobianas.

También se necesita en la materia un método correspondiente para producir nanopartículas de plata u oro de utilidad constatada en ciertas aplicaciones médicas.

30 En Crystal Growth & Design (2002) 2:293-298, Nair *et al.* describen la producción de nanopartículas de plata y oro empleando bacterias del ácido láctico (cepas de *Lactobacillus*) a temperatura ambiente, donde la concentración de Au(III) era de aproximadamente 1 mM y la concentración de  $Ag^+$  era de aproximadamente 1.2 mM.

35 En Applied and Environmental Microbiology (2001) 67:3275-3279, Kashefi *et al.* describen la participación de microorganismos que reducen Fe(III) en una reacción de precipitación de oro que se lleva a cabo en una solución tamponada de bicarbonato anaeróbica a la temperatura de crecimiento óptima del organismo, pero no especifican una concentración de la sal de oro.

En Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A (1999) 96:13611-4, Klaus *et al.* describen la biosíntesis de monocristales basados en plata con composiciones y formas bien definidas en *Pseudomonas stutzeri*.

40 En Applied Microbiology and Biotechnology (2006) 69:485-492, Mandal *et al.* revisan el uso de microorganismos, tales como bacterias, levaduras, algas, hongos y actinomicetos, en la biosíntesis de nanopartículas metálicas y concluyen que todavía se deben abordar una serie de problemas desde el punto de vista microbiológico y nanotecnológico antes de que los procedimientos biosintéticos puedan competir con los protocolos químicos tradicionales.

45 En Materials Science and Engineering (2006) 27:188-192, Merroun *et al.* describen la reducción de oro para formar nanoclústers metálicos empleando células JG-A12 de *Bacillus sphaericus* y sus proteínas de la capa S en presencia de un agente reductor tal como el hidrógeno molecular. La reducción se llevó a cabo empleando una solución de  $HAuCl_3$  3 mM.

La Solicitud de Patente de los EE. UU. N.º 2005/013759 describe el uso de bacterias para producir nanomateriales y muestra que algunas características del producto resultante se pueden controlar mediante la selección y/o preparación del agente microbiano, así como las condiciones de incubación empleadas.

50 Compendio de la invención

La presente invención se refiere al uso de bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies

de *Lactobacillus* para producir una composición que comprende nanoplata o nanooro coloidal en la membrana bacteriana, comprendiendo dicha producción un paso de incubación de dichas bacterias probióticas con una solución acuosa que comprende una concentración de al menos 4 mM de una sal de plata u oro. En particular, la invención se refiere a:

- 5 • El uso de bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus* para producir nanoplata o nanooro coloidal poniendo en contacto dichas bacterias con una sal de plata u oro, a un pH controlado que hace que las bacterias produzcan nanoplata o nanooro coloidal en su membrana.

10 Más concretamente, las bacterias seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus* pueden reducir sales de Ag(I) a Ag(0) coloidal, que precipita en forma de partículas de nano-Ag en la superficie celular. La biomasa recubierta con el nanoprecipitado de plata coloidal se puede recuperar fácilmente a partir de una fase acuosa mediante filtración o centrifugación, se puede lavar y enjuagar y procesar adicionalmente, y proporciona un producto coloidal con potentes propiedades antimicrobianas, tanto en suspensión (diluida) como cuando se procesa en recubrimientos.

15 Es interesante notar que una serie de bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus*, es decir, bacterias producidas industrialmente por sus efectos beneficiosos para la salud humana cuando se encuentran presentes en el aparato digestivo humano, presentan esta habilidad para producir nanoprecipitados de Ag en su superficie celular. Estas bacterias incluyen, sin carácter limitante, cepas probióticas de *Lactobacillus fermentum*.

20 Añadiendo una combinación específica de sales (AgNO<sub>3</sub>, NH<sub>4</sub>Cl, NaOH) al cultivo celular concentrado de bacterias seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus* y controlando el pH, se forma un producto de plata coloidal con potentes propiedades antimicrobianas.

25 Ajustando la proporción de “masa de plata” frente a “masa de células biológicas” (Ag:CDW, donde CDW = peso seco de las células), se pueden modificar la reactividad y las propiedades del producto de plata coloidal final, en cuanto al tamaño de partículas coloidales, la distribución de partículas coloidales y otras propiedades del producto.

Los compuestos de plata coloidal producidos en la superficie de las bacterias presentan una amplia gama de aplicaciones, que consisten en, sin carácter limitante: desinfección de aguas, uso como agente desinfectante en productos de limpieza, como agente de limpieza, formulación de recubrimientos antimicrobianos, aplicaciones médicas, consumo humano, uso en la industria textil, aplicación en ungüentos y lubricantes, como catalizador, etc.

30 El proceso de producción es sencillo, rentable, presenta un rendimiento elevado y se puede aumentar la escala fácilmente, el tamaño y la distribución de las partículas se pueden controlar y la reactividad antimicrobiana de la nanoplata producida supera la de otros productos de plata coloidal empleando concentraciones muy bajas (ppb). Además, el producto se puede procesar en diferentes formas: seca, en forma suspendida o como un pellet “húmedo”; se puede formular en diferentes aplicaciones. No existen residuos de reactivos químicos presentes en el  
35 producto final, ya que se ha enjuagado con agua pura sin pérdida de actividad.

El uso de bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus* posibilita muchas aplicaciones en la sanidad y la industria alimentaria. El producto bacteriano recubierto de Ag sería especialmente adecuado para las siguientes aplicaciones:

- 40 • formulación de productos de limpieza desinfectantes (hospitales, laboratorios, terrenos de producción animal, entre otros);
- aplicación en filtros cerámicos u otros filtros para la desinfección de aguas, tanto agua para el consumo humano, como agua para piscinas, agua para producción animal, agua para producción acuícola, entre muchas otras;
- aplicación en recubrimientos desinfectantes: polímeros, fibras textiles, metales;
- es adecuado para la formulación de ungüentos, lubricantes, etc. para desinfectar la piel;
- 45 • aplicaciones para desinfectar el agua de consumo humano: países en desarrollo, mochileros, aviones, entre muchas otras (método de fácil aplicación); y
- para combatir patógenos: *Legionella*, *Cryptosporidium*, Hepatitis, Herpes, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, diferentes tipos de bacterias, hongos y virus.

50 Un objeto de la presente invención consiste en proporcionar nanopartículas de plata u oro de gran calidad. Un primer objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método biológico mejorado para producir una

composición que comprende nanopartículas de plata u oro coloidal, comprendiendo dicho método el uso de bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus*, tales como *Lactobacillus fermentum*, y poner en contacto dicha biomasa con una solución acuosa que comprende una concentración de al menos 4 mM de una sal de plata (I) o una sal de oro (III). La presente invención se basa en el descubrimiento inesperado de que ciertos parámetros específicos del proceso para producir nanopartículas de plata u oro mediante biorreducción afectan en gran medida a la eficacia de producción y las características de las nanopartículas resultantes. En particular, los métodos específicos de la presente invención afectan en gran medida a la actividad antimicrobiana de una composición resultante que comprende nanopartículas de plata.

Otro objeto de la presente invención consiste en que la composición de nanopartículas de plata u oro obtenida mediante biorreducción en estas condiciones específicas se pueda procesar adicionalmente, p. ej., se pueda separar de la biomasa, a la vez que se mantenga o incluso se mejore aún más su actividad u otras propiedades relevantes tales como la estabilidad durante el almacenamiento. Como alternativa, un tratamiento químico posterior, p. ej., con especies oxidantes tales como un peróxido o una persal, de una composición de nanopartículas de plata u oro obtenida mediante biorreducción en estas condiciones específicas puede incluso mejorar las propiedades de la composición de nanopartículas resultante.

También es una ventaja del proceso de la presente invención el hecho de que el tamaño y la distribución de las nanopartículas de plata u oro resultantes se pueden controlar de manera reproducible.

También es una ventaja de la presente invención el hecho de que dicho método proporciona un resultado muy fiable en un periodo de tiempo significativamente corto, con un bajo coste y de forma ecológica, reduciendo la necesidad de agentes químicos caros y/o potencialmente tóxicos. En la composición resultante del método de la invención no quedan residuos peligrosos de reactivos químicos en gran parte, ya que la biomasa empleada se origina a partir de un microorganismo inocuo, por ejemplo, probiótico. Por lo tanto, una ventaja de la presente invención consiste en que el método proporciona una composición que, al aplicarla con organismos eucarióticos, no afecta sustancialmente a dichos organismos. Se proporciona una composición con elevada actividad antimicrobiana que también actúa contra patógenos marinos, sin que afecte sustancialmente a los organismos eucarióticos. Una ventaja adicional de la invención consiste en que la invención hace posible la producción de una composición que comprende nanoplatina o nanooro como tales con una concentración elevada, y que comprende nanoplatina o nanooro compuestos sustancialmente por plata u oro en su estado metálico, respectivamente, por ejemplo, que comprenden más de aproximadamente un 95% de  $\text{Ag}^0$  en función del contenido total de plata o más de aproximadamente un 95% de  $\text{Au}^0$  en función del contenido total de oro, respectivamente.

Otra ventaja de la presente invención consiste en que el producto o la composición resultantes se pueden procesar fácilmente y de forma segura, a la vez que se mantiene o incluso se mejora su actividad. La composición se puede secar, o se puede mantener en forma suspendida o como un pellet húmedo, y se puede formular de diferentes maneras, como en formulaciones de aerosoles o por impregnación sobre un portador, sin que la actividad antimicrobiológica se vea afectada, debido a la estabilidad de las partículas de nanoplatina.

#### Definiciones

Los términos “nanoplatina” o “nano-Ag”, según se emplean en la presente a los efectos de esta invención, se refieren a nanopartículas de plata metálica ( $\text{Ag}^0$ ). Dentro del significado de la presente invención, dichas nanopartículas se pueden depositar o no sobre una biomasa. El tamaño de estas nanopartículas puede variar entre aproximadamente 0.1 nm y aproximadamente 100 nm, por ejemplo, dentro del intervalo que oscila entre aproximadamente 0.5 nm y aproximadamente 5 nm. La distribución de tamaños de estas nanopartículas también puede variar alrededor de su tamaño medio.

Los términos “nanooro” o “nano-Au”, según se emplean en la presente a los efectos de esta invención, se refieren a nanopartículas de oro metálico ( $\text{Au}^0$ ). Dentro del significado de la presente invención, dichas nanopartículas se pueden depositar o no sobre una biomasa. El tamaño de las nanopartículas puede variar entre aproximadamente 0.1 nm y aproximadamente 100 nm, por ejemplo, dentro del intervalo que oscila entre aproximadamente 0.5 nm y aproximadamente 5 nm.

El término “biomasa”, según se emplea en la presente a los efectos de esta invención, se refiere al material orgánico constituido por, o procedente de, las especies bacterianas empleadas para producir “nanoplatina” o “nanooro”.

La expresión “bacterias probióticas”, según se emplea en la presente a los efectos de esta invención, se refiere a bacterias tales que, cuando se administran en cantidades adecuadas a un huésped tal como un mamífero, una especie marina (p. ej., un pez) o un ser humano, confieren un efecto beneficioso para la salud de dicho huésped.

El término “plata (I)” o “Ag (I)”, según se emplea en la presente a los efectos de esta invención, se refiere a iones plata cargados positivamente monovalentes o  $\text{Ag}^+$ .

Los términos “oro (I)” y “Au (III)”, según se emplean en la presente a los efectos de esta invención, se refieren a

iones oro cargados positivamente monovalentes y trivalentes, respectivamente.

#### Breve descripción de los dibujos

5 La Figura 1 muestra el efecto antimicrobiano del tratamiento con partículas de nanoplata de acuerdo con una realización de la invención a diferentes concentraciones sobre el recuento total de células y la supervivencia de *E. coli*.

La Figura 2 muestra el espectro del análisis de difracción de rayos X de las partículas de nanoplata de acuerdo con una realización de la invención.

10 La Figura 3 muestra el efecto de la proporción de plata frente al peso seco de las células, durante la producción de las partículas de nanoplata de acuerdo con una realización de la invención, sobre la actividad antimicrobiana de dichas partículas contra *Salmonella typhimurium*.

La Figura 4 muestra el espectro del análisis de difracción de rayos X de las partículas de nanoplata de acuerdo con otra realización de la invención.

#### Descripción detallada de la invención

15 Un primer objeto de la presente invención consiste en proporcionar un método simple para producir una composición que comprende nanoplata o nanooro coloidal, que comprende un paso de incubación de bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus* con una solución acuosa que comprende una concentración de al menos 4 mM de una sal de plata u oro.

20 Las bacterias probióticas pueden pertenecer a una o más de las siguientes especies, sin carácter limitante: *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus rhamnosus*.

25 A los efectos de las diferentes realizaciones del método de la presente invención, se puede emplear cualquier sal de plata hidrosoluble. Según se emplea en la presente, la expresión "sal de plata" también engloba hidratos y otros solvatos de dichas sales de plata. Habitualmente, una sal de plata hidrosoluble se puede definir en la presente como una sal de plata con una solubilidad en agua de al menos 0.1 g/L a la temperatura de actuación del método de esta invención, p. ej., a temperatura ambiente. La sal de plata puede ser, sin carácter limitante, una sal de plata inorgánica o una sal de plata orgánica tal como, sin carácter limitante, acetato de plata, cloruro de plata, perclorato de plata, clorato de plata, bromuro de plata, fluoruro de plata, lactato de plata, nitrato de plata, sulfato de plata o tartrato de plata.

30 A los efectos de las diferentes realizaciones del método de la presente invención, se puede emplear cualquier sal de oro hidrosoluble. Según se emplea en la presente, la expresión "sal de oro" también engloba hidratos y otros solvatos de dichas sales de oro. Habitualmente, una sal de oro hidrosoluble es una sal de oro con una solubilidad en agua de al menos 0.1 g/L a la temperatura de actuación del método de esta invención, p. ej., a temperatura ambiente. La sal de oro puede ser, sin carácter limitante, monovalente o trivalente. La sal de oro puede ser, sin carácter limitante, una sal de oro inorgánica o una sal de oro orgánica o una sal de oro mixta tal como, sin carácter limitante, cloruro de oro (III), tiomalato de sodio y oro monohidratado, bromuro de oro (III), yoduro de oro (III) y nitrato de oro (III).

40 De acuerdo con la presente invención, la concentración inicial de la sal de plata u oro en la solución acuosa que se va a incubar debe ser de al menos 4 mM, por ejemplo, de al menos 10 mM o, a modo de ejemplo particular, de al menos 50 mM.

45 De acuerdo con una realización de la presente invención, dicha solución acuosa puede comprender además componentes adicionales que podrían influir sobre el comportamiento de la composición resultante, en particular, mejorar sus propiedades. A este efecto, en una realización de la presente invención, donde se desea obtener nanoplata, el método puede comprender un paso de incubación de bacterias probióticas (según se han definido anteriormente en la presente) con una solución acuosa que comprende una concentración de al menos 4 mM de una sal de plata y que comprende además amoníaco y/o una sal de amonio. Las sales de amonio adecuadas para esta realización son tales como, sin carácter limitante, cloruro de amonio, nitrato de amonio, fosfato de amonio, sulfato de amonio, carbonato de amonio, formiato de amonio y bromuro de amonio. La cantidad de amoníaco y/o sal de amonio empleada en esta realización de la invención debería ser preferentemente suficiente para permitir la formación de una cantidad sustancial de un complejo de plata-amoníaco o plata-amonio tal como, sin carácter limitante, un complejo de plata(I)-amoníaco como  $\text{Ag}(\text{NH}_2)^+$  y/o  $\{\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\}^+$ . De acuerdo con otra variante de esta realización de la presente invención, la solución acuosa que se va a incubar puede comprender además una cantidad adecuada de un hidróxido de un metal alcalino tal como, sin carácter limitante, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio. Dicha cantidad adecuada se puede definir por referencia a un intervalo de pH adecuado que se debe alcanzar, según se

explica en la presente más adelante.

De acuerdo con otra realización de la presente invención, el método comprende un paso de incubación de bacterias probióticas (según se han definido anteriormente en la presente) con una solución acuosa que comprende una concentración de al menos 4 mM de una sal de oro y que comprende además una cantidad adecuada de un hidróxido de un metal alcalino, tal como, sin carácter limitante, hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, en ausencia de amoníaco y/o una sal de amonio.

Se pueden añadir hidróxidos de metales alcalinos adecuados, tales como, sin carácter limitante, hidróxido de sodio y/o hidróxido de potasio, a la solución acuosa de incubación con concentraciones de hasta aproximadamente 1 M. Preferentemente, la incubación se lleva a cabo en condiciones tales que el pH sea de al menos 8, por ejemplo, dentro de un intervalo de aproximadamente 8 a aproximadamente 12 o, a modo de realización más específica, dentro de un intervalo de aproximadamente 8.5 a aproximadamente 11. De acuerdo con una realización de la presente invención, la proporción de peso de plata o peso de oro frente al peso seco de las células (abreviado en lo sucesivo en la presente como CDW) de las bacterias probióticas es de al menos aproximadamente 0.05 o de al menos aproximadamente 0.1. De acuerdo con otra realización de la presente invención, la proporción de peso de Ag:CDW o Au/CDW no es superior a 20, preferentemente es inferior a aproximadamente 10, por ejemplo, inferior a 5.

De acuerdo con una realización de la presente invención, el paso de incubación del método se lleva a cabo a una temperatura de entre aproximadamente 5 °C y aproximadamente 45 °C, preferentemente a una temperatura de entre aproximadamente 15 °C y aproximadamente 35 °C, por ejemplo, a temperatura ambiente.

Como otra realización de la presente invención, el paso de incubación del método se puede llevar a cabo durante un periodo de tiempo de entre aproximadamente 1 segundo y aproximadamente 30 minutos, por ejemplo, de entre aproximadamente 5 segundos y aproximadamente 20 minutos. Un experto en la materia será capaz de determinar, con un número de experimentos limitado, el periodo de tiempo más adecuado para la incubación, dependiendo de otros parámetros del proceso tales como, sin carácter limitante, la concentración de la sal de plata u oro, la temperatura de incubación, la proporción de peso de Ag:CDW o Au/CDW, la presencia o ausencia de amoníaco o una sal de amonio, y análogos. Como es habitual en la materia, la incubación se puede llevar a cabo con agitación durante al menos parte del tiempo de incubación.

El método de la presente invención también puede comprender un paso de procesamiento adicional de la composición resultante que comprende nanopartículas de plata u oro coloidal. Dicho procesamiento adicional puede comprender uno o más pasos tales como, sin carácter limitante, la eliminación de al menos parte de la biomasa de las nanopartículas de plata u oro o el fraccionamiento de la biomasa mediante tratamiento mecánico, enzimático y/o fisicoquímico, p. ej., mediante sonicación. Cada uno de estos métodos de fraccionamiento o eliminación de biomasa es de uso común para los expertos en la materia. Como alternativa o de manera adicional, dicho procesamiento puede incluir un paso de tratamiento químico para estabilizar o incluso mejorar ciertas propiedades deseables de la composición resultante que comprende nanopartículas de plata u oro coloidal. Como realización particular de dicho procesamiento químico, una composición de nanopartículas de plata u oro de acuerdo con la presente invención se puede tratar después de la incubación, y opcionalmente la eliminación de biomasa, con un agente oxidante, tal como un peróxido o una persal, para obtener un precipitado de nanopartículas de plata u oro con una estabilidad mejorada y/o (con relación a la nanoplatina) con una mayor actividad antimicrobiana. En esta realización de la presente invención, los peróxidos orgánicos e inorgánicos adecuados incluyen, sin carácter limitante, peróxido de hidrógeno, ácido peracético y análogos. Las persales adecuadas para emplear en esta realización de la presente invención incluyen, sin carácter limitante, las sales alcalinas hidrosolubles capaces de formar peróxido de hidrógeno al disociarse, p. ej., cuando dichas sales se disuelven en agua, se libera un ión peróxido. Los ejemplos adecuados de este tipo incluyen percarbonatos, perboratos, persilicatos y perfosfatos asociados con un catión tal como un metal alcalino. Se prefiere especialmente el percarbonato de sodio con la fórmula empírica  $2\text{Na}_2\text{CO}_3 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}_2$ . A favor de esta realización de la presente invención, el experto sabe que:

- dichas persales pueden ser mejores que el peróxido de hidrógeno en cuanto a la capacidad desinfectante,
- el peróxido de hidrógeno es un desinfectante débil y presenta una permeabilidad insatisfactoria en las bacterias, y
- cuando una persal se disuelve en agua y libera peróxido de hidrógeno, la sal alcalina extrae un protón del peróxido de hidrógeno liberado para formar el ión hidroperóxido, el cual, a diferencia del peróxido de hidrógeno, es un desinfectante poderoso y es fácilmente permeable en las bacterias.

En cualquier momento del proceso de la invención, la porción sólida que comprende nanoplatina o nanooro se puede separar de la porción líquida mediante cualquier método de uso común para los expertos. Por ejemplo, se puede separar mediante centrifugación y posterior decantación de la fracción líquida, o mediante filtración.

En el método, se puede reemplazar parcialmente una sal de plata u oro por una sal de cobre, a la vez que se ajustan

cuidadosamente una o más de las condiciones de operación de la reacción tales como, sin carácter limitante, el pH, la temperatura de incubación, el tipo de sal y la concentración de la sal. En el método, las especies bacterianas probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus* también se pueden reemplazar parcialmente por microorganismos o bacterias alternativas, a la vez que se ajustan cuidadosamente una o más condiciones de operación de la reacción tales como, sin carácter limitante, el pH, la temperatura de incubación, el tipo de sal y la concentración de la sal (de plata u oro). Dichas bacterias alternativas se pueden seleccionar del grupo constituido por bacterias que se consideran generalmente seguras para el medioambiente, más concretamente, aquellas bacterias conocidas por tener capacidad biorreductora.

Un segundo aspecto consiste en un uso antimicrobiano de una composición de nanoplata producida mediante el método descrito anteriormente, que se basa en el descubrimiento inesperado de que una concentración eficaz de dicha composición de nanoplata en un tratamiento antimicrobiano puede ser excepcionalmente baja, dependiendo de las bacterias objetivo, p. ej., de aproximadamente 0.5 ppm o incluso inferior, por ejemplo, de aproximadamente 0.05 ppm o inferior, y en el descubrimiento de que se puede observar una reducción sustancial de la cantidad de bacterias indeseadas en un periodo de tiempo limitado, p. ej., en no más de aproximadamente 5 horas. Los objetivos bacterianos adecuados para este aspecto incluyen una amplia gama de gérmenes gram positivos y gram negativos tales como, sin carácter limitante, *Pseudomonas aeruginosa* (p. ej., cepa CMCM-2-22), *Pseudomonas cepacia*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter agglomerans*, *Klebsiella pneumoniae* (p. ej., cepa ATCC-10031), *Eschericia coli*, *Streptococcus faecalis* (p. ej., cepa ATCC-10541), *Staphylococcus cohnii*, *Staphylococcus aureus* (p. ej., cepa IP 52154 o ATCC-6538), *Bacillus subtilis* (cepa ATCC-19659) (siendo todos ellos habituales entre las cepas bacterianas de los hospitales), *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae*, *Thiobacillus ferrooxidans* (p. ej., cepa ATCC 13661), *Lactobacilli*, *Thermophilic bacilli*, *Trychophyton interdigitale* (p. ej., cepa ATCC-640), *Clostridium sporogenes* (cepa ATCC-3584), *Clostridium perfringens* (cepa ATCC-13124), *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y análogos. La composición de nanoplata también puede ser activa contra los hongos, incluidos, por ejemplo, *Candida albicans* (p. ej., cepa APCC-2091), *Mycobacterium smegmatis* (p. ej., cepa IP 7326), *Aspergillus niger* (p. ej., cepa 218 IP), *Penicillium verrucosum* y análogos, y también puede tener actividad antiparasitaria contra, por ejemplo, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni* y análogos.

El uso antimicrobiano (antifúngico, antiparasitario o antivírico) puede ser en forma de una composición desinfectante líquida, en la que se puede combinar una composición de nanoplata producida mediante los métodos descritos anteriormente con un segundo agente antimicrobiano o una mezcla de dichos agentes. Los ejemplos adecuados de un segundo agente antimicrobiano incluyen, sin carácter limitante, peróxido de hidrógeno, sales de amonio cuaternario, ácido peracético, persales (siendo estas últimas como se han descrito en la presente anteriormente con relación a la presente invención) y mezclas de estos en cualesquiera proporciones conocidas. En particular, dicha combinación puede proporcionar efectos sinérgicos en la actividad antimicrobiana. Dicho segundo agente antimicrobiano puede ser un agente antimicrobiano oxidante tal como, sin carácter limitante, dióxido de cloro, monocloramina, un hipoclorito, permanganato de potasio, yodo o cloro. Las composiciones desinfectantes líquidas pueden incluir además uno o más estabilizantes tales como, por ejemplo, ácido fosfórico, ácido nítrico, ácido sulfúrico, ácido bromhídrico o ácido bórico o mezclas de estos, específicamente con el fin de ajustar el pH de la composición dentro de un intervalo adecuado para su manipulación y uso. Entre los estabilizantes de tipo ácido inorgánico, se prefiere especialmente el ácido fosfórico. En la práctica, dicho estabilizador ácido puede estar habitualmente ya incorporado en una cantidad adecuada a un peróxido de hidrógeno de cierta calidad disponible de proveedores comerciales. El estabilizante opcionalmente empleado también puede ser un ácido carboxílico orgánico tal como ácido tartárico, ácido cítrico (o uno de sus hidratos), ácido benzoico, ácido picolínico, ácido nicotínico y ácido isonicotínico. También se pueden considerar mezclas de ácidos orgánicos e inorgánicos con este fin. Dicho(s) estabilizante(s), cuando se encuentran presentes, están preferentemente en una cantidad eficaz para ajustar el pH y/o la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de la composición desinfectante líquida. Estas composiciones desinfectantes líquidas también pueden incluir al menos un componente seleccionado del grupo constituido por surfactantes, inhibidores de corrosión y fragancias (perfumes).

Los surfactantes adecuados para emplear en composiciones desinfectantes incluyen, por ejemplo, sin carácter limitante, compuestos tensioactivos catiónicos, no iónicos, anfóteros y zwitteriónicos, preferentemente los adecuados para poner en contacto con productos alimentarios o agua potable con la dosis relevante, y mezclas de dichos compuestos. En la presente son potencialmente útiles una amplia variedad de surfactantes no iónicos. Los ejemplos no limitantes de surfactantes aniónicos incluyen, por ejemplo, los seleccionados del grupo constituido por glicoles polietoxilados y/o polipropoxilados, monoésteres de ácidos grasos C<sub>8</sub>-C<sub>20</sub>, monopalmitato de sorbitán y análogos. Los ejemplos específicos de surfactantes anfóteros adecuados incluyen 3-dodecilaminopropionato de sodio, 3-dodecilaminopropanosulfonato de sodio, N-alkiltaurinas y betaínas.

La composición desinfectante que comprende nanoplata se puede estabilizar en la biomatriz y se puede aplicar directamente, o después de un procesamiento adicional según se ha descrito anteriormente en la presente, en el entorno que se desea tratar, limpiar o descontaminar. Por ejemplo, las partículas de nanoplata se pueden dispersar en el lugar del cual se desean eliminar las bacterias, o en sus alrededores, de cualquier forma adecuada o empleando métodos de aplicación adecuados. El componente de nanoplata de la composición es capaz de interactuar con los componentes celulares de las bacterias, de manera que los destruyen eficazmente y reducen el

número de células bacterianas totales hasta un nivel admisible.

El uso de una composición que contiene nanoplata tal como la descrita anteriormente puede ser para limpiar, descontaminar, desinfectar o esterilizar una superficie sólida o un volumen de un gas o un líquido. Cuando dicha composición líquida de acuerdo con la presente invención se emplea como una composición desinfectante o esterilizante (p. ej., por dispersión en un líquido o gas), se suele aplicar en condiciones adecuadas, que incluyen las concentraciones y el tiempo de aplicación, que pueden ser determinadas fácilmente por un experto a partir del conocimiento estándar de las técnicas de desinfección y esterilización.

Cuando la composición desinfectante líquida que contiene nanoplata se aplica sobre una superficie sólida, se prefiere, por normativas de seguridad, emplear una formulación diluida lista para usar obtenida mezclando una cantidad adecuada de una composición concentrada con agua y a continuación humedeciendo dicha superficie sólida con la formulación diluida obtenida durante dicho tiempo hasta conseguir la humectación completa de la superficie sólida (la cual puede depender de la porosidad de la superficie, como bien saben los expertos).

Según sobreentenderán los expertos en la materia, la cantidad preferida de la composición desinfectante líquida que contiene nanoplata que se debe emplear variará en gran medida con el tipo y la cantidad de microorganismos presentes en la superficie sólida o presentes en el líquido o gas que se desea tratar.

Con relación al uso anterior de las composiciones líquidas que contienen nanoplata como desinfectantes, se recomiendan más particularmente los siguientes métodos de aplicación:

- inmersión del producto que se desea tratar en dicha composición que contiene nanoplata,
- pulverización de la composición desinfectante sobre una superficie sólida que se desee tratar, e
- incorporación de la composición desinfectante (diluida o concentrada) en el agua que se desee tratar (particularmente, el agua de una piscina, el agua de un proceso industrial, aguas residuales y análogos).

Por consiguiente, las composiciones desinfectantes líquidas que contienen nanoplata son especialmente útiles para:

- (a) la desinfección e higiene de hospitales y laboratorios, locales industriales (tales como centrales lecheras, queserías, fábricas de malta, cervecerías, instalaciones para la producción de agua mineral, vino, licores, zumos de frutas y verduras; invernaderos; vaquerizas, gallineros y establos; cadenas de envasado para productos alimentarios, bebidas o productos farmacéuticos; espacios interiores de aviones y barcos) y los contenidos de dichos locales, especialmente el equipo o los instrumentos de dichos locales;
- (b) la esterilización de recintos asépticos tales como incubadoras para animales prematuros o animales axénicos en crecimiento;
- (c) el tratamiento de legionela en sistemas de aire acondicionado;
- (d) la desinfección e higiene de contenedores de almacenamiento (especialmente silos) y tuberías para transportar productos sólidos o líquidos tales como productos alimentarios (azúcar, té, café, cereales, bebidas) y piensos;
- (e) la desinfección e higiene de piscinas y otros equipos de balneoterapia (en cuyo caso la composición estará preferentemente exenta de surfactante);
- (f) la desinfección de sistemas para la producción, transporte y almacenamiento de agua potable (por ejemplo, en pozos o contenedores de almacenamiento), en cuyo caso la composición estará preferentemente exenta de surfactante; y
- (g) la protección de cultivos al aire libre (tales como cereales, tomates, plantaciones plataneras, cultivos hidropónicos, que incluyen endibias, semillas, tubérculos y análogos) en virtud de sus propiedades bactericidas, fungicidas, antivirales y antiparasitarias.

La actividad antimicrobiana selectiva y elevada de la composición de nanoplata obtenida mediante el método de la presente invención presenta una amplia gama de aplicaciones tanto domésticas como industriales tales como, sin carácter limitante, la desinfección de aguas, el tratamiento del crecimiento de algas en el agua, productos de limpieza y la formulación de recubrimientos antimicrobianos, p. ej., para emplear en aplicaciones médicas o en el proceso de nutrición u otros materiales para el consumo humano o animal (especialmente debido a la ausencia de efectos o a los efectos mínimos sobre las células u organismos eucarióticos), para emplear en la protección antimicrobiana de productos textiles, para emplear en preparados médicos tópicos para prevenir contaminaciones microbianas o infecciosas de tejidos expuestos tales como, sin carácter limitante, cremas, ungüentos o lociones, o para emplear como catalizadores en procesos químicos u otros procesos de transformación. Todos los usos mencionados anteriormente se pueden conseguir mediante nanoplata en suspensión, así como mediante la

incorporación de nanoplatina en polímeros y/u otros tipos de recubrimientos.

La presente invención se refiere a la producción de nanoprecipitados de plata u oro mediante bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus* que se pueden emplear sorprendentemente como agentes algicidas (p. ej., contra *Chlorella vulgaris*, pero sin limitarse a esta) en agua potable, agua de piscinas o estanques o acuarios, o en otros depósitos de agua dulce o agua salada, en polímeros y pinturas, en recubrimientos de superficie y otros materiales para protegerlos contra pequeñas incrustaciones (aspecto estético) o contra grandes incrustaciones (deterioro de materiales). La presente invención se refiere a la producción de nanoprecipitados de plata u oro mediante bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus* que pueden presentar sorprendentemente un efecto herbicida contra ciertas plantas dicotiledóneas o monocotiledóneas o un efecto contra diferentes tipos de plantas inferiores, tales como el musgo, tanto en forma diluida en agua o cuando se procesan adicionalmente mediante métodos mecánicos, enzimáticos y/o físico-químicos. La elección de la planta relevante para este fin no resulta un parámetro crítico de la presente invención. Las plantas adecuadas para este fin incluyen, entre otras, plantas dicotiledóneas tales como el tabaco (*Nicotiana tabacum*), lentejas de agua (*Lamna* sp.), soja (*Glycine max*), manzana, remolacha azucarera, *Arabidopsis thaliana*, alfalfa, petunia, algodón, zanahoria, apio, col, pepino, pimiento, canola, tomate, patata, lentejas, lino, brócoli, alubias, lechuga, colza oleaginosa, coliflor, espinacas, col de Bruselas, alcachofas, guisantes, oca, calabacín, col verde, berzas, té, café y *Selaginella lepidophylla*. También incluyen plantas monocotiledóneas tales como el arroz *Oryza sativa*, grano, cebada, maíz, girasol (*Helianthus annuus*), trigo, avena, mijo, sorgo, amaranto, cebolla, espárragos y caña de azúcar.

Los aspectos anteriores de la presente invención son especialmente útiles en los campos siguientes:

- la inhibición del crecimiento de algas en el agua de acuarios, en los sistemas de distribución del agua potable para animales y humanos, en los sistemas de distribución de agua para horticultura, en estanques, en piscinas, en sistemas de filtración para tratar agua de estanques o piscinas, y en diferentes tipos de sistemas de riego;
- la inhibición del crecimiento de algas en superficies, incluidas las superficies en contacto con agua tales como los cascos de los barcos;
- el uso en pinturas, polímeros o recubrimientos para el tratamiento de superficies contra algas, incluido el crecimiento de algas en superficies de organismos superiores tales como plantas;
- la inhibición del crecimiento de musgo u otras plantas indeseadas, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, mediante la exposición de hojas, tallo, flor o sistemas de raíces a plata coloidal, p. ej., la plata coloidal producida por bacterias probióticas y que precipita sobre estas de acuerdo con el método de producción mencionado anteriormente; y
- la inhibición del crecimiento de ciertas plantas o maleza sobre superficies mediante el recubrimiento o la exposición de estas superficies a plata coloidal, p. ej., la plata coloidal producida por bacterias y que precipita sobre estas de acuerdo con el método de producción mencionado anteriormente.

Los siguientes ejemplos se proporcionan a modo ilustrativo de ciertas realizaciones del método de acuerdo con la presente invención.

## Ejemplos

### Ejemplo 1 - Preparación de nanoplatina

Se propagó un cultivo de *Lactobacillus fermentum* Beijerinck 1901 AL (ATCC 11976, LMG 8900, del intestino de un lactante de 8 días) en caldo MRS (disponible del proveedor comercial Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) en condiciones microaerofílicas a 37 °C durante 15 horas. Las células se separaron del MRS por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 15 °C y se lavaron 2 veces con agua milliQ, a continuación se volvieron a suspender en agua milliQ hasta obtener una densidad óptica final de 1.5 a 600 nm ( $DO_{600}$ ). Se añadió hidróxido de sodio a la suspensión de células partiendo de una solución patrón de NaOH 1 N para alcanzar concentraciones finales de NaOH 0.05 N y NaOH 0.10 N, respectivamente.

Se preparó una solución patrón de Ag (I) de 425 mg de  $AgNO_3$  y 225 mg de  $NH_4Cl$  en 50 mL de agua milliQ. Se añadió un volumen de esta solución patrón de Ag (I) a 10 volúmenes de las suspensiones de células con NaOH 0.05 y 0.10 N, respectivamente. Se dejaron incubar estas mezclas con luz visible a 25 °C en condiciones de agitación suave (100 rotaciones por minuto en el agitador) durante 30 minutos. Se obtuvo una solución final de Ag (0) 5.0 mM (535 mg de Ag(0)/L) depositada sobre la biomasa de *Lactobacillus fermentum*, que se denomina en la presente "nanoplatina" o "nano-Ag". Las células de *Lactobacillus fermentum* recubiertas se centrifugaron y se lavaron tres veces con agua milliQ para eliminar los residuos del medio de cultivo y otros aditivos, mediante la centrifugación, decantación y resuspensión varias veces de la composición en agua milliQ fresca. La concentración final de nano-Ag se ajustó consiguientemente. A continuación, la composición se diluyó con agua milliQ o se concentró por

centrifugación a 3000 g y se volvió a suspender en agua milliQ de acuerdo con las necesidades del usuario final.

#### Ejemplo 2 - Análisis de DRX de la nanoplata

5 El análisis de difracción de rayos X (DRX) de la biomasa con partículas de plata obtenida en el Ejemplo 1 y secada adicionalmente a 30 °C se realizó con un difractómetro D5000 de Siemens con un sistema óptico Bragg-Brentano (comercializado por el proveedor Siemens, Munich, Alemania). Los rayos X se generaron en un tubo de rayos X de cobre con una potencia de 1.6 kW (40 kV, 40 mA). Las medidas se realizaron entre 25 y 90 grados 2-theta con un tiempo por paso de 1.6 s y un tamaño de paso de 0.02 grados. El espectro resultante (no se muestra) indica la presencia del patrón de difracción de rayos X de plata metálica y óxido de sodio. Este último es un residuo del hidróxido de sodio empleado para preparar la nanoplata.

#### 10 Ejemplo 3 - Análisis de EDX de la nanoplata

15 El análisis por energía dispersiva de rayos X (EDX) de la biomasa seca con nanoplata obtenida en el Ejemplo 1 y secada adicionalmente a 30 °C se realizó con un microscopio electrónico de barrido JSM6100 con detector EDX (comercializado por JEOL USA, Inc.) con una resolución correspondiente a una energía incidente de 20.0 keV. Los resultados del análisis se enumeran en la Tabla 1 (como % en peso y % atómico) y demuestran claramente la presencia principalmente de materia orgánica (debido al elevado contenido de carbono y oxígeno) y plata, la combinación de cuyas cantidades representa aproximadamente hasta un 91% en peso de la materia seca. El resto del producto seco consistía en trazas de los elementos Ca, Mg, Si, P, S y Cl, principalmente debidas a los residuos minerales de la matriz biológica seca.

Tabla 1

elemento	% en peso	% atómico
C	55.90 ± 0.28	69.18 ± 0.16
O	26.21 ± 0.08	24.35 ± 0.15
Na	4.97 ± 0.02	3.21 ± 0.00
Mg	0.85 ± 0.06	0.52 ± 0.04
Si	0.19 ± 0.06	0.10 ± 0.03
P	1.64 ± 0.04	0.79 ± 0.02
S	0.22 ± 0.01	0.11 ± 0.01
Cl	0.31 ± 0.03	0.13 ± 0.014
Ag	8.51 ± 0.20	1.17 ± 0.03
Ca	1.22 ± 0.18	0.45 ± 0.07

20

#### Ejemplo 4 - Actividad antimicrobiana de la nanoplata en un medio de cultivo sólido para *Escherichia coli*

25 A una placa que contenía medio de cultivo solidificado para cultivar *Escherichia coli* (agar Luria Bertani), se añadieron 100 mL de una suspensión de plata con una concentración de Ag de 5 mM en forma de nanoplata depositada sobre una biomasa de *Lactobacillus fermentum* como la obtenida en el Ejemplo 1. Como control, a una placa que contenía el mismo medio de cultivo, se añadieron 100 mL de una solución de AgNO<sub>3</sub> 5 mM en agua milliQ esterilizada con NaOH 0.1 N. Este sistema se corresponde con una cantidad total de 0.05 mg de Ag por placa de agar o 11 mg de Ag por m<sup>2</sup> de área superficial total. Se repitió este experimento con unas concentraciones del doble de las mencionadas anteriormente, es decir, con 0.11 mg de Ag por placa de agar o 22 mg de Ag por m<sup>2</sup> de área superficial total.

30 Al añadir estas suspensiones de plata a las placas, se aplicó una capa homogénea de Ag(I)NO<sub>3</sub> o nano-Ag,

respectivamente, sobre el medio de cultivo solidificado.

Después de tratar previamente el medio de cultivo solidificado de esta manera, se añadieron 100  $\mu$ L de una suspensión de  $2 \times 10^8$  CFU/mL de *Escherichia coli* en solución fisiológica (8.5 g de NaCl/L en agua esterilizada) a las placas de agar tratadas previamente. A continuación, las placas se incubaron durante 24 horas a 30 °C y se contaron las colonias. Los resultados del recuento se ilustran en la Figura 1. Para concentraciones de nano-Ag de 11 mg de Ag/m<sup>2</sup> y 22 mg de Ag/m<sup>2</sup>, no se pudieron detectar células viables de *E. coli* en el medio de cultivo sólido tratado (< límite de detección (L.D.) =  $1 \times 10^1$  CFU/mL). De esta manera, el tratamiento con nano-Ag a estas concentraciones dio como resultado una reducción de células de *E. coli* desde  $2 \times 10^8$  CFU/mL hasta menos de  $1 \times 10^1$  CFU/mL (L.D.). Para concentraciones de Ag(I)NO<sub>3</sub> de 11 mg de Ag/m<sup>2</sup> y 22 mg de Ag/m<sup>2</sup>, se observó una reducción de células de *E. coli* significativa desde  $2 \times 10^8$  CFU/mL hasta  $4 \times 10^2$  CFU/mL y  $1 \times 10^2$  CFU/mL, respectivamente.

Como control, se añadieron suspensiones de *E. coli* con una concentración de  $2 \times 10^6$  CFU/mL a placas que contenían medio de cultivo sin tratar, es decir, sin Ag, y a placas que contenían el mismo medio de cultivo tratado con 100  $\mu$ L de agua mQ esterilizada con solamente *Lactobacillus fermentum* ATCC 11976, con la misma concentración que para el tratamiento con nano-Ag, pero sin nano-Ag. No se observó ningún efecto inhibitorio sobre el recuento total de estas bacterias. Como consecuencia, el efecto inhibitorio observado para nano-Ag y Ag (I) se puede atribuir al tratamiento con Ag y no al procedimiento del tratamiento ni a las cepas de *Lactobacillus* empleadas en este experimento.

#### Ejemplo 5 - Actividad antimicrobiana en suspensión para diferentes bacterias patógenas

Se evaluó la supervivencia de cultivos patógenos de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes* diluidos en solución fisiológica que contenía diferentes concentraciones (0 mg/L, 0.10 mg/L, 1.0 mg/L, 10 mg/L y 50 mg/L) de la composición de nano-Ag obtenida en el Ejemplo 1. Se aplicó nano-Ag en una solución fisiológica que contenía un cultivo vivo de una de las bacterias patógenas mencionadas anteriormente. La solución fisiológica incluía 8.5 g de NaCl por 1 L de agua y se preparó de forma que tuviera un potencial osmótico neutro para las células bacterianas, de manera que no las matara debido a la tensión osmótica. Los tratamientos de control consistieron en un cultivo bacteriano en solución fisiológica en ausencia de nano-Ag.

Se preparó una solución patrón de 100 mg de nano-Ag/L en agua mQ y se añadió a los cultivos bacterianos diluida en solución fisiológica, en cantidades adecuadas para obtener las concentraciones finales de nano-Ag mostradas en la Tabla 2.

El tratamiento se repitió independientemente para cada especie bacteriana patógena mencionada anteriormente, donde el "cultivo bacteriano" representa un caldo líquido diluido con las especies bacterianas en fase de crecimiento exponencial, diluida en solución fisiológica hasta una concentración final de células de  $10^4$ - $10^5$  CFU/mL. Cada tratamiento se realizó por duplicado. Todas las incubaciones se realizaron en tubos de ensayo esterilizados y con tapón, que se incubaron con agitación a 37° C durante 72 horas. Después de la incubación, se añadieron 100  $\mu$ L de cada tubo de ensayo a una placa que contenía un medio de cultivo sólido de agar tripticasa soja (TSA) y se contaron las colonias. Los resultados de estos recuentos para los diferentes patógenos evaluados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2

Concentración de nano-Ag (mg de Ag/L)	Patógeno (CFU/mL)			
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria</i>
0	$1.1 \times 10^2$	$1.3 \times 10^2$	$1.0 \times 10^5$	$1.5 \times 10^1$
0.10	$4.6 \times 10^1$	1	5	$1.0 \times 10^1$
1.0	0	0	0	2
10	2	0	0	0
50	0	0	0	0

La Tabla 2 muestra que una concentración de 1 mg/L de nano-Ag como la obtenida en el Ejemplo 1 fue suficiente para reducir el número de células viables de *E. coli*, *S. aureus* y *S. typhimurium* en 72 horas hasta una concentración

de células < 10 CFU/mL (es decir, inferior al límite de detección). Ya se observó una muerte celular significativa a una concentración de 0.10 mg/L. Con relación a la *Listeria*, se obtuvo una reducción de la concentración de células viables por debajo del límite de detección a 10 mg/L de nano-Ag. De este modo, se puede concluir que la nano-Ag obtenida en el Ejemplo 1, en concentraciones de 1.0 mg/L o inferiores en suspensiones de células líquidas, actúa como un agente antimicrobiano potente que elimina eficaz y significativamente las bacterias patógenas viables del líquido.

Ejemplo 6 - Actividad antimicrobiana de la nano-Ag en suspensión combinada con *Artemia franciscana*

Se preparó agua marina artificial esterilizada (Instant Ocean<sup>®</sup>, comercializada por Aquarium Systems de EE. UU.) en agua milliQ por autoclavado. Todos los tratamientos se llevaron a cabo en alícuotas de 20 mL de agua marina artificial esterilizada en tubos Falcon de 50 mL. Cada tratamiento (realizado por triplicado) consistió en 20 *Artemia nauplii* axénicas en 20 mL de agua marina artificial, complementadas con una combinación de 10<sup>5</sup> CFU (unidades formadoras de colonias)/mL de *Vibrio campbellii* LMG21363 y/o nano-Ag como la obtenida en el Ejemplo 1 con una concentración final según se muestra en la Tabla 3. De este modo, la bacteria *V. campbellii* se incubó junto con su organismo huésped *Artemia franciscana*.

Se prepararon los siguientes ensayos:

- *Artemia franciscana* + 10<sup>5</sup> CFU/mL de *Vibrio campbellii*
- *Artemia franciscana* + 10<sup>5</sup> CFU/mL de *Vibrio campbellii* + 100 mg de nano-Ag/L
- *Artemia franciscana* + 10<sup>5</sup> CFU/mL de *Vibrio campbellii* + 10 mg de nano-Ag/L
- *Artemia franciscana* + 10<sup>5</sup> CFU/mL de *Vibrio campbellii* + 1.0 mg de nano-Ag/L
- *Artemia franciscana* + 10<sup>5</sup> CFU/mL de *Vibrio campbellii* + 0.1 mg de nano-Ag/L
- *Artemia franciscana* + 0.1 mg de nano-Ag/L
- *Artemia franciscana* + 100 mg de nano-Ag/L
- *Artemia franciscana* + 10 mg de nano-Ag/L
- *Artemia franciscana* + 1.0 mg de nano-Ag/L y
- *Artemia franciscana* + 0.1 mg de nano-Ag/L

Después de 48 horas de incubación, se determinó la concentración de *V. campbellii* en el agua marina artificial esterilizada que contenía *Artemia franciscana* contando las placas en un medio de cultivo específico para *Vibrio*. Los resultados medios de los tratamientos se muestran en la Tabla 3 a continuación (donde L.D. se refiere al límite de detección).

Tabla 3

Concentración de nano-Ag (mg de Ag/L)	Supervivencia de las bacterias patógenas <i>Vibrio campbellii</i>
0	1.0 x 10 <sup>5</sup> CFU/mL
0.10	3.0 x 10 <sup>2</sup> CFU/mL
1.0	< 10 <sup>1</sup> CFU/mL (L.D.)
10	< 10 <sup>1</sup> CFU/mL (L.D.)
100	< 10 <sup>1</sup> CFU/mL (L.D.)

Además, se observó que, para concentraciones de 0.10 y 1.0 mg/L de nano-Ag, no se produjo ningún efecto significativo sobre la tasa de supervivencia (80%) de *Artemia franciscana* en comparación con los controles sin tratar. Esto indica que la nano-Ag producida de acuerdo con el Ejemplo 1 no presenta ningún efecto tóxico ni

inhibitorio en organismos superiores a estas concentraciones.

Ejemplo 7 - Determinación del tiempo de contacto eficaz para la actividad antimicrobiana

5 El objetivo de este ensayo era determinar un tiempo de contacto adecuado de la composición de nano-Ag del Ejemplo 1 con cultivos bacterianos patógenos de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* o *Listeria monocytogenes* diluidos en solución fisiológica, con el fin de obtener una actividad antimicrobiana eficaz para concentraciones de 0.1 y 1 mg/L de Ag, respectivamente.

10 Se aplicaron estas concentraciones de nano-Ag a cultivos bacterianos en una solución fisiológica (8.5 g de NaCl en 1 L de agua) preparados para tener un potencial osmótico neutro para las células bacterianas, de manera que no las mataran debido a la tensión osmótica. El tratamiento de control consistió en un cultivo bacteriano en solución fisiológica sin la composición de nano-Ag.

Se preparó una solución patrón de 100 mg de nano-Ag/L en agua mQ y se añadió a los cultivos bacterianos (de la misma forma que en el Ejemplo 5) en solución fisiológica, en cantidades adecuadas para proporcionar las concentraciones finales de nano-Ag deseadas.

15 Las incubaciones (realizadas por duplicado) se llevaron a cabo en tubos de ensayo esterilizados y con tapón, agitando a 37 °C, y a continuación se determinó el recuento celular para diferentes tiempos de contacto (eventos de muestreo). Para cada evento de muestreo, se añadieron 100 µL de cada tratamiento a placas que contenían un medio de cultivo sólido de agar tripticasa soja (TSA) y se contaron las colonias. A continuación en la Tabla 4 se muestran los resultados obtenidos después de 15 horas, 16 horas, 17 horas, 18 horas y 40 horas, respectivamente (donde ND significa no detectable, es decir, por debajo del límite de detección).

20

Tabla 4

Tiempo de contacto (horas)	Conc. (ppm)	Patógeno			
		<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Listeria</i>
15	0	1.0E+05	2.2E+02	4.5E+03	4.9E+03
		1.0E+04	1.1E+02	6.1E+03	4.2E+03
	1	ND	ND	ND	1.0E+01
		ND	ND	ND	2.0E+01
	0.1	ND	5.0E+01	ND	3.4E+03
		ND	1.0E+02	1.0E+01	3.9E+03
16	0	2.0E+04	1.6E+02	2.7E+03	5.6E+03
		7.3E+03	1.3E+02	4.0E+03	5.1E+03
	1	ND	ND	ND	ND
		ND	6.0E+01	ND	2.0E+03
	0.1	ND	4.0E+01	ND	2.1 E+03
		ND	4.0E+01	ND	2.1 E+03
17	0	1.2E+04	1.5E+02	3.1E+03	5.6E+03
		1.0E+04	1.7E+02	3.2E+03	4.7E+03
	1	ND	ND	ND	ND

Tiempo de contacto (horas)	Conc. (ppm)	Patógeno			
		<i>Salmonella</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>E.coli</i>	<i>Listeria</i>
	0.1	ND	1.0E+01	ND	1.1E+03
		ND	5.0E+01	ND	8.8E+02
18	0	1.0E+04	1.6E+02	2.2E+03	3.5E+03
		1.0E+04	7.0E+01	2.3E+03	2.4E+03
	1	ND	ND	ND	ND
	0.1	ND	1.0E+01	ND	9.2E+02
		ND	ND	ND	2.2E+03
40	0	1.0E+04	1.0E+01	1.5E+03	9.0E+01
		1.9E+04	1.0E+01	1.9E+03	7.0E+01
	1	ND	ND	ND	ND
	0.1	ND	ND	ND	ND

Ejemplo 8 - Preparación de composiciones de nanoplatina con diferentes proporciones en peso de plata frente al peso seco de las células de biomasa

5 Se preparó una solución patrón de plata (I) en amoníaco líquido (28% en volumen de NH<sub>3</sub> en agua) con una concentración final de 425 g de AgNO<sub>3</sub>/L (= AgNO<sub>3</sub> 50 mM). A continuación, se preparó un cultivo de *Lactobacillus fermentum* como en el Ejemplo 1.

Se volvieron a suspender 2.8 g (peso húmedo) del pellet celular centrifugado en 3 cantidades diferentes (50 mL, 100 mL y 1 L) de agua milliQ para obtener las mezclas de reacción denominadas A, B y C, respectivamente.

10 A continuación, se añadió NaOH a cada tubo de ensayo partiendo de una solución patrón de NaOH 1 N en agua milliQ, para obtener una normalidad de 0.10 N de NaOH en la suspensión mencionada anteriormente.

Como consecuencia, la solución patrón de plata (I) se añadió como se indica a continuación:

15 - Mezcla de reacción A: Se añadieron 0.24 mL de solución patrón de plata (I) para obtener una concentración final de 1.30 g de Ag/L (o Ag 12 mM). Se observó una reacción de precipitación casi inmediata (precipitado marrón-rojizo) en la biomasa de 56 g/L (peso húmedo). Asumiendo una proporción en peso seco media de la biomasa centrifugada de entre un 10 y un 30%, se obtuvo una proporción de plata frente al peso seco de las células de entre 1:4 y 1:12.

20 - Mezcla de reacción B: Se añadieron 2.4 mL de solución patrón de plata (I) para obtener una concentración final de 5.78 g de Ag/L (Ag 55 mM). Se observó una reacción de precipitación casi inmediata (precipitado marrón-rojizo) en la biomasa de 28 g/L (peso húmedo). Ya que el peso seco de la biomasa centrifugada era de un promedio de 10-30%, se obtuvo una proporción de plata frente al peso seco de las células de entre 2:1 y 0.7:1. El pH durante esta reacción fue de 11.6.

25 - Mezcla de reacción C: Se añadieron 24 mL de solución patrón de plata (I) para obtener una concentración final de 5.78 g de Ag/L (Ag 55 mM). Se observó una reacción de precipitación casi inmediata en la biomasa de 2.8 g/L (peso húmedo). Ya que el peso seco de la biomasa centrifugada era de un promedio de 10-30%, se obtuvo una proporción de plata frente al peso seco de las células de entre 20:1 y 7:1.

Las mezclas de reacción se dejaron reposar durante 30 minutos y después se recogió la composición de nano-Ag formada.

5 El precipitado de nano-Ag resultante se centrifugó junto con la biomasa a 3000 g durante 10 minutos a 15 °C y a continuación se lavó dos veces con agua milliQ para eliminar cualquier resto de amoníaco y otros componentes hidrosolubles del proceso de producción. A continuación, el producto de tipo pellet purificado de nano-Ag se analizó (Ejemplo 9) o se diluyó adicionalmente en agua milliQ hasta obtener concentraciones adecuadas de nano-Ag para ensayos adicionales.

Ejemplo 9 - Análisis de DRX de la nano-Ag producida con una proporción de plata frente al peso seco de las células de biomasa de 0.7:1

10 El análisis de DRX de una biomasa con partículas de nanoplatina producida con una proporción de plata frente al peso seco de las células de biomasa de 0.7:1 de acuerdo con el Ejemplo 8, secada a continuación en un horno a 100 °C durante 24 horas, se llevó a cabo según se ha explicado en el Ejemplo 2. Solo se pudo detectar el patrón de difracción de rayos X de la plata metálica en este espectro de DRX. Debido a que se puede estimar con certeza que las trazas de elementos cristalinos por debajo de un 5% en peso en el producto seco no se pueden detectar por  
15 DRX, se puede estimar que aproximadamente al menos un 95% de la plata detectada con este análisis de DRX estaba en el estado de Ag (0).

Ejemplo 10 - Tratamiento posterior de la nanoplatina con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

20 Los pellets de nano-Ag lavados obtenidos de acuerdo con el Ejemplo 1 o el Ejemplo 8, se trataron posteriormente con un 30% (en volumen) de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en agua. Con este fin, los pellets se suspendieron en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> con concentraciones de hasta 6 g de Ag/L de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%). Se obtuvieron precipitados más estables. A continuación, se diluyó adicionalmente una suspensión de los precipitados obtenidos en agua milliQ con el fin de obtener concentraciones adecuadas de nano-Ag para ensayos adicionales.

Ejemplo 11 - Propiedades antimicrobianas de la nano-Ag sin tratamiento posterior con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o después de dicho tratamiento

25 Se prepararon formulaciones de nano-Ag según se ha descrito en el Ejemplo 8 con diferentes proporciones de plata frente al peso seco de las células de biomasa de 7:1, 1:10 y 0.7:1, respectivamente (muestras denominadas en la presente A, B y C, respectivamente). De forma adicional, los preparados de nano-Ag obtenidos con una proporción de plata frente al peso seco de las células de biomasa de 0.7:1 se trataron adicionalmente con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> según se ha descrito en el Ejemplo 10, para obtener de esta manera una cuarta muestra denominada D. Para evaluar el efecto  
30 de la proporción de plata frente al peso seco de las células de biomasa sobre la actividad antimicrobiana de los productos de nano-Ag, se preparó una suspensión celular de  $1 \times 10^4$  CFU/mL de *Salmonella typhimurium* en solución fisiológica esterilizada y se distribuyó en diferentes tubos de ensayo. Se añadieron las muestras A, B, C y D a estos tubos de ensayo hasta obtener una concentración final de 0.05 mg/L (o 50 ppb) de nano-Ag en cada tubo de ensayo. Como controles, se incubaron cultivos bacterianos con AgNO<sub>3</sub> a 0.05 ppm y sin nada de plata. Los tubos de  
35 ensayo se taparon y se incubaron con agitación a 37 °C por duplicado. Después de 4.5 horas de incubación, se tomaron muestras, se realizaron series de diluciones en solución fisiológica, se añadieron a placas con medio TSA y a continuación las placas se incubaron a 37 °C durante toda la noche para poder determinar el recuento total de *Salmonella*. Los resultados de estos recuentos se muestran en la Figura 3 en forma de un recuento celular medio y una desviación estándar de dos duplicados independientes. Se ha observado una reducción sustancial del recuento  
40 de bacterias después de 4.5 horas de incubación en presencia de 0.05 ppm de nano-Ag obtenida mediante el método del Ejemplo 8. La Figura 3 muestra que cuanto mayor es la proporción de plata frente al peso seco de las células, menos reactiva es la nano-Ag resultante contra la actividad antimicrobiana. Además, el tratamiento del producto de nano-Ag con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> aumenta significativamente su actividad antimicrobiana.

45 Ejemplo 12 - Determinación del tamaño de partícula de la nanoplatina mediante microscopía electrónica de transmisión

Con el fin de preparar secciones finas para el análisis por TEM, los pellets de bacterias se fijaron en un tampón de cacodilato 0.1 M (pH de 7.4) que contenía un 2.5% de glutaraldehído y un 2% de formaldehído, y se embebieron en agarosa con punto de fusión bajo al 3% (de Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EE. UU.). Estas muestras se fijaron posteriormente en tetraóxido de osmio al 1%. Entre y después de los pasos de fijación, las muestras se  
50 lavaron con agua destilada. A continuación, las muestras se deshidrataron en concentraciones cada vez más elevadas de etanol y, finalmente, en óxido de propileno anhidro. Después de embeberlos en medio Epon-Spurr, los bloques de muestras se cortaron con una máquina de corte TM60 (de Reichert-Jung A.G., Viena, Austria) para obtener una cara de corte de 0.5 X 1 mm<sup>2</sup> - 1 X 2 mm<sup>2</sup>, y las secciones ultrafinas en el intervalo de color de interferencia de oro a plata mate se cortaron empleando el microtomo Ultracut (de Reichert-Jung A.G., Viena, Austria). Las secciones se colocaron sobre pioloform y rejillas de cobre recubiertas de carbono (malla 200). Una vez  
55 completado este procedimiento, las secciones finas se tiñeron con acetato de uranilo al 2% y a continuación con citrato de plomo para determinar la ultraestructura de las células. Los productos químicos y las rejillas se obtuvieron

de Agar Scientific (Stansted, Reino Unido). La obtención de las imágenes se llevó a cabo con un microscopio electrónico de transmisión EM208S (de FEI, Eindhoven, Países Bajos) que operaba a 80 kV.

Se obtuvieron las imágenes TEM (no se muestran) para las partículas de nanoplatina resultantes de las mezclas de reacción A, B y C descritas en el Ejemplo 8. Estas imágenes confirman que se obtuvieron partículas de nanoplatina esféricas en la composición en forma de precipitados sobre la superficie celular bacteriana y en suspensión entre la biomasa.

- 5 - Tamaños de partícula para la nano-Ag resultante de la mezcla de reacción A (proporción 1:10): para las 35 nanopartículas evaluadas, el diámetro osciló entre 3.3 nm y 72 nm, con una media de 14 nm, el área superficial de las partículas osciló entre 6.4 y 2996 nm<sup>2</sup> y, por consiguiente, la esfericidad osciló entre 0.14 y 0.97;
- 10 - Tamaños de partícula para la nano-Ag resultante de la mezcla de reacción B (proporción 1:1): para las 202 nanopartículas evaluadas, el diámetro osciló entre 3 nm y 116 nm, con una media de 15 nm, el área superficial de las partículas osciló entre 6 y 4805 nm<sup>2</sup> y, por consiguiente, la esfericidad osciló entre 0.12 y 0.96;
- 15 - Tamaños de partícula para la nano-Ag resultante de la mezcla de reacción C (proporción 10:1): para las 56 nanopartículas evaluadas, el diámetro osciló entre 3.3 nm y 56 nm, con una media de 16 nm, el área superficial de las partículas osciló entre 6.4 y 1841 nm<sup>2</sup> y, por consiguiente, la esfericidad osciló entre 0.15 y 0.95.

#### Ejemplo 13 - Preparación de nanooro coloidal

Se preparó una solución patrón de oro (III) en agua milliQ con una concentración final de 7.5 g de AuCl<sub>3</sub>/L. Se obtuvo un cultivo de *Lactobacillus fermentum* de acuerdo con el Ejemplo 1.

Se añadió un pellet celular centrifugado con un peso húmedo de 2.5 g a 100 mL de agua milliQ.

- 20 Se añadió NaOH partiendo de una solución patrón de NaOH 1 N en agua milliQ, para obtener una normalidad de 0.10 N de NaOH en la suspensión mencionada anteriormente.

Consecuentemente, se añadieron 10 mL de la solución patrón de oro (III) a esta suspensión para obtener una concentración final de 75 mg de Au (III)/100 mL en forma de AuCl<sub>3</sub>-Au (Au 3.8 mM). La precipitación de Au (0) sobre la biomasa de 2.5 g/100 mL (peso húmedo) se completó en 4 horas. Debido a que el peso seco de biomasa centrifugada era de una media de 10-30 %, se obtuvo una proporción de oro frente al peso seco de las células de entre 1:3 y 1:10. Se dejó evolucionar la reacción durante 4 horas y a continuación se recogieron las partículas de nanooro. Este precipitado violeta se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos a 15 °C y se lavó 2 veces con agua milliQ para eliminar los componentes hidrosolubles del proceso de producción.

#### Ejemplo 14 - Análisis de DRX del nanooro

- 30 El análisis de DRX de la biomasa con partículas de oro del Ejemplo 13, secada en un horno a 100 °C durante 24 horas, se realizó con un difractor D5000 de Siemens con un sistema óptico Bragg-Brentano, según se ha explicado en el Ejemplo 2. El espectro resultante se muestra en la Figura 4 e indica la presencia de picos de difracción de rayos X de Au<sup>0</sup> solamente.

#### Ejemplo 15 - Eficacia de la bioprecipitación y recuperación de la biomasa para diferentes proporciones de plata frente al peso seco de las células de biomasa

Con el fin de evaluar la influencia de la biomasa sobre la biorreducción de Ag (I) a nanopartículas de Ag (0), se determinó la recuperación sobre la biomasa y en solución después de la biorreducción para diferentes proporciones de Ag:CDW.

- 40 Se prepararon formulaciones de nanoplatina con diferentes proporciones de Ag:CDW según se ha descrito en el Ejemplo 8. Los porcentajes de recuperación de plata se determinaron después de 4 horas de incubación de la biomasa con Ag (I) y después del fraccionamiento entre la fase soluble (en solución) y la fase precipitada (sobre la biomasa) por centrifugación a 7000 g durante 10 minutos. Los resultados de esta investigación se muestran a continuación en la Tabla 8.

45

Tabla 8

Muestra (proporción de Ag:CDW)	mg de Ag/L en solución	mg de Ag/L sobre la biomasa	Recuperación total
A (1:10)	76	1295	100 %
B (1:1)	819	5308	100 %
C: Ag:CDW = 10:1	1612	4844	100 %

- 5 A partir de estos resultados, resulta evidente que la recuperación de la plata en forma de partículas asociadas a la biomasa fue superior cuando las proporciones de Ag:CDW eran menores. Por ejemplo, una proporción de Ag:CDW de 1:10 proporciona una recuperación de Ag<sup>0</sup> aceptable (de aproximadamente un 95%) a partir de Ag (I) en solución mediante biorreducción.

Ejemplo 16 - Propiedades algicidas de una formulación de nanoplata sin tratamiento posterior con peróxido de hidrógeno

- 10 Se preparó una formulación de nanoplata según se ha descrito en el Ejemplo 8 con una proporción de plata frente al peso seco de las células de biomasa de 1:4.

- 15 Para evaluar el efecto algicida de esta formulación, se inocularon tubos de ensayo que contenían 10 mL de medio BG11 (según describen Stanier *et al.* en Bacteriol. Rev. (1971) 35:171-205) con 0.5 mL de un cultivo BG11 líquido en crecimiento activo de *Chlorella vulgaris* y se incubaron a 20 °C con un 65% de humedad relativa y 1000 Lux (16 horas/día). Se evaluó el crecimiento después de 2 semanas mediante medidas espectrofotométricas. Se evaluaron diferentes concentraciones de la formulación de nanoplata, que oscilaban entre 20 mg de Ag/L y 0.01 mg de Ag/L, mediante dosificación en los tubos de ensayo. El valor MIC representa la concentración de ensayo más baja para la cual se observa una inhibición completa del crecimiento del organismo. Se determinó que el valor MIC de esta formulación de nanoplata contra *Chlorella vulgaris* era de 0.125 mg de Ag/L.

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para producir una composición que comprende nanoplata o nanooro coloidal, que comprende un paso de incubación de bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus* con una solución acuosa que comprende una concentración de al menos 4 mM de una sal de plata u oro.
- 5 2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicha solución acuosa comprende una concentración de al menos 4 mM de una sal de plata y comprende además amoníaco y/o una sal de amonio, y un hidróxido de un metal alcalino.
3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 para producir una composición que comprende nanoplata coloidal, que comprende un paso de poner en contacto, a una temperatura de 5 °C a 45 °C, bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus* con una solución acuosa que comprende una mezcla de una sal de plata, amoníaco y/o una sal de amonio, y un hidróxido de un metal alcalino.
- 10 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, donde la cantidad de amoníaco y/o sal de amonio es suficiente para formar una cantidad sustancial de un complejo de  $\text{Ag}(\text{NH}_3)^+$  o  $\{\text{Ag}(\text{NH}_3)_2\}^+$ .
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 para producir una composición que comprende nanooro coloidal, que comprende un paso de poner en contacto, a una temperatura de 5 °C a 45 °C, bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por especies de *Lactobacillus* con una solución acuosa que comprende una mezcla de una sal de oro y un hidróxido alcalino en ausencia de amoníaco o una sal de amonio.
- 15 6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde la proporción del peso de plata u oro frente al peso seco de las células de las bacterias está comprendida en un intervalo que oscila entre 0.05 y 20.
7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el tiempo de contacto o incubación oscila entre 1 segundo y 30 minutos.
- 20 8. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la incubación se lleva a cabo a un pH comprendido en un intervalo que oscila entre 8 y 12.
9. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, donde dicha especie de *Lactobacillus* se selecciona del grupo constituido por *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus delbrueckii* subespecie *bulgaricus*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus rhamnosus*.
- 25 10. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que comprende además el paso de eliminar al menos parte de dichas bacterias probióticas seleccionadas del grupo constituido por las especies de *Lactobacillus* a partir de la mezcla de incubación mediante tratamiento mecánico, enzimático o físicoquímico.
- 30 11. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende además los pasos de:
  - centrifugar la mezcla de incubación para obtener una porción sólida que comprende la composición que contiene nanoplata o nanooro coloidal y una porción líquida, y
  - 35 - separar dicha porción sólida de la porción líquida.
12. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende además el paso de tratar dicha composición que comprende nanoplata o nanooro coloidal con un peróxido o una persal.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, donde dicho peróxido es peróxido de hidrógeno o ácido peracético, o dicha persal se selecciona del grupo constituido por percarbonatos, perboratos, persilicatos y perfosfatos asociados con un catión.
- 40 14. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicho catión es un metal alcalino.
15. Un método de acuerdo con la reivindicación 13, donde dicho percarbonato es percarbonato de sodio.

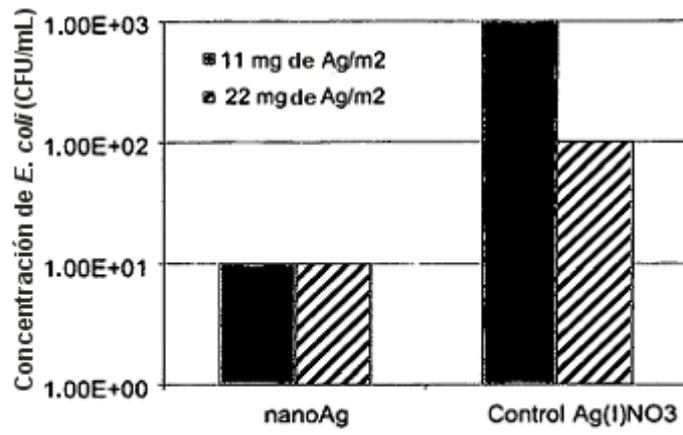
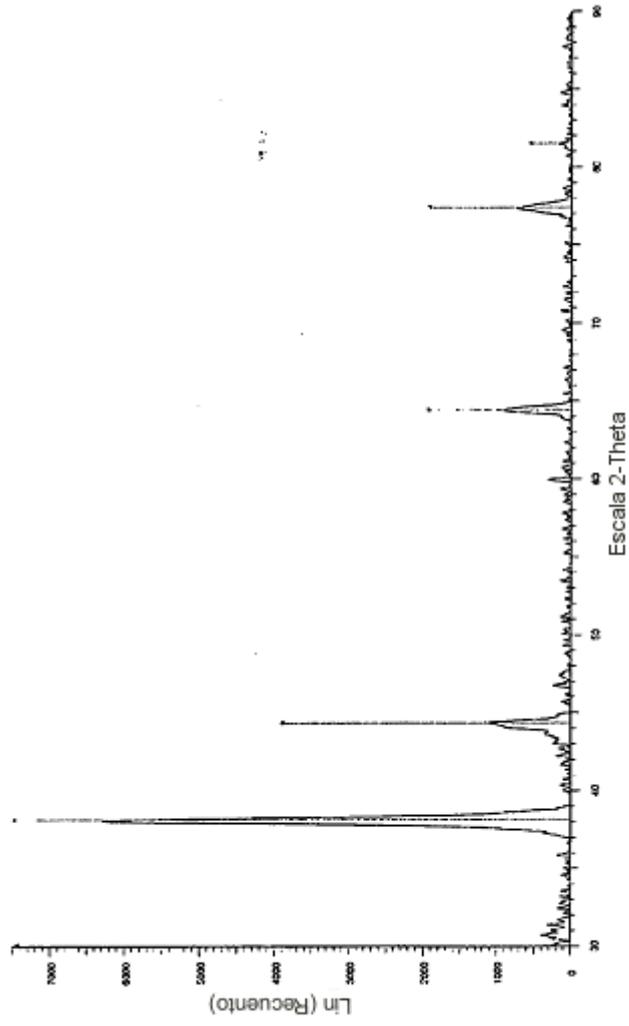


Figura 1



**Figura 2**

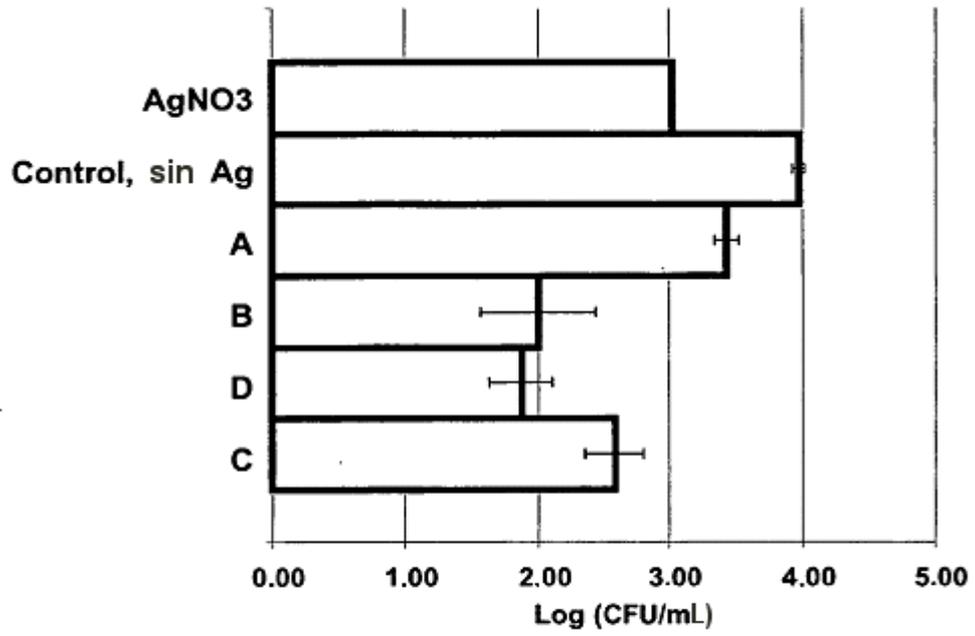


Figura 3

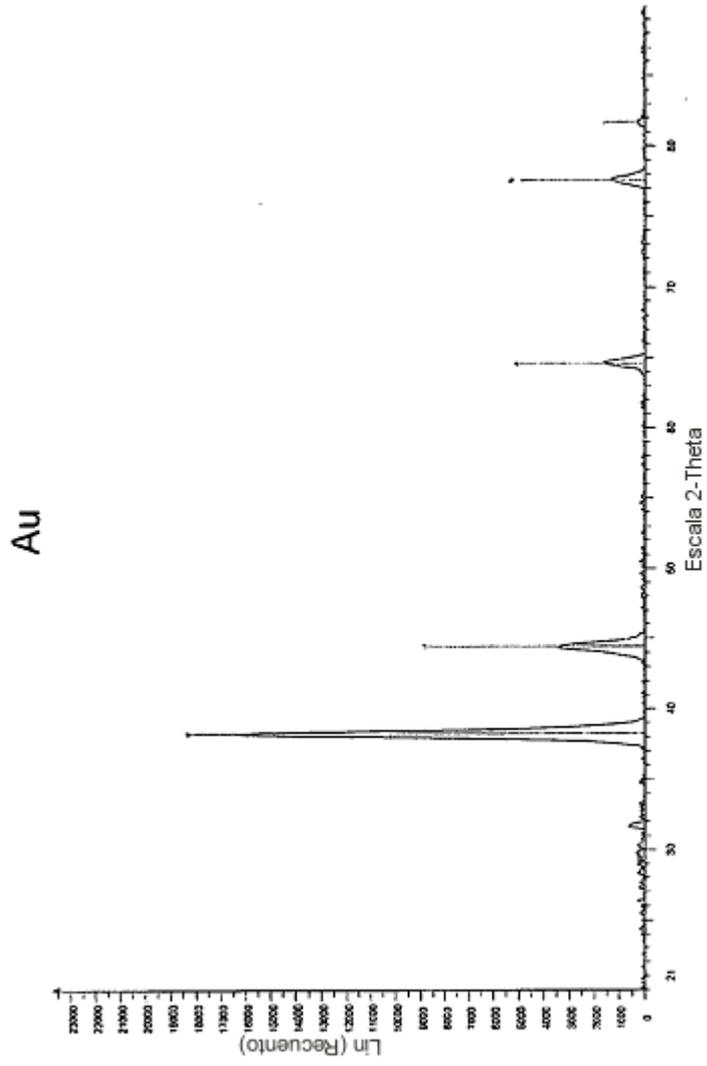


Figura 4