

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 568 698**

21 Número de solicitud: 201431591

51 Int. Cl.:

**C08L 5/08** (2006.01)  
**A61K 35/64** (2015.01)  
**A61K 47/36** (2006.01)  
**A61K 33/38** (2006.01)  
**A01N 59/16** (2006.01)  
**A01N 65/00** (2009.01)  
**B82Y 30/00** (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:  
**30.10.2014**

43 Fecha de publicación de la solicitud:  
**03.05.2016**

71 Solicitantes:  
**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)  
CTT - OTRI Casa del Estudiante  
47001 Valladolid ES**

72 Inventor/es:  
**MARTÍN GIL, Jesús;  
SÁNCHEZ BASCONES, Mercedes;  
HERNÁNDEZ NAVARRO, Salvador;  
PÉREZ LEBEÑA, Eduardo;  
MARTÍN RAMOS, Pablo;  
DE ARAÚJO RUFINO, Cassyo y  
MATEI, Petruta Mihaela**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **Composite con actividad antimicrobiana que comprende dos componentes autoensamblados de origen natural y, opcionalmente, un componente (C) de tamaño nanométrico**

57 Resumen:  
Composite con actividad antimicrobiana que comprende dos componentes autoensamblados de origen natural y, opcionalmente, un componente (C) de tamaño nanométrico.

Un material compuesto formado por un componente (A) oligomérico y un componente (B) con compuestos fenólicos, donde ambos componentes son de origen natural, presentan actividad antimicrobiana y propiedades antiadhesivas frente a los microorganismos, son biocompatibles y no presentan citotoxicidad para las células de los mamíferos. Opcionalmente, el material compuesto puede comprender un componente (C) de tamaño nanométrico. Preferiblemente, material compuesto formado por oligómeros de quitosano propóleo y, opcionalmente, plata de tamaño nanométrico. Método de síntesis de un material compuesto que comprende al menos dos de los componentes (A), (B) y (C) mediante procesos de sonicación. Uso del material compuesto para prevenir, reducir, controlar o eliminar cualquier tipo de microorganismo o agente patógeno.

ES 2 568 698 A1

## DESCRIPCIÓN

### COMPOSITE CON ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA QUE COMPRENDE DOS COMPONENTES AUTOENSAMBLADOS DE ORIGEN NATURAL Y, OPCIONALMENTE, UN COMPONENTE (C) DE TAMAÑO NANOMÉTRICO

#### 5 CAMPO DE LA TÉCNICA

La presente invención pertenece al campo de la Ciencia de Materiales, en concreto se trata de un material compuesto o asociación de un componente (A) oligomérico de origen natural, con otro componente (B) que comprende al menos un compuesto fenólico, preferiblemente ácidos fenólicos (benzoicos y cinámicos) y/o flavonoides (flavonoles, antocianos y taninos).  
 10 Ambos componentes con importantes propiedades antimicrobianas y que, una vez autoensamblados, permiten la incorporación de un componente (C) que es un nanomaterial, preferiblemente de origen inorgánico, de forma que, fruto de la asociación de dos o tres de estos principios activos por sonicación, se incrementan las propiedades sinérgicas al objeto de impedir la formación o adherencia de películas microbianas.

15 En particular, el material compuesto de la presente invención encuentra aplicación en el campo de la lucha contra la contaminación producida por los microorganismos y agentes patógenos. Sus ámbitos de aplicación se inscriben, pues, en los campos de la Salud humana, animal y vegetal, y abarcan desde la protección del entorno hospitalario y sus instalaciones (apósitos para heridas, aplicaciones clínicas), hasta la preservación y  
 20 protección frente al biodeterioro del medio natural y su patrimonio cultural: protección de plantas y/o animales, materiales arqueológicos, monumentos naturales y del medio agrícola, protección de cultivos, protección del medio industrial y protección de productos y alimentos.

Adicionalmente, la presente invención también proporciona nuevos métodos de síntesis de nanopesticidas, nuevos métodos de formación de sustancias adherentes y nanofilms para la  
 25 protección de envases y alimentos, cosechas, madera, patrimonio cultural y en general, de cualquier material que precise ser conservado y preservado de los microorganismos y/o agentes patógenos.

#### ESTADO DE LA TÉCNICA

La nanotecnología es en la actualidad el área que implica mayores inversiones e  
 30 investigación por parte de las empresas, siendo las nanopartículas de plata una de las especies antimicrobianas de mayor interés, ya que su actividad antibacteriana es de muy amplio espectro y es muy superior a la de la plata en bruto. Las principales desventajas que limitan el uso de la nanoplata son su facilidad de agregación y la liberación incontrolada de iones plata y su citotoxicidad potencial [Silva A.R., Unali G. 2011. Controlled silver delivery  
 35 by silver–cellulose nanocomposites prepared by a one-pot green synthesis assisted by microwaves, Nanotechnology 22: 315605].

Se sabe que las paredes bacterianas son capas de peptidoglicanos que constan de azúcares y aminoácidos. Puesto que los iones plata pueden unirse con peptidoglicanos cargados negativamente, pueden enlazar fácilmente con el grupo tiol de los receptores y  
 40 enzimas a lo largo de la membrana de peptidoglicano y llegar a provocar la muerte bacteriana. Curiosamente, las bacterias gram-positivas son menos susceptibles a la nanoplata que las bacterias Gram-negativas [Shrivastava S., Bera T., Roy A., Singh G., Ramachandrarao P., Dash D. 2007. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles, Nanotechnology 18], lo que puede explicarse por el tamaño de las  
 45 paredes celulares, que son más gruesas para las bacterias Gram-positivas que para las bacterias Gram-negativas. Los iones plata se difunden en las células bacterianas y se unen a las bases de ADN para inhibir los procesos de replicación y transcripción y prevenir una

mayor producción bacteriana. La generación de especies reactivas de oxígeno por los nanomateriales o nanometales es un mecanismo bien establecido y que puede explicar como ocurren los procesos de nanotoxicidad. Las partículas de nanoplata con un tamaño más pequeño poseen mayor relación de superficie a volumen, exponen más átomos de plata en su superficie y, por consiguiente, facilitan mejor la liberación de iones plata y presentan mayor actividad antimicrobiana.

No obstante, se ha observado que si las nanopartículas de plata presentan un tamaño muy pequeño (igual o inferior a 10 nm de tamaño), exhiben una mayor capacidad de inducir la apoptosis que las nanopartículas de mayor tamaño (preferiblemente entre 50 y 100 nm). Por lo tanto, aunque las partículas de tamaño muy pequeño de nanoplata pueden ofrecer una fuerte actividad antibacteriana, los posibles efectos citotóxicos sobre las células pueden llegar a limitar sus aplicaciones en recubrimientos antibacterianos. Las partículas de nanoplata pueden presentar diferentes aspectos, tales como nanoesferas, nanobarras, nanoplacas, nanotriángulos, nanocables, etc. y se pueden obtener mediante el uso de diferentes estrategias y condiciones de síntesis [Shape-controlled synthesis of silver nanoparticles: ab initio study of preferential surface coordination with citric acid, Chem. Phys. Lett. 458: 113–116; Sun Y.G., Xia Y.N. 2002. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles, Science 298:2176–2179].

Se ha observado que la actividad antibacteriana más fuerte se presenta para las nanopartículas de plata triangulares truncadas. También se ha observado que cuando las partículas de nanoplata se encuentran cargadas positivamente, presentan una mayor actividad antibacteriana y que, cuando se agregan, disminuye la actividad.

La combinación de polímeros bactericidas y nanoplata mejora sinérgicamente los efectos bactericidas, aunque la actividad bactericida de los polímeros generalmente suele ser más débil que la nanoplata.

Existen muchos métodos para la incorporación de nanoplata en la matriz polimérica. En general, la nanoplata se puede incorporar por vía directa o por síntesis *in situ*. Por vía directa, con el aumento del tiempo de adsorción, el color de recubrimiento cambia de amarillo a negro rojo y marrón, lo que indica que las nanopartículas de plata pueden sufrir agregaciones. El método de síntesis *in situ* presenta ventajas ya que se consigue una distribución uniforme las nanopartículas de plata en el polímero.

Por otro lado, la tecnología y la ciencia actual tiene conocimiento de que la presencia de grupos funcionales en los polímeros hace que éstos se enlacen a las nanopartículas y estas interacciones entre los polímeros y las nanopartículas pueden incrementar notablemente la eficacia y vida media de los agentes antimicrobianos.

Actualmente, los principales polímeros bactericidas utilizados son los polímeros sintéticos basados en compuestos de amonio cuaternario [Muñoz-Bonilla A., Fernández-García M., 2012. Polymeric materials with antimicrobial activity Progress in Polymer Science 37 (2012) 281– 339] y el polímero natural quitosano, que procede de la desacetilación de la quitina y que, además, presenta la ventaja de su biocompatibilidad.

Se han propuesto varios mecanismos posibles para explicar las propiedades antibacterianas del quitosano: se sabe que los grupos amina cargados positivamente son capaces de interactuar con la membrana celular bacteriana cargada negativamente y, asimismo, que el quitosano podría unirse con el ADN produciendo inhibición de la síntesis de ARNm y de las proteínas [Dutta P.K., Tripathi S., Mehrotra G.K., Dutta J. 2009, Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications, Food Chem. 114:1173–1182].

Se ha demostrado que el quitosano polimérico y los oligómeros de quitosano inducen fitoalexinas o compuestos antimicrobianos que ayudan a limitar la dispersión del patógeno [Kendra D.F., Christian D.A., Hadwiger L.A. 1989. Chitosan oligomers from fungal wall chitin actively inhibit fungal growth and enhance disease resistance. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35:215-230]. El quitosano (polímero de glucosamina con enlaces  $\beta$ -1,4) se ha encontrado que tiene propiedades antifúngicas, y el tamaño de sus oligómeros es muy importante para que ejerza su acción [Hadwiger L.A., Ogawa T., Kuyama H. 1994. Chitosan polymer sizes effective in inducing phytoalexin accumulation and fungal suppression are verified with synthesized oligomers. *Mol Plant Microbe Interact.* 7(4):531-3]. Por ejemplo, los heptámeros y oligómeros superiores inducen el incremento de Pisatin, una sustancia antifúngica procedente de *Pisum sativum* L. (Kendra D.F., Hadwiger L.A. 1984. Characterization of the smallest chitosan oligomer that is maximally antifungal to *Fusarium solani* and elicits pisatin formation from *Pisum Sativum*. *Exp Mycol.* 8: 276-281). El quitosano es una sustancia que puede tener un papel importante en las interacciones planta-hongo. La síntesis química de diferentes tamaños de oligómeros de quitosano con actividad biológica determinada puede seguirse en los estudios de [Kuyama H., Nakahara Y., Nukada T., Ito Y., Ogawa, T. 1993. Stereo-controlled syntheses of chitosan dodecamer. *Carbohydr. Res.* 243:C1-C7]. [Prakongkha I., Sompong M., Wongkaew S., Athinuwat D., Buensanteai N. 2013. Changes in salicylic acid in grapevine treated with chitosan and BTH against *Sphaceloma ampelinum*, the causal agent of grapevine anthracnose. *African Journal of Microbiology Research Vol.* 7(7):557] proponen la utilización del quitosano en viñedos y [Aziz A., Trotel-Aziz P., Dhucq L., Jeandet P., Couderchet M., Vernet G. 2006. Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology.* (11):1188-94. doi: 10.1094/PHYTO-96-1188] la obtención de oligómeros octaméricos de quitosano dopados con sulfato de cobre al objeto de inducir reacciones de defensa de la vid y resistencia al moho gris y al mildiú.

La medicina tradicional tiene conocimiento de miles de sustancias con actividad bactericida tal como, por ejemplo, el propóleo [Nedji N., Loucif-Ayad W. 2014. Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4 (6): 433-437].

El propóleo es un producto natural producido por las abejas a partir de resina de brotes de los árboles y savia. Las abejas llevan la resina a la colmena y la mezclan con sus propias secreciones, tales como cera y saliva. El propóleo contiene numerosas especies químicas: derivados del ácido cinámico, ácido benzoico, ácidos fenólicos sustituidos, flavonoides, aminoácidos, etc. Su fuerte actividad antimicrobiana puede deberse al elevado contenido en fenoles totales y en flavonoides [Nedji N., Loucif-Ayad W. 2014. Antimicrobial activity of Algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 4 (6): 433-437]. El propóleo también ha encontrado aplicación como antioxidante y en preservación de alimentos [Dota K.F.D., Consolaro M.E.L., Svidzinski T.I.E., Bruschi M.L.. Antifungal activity of Brazilian propolis microparticles against yeasts isolated from vulvovaginal candidiasis. *Evid Based Complementary Altern Med* 2011; doi: 10.1093/ecam/nej029; Kalogeropoulos N., Konteles S.J., Troullidou E., Mourtzinou I., Karathanos V.T. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. *Food Chem* 116: 452-461].

## **DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION**

### **Breve descripción de la invención**

Tal como se ha mencionado anteriormente, existen estudios dedicados a estudiar la actividad antimicrobiana de películas y recubrimientos en base a oligómeros como el

5 quitosano frente a distintos patógenos, así como también en base a nanopartículas de plata. Sin embargo, hasta el momento falta una estandarización de los procedimientos y de los métodos de síntesis para evitar los problemas derivados de los ensayos utilizados y de las inconsistencias debidas a la aplicación de procedimientos que no se encuentran bien contrastados. La presente invención proporciona un nuevo método de síntesis donde la asociación de los diferentes componentes del composite, en particular cuando éste es una biopelícula, tiene lugar por sonicación.

10 Adicionalmente, la presente invención proporciona un material compuesto o "composite" formado por la asociación de dos o tres componentes. En particular, el material compuesto de la invención comprende un componente (A) oligomérico y un componente (B) que a su vez comprende uno o varios compuestos fenólicos, donde ambos componentes son de origen natural, presentan actividad antimicrobiana y propiedades antiadhesivas frente a los microorganismos, son biocompatibles y no presentan citotoxicidad para las células de los mamíferos.

15 La asociación de estos componentes, en particular la combinación de quitosano y propóleo, permite mejorar la actividad antimicrobiana respecto a la aplicación de los principios activos por separado. Así, los compuestos fenólicos, preferiblemente ácidos fenólicos y/o flavonoides, comprendidos en el componente (B) interactúan con los grupos funcionales del oligómero, preferiblemente oligosacárido, dando como resultado una actividad antimicrobiana superior. A la vez que proporciona un composite con mayor estabilidad y una vida media como agente antimicrobiano superior respecto a los componentes por separado.

20 La incorporación de un componente (B) que comprende compuestos fenólicos tales como ácidos fenólicos y/o flavonoides proporciona adicionalmente al composite propiedades antioxidantes y compuestos solubles, que pueden interactuar y formar quelatos con especies inorgánicas en disolución acuosa, en particular con un componente (C) que se puede adicionar al composite en realizaciones preferidas de la invención. Estas especies inorgánicas pueden incorporarse como nanoelementos en muy pequeñas proporciones, mejorando aún más el poder como antibacteriano o antifúngico del material compuesto de la invención, sin suponer esta incorporación ningún peligro para la planta o el sustrato donde se aplique el material compuesto.

25 Preferiblemente, el componente (B) comprende ácidos fenólicos. Estos pueden formar puentes entre distintos polisacáridos en la pared celular.

30 Los datos que se aportan muestran que la actividad antimicrobiana se ve reforzada si se integran ácidos fenólicos en la fibra de los oligómeros, al objeto de obtener una fibra soluble en agua y de muy bajo peso molecular, preferiblemente máximo 6000 g/mol. En realizaciones preferidas de la invención, el oligómero es un oligosacárido y, más preferiblemente, un quitooligosacárido.

35 En realizaciones preferidas, el material compuesto de la invención puede comprender un componente (C) de tamaño nanométrico, preferiblemente plata. En esta solicitud de patente también se hará referencia a este componente (C) como nanomaterial.

40 La asociación de los tres componentes descritos permite mejorar aún más el comportamiento de estos principios activos respecto a su aplicación por separado. Los diferentes grupos funcionales favorecen la integración de los diferentes componentes en el composite, favoreciendo su estabilidad y vida útil. Adicionalmente, estos composites presentan una actividad antimicrobiana significativamente mejorada respecto a la combinación de los componentes por separado. En concreto y según estimaciones indirectas obtenidas del estudio comparativo de los halos de inhibición (ver ejemplos), la

5 actividad microbiana de las mezclas ternarias que comprenden oligómeros de quitosano/propóleo/nanoplatina llegó, en algunos casos, a quintuplicar la del quitosano (caso 3). También se demostró que la aplicación de la mezcla ternaria presentó un porcentaje de inhibición del 100%, llegando a incrementarse en un 37% la efectividad cuando se incrementó la concentración de plata (caso 1).

10 Otro problema que resuelve esta solicitud de patente es mejorar la solubilidad de polímeros, en particular del quitosano o de otros polisacáridos tal como el almidón, para incrementar así su rango de aplicaciones. Para ello se precisa despolimerizar el polímero en cuestión y convertirlo en oligómeros de bajo peso molecular, preferiblemente máx 6000 g/mol. De este modo los productos obtenidos son más solubles en agua y tienen más actividad antimicrobiana. Ello se ha conseguido en todos los casos utilizando la técnica de sonicación de las soluciones, de forma directa.

### Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a un material compuesto, también llamado *composite*, que comprende un componente (A) oligomérico y un componente (B) que a su vez comprende uno o varios compuestos fenólicos, donde ambos componentes son de origen natural, presentan actividad antimicrobiana y propiedades antiadhesivas frente a los microorganismos, son biocompatibles y no presentan citotoxicidad para las células de los mamíferos.

20 Una vez autoensamblados, el composite obtenido permite la incorporación de un nanomaterial de forma que, fruto de la asociación de los tres principios activos, preferiblemente por sonicación, se incrementan las propiedades sinérgicas al objeto de impedir la formación o adherencia de películas microbianas.

25 En realizaciones preferidas de la presente invención, el componente (A) es un oligosacárido obtenido a partir de un polisacárido de origen natural tal como quitosano, alginato o almidón. Preferiblemente, el oligosacárido procede de quitosano, polisacárido de origen natural que mayoritariamente procede de la quitina de los caparazones de los crustáceos.

30 En otras realizaciones preferidas, el componente (A) es un oligómero con un peso molecular máximo de 6000 g/mol. Aún más preferiblemente, máximo 2000 g/mol. De esta forma se obtiene un composite con mayor solubilidad en agua.

En realizaciones aún más preferidas, el componente (A) del composite de la invención es un oligómero de quitosano de peso molecular máximo 6000 g/mol y, más preferiblemente, máximo 2000 g/mol.

35 En otras realizaciones preferidas, el componente (B) del material compuesto de la presente invención comprende compuestos fenólicos seleccionados del grupo que consiste en polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos y cualquier combinación de éstos. Como ácidos fenólicos puede comprender ácidos benzoicos o cinámicos; mientras que flavonoides adecuadas pueden ser flavonoles, antocianos o taninos.

40 Preferentemente, el componente (B) comprende entre un 5 y un 15% en peso de polifenoles y flavonoides.

45 En realizaciones aún más preferidas, el componente (B) se selecciona del grupo que consiste en propóleo, aloe vera y una combinación de los anteriores. Preferentemente, como componente (B) se propone utilizar propóleo, ya que presenta propiedades anti-adhesivas, anti-bacterianas, anti-inflamatorias y anti-tumorales. Adicionalmente el material resultante es biocompatible y no es nocivo.

Se prefiere especialmente que el componente (B) sea un extracto de propóleo con una concentración 10 % en peso de polifenoles y flavonoides, propóleos procedentes preferentemente de Burgos, Cuenca del Duero, España. En particular, el extracto de propóleo obtenido tal como se describe en el apartado de los ejemplos de esta solicitud.  
5 Así, el composite de la invención se puede obtener mezclando el extracto descrito en esta solicitud con la solución de quitosano en la relación 1:1, o 1 mg/L de propóleo con un 1mg/L de quitosano

Tal como se ha mencionado anteriormente, el material compuesto de la invención también puede comprender aloe vera como componente (B), producto que comprende generalmente un contenido de 1% en peso en polifenoles y flavonoides. En este caso, el composite de la invención comprende preferiblemente una relación aloe vera/quitosano de 10:1, o 10 mg/L de aloe vera con 1 mg/L de quitosano.  
10

También se pueden utilizar extractos puros de polifenoles o flavonoides disponibles en el mercado y mezclarlos directamente con el componente (A) oligomérico, en particular oligómeros de quitosano, preferentemente en la proporción 10% en p/v de polifenol o flavonoide y un 90% en p/v del oligómero. Por ejemplo se puede adquirir el producto puro o componente activo aislado del propolis o fenetil ester del ácido cafeico (CAPE), aunque también pueden utilizarse otros principios activos derivados de ácidos fenólicos, polifenoles o de flavonoides y utilizarse mezclando en las proporciones recomendadas más arriba con el oligómero, preferiblemente quitosano. No obstante y de modo preferente se recomienda en la presente invención que se opere con los productos naturales, ante todo por el ahorro de coste que ello representa.  
15  
20

En realizaciones especialmente preferidas de la presente invención, el material compuesto o composite comprende un componente (A) formado por oligómeros de quitosano con peso molecular máximo 6000 g/ml, y propóleo como componente (B), preferiblemente extracto de propóleo con un contenido de polifenoles y flavonoides entre un 5 y un 15% en peso. Este material compuesto presenta una actividad antifúngica superior a sus componentes por separado. Adicionalmente, es soluble en agua, y también puede fabricarse como recubrimiento o película y así ofrecer una mayor protección.  
25

En otras realizaciones preferidas adicionales, el material compuesto que se describe en esta solicitud de patente comprende un componente (C) de tamaño nanométrico, es decir, tamaño de partícula comprendido entre 1 a 150 nm. Preferentemente, entre 40 y 150 nm, ya que por debajo de 40 nm el elemento o especie química presenta una muy elevada actividad y puede ser tóxica para la célula. Este componente (C), ya sea elemento o especie química, puede ser de origen inorgánico tal como óxido, metal o fluoruro, pero también puede ser de origen orgánico, por ejemplo, un nanopesticida sintético.  
30  
35

En realizaciones aún más preferidas, el componente (C) de tamaño nanométrico es inorgánico. Preferentemente, éste se selecciona del grupo que consiste en plata, cobre, arsénico, óxido de titanio, sílice y material grafénico.

En realizaciones especialmente preferidas, el material compuesto o *composite* de la presente invención comprende un componente (A) formado por oligómeros de quitosano con peso molecular máximo 6000 g/ml, un componente (B) que es propóleo, preferiblemente extracto de propóleo con un contenido de polifenoles y flavonoides entre un 5 y un 15% en peso, y plata de tamaño nanométrico, preferiblemente con un tamaño de partícula entre 40 y 150 nm, como componente (C). Este material compuesto presenta una mayor actividad antifúngica o antimicrobiana debido a la incorporación o integración del nanomaterial, y tiene además un mayor poder bactericida que los componentes por separado o asociados de dos  
40  
45

en dos. Adicionalmente la actividad bactericida se ve incrementada también si el composite se fabrica como una biopelícula o recubrimiento sobre la zona o sustrato a proteger.

5 En otras realizaciones preferidas de la invención, el material compuesto que se describe en esta solicitud de patente, en particular cuando el material ésta formado por quitosano/propóleo o quitosano/propóleo/nanoplata, es un recubrimiento o película. Este recubrimiento puede obtenerse por entrecruzamiento del componente (A) oligomérico con un agente de entrecruzamiento tal como, por ejemplo, glicerina ( $C_3H_8O_3$ ) al 2-2.5 % p/v o bien de glioxal al 4% v/v.

10 En la presente solicitud de patente se describe la obtención de nanocompuestos de quitosano/propóleo y sus interacciones con nanoplata para mejorar su bio-compatibilidad y su actividad antimicrobiana. Los nuevos preparados *in situ* de materiales poliméricos de quitosano/propóleo son capaces de inhibir la agregación de las partículas de nanoplata, la liberación incontrolada de iones plata y reducen su citotoxicidad.

15 El aumento de las enfermedades fúngicas de los cultivos de las vides y del arroz está siendo objeto de estudio en la E.T.S. de Ingenierías Agrarias de la Universidad de Valladolid. También está siendo objeto de estudio la obtención de nuevos preparados o nanopesticidas para combatir los hongos de la yesca o la enfermedad de Petri en las vides y los hongos *Bipolaris oryzae* que causan la enfermedad de la mancha marrón del arroz. Tal como se demuestra más adelante, el material compuesto, también llamado composite, de la presente  
20 invención es capaz de combatir estos hongos.

La presente solicitud de patente también ofrece el método de síntesis de los materiales compuestos con propiedades antimicrobianas o antifúngicas, y antiadhesivas frente a microorganismos de la presente invención. Así mismo, también se refiere a la utilización de éstos como alternativa a los preparados o productos fungicidas comerciales disponibles en  
25 el mercado y que se encuentran prohibidos o en periodo de moratoria en el Anexo 1, de la Directiva 91/414/CEE.

Tal como se adelantaba en el párrafo anterior, la presente invención también se refiere a un método de síntesis de un material compuesto que comprende al menos dos de los componentes (A), (B) y (C) tal como se describen en esta solicitud de patente, donde el  
30 método comprende mezclar, en solución y agitación mediante sonicación, cantidades equimoleculares adecuadas de los diferentes materiales. En particular, un método de síntesis de los composites que comprenden mezclas binarias o terciarias de oligómeros de quitosano, propóleo y/o nanoplata.

35 En realizaciones preferidas, el método de síntesis que se describe permite obtener el material compuesto de la invención que comprende quitosano/nanoplata, quitosano/propóleo ó quitosano/propóleo/nanoplata, donde tanto la obtención del oligómero de quitosano, como las diferentes mezclas de los componentes se realiza mediante sonicación. En particular, para obtener el composite formado por  
40 quitosano/propóleo/nanoplata, se utilizan cantidades equimoleculares de los tres componentes, es decir, la proporción de quitosano/propóleo/nanoplata es de 1:1:1.

En la presente solicitud de patente debe entenderse que las referencias a "quitosano" en las mezclas binarias o terciarias descritas (ej: quitosano/propóleo, quitosano/propóleo/nanoplata) hacen referencia en todo momento a "oligómero de quitosano", componente (A) del material compuesto de la invención.

45 En realizaciones preferidas, cuando el material compuesto comprende los componentes (A) y (B) tal como se describen en esta solicitud de patente, el método de síntesis de la presente invención comprende:

a) obtener una solución de un componente (A) formado por oligómeros de peso molecular máximo 6000 g/mol, preferentemente entre 2000 g/mol y 6000 g/mol;

b) obtener un componente (B) que comprende uno o varios compuestos fenólicos, preferiblemente flavonoides o polifenoles; y

5 c) mezclar la solución de oligómeros de la etapa a) con los compuestos fenólicos de la etapa b) y sonicar durante al menos un minuto.

En el método que se describe en esta solicitud de patente, la obtención del componente (A) oligomérico y del componente (B) que comprende uno o varios compuestos fenólicos se realiza de forma independiente. Por ello, las etapas a) y b) pueden realizarse en cualquier  
10 orden o simultáneamente.

En realizaciones aún más preferidas, cuando el material compuesto de la invención comprende un oligómero de quitosano y propóleo, el método de síntesis de la presente invención comprende:

15 a) obtener una solución de un componente (A) formado por oligómeros de peso molecular máximo 6000 g/mol, preferentemente entre 2000 g/mol y 6000 g/mol;

b) obtener un extracto fenólico de propóleo, preferiblemente con un contenido entre 5 y 15 % de flavonoides y polifenoles; y

c) mezclar la solución de oligómeros de la etapa a) con el extracto fenólico de la etapa b) y sonicar durante al menos un minuto.

20 Los oligómeros de quitosano se pueden producir por degradación oxidativa del quitosano comercial. Para ello se pueden utilizar, por ejemplo, métodos de radiación de microondas [Sun T., Zhou D., Xie J., Mao F. 2007. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity. Eu. Food. Res. Technol. 225:451-456].

25 Sin embargo, en el método de la presente invención, con objeto de disminuir los tiempos de degradación, los oligómeros se producen por sonicación. En particular, los oligómeros de quitosano se pueden obtener por hidrólisis ácida a partir de una disolución de quitosano en presencia de un agente oxidante limpio y asequible tal como, por ejemplo, peróxido de hidrógeno. La hidrólisis se lleva a cabo con agitación con un equipo de ultrasonidos que opera a frecuencia de 20 kHz. La sonicación se puede realizar durante 3-6 periodos de 5  
30 minutos cada uno, dependiendo de la calidad del quitosano de partida, no dejando que la solución se caliente por encima de 60°C. A medida que se incrementan los periodos de sonicación de 3 a 6, las temperaturas de 30 a 60°C y las concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 0.3 a 0.6 M, se consigue reducir el PM de los oligómeros de 6000 a 2000 g/mol, siendo óptimo la obtención de oligómeros de 2000 g/mol.

35 Después de calentar o sonicar durante 30 minutos se retira, por ejemplo, por centrifugación o decantación, cualquier material insoluble en agua. Posteriormente se ajusta el pH a 8-9, por ejemplo, utilizando una solución de metóxido de potasio al 25% en metanol. Seguidamente, el material se puede aislar de la solución y secar, preferiblemente a vacío a 20°C. La calidad de los oligómeros obtenidos puede determinarse por espectrometría  
40 infrarroja por transformada de Fourier (FTIR). De esta forma se pueden obtener oligómeros con un peso molecular entre 2000-6000 g/mol. Tamaño que puede reducirse en el proceso de sonicación de las etapas posteriores del método de síntesis, alcanzando preferiblemente un tamaño máximo de 2000 g/mol en el composite de la invención.

45 Soluciones acuosas de oligómeros de quitosano, preferiblemente de concentración 0.005-0.01 M o soluciones del 1.25-2.5% p/v, pueden prepararse a partir de una disolución de

5 oligómeros de quitosano de PM 6000-2000 g/mol en AcOH al 0.5 % y pH 4-6. La mezcla de quitosano/ácido acético/agua se sonica durante al menos un minuto y se deja agitando durante al menos 12 horas, al objeto que la solución se estabilice y se obtenga una solución transparente de quitosano. Las soluciones se mantienen estables en atmósfera inerte y en frío a 4-10°C, a pH entre 4-6.

10 En realizaciones preferidas de la presente invención, el propóleo se utiliza como extracto etanólico de propóleo. Este extracto se puede obtener triturando el propóleo de partida hasta polvo fino y posterior extracción, por ejemplo, utilizando una solución hidroalcohólica 7:3. Otras etapas del procedimiento de extracción pueden ser maceración dinámica, percolación, filtración y concentración de la solución resultante.

En el método que se describe en esta solicitud de patente, la obtención de los oligómeros de quitosano y el extracto etanólico de propóleo se realiza de forma independiente. Por ello, estas etapas pueden hacerse en cualquier orden o simultáneamente.

15 Una vez obtenida la solución de oligómeros de quitosano de la etapa a) y el extracto etanólico de propóleo de la etapa c), la mezcla de ambas soluciones tiene lugar preferiblemente adicionando el extracto alcohólico de propóleo sobre una solución de quitosano en agua.

20 Tal como se ha mencionado anteriormente, el composite de la presente invención puede ser un recubrimiento o película que puede utilizarse para tratar, por ejemplo, cultivos, semillas, madera, piedra, etc. En estas realizaciones preferidas, en primer lugar se obtiene un material adhesivo o película del oligómero, preferentemente oligómero de quitosano, al que posteriormente se le incorporan el resto de componentes del composite.

25 Cuando el material compuesto que se describe en esta solicitud de patente se encuentra en forma de recubrimiento o película, el método de síntesis de la invención comprende entrecruzar *in situ* los oligómeros en presencia de un agente de entrecruzamiento, preferentemente glicerina o glioxal, antes de su mezcla con el componente (B) que comprende compuestos fenólicos, o con el componente (C) de tamaño nanométrico.

30 En realizaciones aún más preferidas, esta etapa de entrecruzamiento tiene lugar en presencia de un surfactante, en particular Tween 20, para mejorar las propiedades de adhesión de las soluciones del oligómero.

35 En realizaciones preferidas, para producir un recubrimiento o película del composite que comprende quitosano/nanoplatea, quitosano/propóleo o quitosano/propóleo/nanoplatea, se pueden utilizar las soluciones de oligómeros de quitosano obtenidas tal como se ha descrito anteriormente, preferiblemente con una concentración 1.25-2.5% p/v y pH 4-6. Estas soluciones se pueden tratar con una solución de glicerina (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) al 2-2.5 % p/v o bien de glioxal al 4% v/v. Adicionalmente, se puede adicionar Tween 20, preferiblemente al 0.05-0.1% (v/v), a fin de mejorar las propiedades de adhesión de las soluciones de quitosano.

40 Cuando se utiliza glioxal, el proceso de entrecruzamiento es inmediato (menos de 1 hora), mientras que cuando se utiliza glicerina son varias horas (o incluso días) lo que tarda en producirse. El entrecruzamiento puede depender de múltiples factores, como temperatura, pH, tiempo de sonicación y/o agitación y concentración de las soluciones. En el método de síntesis de la presente invención se utilizan procesos de sonicación como activadores del proceso de entrecruzamiento, de esta forma la activación tiene lugar en un periodo máximo de 1 minuto, disminuyendo así los tiempos de formación de las películas o recubrimientos.

45 Una vez incorporados el resto de materiales al composite, éste se puede aplicar dejando reposar sobre la superficie a tratar entre 1 minuto y 1 hora en atmósfera seca, para obtener espesores óptimos de 0.3 a 0.6 mm.

En otras realizaciones preferidas, cuando el material compuesto comprende los componentes (A), (B) y (C) tal como se describen en esta solicitud de patente, el método de síntesis comprende:

- 5 a) obtener una solución de un componente (A) formado por oligómeros de peso molecular máximo 6000 g/mol, preferiblemente entre 2000 g/mol y 6000 g/mol;
- b) obtener un componente (B) que comprende uno o varios compuestos fenólicos;
- c) mezclar la solución de oligómeros de la etapa a) con los compuestos fenólicos de la etapa b) y sonicar durante al menos un minuto;
- d) obtener una solución estabilizada de un componente (C) de tamaño nanométrico; y
- 10 e) mezclar la solución del material bicompuesto obtenido en la etapa c) con la solución del componente (C) de tamaño nanométrico de la etapa d) y sonicar durante al menos un minuto.

En realizaciones aún más preferidas, cuando el material compuesto de la invención comprende oligómeros de quitosano, propóleo y plata de tamaño nanométrico, el método de síntesis de la presente invención comprende:

- 15 a) obtener una solución que comprende oligómeros de quitosano de peso molecular máximo 6000 g/mol, preferentemente entre 2000 g/mol y 6000 g/mol;
- b) obtener un extracto fenólico de propóleo, preferiblemente con un contenido entre 5 y 15 % de flavonoides y polifenoles;
- 20 c) mezclar la solución de oligómeros de la etapa a) con el extracto fenólico de la etapa b) y sonicar durante al menos un minuto;
- d) preparar una solución estabilizada de plata de tamaño nanométrico, preferiblemente entre 40 y 150 nm; y
- 25 e) mezclar la solución de quitosano y propóleo obtenido en la etapa c) con la solución de plata de tamaño nanométrico de la etapa d) y sonicar durante al menos un minuto.

Para obtener el material compuesto que comprende los componentes (A), (B) y (C), en particular quitosano, propóleo y plata de tamaño nanométrico, los tres componentes se preparan de forma separada. A continuación, se obtiene el material compuesto que comprende oligómeros y compuestos fenólicos tal como se ha descrito anteriormente. Y, posteriormente se incorpora el componente (C).

La etapa d) comprende la preparación de una solución estabilizada de plata de tamaño nanométrico, preferiblemente 40 y 150 nm. De acuerdo con el método de síntesis de la presente invención, la estabilización de nanoplata se realiza exclusivamente mediante sonicación. Sin embargo, existen otros métodos que permiten obtener nanopartículas de plata estabilizando las soluciones con una lámpara UV de 30 W durante 3 horas [Montazer, M. Shamei, A., Alimohammadi F. 2012. Synthesizing and stabilizing silver nanoparticles on polyamide fabric using silver-ammonia/PVP/UVC. Progress in Organic Coatings, 75 (4), 379-385].

La preparación de nanoplata en la presente invención se puede llevar a cabo preparando en primer lugar una solución acuosa de  $\text{AgNO}_3$  y un agente reductor como citrato de sodio o ácido ascórbico. Posteriormente, la solución anterior se enfría y agitar a una temperatura entre 5 y 10°C. A continuación, se desoxigena con un gas inerte, preferentemente  $\text{N}_2$  abundante durante al menos 30 minutos. La etapa más delicada es la adición de una

solución de  $\text{NaBH}_4$  (también se puede utilizar hidrazina). Esta adición ha realizarse en medio inerte, preferiblemente en atmósfera de  $\text{N}_2$ , a la temperatura entre 5-10°C, a una velocidad de adición muy baja, preferiblemente con micropipeta, y agitando fuertemente la solución. La primera microgota hace virar la solución de incolora a amarilla y el aumento de  $\text{NaBH}_4$ , o de sucesivas gotas, produce una intensificación del color amarillo hacia marrón, que puede llegar a revertir a amarillo claro por la adición de microgotas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 10%. El color amarillo de la solución de plata se puede estabilizar con polivinilpirrolidona (PVP) para evitar que se agreguen las nanopartículas de plata o de cualquier otra especie química presente, y la aplicación de ultrasonidos durante 3-5 minutos con un equipo de ultrasonidos de 20 kHz. Por último se ajusta el pH entre 7-8, por ejemplo adicionando metóxido de potasio en metanol al 25%. La solución se debe dejar estabilizándose durante 24 horas en un refrigerador entre 5 y 10°C.

Conforme al procedimiento descrito se pueden obtener soluciones de nanoplatina con un tamaño de las nanopartículas 40 y 150 nm, y un contenido de plata en solución entre 100 ppm y 200 ppm. Estas soluciones se pueden caracterizar mediante su absorción en un espectrofotómetro de UV-Vis a 420 nm. Las soluciones se mantienen estables en atmósfera inerte y en frío a 4-10°C.

Adicionalmente, el método de la presente invención también permite obtener materiales compuestos que comprendan los componentes (A) y (C) tal como se describen en esta solicitud de patente. Este método comprende:

- a) obtener una solución de un componente (A) formado por oligómeros de peso molecular máximo 6000 g/mol, preferentemente entre 2000 g/mol y 6000 g/mol;
- d) obtener una solución estabilizada de un componente (C) de tamaño nanométrico, preferentemente de tamaño entre 40 y 150 nm; y
- e) mezclar la solución de oligómeros de la etapa a) con la solución del componente (C) de tamaño nanométrico de la etapa d) y sonicar durante al menos un minuto.

En realizaciones preferidas, el método de la presente invención permite obtener un material compuesto formado por oligómeros de quitosano y plata de tamaño nanométrico, donde el método comprende:

- a) obtener una solución de oligómeros de quitosano de peso molecular máximo 6000 g/mol, preferentemente entre 2000 g/mol y 6000 g/mol;
- d) obtener una solución estabilizada de un plata tamaño nanométrico, preferentemente de tamaño entre 40 y 150 nm; y
- e) mezclar la solución de oligómeros de quitosano de la etapa a) con la solución de plata de tamaño nanométrico de la etapa d) y sonicar durante al menos un minuto.

En realizaciones preferidas, los componentes (A) y (C) del composite se pueden definir tal como se ha descrito anteriormente en esta solicitud de patente. Así mismo, las condiciones preferidas de las etapas a), d) y e) son iguales a las descritas anteriormente para las otras variantes del método de la invención.

En realizaciones preferidas de la presente invención, una vez obtenida las soluciones por separado se pueden preparar las mezclas binarias en la relación 1:1 o ternarias en la relación 1:1:1. Estas se pueden mezclar adicionando siempre la solución que contiene la nanoplatina sobre la solución que contiene propóleo-quitosano, o el quitosano en el caso de obtener el composite quitosano-nanoplatina. Las muestras utilizadas para llevar a cabo los ensayos de actividad se prepararon en el intervalo 50 ug/ml a 900 ug/ml. Por ejemplo se

recomienda que si se parte de una solución que contiene 50 mg/L de quitosano, se mezcla en solución acuosa con 50 mg/L de propóleo y con 50 mg/L de la solución de nanoplata. Se recomienda que se trabaje para cualquier mezcla en las proporciones 1:1:1 y se deposite componente (A) o el propóleo sobre el quitosano y por último la plata sobre el propóleo-quitosano.

5

La formación de películas o adhesivos del material compuesto que comprende quitosano, propóleo y/o plata de tamaño nanométrico también se puede acelerar utilizando glioxal, que produce el *cross-linking* de las cadenas de quitosano. Para facilitar el auto-ensamblaje se puede adicionar agentes surfactantes como el Tween 20. Primero se preparan las soluciones de recubrimiento o películas de oligómeros de quitosano tal como se ha descrito anteriormente, preferiblemente haciendo uso de agentes de entrecruzamiento como glioxal. A continuación se adicionan las soluciones de propóleo y nanoplata, se sónica la solución resultante durante al menos 1 minuto y se dejar reposar sobre la superficie a tratar en atmósfera seca, para obtener espesores óptimos de 0.3 a 0.6 mm.

10

En realizaciones preferidas, el método de síntesis que se describe en esta solicitud de patente permite obtener:

15

- Composites que comprenden quitosano/propóleo ó quitosano/propóleo/plata, donde en la relación quitosano-propóleo es 1:1 y las concentraciones de plata entre 10 y 20 ppm;

20

- Recubrimientos o películas de composites que comprenden quitosano/propóleo ó quitosano/propóleo/plata, donde en quitosano se ha entrecruzado con glioxal como agente de entrecruzamiento, la relación quitosano-propóleo es 1:1 y las concentraciones de plata entre 10 y 20 ppm;

25

- Composites que comprenden quitosano/propóleo ó quitosano/propóleo/plata, donde la solución de oligómeros de quitosano de la etapa a) tiene una concentración entre 1.25-2.5% p/v y pH 4-6; y el entrecruzamiento tiene lugar en presencia de glicerina (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O<sub>3</sub>) al 2-2.5 % (p/v) o glioxal al 4% v/v, y Tween 20 al 0.05-0.1% (v/v).

30

Adicionalmente, la presente invención se refiere al material compuesto obtenido por cualquiera de las variantes del método de síntesis que se describe en esta solicitud de patente, así como al uso del compuesto así obtenido tal como se indica en los párrafos siguientes.

Por otro lado, la presente invención también se refiere al uso del material compuesto que se describe en esta solicitud de patente para prevenir, reducir, controlar o eliminar cualquier tipo de microorganismo o agente patógeno. En particular, en los sectores de la Salud humana, animal o vegetal.

35

Dentro del entorno hospitalario y de la salud humana y animal, el composite que se describe en esta solicitud de patente, en particular cuando está formado por quitosano/propóleo ó quitosano/propóleo/nanoplata, se puede utilizar en apósitos para heridas, aplicaciones clínicas, obtención de salas limpias, descontaminación de superficies y de instalaciones hospitalarias en general.

40

Adicionalmente, dentro de la preservación y protección frente al biodeterioro del medio natural y su patrimonio cultural, el composite que se describe en esta solicitud de patente, en particular cuando está formado por quitosano/propóleo ó quitosano/propóleo/nanoplata se puede utilizar en apósitos para restauración de pinturas, piedra, maderas, lienzos, papel y todo tipo de superficie con interés histórico –artístico o arqueológico que deba preservarse de la contaminación.

45

5 Dentro de la preservación y protección de plantas y/o cultivos, el composite que se describe en esta solicitud de patente, en particular cuando está formado por quitosano/propóleo ó quitosano/propóleo/nanoplata se puede utilizar como pesticida, en apósitos y recubrimientos para la protección y conservación del medio agrícola y forestal en su conjunto, protección de cultivos y de especies forestales.

10 Dentro de la protección del medio industrial, el composite que se describe en esta solicitud de patente, en particular cuando está formado por quitosano/propóleo ó quitosano/propóleo/nanoplata, se puede utilizar en la protección y preservación de productos, alimentos e instalaciones industriales, preferiblemente cuando el composite forma recubrimiento o película.

15 En otras realizaciones preferidas, el composite que se describe en esta solicitud de patente, se puede aplicar en el entorno agro-forestal, como nuevos agentes nanopesticidas para la protección antimicrobiana de superficies de plantas y de cultivos, semillas, madera, celulosa, alimentos e instalaciones agroforestales tal como silos, industrias alimentarias y sus instalaciones, industrias de la madera y de la celulosa y sus instalaciones, etc. En Agricultura el material compuesto de la presente invención se puede aplicar como factores de nodulación, agentes osmoprotectores y antioxidantes que beneficien el crecimiento de las cosechas.

20 En realizaciones especialmente preferidas, la presente invención se refiere al uso del composite que se describe en esta solicitud de patente, en particular cuando está formado por quitosano/propóleo ó quitosano/propóleo/nanoplata, como agente fungicida y/o bactericida frente a:

- Hongos de la yesca en vides o *Diplodia seriata*;
- Hongo de la enfermedad roja del arroz, *Bipolaris orizae*;
- 25 • Bacterias y hongos de interés clínico. Preferiblemetne, bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*; u hongos seleccionados del grupo que consiste en *Candida albicans* y *Candida glabrata*.

30 Adicionalmente, la presente invención también se refiere al uso de un composite que comprende los componentes (A) y (C) tal como se describen en esta solicitud de patente, preferiblemente oligómeros de quitosano y plata nanométrica tal como se describen en esta solicitud de patente en Agricultura para favorecer el crecimiento de las semillas.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

35 **Figura 1 (A)** Diagrama de barras del porcentaje de inhibición del crecimiento del hongo (PI) y **(B)** diámetro radial del micelio *D. seriata* ( $\emptyset$ ) por quitosano (A<sub>50</sub>), quitosano+propóleo (B<sub>100</sub>), quitosano+propóleo+nAg (3 mL) (C<sub>1</sub>), quitosano+propóleo+nAg (6 mL) (C<sub>2</sub>), quitosano+propóleo+nAg (1.5 mL) (D<sub>1</sub>), quitosano+nAg (3 mL) (D<sub>2</sub>), propóleo+nAg (1.5 mL) (F<sub>1</sub>), propóleo+nAg (3 mL) (F<sub>2</sub>), nAg (E), propóleo (P) y testigo (T).

40 **Figura 2.** Crecimiento del hongo *Diplodia seriata* en placas petri y correspondiente a las mezclas A<sub>50</sub>, B<sub>100</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, B<sub>100</sub>, E y G); T = testigo. Las manchas que aparecen en las placas petri representan los discos de micelios repicados.

**Figura 3.** Crecimiento del hongo *Biporaris orizae* en placas petri. De izquierda a derecha: testigo (diámetro máximo  $\emptyset=7.8$  cm) y mezcla D<sub>2</sub> (quitosano + nAg 6 mL) con un diámetro radial cero y para concentraciones de 300, 600 y 900  $\mu\text{L}/\text{mL}$ , respectivamente.

**Figura 4. (A)** Diagrama de barras del porcentaje de inhibición (PI) del crecimiento del hongo y **(B)** Diámetro radial del micelio de *Bipolaris oryzae* para oligómeros de quitosano ( $A_{50}$ ), quitosano/propóleo ( $B_{100}$ ), quitosano/propóleo/nAg 1 ( $C_1$ ), quitosano/propóleo/nAg 2 ( $C_2$ ), quitosano/nAg 1 ( $D_1$ ), quitosano/nAg 2 ( $D_2$ ), propóleo/nAg 1 ( $F_1$ ), propóleo/nAg 2 ( $F_2$ ), nAg (E), propóleo (P), Testigo (T).

**Figura 5.** Actividad de combinaciones binarias y ternarias de quitosano, propóleo y nAg frente a *S. aureus* (izquierda) y *E. coli* (derecha): nAg (1); quitosano/propóleo/nAg (2 y 6); propóleo/nAg (3 y c); quitosano (4); quitosano/propóleo (5). Concentración de los preparados dispensados en los discos 1-3: 50  $\mu\text{g/mL}$ ; en los discos 4-6: 300  $\mu\text{g/mL}$ ; en el central: 300  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 6.** Actividad de combinaciones binarias y ternarias de quitosano, propóleo y nAg frente a *A. baumannii* (izquierda) y *Pseudomonas aeruginosa* (derecha): propóleo (1); quitosano (2); propóleo/nAg (3 y 5); quitosano/nAg (4); quitosano/propóleo/nAg (6 y 7). Concentración de los preparados dispensados en los discos 1-4: 500  $\mu\text{g/mL}$ ; y en los discos 5-6-7: 300  $\mu\text{g/mL}$ .

**Figura 7.** Actividad de combinaciones binarias y ternarias de quitosano, propóleo y nAg frente a las levaduras *C. albicans* (izquierda) y *C. glabrata* (derecha): nAg (1); quitosano/propóleo/nAg (2 y 6); propóleo/nAg (3 y c); quitosano (4); quitosano/propóleo (5). Concentración de los preparados dispensados en los discos 1-3: 300  $\mu\text{g/mL}$ ; y en los discos 4, 5, 6 y central: 600  $\mu\text{g/mL}$ .

## **EJEMPLOS DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION**

### **A. PROCEDIMIENTO DE OBTENCION**

Primeramente, se ofrece una descripción detallada de la síntesis de las soluciones de oligómeros de quitosano ( $A_{50}$ ), nanoplatina (nAg o E) y propóleo (P) por separado. Seguidamente, se ofrece la preparación de mezclas o soluciones de cubrimiento de quitosano/propóleo ( $B_{100}$ ), quitosano/propóleo/plata ( $C_1$ ,  $C_2$ ), quitosano/plata ( $D_1$ ,  $D_2$ ) y, por último, de propóleo/plata ( $F_1$ ,  $F_2$ ) y testigo (T).

#### **1. Método de preparación de oligómeros de quitosano ( $A_{50}$ )**

Una solución de quitosano comercial se preparó por disolución de 5 g de quitosano en 200 mL de una disolución de AcOH al 2% y utilizando como oxidante una solución de  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.6M y agitación con un equipo de ultrasonidos con una frecuencia de 20 kHz y durante 30 minutos, para un quitosano de partida de calidad Sigma-Aldrich de peso molecular medio, y a una temperatura entre 50 y 60°C. Después de calentar o sonicar se retiró por centrifugación o decantación cualquier material insoluble en agua y se ajustó posteriormente el pH entre 8-9, utilizando una solución de metóxido de potasio al 25% en metanol. Seguidamente, el material se precipitó por metanol, se separó por decantación y/o ultracentrifugación, se lavó en una placa de vidrio fritado con agua destilada, etanol y acetona y se secó en un desecador a vacío a 20°C. La calidad de los oligómeros obtenidos (2000 g/mol) se determinó por espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

Soluciones acuosas de oligómeros de quitosano 0.005-0.01 M o soluciones del 1.25-2.5% p/v (solución  $A_{50}$ ) se prepararon, a partir de una disolución de oligómeros de quitosano de PM 2000 g/mol (obtenida tal como se ha descrito en el apartado anterior) en AcOH al 0.5 % y pH 4-6, ajustado con unas gotas de metóxido de potasio al 25% en metanol. La mezcla de quitosano/ácido acético/agua se sonicó durante un minuto y se dejó agitando durante 12 horas obteniendo una solución estable y transparente de quitosano. Las soluciones se

mantuvieron estables en atmósfera inerte y en frío a 4-10°C, a pH próximo a 5 hasta su utilización.

## 2. Método de producción *in situ* de soluciones de recubrimiento y películas de oligómeros de quitosano

- 5 Soluciones de oligómeros de quitosano A<sub>50</sub> (1.25-2.5% p/v, pH 4-6) se trataron con una solución de de glioxal al 4% v/v. Adicionalmente, se adicionó Tween 20 al 0.05-0.1% v/v a fin de mejorar las propiedades de adhesión de las soluciones de quitosano.

## 3. Método de preparación de nanoplata (nAg)

- 10 La preparación de nanoplata se efectuó en un matraz aforado de dos bocas de 2 litros. Se vertieron aproximadamente 100 mL de agua destilada y desionizada en su interior y seguidamente se adicionó de 1 mL a 2 mL de una solución 50 mM de AgNO<sub>3</sub> (0.849 g en 100 mL de H<sub>2</sub>O) y 2 mL de una solución 30 mM de citrato de sodio (0.882 g en 100 mL de H<sub>2</sub>O). La solución anterior se enfrió y agitó en un congelador a 5°C aproximadamente y posteriormente desoxigenó con N<sub>2</sub> abundante durante 30 minutos. La etapa más delicada es
- 15 la adición con una micropipeta de 1 mL de una solución de 10 mM NaBH<sub>4</sub> en frío (5-10°C) y en medio inerte (atmósfera de N<sub>2</sub>) y durante 1 hora aproximadamente, agitando fuertemente con un agitador magnético. La primera microgota hizo virar la solución de incolora a amarilla y el aumento de NaBH<sub>4</sub>, o de sucesivas gotas, dio lugar a una intensificación del color amarillo hacia marrón, que podría haber llegado a revertir a amarillo claro por la adición de
- 20 microgotas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10%. El color amarillo de la solución se estabilizó con polivinilpirrolidona (PVP) y la aplicación de ultrasonidos durante 3-5 minutos con un equipo de ultrasonidos de 20 kHz. Por último se adicionaron con una micropipeta unas gotas de una solución de metóxido de potasio en metanol al 25% para obtener un pH de 7-8. La solución se dejó estabilizándose durante 24 horas en un refrigerador a 5°C.
- 25 Las soluciones resultantes sonicadas pueden llegar a alcanzar contenido en plata de 100 ppm a 200 ppm (solución nAg) y se pueden caracterizar mediante su absorción en un espectrofotómetro de UV-Vis a 420 nm y un tamaño de las nanopartículas entre 60 y 100 nm. Las soluciones se mantienen estables en atmósfera inerte y en frío a 4-10°C.

## 4. Método de producción de extracto etanólico de propóleo (P)

- 30 El extracto etanólico de propóleo se preparó a partir de propóleo procedente del sur de la provincia de Burgos, en la Cuenca del Duero (España). El propóleo se trituró a polvo fino y se sometió a extracción utilizando una solución hidroalcohólica 7:3, después a maceración dinámica durante 72 horas a temperatura ambiente, seguida de percolación (1 L/min) y subsiguiente filtración con una malla de acero inoxidable de 220 *mesh*. La solución
- 35 resultante se concentró a 50°C utilizando un equipo de ultrasonidos, y se prepararon soluciones de una concentración final de propóleo de 100 mg/mL o del 10% p/v (P).

## 5. Método de producción *in situ* de mezclas de quitosano/propóleo (B100)

- 40 A una solución de 50 mL de A<sub>50</sub>, o del 2-3% p/v de quitosano en agua, se adicionó una solución de 50 mL del 2-3% p/v de propóleo/agua y alcohol y la mezcla resultante, en cantidad de 100 mL, se sonicó durante 1 minuto.

## 6. Método de producción *in situ* de soluciones de recubrimiento y películas de oligómeros de quitosano/propóleo

- 45 Primero se prepararon las soluciones de recubrimiento o películas de oligómeros de quitosano como se indica más arriba (A<sub>50</sub>), haciendo uso de glioxal como agentes de entrecruzamiento. A continuación se adicionó la solución de propóleo al 3% p/v, se sonicó la

solución resultante durante 1 minuto. Posteriormente, se dejó reposar sobre la superficie a tratar en atmósfera seca, obteniendo espesores de 0.3 a 0.6 mm.

**7. Método de producción *in situ* de quitosano/propóleo/plata (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>)**

5 A 50 mL de una solución A<sub>50</sub>, de 2-3% p/v de quitosano, se adicionaron 50 mL de una disolución al 2-3% p/v de propóleo/agua y alcohol y la mezcla resultante, en cantidad de 100 mL, se sonicó durante al menos 1 minuto.

Por otra parte, se prepararon dos disoluciones de 50 mL que contenían 10 ppm de nAg (solución C<sub>1</sub>) y 20 ppm de nAg (solución C<sub>2</sub>). Se sonicaron ambas durante al menos 1 minuto.

10 Se adicionó la disolución de nano plata nAg (solución C1 y solución C2) sobre las soluciones A<sub>50</sub> de quitosano y se sonicó la solución resultante durante al menos 1 minuto, al objeto de producir *in situ* dos nuevas mezclas de quitosano/propóleo/plata (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>).

**8. Método de producción *in situ* de soluciones de recubrimiento y películas de oligómeros de quitosano/ propóleo y plata**

15 Al igual que lo indicado para los *films* de quitosano y quitosano/propóleo, y a partir de agentes de entrecruzamiento se sintetizaron los *films* de quitosano (2-3% p/v) / propóleo (2-3% p/v) / plata (10ppm/20ppm), se sonicó la solución resultante durante 1 minuto y se dejó reposar sobre la superficie a tratar en atmósfera seca, para obtener espesores de 0.3 a 0.6 mm.

**9. Método de producción *in situ* de quitosano/plata (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>)**

20 A 50 mL de una solución A<sub>50</sub> de 2-3% p/v de quitosano se adicionaron 10 ppm (solución D<sub>1</sub>) y a otra solución de 50 mL de 2-3% p/v de quitosano se adicionaron 20 ppm de nAg (solución D<sub>2</sub>). Ambas soluciones se sonicaron durante 1 minuto.

**10. Método de producción *in situ* de soluciones de recubrimiento y películas de oligómeros de quitosano/plata**

Ver ejemplos anteriores y mezclar mediante sonicación.

**11. Método de producción *in situ* de propóleo/plata (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>)**

30 Se prepararon dos disoluciones de 0.050 L de propóleo al 2-3% p/v, se adicionaron 10 ppm de nAg (solución F<sub>1</sub>) y 20 ppm de nAg (solución F<sub>2</sub>), y se sonicaron las soluciones resultantes durante 1 minuto.

**B. ENSAYOS DE ACTIVIDAD**

Se ofrecen tres casos o ejemplos de realización de la invención:

Caso 1: Sobre hongos de la yesca en vides o *Diplodia seriata*

Caso 2: Sobre hongo de la enfermedad roja del arroz, *Bipolaris orizae*

35 Caso 3: Sobre bacterias (*Staphylococcus aureus*, *Eschericia coli*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*) y hongos (*Candida albicans* y *Candida glabrata*) de interés clínico

El tratamiento de esta casuística comprende dos partes: la metodológica y la de resultados:

**Metodología:****Medios de cultivo**

La acción fúngica de los productos analizados ha sido ensayada *in vitro*. Se han utilizado dos medios de cultivo artificial diferenciados para cada hongo: MEA (malta extracto agar) para *Diplodia seriata* y PDA (patata dextrosa agar) para *Bipolaris orizae*. Para el crecimiento de los hongos de interés clínico *Candida albicans* y *Candida glabrata* se ha utilizado un medio agar Sabouraud.

En el estudio sobre las especies bacterianas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa* se han utilizado cepas procedentes de cultivos frescos en placas de agar sangre. A partir de una placa de cultivo de 18 a 24 horas se cogen varias colonias con un asa y se ajusta el inóculo a una turbidez equivalente al 0.5 de la escala de MacFarland 0.5 en suero fisiológico. Se agitan en un agitador "vortex" durante 15-20 componente (B)s, se toman inóculos y se extienden sobre placas agar Mueller-Hinton. El medio de siembra Mueller Hinton es el recomendado por la National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) porque en él crecen bien la mayor parte de las bacterias patógenas y hay muy pocas diferencias entre los distintos lotes comercializados, lo que ayuda a una estandarización entre laboratorios. Sobre tales placas se dispensan los discos con los extractos etanólicos de las combinaciones binarias o ternarias del sistema quitosano/propóleo/plata para medir la actividad.

**Ensayos de actividad**

Para las especies fúngicas *Diplodia seriata* y *Bipolaris orizae* se determinaron las concentraciones de los productos que se introdujeron en los medios de cultivo en las placas petri. Para *D. seriata* se ha utilizado 300 µL/mL de los productos A<sub>50</sub>, B<sub>100</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, E, P y T en las placas petri con MEA a 50 °C de temperatura y con *B. orizae* se utilizan 3 concentraciones diferentes: concentraciones 300 µL/mL, 600 µL/mL y 900 µL/mL en las placas petri con PDA a 50°C de temperatura.

Para la medida de la actividad de las cepas bacterianas se ha utilizado el método disco-placa basado en el trabajo de Bauer, Kirby y colaboradores, siendo uno de los métodos que el National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) recomienda para la determinación de la sensibilidad bacteriana a los antimicrobianos. El método disco-placa consiste en depositar, en la superficie de agar de una placa de petri previamente inoculada con el microorganismo, discos de papel secante impregnados con distintas combinaciones, binarias o ternarias, del sistema quitosano/propóleo/plata. Para *C. albicans* y *C. glabrata*, los discos fueron cargados con concentraciones entre 300 µL/mL y 600 µL/mL en mezclas binarias o ternarias de quitosano/propóleo/nanoplate. Tan pronto los discos impregnados de soluciones etanólicas de dichas combinaciones se ponen en contacto con la superficie húmeda del agar, el filtro absorbe agua y el extracto etanólico difunde al agar. El extracto difunde radialmente a través del espesor del agar a partir del disco formándose un gradiente de concentración. Transcurridas 18-24 horas de incubación los discos aparecen rodeados por una zona de inhibición. La comparación de los tamaños de los halos inhibitorios permite una estimación relativa de la actividad.

**Especificaciones adicionales en los ensayos con *Diplodia seriata* :**

De la periferia del cultivo puro han sido cortados discos de micelio de 6-7 mm Ø de *Diplodia seriata*, aislado Y 207-1-1c, e introducidos en las placas Petri preparadas. Se procede a medir cada día el diámetro del crecimiento del hongo un periodo de 20 días, datos que se utilizan para el cálculo del porcentaje de inhibición (PI) en comparación con el testigo cultivado solo en MEA.

$$PI (\%) = (Dmt - Dvar) / Dmt \times 100$$

donde: Dmt = diámetro del micelio del testigo (sin tratamiento) y Dvar = diámetro del micelio de la variante con producto.

5 Los ensayos han sido realizados por triplicado (R1, R2 y R3) para determinar el grado de sensibilidad/resistencia a cada uno de los productos aplicados. Para las tres repeticiones se hizo la media de los diámetros de crecimiento del micelio del hongo.

### **Especificaciones de los ensayos con *Bipolaris orizae*:**

10 **Ensayo "sanitario".** La inoculación por un periodo de 7 días con las conidias del hongo *Bipolaris orizae* en las semillas colocadas en una sola capa uniforme se hace en cajas de plástico a una temperatura de 20°C y 80% de humedad, condiciones favorables para el crecimiento del hongo.

El tratamiento de las semillas inoculadas se realiza bajo pulverización con un dispensador tipo *spray* a una dosis de 1 mL/100 g semillas.

15 Se validan 2000 semillas de arroz (*Oriza sativa* cv. IRGA424) inoculadas que se distribuyen en ocho repeticiones de 25 semillas por 10 tratamientos (A<sub>50</sub>, B<sub>100</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, P, T).

20 Se colocan tres hojas de papel de filtro en cajas Gerbox de Poliestireno de 250 ml de capacidad y medidas de 11 cm × 11 cm × 3.5 cm que previamente se desinfectan con una disolución de hipoclorito de sodio a 1%. Sobre el papel de filtro se efectúa un prensado de 25 marcas o cápsulas de 0.5 cm × 0.5 cm y en cada cápsula se coloca una semilla inoculada. Las hojas de papel de filtro se humedecen con agua destilada en una cantidad igual a 2.5 × el peso del papel de filtro utilizado.

25 Las semillas tratadas se incuban a temperaturas de 20±2°C y con un régimen de luminosidad de 12 horas de luz y 12 de oscuridad, con una lámpara de 40W de luz fluorescente y dispuesta sobre una caja seca a 40 cm. Después de 7 días, las semillas se validan individualmente utilizando un estereoscopio para identificar las incidencias del hongo *Bipolaris orizae* (normativa International Seed Testing Association (ISTA), 1976).

30 **Ensayo de germinación (TG):** las semillas fueron tratadas con diferentes combinaciones de productos (A<sub>50</sub>, B<sub>100</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, P, T). Con estas semillas se realizaron 4 repeticiones de 100 semillas para cada producto de acuerdo con lo establecido por la ISTA (1976) y los resultados expresados en porcentaje de plántulas normal germinadas.

35 **Dimensiones del tallo (DT) y de la raíz (DR) de las plántulas:** se mide con la ayuda de una regla graduada en milímetros la longitud del tallo y de la raíz de 10 plántulas normales, elegidas aleatoriamente a partir de las 4 repeticiones de 20 semillas por tratamiento puestas a germinar en los rollos de papel de filtro de acuerdo con el método anteriormente descrito. De las 10 plántulas analizadas se hace la media de la longitud de los tallos y de las raíces y los datos obtenidos se expresan en cm.

## **Resultados**

40 **Caso 1. Tratamiento de las heridas de la poda de la vid frente al hongo *Diplodia seriata***

En la Figura 1A se presenta el diagrama de barras del porcentaje de inhibición y el diámetro radial del micelio de *Diplodia seriata*, para una concentración de 300 uL/ml. El porcentaje de inhibición (PI) es máximo para las combinaciones A<sub>50</sub>, B<sub>100</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub> y disminuye al 74%

5 para el propóleo (P o G), 63% para el C<sub>1</sub> (quitosano+propóleo+plata 3 mL), 30% para F<sub>2</sub> (propóleo+plata 6 mL), 16% para F<sub>1</sub> (propóleo+plata 3 mL), y 0% para la plata (E) y 0% para el testigo (T). En la Figura 1B se observa que el mayor diámetro radial se presenta en la muestra de plata (E) y para el testigo (T), seguidos de los tratamientos F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> correspondientes a propóleo+plata y del tratamiento C<sub>1</sub> (quitosano+propóleo+plata 3 mL).

10 Es preciso destacar que cuando se efectúan tratamientos con 300 uL/mL de quitosano+propóleo+plata (C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>), la concentración de plata influye notablemente en el porcentaje de inhibición del micelio. Tratamiento C<sub>1</sub> de quitosano+propóleo+3 mL Ag o PI 63% vs tratamiento C<sub>2</sub> de quitosano+propóleo+6 mL Ag o PI 100% (Figura 1). En la Figura 2 (columna izquierda, 3<sup>a</sup> y 4<sup>a</sup> fila) se comparan los tamaños de los diámetros de los micelios de C<sub>1</sub> vs. C<sub>2</sub> (C<sub>1</sub> Ø=3.4 cm y PI 63% vs. C<sub>2</sub> Ø= 0 cm y PI 100%). En este ensayo se observa claramente que cuando se incrementa la concentración de nanoplata se incrementa el poder inhibitorio del quitosano/propóleo.

15 También es interesante destacar en la Figura 2 (columna derecha, 4<sup>a</sup> fila) los diámetros del crecimiento del micelio tratado con propóleo solo (Ø=1.9 cm y PI 74%). Se demuestra en este caso la eficacia del propóleo sólo, frente a cuando se utiliza en mezclas F<sub>1</sub> y F<sub>2</sub> (Figura 2, columna derecha, 1<sup>a</sup> y 2<sup>a</sup> fila) de propóleo con distintas concentraciones de plata (Ag, 3 mL, F<sub>1</sub>, Ø=7.2 cm, PI 16%; Ag, 6 mL, F<sub>2</sub>, Ø=4.9 cm, PI 30%).

20 Igualmente se destaca que la plata sola no tiene ningún efecto fungicida cuando se incorpora directamente en el medio de cultivo, debido a que el propio medio produce agregados de plata y reduce notablemente la actividad de las moléculas de nanoplata (Figura 2, columna derecha, 3<sup>a</sup> fila). Sin embargo, las mezclas de propóleo y plata sí presentan actividad inhibitoria.

## 25 **Caso 2. Nuevos productos biológicos a base de quitosano/propóleo/plata para protección de plantas**

### **Tratamiento de semillas de arroz frente al hongo *Bipolaris oryzae***

30 En la Tabla 1 se observa que a concentraciones inferiores a 300 µL/mL disminuye gradualmente el crecimiento del hongo *Bipolaris oryzae*, y a concentraciones de 300-900 µL/mL, se inhibe totalmente ese crecimiento (Ø=0 cm). Esto sucede para distintas combinaciones de quitosano sólo (A<sub>50</sub>), quitosano+propóleo (B<sub>100</sub>), quitosano+plata (D<sub>1</sub> y D<sub>2</sub>) y quitosano+propóleo+plata (C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>). También en la Tabla 1 y referente a combinaciones de propóleo+plata (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>) y propóleo solo, la inhibición total del hongo se presenta a partir de 600 µL/mL.

35 **Tabla 1.** Diámetro micelar del hongo *Bipolaris oryzae* en función de la concentración y para distintas combinaciones de quitosano/propóleo/plata (CHIPP): A<sub>50</sub>, B<sub>100</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, P y testigo.

Tratamientos	Concentraciones ( $\mu\text{l/ml}$ )		
	300	600	900
A <sub>50</sub>	0	0	0
B <sub>100</sub>	0	0	0
C <sub>1</sub>	0	0	0
C <sub>2</sub>	0	0	0
D <sub>1</sub>	0	0	0
D <sub>2</sub>	0	0	0
F <sub>1</sub>	5.7	0	0
F <sub>2</sub>	5.7	0	0
P	6.8	0	0
Testigo	7.4		

5 En la Figura 3 se ofrece una imagen de diámetro radial del testigo y diferentes concentraciones de muestras D<sub>2</sub> de quitosano/plata en placas petri. La muestra a la izquierda corresponde al testigo y ocupa prácticamente todo el diámetro de la placa, mientras que las tres placas de la derecha, correspondientes a mezclas D<sub>2</sub> de 300, 600 y 900  $\mu\text{L/mL}$  no exhiben crecimiento micelial.

10 Las combinaciones de los productos quitosano+propóleo+plata se han mostrado efectivas para el control de los hongos *Bipolaris orizae* en semillas de arroz. Se ha comprobado la acción antifúngica sobre el porcentaje de semillas sanas, una medida de la eficiencia del control de hongos para las distintas combinaciones de quitosano/propóleo/plata.

15 En la Figura 4 se observa que las combinaciones más activas son las de quitosano/propóleo/plata (C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>), las de los oligómeros de quitosano (A<sub>50</sub>) y las combinaciones de quitosano/plata (D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>), con porcentajes de inhibición máximos. Siguen en eficacia a estos tratamientos las combinaciones de propóleo/plata (F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>) que dan lugar a porcentajes de semillas sanas por encima del 65% y, con porcentajes menores, las mezclas quitosano/propóleo y sólo propóleo.

20 La fitotoxicidad de las diferentes combinaciones frente al testigo ha sido evaluada a través de los resultados de los ensayos de germinación (EG) y medida de la longitud del tallo y de raíz (LT), recogidos en la Tabla 2.

25 Del examen de esos resultados se concluye que, para la germinación de semillas de arroz, la combinación quitosano-plata (D<sub>2</sub>) es el tratamiento que ofrece un mayor índice de germinación (90%). Para el resto de los tratamientos puede establecerse que sus propiedades antifúngicas no se vienen acompañadas de propiedades estimulantes de la germinación o del crecimiento de la plántula (raíz y parte aérea).

**Tabla 2.** Ensayos de germinación, diámetros de tallo y raíz en semillas tratadas con distintas combinaciones de quitosano/propóleo/plata (CHIPP): A<sub>50</sub>, B<sub>100</sub>, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, D<sub>1</sub>, D<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, P y testigo.

Tratamientos	Concentraciones (µl)		
	TG (%)	DT (cm)	DR (cm)
A <sub>50</sub>	85	3.36	8.33
B <sub>100</sub>	65	2.81	8.75
C <sub>1</sub>	85	2.87	10.15
C <sub>2</sub>	85	2.71	9.57
D <sub>1</sub>	82	3.76	8.89
D <sub>2</sub>	91	3.92	9.23
F <sub>1</sub>	60	2.86	9.87
F <sub>2</sub>	80	2.74	9.31
P	90	4.18	10.54
Testigo	85	4.14	10.45

5 **Caso 3. Actividad bactericida y fungicida de mezclas binarias y ternarias de quitosano/propóleo/plata sobre cepas bacterianas y hongos de interés hospitalario.**

**Actividad bactericida**

Como se muestra en la Figura 5, para concentraciones de 50 µg/mL, las muestras de propóleo-nAg o propóleo-quitosano-nAg (muestras 2 y 3) apenas inhiben el crecimiento bacteriano (*Staphylococcus aureus*) o resultan resistentes (*Escherichia coli*). Sin embargo, para concentraciones en torno a 300 µg/mL, quitosano y sus combinaciones con propóleo y propóleo-nAg son siempre sensibles, hecho que no siempre ocurre para las preparaciones de propóleo-nAg. La inhibición de la cepa de *Staphylococcus aureus* ensayada tiene un alto interés clínico dado su carácter de meticilin resistencia (MRSA). Es de observar que las nanopartículas de plata sola (nAg) no muestran actividad bactericida *per se* (quizás al ser retenidas en las capas superiores de los discos de celulosa)

En la Figura 6 puede observarse que para concentraciones por encima de 300 µg/mL, todos los preparados estudiados inhiben el crecimiento de cepas clínicas de *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*. Un estudio comparativo de los halos de inhibición y sus concentraciones permite advertir que una mezcla ternaria de oligómeros de quitosano-propóleo-nanoplatea de 300 ug/ml iguala en actividad la que produce el quitosano solo a una concentración de 500 ug/ml o dicho de otro modo: 100 ug/ml de quitosano en combinación con las mismas cantidades de propóleo y nanoplatea iguala en actividad a la que producen 500 ug/ml de quitosano solo. Puede pues, concluirse indirectamente que la mezcla ternaria multiplica x5 la actividad del quitosano solo.

**Actividad fungicida**

5 Para concentraciones por debajo de 400 µg/mL, las muestras de propóleo-nAg o propóleo-  
quitosano-nAg (muestras 2 y 3) no muestran actividad frente a las dos levaduras ensayadas,  
*Candida albicans* y *Candida glabrata*, siendo preciso aumentar la concentración de las  
preparaciones hasta 600 µg/mL para conseguir la deseada actividad fungicida. Los halos  
inhibitorios de mayor diámetro corresponden a las muestras de quitosano-propóleo y  
quitosano-propóleo-nAg.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un material compuesto que comprende un componente (A) oligomérico y un componente (B) que a su vez comprende uno o más compuestos fenólicos, donde ambos componentes son de origen natural, presentan actividad antimicrobiana y propiedades antiadhesivas frente a los microorganismos, son biocompatibles y no presentan citotoxicidad para las células de los mamíferos.
2. El material compuesto según la reivindicación 1, donde el componente (A) es un oligosacárido obtenido a partir de un polisacárido de origen natural.
- 10 3. El material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde el componente (A) es un oligómero con un peso molecular máximo de 6000 g/mol.
4. El material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el componente (B) comprende uno o más compuestos fenólicos seleccionados del grupo que consiste en polifenoles, flavonoides, ácidos fenólicos y cualquier combinación de éstos.
- 15 5. El material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que comprende adicionalmente un componente (C) de tamaño nanométrico.
6. El material compuesto según la reivindicación 5, donde el componente (C) se selecciona del grupo que consiste en plata, cobre, arsénico, óxido de titanio, silice, material grafénico y nanopesticida orgánico de síntesis.
- 20 7. El material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en forma de recubrimiento o película.
8. Método de síntesis de un material compuesto que comprende al menos dos de los componentes (A), (B) y (C) tal como se definen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el método comprende mezclar, en solución y agitación mediante sonicación, cantidades equimoleculares adecuadas de los diferentes materiales.
- 25 9. Método de síntesis de un material compuesto que comprende los componentes (A) y (B) tal como se describen en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 y 7, donde el método comprende:
- 30 a) obtener una solución de un componente (A) formado por oligómeros de peso molecular máximo 6000 g/mol;
- b) obtener un componente (B) que comprende compuestos fenólicos; y
- c) mezclar la solución de oligómeros de la etapa a) con los compuestos fenólicos de la etapa b) y sonicar durante al menos un minuto.
- 35 10. Método de síntesis de un material compuesto que comprende los componentes (A), (B) y (C) tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde el método comprende:
- a) obtener una solución de un componente (A) formado por oligómeros de peso molecular máximo 6000 g/mol;
- b) obtener un componente (B) que comprende compuestos fenólicos;
- 40 c) mezclar la solución de oligómeros de la etapa a) con los compuestos fenólicos de la etapa b) y sonicar durante al menos un minuto;
- d) obtener una solución estabilizada de un componente (C) de tamaño nanométrico; y

- e) mezclar el material bicompuesto obtenido en la etapa c) con la solución del componente (C) de tamaño nanométrico de la etapa d) y sonicar durante al menos un minuto.
- 5 11. Método de síntesis de un material compuesto que comprende los componentes (A) y (C) tal como se describen en las reivindicaciones 1-3 y 5-7, donde el método comprende:
- a) obtener una solución de un componente (A) formado por oligómeros de peso molecular máximo 6000 g/mol;
- d) obtener una solución estabilizada del componente (C) de tamaño nanométrico; y
- 10 e) mezclar la solución de oligómeros obtenida en la etapa a) con la solución del componente (C) de tamaño nanométrico de la etapa d) y sonicar durante al menos un minuto.
12. Método de síntesis de un material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, que comprende entrecruzar *in situ* los oligómeros en presencia de un agente de entrecruzamiento, antes de su mezcla con el componente (B) que comprende uno o más compuestos fenólicos, o con el componente (C) de tamaño nanométrico.
- 15 13. Uso del material compuesto tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para prevenir, reducir, controlar o eliminar cualquier tipo de microorganismo o agente patógeno.
14. Uso del material compuesto según la reivindicación 13:
- 20 i. dentro del entorno hospitalario y de la salud humana y animal, preferiblemente en apósitos para heridas, aplicaciones clínicas, obtención de salas limpias, descontaminación de superficies y de instalaciones hospitalarias en general;
- ii. dentro de la preservación y protección frente al biodeterioro del medio natural y su patrimonio cultural, preferiblemente en apósitos para restauración de pinturas, piedra, maderas, lienzos, papel y todo tipo de superficie con interés histórico –artístico o arqueológico que deba preservarse de la contaminación;
- 25 iii. como pesticida dentro de la preservación y protección de plantas y/o cultivos, preferiblemente en apósitos y recubrimientos para la protección y conservación del medio agrícola y forestal en su conjunto, protección de cultivos y de especies forestales;
- 30 iv. dentro de la protección del medio industrial, preferiblemente en la protección y preservación de productos, alimentos e instalaciones industriales.
15. Uso del material compuesto tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para prevenir, reducir, controlar o eliminar:
- Hongos de la yesca en vides o *Diplodia seriata*;
  - 35 • Hongo de la enfermedad roja del arroz, *Bipolaris orizae*;
  - Bacterias seleccionadas del grupo que consiste en *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii* y *Pseudomonas aeruginosa*; u
  - Hongos seleccionados del grupo que consiste en *Candida albicans* y *Candida glabrata*.
- 40 16. Uso del material compuesto tal como se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, para favorecer el crecimiento de cosechas y de semillas.

17. Uso de un material compuesto que comprende los componentes (A) y (C) tal como se describen en una cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y 5-7 para favorecer el crecimiento de cosechas y de semillas.

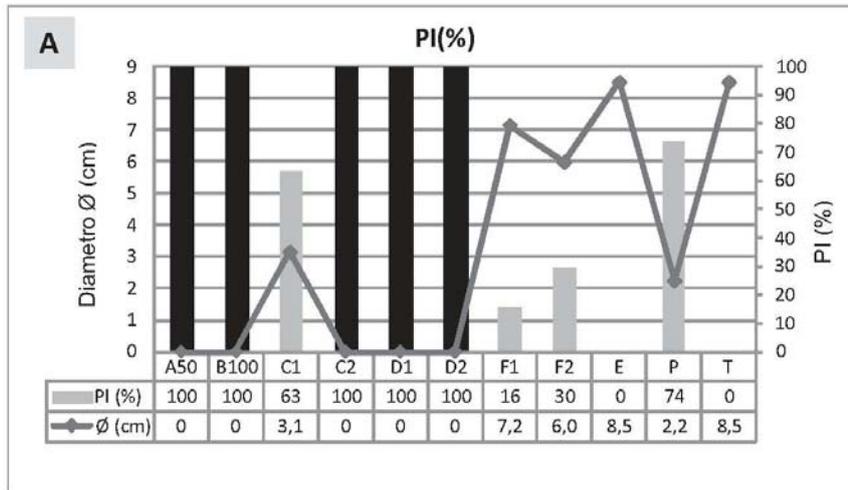


Fig. 1A

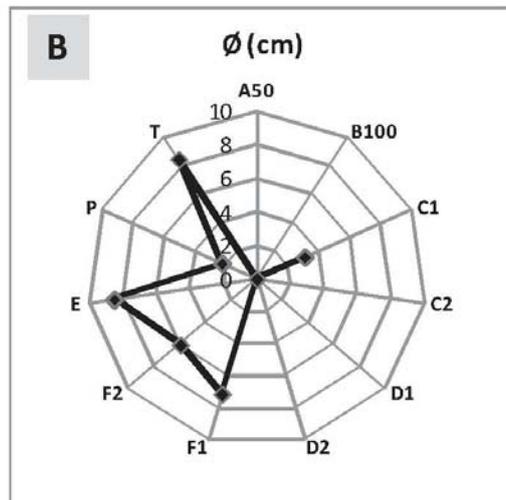


Fig. 1B

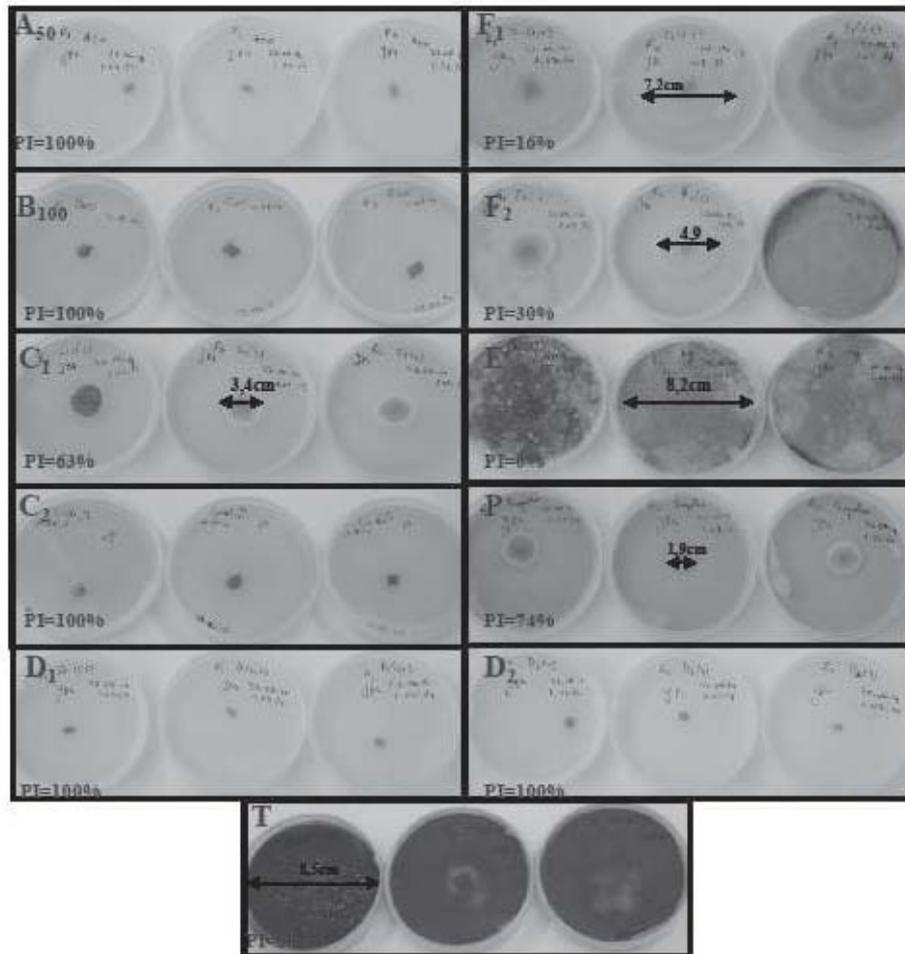


Fig. 2

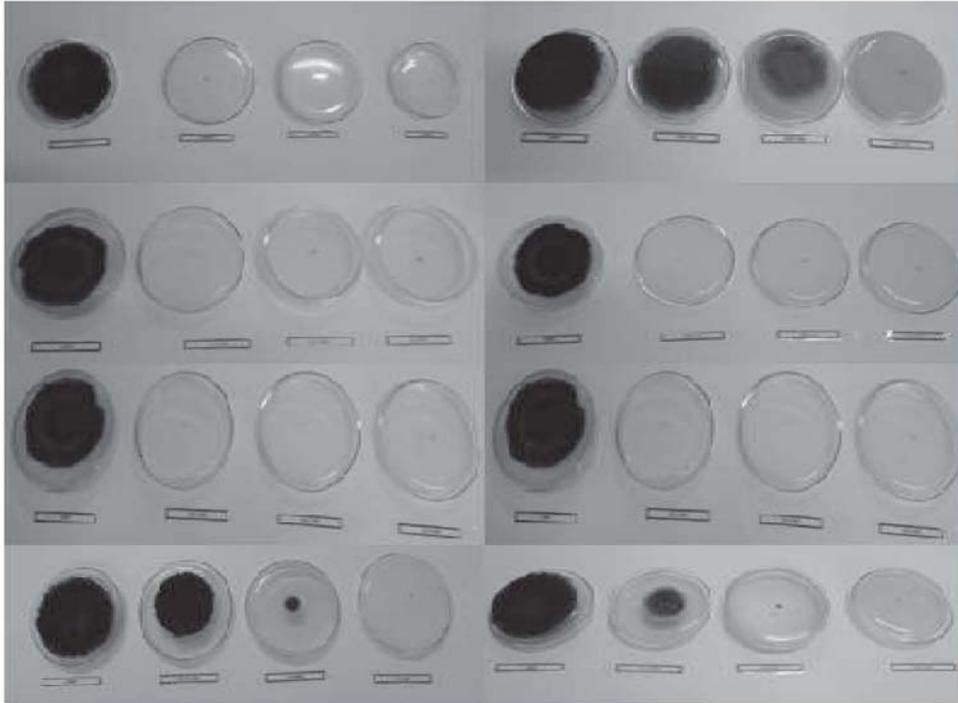


Fig. 3

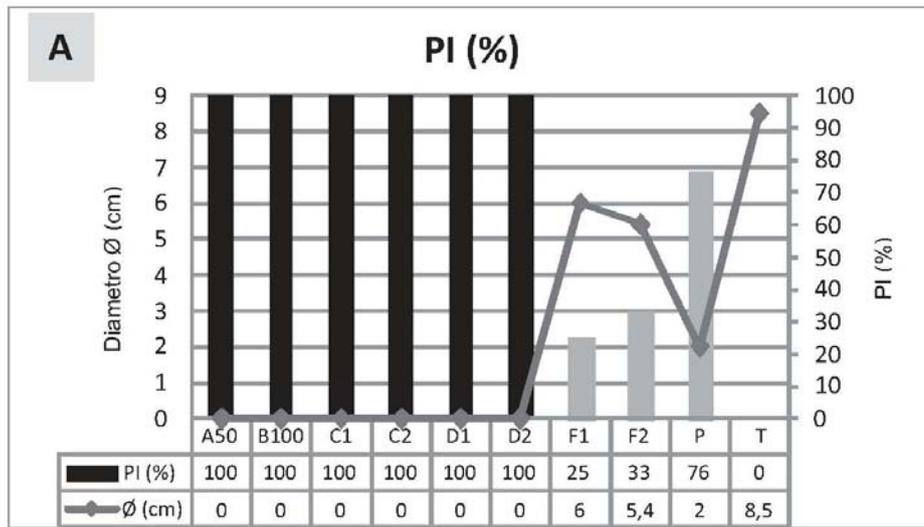


Fig. 4A

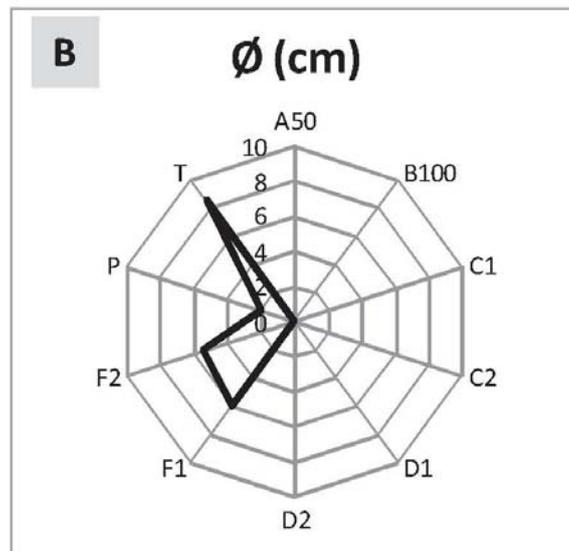


Fig. 4B

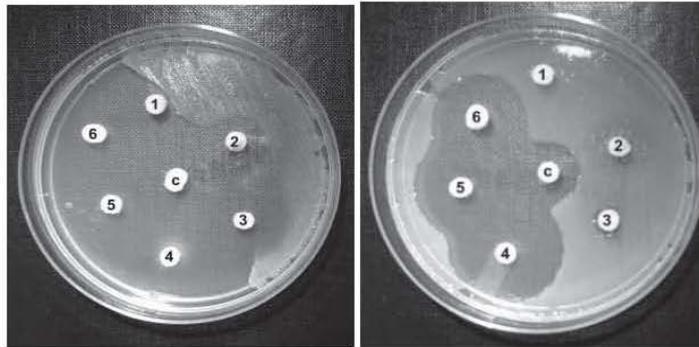


Fig. 5

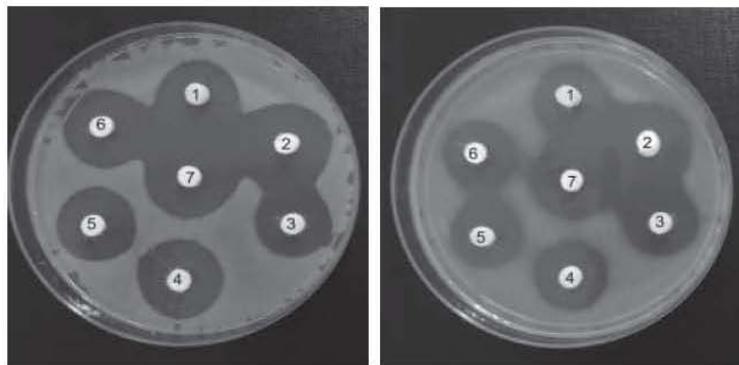


Fig. 6

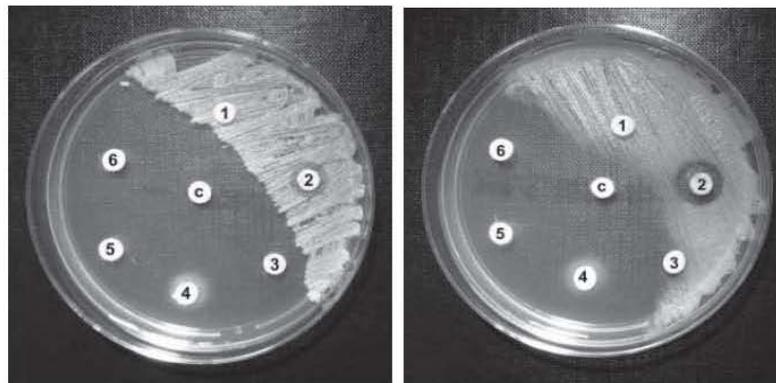


Fig. 7



- ②① N.º solicitud: 201431591  
②② Fecha de presentación de la solicitud: 30.10.2014  
③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	US 20060168924 A1 (S-C. SUN) 03.08.2006, párrafos [0005],[0006],[0012]; reivindicación 1.	1-7,13,14
X	M. P. DE LUCA et al., "Propolis varnish: Antimicrobial properties against Cariogenic Bacteria, cytotoxicity and sustained-release profile", Biomed Research International, 2014 [accesible en línea 13.05.2014], artículo ID 348647, 6 páginas.	1-4,7-9,13,14
X	CN 102579702 A (SHANDONG SUCCESS PHARM. TECHN.) 18.07.2012, (resumen), World Patent Index [en línea]. Londres (Reino Unido): Derwent Publications Ltd. [recuperado el 27.03.2015]. Recuperado de: EPODOC, EPO, DW 201279, N° de acceso: 2012-M75364.	1-14
X	KR 20060004632 A (JHUNG CHAN YOUNG) 12.01.2006, (resumen), World Patent Index [en línea]. Londres (Reino Unido): Derwent Publications Ltd. [recuperado el 27.03.2015]. Recuperado de: EPODOC, EPO, DW 201279, N° de acceso: 2006-693927	1-14
X	S. AKMAZ et al., "The effect of Ag content of the chitosan-silver nanoparticle composite material on the structure and antibacterial activity", Advances in Materials Science and Engineering, 2013, artículo ID 690918, 6 páginas.	15-17
X	JP 2002029908 A (JOLIVE KK.) 20.01.2002, (resumen), World Patent Index [en línea]. Londres (Reino Unido): Derwent Publications Ltd. [recuperado el 27.03.2015]. Recuperado de: EPODOC, EPO, DW 200240, N° de acceso: 2002-366753.	16

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  
31.03.2015

Examinador  
E. Dávila Muro

Página  
1/4

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C08L5/08** (2006.01)  
**A61K35/64** (2015.01)  
**A61K47/36** (2006.01)  
**A61K33/38** (2006.01)  
**A01N59/16** (2006.01)  
**A01N65/00** (2009.01)  
**B82Y30/00** (2011.01)

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

A61K, B82Y, C08L, A01N

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, BD-TXT, XPESP, NLP, CAS, BIOSIS, MEDLINE

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 31.03.2015

**Declaración**

<b>Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-17	<b>NO</b>
<b>Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)</b>	Reivindicaciones	<b>SI</b>
	Reivindicaciones 1-17	<b>NO</b>

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	US 20060168924 A1 (S-C. SUN)	03.08.2006
D02	M. P. DE LUCA et al., Biomed Research International, 2014, artículo ID 348647, 6 páginas.	2014
D03	CN 102579702 A (SHANDONG SUCCESS PHARM. TECHN.)	18.07.2012
D04	KR 20060004632 A (JHUNG CHAN YOUNG)	12.01.2006
D05	S. AKMAZ et al., Advances in Materials Science and Engineering, 2013, artículo ID 690918, 6 páginas.	2013
D06	JP 2002029908 A (JOLIVE KK.)	20.01.2002

**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 invención se refiere a un material compuesto que comprende un componente (A) oligomérico y un componente (B) con compuestos fenólicos, siendo ambos componentes de origen natural, con actividad antimicrobiana y propiedades antiadhesivas frente a microorganismos, biocompatibles y que no presentan citotoxicidad para las células de los mamíferos. El material compuesto puede comprender adicionalmente un componente (C) de tamaño nanométrico. La invención también se refiere al método de obtención del material compuesto y su uso para prevenir, reducir, controlar o eliminar cualquier microorganismo o agente patógeno, así como para favorecer el crecimiento de cosechas y semillas.

El documento D01 divulga un filtro para eliminar sustancias tóxicas y microbios o gérmenes en el aire que está recubierto por un material compuesto formado por quitosano, un fotocatalizador, carbón activo, propóleo y nanopartículas de Ag, Au, TiO<sub>2</sub>Ag, TiO<sub>2</sub>Au y TiO<sub>2</sub>Pt (ver párrafos [0005],[0006] y [0012]).

El documento D02 divulga una composición de recubrimiento para uso en odontología que está formada por propóleo y quitosano. Se prepara mediante mezclado con agitación de un extracto etanólico de propóleo con una base polimérica de quitosano en distintas concentraciones. La composición tiene propiedades antibacterianas contra bacterias cariogénicas de los géneros *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus salivarius* y *Lactobacillus casei* (ver Resumen y Apartado 2).

El documento D03 se refiere a una composición en forma de gel para el tratamiento de úlceras dentales que comprende un agente antibacteriano, un componente antiinflamatorio y propóleo, sobre un material base que puede ser carboximetil celulosa, carboximetil quitosano y/o almidón. El agente antibacteriano está constituido por iones o nanopartículas de Ag, y el componente antiinflamatorio comprende polifenoles procedentes de extractos de té, uva, manzana y granada (ver resumen).

El documento D04 divulga una composición con propiedades antibacterianas para recubrimiento de tejidos para uso médico y sanitario, la cual comprende nanopartículas de Ag, propóleo y quitosano junto con otros componentes como resina PVC, carbón vegetal y extractos vegetales (ver resumen).

El documento D05 divulga un material compuesto que comprende quitosano y nanopartículas de Ag, con actividad antibacteriana contra bacterias de los géneros *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae* (ver Resumen y Apartado 2.2).

El documento D06 divulga una composición para regular el crecimiento de las plantas que comprende un agente antimicrobiano de origen natural y un surfactante no iónico. Entre otros componentes, el agente antibacteriano puede incluir quitosano y propóleo (ver resumen).

La invención definida en las reivindicaciones 1-17 de la solicitud ya se encuentra recogida en cualquiera de los documentos D01-D06. Por lo tanto, las reivindicaciones no se consideran nuevas ni con actividad inventiva a la vista del estado de la técnica conocido (artículos 6.1 y 8.1 LP 11/1986).