

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 593 837**

51 Int. Cl.:

A61K 33/38	(2006.01)
A61P 31/00	(2006.01)
B22F 9/24	(2006.01)
B22F 1/00	(2006.01)
A61K 45/06	(2006.01)
A61K 33/24	(2006.01)
A61K 33/26	(2006.01)
A61K 33/34	(2006.01)
B82Y 30/00	(2011.01)
B82Y 5/00	(2011.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **01.10.2008 PCT/ES2008/070180**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **09.04.2009 WO09043958**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **01.10.2008 E 08835314 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.07.2016 EP 2206503**

54 Título: **Uso de clústeres cuánticos atómicos (AQC) como agentes antimicrobianos y biocidas**

30 Prioridad:

05.10.2007 ES 200702615

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

13.12.2016

73 Titular/es:

**UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA (100.0%)
Edificio CACTUS-Campus Sur
15782 Santiago de Compostela, A Coruña, ES**

72 Inventor/es:

**LÓPEZ QUINTELA, MANUEL ARTURO;
RIVAS REY, JOSÉ y
BLANCO VARELA, MARÍA CARMEN**

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 593 837 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

Uso de clústeres cuánticos atómicos (AQC) como agentes antimicrobianos y biocidas

- 5 La presente propuesta de invención describe el uso de la actividad antimicrobiana y biocida que presentan los Clústeres Cuánticos Atómicos (AQC: sigla del inglés *Atomic Quantum Clusters*) de diversos metales sintetizados de acuerdo con el procedimiento descrito en la solicitud de patente de invención P200502041 y los AQC reivindicados en la correspondiente solicitud internacional WO 2007/017550.

10 **Estado de la técnica anterior**

Aunque el uso de metales, tales como el oro y la plata, como bactericidas y biocidas se conoce desde muy antiguo, no existe acuerdo unánime respecto a su modo de acción, que parece depender de su forma, tamaño y método de preparación. Así, por ejemplo, Pal *et al.* [S. Pal, Appl. Environ. Microbiol. 2007, 73, 1712] demostraron que la geometría de las nanopartículas desempeña un papel muy importante en su actividad frente a *Escherichia coli*. De forma similar, Cioffi *et al.* [N. Cioffi, Anal. Bioanal. Chem., 2005, 382, 1912] demostraron la actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae* de nanopartículas de Ag y Cu de tamaños entre 1,7 nm y 6,3 nm, obtenidas de forma electroquímica en presencia de sales de tetraoctilamonio. Además, estos autores demostraron que la introducción de las partículas en un polímero inerte no reduce su actividad antimicrobiana. Lee *et al.* [H. J. Lee, J. Mater. Sci. 2003, 38, 2199] demostraron que las partículas de plata de 2-5 nm también presentan actividad antimicrobiana frente a una bacteria grampositiva, *Staphylococcus aureus*, así como frente a una bacteria gramnegativa, *Klebsiella pneumoniae*, y que esta actividad se mantenía cuando las nanopartículas se introducían en fibras de algodón o poliéster. De forma similar, Sondi *et al.* [I. Sondi, J. Colloid Interface Sci. 2004, 275, 177] también observaron actividad bactericida frente a *E. coli* de nanopartículas de Ag de 12 nm recubiertas con un tensioactivo de alto peso molecular. Además, Xu *et al.* en la patente US2003108612A1 describieron el uso de nanopartículas metálicas como método para la inhibición del crecimiento bacteriano y el tratamiento de enfermedades provocadas por bacterias.

30 Aunque en esta patente las reivindicaciones indican que las partículas que presentan estas propiedades deben tener tamaños de 100 nm o menos (reivindicaciones 1, 17, 39 y 54), la patente señala varias veces que los tamaños ideales deben ser de entre 50 a 100 nm (reivindicaciones 13, 29, 51 y 56). Por lo tanto, esta patente de invención pone de manifiesto que el tamaño, siempre que se encuentre en estos intervalos (menos de 100 nm), no influye de forma apreciable en las propiedades antibacterianas. Las partículas descritas en esta patente también se caracterizan, además de por sus tamaños obtenidos por microscopia electrónica de transmisión y microscopia de campo oscuro, por la posición de su banda plasmónica en espectroscopia visible.

De lo anterior se desprende que, a pesar de los numerosos estudios llevados a cabo hasta la fecha, todavía se desconoce el mecanismo mediante el cual las nano/micropartículas presentan, en determinadas condiciones, comportamiento antibacteriano/biocida. Debido al hecho de que el uso directo de las sales metálicas (principalmente oro, plata y cobre) también muestra propiedades antibacterianas [véase por ejemplo, J. A. Spadaro, *et al.*, Microb. Agents Chemother. 6 (1974) 637] una de las hipótesis actuales es que las micro/nanopartículas metálicas pueden servir como un depósito de iones metálicos que libera iones que actúan como bactericidas/biocidas. Así, por ejemplo, C. E. Easterly *et al.* en la solicitud de patente US2006280785A1, utilizaron esta idea por medio de la incorporación de nanopartículas de Ag de tamaños <10 nm en liposomas de tamaños <85 nm. El uso preferente de nanopartículas en el intervalo de tamaños de 1 nm a 10 nm se basa en la intención de disolver las nanopartículas, generando una concentración constante de iones metálicos. El hecho de utilizar partículas metálicas de los tamaños descritos es debido a la baja estabilidad que presentan las nanopartículas a medida que disminuye su tamaño.

La solicitud de patente española P200502041 y su solicitud internacional WO 2007/017550, describen un procedimiento para la obtención de clústeres cuánticos atómicos, denominados AQC, e identifican partículas de diversos metales con tamaños menores de 1 nm - 2 nm. Además, se describe cómo separarlas, estabilizarlas y utilizarlas; los detalles del método indican que las propiedades fisicoquímicas de los clústeres sintetizados mediante este procedimiento son distintas a las de las nanopartículas (partículas más grandes de 1 nm - 2 nm). Esto es debido a que existe una separación de los niveles de la energía de Fermi (hueco "HOMO-LUMO" o hueco de bandas) en los AQC, que provoca que estas partículas dejen de comportarse como metálicas; esto se observa fácilmente por la supresión de su banda plasmónica y la aparición de bandas distintas debido a las transiciones electrónicas entre los distintos niveles de energía de los clústeres. Estas dejan de comportarse de modo "metálico" y su comportamiento se hace de naturaleza molecular. Así, aparecen nuevas propiedades en estos clústeres que no se observan en las nanopartículas, micropartículas o los materiales metálicos masivos. Es debido a que las propiedades fisicoquímicas de los AQC no pueden simplemente extrapolarse a partir de las de las nano/micropartículas que, en principio, no se pueden predecir las propiedades que muestran estos clústeres a partir de las propiedades que muestran las nano/micropartículas, tales como las propiedades antibacterianas descritas anteriormente para las nanopartículas y los iones metálicos. Los AQC (en contraste con las nanopartículas, que requieren "estabilización" por carga o impedimento estérico mediante alguna molécula protectora) presentan una estabilidad extraordinaria debido precisamente a la existencia de este "hueco" del nivel de Fermi. Es decir, los clústeres, a diferencia de las nanopartículas, no se disuelven para generar iones, de manera que, en principio, tampoco puede hacerse la

extrapolación de que tengan propiedades bactericidas, como se describe en la solicitud de patente US2006280785A1.

Descripción de la invención

5 La presente invención se refiere al uso de clústeres cuánticos atómicos estables, AQC's, es decir, grupos de átomos con el número de átomos siendo menor de 500 (que corresponde a un tamaño de aproximadamente 2 nm), como agentes antimicrobianos, antifúngicos y biocidas. Se entiende que los AQC's son:

- 10 - AQC's, clústeres cuánticos atómicos estables,
 - AQC's caracterizados por estar compuestos por menos de 500 átomos de metal (Mn, $n < 500$),
 - AQC's caracterizados por estar compuestos por menos de 200 átomos de metal (Mn, $n < 200$),
 - AQC's caracterizados por estar compuestos de entre más de 2 y menos de 27 átomos de metal (Mn, $2 < n < 27$),
 - AQC's caracterizados por estar compuestos de entre 2 y 5 átomos de metal,
 15 - AQC's en donde los metales se seleccionan de Au, Ag, Co, Cu, Pt, Fe, Cr, Pd, Ni, Rh, Pb o combinaciones bi y multimetálicas,
 - AQC's en donde el metal es Au o Ag o sus combinaciones.

20 Se entiende que los biocidas son sustancias activas y preparadas que contienen uno o más principios activos, presentadas en la forma en que se administran al usuario, destinados a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejecutar control de algún otro tipo sobre cualquier organismo, nocivo por medios químicos o biológicos.

25 Además, se demostrará que el mecanismo de acción de estos AQC's es distinto del de las micro/nanopartículas, ya que los clústeres presentan actividades antimicrobianas, mientras que las nanopartículas de 5 nm probadas como controles a concentraciones (expresadas en el número de átomos del metal correspondiente) incluso 100.000 veces más elevadas que la de los AQC's, no presentan actividad alguna, como se describirá en los ejemplos más adelante. Además, en contraste con lo que se observa con las nanopartículas (haciendo referencia por ejemplo a la patente US2006280785A1), los clústeres presentan determinada especificidad frente a diversos patógenos, tanto por el tamaño del clúster, como por el tipo de elemento metálico utilizado, tal como se demostrará en los ejemplos descritos más adelante. Por último, los mecanismos también son distintos de los que pudieran producirse con sales metálicas para el mismo propósito, ya que se han utilizado como controles sales metálicas y no se observó actividad antibacteriana en las mismas condiciones experimentales, incluso a concentraciones 100.000 veces más elevadas que las de los clústeres.

35 Los AQC's de la presente invención presentan actividades antimicrobianas y biocidas a la concentración del orden de 1 nM (expresada en átomos del metal correspondiente), que es del orden de 100.000 veces menor que la concentración inhibitoria mínima (CIM) utilizada normalmente en los estudios de la actividad antimicrobiana de nanopartículas (véase, por ejemplo, la citada en la patente US2003108612A1), lo que demuestra que el mecanismo de acción es también distinto. Además, debido a la extrema estabilidad, estos clústeres pueden utilizarse directamente sin necesidad de utilizar ningún vehículo, evitando procesos tales como el descrito en la solicitud de patente US2006280785A1 para el uso de nanopartículas como agentes bactericidas.

45 La presente invención se basa en el hecho sorprendente de que los AQC's presentan propiedades antimicrobianas, antifúngicas y biocidas.

Las bacterias frente a las que actúan los AQC's incluyen:

- 50 - bacterias grampositivas seleccionadas entre el grupo de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis* y *faecium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani* y *Clostridium novyi*.
 - bacterias gramnegativas seleccionadas entre el grupo de *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus aphrophilus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter foetus*,
 55 *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio opticus*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella* spp, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Rickettsia rickettsii*, *Francisella tularensis*, *Pasteurella multocida*, *Yersinia pestis*, *Acinetobacter baumani*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Proteus mirabilis*, especies de *Bacteroides*, especies de *Fusobacterium*, *Bordetella pertussis* y *Legionella pneumophila*.
 60 - bacterias anaerobias, ácido-alcohol resistentes, espirilos, rickettsias, micoplasmas, actinomices y bacterias varias que, por ejemplo, incluyen *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Rickettsia*, *Mycobacterium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenuae*, *Treponema carateum*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia hermsii*, *Borrelia turicatae*, *Borrelia parkeri* y *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microtii* y *Mycobacterium leprae*.

65

Los hongos frente a los que actúan los AQCs incluyen a *Actinomyces*, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, cromoblastomices, coccidios, *Cryptococcus*, dermatofitos, *Fusarius*, *Histoplasma*, *Madura*, *Mocor*, *Nocardia*, paracoccidios, *Penicillium*, *Phaeohyphomyces*, *Scedosporium* y *Sporotricum*.

5 Estos también pueden utilizarse en combinación con otros agentes antifúngicos tales como, por ejemplo, Anfotericina, Caspofungina, Micafungina, Anidulafungina, Fluconazol, Flucitosina, Griseofulvina, Imidazol, Itraconazol, Cetoconazol, Miconazol, Nistatina, Posaconzol, Terbinafina y Voriconazol.

10 La presente invención se puede utilizar para el tratamiento de una enfermedad provocada por bacterias o para la inhibición del crecimiento bacteriano. Su uso está especialmente indicado en infecciones intrahospitalarias por agentes que se han hecho resistentes a los antibióticos tradicionales.

También, el objeto de la invención puede utilizarse *in vitro* para todos aquellos casos en donde sea indeseable el crecimiento bacteriano o para la preparación de kits para pruebas de diagnóstico clínico.

15 El objeto de la invención puede utilizarse para conferir propiedades antibacterianas a otros materiales tales como polímeros y plásticos; así como a materiales quirúrgicos y hospitalarios tales como vendas, apósitos y dispersiones y soluciones desinfectantes.

20 Los AQCs son adecuados para la preparación de un medicamento o un producto fitosanitario para el tratamiento de estados patológicos o fisiológicos en personas, animales y plantas.

Los AQCs son adecuados para la preparación de un medicamento para administrarse por vía transdérmica, transmucosa, bucal, oral, rectal, ocular, nasal, ótica, tópica, vaginal o parenteral.

25 Los AQCs son adecuados para la preparación de cosméticos y desinfectantes.

Los AQCs están particularmente indicados cuando la bacteria es resistente a un antibiótico diferente de los AQC. La administración de los AQC se puede combinar con la de otros tipos de antibióticos, que incluyen como ejemplos, penicilinas y medicamentos relacionados, carbapenémicos, monobactámicos, fluoroquinolonas, cefalosporinas parenterales y orales, aminoglucósidos, macrólidos, cetólidos, tetraciclinas, gliciliclinas, glucopéptidos, nitrofurantoinas, Fosfomicina, Rifamicina, Metronidazol, Quinupristina, Linezolid, Daptomicina, Cloranfenicol, Clindamicina, ácido fusídico, Trimetoprim y Celestine.

35 Los AQC también pueden utilizarse en combinación con nanopartículas que presentan actividad antibiótica conocida.

Los AQC están indicados para conferir propiedades biocidas a diversas formulaciones, tales como pinturas, sellantes, polímeros y plásticos.

40 Los AQC también pueden utilizarse en materiales de construcción, automatización y materiales textiles.

Los AQCS pueden utilizarse solos o en combinación con otros biocidas conocidos.

45 Los AQC son especialmente adecuados como biocidas para el tratamiento de aguas.

Para el uso de los AQCS, tanto en aplicaciones antibacterianas como biocidas, la concentración a utilizar (en referencia a átomos del metal correspondiente) es de aproximadamente 1 nM a 100 nM, o más elevada.

50 En toda la descripción y las reivindicaciones, no se pretende que la palabra "comprende" y sus variantes excluyan otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se harán obvios en parte a partir de la descripción y en parte a partir de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ejemplo y no se pretende que sean limitantes de la presente invención.

55 **Breve descripción de las figuras**

Fig. 1. - Muestra los halos obtenidos para los experimentos de inhibición del crecimiento frente a *E. coli* ATCC 90028.

60 Fig. 2. - Muestra los halos obtenidos para los experimentos de inhibición del crecimiento frente a *Staphylococcus aureus* ATCC 29213.

65 Fig. 3. - Muestra los halos obtenidos para los experimentos de inhibición del crecimiento frente a *Enterococcus faecalis* ATCC 29212.

Fig. 4. - Muestra los halos obtenidos para los experimentos de inhibición del crecimiento frente a *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

5 Fig. 5. - Muestra los halos obtenidos para los experimentos de inhibición del crecimiento frente a especies de *Candida*.

Descripción detallada de los métodos de realización

10 Los siguientes ejemplos demuestran claramente las propiedades antimicrobianas y biocidas de los AQC. El Ejemplo 1 describe la preparación de las muestras de AQC cuyas propiedades antibacterianas se describen en el Ejemplo 2. El Ejemplo 1 también describe las nanopartículas y los controles de sales metálicas correspondientes, utilizadas para comparar su actividad antimicrobiana, que se refleja también en el Ejemplo 2. El Ejemplo 3 describe la preparación de las muestras de AQC utilizadas en los experimentos de actividad biocida, así como la de los controles y muestras de biocidas de referencia.

15

Ejemplo 1

Preparación de los AQC, muestras de nanopartículas y muestras de control.

20 Ag 01; Ag05; Ag06; Ag07; Ag08. Control de Ag.

Au6; Au7; Au8; Au9. Control de Au (muestras Au6-8). Au10. Control de Au (muestra Au10).

1) Muestra de control de Ag: solución de AgNO_3 100 μM y bromuro de tetrabutilamonio 200 μM .

Muestras Ag05-Ag08: AQC de Ag.

25 La síntesis de los AQC de Ag se llevó a cabo en una celda electroquímica utilizando potenciometría galvanostática, aplicando una densidad de corriente constante de 0,2 mA/cm^2 durante distintos tiempos (t), en las siguientes condiciones experimentales: Electrodo de trabajo: Pt (6 cm^2). Contraelectrodo: Ag. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Solución electrolítica: bromuro de tetrabutilamonio 200 μM en agua. Temperatura: 25 °C.

30 Las muestras finales se diluyeron en agua para obtener una concentración final de clústeres 100 nM en átomos de Ag.

Todas las muestras presentaban dos picos de absorción de UV a 211 nm y 227 nm, así como una pequeña banda estrecha centrada alrededor de 260 nm.

35 Los tiempos de síntesis utilizados fueron:

2) Muestra Ag05; t = 210 minutos.

3) Muestra Ag06; t = 90 minutos.

4) Muestra Ag07; t = 65 minutos.

40 5) Muestra Ag08; t = 55 minutos.

6) Muestra Ag01: Nanopartículas de Ag.

45 La síntesis de nanopartículas de plata se realizó por reacción entre PVP, poli(N-vinil-2-pirrolidona), de peso molecular, $\text{PM}=10.000$ y nitrato de plata. En primer lugar, se preparó una solución de 50 ml de AgNO_3 20 nM. Después se pesaron 20 g de PVP en un vaso de precipitado de 250 ml y se disolvieron en agua destilada. Se añadió agua hasta alcanzar un total de 91,25 ml. A esta solución se añadieron 8,75 ml de solución de nitrato de plata. El vaso se colocó en un baño de agua a 70 °C durante 4 horas. Una vez terminada la reacción se añadió un exceso de acetona para precipitar las nanopartículas. Por decantación se eliminó parte del disolvente y el restante se eliminó por evaporación en una estufa. La muestra obtenida, dispersa en agua, presentó una banda de absorción a 410 nm característica de la banda plasmónica de las partículas de Ag. El tamaño de las nanopartículas, medido por MET, fue de 6 nm. La muestra para los ensayos microbiológicos se preparó realizando una etapa de lavado de una solución de 0,5 g en 10 ml de agua con 10 ml de acetona, para eliminar el exceso de PVP. Finalmente, la solución resultante se diluyó para obtener una solución de nanopartículas de Ag 100 nM.

55 7) Muestra de control de Au: HAuCl_4 100 μM y TBABr (bromuro de tetrabutilamonio) 200 μM en una mezcla 1:1 de acetonitrilo/agua.

Muestras Au6-Au9: AQC de Au.

60 La síntesis de los AQC de Au se llevó a cabo en una celda electroquímica utilizando potenciometría galvanostática, aplicando una densidad de corriente constante de 10 mA/cm^2 durante distintos tiempos en las siguientes condiciones experimentales: Electrodo de trabajo: Pt (2,5 cm^2). Contraelectrodo: Au. Electrodo de referencia: Ag/AgCl. Solución electrolítica: bromuro de tetrabutilamonio 0,1 M en una mezcla 1:1 de acetonitrilo/agua.

Atmósfera inerte de nitrógeno.

Temperatura: 25 °C

65

Las muestras finales se diluyeron en una mezcla 1:1 de acetonitrilo/agua para obtener una concentración final de clústeres 100 nM en átomos de Au.

Todas las muestras presentaban dos picos de absorción de UV-visible a 260 nm y 390 nm además de un pico pequeño a 470 nm. Las muestras Au6 y Au7 también presentaban un pico adicional a 300 nm.

5 Los tiempos de síntesis utilizados fueron:

8) Muestra Au6; t = 200 s.

9) Muestra Au7; t = 150 s.

10) Muestra Au8; t = 100 s.

10 11) Muestra Au9; t = 50 s.

12) Muestra AuW: Nanopartículas de Au.

La síntesis de nanopartículas de oro se llevó a cabo por el método de Brust [M. Brust, *et al.* J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1994, 801]. Para esto se prepararon dos soluciones. En primer lugar, 10 ml de HAuCl_4 30 mM. En

15 segundo lugar, se disolvieron 0,670 g de TOABr (bromuro de tetraoctilamonio) en 24 ml de tolueno. Se introdujo la solución de Au(III) en un matraz de 100 ml con una barra agitadora y se añadió lentamente la solución de TOABr con agitación, produciéndose un intercambio de la sal de Au(III) con la fase orgánica. Después se disolvieron 0,114 g de NaBH_4 en 30 ml de H_2O (0,1 M) y, utilizando un embudo, se añadió lentamente gota a gota sobre la mezcla anterior.

20 El hidruro reduce la sal de Au y la muestra adquiere un color rojo intenso característico de las nanopartículas de Au. Finalmente, se purificó la muestra. Para hacer esto se separó la fase acuosa. Se lavó la fase orgánica con 25 ml de H_2SO_4 0,1 M. Después se lavó 5 veces con 25 ml de agua destilada y, finalmente, se secó con Na_2SO_4 anhidro. La muestra obtenida, dispersa en tolueno, presentaba una banda de absorción a 540 nm, característica de la banda plasmónica de las nanopartículas de Au. El tamaño de las nanopartículas, medido por MET, fue de 5 nm. La muestra final utilizada en los ensayos microbiológicos se obtuvo disolviendo 333 μl del producto anterior en la cantidad

25 correspondiente de tolueno, de manera que la concentración final de partículas fuera de 100 μM .

13) Muestra control de Tol

Muestra que contenía HAuCl_4 100 μM y TOABr 200 μM en tolueno. Secada con Na_2SO_4 anhidro, filtrada a través un filtro plegado y finalmente a través de un filtro de 0,2 micrómetros.

30

Ejemplo 2

Ensayos de actividad antimicrobiana. Todas las muestras se esterilizaron por filtración a través de membranas de 0,22 micrómetros. El método utilizado para los ensayos de actividad antimicrobiana fue el de difusión en disco. Para

35 los ensayos, los discos de celulosa se cargaron por inmersión en las soluciones de AQC y después se secaron a 4 °C. La cantidad de solución de clúster que adsorbieron los discos del presente ejemplo fue de 25 ± 1 ml. El medio de crecimiento utilizado fue Agar Müeller-Hilton. La suspensión microbiana utilizada era de 0,5 McFarland. Los microorganismos ensayados fueron:

40 - *E. coli* ATCC 25922

- *E. faecalis* ATCC 29212

- *P. aeruginosa* ATCC 27853

- *S. aureus* ATCC 29213

- especies de *C. albicans* obtenidas de una muestra clínica

45

Los microorganismos se incubaron durante 24 horas a 35 °C en una atmósfera aerobia.

Las Figuras 1 a 5 muestran los halos observados con los diversos AQCs analizados, así como con las nanopartículas y las sales correspondientes probadas como controles. La Tabla 1 muestra los diámetros de los halos

50 observados utilizando un disco de celulosa de 6 mm de diámetro.

Tabla 1.- Resultados de los halos de inhibición observados (expresados en mm), frente a diversos microorganismos, para los experimentos descritos en el Ejemplo 2.

A partir de los experimentos antimicrobianos se deduce lo siguiente:

55

a) Muestras de Ag

Para las muestras de Ag se puede observar que el control de Ag (iones Ag^+) y la muestra Ag01 (nanopartículas de Ag) no dieron halos de inhibición en ninguno de los ensayos. Los AQCs de Ag tienen halos en todos los ensayos, excepto en el caso de *E. faecalis*. También se puede observar que los halos para *C. albicans* son más grandes para todas las muestras de AQC ensayadas.

60

b) Muestras de Au

Para las muestras de Au se puede observar que los iones Au^{3+} [bien en una mezcla de acetonitrilo-agua (control de Au), bien en tolueno (control de Tol)] y las nanopartículas de Au (Au10) no dieron ningún halo de inhibición. Las

65

muestras de AQC presentaron distintos comportamientos dependiendo del tipo de muestra. Así, la muestra Au6 presentó halos de inhibición solo frente a *C. albicans*, *E. coli* y *S. aureus*. Las muestras Au7 y Au8 presentaron actividad solo frente a *E. coli*. Por último, la muestra Au9 no presentó ninguna actividad.

- 5 Por lo tanto, se ha demostrado que la actividad de los AQC es distinta dependiendo del tipo de material (Au o Ag en estos ejemplos concretos) y también dependiendo del tamaño dentro del mismo material (que está relacionado con el tiempo de síntesis de acuerdo con el indicado en la solicitud de patente n.º P200502041 y su extensión PCT/ES2006/070121. Además se ha demostrado claramente que la actividad de los AQC es más elevada que la de las sales y nanopartículas de los metales ensayados, ya que los últimos no presentaron ninguna actividad en las
- 10 condiciones en que se realizaron los ensayos.

Ejemplo 3

15 Para el estudio de la actividad biocida de los AQC se prepararon tres muestras distintas.

- Muestra B1: se preparó una pintura de recubrimiento de base acuosa con un adyuvante de copolímero estireno-acrílico en dispersión acuosa al 50 % y una concentración de pigmento en volumen del 22 %, pigmentada con óxido de titanio y con una viscosidad de 3 Pa·s. Esta muestra se utilizó como control. Muestra B2: A la muestra B1 se le
- 20 añadió una muestra de AQC Ag05 5 µM (véase el Ejemplo 1), diluida en la muestra final al 0,2 %, lo que es equivalente a una concentración final de clústeres en la pintura de 10 nM.

Muestra B3: A la muestra B1 se le añadió una muestra de AQC Ag05 5 µM (véase el Ejemplo 1), diluida en la muestra final al 0,4 %, lo que es equivalente a una concentración final de clústeres en la pintura de 20 nM.

- 25 Las muestras se almacenaron en recipientes de 100 ml cerrados y se mantuvieron a temperatura ambiente (22 °C) durante 3 meses. Se observó que, en las muestras que contenían AQC (B2 y B3), había comenzado una pequeña fermentación anaerobia que se manifestó por un burbujeo homogéneo en el recipiente. Sin embargo, no se observaron en las muestras cambios en la viscosidad, en comparación con la viscosidad inicial (3 Pa·s). Por el contrario, la muestra utilizada como control, además de la fermentación anaerobia que se observó, presentó una
- 30 caída brusca de la viscosidad (1 Pa·s), lo que indicó la clara degradación del polímero en las condiciones de la prueba. Este ejemplo demuestra claramente la actividad biocida de los AQC para inhibir la degradación de polímeros utilizados en formulaciones de pinturas de recubrimiento.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Uso de clústeres cuánticos atómicos (AQC) estables, caracterizados por estar compuestos por menos de 500 átomos de metal seleccionados de Au, Ag, Co, Cu, Pt, Fe, Cr, Pd, Ni, Rh, Pb o cualquiera de sus combinaciones, como agentes biocidas.
2. Uso de AQC de acuerdo con la reivindicación 1, en donde dichos AQC están compuestos por menos de 200 átomos de metal.
- 10 3. Uso de AQC de acuerdo con la reivindicación 2, en donde dichos AQC están compuestos de entre 2 y menos de 27 átomos de metal, preferentemente de 2 a 5 átomos de metal.
4. Uso de AQC de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde los metales de dichos AQC se seleccionan de Au y Ag y cualquiera de sus combinaciones.
- 15 5. Uso de AQC de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, a una concentración, con referencia a los átomos del metal correspondiente, de al menos 1 nM, preferentemente entre 1 nM a 100 nM.
- 20 6. Uso de AQC de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 como agentes antimicrobianos o antifúngicos, preferentemente como agentes antimicrobianos frente a bacterias grampositivas, gramnegativas, anaerobias, ácido-alcohol resistentes, espirilos, rickettsias, micoplasmas, actinomices o bacterias varias.
- 25 7. Uso de AQC de acuerdo con la reivindicación 6, como agentes antimicrobianos frente a bacterias grampositivas que se seleccionan de la lista que comprende: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Enterococcus faecalis* o *faecium*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium tetani* y *Clostridium novyi*.
- 30 8. Uso de AQC de acuerdo con la reivindicación 6, como agentes antimicrobianos frente a bacterias gramnegativas de la lista que comprende: *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus haemolyticus*, *Haemophilus parahaemolyticus*, *Haemophilus aphrophilus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Campylobacter foetus*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Helicobacter pylori*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio opticus*, *Salmonella typhimurium*, especies de *Salmonella*, *Shigella sonnei*, *Shigella boydii*, *Shigella flexneri*, *Shigella dysenteriae*, *Escherichia coli*, *Brucella melitensis*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Rickettsia rickettsii*, *Francisella tularensis*, *Pasteurella multocida*, *Yersinia pestis*, *Acinetobacter baumani*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Proteus mirabilis*, especies de *Bacteroides*, especies de *Fusobacterium*, *Bordetella pertussis* y *Legionella pneumophila*.
- 35 9. Uso de AQC de acuerdo con la reivindicación 6, como agentes antimicrobianos frente a bacterias seleccionadas de la lista que comprende: *Chlamydia*, *Chlamydophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Rickettsia*, *Mycobacterium*, *Treponema pallidum*, *Treponema pertenue*, *Treponema carateum*, *Leptospira interrogans*, *Borrelia hermsii*, *Borrelia turicatae*, *Borrelia parkeri* y *Borrelia burgdorferi*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum*, *Mycobacterium microtii* y *Mycobacterium leprae*.
- 40 10. Uso de AQC de acuerdo con la reivindicación 6, como agentes antifúngicos frente a hongos seleccionados de la lista que comprende: *Actinomyces*, *Aspergillus*, *Blastomyces*, *Candida*, *Cromoblastomices*, *Coccidios*, *Cryptococcus*, *Dermatophitos*, *Fusarius*, *Histoplasma*, *Madura*, *Mocor*, *Nocardia*, *Paracoccidios*, *Penicillium*, *Phaeohyphomyces*, *Scedosporium* y *Sporotricum*.
- 45 11. Uso de AQC de acuerdo con la reivindicación 10, en combinación con otro agente antifúngico seleccionado de la lista que comprende: Anfotericina, Caspofungina, Micafungina, Anidulafungina, Fluconazol, Flucitosina, Griseofulvina, Imidazol, Itraconazol, Cetoconazol, Miconazol, Nistatina, Posaconazol, Terbinafina y Voriconazol.
- 50 12. AQC como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, para su uso en el tratamiento de enfermedades provocadas por bacterias o para la inhibición del crecimiento bacteriano, preferentemente para el tratamiento de enfermedades provocadas por bacterias resistentes a antibióticos.
- 55 13. AQC de acuerdo con la reivindicación 12, para su uso en el tratamiento de infecciones hospitalarias.
- 60 14. Uso de AQC de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, como un producto fitosanitario, cosmético o desinfectante, o cualquier otro producto seleccionado de la lista que comprende: kits para pruebas de diagnóstico clínico *in vitro*, pinturas, sellantes, polímeros y plásticos.
- 65 15. Uso de AQC de acuerdo con la reivindicación 14, en donde dichos productos se utilizan en: tratamiento de aguas, construcción, automatización, material textil, materiales hospitalarios y quirúrgicos.

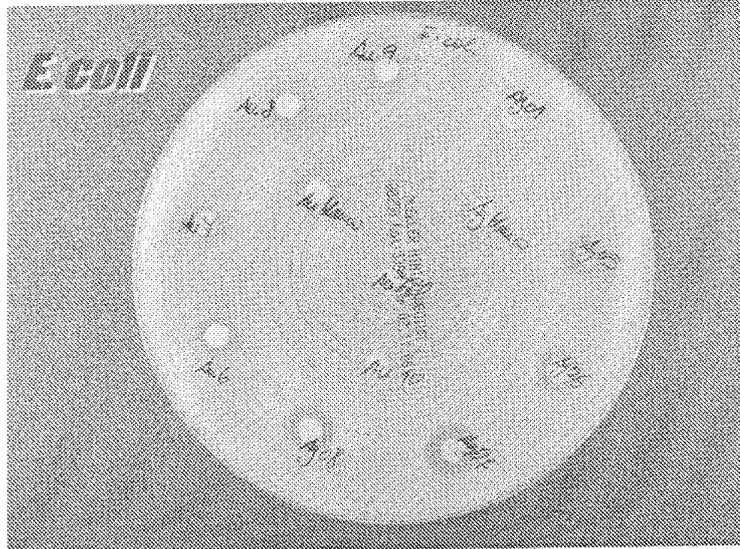


FIG 1

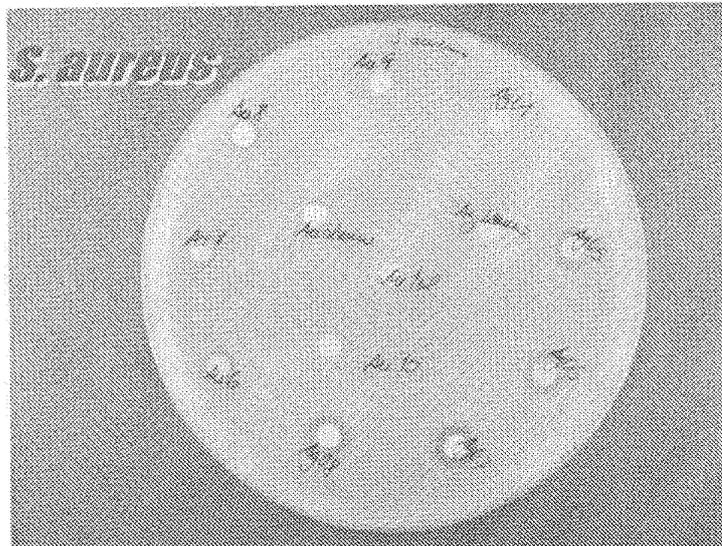


FIG 2

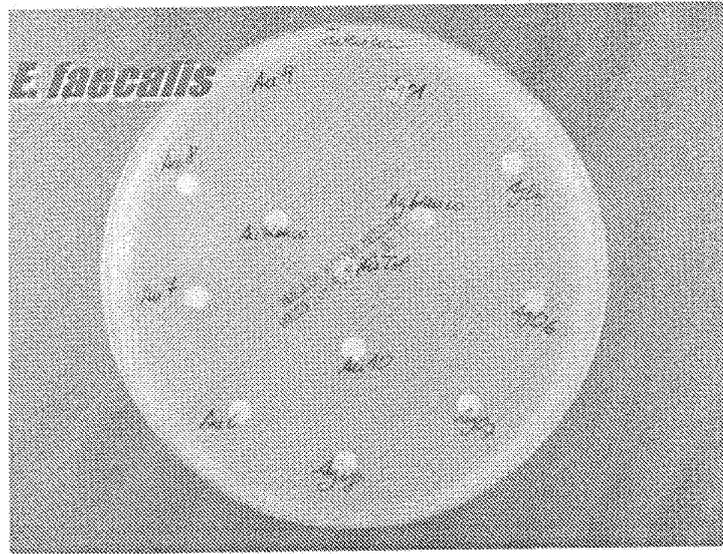


FIG 3

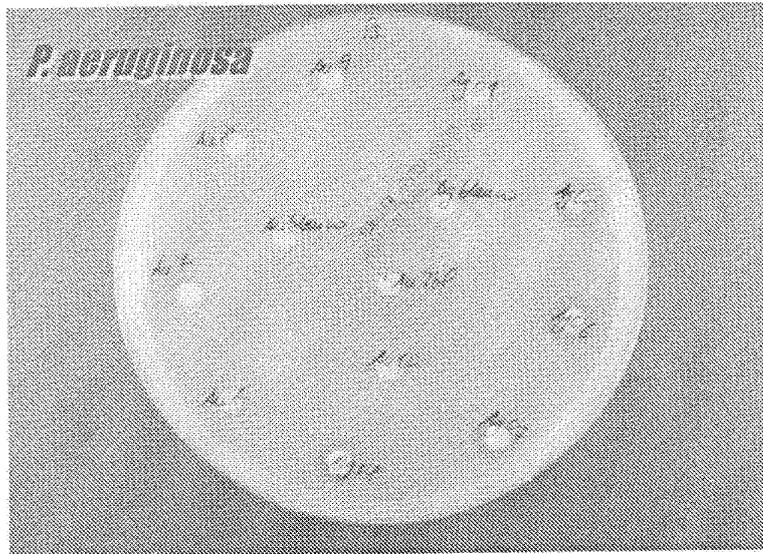


FIG 4

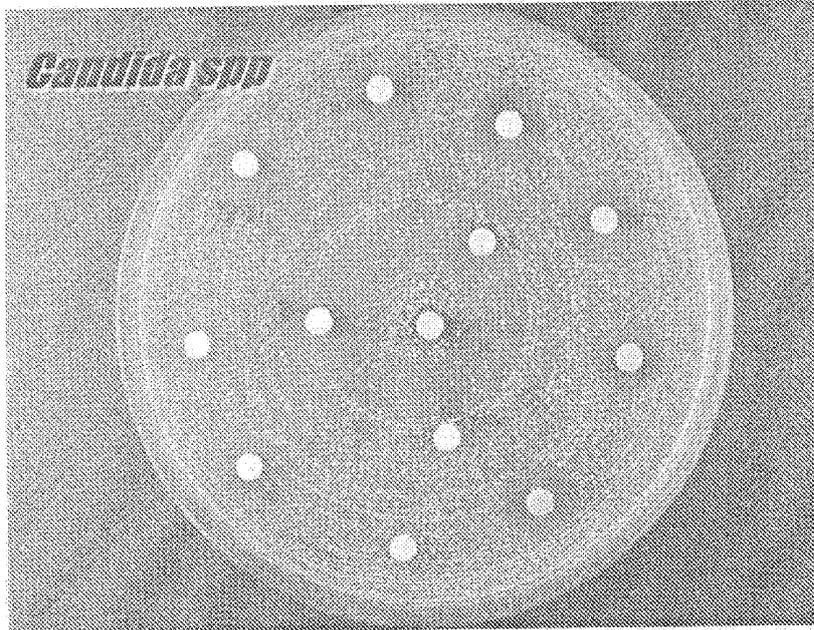


FIG 5