

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 598 531**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/44** (2006.01)

**A61K 9/14** (2006.01)

**A01N 59/20** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.12.2009 PCT/US2009/006496**

87 Fecha y número de publicación internacional: **17.06.2010 WO10068275**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2009 E 09832240 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.07.2016 EP 2367552**

54 Título: **Nanoformulación antibacteriana y antifúngica a base de sílice**

30 Prioridad:

**10.12.2008 US 332021**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.01.2017**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CENTRAL FLORIDA RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (50.0%)**

**12201 Research Parkway, Suite 501**

**Orlando, FL 32826, US y**

**SANTRA, SWADESHMUKUL (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SANTRA, SWADESHMUKUL**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 598 531 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

Nanoformulación antibacteriana y antifúngica a base de sílice

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a nanoformulaciones a base de sílice, y en particular a composiciones y métodos para la fabricación de nanopartículas a base de sílice y nanogeles a base de sílice, o una combinación de los mismos, que proporcionan un nanoentorno único para albergar agentes antibacterianos y antifúngicos, a un método de síntesis y a su uso.

**Antecedentes y técnica anterior**Preocupación mundial

La globalización de los negocios, los viajes y las comunicaciones atraen una mayor atención a los intercambios internacionales entre comunidades y países, incluyendo la globalización potencial del ecosistema bacteriano y patógeno. Se han desarrollado bactericidas y fungicidas para el control de enfermedades en el hombre, animales y plantas, y deben evolucionar para seguir siendo eficaces a medida que aparecen más y más bacterias y hongos resistentes a antibióticos, pesticidas e insecticidas en todo el mundo.

La resistencia bacteriana a agentes antimicrobianos también ha surgido, en todo el mundo, como una de las principales amenazas para el hombre y el estilo de vida agrícola. La resistencia a los agentes antibacterianos y antifúngicos se ha convertido en un problema agrícola que requiere atención y mejoras en los materiales de tratamiento en uso hoy en día.

Por ejemplo, centrándose en las plantas, hay más de 300.000 enfermedades que afectan a las plantas en todo el mundo, lo que resulta en miles de millones de dólares en pérdidas de cultivos al año. En 1990, se gastaron más de 7300 millones de dólares en Estados Unidos en productos plaguicidas.

Los agentes antibacterianos y antifúngicos (anti-B/F) incluyen, pero no se limitan a, cobre metálico (Cu), sales de cobre, complejos de cobre, zinc metálico (Zn), óxidos de zinc, sales de zinc, plata metálica (Ag), sales de plata, complejos de plata, dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), óxidos de cerio, óxidos de magnesio, óxidos de circonio, polietilenoimina (PEI), carbono, carbono u hollín mezclados, fulerenos, nanotubos de carbono y similares. Los compuestos anteriores son solo algunos ejemplos de agentes antibacterianos y antifúngicos usados por el hombre en un intento por controlar o eliminar las enfermedades infecciosas en el medio ambiente mundial.

Los formulaciones antibacterianas/antifúngicas (anti-B/F) existentes en la actualidad se podrían mejorar y ser más eficaces si se incluyesen las siguientes funciones en la formulación. Por ejemplo, una formulación deseable tendría una mayor distribución uniforme sobre el área de superficie tratada, mejora de la adherencia a la superficie tratada, un medio para controlar y mantener la liberación de los ingredientes activos, y niveles de dosificación que eviten cualquier impacto tóxico sobre el medio ambiente y/o la superficie tratada.

La presente invención proporciona una composición que aloja formulaciones antibacterianas/antifúngicas y juntas, la composición hospedadora y los ingredientes antibacterianos/antifúngicos proporcionan beneficios funcionales que resuelven muchos problemas y superan muchas limitaciones de la técnica anterior.

Se informa de un método de síntesis para la preparación de una matriz de sílice con partículas metálicas incorporadas en la Patente de Estados Unidos 6.548.264 de Tan et al., Estados Unidos 6.924.116 de Tan et al. y la Patente de Estados Unidos 7.332.351 de Tan et al.

Uso de fungicidas/bactericidas de cobre (Cu)

En la agricultura moderna, los compuestos de cobre (Cu) se usan ampliamente como fungicidas/bactericidas. Los compuestos de Cu, en una concentración relativamente baja, son bastante tóxicos para organismos talofitas, tales como hongos, bacterias y algas. Esta característica de toxicidad se ha usado durante más de 100 años para el control de enfermedades fúngicas y bacterianas de las plantas. En 1761, se descubrió que los granos de semillas remojadas en una solución diluida de sulfato de cobre inhiben los hongos transmitidos por la semilla.

El mayor avance en las sales de Cu, sin duda, se produjo cuando el científico francés Millardet anunció al mundo en 1885 que había encontrado una cura para la temida plaga usando mezclas de sulfato de cobre, cal y agua (conocido como caldo bordelés). Los fungicidas/bactericidas a base de Cu se usan en todo el mundo, ya que los compuestos de Cu son relativamente seguros; el desarrollo de resistencia por los patógenos de las plantas ha sido mínimo; en demanda de los países en desarrollo del tercer mundo y las crecientes necesidades de alimentos que requieren una agricultura más eficiente; y un aumento de las regulaciones y restricciones gubernamentales o la prohibición total de productos alternativos debido a su impacto toxicológico y medioambiental requiere formulaciones de tratamiento

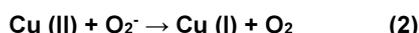
seguras, como describe H.W. Richardson en el Handbook of Copper Compounds and Applications, "Copper fungicidas/bactericidas" H. W. Richardson, Editor, 1997, Marcel Dekker, Inc.: Nueva York, NY, páginas 93-122.

5 La toxicidad del Cu en gran parte es debida a su tendencia a alternar entre sus estados de oxidación cuproso, Cu (I),  
y cúprico, Cu (II). En condiciones aeróbicas, este ciclo redox da lugar a la generación de radicales hidroxilo  
altamente reactivos que dañan fácil y eficientemente a biomoléculas tales como el ADN, proteínas y lípidos. Las  
reacciones subyacentes de tipo Fenton que afectan a especies reactivas de oxígeno se pueden describir como  
reacciones de Haber-Weiss catalizadas por Cu. Aunque la reacción de peróxido de hidrógeno con superóxido tiene  
principalmente una constante de velocidad insignificante como se muestra a continuación en la ecuación 1, esta  
10 velocidad se acelera enormemente en presencia de Cu.

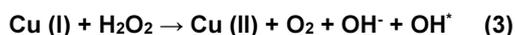


15 Se cree que los iones de Cu catalizan esta reacción como se muestra en las ecuaciones 2 y 3.

El Cu (II) se reduce inicialmente por superóxido como se muestra en la ecuación 2,



20 seguido de la reoxidación por el peróxido de hidrógeno como se muestra en la ecuación 3,



25 lo que resulta en una producción neta del radical hidroxilo.

La mayoría de los fungicidas y bactericidas son poco eficaces para matar una infección ya establecida de hongos y  
bacterias, respectivamente, sino que actúan protegiendo al hospedador de la posibilidad de infección. Si se aplica el  
protector después de la aparición de los síntomas de la enfermedad, a menudo el control será mínimo. Del mismo  
modo, los compuestos de Cu inhiben la germinación de la espora fúngica o la célula bacteriana, las "semillas"  
30 principales responsables de la difusión y la reproducción del hongo o la bacteria. Debido a que las esporas o células  
retiradas del ciclo de infección actual no maduran, ni se reproducen en presencia de Cu, el hongo o la bacteria se  
matan con eficacia.

35 El valor fungicida/bactericida es una medida de la toxicidad de un material para el patógeno y generalmente se  
expresa como DL<sub>50</sub>, principalmente una medición de la toxicidad *in vitro* en laboratorio, en la que DL significa dosis  
letal y DL<sub>50</sub> es la cantidad de material o dosis que causa la muerte del 50 % de la población objetivo.

40 El valor de protección es una medida de la capacidad de un material para proteger al organismo hospedador, por  
ejemplo, una planta, de la infección, que principalmente es una medida en condiciones de campo. Por ejemplo, el  
sulfato de Cu tiene una excelente capacidad para inhibir la germinación de esporas fúngicas o de células  
bacterianas en el laboratorio; sin embargo, en el campo que no presenta persistencia, debido a su solubilidad. Tiene  
un valor de protección limitado, ya que se elimina rápidamente de la superficie de la planta con la primera lluvia. Por  
otra parte, el sulfato de cobre puede producir suficiente Cu soluble para ser tóxico para la planta (fitotóxico). Se debe  
45 seleccionar un compuesto de Cu que sea relativamente resistente a la intemperie y que proporcione suficiente Cu  
para ser tóxico a las esporas de hongos y células bacterianas sin afectar negativamente a la planta.

50 Una consideración importante es si usar protección con fungicida o bactericida "soluble" o "insoluble" de cobre (Cu)  
a largo plazo. El Cu "soluble" se refiere a sales a base de Cu (tales como sulfato de Cu) que se hidrolizan  
completamente en agua, produciendo Cu iónico. Los compuestos de Cu "insolubles" (poco solubles) actúan como  
depósito desde el que se liberan iones de Cu a la superficie de la planta en la que se deposita tras su aplicación.

55 La estimación del mercado mundial de fungicidas y bactericidas por el tipo de compuesto de Cu y el año de  
introducción se muestra en la Tabla 1 a continuación (datos publicados en 1988, Fuente: HW Richardson, Handbook  
of Copper Compounds and Applications, *supra*).

Tabla 1 - Estimación del mercado mundial de fungicidas/bactericidas según el tipo de compuesto de Cu

| Compuesto de Cu   | Cantidad (Toneladas/Año) | % del mercado | Año introducido |
|---|--------------------------|---------------|-----------------|
| Oxicloruro de Cu (II)                                   | 71.000                   | 51,1          | 1990            |
| Sulfato de Cu (II)                                      | 48.000                   | 34,6          | 1761            |
| Sulfato de Cu (II) + cal (caldo bordelés)               |                          |               | 1873            |
| Sulfato de Cu (II) + ceniza de sosa (mezcla de Borgoña) |                          |               |                 |

|  |        |     |      |
|--|--------|-----|------|
| Sulfato básico de Cu (II)  |        |     |      |
| Óxido de Cu (I)  | 6.000  | 4,3 | 1932 |
| Hidróxido de Cu (II)   | 11.000 | 7,9 | 1960 |
| Otros: complejo de Cu (II) amoniaco, CO <sub>3</sub> y PO <sub>4</sub> |        |     | 1917 |

Está claro que los fungicidas/bactericidas a base de Cu se han aplicado durante largo tiempo y tienen un alto impacto social y económico en la agricultura, en el tratamiento de aguas y en la vida doméstica. Hay aproximadamente 2000 productos registrados que contienen compuestos de cobre como ingredientes activos.

5

En Estados Unidos hay registrados varios compuestos de Cu para la gestión de más de 100 enfermedades en casi 50 cultivos alimentarios. Los compuestos de Cu presentan distintos grados de eficacia para cualquier organismo objetivo en cualquier hospedador dado. Las formas más comunes del Cu que satisfacen estas condiciones en diversos grados son los productos de hidrólisis normales de las sales de Cu (I) y Cu (II) (también conocidas como compuestos de "Cu insoluble"): óxido de Cu (I) (Cu<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), oxiclورو de Cu (II) (CuCl<sub>2</sub> · 3 Cu(OH)<sub>2</sub>), sulfato tribásico de Cu (II) (CuSO<sub>4</sub> · 3 Cu(OH)<sub>2</sub>), e hidróxido de Cu (Cu(OH)<sub>2</sub>). A mediados de los años 1930, el caldo bordelés fue reemplazado en gran medida por el sulfato básico de Cu (II), el óxido de Cu (I), y el oxiclورو de Cu (II). Estos compuestos de Cu son fáciles de manejar y relativamente menos fitotóxicos en comparación con el caldo bordelés. El hidróxido de Cu se introdujo en 1960. Kocide® 3000 es el último producto a base de hidróxido de Cu de la DuPont Company, Wilmington, DE, que es uno de los fungicidas/bactericidas más populares.

10

15

Los compuestos de Cu usados actualmente poseen un conjunto único de propiedades físicas y químicas. Se diferencian en su cantidad total de contenido metálico de Cu y solubilidad acuosa. Se entiende bien que la actividad antibacteriana dependerá de la disponibilidad de los iones de Cu solubles en la formulación. Entre los compuestos de Cu existentes, son menos solubles los sulfatos tribásicos de cobre y el óxido cuproso, mientras que los hidróxidos de Cu son más solubles que el oxiclورو de Cu.

20

Una vez más, el exceso de Cu provocará fitotoxicidad y afectará negativamente al medio ambiente mientras que los compuestos poco solubles de Cu serán menos eficaces, lo que requiere múltiples aplicaciones, y por lo tanto más mano de obra. Una formulación de Cu robusta debe cumplir al menos los siguientes tres criterios: (i) la tasa de liberación de Cu se debe mantener a un nivel óptimo (mecanismo de liberación sostenida mientras se reduce al mínimo la fitotoxicidad) para proporcionar una protección a largo plazo contra el patógeno, (ii) el compuesto de Cu se debe adherir bien a la superficie de la planta para resistir la lluvia y el viento de manera que no se requerirán múltiples aplicaciones y (iii) el compuesto de Cu no provoca toxicidad para el medio ambiente (es decir, medioambientalmente seguro). Sin embargo, debido a sus propiedades químicas y físicas inherentes, los compuestos de Cu existentes están muy limitados para cumplir estos criterios.

25

30

Con respecto a los compuestos de cobre (Cu), la eficacia de un compuesto de Cu se puede mejorar considerablemente al reducir el tamaño de partícula de acuerdo con Torgeson, DC, ed. Fungicides - An Advanced Treatise, Agricultural and Industrial Applications and Environmental Interaction. Vol. 1. (1967), Academic Press: Nueva York, N. Y., página 697. Cuanto menor sea el tamaño de partícula mayor es el número de partículas por gramo y por lo tanto mayor es la actividad fungicida o bacteriana. Esto da la bienvenida a la nanociencia y la nanotecnología que se ocupa de cuestiones a escala nanométrica, normalmente un rango nanométrico de 1-100.

35

Navarro, E., et al., en "Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi," *Ecotoxicology*, 2008. 17(5): páginas 372-386 enseña que el área superficial específica como se muestra en la Fig. 1a aumenta exponencialmente a medida que el tamaño de partícula disminuye por debajo de 100 nanómetros. Del mismo modo, Oberdorster, G. et al., en *Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles*, *Environmental Health Perspectives*, 2005. 113(7): páginas 823-839 enseña que el porcentaje de átomos de la superficie aumenta de forma exponencial a medida que el tamaño de partícula disminuye por debajo de 100 nm como se muestra en la Fig. 1b. Por lo tanto, con partículas más pequeñas se mejora la cobertura y significativamente hay más área de superficie disponible por gramo de producto para liberar iones de Cu cuando está presente la humedad.

45

Las partículas más pequeñas también resisten un mejor desalojo, ya que son más ligeras y tienen una mayor área de superficie en relación con su peso; por lo tanto, una mayor área de contacto con la superficie de la planta, y el resultado es un aumento en la fuerza de adherencia total. Las formulaciones de Cu con partículas más pequeñas por lo tanto producen mejoras en el control de la enfermedad a través de una mejor cobertura, resistencia a la lluvia, y la longevidad del producto y la liberación de los iones de Cu sobre la superficie de la planta. En este sentido, en la última década se han realizado algunas mejoras en la calidad del producto sobre los compuestos de Cu. Hasta la fecha, sin embargo, no se ha realizado ningún gran avance que pudiera ser considerado revolucionario. Esto exige el desarrollo enérgico de una nueva generación de fungicidas/bactericidas a base de Cu que cumpla con los criterios antes mencionados.

50

55

Inhibición del crecimiento de moho y hongos mildiu

5 El crecimiento de los hongos, como por ejemplo, el moho y los hongos mildiu es un problema serio en ambientes cálidos y húmedos, como en climas tropicales. En presencia de nutrientes que se encuentran en abundancia en los materiales de la casa/de construcción tales como paredes secas, madera, lechada, base de alfombras y similares, el moho y los hongos mildiu prosperan.

10 El moho y los hongos mildiu tienen características similares, pero son diferentes tipos de hongos microscópicos y a menudo son diferentes en color y textura y se pueden observar creciendo en objetos tanto en el interior como en el exterior de los edificios. La formación de moho y hongos mildiu no solo es perjudicial para la salud, sino que también presenta un aspecto antiestético cuando se establecen colonias en las superficies interiores o exteriores de los edificios. El *hongo mildiu* se encuentra más a menudo en duchas, bañeras, lechada de baldosas de cerámica, papel y tela de cuartos de baño; el *moho* por lo general se encuentra en alimentos. Pueden ser difíciles de distinguir, ya que ambos usan esporas para su reproducción. El moho a menudo es de color negro, verde, rojo o azul, mientras que el hongo mildiu generalmente es gris o blanco. Los olores a humedad y a moho son producidos por los cambios químicos que tienen lugar durante el proceso de la vida del moho y se designan científicamente como compuestos orgánicos volátiles microbianos (mVOCs). Los productos de desecho son producidos por los mohos en crecimiento activo.

20 Las esporas del moho transportadas por el aire pueden comprometer seriamente la calidad del aire interior y causar alergia severa, asma y otros problemas inmunológicos. Efectos en la salud, tales como dolores de cabeza, mareos, náuseas y tos se han relacionado con la exposición a mVOCs. También puede ocurrir irritación de los ojos y de la garganta como resultado de la respiración de toxinas del moho. Los alimentos con moho no deben ser consumidos. La infestación por hongo mildiu sobre papel y algunas telas no se puede limpiar, pero por lo general un eliminador de hongo mildiu se puede deshacer del hongo mildiu en superficies más duras, como por ejemplo, superficies de baños, cocinas y en las paredes exteriores.

30 Las esporas del moho son resistentes a alta temperatura, a la luz ultravioleta y a la desecación. Las esporas son abundantes en el medio ambiente y permanecen latentes en condiciones desfavorables y germinan rápidamente en un ambiente favorable (calor, humedad y nutrientes). Las soluciones de lejía son eficaces para matar tanto el moho como el hongo mildiu y se consideran un tratamiento muy efectivo en todo el mundo. Sin embargo, la acción de la lejía no dura mucho tiempo; se requieren múltiples aplicaciones cada una o dos semanas.

35 La Patente de Estados Unidos 3.992.146 de Fazzalari describe un proceso de uso de soluciones biocidas que contienen sulfato de cobre y un agente tensioactivo para inhibir el crecimiento de hongos sobre superficies porosas duras, tales como lechada.

40 Es conveniente usar la nanotecnología para ampliar el uso de formulaciones de nanopartículas/nanogeles de sílice cargadas de cobre (Cu) con una actividad antibacteriana superior para tratar áreas que favorezcan y fomenten el crecimiento de moho y hongos mildiu; además, es conveniente que un solo tratamiento no pierda su eficacia durante, al menos, dos a seis meses debido a la liberación de Cu iónico de una manera lenta y sostenida y en cantidades que no violen la EPA Water Quality Standard Rule publicada el 1 de diciembre de 1992, que establece las normas de la calidad del agua para el cobre como contaminante tóxico prioritario.

45 Tratamiento de enfermedades en plantas

El estado de la técnica para los métodos y el tratamiento de enfermedades en plantas, y específicamente el cancro en plantas de cítricos se encuentra en una muestra representativa de las patentes enumeradas a continuación:

50 La Patente de Estados Unidos 3.983.214 de Misato et al., enseña composiciones fungicidas y un método para la protección de plantas mediante el uso de composiciones que contienen ácidos orgánicos como ingrediente activo, sales de metales alcalinos de estos ácidos orgánicos, citrato férrico, lactato férrico, glicerina, cloruro de aluminio y ésteres formados entre el azúcar y ácidos grasos superiores que tienen de 8 a 18 átomos de carbono. Las composiciones no tienen fitotoxicidad y no hay toxicidad para los mamíferos y no presentan ningún riesgo de contaminación del suelo.

55 La Patente de Estados Unidos 5.462.738 de LeFiles et al., desvela un bactericida/fungicida fluido seco de hidróxido de cobre granular con actividad biológica mejorada y un método para su preparación y uso.

60 La Patente de Estados Unidos 5.939.357 de Jones et al., proporciona una composición fungicida que tiene un ingrediente de sal inorgánica que contiene bicarbonato que mejora la eficacia de un ingrediente fungicida para el tratamiento de cultivos.

La Patente de Estados Unidos 6.471.976 de Taylor et al., desvela un bactericida/fungicida de complejo de cobre mejorado que contiene un ácido policarboxílico parcialmente neutralizado y un método para su preparación y uso.

65 La Patente de Estados Unidos 7.163.709 de Cook et al., desvela una composición y un método para proporcionar formas o compuestos iónicos de cualquier combinación de tres metales (cobre, oro y plata) para producir un producto que se puede usar como agente antimicrobiano, desinfectante de superficies duras,

pulverizador foliar o tratamiento del agua. La composición se pulveriza, nebuliza, vaporiza, o humidifica para producir partículas micronizadas que son capaces de permanecer en suspensión en el aire durante largos periodos de tiempo para actuar sobre las esporas de hongos y/o patógenos transportados por el aire. Esta sería una composición enormemente cara.

5 La Patente de Estados Unidos 7.226.610 de Winniczuk enseña composiciones y métodos para el tratamiento y la prevención de enfermedades en plantas, especialmente el cancro de los cítricos, usando una composición que incluye varias combinaciones de d-limoneno, cera y alcohol monohídrico.

10 La Publ. de Patente de EEUU n.º 200110051174 de Staats proporciona una composición antimicrobiana que contiene compuestos de amonio cuaternario, un agente tensioactivo, un agente humectante, un agente de secado 10, un agente formador de película hidrófila, un agente de impermeabilización hidrófobo y agua, que tiene propiedades antivirales, antibacterianas, y antifúngicas, aplicada a plantas y árboles mediante revestimiento por pulverización y/o por administración sistémica para proteger contra organismos nocivos y destructivos.

15 La Publ. de Patente de EE.UU. n.º US 2007/0087023 y la Publ. de Patente de EE.UU. n.º US 15 2007/0098806, ambas de Ismail et al., desvelan un agente antimicrobiano a base de polímero que incluye un polímero soluble en agua e iones metálicos oligodinámicos (por ejemplo, partículas de plata de tamaño nanométrico) que interactúan con el polímero soluble en agua para tratar o prevenir el cancro de los cítricos.

20 El documento de Estados Unidos 2004/0096421 A1 desvela materiales complejos de dominio orgánico/dominio inorgánico que comprenden una composición de acuerdo con el preámbulo de la reivindicación independiente 2, y un método para la síntesis de estos materiales según el preámbulo de la reivindicación independiente 1. Los materiales híbridos conocidos se pueden usar como reactivos de hidrofiliidad y se aplican a las superficies de diversas sustancias, tales como una superficie de resina y una superficie recubierta. Los materiales híbridos también se pueden usar como reactivo antifúngico/antibacteriano, que se puede usar especialmente en forma de una mezcla de los mismos con un cemento.

25 El documento de Estados Unidos 2007/0140951 A1 desvela nanopartículas, sus procesos de fabricación y sus composiciones. Las nanopartículas son a base de óxido de metal. Un ejemplo de nanopartículas a base de óxido metálico son nanocristales de óxido de cobre del sistema Cu/Cu<sub>2</sub>O/CuO. Los nanocristales de óxido de cobre se preparan por un proceso que implica la descomposición térmica de acetato de cobre (I) a temperatura elevada en presencia de un tensioactivo. Esto da lugar a nano partículas de Cu<sub>2</sub>O altamente mono dispersas y cristalinas. Las evidencias de Cu<sup>2+</sup> en XPS y la caracterización óptica de los nanocristales sugerían la existencia de una capa delgada de CuO amorfo en la interfaz nanocristal-ligando.

30 Por lo tanto, hay una amplia gama de composiciones fungicidas/bactericidas representadas en la literatura de patentes con formulaciones que incluyen ácidos, compuestos poliméricos, iones metálicos, 20 componentes poco convenientes tales como tensioactivos o aceites. También se debe considerar el coste, la eficacia y la resistencia bacteriana o fúngica al tratamiento.

35 Con respecto al cancro de los cítricos, se ha desarrollado una situación particularmente aguda y crítica en Estados Unidos. El cancro de los cítricos es una enfermedad bacteriana de los cítricos que causa la caída prematura de hojas y frutos. Los síntomas de la enfermedad aparecen en las hojas y frutos por muchas lesiones marrones rodeadas de un margen aceitoso y empapado con agua y un anillo o halo amarillo. Las lesiones antiguas en las hojas pueden caerse, creando un efecto de agujero de bala.

40 El cancro de los cítricos no hace daño a los seres humanos o a los animales o a plantas que no sean cítricos. Sin embargo, el cancro de los cítricos afecta a todos los tipos de cítricos, como naranjas, naranjas amargas, pomelos, mandarinas, limones y limas. El cancro hace que la salud y la producción de frutas de un árbol de cítricos disminuyan continuamente. En última instancia, el árbol no producirá ningún fruto.

45 El cancro de los cítricos es muy contagioso y se puede propagar rápidamente por la lluvia arrastrada por el viento, las cortadoras de césped y otros equipos de jardinería, personas que llevan la infección en sus manos, la ropa o el equipo, mover las plantas o partes de plantas infectadas o expuestas.

50 El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA) retiró la financiación del programa de erradicación debido a los impactos de las restricciones legales y los huracanes de 2004/2005 que causaron que el cancro se extendiese hasta un punto en que ya no era posible su erradicación.

55 Florida se encuentra actualmente en cuarentena a nivel estatal por el USDA y ningún cítrico puede salir del estado a menos que el USDA emita un permiso limitado. Ningún cítrico cultivado en Florida pueden entrar en ningún estado o territorio productores de cítricos. Ninguna planta o partes de plantas de cítricos pueden entrar o salir de Florida.

60 En Florida, desde que el cancro se identificó por primera vez en Florida en 1910, han sido destruidos más de 16 millones de árboles. El estado de Florida ha declarado dos veces que el cancro ha sido erradicado, en 1933 y nuevamente en 1994, solo para el resurgir de la enfermedad del cancro una tercera vez en 1995 cerca del aeropuerto internacional de Miami. En 2008, la industria de los cítricos en Florida ahora está en cuarentena a causa de la enfermedad del cancro que fue propagada por los huracanes de 2004/2005. Arboledas, tierra y árboles una

vez productivos, ahora se están volviendo improductivos a un costo enorme para el Estado y sus ciudadanos. El número de plantaciones comerciales en Florida se redujo de aproximadamente 857.000 acres en 1996 a 621.000 acres en 2006, según H. Florin en "The Sour State of Florida Citrus" publicado en línea en <http://www.time.com/time/nation/article/0,8599,1836766,00.html> para la revista Time, el 28 de agosto de 2008.

5 A nivel mundial, el cancro de los cítricos es una de las enfermedades más devastadoras que ha afectado gravemente a la industria de los cítricos en más de treinta países de Asia, el Pacífico y las islas del Océano Índico, América del Sur, y el sureste de los EE.UU., según informa A.K. Das en "Citrus Canker-A review," J. Appl. Hort. 2003, 5 (1), 52-60. Esta enfermedad es causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *Citri*, una bacteria gram-negativa. El patógeno causa lesiones necróticas en las hojas, tallos y frutos. Las infecciones severas pueden causar defoliación, el manchado grave de la fruta, la caída prematura de la fruta, la muerte de las ramitas y el declive general del árbol, como se comenta por T.S. Schubert et al. en Plant Disease, 2001, 85 (4). La tenacidad de la enfermedad del cancro de los cítricos y la infección se discute por C.H. Bock, et al. "Efficacy of Cankerguard(R) Sprays for Effective Decontamination of Citrus Canker." en Phytophology 2009, 99, (6), página S13-Abstract of Presentations, 2009 APS Annual Meeting. Bock et al. encontraron que después del tratamiento, tuvo lugar la infección, en o muy poco después de la inoculación puesto que la descontaminación no redujo la incidencia o la gravedad de la enfermedad.

20 La consecuencia más grave de la infestación por cancro de los cítricos es el impacto en el comercio como consecuencia de las restricciones al transporte y la venta interestatal e internacional de frutas procedentes de áreas infestadas, causando enormes pérdidas económicas cada año. Los productores de cítricos están buscando agresivamente un remedio robusto.

25 Sigue existiendo una necesidad continua y urgente para el desarrollo de fungicidas/bactericidas nuevos y más eficaces que sean baratos y fáciles de fabricar con actividad preventiva, curativa y sistémica para la protección no solo de los árboles de cítricos, sino de todas las plantas cultivadas, con unos efectos secundarios fitotóxicos mínimos. La presente invención usa la nanotecnología para satisfacer la necesidad de un fungicida/bactericida barato y más eficaz.

30 Otros desarrollos innovadores de la presente invención se basan en nanogeles de sílice cargados de Cu (CuSiNG). En comparación con los productos disponibles en el mercado, la tecnología de nanogeles del presente documento ha demostrado su superioridad en la mejora de la biodisponibilidad del Cu, la cobertura de la superficie y la longevidad de la planta y proporciona un medio para detectar cuándo se debe volver a aplicar el CuSiNG para una protección máxima.

### 35 Sumario de la invención

40 La presente invención proporciona un método para sintetizar una nanoformulación a base de sílice según la reivindicación independiente 1, y una composición para el tratamiento y la prevención de enfermedades en una especie vegetal de acuerdo con la presente reivindicación 2. Las reivindicaciones dependientes 3 a 5 están dirigidas a realizaciones preferidas de la composición de la presente invención.

45 Un primer objetivo de la presente invención es proporcionar una composición y un método para fabricar una nanoformulación a base de sílice que proporciona un nanoentorno único para albergar agentes antibacterianos y antifúngicos.

50 Un segundo objetivo de la presente invención es proporcionar una nanoformulación a base de sílice que proporciona un nanoentorno único para albergar agentes antibacterianos y antifúngicos con una cinética de liberación controlada, que establece un mecanismo de liberación sostenida.

Un tercer objetivo de la presente invención es proporcionar una nanoformulación a base de sílice que proporciona un nanoentorno único para albergar agentes antibacterianos y antifúngicos (anti-B/F) para mejorar la eficacia de los agentes anti-B/F.

55 Un cuarto objetivo de la presente invención es proporcionar una nanoformulación que consiste en nanopartículas de sílice (SiNP), o nanogel de sílice (SiNG) o una combinación de SiNP y SiNG.

60 Un quinto objetivo de la presente invención es proporcionar una fabricación o un método de síntesis sencillo y rentable para una nanoformulación a base de sílice con un contenido antibacteriano y antifúngico que se puede preparar *in situ*, en unas pocas horas, en un método de síntesis en un solo recipiente, que no requiere etapas de purificación.

65 Un sexto objetivo de la presente invención es proporcionar una fabricación o un método de síntesis sencillo y rentable para una nanoformulación a base de sílice concentrado con un contenido antibacteriano y antifúngico que se puede preparar *in situ*, diluido para su aplicación al suelo por una persona sin conocimientos técnicos.

5 Un séptimo objetivo de la presente invención es proporcionar una nanoformulación a base de sílice con contenido antibacteriano y antifúngico para el tratamiento de una superficie propensa a la enfermedad del cancro de los cítricos, proporcionando una cobertura uniforme a la superficie, la adherencia superficial por un periodo de tiempo satisfactorio, la liberación sostenida en el tiempo, un mejor control de liberación de anti-B/F, y una reducción de la toxicidad y del estrés para el medio ambiente en la zona tratada.

10 Un octavo objetivo de la presente invención es proporcionar una nanoformulación a base de sílice con contenido antibacteriano y antifúngico para el tratamiento de una superficie propensa a la enfermedad del cancro de los cítricos con un gran número de beneficios, incluyendo, pero no limitado a, la adherencia superficial durante un periodo de tiempo satisfactorio, la liberación sostenida en el tiempo, el control de liberación de anti-B/F, y menos toxicidad y estrés para el medio ambiente en la zona tratada.

15 Un noveno objetivo de la presente invención es proporcionar una nanoformulación a base de sílice con contenido antibacteriano y antifúngico para el tratamiento del cancro de los cítricos y la prevención de la enfermedad del cancro durante un periodo de cinco a nueve meses.

20 Un décimo objeto de la presente invención es proporcionar una nanoformulación a base de sílice con contenido antibacteriano y antifúngico para la industria agrícola (hortalizas, flores, hierba y otras plantas), aplicaciones domésticas (telas, cuero, plásticos, pintura y similares).

Un undécimo objetivo de la presente invención es proporcionar una nanoformulación a base de sílice cargada de cobre (Cu) con propiedades fertilizantes residuales para el suelo en el que las hojas y las ramas de las plantas tratadas con la nanoformulación siguen liberando nutrientes de Cu cuando las hojas y las ramas caen al suelo.

25 Un duodécimo objetivo de la presente invención es proporcionar una nanoformulación a base de sílice cargada de cobre (Cu) con propiedades fertilizantes residuales para el suelo en el que cuando las plantas y los árboles tratados con la nanoformulación en este documento se recogen como abono o mantillo, el suelo se enriquece con iones de Cu residuales.

30 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar una nanoformulación a base de sílice cargada de cobre (Cu) con propiedades antifúngicas superiores para inhibir el crecimiento de moho y hongos mildiu durante al menos seis meses por la liberación de un fungicida de una manera lenta y sostenida.

35 Además de los objetivos mencionados anteriores, desarrollos y mejoras innovadoras que usan nanogel de sílice cargado de Cu (CuSiNG) incluyen el objetivo adicional de reducir las poblaciones de bacterias sobre las superficies de plantas y del follaje al mejorar la biodisponibilidad del cobre.

40 Otro objetivo de la presente invención es optimizar la carga de cobre (Cu) de formas de valencias múltiples (estados de  $\text{Cu}^{1+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ), así como sus formas cristalinas (óxido de Cu) y amorfas (complejadas con matriz de sílice) de cobre dentro del nanogel de sílice para controlar la cinética de liberación del cobre.

45 También es un objetivo de la presente invención proporcionar el cobre en una aplicación de pulverización de CuSiNG con longevidad de residencia en la planta en el que el CuSiNG se difunde hacia fuera y cubre la superficie del tejido recién expuesto de frutos y hojas jóvenes de crecimiento rápido, minimizando así el número de aplicaciones por temporada de crecimiento.

50 Otro objetivo de la presente invención es proporcionar un nanogel de sílice fluorescente, que incorpora un colorante a base de rutenio (RuCuSiNG) para proporcionar un medio para la medición de las propiedades de difusión del CuSiNG, observando visualmente la propiedad de adherencia del CuSiNG y determinando cuándo se justifica la reaplicación del CuSiNG.

55 Un método preferido para sintetizar una nanoformulación a base de sílice que contiene agentes antibacterianos y antifúngicos usando un proceso sol-gel en un solo recipiente catalizada por ácido, incluye la selección de un recipiente de reacción que contiene un medio de reacción ácido, la adición de tetraetoxisilano (TEOS), agua, etanol y un agente antibacteriano o antifúngico que contiene iones de cobre en el recipiente de reacción con el medio ácido para formar una mezcla I, permitiendo que continúe la reacción de la mezcla I durante aproximadamente una hora para facilitar la formación de una pluralidad de nanopartículas a base de sílice, la adición de un agente neutralizante después de la formación de una pluralidad de nanopartículas para ajustar el valor del pH de la mezcla de reacción a aproximadamente 7,0, lo que permite que continúe la reacción neutralizada de la mezcla I durante aproximadamente 60 12 horas, preferentemente durante toda la noche, para permitir que se produzca la gelificación, en el que la estructura del nanogel consiste en nanopartículas interconectadas; y la recogida de un nanogel poroso a base de sílice que tiene agentes antibacterianos y antifúngicos unidos en una pluralidad de nanopartículas interconectadas del nanogel.

65 El medio de reacción ácido preferido del método es una solución acuosa de un ácido seleccionado entre uno de ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico. El agente antibacteriano o antifúngico preferido es una pluralidad de

iones de cobre (Cu) procedentes de un compuesto de cobre.

También se prefiere que la reacción de la mezcla I se produzca a temperatura y presión ambiente.

5 Se prefiere que la pluralidad de nanopartículas interconectadas del nanogel contenga una pluralidad de iones de Cu electrostáticamente unidos al núcleo de las nanopartículas, una pluralidad de iones de Cu unidos covalentemente a una superficie de la corteza hidratada y nanoporos de la nanopartícula, y una pluralidad de óxido/hidróxido de Cu como nanoagrupaciones/nanopartículas unidas a la superficie de la nanopartícula.

10 Una composición preferida y el método para el tratamiento y la prevención de enfermedades en una especie vegetal consiste en una nanoformulación a base de sílice, que contiene preferentemente una pluralidad de iones de cobre incorporados a una pluralidad de nanopartículas de sílice y, más preferentemente, una pluralidad de iones de cobre incorporados a un nanogel de sílice. Preferentemente, la pluralidad de iones de cobre procede de compuestos de cobre, tales como cobre metálico, óxido de cobre, oxiclورو de cobre, sulfato de cobre, hidróxido de cobre y sus mezclas.  
15

Preferentemente, la planta enferma tratada por la composición preferida es un miembro de la especie *Citrus*, en el que la enfermedad es el cancro de los cítricos causada por cualquier especie de *Xanthomonas*.

20 Se prefiere que durante el tratamiento, la pluralidad de iones de cobre (Cu) se libere de una manera sostenida durante el tratamiento a largo plazo de la planta durante un periodo de tiempo de al menos seis meses.

Un método preferido para el tratamiento o la prevención de enfermedades en una especie vegetal que comprende aplicar a la especie vegetal una composición que comprende una nanoformulación a base de sílice, en la que la  
25 composición preferida comprende además una pluralidad de iones de cobre incorporados a una pluralidad de nanopartículas de sílice, más preferentemente, una pluralidad de iones de cobre incorporados a un nanogel sílice.

La composición incluye además una pluralidad de iones de cobre procedentes de compuestos de cobre, tales como, cobre metálico, óxido de cobre, oxiclورو de cobre, sulfato de cobre, hidróxido de cobre y sus mezclas.  
30

Un método preferido para el tratamiento y la inhibición del crecimiento de moho y los hongos mildiu en una superficie que se selecciona del grupo que consiste en paredes interiores y exteriores de edificios, techos, lechada de baldosas de cerámica, y accesorios de baño que comprende la aplicación a la superficie de una composición que comprende una nanoformulación a base de sílice. La nanoformulación a base de sílice preferida es una pluralidad de  
35 nanopartículas interconectadas del nanogel que contiene una pluralidad de iones de Cu electrostáticamente unidos al núcleo de nanopartículas, una pluralidad de iones de Cu unidos covalentemente a una superficie y los nanoporos de la corteza hidratada de la nanopartícula, y una pluralidad de óxido/hidróxido de Cu como nanoagrupaciones/nanopartículas unidas a la superficie de la nanopartícula.

40 La fuente preferida de la pluralidad de iones de Cu se selecciona entre cobre metálico, óxido de cobre, oxiclورو de cobre, sulfato de cobre, hidróxido de cobre y sus mezclas.

Un método preferido para la adición de nutrientes al suelo incluye el tratamiento de la vegetación con una formulación de nanopartículas de sílice cargadas de cobre (Cu), permitiendo que las hojas y las ramas caigan al  
45 suelo, y dejando que las hojas y las ramas tratadas se biodegraden y fertilicen con ello el suelo con nutrientes de iones de Cu de manera no fitotóxica y con una liberación lenta.

Otro método preferido para la adición de nutrientes al suelo incluye el tratamiento de la vegetación con una formulación de nanopartículas de sílice cargadas de cobre (Cu), la cosecha y la trituración de la vegetación para formar mantillo o abono, y la difusión del mantillo o abono sobre el suelo para permitir la lixiviación de los nutrientes de iones de Cu de una manera no fitotóxica con liberación lenta, con la exposición a condiciones atmosféricas seleccionadas entre al menos una de lluvia, viento, nieve y luz solar.  
50

Se proporciona una nanoformulación a base de sílice preferida en la que una matriz de sílice tiene un nanogel de sílice cargado con iones de cobre (CuSiNG) que aloja simultáneamente dos formas activas de cobre, en la que una primera forma de cobre es amorfa y una segunda forma de cobre es cristalina y el equilibrio establecido por las dos formas activas de cobre se puede ajustar para controlar la cinética de liberación de los iones de cobre y mejorar la biodisponibilidad de los iones de cobre.  
55

Otra nanoformulación a base de sílice preferida presenta una propiedad en la que una pluralidad de iones de cobre se difunden hacia fuera desde su lugar de aplicación sobre una superficie del tejido de la planta en un ambiente húmedo y cubre la superficie del tejido expuesto de frutos y hojas de crecimiento rápido, minimizando así la frecuencia de aplicación por temporada de crecimiento y aumentando la cobertura de la superficie de la planta y la longevidad de la cobertura.  
60

65

También se prefiere que la formulación a base de sílice de la presente invención incluya además un compuesto precursor de silano para lograr una cobertura uniforme de la superficie de la planta, modular la tasa de liberación de iones de cobre, mejorar la resistencia a la lluvia y aumentar la longevidad de la cobertura de la superficie de la planta. Un compuesto precursor de silano preferido es metilfosfonato de 3-(trihidroxisilil)propilo (THPMP).

5 Otra nanoformulación a base de sílice preferida incluye un colorante fluorescente a base de rutenio (RuCuSiNG) para evaluar las propiedades de adherencia del nanogel de sílice (SiNG) a niveles microscópicos y un colorante fluorescente a base de rutenio preferido es tris(2,2'-bipiridilo diclororutenio) hexahidratado (Rubpy) y el colorante fluorescente a base de rutenio, tris(2,2'-bipiridilo diclororutenio) hexahidratado (Rubpy), se usa para controlar la liberación de los iones de cobre a partir de nanogel de sílice cargado de cobre (CuSiNG) en tiempo real.

Además, el colorante fluorescente a base de rutenio preferido, tris(2,2'-bipiridilo diclororutenio) hexahidratado (Rubpy), se usa para medir la cantidad de nanogel de sílice cargado de cobre (CuSiNG) que queda sobre la superficie de una planta para determinar si es necesario repetir la aplicación.

15 Se proporciona una nanoformulación a base de sílice híbrida más preferida en la que una matriz de sílice incluye una pluralidad de iones de cobre y un precursor de silano, metilfosfonato de 3-(trihidroxisilil)propilo (THPMP), cargado en el nanogel de sílice cargado de cobre (CuSiNG) para lograr una cobertura uniforme de la superficie de la planta y proporcionar una cobertura de la superficie que se expande con el crecimiento de la planta.

20 Otros objetos y ventajas de esta invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de una realización preferida actualmente que se ilustra esquemáticamente en los dibujos adjuntos.

#### 25 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1a es un gráfico que muestra el aumento exponencial de moléculas superficiales en función de la disminución del tamaño de partícula. (De la técnica anterior)

La Fig. 1b es un gráfico de la relación entre el área de superficie específica de una partícula esférica y el tamaño de la partícula (diámetro en nm). (De la técnica anterior)

30 La Fig. 2 es una representación esquemática de la nanoformulación a base de sílice de la presente invención que muestra nanopartículas de sílice cargadas de cobre (Cu) (CuSiNP).

La Fig. 3 es una imagen de microscopía electrónica de transmisión (TEM) de la formulación de nanogel de sílice cargado de cobre (CuSiNG) que consiste en nanopartículas de sílice de aproximadamente 10 nm de diámetro que están interconectadas.

35 La Fig. 4a muestra el material de nanogel de sílice cargado de cobre (Cu) (SiNG) disperso en agua.

La Fig. 4b muestra el CuSiNG dispersable en agua después de la centrifugación con la separación de residuo del líquido sobrenadante.

La Fig. 4c muestra una mezcla de CuSiNG dispersable en agua tratada con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA, un agente quelante fuerte) que forma un complejo de Cu-EDTA soluble en agua.

40 La Fig. 4d muestra el complejo de Cu-EDTA soluble en agua después de la centrifugación con la separación del complejo de Cu-EDTA y un residuo de nanogel de sílice (SiNG).

La Fig. 5 es un patrón de difracción de rayos X (XRD) de una muestra de CuSiNG y un bactericida/fungicida disponible en el mercado, DuPont™ Kocide® 3000.

45 La Fig. 6a es el espectro de espectroscopía de fotoelectrones de alta resolución de rayos X (XPS) de la muestra de CuSiNG que muestra picos de Cu 2p.

La Fig. 6b es la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) de una muestra de CuSiNG que muestra el espectro del nivel del núcleo 2p del Cu sin picos satélite.

La Fig. 6c es la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) del oxígeno (O) 1s en una muestra de CuSiNG.

50 La Fig. 6d es la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) del silicio (Si) 2p<sup>3</sup> en una muestra de CuSiNG.

La Fig. 7a es un dibujo de un ensayo de difusión en disco de CuSiNG disperso en agua desionizada con un pH de aproximadamente 7.

55 La Fig. 7b es un dibujo de un ensayo de difusión en disco de una solución de sulfato de cobre (CuSO<sub>4</sub>) en agua desionizada.

La Fig. 7c es un dibujo de un ensayo de difusión en disco de fungicida/bactericida DuPont™ 3000 Kocide® disperso en agua desionizada.

60 La Fig. 8 es una imagen digital de una hoja de limonero tomada 5 días después de la aplicación inicial de una nanoformulación a base de sílice de la presente invención (CuSiNG) que se expone a condiciones de fuertes lluvias, viento y tormenta en un entorno al aire libre.

La Fig. 9a muestra una imagen de campo digital de CuSiNG sobre la superficie de la hoja *antes* de que se pulverice el agua de lluvia sobre la superficie de la hoja.

La Fig. 9b es un dibujo de la imagen de fluorescencia de la hoja en la Fig. 9a que muestra la adhesión de CuSiNG antes que el agua de lluvia se pulverice sobre la superficie de la hoja.

65 La Fig. 9c muestra una imagen de campo digital de CuSiNG sobre la superficie de la hoja *después de* aproximadamente 5 minutos de pulverización continua de agua de lluvia sobre la superficie de la hoja.

La Fig. 9d es un dibujo de la imagen de fluorescencia de la hoja en la Fig. 9c que muestra la adhesión de CuSiNG después de aproximadamente 5 minutos de pulverización continua de agua de lluvia sobre la superficie de la hoja.

La Fig. 10a muestra la formación de una estructura de tipo reticular interconectada de CuSiNG.

La Fig. 10b muestra el aspecto de zonas oscuras dispersas en la matriz de sílice, lo que confirma la presencia de materiales ricos en electrones en la matriz amorfa.

La Fig. 10c muestra el patrón de difracción de electrones del área seleccionada (SAED) del CuSiNG que indica la formación de CuSiNG amorfo.

La Fig. 10d es una imagen de alta resolución de microscopía electrónica de transmisión (HRTEM) que revela la formación de partículas de contraste oscuro de cristalitas de  $\text{Cu}_2\text{O}$  de 1-3 nanómetros (nm), confirmada por la medición del espaciado de la red, incorporado en una matriz de sílice amorfa.

La Fig. 11a es una imagen de un disco de CuSiNG tratado (ensayo de difusión en disco) que muestra una superficie sin *Xanthomonas alfalfa* (*X. alfalfae*), un sustituto del cancro de los cítricos que crece rodeando el disco central.

La Fig. 11b es una imagen de un disco tratado con Kocide 3000® (ensayo de difusión en disco) que muestra un área sin crecimiento de *X. alfalfae* que rodea el disco central saturado con Kocide 3000®, en el que el área sin crecimiento de *X. alfalfae* que rodea el disco central es menor que el área sin crecimiento que rodea el disco tratado con CuSiNG de un contenido de Cu metálico idéntico al de la Fig. 11a.

La Fig. 11c es una imagen de un disco tratado con sulfato de Cu (ensayo de difusión en disco) que muestra un área sin crecimiento de *X. alfalfae* que rodea el disco central saturado con sulfato de Cu, en el que el área sin crecimiento de *X. alfalfae* que rodea el disco central es menor que el área sin crecimiento que rodea el disco tratado con CuSiNG de un contenido de Cu metálico idéntico al de la Fig. 11a y un disco tratado con Kocide 3000® de un contenido de Cu metálico idéntico al de la Fig. 11b.

La Fig. 11d es una imagen del disco tratado con nanogel de sílice (SiNG) (ensayo de difusión en disco) que muestra el crecimiento de *X. alfalfae* que rodea completamente el disco central tratado con SiNG, confirmando así que el SiNG no tiene propiedades antibacterianas.

La Fig. 12a es una imagen de fluorescencia de un disco en blanco en una placa de agar nutriente.

La Fig. 12b es una imagen de fluorescencia de un disco tratado con RuSiNG en la placa de agar nutriente de la Fig. 12a después de la refrigeración durante 7 días.

La Fig. 12c es una imagen de fluorescencia de la placa de agar nutriente de la Fig. 12b cuando se elimina el disco tratado con RuSiNG.

La Fig. 13a es un dibujo de un material de SiNG (RuSiNG) cargado de colorante fluorescente (Rubpy) aplicado a una superficie de la hoja antes de lavar la hoja.

La Fig. 13b es un dibujo de una superficie de la hoja a la que se le aplica RuSiNG después de lavar un minuto (1 min) debajo de un grifo abierto que corre rápido.

La Fig. 13c es un dibujo de una superficie de la hoja con una aplicación de RuSiNG después de lavar 6 minutos bajo un grifo abierto que corre rápido.

La Fig. 13d es un dibujo de una superficie de la hoja con una aplicación de RuSiNG después de lavar 16 minutos bajo un grifo abierto que corre rápido.

La Fig. 14a muestra un tubo de centrifugado de RuCuSiNG a la izquierda y a la derecha un tubo de ensayo de material de RuCuSiNG centrifugado tratado con EDTA como se ve a la luz ambiente.

La Fig. 14b muestra un tubo centrifugado de RuCuSiNG a la izquierda y a la derecha un tubo de ensayo de material de RuCuSiNG centrifugado tratado con EDTA como aparece bajo la iluminación de una fuente manual de excitación UV a 366 nm.

#### Descripción de la realización preferida

Antes de explicar en detalle la forma de realización descrita de la presente invención, debe entenderse que la invención no está limitada en su aplicación a los detalles de la disposición particular mostrada, ya que en la invención caben otras realizaciones. Además, la terminología usada en este documento tiene la finalidad de describir y no de limitar.

Sería útil describir los significados de algunas palabras y abreviaturas usadas en el presente documento para explicar la invención con mayor detalle.

Cu representa el elemento metálico cobre.

CuSiNG representa nanogel de sílice cargado de cobre.

CuSiNP significa nanopartículas de sílice cargadas de cobre.

Fungicida/bactericida Kocide® 3000; Kocide es una **marca registrada** de E.I. du Pont de Nemours and Company.

NG significa nanogel, que es la sustancia similar a un gel formada por la interconexión de nanopartículas.

NP significa nanopartículas que tienen un tamaño de partícula de aproximadamente 10 nm a aproximadamente

50 nm

Ru significa Rubpy, un colorante fluorescente a base de rutenio, tris(2,2'-bipiridilo diclororutenio) hexahidratado [Ru(bpy)]. Cualquier colorante fluorescente o nanopartícula fluorescente (tales como los puntos cuánticos) que experimente extinción de la fluorescencia en presencia de Cu o cualquier otro agente/ingrediente activo antibacteriano/antifúngico es adecuado para su uso en el presente documento.

"Si" se usa en el presente documento con el significado de dióxido de silicio, que también se conoce comúnmente como "sílice".

La presente invención supone una aplicación única de nanociencia y nanotecnología para desarrollar un material de ingeniería de nanogel de sílice cargado de cobre Cu (II) (CuSiNG). La nanotecnología permite la manipulación de un nanoentorno de sílice alrededor del Cu, el establecimiento de un mecanismo de liberación sostenida de iones de Cu. El novedoso diseño de las CuSiNP que se muestra en la Fig. 2, permite la asociación de cobre (Cu) a NG de sílice en tres formas diferentes, lo que permite la liberación sostenida del Cu. En primer lugar, los iones de Cu unidos electrostáticamente en el núcleo **10**. En segundo lugar, el Cu unido covalentemente sobre la superficie de la partícula hidratada **20** y los nanoporos **30**. En tercer lugar, el Cu unido a la superficie como nanoagrupaciones/nanopartículas de hidróxido/óxido **40**. La estructura del nanogel se compone de nanopartículas ultra-pequeñas (CuSiNPs) de menos de aproximadamente 50 nm de diámetro para proporcionar una mejor cobertura de la superficie vegetal y mejorar las propiedades de adherencia. Todas estas características atractivas formarán una base sólida para la protección a largo plazo de las plantas frente a patógenos usando el material de CuSiNG.

Debido a la ingeniería a nanoescala, el CuSiNG de la presente invención tiene las siguientes ventajas sobre los compuestos a base de Cu existentes: una cobertura uniforme de la superficie de la planta debido al tamaño ultra-pequeño de las partículas, mejores propiedades de adherencia debido a una nanoestructura similar a un gel, un perfil de liberación de Cu sostenido (a largo plazo), un mejor control sobre la velocidad de liberación de Cu (relación ajustable de Cu "soluble" a "insoluble"), más actividad antibacteriana/antifúngica con menos cantidad de contenido de Cu, efecto fitotóxico reducido debido a la relación de Cu "soluble" a "insoluble" y ambiente seguro debido al menor contenido de Cu, formación de subproductos no perjudiciales, síntesis a base de agua, uso del exceso de CuSiNG como nutrientes de las plantas y mínima posibilidad de tener una concentración local de Cu elevada que pudiera causar toxicidad ambiental.

El protocolo de síntesis tiene las siguientes ventajas: (i) simplicidad, (ii), a base de agua, (iii) escalable a aplicaciones de campo, (iv) método de síntesis en un solo recipiente, sin necesidad de etapas de purificación y (v) el material de CuSiNG concentrado se podría diluir fácilmente para su aplicación en el campo. Una persona sin conocimientos técnicos puede realizar esta tarea añadiendo una cantidad apropiada de agua, lo que reduce los costes de envío. El método también usa productos químicos en bruto baratos y se produce fácilmente de una manera rentable.

#### 40 Ejemplo 1 - Síntesis de CuSiNG

La síntesis del nanogel de cobre/sílice (CuSiNG) se llevó a cabo a temperatura ambiente a través de un proceso de sol-gel catalizado por ácido en una sola etapa usando tetraetoxisilano (TEOS), agua, etanol, y sulfato de Cu (II). La hidrólisis como se muestra a continuación en la ecuación 4 y las reacciones de condensación en las ecuaciones 5 y 6 siguientes se tradujeron en la formación de nanopartículas de sílice ultra-pequeñas cargadas de Cu (<10 nm de tamaño) (CuSiNPs). Cuando se mantiene en condiciones ácidas durante varias horas, tiene lugar la gelificación. La Fig. 3 muestra la formación de CuSiNG en la que las CuSiNP están interconectadas.



El proceso de síntesis general implicará dos etapas simples: En primer lugar, la adición de sales de Cu (II) al medio de reacción ácido al comienzo de la síntesis de nanopartículas y, segundo, la adición de un agente neutralizante, tal como hidróxido de sodio (NaOH) después de la síntesis para ajustar el pH a 7,0. El medio de reacción ácido se forma con cualquier ácido inorgánico, tal como ácido clorhídrico (HCl), sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), nítrico (HNO<sub>3</sub>) y similares. El agente neutralizante es cualquier compuesto con un pH alcalino, tal como hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, hidróxido de potasio y similares.

La gelificación de partículas de sol tiene lugar a lo largo del tiempo. La viscosidad del gel resultante se puede controlar fácilmente mediante el ajuste del pH y el tiempo entre estas dos etapas de síntesis simples. Esta es una técnica de síntesis sencilla en un solo recipiente en unas pocas horas que no requiere purificación. Debido a esta simplicidad, es factible la producción a gran escala de varias toneladas de CuSiNG. El proceso es medioambientalmente seguro, ya que es una técnica de "síntesis verde" a base de agua, que no produce

subproductos nocivos, tanto el sílice como el Cu se encuentran de forma natural en el medio ambiente, el CuSiNG tendrá niveles bajos de Cu "insoluble", y el CuSiNG no va a elevar los niveles locales de Cu en el suelo puesto que las plantas lo consumen como nutriente. El método también usa productos químicos de bajo coste fácilmente disponibles para la síntesis de CuSiNG.

5 Para estudiar la unión de Cu iónico a SiNG, se sintetiza CuSiNG en medios de reacción a pH ácido, tal como una solución de ácido clorhídrico al 1 %; sin embargo, no se añade agente neutralizante. El material de CuSiNG se recoge por centrifugación para eliminar el sobrenadante que contenga cualquier ion libre de Cu. El CuSiNG se lava varias veces con agua desionizada (DI). En este material de CuSiNG, la superficie de CuSiNP estará libre de hidróxido/óxido de Cu precipitado y el Cu se encuentra solo en su forma iónica y se identifica en el presente documento en adelante como "CuSiNP-limpio."

15 El CuSiNG (nanogel) consiste en CuSiNPs (partículas) de tamaño uniforme ultra-pequeñas interconectadas, como se muestra en la Fig. 2, formando una estructura similar a un gel, como se muestra en la Fig. 3. Estas CuSiNPs tendrán una nanoestructura de núcleo-corteza. El núcleo **10** constará de sílice cargada de iones de Cu y la corteza **20** soportará nanoagrupaciones de hidróxido de Cu/óxido de Cu **40** que se depositan sobre la superficie de la corteza **20**. El tamaño de las CuSiNP se puede ajustar y el tamaño de partícula se puede variar de 10 nm a 50 nm controlando el proceso de nucleación y crecimiento. La razón para variar el tamaño de partícula es controlar la relación de superficie a volumen. Un tamaño de partícula más grande tendrá menos superficie pero más volumen del núcleo. Esto proporcionará una oportunidad única para manipular la relación de Cu iónico en el núcleo de las CuSiNP **20** al Cu iónico unido a la superficie **40**. También debe observarse que la sílice amorfa es altamente porosa, que consta de numerosos nano-canales hidratados **30**. El diámetro del canal normalmente es de 1-2 nm. Las moléculas de agua y etanol pueblan la pluralidad de nano-canales (unido a través de enlaces de hidrógeno) y proporcionan un nanoentorno único de iones de Cu. Debe observarse que la polaridad y la capacidad de los puentes de hidrógeno se pueden ajustar fácilmente dentro del nano-canal **30** variando la relación de etanol a agua, proporcionando un buen control sobre la liberación de iones de Cu de los canales. El núcleo **10** de la partícula tiene un entorno polar reducido y se le priva de moléculas de disolvente. Este entorno facilita la formación de nanocristales de sales de Cu, en el que estarán presentes tanto Cu como iones de sulfato en un entorno polar reducido, como se muestra en la Fig. 2.

30 En el CuSiNG, el Cu iónico unido a la superficie poblará la superficie de la partícula, así como la interfase partícula-partícula. Por lo tanto, el diseño único de las CuSiNP proporciona tres nanoentornos de Cu diferentes, (i) el núcleo mantenido electrostáticamente de Cu **10**; es decir, Cu iónico en el núcleo del NG, (ii) Cu iónico unido covalentemente dentro de nano-canales **30**, sobre la superficie de la partícula **20** y en la interfase y (iii) Cu depositado sobre la superficie de la partícula en su forma de hidróxido/óxido **40**; la forma superficial **40** del Cu estará muy expuesta al entorno circundante. El Cu presente en estos tres nanoentornos establecerá diferentes cinéticas de liberación de Cu que se pueden controlar de manera sostenida. Se espera que el CuSiNG tenga una cobertura muy uniforme sobre la superficie de la planta debido al menor tamaño de partícula. Una vez más, se espera una propiedad de adherencia superficial muy mejorada debido a la nanoestructura similar a un gel del CuSiNG (ya que tiene la ventaja de las propiedades de adhesión combinadas de CuSiNPs individuales en la red).

45 El novedoso diseño del CuSiNG ofrece Cu más soluble ("libre y activo") para mejorar la actividad antifúngica/antibacteriana a pesar de que tendrá menos contenido de Cu metálico por gramo de material. Durante la aplicación por pulverización en el campo, se depositará una cierta cantidad de CuSiNG en el suelo, que servirá como nutriente a base de Cu para la planta. La reducción del contenido de Cu en el CuSiNG se usa por tanto para dos fines; primero como micronutriente esencial y en segundo lugar, como fungicida/bactericida mientras se reduce al mínimo la toxicidad relacionada con el Cu en el medio ambiente.

#### 50 Ejemplo 2 - Unión de cobre al nanogel de sílice

La unión de Cu al SiNG fue claramente evidente con la aparición del color azul del producto que se muestra en la Fig. 4a. El producto es dispersable en agua. Tras la centrifugación, se obtuvo un residuo azul y el sobrenadante era transparente como se muestra en la Fig. 4b. En contraste, cuando se prepara el NG de sílice en ausencia de iones de Cu aparecía el color blanco característico de la sílice.

55 Para evaluar cuánto Cu se unía al NG de sílice, el CuSiNG se trató con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un quelante fuerte de iones de Cu. En varios minutos, se forma un complejo de Cu-EDTA soluble en agua como se muestra en la Fig. 4c. Tras la centrifugación, se obtuvo un residuo de color blanco del NG de sílice y un sobrenadante de color azul del complejo de Cu-EDTA como se muestra en la Fig. 4d. Estos resultados demuestran claramente que la unión de Cu a la sílice no es tan fuerte como en el complejo de Cu-EDTA. Por lo tanto, el Cu cargado se podía liberar lentamente en su forma iónica del CuSiNG.

#### 60 Caracterización del producto de CuSiNG

65 Las muestras se caracterizaron por microscopía electrónica de transmisión (TEM), difracción de rayos X (XRD), espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), y espectroscopía de dispersión de energía (EDS).

Tamaño

El tamaño del CuSiNG se determinó mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM). El CuSiNG consistía en nanopartículas (NPs) interconectadas de tamaño ultra-pequeño (~10 nm), que forman una nanoestructura similar a un gel como se muestra en la Fig. 3. Se usó difracción de rayos X (XRD) para determinar la cristalinidad (si la hubiera) para el CuSiNG y se compararon los datos con Kocide® 3000. El patrón de XRD distingue claramente el CuSiNG del Kocide® 3000. Como se muestra en la Fig. 5, Kocide® 3000 era un material de hidróxido/óxido de Cu principalmente cristalino mientras que el CuSiNG era de naturaleza puramente amorfa. La microscopía electrónica de barrido-espectroscopía de dispersión de energía (SEM-EDS, una técnica de análisis elemental) mostraba que la cantidad de Cu (en porcentaje atómico, estimación cualitativa) presente en el Kocide® 3000 y el CuSiNG es del 54 % at. y el 13 % at., respectivamente. El estado de oxidación del Cu en el CuSiNG se determinó por espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS). La XPS es capaz de proporcionar información sobre el estado de oxidación de cada componente en la muestra, así como la composición de la superficie de la muestra.

Energía de enlace (eV)

Espectros de alta resolución regional de la composición elemental clave proporcionan información detallada del componente individual tal como el desplazamiento químico y cambios de intensidad, que indican cambios en la unión entre los elementos individuales. Los espectros de XPS de alta resolución de cobre (Cu) 2p, oxígeno (O) 1s y silíce (Si) 2p3 se muestran en la Fig. 6. Los picos de Cu 2p a una energía de enlace de 933,3 eV se atribuyeron al entorno de Cu<sup>2+</sup>. Picos satélite amplios a energías de enlace más altas también sugieren la presencia de estados iónicos de Cu<sup>2+</sup>. El componente de mayor energía de enlace situado a 935,2 eV se atribuyó a especies de Cu(OH)<sub>2</sub>. Los picos del O 1s y Si 2p3 se encuentran a una energía de enlace de 532,1 eV y 103,1 eV, respectivamente. La energía de enlace del Si 2p coincide muy bien con los datos publicados por el National Institute of Standard and Technology de EE.UU., es decir, el Si en la muestra del CuSiNG se encuentra en forma de SiO<sub>2</sub>.

Análisis de la composición

El análisis semi-cuantitativo de la composición es posible al comparar los datos de la XPS y la EDS, ya que la XPS es un método sensible de la superficie y EDS es un método en bruto de análisis de la composición. Las relaciones atómicas de Si/Cu de XPS y EDS se determinaron integrando las áreas de pico y dividiendo por los factores de sensibilidad. Las relaciones de Si/Cu a partir de los datos de EDS y XPS se identificaron como 2,3 y 7,3, respectivamente, lo que confirma que el Cu se distribuye por todo el CuSiNG.

Actividad antibacteriana

La evaluación de la actividad antibacteriana del CuSiNG se realizó usando *E. coli* como sistema modelo. Se usó el ensayo de difusión en disco, considerado como uno de los métodos microbiológicos más comunes para la evaluación de agentes antibióticos potenciales, para evaluar la actividad antimicrobiana del material de CuSiNG. Específicamente, *E. coli* (cepa 8739 de la ATCC) cultivadas en placas de agar nutriente se incubaron con discos de papel de filtro que contienen el mismo volumen y concentración de Cu de soluciones acuosas de Kocide® 3000 **50**, sulfato de Cu (pH 7) **60**, CuSiNG (pH 7) **70** o nanopartículas (NPs) de sílice pura (pH 7) (no mostrado). Después de incubar durante toda la noche a 37 °C, se comprobó que el CuSiNG presentaba una actividad antimicrobiana muy significativa, como se muestra en la Fig. 7a, e indicada por una zona de aclaramiento marcado que se extiende desde el disco correspondiente **70**. En particular, la actividad del CuSiNG fue más pronunciada que la de la solución de sulfato de Cu en el disco **60**, como se muestra en la Fig. 7b y Kocide® 3000 en el disco **50**, que se muestra en la Fig. 7c a pesar de que el contenido de Cu en el CuSiNG es aproximadamente 4 veces más bajo que el contenido de Cu en Kocide® 3000 (según lo determinado por las mediciones de SEM-EDS). La superficie sin crecimiento de *E. coli* que rodea el disco de papel de filtro **50** con Kocide® 3000 es aproximadamente la mitad del área sin crecimiento de *E. coli* para el disco **70** con CuSiNG, lo que confirma la eficacia de la formulación de CuSiNG con una cuarta parte del contenido de cobre; la formulación de CuSiNG tiene el doble de actividad antimicrobiana que Kocide® 3000. Cabe señalar que el NG de sílice pura, preparado sin los iones de Cu, no muestra ninguna actividad antibacteriana.

Propiedad de adherencia

La evaluación de la propiedad de adherencia del CuSiNG se evaluó cualitativamente en una planta de limón. La planta se obtuvo de una tienda de Home Depot® en Orlando, FL. En un procedimiento experimental típico, una primera pulverización de una suspensión acuosa de CuSiNG y Kocide® 3000 se pulverizó uniformemente a una distancia de 6 pulgadas (15 cm) sobre media docena de hojas experimentales preseleccionadas, asignadas para cada muestra, usando una botella de pulverizador de mano. El exceso de líquido cayó por goteo de la superficie de la hoja. En esta etapa, se tomaron imágenes digitales de la superficie de la hoja pulverizada con Kocide® 3000, CuSiNP y CuSiNG, los resultados de la adherencia se registran en la Tabla II a continuación. Se dejó que el líquido pulverizado se secase por completo y se volvieron a tomar imágenes de la superficie de la hoja seca pulverizada con Kocide® 3000 y CuSiNG. Aproximadamente 2 horas más tarde, se pulverizó agua de lluvia natural de forma continua durante 5 minutos aproximadamente sobre las mismas hojas experimentales y se dejó que las hojas sometidas a

pulverización continua de agua de lluvia se secasen completamente. En esta etapa, se evalúan visualmente las imágenes digitales de las hojas secas con una primera pulverización de Kocide® 3000, CuSiNP y CuSiNG y una segunda pulverización de agua de lluvia para la adherencia del agente antibacteriano/antifúngico a la superficie de la hoja. Se usa una escala de 1 a 5 para evaluar la adherencia.

- 5
- 1 = 1-5 % de la composición antibacteriana/antifúngica se encuentra sobre la superficie de la hoja;
- 2 = 6-15 % de la composición antibacteriana/antifúngica se encuentra sobre la superficie de la hoja;
- 3 = 16-40 % de la composición antibacteriana/antifúngica se encuentra sobre la superficie de la hoja;
- 4 = 41-75 % de la composición antibacteriana/antifúngica se encuentra sobre la superficie de la hoja;
- 10 5 = 76-95 % de la composición antibacteriana/antifúngica se encuentra sobre la superficie de la hoja.

Tabla II - Adhesión de la composición antibacteriana/antifúngica a la superficie de la hoja

| PRODUCTO  | KOCIDE® 3000 | CuSiNP | CuSiNG |
|---|--------------|--------|--------|
| Pulverización en primer lugar (producto aplicado)             | 5            | 5      | 5      |
| Secado  | 4            | 4      | 5      |
| Pulverización en segundo lugar (5 minutos con agua de lluvia) | -            | -      | -      |
| Secado  | 2            | 3      | 4      |
| Producto sobre la hoja  | 1            | 2      | 4      |

15 Los resultados indican claramente la propiedad de adherencia superior de la suspensión de CuSiNG sobre Kocide® 3000. Como era de esperar, el CuSiNG mostraba una cobertura más uniforme sobre la superficie de la hoja. Curiosamente, la aplicación de CuSiNG a una hoja de limonero resistió muy bien la caída de lluvia fuerte y tormenta eléctrica que se experimentó de forma continua durante cinco días y que se muestra en la Fig. 8; imagen ampliada de una hoja del limonero con una cubierta protectora marmórea y visualmente discernible de CuSiNG. La mayor parte de la formulación Kocide® 3000 fue arrastrada después de un par de minutos de pulverización de agua de lluvia.

20 A fin de evaluar la propiedad de adherencia del CuSiNG, se usó una técnica de fluorescencia. Hojas de limonero se marcaron con isotiocianato de fluoresceína (FITC), un colorante fluorescente de emisión verde. El colorante está unido covalentemente a la sílice. El fin de la marcación con fluorescencia era evaluar la propiedad de adherencia del SiNG con mayor sensibilidad usando mediciones de fluorescencia. En la hoja experimental que se muestra en la Fig. 9a se ha creado una matriz de puntos con el material de SiNG fluorescente y se deja secar completamente en un ambiente oscuro para evitar el fotoblanqueo de los colorantes de FITC.

25 Usando una fuente de luz UV de mano (excitación multibanda a 366 nm), se apreciaron claramente manchas de fluorescencia verde en la superficie de las hojas antes de la pulverización de agua de lluvia. La Fig. 9b es un dibujo de la imagen de fluorescencia que muestra los puntos fluorescentes del CuSiNG en el mismo patrón que la hoja de la Fig. 9a.

30 Después de aproximadamente 3 horas, se pulverizó agua de lluvia natural durante aproximadamente 5 minutos a la hoja de la Fig. 9b, el pulverizado se dejó secar, de nuevo completamente en oscuridad, y la hoja seca se muestra en la Fig. 9c, con varios puntos de CuSiNG sobre la superficie. Usando una fuente de luz UV de mano (excitación multibanda a 366 nm), se apreciaron claramente manchas de fluorescencia verde en la superficie de las hojas después de la pulverización de agua de lluvia. La Fig. 9d es un dibujo de la imagen de fluorescencia que muestra el material fluorescente del CuSiNG que se adhiere a la hoja en la Fig. 9c en un patrón similar, como se muestra en la hoja de la Fig. 9c. Las imágenes fluorescentes en las Figuras 9b y 9d confirman que el material de CuSiNG no se arrastra de la hoja cuando se somete a pulverización de agua de lluvia.

35 La enorme área de superficie de los materiales de nanogel (NG) es, de hecho, un factor que contribuye a la liberación de una cantidad adecuada de Cu "soluble". La matriz de sílice-nanogel (SiNG) es porosa y la superficie está muy hidratada, como se describe por S. Santra et al. en "Fluorescence Lifetime Measurements to Determine the Core-Shell Nanostructure of FITC-doped Silica Nanoparticles: An Optical Approach to Evaluate Nanoparticle Photostability," Journal of Luminescence, 2006. 117 (1) páginas 75-82. Esta matriz de sílice proporciona un entorno único, lo que permite la incorporación de diversos iones metálicos, como se describe en la patente de Estados Unidos 6.548.264 de Tan, et al., así como moléculas sin un cambio significativo en las propiedades físicas y químicas. Los estudios de caracterización muestran claramente que los iones de Cu se incorporan con éxito dentro de la matriz de sílice y los iones de Cu incorporados se liberan de una manera sostenida.

40 La adherencia y la liberación lenta y sostenida de iones de Cu proporcionan algunos otros beneficios para la presente invención. En primer lugar, cuando se aplica a plantas, árboles y similares, las hojas y/o ramas que caen al suelo proporcionan cobre, un nutriente muy deseado para el suelo y a niveles muy bajos que no son perjudiciales para el medio ambiente. Además, cuando las plantas y árboles se cosechan o se retiran de la producción agrícola, la vegetación tratada se puede usar para mantillo o abono y proporciona nutrientes de Cu adicionales como fertilizante.

Se proporcionan nuevos datos, el rendimiento y las formulaciones de biocidas de nanogel a base de Cu. La nueva generación de biocidas de nanogel a base de Cu presenta una mejor biodisponibilidad del Cu, un entorno de Cu en el material de CuSiNG que es único y manipulable, una composición a base de Cu con mejores propiedades de adherencia y propiedades que permiten evaluar y determinar si el biocida se tiene que volver a aplicar.

5 Recientemente se ha descubierto que la matriz de sílice del nanogel de sílice es capaz de albergar simultáneamente dos formas activas de cobre,  $\text{Cu}^+$  (I) y  $\text{Cu}^{++}$  (II). El Cu (I) está presente como  $\text{Cu}_2\text{O}$  en forma nanocristalina (tamaño de cristal de 1-3 nanómetros (nm)) y el Cu (II) está presente en forma amorfa (débilmente quelado por los grupos silanol). El equilibrio establecido por las dos formas activas del cobre afecta a la cinética global de liberación de los iones de Cu, por lo tanto, el nanogel de sílice (SiNG) es capaz de albergar Cu tanto +1 (cuproso, forma cristalina) como +2 (cúprico, forma amorfa) en la misma matriz que contribuye a la liberación sostenida del Cu y una mejor biodisponibilidad del Cu. A diferencia de cualquiera de los compuestos de Cu existentes, el entorno de Cu en el CuSiNG es único y permite su manipulación para mejorar el rendimiento de la composición biocida.

15 Otro descubrimiento reciente es la propiedad del material de nanogel de sílice cargado de Cu (CuSiNG) que se difunde lentamente desde la ubicación de su aplicación en ambientes húmedos. Por lo tanto, en aplicaciones de pulverización, el CuSiNG se difunde hacia fuera y cubre las superficies de tejido recién expuesto de frutas y hojas jóvenes de crecimiento rápido, reduciendo así al mínimo el número de aplicaciones por temporada de crecimiento y el aumento de la longevidad y de la cobertura de la superficie de la planta.

20 **Una nueva generación de CuSiNG.**

Como se describe en el Ejemplo 1 anterior, la gelificación de partículas de sol tiene lugar con el tiempo. El proceso de gelificación reúne SiNPs ultra-pequeñas (<10 nm de tamaño) con un proceso de condensación adicional en presencia de iones de Cu, formando así el material de CuSiNG, que tiene una estructura similar a una red como se muestra en la Fig. 10a. La composición del medio de reacción, así como el pH del medio, favorecen la formación de nanopartículas de óxido de Cu (I) altamente cristalino de 2-3 nm de tamaño **115** que permanecen incorporadas a la matriz de nanogel de sílice como se muestra en la Fig. 10b y la Fig. 10d. El patrón de difracción de electrones en el área seleccionada (SAED) en la Fig. 10c indica la formación del CuSiNG amorfo. La Fig. 10d es una imagen de alta resolución de microscopía electrónica de transmisión (HRTEM) que muestra la formación de partículas de contraste oscuro de 1-3 nm **115**, marcado por las líneas paralelas entre dos flechas opuestas, a medida que los cristallitos se incorporan a la matriz de sílice amorfa. El espaciado reticular medido en la imagen de HRTEM ampliada es de aproximadamente 2,447 Å, que indica la formación de cristallitos  $\text{Cu}_2\text{O}$ .

35 La estructura del nanogel de sílice de la presente invención está cargada con dos estados de valencia del Cu que permanecen intactos. La relación del Cu cristalino a amorfo se controla cambiando la composición del medio de reacción. Esto proporciona una excelente oportunidad para controlar la cinética de liberación del Cu. El cobre amorfo se libera rápidamente y libera lentamente cobre cristalino. Para la prevención a largo plazo de la enfermedad del cancro de los cítricos, es conveniente que la formulación a base de Cu suministre iones de Cu de forma sostenida sin comprometer la eficacia antibacteriana, como por ejemplo, la biodisponibilidad del Cu con el tiempo.

Se ha sintetizado un nanogel de sílice cargado de Cu híbrido (H-CuSiNG) en el que la matriz de SiNG se carga con un compuesto de silano para lograr una cobertura uniforme de la superficie de la planta. Se prepara un material de CuSiNG altamente disperso que incluye un precursor de silano, como por ejemplo metilfosfonato de 3-(trihidroxisilil)propilo (THPMP), en un procedimiento en dos etapas en un solo recipiente como se describe en el Ejemplo 1. El proceso en el Ejemplo 1 se modifica con la adición del precursor de silano con los iones de cobre en la etapa uno, que implica la adición de sales de Cu (II) al medio de reacción antes de la síntesis de nanopartículas/nanogel. Durante la formación de la red de nanopartículas/nanogel de silano, los iones de cobre (Cu) serán capturados. El THPMP es un silano altamente soluble en agua que contiene el grupo fosfonato cargado negativamente. Además de mejorar la dispersabilidad, el THPMP interactúa con los iones de Cu y modula la velocidad de liberación de los iones de Cu, mejorando así la cobertura de la superficie, la resistencia a la lluvia y la longevidad de la cobertura. Los compuestos de silano adecuados para la presente invención están disponibles en el mercado de proveedores tales como Gelest, Morrisville, PA 19067.

55 La caracterización detallada de los materiales revela que el CuSiNG es un nanomaterial único. A diferencia de otros compuestos de Cu existentes, incluyendo Kocide® 3000, el CuSiNG es un material principalmente amorfo tal como se confirma por el estudio de difracción de rayos X (XRD) en el que Cu (II) se compleja con los grupos silanol de la sílice tal como se confirma por el estudio de espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS). El estudio de HRTEM confirma que el material incorpora nanopartículas de óxido de Cu (I) de tamaño cristalino de 1-3 nm **115** que aparecen como zonas de contraste oscuras en la Fig. 10b. Las mediciones BET basadas en las isothermas de adsorción/desorción de nitrógeno confirmaron que el material de CuSiNG es altamente poroso con un tamaño de poro de aproximadamente 7,4 nm y un volumen de poro de aproximadamente 1,023 cc/g y posee una enorme área superficial de aproximadamente 336,1 m<sup>2</sup>/g.

65 **Propiedad antibacteriana del material de CuSiNG.** La evaluación de la propiedad antibacteriana del CuSiNG se llevó a cabo frente a *X. Alfalfae* como sistema modelo usando un "ensayo de difusión en disco" convencional. El

cultivo de *X. alfalfae* crecido en placas de agar nutriente se incubó con discos que contienen un volumen igual de soluciones acuosas de Kocide® 3000, sulfato de cobre en agua desionizada (DI), CuSiNG a un valor de pH 7 y SiNG. El contenido de Cu metálico se mantuvo igual en todas estas soluciones acuosas a base de Cu. Después de incubar durante toda la noche a 30 °C, se comprobó que el CuSiNG 100 en la Fig. 11a presenta una actividad antimicrobiana muy significativa para *X. alfalfa*. Esto se indica por una zona de marcado aclaramiento que se extiende desde el disco correspondiente. En particular, la actividad anti-bacteriana del CuSiNG fue más pronunciada que la de Kocide® 3000 200 en la Fig. 11b y el sulfato de Cu 300 en la Fig. 11c a pesar de que el contenido de Cu metálico permaneció igual. Cabe señalar que, como se esperaba, el SiNG 400 no presentaba actividad antibacteriana alguna como se muestra en la Fig. 11d.

Los resultados experimentales anteriores sugieren que se mejora la biodisponibilidad del Cu cuando se cargan dos estados de valencia del Cu ( $\text{Cu}^{1+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ ) en una matriz de SiNG. Esta mejora de la eficacia no puede explicarse basándose en los datos de solubilidad notificados de los materiales probados. El valor del producto de solubilidad ( $K_{\text{SP}}$ ) del hidróxido de Cu es de  $2,20 \times 10^{-20}$ . Por lo tanto, se espera la liberación lenta de iones de  $\text{Cu}^{2+}$  del Kocide® 3000. El sulfato de Cu, por otra parte, es una sal altamente soluble en agua con pH ácido (pH ~3,0) y por lo tanto se espera una liberación abundante de  $\text{Cu}^{2+}$ . Se sabe que el agar, un material a base de azúcar, se une a iones metálicos. Por tanto, se espera que se una a los iones de Cu y retarde la difusión del Cu con independencia de los materiales que contienen Cu probados tales como el sulfato de Cu, Kocide® 3000 y materiales de CuSiNG. Además, los materiales de CuSiNG deben tener Cu menos soluble en comparación con el sulfato de Cu y Cu más soluble en comparación con el Kocide® 3000. Por lo tanto, la actividad anti-bacteriana inesperadamente alta del material de CuSiNG posiblemente se debe a su capacidad para migrar por difusión desde el disco, e interactuar directamente con las bacterias. Esta interacción directa aumentará la concentración local de Cu en la superficie celular bacteriana, matándolas así eficazmente.

**Difusión del material de CuSiNG.** Para analizar las propiedades de difusión del CuSiNG, se cargó SiNG fluorescente con un colorante fluorescente metalorgánico que emite rojo anaranjado, tris(2,2'-bipiridilo) diclororutenio (II) hexahidratado (Rubpy), un colorante altamente soluble en agua con excitación a una longitud de onda de 455 nm y emisión a una longitud de onda de 600 nm. El colorante fluorescente brillante y fotoestable añadido al material de SiNG se denomina en lo sucesivo RuSiNG. El RuSiNG se lavó varias veces en agua desionizada (DI) para asegurar la eliminación de todo el Rubpy no unido. Se desarrolló una prueba cualitativa para evaluar la propiedad de difusión del SiNG cargado de Rubpy (RuSiNG) usando una placa de agar nutriente como sustrato. En un procedimiento típico, se administran 200 µl de RuSiNG (~1 mg/ml) a un disco de papel en blanco de 13 mm. A continuación, el disco se coloca en el centro de una placa de agar nutriente. La placa se refrigera durante una semana antes de la toma de imágenes con un microscopio de fluorescencia (Olympus MVX10 equipado con cámara a color DP72; juego de filtros: filtro de excitación de paso de banda de 380-420 nm y filtro de emisión de paso largo de 475 nm). Se ve claramente que el RuSiNG difunde fuera del disco como se muestra en las Figuras 12a-12c. En la Fig. 12a hay una imagen de fluorescencia de un disco en blanco en una placa de agar nutriente. La Fig. 12b, muestra una imagen de fluorescencia de un disco RuSiNG tratado en una placa de agar nutriente después de su refrigeración durante 7 días. La Fig. 12c es una imagen de fluorescencia de la misma placa de agar de la Fig. 12b con el disco RuSiNG eliminado. Este estudio de difusión demuestra que el material de SiNG fue capaz de difundir sobre un sustrato de agar en condiciones refrigeradas.

En resumen, el estudio de difusión indica que el material de CuSiNG de la presente invención es capaz de difundir en un ambiente húmedo (por ejemplo, el clima húmedo típico de Florida) con el tiempo. Esta propiedad de difusión es fundamental para la protección de la amenaza del cancro de frutos y hojas jóvenes de cítricos en rápida expansión. Una vez aplicado al comienzo de la temporada, el material de CuSiNG se propaga lentamente con el tiempo para cubrir la superficie del tejido recién formado, lo que no deja espacio para que las bacterias del cancro causen la infección.

**Evaluación de la propiedad de adherencia del material de CuSiNG.** Se observó visualmente que el material de CuSiNG tiene mejores propiedades de adherencia (determinadas después de la aplicación por pulverización de agua de lluvia continua durante 5 minutos) en comparación con Kocide® 3000 cuando se estudia en una planta de limón. A fin de evaluar la propiedad de adherencia del material de SiNG a niveles microscópicos, se usó RuSiNG fluorescente como material modelo. Se administra una pequeña alícuota (10 µl) de RuSiNG (~1 mg/ml) en forma de punto en una hoja de cítricos limpia y fresca, y se deja secar. La hoja se observa bajo un microscopio de fluorescencia (microscopio Olympus MVX10 con gran distancia de funcionamiento) después de la administración inicial y después de 3 lavados posteriores. Cada lavado se llevó a cabo manteniendo la hoja debajo de un grifo de agua corriente durante un periodo de tiempo determinado. Se tomaron una serie de imágenes de fluorescencia para el prelavado (Fig. 13a), después de 1 minuto de lavado (Fig. 13b), después de 6 minutos de lavado (Fig. 13c) y después de 16 minutos (Fig. 13d) de lavado de las muestras. Las imágenes muestran claramente que el material de SiNG tiene una propiedad de adherencia extremadamente fuerte a la superficie de la hoja de los cítricos. La propiedad de fuerte adherencia del material de SiNG refleja una fuerte interacción de van der Waals (fuerzas intermoleculares) entre el CuSiNG y la superficie de la hoja. Una fuerte adherencia del material de SiNG de este tipo se debe a sus propiedades a escala nanométrica, tales como, alta área de superficie y la estructura de tipo reticular. Un estudio de las propiedades de adherencia del CuSiNG demuestra claramente el papel de la nanotecnología en la mejora drástica de la propiedad de adherencia del material a base de SiNG a una superficie de la hoja de los

cítricos.

**Fluorescencia para medir la necesidad de aplicaciones repetidas de CuSiNG.** Una técnica de detección basada en la fluorescencia permite controlar la liberación de Cu en tiempo real. El mecanismo de detección se basa en la extinción de la fluorescencia. Es bien sabido que los iones de Cu pueden extinguir eficazmente la fluorescencia de colorantes fluorescentes mediante procesos de transferencia de energía y/o transferencia de electrones. Por lo tanto, si un colorante fluorescente, tal como Rubpy, se incorpora en el material de CuSiNG, se extinguirá la fluorescencia del colorante Rubpy. Tras la liberación de los iones de Cu, se restaurará la fluorescencia de Rubpy. La viabilidad de este mecanismo se puso a prueba cuando se sintetizó material de CuSiNG cargado de Rubpy (RuCuSiNG) mediante mezcla simple. Como era de esperar, la fluorescencia de Rubpy se extinguió completamente debido a la presencia de iones de Cu. Sin embargo, la fluorescencia se restauró por completo cuando se eliminó el Cu al tratar el RuCuSiNG con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), un agente quelante fuerte como se muestra en las **Figuras 14a y 14b**. En la **Fig. 14a** se muestra un material de RuCuSiNG centrifugado como depósito pesado **180** en la parte inferior del tubo de la izquierda y en una fase dispersa **185** en el tubo de la derecha hay evidencias de fluorescencia bajo luz ambiente cuando se trata con EDTA. En la **Fig. 14b** el material de RuCuSiNG centrifugado **190** de la izquierda se trata con EDTA, un agente quelante que elimina el cobre de la solución y bajo una luz manual de excitación de una longitud de onda UV de 366 nm, se muestra fluorescencia brillante **195** en el tubo de la derecha. Esto ocurre después de que el ion de Cu se extraiga del material como complejo de Cu-EDTA. Esto proporciona una base para usar una técnica de detección altamente sensible basada en la fluorescencia para controlar la liberación de Cu del material en tiempo real.

Debido a la alta sensibilidad de la técnica de fluorescencia y la gran relación señal a ruido, se prevé la detección sensible de la liberación de Cu. Basándose en este estudio de detección, seremos capaces de predecir la biodisponibilidad del Cu y de seleccionar una serie de materiales de CuSiNG al aumentar la relación de las formas amorfas (Cu<sup>2+</sup>) a las formas cristalinas (Cu<sup>1+</sup>).

Otro de los beneficios de las nanopartículas y el nanogel de sílice cargados de Cu de la presente invención consiste en controlar el crecimiento de moho y hongos mildiu. Las formulaciones de nanopartículas/nanogel de sílice cargadas de cobre (Cu) de la presente invención tienen una actividad antifúngica/antibacteriana superior para tratar áreas que favorezcan y fomenten el crecimiento de moho y hongos mildiu; además, un solo tratamiento sigue siendo eficaz durante al menos dos meses a seis meses aproximadamente debido a que la liberación de Cu iónico se produce de una manera lenta, sostenida y en cantidades que inhiben la germinación de las esporas de los hongos, las "semillas" principales responsables de la difusión y reproducción del hongo o la bacteria. Debido a que las esporas o células retiradas del ciclo actual de infección no maduran ni se reproducen en presencia de cobre, el hongo o bacteria muere de manera eficaz. Los baños, cocinas, zonas interiores y exteriores de estructuras sometidas a condiciones de calor y humedad se mantienen libres de moho y hongos mildiu desagradables cuando se tratan con la nanoformulación a base de sílice de la presente invención.

En conclusión, por primera vez, se proporciona un mecanismo de liberación sostenida de Cu usando un diseño único de cobre (Cu), que contiene la formulación de nanopartículas/nanogel de sílice (SiNP/NG). La nanoformulación a base de sílice tiene aplicaciones inmediatas para el tratamiento del cancro de los cítricos. Los usos adicionales de composiciones antifúngicas/antibacterianas que contienen SiNP/NG son como agentes antibacterianos/antifúngicos para fines generales en agricultura y horticultura, incluyendo, pero no limitado a su uso en hortalizas, flores, hierba, otras plantas, aplicaciones domésticas, telas, cueros, plásticos, pinturas y similares. El diseño del CuSiNG, posible gracias a la nanotecnología, es una "re-inventoría revolucionaria" del Cu para la aplicación segura en la agricultura moderna en el siglo XXI.

## REIVINDICACIONES

1. Un método para sintetizar una nanoformulación a base de sílice que contiene agentes antibacterianos y antifúngicos usando un proceso sol-gel en un solo recipiente y catalizado por ácido, que comprende las etapas de:

- 5  
 10  
 15
- selección de un recipiente de reacción que contiene un medio de reacción ácido;
  - adición de tetraetoxisilano (TEOS), agua, etanol y un agente antibacteriano o antifúngico que contiene iones de cobre en el recipiente de reacción, con el medio ácido para formar una mezcla I;
  - permitir que la reacción de la mezcla I prosiga durante aproximadamente una hora para facilitar la formación de una pluralidad de nanopartículas a base de sílice;
  - adición de un agente neutralizante después de la formación de una pluralidad de nanopartículas para ajustar el valor de pH de la mezcla de reacción a aproximadamente 7,0;
  - permitir que la reacción neutralizada de la mezcla I prosiga durante aproximadamente 12 horas, preferentemente durante toda la noche, para permitir que se produzca la gelificación, y formar una estructura de nanogel que consiste en nanopartículas interconectadas; y
  - recogida de un nanogel poroso a base de sílice que tiene agentes antibacterianos y antifúngicos unidos en una pluralidad de nanopartículas interconectadas del nanogel;

20 en el que el agente antibacteriano o antifúngico es una pluralidad de iones de cobre (Cu) que proceden de un compuesto de cobre;

**caracterizado por que** la pluralidad de nanopartículas interconectadas del nanogel contienen

- 25
- una pluralidad de iones de Cu electrostáticamente unidos al núcleo de nanopartículas,
  - una pluralidad de nanocristales de Cu incorporados que incluyen al menos  $\text{Cu}_2\text{O}$ ,
  - una pluralidad de iones de Cu unidos covalentemente a una matriz de sílice con una superficie de la corteza hidratada, nanoporos de la nanopartícula y canales porosos de nanogel, y
  - una pluralidad de óxido/hidróxido de Cu como nanoagrupaciones/nanopartículas unidas a la superficie de la nanopartícula.

30 2. Una composición para el tratamiento y la prevención de enfermedades en una especie vegetal, que comprende una nanoformulación a base de sílice que comprende una pluralidad de iones de cobre incorporados a una pluralidad de nanopartículas de sílice o que comprende una pluralidad de iones de cobre incorporados a un nanogel de sílice, en donde la nanoformulación a base de sílice incluye una matriz de sílice en un nanogel de sílice cargado de iones de cobre (CuSiNG); y

35 **caracterizado por que** la matriz de sílice en el nanogel de sílice cargado de iones de cobre (CuSiNG) alberga simultáneamente dos formas activas del cobre, en donde una primera forma del cobre es amorfa y una segunda forma del cobre es cristalina y el equilibrio establecido por las dos formas activas del cobre se puede ajustar para controlar la cinética de liberación de los iones de cobre y mejorar la biodisponibilidad de los iones de cobre.

40 3. La composición de la reivindicación 2, en la que la fuente de la pluralidad de iones de cobre procede de compuestos de cobre seleccionados del grupo que consiste en cobre metálico, óxido de cobre, oxiclорuro de cobre, sulfato de cobre, hidróxido de cobre y sus mezclas.

45 4. La composición de la reivindicación 2, que incluye además un compuesto precursor de silano para lograr una cobertura uniforme de la superficie de la planta, modular la tasa de liberación de iones de cobre, mejorar la resistencia a la lluvia y aumentar la longevidad de la cobertura de la superficie de la planta.

50 5. La composición de la reivindicación 4, en la que el compuesto precursor de silano es metilfosfonato de 3-(trihidroxisilil)propilo (THPMP).

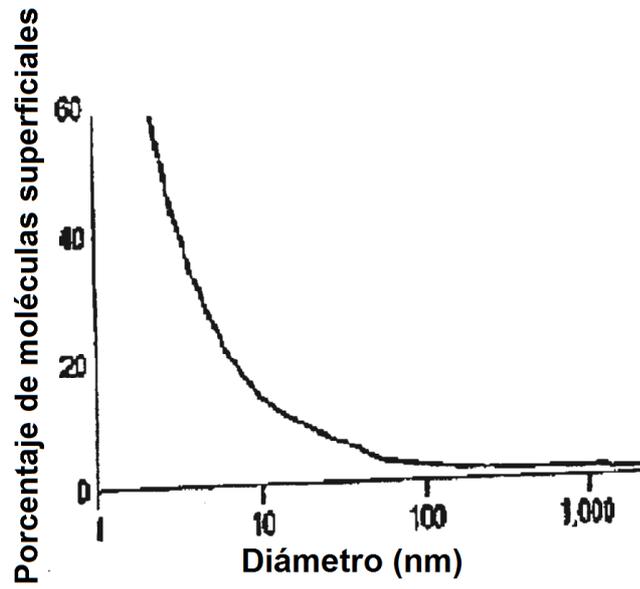
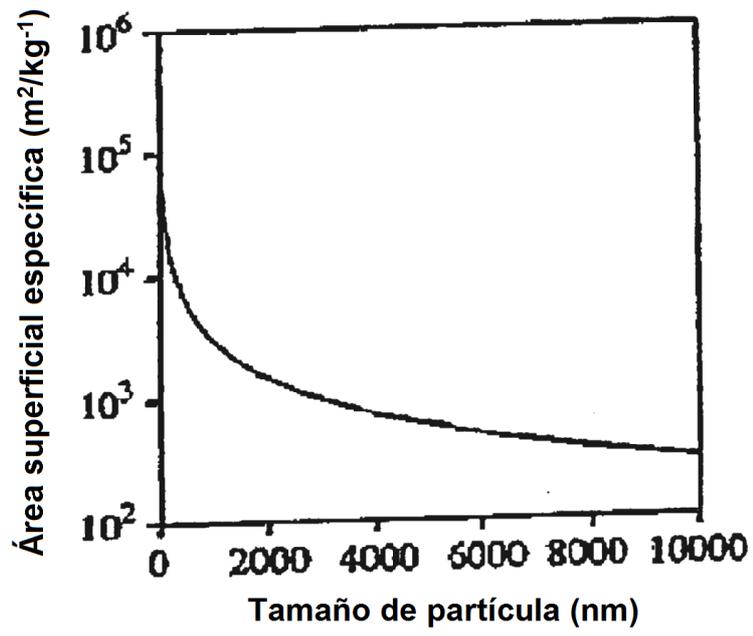


Fig. 1a



**Fig. 1b**

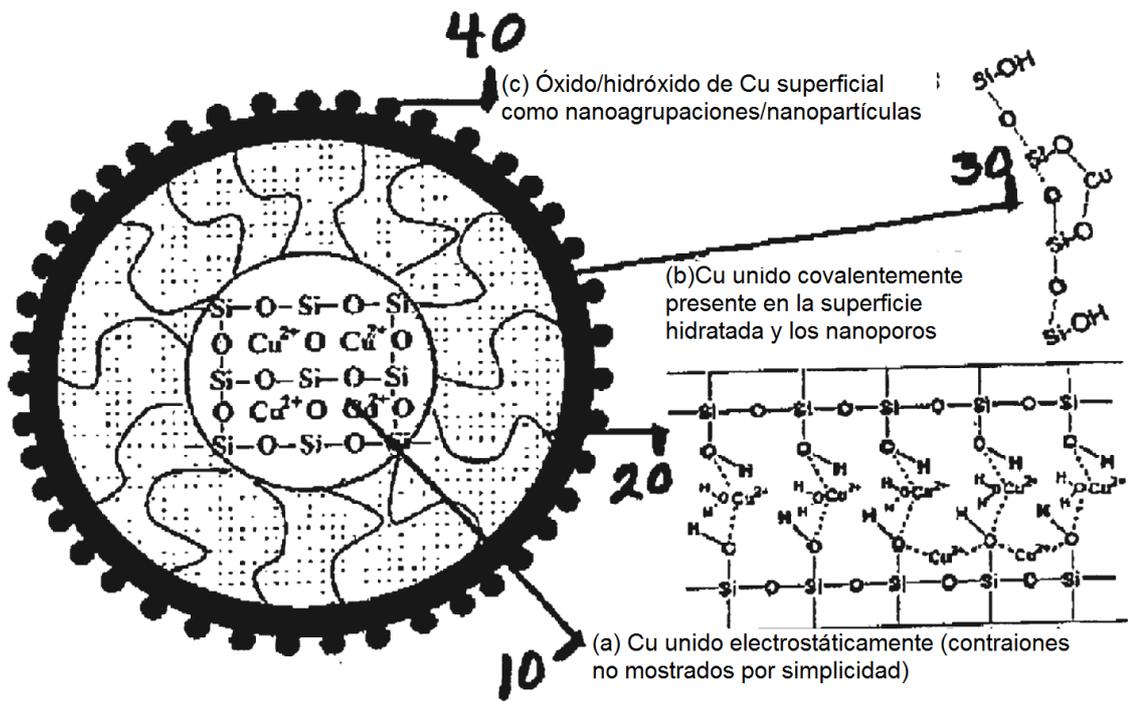


Fig. 2



Silicato-Cu.tif

Aum. Impresión: 7 - 600m a 7,6 1m

15:12 08/06/008

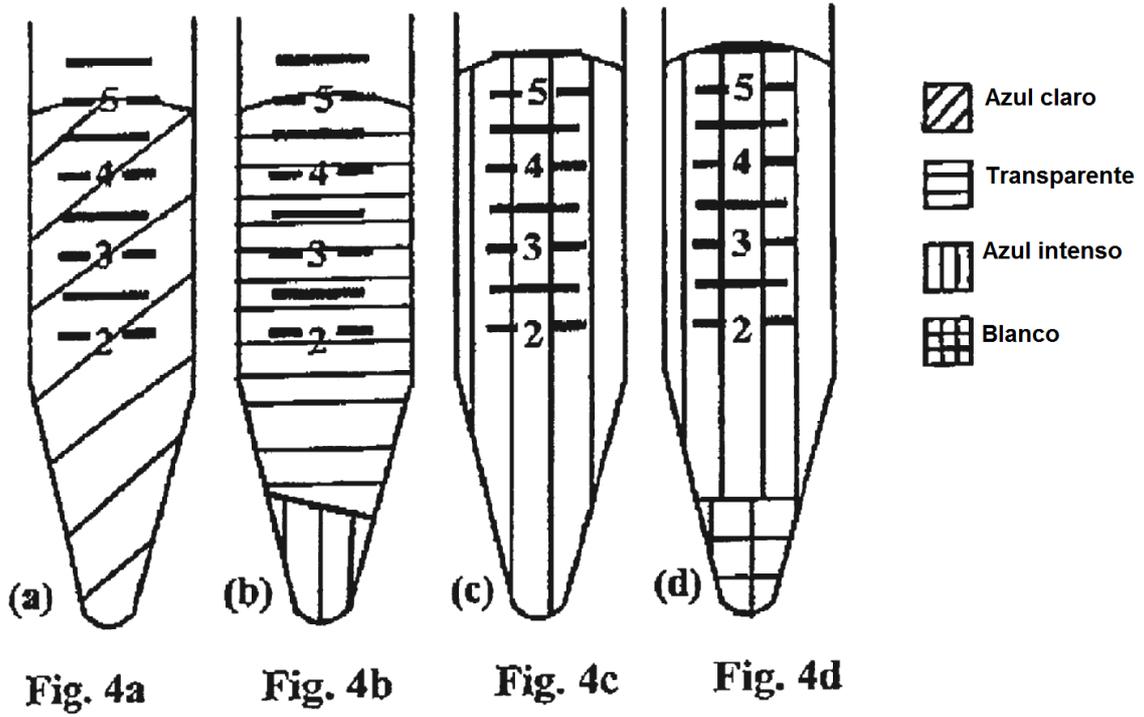
100 nm

HV = 100,0kV

Aum. Directo: 10500X

Instalación de Caracterización de Materiales -  
UCF

**Fig. 3**



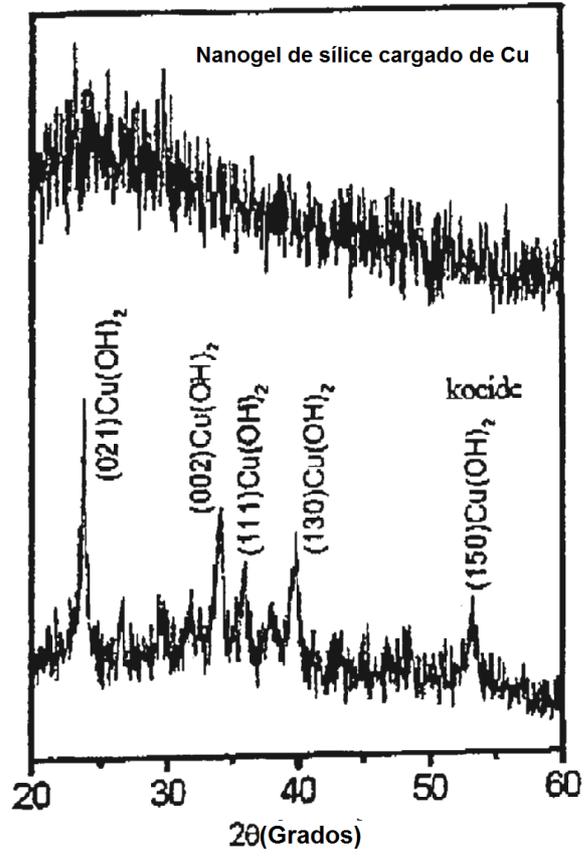


Fig. 5

Fig. 6a

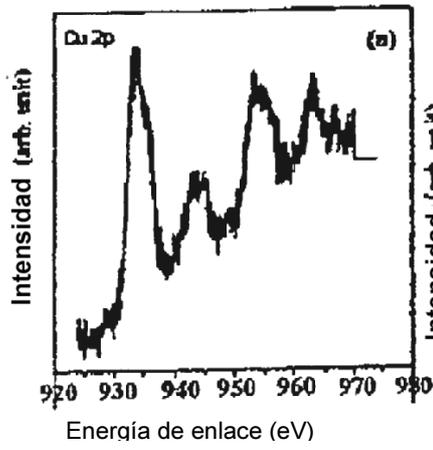


Fig. 6b

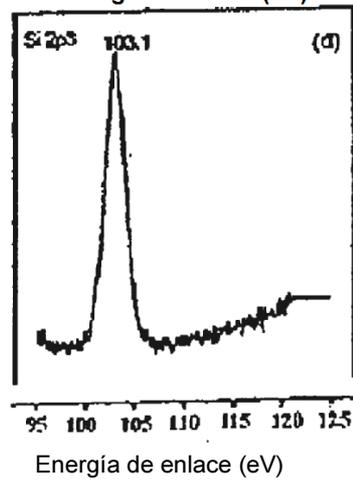
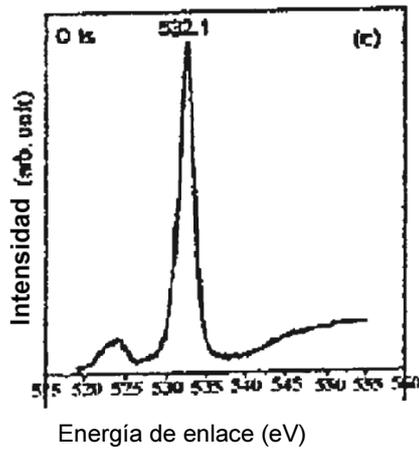
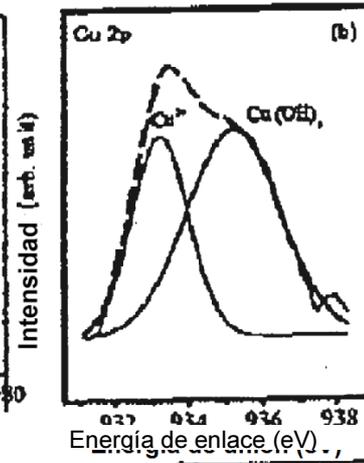
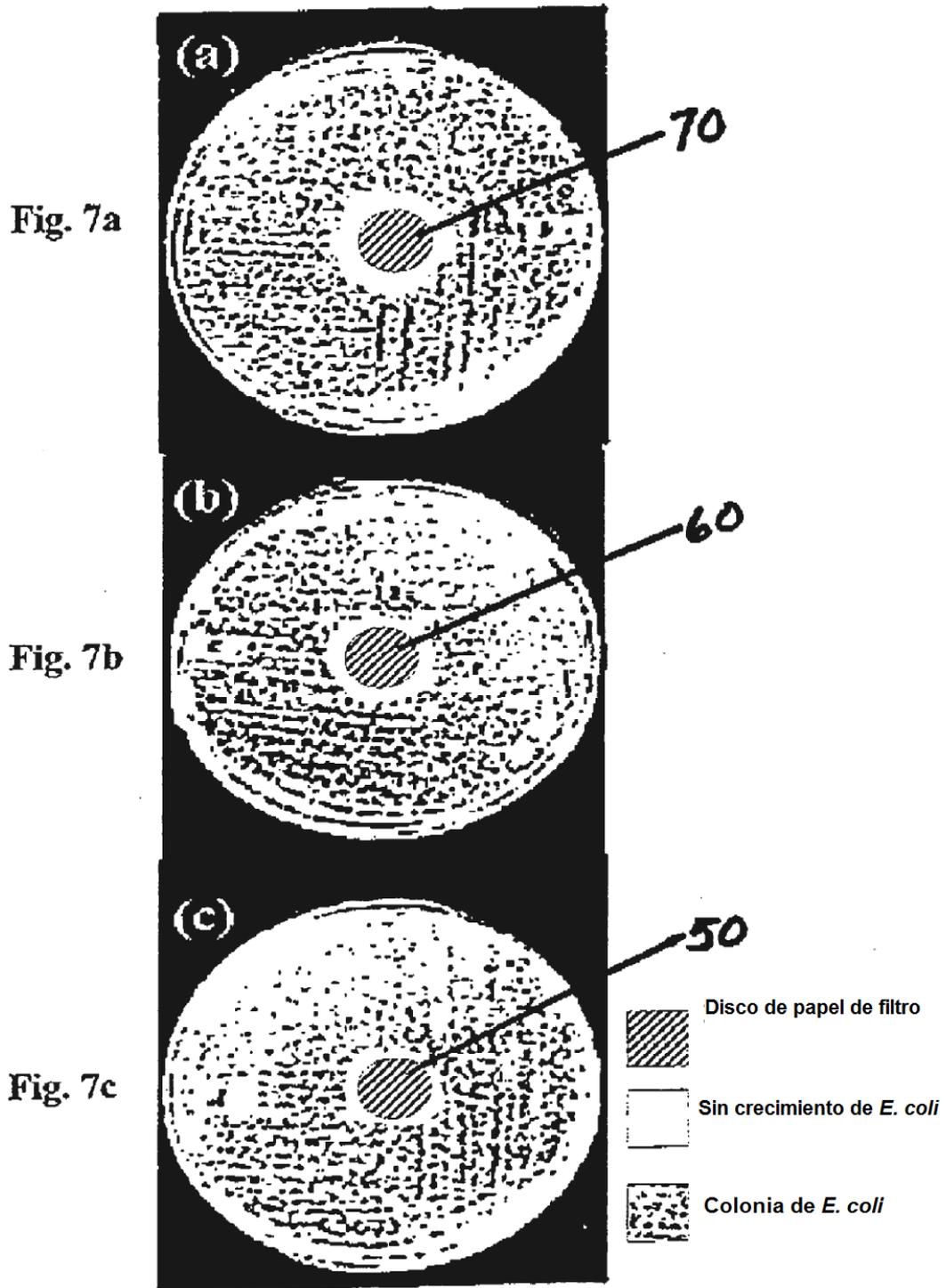


Fig. 6c

Fig. 6d



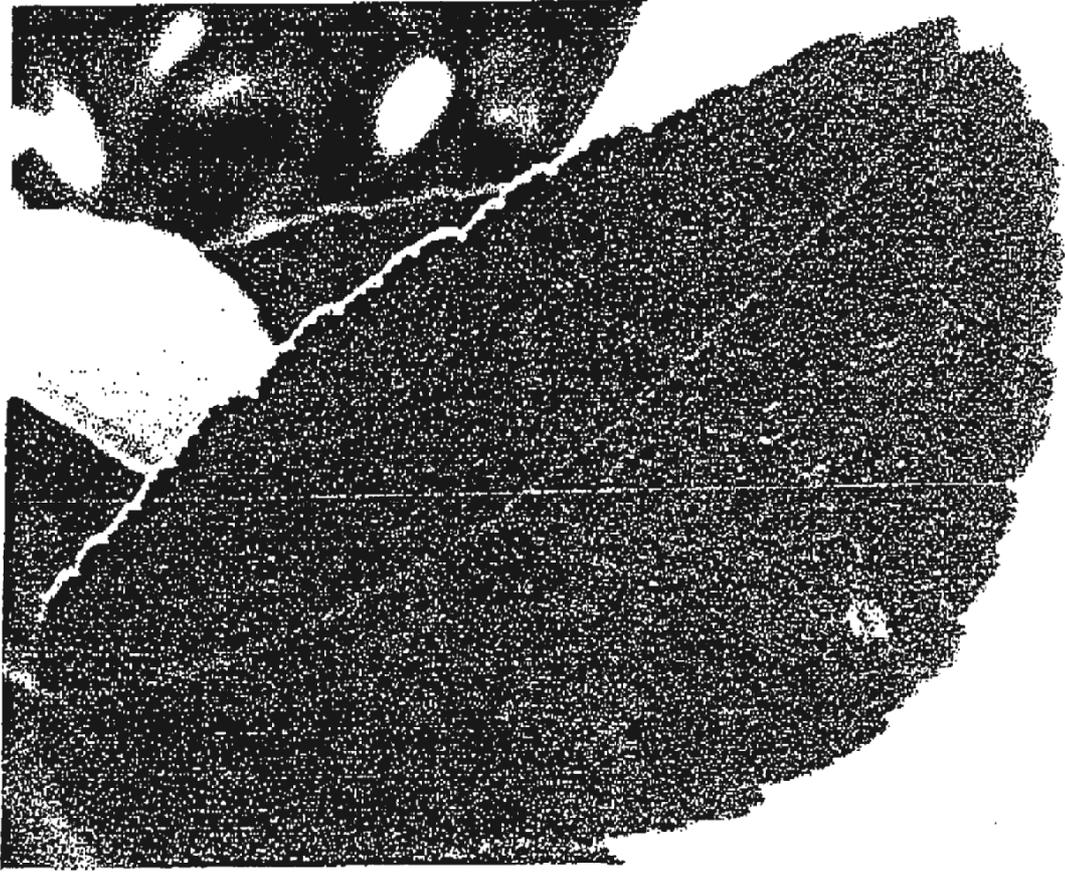
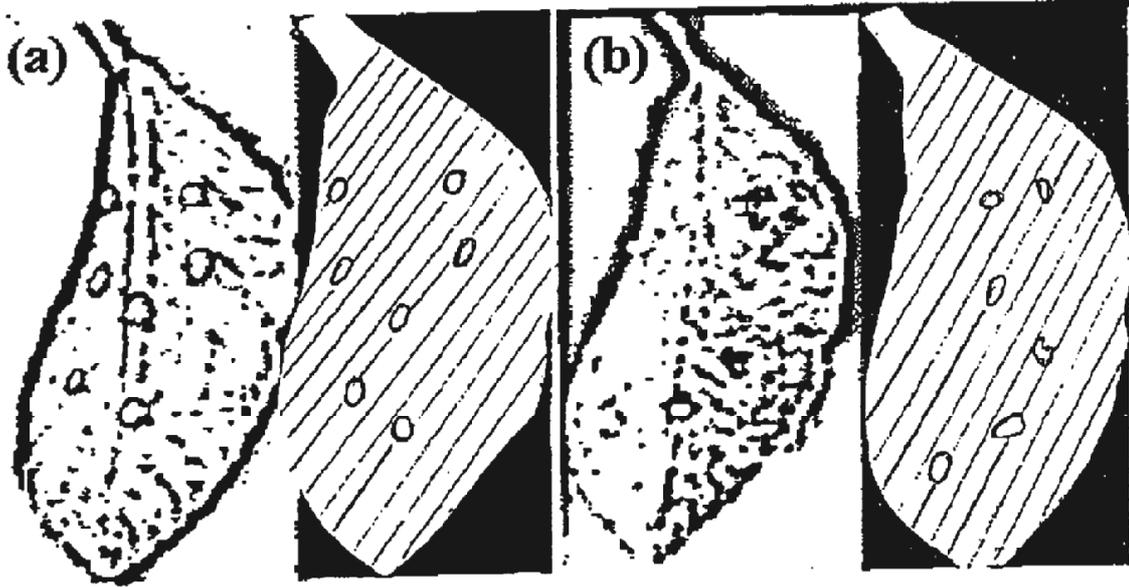


Fig. 8

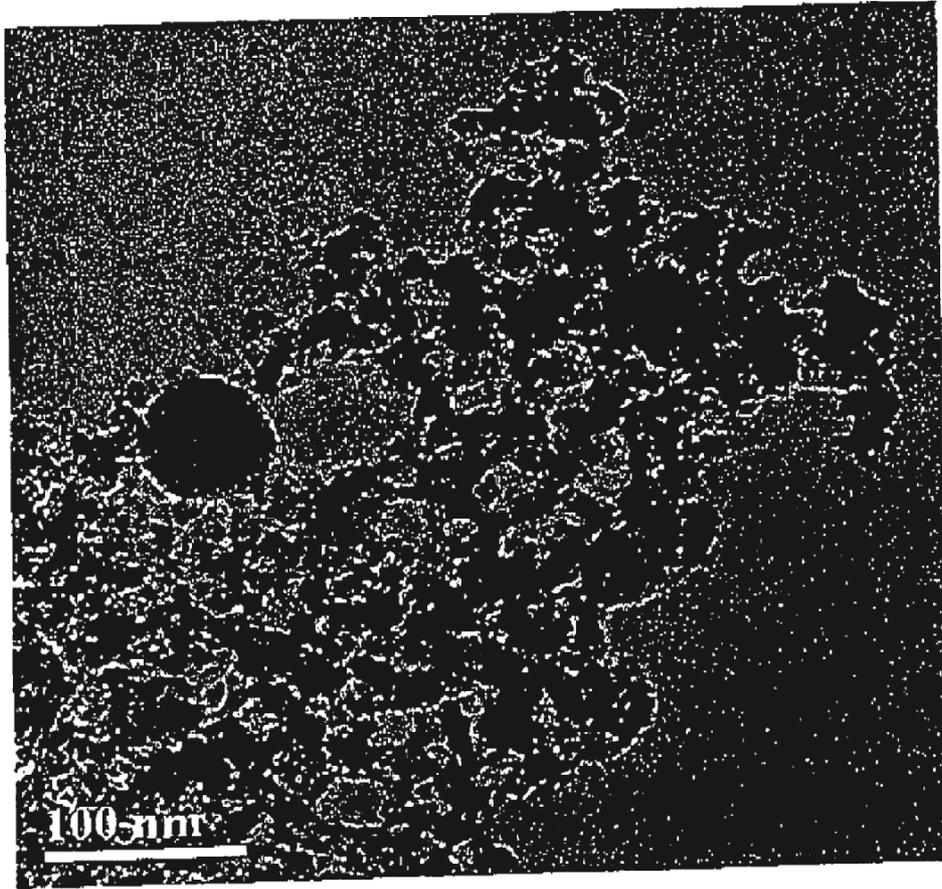


**Fig. 9a**

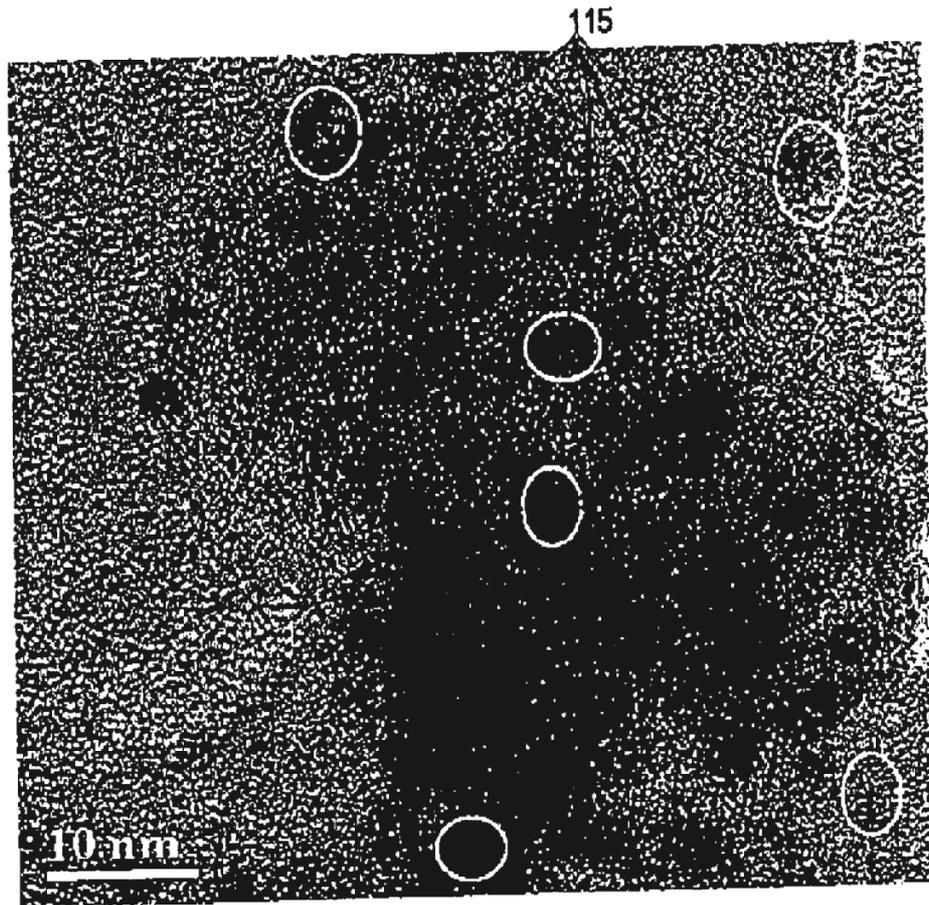
**Fig. 9b**

**Fig. 9c**

**Fig. 9d**



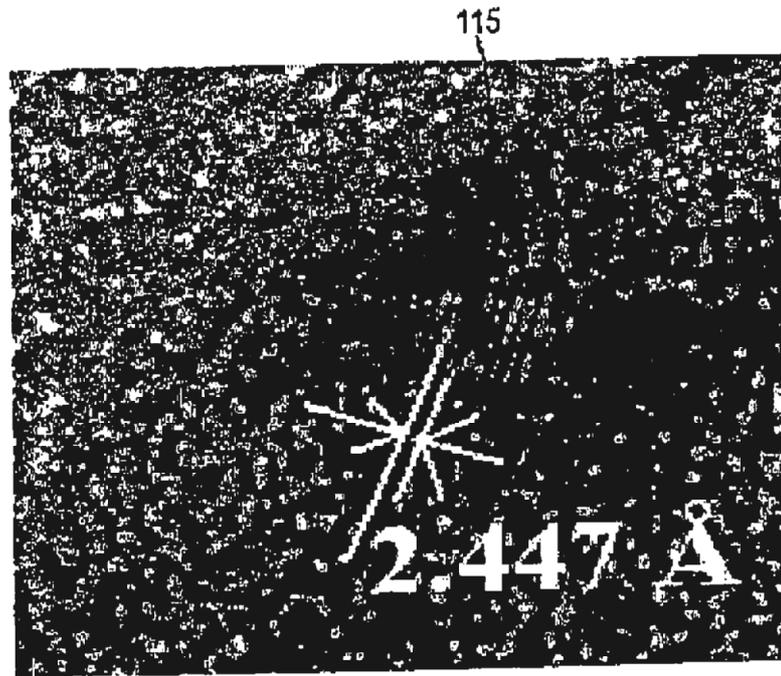
**Fig. 10a**



**Fig. 10b**



**Fig. 10c**



**Fig. 10d**

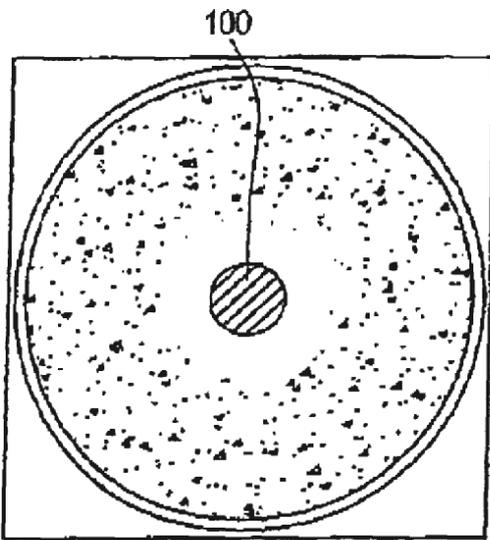


Fig. 11a

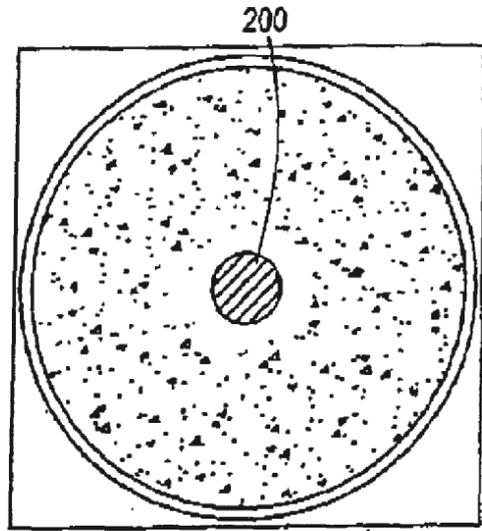


Fig. 11b

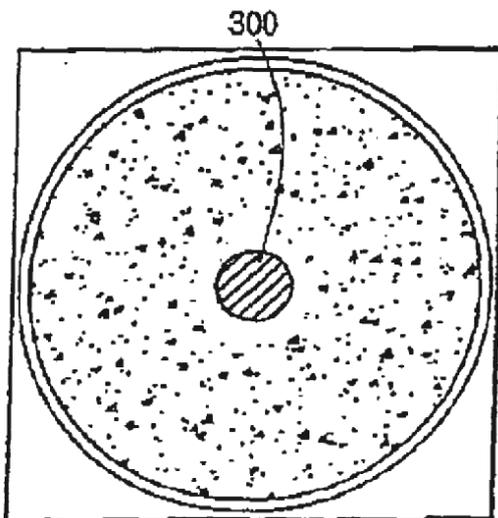


Fig. 11c

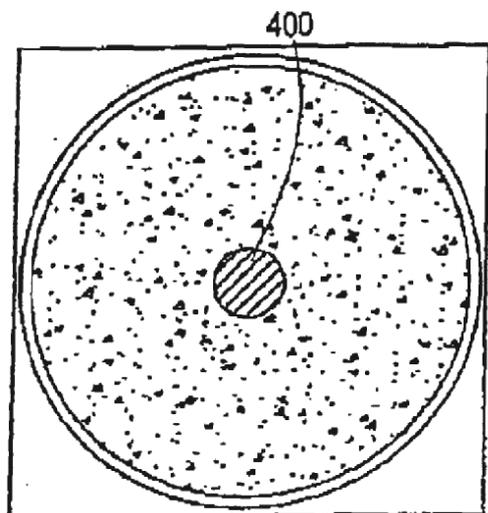
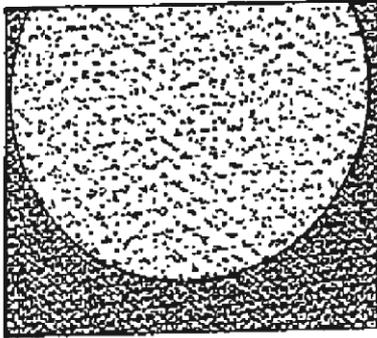
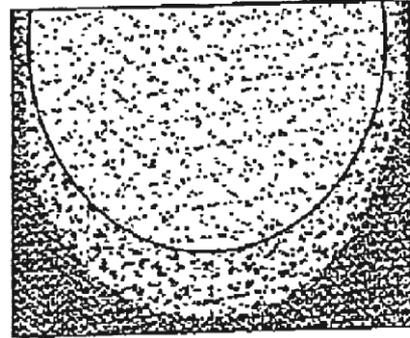


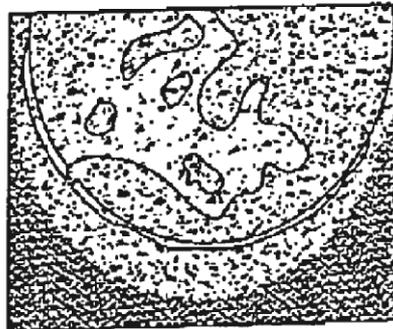
Fig. 11d



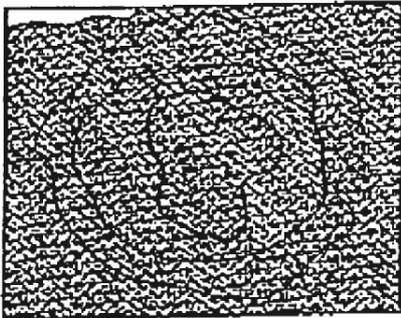
**Fig. 12a**



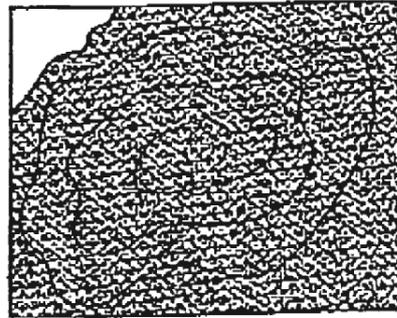
**Fig. 12b**



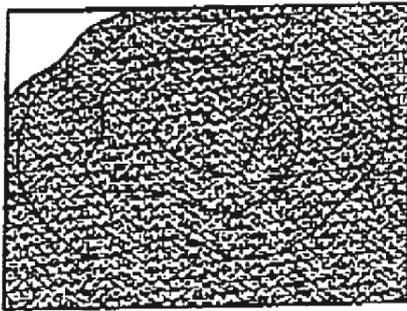
**Fig. 12c**



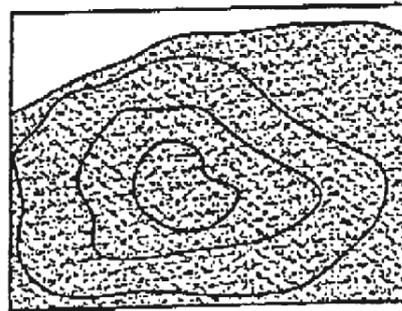
**Fig. 13a**



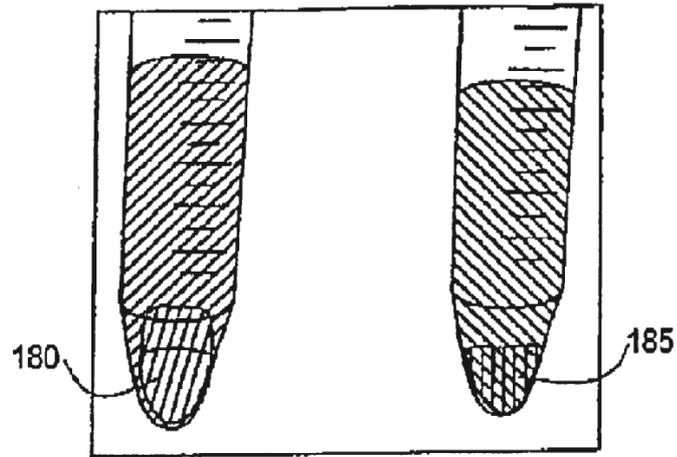
**Fig. 13b**



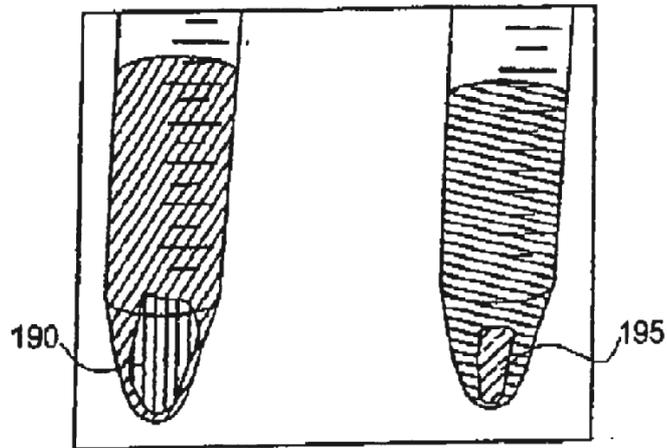
**Fig. 13c**



**Fig. 13d**



**Fig. 14a**



**Fig. 14b**