

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 724 825**

21 Número de solicitud: 201990046

51 Int. Cl.:

**C01G 9/02** (2006.01)

**A01N 59/00** (2006.01)

**A61K 8/27** (2006.01)

**C09D 11/037** (2014.01)

**D21H 19/38** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**29.11.2017**

30 Prioridad:

**29.11.2016 EP 16382571**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**16.09.2019**

Fecha de concesión:

**09.03.2020**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**16.03.2020**

73 Titular/es:

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

**Serrano, 117  
28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**FERNÁNDEZ LOZANO, José Francisco;  
DE LUCAS GIL, Eva y  
RUBIO MARCOS, Fernando**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

54 Título: **Macropartículas de óxido de zinc, método de preparación y uso de las mismas.**

57 Resumen:

Micropartículas de óxido de zinc, método de preparación y uso de las mismas.

La presente invención se refiere a micropartículas de óxido de zinc biocida, método de preparación y uso de las mismas. La invención se refiere además a un producto cosmético, a la pintura, a la tinta, al papel, al cartón, al textil, al alimento, a la agricultura, al cuidado del hogar, al aire acondicionado, al cuidado animal, a la higiene personal y a la higiene del trabajo, lentes de contacto, material de cromatografía, equipos médicos dermatológicos, laca, revestimiento y/o de producto plástico que contiene las micropartículas de óxido de zinc de la invención y a una composición biocida que comprende las micropartículas de óxido de zinc como se definen anteriormente. Finalmente, la invención se refiere además al uso de la composición biocida de la invención para la eliminación, inhibición del crecimiento o inhibición de la progenie de microorganismos.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015. Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 724 825 B2

**DESCRIPCIÓN****MICROPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINC, MÉTODO DE PREPARACIÓN Y USO DE LAS MISMAS****CAMPO DE LA INVENCION**

5

La presente invención se refiere al campo de las partículas de óxido de zinc y al método de preparación. Más particularmente, la presente invención se refiere al campo de micropartículas de óxido de zinc biocidas.

**10 ANTECEDENTES**

Los materiales de óxido de zinc (ZnO) encuentran aplicaciones industriales en muchos campos tecnológicos. Por ejemplo, los materiales de ZnO muestran excelentes propiedades optoelectrónicas (M. Bitenc y col., *Cryst. Growth Des.* 2010, 10, 830-837, Z. Hou y col., *Nanoscale Res. Lett.*, 2012, 7, 507-513) debido a su gran energía de banda ancha prohibida de 3,37 eV y gran energía de unión de excitones (K. Foe y col., *Thin Solid Films*, 2013, 534, 76-82, K. He y col., *Cryst Eng Comm*, 2014, 16, 3853-3856). No solo han sido ampliamente estudiados como soportes de catalizadores, tales como en la síntesis de metanol o en la descomposición de procesos industriales y experimentales (Phuruangrat, A. y col., *Journal of Nanomaterials*, 2014 (2014), pero también han demostrado sobresalir en otras aplicaciones como en semiconductores en células solares (P. Li y col., *Mater. Chem. Phys.* 2007, 106, 63-69; M. Klaumünzer y col., *Cryst Eng Comm*, 2014, 16, 1502-1513), o para aplicaciones antimicrobianas, de las cuales se han reportado aplicaciones antifúngicas (Patra P. y col., *Langmuir*, 2012, 28, 16966-16978; L. He y col., *Microbiol. Res.* 2011, 166, 207-215) y antibacterianas (Talebian N. y col., *J. Photochem. Photobiol. B: Biology*, 2013, 120, 66-73; N. Padmavathy y R. Vijayaraghavan, *Sci. Tech. Adv. Mater.* 2008, 9)

Además, el ZnO es un óxido particularmente interesante en la ingeniería de materiales porque su autoensamblaje puede manipularse, permitiendo la formación de meso-, micro- y nanoestructuras con un control preciso a nivel molecular que a su vez gobierna su estructura, propiedades y función. Al actuar sobre los mecanismos de crecimiento de los materiales de ZnO, se han descrito diferentes estructuras, formas y morfologías más o menos complejas. Ejemplos de partículas de ZnO en configuración 1D son nanovarillas (Schlur L. y col., *Chemical Communications*, 2015, 51, 3367-3370), nanoagujas (Park WI y col., *Adv Mater*, 2002, 14, 1841-1843), nanocables (Yang P. y col., *Advanced Functional Materials*, 2002, 12, 323 - 331) y nanocintas (Pan ZW y col., *Science*, 2001, 291, 1947-

1949). Las estructuras 2D más comunes son nanohojas (Pan A. y col., *J. Cryst. Growth*, 2005, 282, 165-172) y nanogránulos (Chiu WS y col., *Chem. Eng. J.*, 2010, 158, 345- 352). En cuanto a las estructuras 3D, estas incluyen la coliflor (Lin L. y col., *RSC Advances*, 2015, 5, 25215-25221), copos de nieve (Li C. y col., *Nanoscale*, 2010, 2, 2557-2560) y nanocajas (Gao PX y Wang ZL, *JACS.*, 2003, 125, 11299-11305). El autoensamblaje de nanocomponentes básicos inorgánicos en nanoestructuras ordenadas unidimensionales, bidimensionales y tridimensionales es atractivo porque la afinación de la forma en que se organizan los componentes básicos proporciona un método para ajustar las propiedades finales del material resultante.

10

K. Shingange y col., *Materiales Research Bulletin*, 2016, vol. 85, 52-63, divulga nanoestructuras de ZnO que consisten en estructuras de tipo flor de un grupo de nanovarillas compuestas de pequeñas partículas que se nuclean desde un centro.

15 En el documento WO 2010/018075 A1, se divulgan las nanopartículas de ZnO biocidas. Otros documentos divulgan partículas de ZnO nanométricas tales como Liu y col., *Journal of Materials Processing Technology*, 2007, vol. 189(1-3), 379-383; Srinkanth CK y col., *Journal of Alloys and Compounds*, 2009, vol. 486(1-2), 677-684 o el documento CN 1192 991 A. El documento CN 102 079 540 A divulga partículas porosas en 3D de ZnO compuestas de nanopartículas agregadas. Ninguno de estos documentos se refiere a las micropartículas de ZnO de toxicidad reducida.

20

Quando se trata de las aplicaciones antimicrobianas de los materiales de ZnO, la gran mayoría del estado de la técnica se refiere únicamente a sus aplicaciones antibacterianas (Li, M. y col., *Environ. Sci. Technol.*, 2011, 45, 1977-1983, Jones, N. y col., *FEMS Microbiol. Lett.*, 2008, 279, 71-76) con poca mención a sus propiedades antifúngicas (Sharma, D., *Thin Solid Films*, 2010, 519, 1224-1229). En general, los investigadores buscan factores como la concentración de partículas, el tamaño y el área superficial específica como factores decisivos en la actividad antimicrobiana de ZnO. Una clara tendencia común en el estado de la técnica es que las partículas nanométricas de ZnO más pequeñas, muestran una eficacia antibacteriana incrementada. Aunque se sabe poco sobre la actividad antifúngica de los materiales de ZnO, la investigación publicada revela una tendencia similar para la actividad antifúngica de ZnO: los materiales de ZnO nanométricos poseen una actividad antifúngica incrementada con respecto a las micro- o mesopartículas. Este efecto suele asociarse con un aumento de la superficie específica de los materiales más pequeños en comparación con los más voluminosos. En resumen, cuando se trata de la actividad antimicrobiana de ZnO, el

30

35

consenso hasta ahora publicado es que cuanto más pequeño mejor. Sin embargo, una desventaja de los materiales de ZnO nanométricos es su toxicidad: no solo las partículas de ZnO nanométricas se hacen fácilmente disponibles para penetrar en las células de membrana o generar especies de oxígeno reactivas (ROS), sino que también se sabe que  
5 los materiales de ZnO experimentan lixiviación de iones tóxicos de  $Zn^{2+}$  en el medio ambiente.

Por lo tanto, existe la necesidad de materiales de ZnO que muestren una actividad antimicrobiana (tanto antibacteriana como antifúngica) mejorada sin el inconveniente de los  
10 fenómenos de toxicidad antes mencionados.

### RESUMEN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han cultivado microestructuras de ZnO con superficie  
15 específica baja y actividad antimicrobiana sorprendentemente aumentada con respecto a las partículas de ZnO comerciales nanométricas. La baja superficie específica y el tamaño micrométrico permiten que las partículas de la invención muestren muy poca toxicidad asociada a niveles reducidos de lixiviación de  $Zn^{2+}$  y producción ROS limitada y que muestren una alta actividad antimicrobiana. En un sentido amplio, las partículas de la  
20 invención comprenden estructuras de forma cónica unidas por su base, que a su vez están constituidas por plaquetas de ZnO. Esta configuración proporciona a las partículas de la invención las propiedades ventajosas de partículas de ZnO de tamaño micrométrico menos tóxicas y de actividad antimicrobiana incrementada, típica de partículas de ZnO de tamaño nanométrico.

25 Por consiguiente, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a micropartículas de óxido de zinc que comprenden plaquetas, en donde las plaquetas,

- son prismas con base de tipo hexagonal,
- tienen una longitud de borde entre 30 y 200 nm, y
- 30 - se apilan en contacto directo entre sí a lo largo del eje c de apilamiento, por medio de sus planos cristalinos  $[000\bar{1}]$  o  $[0001]$ , y
- están rotadas por un ángulo no nulo con respecto a sus plaquetas adyacentes a lo largo de dicho eje c de apilamiento,

35 en el que dichas micropartículas de óxido de zinc se caracterizan por una superficie específica que es menor o igual a  $4 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Un segundo aspecto de la presente invención se refiere a un método para preparar las micropartículas de óxido de zinc como se ha definido anteriormente, que comprende las etapas de: i) adicionar urea a una solución acuosa de sal de zinc; ii) calentar la solución resultante de la etapa (i); iii) aislar el producto resultante de la etapa (ii); y iv) someter el producto aislado de la etapa (iii) a un tratamiento de recocido.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que las micropartículas de la presente invención muestran una actividad antimicrobiana intensa y al mismo tiempo son menos tóxicas que las composiciones comerciales de óxidos de zinc de tamaño nano- y micrométrico.

Por lo tanto, un tercer aspecto de la presente invención se refiere a un producto cosmético, pintura, tinta, papel, cartón, textiles, alimentos, agricultura, cuidado del hogar, aire acondicionado, cuidado de los animales, higiene personal y de trabajo, lentes de contacto, material de cromatografía, equipo médico, producto dermatológico, laca, recubrimiento y/o producto plástico que contiene las micropartículas de óxido de zinc como se ha definido anteriormente.

En otro aspecto más, la presente invención está dirigida a una composición biocida que comprende las micropartículas de óxido de zinc como se ha definido anteriormente y opcionalmente un vehículo.

Por último, otro aspecto de la presente invención está dirigido al uso de la composición biocida como se ha definido anteriormente para la eliminación, inhibición del crecimiento o inhibición de la progenie de microorganismos.

## **DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

Estas y otras características y ventajas de la invención se entenderán claramente a la vista de la descripción detallada de la invención que se hace evidente a partir de realizaciones preferidas, dado solo como ejemplo y no limitado a ellas, con referencia a los dibujos.

Figura 1: Mecanismo de crecimiento representativo de las micropartículas de la presente invención. El panel a muestra una única plaqueta de ZnO (1) y el panel b muestra la microestructura de las micropartículas de la invención que comprende al menos tres plaquetas de ZnO (3) apiladas a lo largo del eje c y tiene una morfología de forma cónica. El

espesor de la dimensión corta de una sola plaqueta de ZnO se caracteriza por su longitud de borde (2). El panel c muestra una representación de una micropartícula de tipo flor (4) que comprende grupos de plaquetas con forma cónica (3) unidos por su base.

5 Figura 2: Micrografías mediante microscopía electrónica de barrido de baja resolución (paneles a-f) y alta resolución (paneles g-l) para la caracterización morfológica de las micropartículas de los ejemplos 1 y 2 obtenidas antes y después del tratamiento térmico de recocido para muestras: A (no T, paneles a, g y m); B (350 °C, paneles b, h y n); C (400 °C, paneles c, l y o); D (500 °C, paneles d, j y p); E (600 °C, paneles e, k y q) y muestra F (700  
10 °C, paneles f, l y r). Los paneles m a r muestran los grupos de plaquetas apiladas de forma cónica.

Figura 3: Tamaño de cristalito (panel a) y estudio estadístico de los parámetros microestructurales de las micropartículas de la Figura 2: diámetro de plaquetas (panel b),  
15 espesor de plaquetas definido como longitud de borde (panel c) y ángulo de rotación entre plaquetas separadas por una pared de dominio (panel d).

Figura 4: Micrografía mediante microscopía electrónica de barrido de una micropartícula de tipo flor de la invención (panel a) tratada térmicamente a 500 °C (muestra D) en la que se  
20 señalizan diferentes grupos de plaquetas de forma cónica (5) (6) (7) y (8) respecto a los ejes x e y de referencia. El panel b muestra los espectros de Raman de cada grupo de plaquetas de forma cónica que revela la orientación del cristal relacionado con la intensidad del modo  $E_2^{\text{high}}$  Raman de ZnO. El láser de 532 nm empleado en el experimento Raman fue un láser polarizado a lo largo del eje x. El panel c muestra una micrografía electrónica de transmisión  
25 de una micropartícula tratada térmicamente a 500 °C (muestra D) que muestra la dirección cristalográfica paralela al lado de la longitud de borde de la plaqueta y por lo tanto a lo largo de la dirección de apilamiento de las plaquetas de ZnO.

Figura 5: Valores de superficie específica (SSA) de dos muestras comerciales, nanoZnO  
30 (cuadrado sin relleno) y microZnO (triángulo sin relleno), así como las partículas de la invención (círculos rellenos) en función de la temperatura de recocido.

Figura 6: Ensayo de lixiviación de  $Zn^{2+}$  en agua de peptona del ejemplo 5 (panel a). Los  
35 datos se obtuvieron mediante Espectroscopia de Emisión Atómica de Plasma Acoplado Inductivamente (ICP-AES) que produjo la concentración de  $Zn^{2+}$  en agua de peptona para cada una de las muestras probadas: muestras comerciales microZnO y nanoZnO y

muestras de A a F (Ejemplos 1 y 2). En el panel b se muestra una representación gráfica en la que el eje de ordenadas (correspondiente a la concentración de  $Zn^{2+}$ ) está limitado a un valor de 1 mg/l.

5 Figura 7: Degradación fotocatalítica de naranja de metilo (MO) expuesto a irradiación de luz UV en presencia de muestras comerciales microZnO (triángulo sin relleno) y nanoZnO (cuadrado sin relleno) así como las partículas ejemplares de la presente invención (muestra D, círculo relleno). El área gráfica se divide en dos regiones según la capacidad de degradación fotocatalítica. La zona gris (9) corresponde a una región en la que las partículas  
10 de ZnO producen una gran degradación fotocatalítica y la zona blanca (10) indica que las partículas de ZnO producen una baja degradación fotocatalítica.

Figura 8: Actividad antimicrobiana de las partículas de la presente invención representadas por las muestras A a F, en comparación con referencias comerciales (microZnO y  
15 nanoZnO). Los paneles a y b representan la actividad antibacteriana (R) contra *E. coli* y *S. aureus*. El panel c muestra la actividad antifúngica de dichas muestras contra *A. niger*.

Figura 9: El panel a muestra una unidad de tres plaquetas (3) de las micropartículas de la presente invención en las que cada plaqueta se apila a lo largo de la dirección [0001]. Las  
20 plaquetas adyacentes forman una interfaz de pared de dominio (11) en la que las plaquetas adyacentes están rotadas a lo largo de la dirección [0001]. La acumulación de carga generada en las paredes del dominio forma una barrera potencial llamada barrera Schottky (12). El panel b muestra el potencial zeta y los valores de conductividad de las micropartículas de ZnO de la presente invención (muestra D) medidas en una suspensión  
25 acuosa a diferentes valores de pH.

Figura 10: Micrografías mediante microscopía electrónica de barrido de micropartículas de ZnO de la presente invención (muestra D) atacando bacterias *E. coli* (a), *S. aureus* (b) y hongo *A. niger* (c) por acción electrostática. El panel d muestra la catodoluminiscencia de la  
30 muestra D contra *A. niger*. La línea de puntos en la Figura 10 (a) delimita la bacteria *E. coli* y en la Figura 10 (b) delinea la bacteria *S. aureus*.

Figura 11: Supervivencia de células HeLa con 0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml y 0,5 mg/ml de nanoZnO y micropartículas de la presente invención tratadas térmicamente a 500 °C  
35 (marcado como 500 °C en el eje x de la figura). La supervivencia de las células se evaluó por el ensayo de MTT después de 24 h de contacto con las partículas.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

A menos que se defina lo contrario, todos los términos y expresiones técnicas y científicas utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta descripción.

Un primer aspecto de la invención está dirigido a micropartículas de óxido de zinc que comprenden plaquetas, en donde las plaquetas,

- son prismas con base de tipo hexagonal,
- 10 - tienen una longitud de borde entre 30 y 200 nm, y
- se apilan en contacto directo entre sí a lo largo del eje c de apilamiento, por medio de sus planos cristalinos  $[000\bar{1}]$  o  $[0001]$ , y
- están rotadas por un ángulo no nulo con respecto a sus plaquetas adyacentes a lo largo de dicho eje c de apilamiento;

15 en el que dichas micropartículas de óxido de zinc se caracterizan por una superficie específica que es menor o igual a  $4 \text{ m}^2/\text{g}$ .

La superficie específica (SSA) de un sólido debe entenderse como la superficie total de dicho sólido por unidad de masa, y se expresa en  $\text{m}^2/\text{g}$ . Bajo esta definición, queda claro para el experto que una superficie plana tiene un valor de SSA menor que una superficie de tipo acordeón. En este respecto, los valores de SSA para sólidos pueden medirse fácilmente mediante curvas de adsorción de isoterma Brunauer-Emmett-Teller (BET).

25 Se considera un nanomaterial cuando el 50 % o más de las partículas en su distribución de tamaños numéricos poseen una o más dimensiones externas en el intervalo de tamaño entre 1 nm y 100 nm. Se calculó el valor mínimo de la superficie específica (SSA) para diferentes morfologías de partículas (esfera, fibra y placa) que tenía una dimensión de 100 nm para fines de referencia. Para calcular los valores de SSA es necesario determinar el

30 volumen de partícula y el área para cada morfología, así como el número de partículas por gramo. Para expresar los datos como una función de masa, en lugar de utilizar el número de partículas, se usó el valor de densidad de  $5,61 \text{ g}/\text{cm}^3$  de material de ZnO. Los resultados obtenidos para las morfologías de esfera, fibra y placa fueron  $10,7 \text{ m}^2/\text{g}$ ,  $7,5 \text{ m}^2/\text{g}$  y  $4,3 \text{ m}^2/\text{g}$ , respectivamente. Los cálculos de SSA mínima permiten categorizar las partículas en dos

35 grupos: grupo de nanoescala (SSA más de  $10,7 \text{ m}^2/\text{g}$ ) y grupo de microescala (SSA menor que  $4,3 \text{ m}^2/\text{g}$ ). Los rangos potenciales de toxicidad de las partículas se definen de acuerdo

con la SSA mínima como inseguro (más de 10,7 m<sup>2</sup>/g), límite de seguridad (entre 10,7 y 4,3 m<sup>2</sup>/g) y seguro (menos de 4,3 m<sup>2</sup>/g).

5 El término ampliamente utilizado "micropartícula", debe ser interpretado en el contexto de la presente invención como cualquier partícula que tiene al menos una dimensión micrométrica, es decir, menor de 100 µm pero mayor de 100 nm.

El término "pila" debe interpretarse como un conjunto o apilamiento ordenado de, en el presente contexto, plaquetas.

10

En el contexto de la presente invención, el término "plaqueta" se debe asociar con cualquier partícula de ZnO caracterizada por ser de forma de placa (1 en la Figura 1) o un prisma con base de tipo hexagonal.

15 Los términos "longitud de borde" (2 en la figura 1) cuando se usan para referirse al espesor de las plaquetas se refiere al borde corto entre los dos vértices más cercanos de cada base poligonal de la partícula cristalina. Los términos "longitud lateral" se refieren al borde grande de los dos vértices más cercanos de la base del polígono. Los términos "diámetro" o "diámetro equivalente" de la plaqueta se refieren a la distancia entre los dos vértices más  
20 alejados de la base poligonal. Para ejemplificar esto último, si el polígono en cuestión es un prisma hexagonal, entonces la longitud del borde sería la altura de dicho prisma, es decir, la longitud de uno de los seis bordes formados entre dos vértices más cercanos de cada base hexagonal que forman el prisma hexagonal. El término "vértice" se refiere a la unión de dos bordes adyacentes. El término ángulo de rotación entre dos plaquetas adyacentes se refiere  
25 al ángulo formado por la línea que va desde el centro de una primera plaqueta a un vértice de la primera plaqueta y la línea que va desde el centro de una segunda plaqueta (adyacente a la primera plaqueta) a un vértice de la segunda plaqueta (y equivalente al vértice considerado para la primera plaqueta). El ángulo de rotación se produce a lo largo del eje c de las plaquetas de ZnO.

30

En una realización particular de la invención, las plaquetas son monocristales. En otra realización particular de la invención, cada plaqueta crea un único dominio.

35 En el contexto de la presente invención, el término "dominio" se refiere a una región dentro de un cristal de ZnO en la cual el cristal es homogéneo en una dirección cristalográfica.

Además, las micropartículas de óxido de zinc, como se definen anteriormente, comprenden plaquetas que tienen una longitud de borde entre 30 y 200 nm.

5 En una realización particular de la invención, las plaquetas se caracterizan por una longitud de borde entre 40 y 180 nm.

En otra realización particular de la invención, las plaquetas se caracterizan por un diámetro comprendido entre 100 y 500 nm.

10 Los términos "tamaño de cristalito" deben interpretarse como la longitud de coherencia de la estructura cristalina y se determina por difracción de rayos X.

En una realización particular de la invención, las micropartículas de ZnO se caracterizan por un tamaño de cristalito entre 10 nm y 100 nm, preferiblemente entre 40 y 70 nm.

15 Las micropartículas de óxido de zinc de la invención comprenden plaquetas apiladas a lo largo del eje c hexagonal.

20 En una realización particular de la invención, las plaquetas apiladas forman paredes de dominio o barreras de tipo Schottky.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que las micropartículas de la invención están formadas por plaquetas que están apiladas en contacto directo entre sí a lo largo del eje c de apilamiento por medio de sus planos cristalinos  $[000\bar{1}]$  o  $[0001]$ , es decir, sus caras polares, y están rotadas por un ángulo no nulo con respecto a sus plaquetas adyacentes a lo largo de dicho eje c de apilamiento. El ángulo de rotación formado entre dos vértices de plaquetas adyacentes unidas por paredes de dominio es el resultado de la estructura apilada de forma cónica en la que las plaquetas adyacentes poseen diferentes tamaños y por lo tanto los seis vértices no están alineados a medida que el diámetro de plaquetas disminuye a lo largo del eje de crecimiento, el eje c de la estructura cristalina de ZnO.

30 En una realización particular de la invención, el ángulo no nulo es un ángulo comprendido entre  $1^\circ$  y  $40^\circ$ .

35 Sin pretender estar limitado por ninguna teoría en particular, se cree que es el contacto directo entre plaquetas adyacentes en un ángulo diferente de  $0^\circ$  a lo largo del eje c de

apilamiento lo que da lugar a la generación de paredes de dominio en cada capa interplaquetas, acumulando carga eléctrica y generando un potencial eléctrico distribuido a lo largo de la estructura. Sigue una explicación probable del mecanismo de montaje y de los fenómenos eléctricos detrás de las partículas de la invención.

5

En condiciones ambientales, el óxido de zinc (ZnO) cristaliza principalmente en la forma más estable de *wurtzita* hexagonal, un cristal polar que se caracteriza por una superficie positivamente cargada de Zn-polar ( $[0001]$  plano cristalino) y una superficie O-polar cargada negativamente ( $[000\bar{1}]$  plano cristalino) además de las seis caras no polares. El plano cristalino  $[0001]$  o  $[000\bar{1}]$  es la dirección cristalográfica del eje c de la estructura de ZnO. En términos de la estructura molecular cristalina de ZnO, las superficies polares están asociadas a los átomos Zn y O colocados en posiciones terminales. De forma esquemática, se cree que estas superficies positiva y negativamente cargadas desempeñan un papel importante en el mecanismo detrás de la formación de plaquetas apiladas a lo largo del eje c: es la atracción electrostática entre dichas superficies polares lo que las reúne y permite el apilamiento de las nanoplaquetas de ZnO (Wang S. y Xu A., *CrystEngComm*, 2013, 15, 376).

10  
15

Una vez formadas las micropartículas de ZnO que comprenden plaquetas apiladas, un tratamiento térmico o un recocido térmico comprime dichas plaquetas contra sus plaquetas adyacentes vecinas dando lugar a plaquetas que están en contacto directo con las plaquetas adyacentes. Como consecuencia del tratamiento térmico, las plaquetas adyacentes forman una pared de dominio en la interfaz. Además, el tratamiento térmico mejora la cristalinidad de la estructura que da como resultado un tamaño de cristalito entre 20  
25 10 nm y 100 nm, preferiblemente entre 40 y 70 nm. Los tamaños de cristalitos grandes de las plaquetas apiladas dan como resultado una mayor inmovilización de cationes de zinc, es decir, el tratamiento térmico reduce la liberación de  $Zn^{2+}$  como se demuestra en experimentos de lixiviación.

Además, el apilamiento de las plaquetas de ZnO a lo largo del eje c se produce con un ángulo de rotación no nulo, es decir, un ángulo de rotación que es  $>0^\circ$ , con respecto a sus plaquetas adyacentes, lo que significa que cada plaqueta tiene un grado de rotación a lo largo del eje c con respecto a sus dos plaquetas adyacentes. Se cree que, en estas condiciones, cada plaqueta es un dominio único, y son los límites formados por cada  
35 plaqueta lo que da lugar a fenómenos interfaciales finitos y la aparición de paredes de

dominio (11) (Figura 9). Como puede verse en la Figura 9 (a), las paredes del dominio conducen a una generación de barreras de tipo Schottky, donde se acumula una carga negativa al agotamiento de la banda de conducción de ZnO. Por lo tanto, estas barreras Schottky implican la generación de un potencial eléctrico. Las barreras de Schottky pueden ser asimétricas debido a la rotación relativa, el tamaño, entre otros, de cada plaqueta. Además, la presencia de múltiples plaquetas apiladas da lugar a la aparición de multidominios que podrían considerarse como una partícula o una estructura que comprende más de, o al menos, dos dominios.

En el contexto de la presente invención, los términos "pared de dominio" se refieren a los dominios cristalográficos que separan las interfaces, en donde, como se ha definido anteriormente, cada dominio es una región dentro de un cristal ZnO en el que el cristal es homogéneo en una dirección cristalográfica. Con respecto al eje de crecimiento preferencial, las plaquetas están orientadas a lo largo del eje c dando lugar a una estructura de plaquetas apiladas de forma cónica. La pared del dominio se produce en el plano perpendicular al eje principal del sistema de cristal ZnO, el eje c y la simetría del cristal se rompe por la rotación de las plaquetas adyacentes a lo largo del eje c.

Las micropartículas de óxido de zinc de la presente invención se caracterizan por una superficie específica que es menor o igual a  $4 \text{ m}^2/\text{g}$ .

En una realización preferida de la invención, las micropartículas de óxido de zinc definidas anteriormente se caracterizan por una superficie específica que es menor o igual a  $2 \text{ m}^2/\text{g}$ , más preferiblemente menor o igual a  $1,5 \text{ m}^2/\text{g}$ .

Se cree en el contexto de la presente invención que una de las razones detrás de la toxicidad de nanopartículas de ZnO se refiere a que el tamaño de partícula es de dimensiones nanométricas. De forma similar, también se cree en el contexto de la presente invención que la toxicidad de las nanopartículas de ZnO también está relacionada con su superficie específica (SSA). Tomando SSA como un criterio para evaluar la toxicidad de ZnO, se determinó que las partículas de la invención son mucho más seguras que las muestras comerciales de nanopartículas de ZnO esféricas (nanoZnO, *Evonik*) y placas micrométricas (microZnO, *Asturiana de Zinc*).

Las micropartículas de óxido de zinc de la invención pueden ser micropartículas donde las plaquetas apiladas forman una estructura de forma cónica y en la que al menos dos de

dichas estructuras de forma cónica están unidas por la base de cada cono. Esta estructura puede ser representada esquemáticamente por el panel c de la Figura 1.

5 En una realización particular, cada estructura de forma cónica de las micropartículas de la invención está formada por al menos tres plaquetas. Por ejemplo, una estructura de forma cónica que tiene una longitud de 500 nm podría estar formada por alrededor de 10 plaquetas apiladas que tienen una longitud de borde de aproximadamente 50 nm.

10 En una realización particular, las estructuras de forma cónica de la invención se caracterizan por un diámetro comprendido entre 0,1 y 0,5  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente entre 0,1 y 0,3  $\mu\text{m}$ .

15 En una realización preferida de la invención, las micropartículas de óxido de zinc de la invención se caracterizan por ser estructuras de micropartículas con forma de flor. Las imágenes SEM de la Figura 2 muestran representantes no limitativos de estas micropartículas de tipo flor de la invención. De esta forma, los términos "tipo flor" se refieren a una forma que se asemeja a una flor, o figuras similares como un ramo, un árbol, una estrella, un cactus, entre otros.

20 En una realización particular, las micropartículas de tipo flor de la invención se caracterizan por un diámetro comprendido entre 0,1 y 20  $\mu\text{m}$ , más preferiblemente entre 1 y 10  $\mu\text{m}$ .

Otro aspecto de la invención se refiere a un método para preparar las micropartículas de óxido de zinc como se ha definido anteriormente, que comprende las etapas de: i) adicionar urea a una solución acuosa de sal de zinc, ii) calentar la solución resultante de la etapa (i),  
25 iii) aislar el producto resultante de la etapa (ii), y iv) someter el producto aislado de la etapa (iii) a un tratamiento de recocido.

30 En otra realización preferida, el método para preparar las micropartículas de óxido de zinc como se ha definido anteriormente es un método en el que la etapa (i) está a una concentración entre 1 y 10 M, más preferiblemente entre 4 y 6 M, incluso más preferiblemente 5 M. En todavía otra realización preferida, la solución de sal de zinc de la etapa (i) está a una concentración entre 3 y 10 M, más preferiblemente entre 4 y 10 M, incluso más preferiblemente entre 3 y 7 M. En todavía otra realización preferida, el método para preparar las micropartículas de óxido de zinc según se ha definido anteriormente es un  
35 método en el que la solución en la etapa (ii) se calienta a una temperatura entre 80 °C y 140 °C durante un período de tiempo entre 1 y 3 horas.

En una realización más preferida de la invención, la solución en la etapa (ii) se calienta a una temperatura entre 100 °C y 120 °C.

5 En todavía otra realización particular de la invención, la solución en la etapa (ii) se calienta durante 2 horas.

El término "aislamiento" se refiere a cualquier proceso capaz de producir el producto de reacción principal de la etapa (ii) privado de la mayor parte del material líquido. Por ejemplo, el aislamiento del producto puede referirse al proceso de extracción, centrifugación, 10 filtración, evaporación, cristalización y otros procesos conocidos en la técnica.

En una realización preferida de la invención, el método para preparar las micropartículas de óxido de zinc como se ha definido anteriormente es un método en el que la etapa (iii) comprende enfriar la solución resultante de la etapa (ii) a temperatura ambiente y añadir un 15 disolvente acuoso caliente para obtener un producto precipitado; y aislar el producto precipitado. Una vez aislado el producto precipitado, se puede lavar opcionalmente con un disolvente seleccionado de disolventes polares o no polares como el del grupo de agua, etanol, metanol, isopropanol, acetona, acetato de metilo, acetato de etilo, dimetilformamida, acetonitrilo, pentano, hexano, tolueno, trementina, tetracloroetileno.

20 Los términos "disolvente acuoso caliente", en el contexto de la presente invención deben identificarse rápidamente por el experto como un disolvente acuoso que no está a la temperatura ambiente (20-25 °C) o por debajo de la misma. Es un disolvente acuoso que se somete a calor pero todavía está en fase líquida y por lo tanto es un disolvente acuoso a una 25 temperatura más alta que la temperatura ambiente pero por debajo de su punto de ebullición.

En una realización preferida, el disolvente acuoso caliente está a una temperatura desde 30 hasta 120 °C, desde 30 hasta 100 °C, desde 40 hasta 100 °C, desde 50 hasta 100 °C, desde 30 60 hasta 100 °C y desde 70 hasta 100 °C. Preferiblemente, el disolvente acuoso caliente está a una temperatura desde 30 hasta 80 °C.

En una realización particular, el disolvente acuoso caliente de la etapa (iii) es agua.

En otra realización preferida, el método para preparar las micropartículas de óxido de zinc 35 de la invención es un método en el que el tratamiento de recocido (etapa iv) se realiza a una temperatura entre 350 °C y 700 °C.

En todavía otra realización preferida, dicho tratamiento de recocido de la etapa (iv) se realiza durante un periodo de tiempo entre 1 y 24 horas.

5 El término "recocido" es ampliamente empleado en la metalurgia y la ciencia de los materiales, y se refiere a un tratamiento térmico que altera las propiedades físicas y a veces químicas de un material para aumentar su ductilidad y reducir su dureza, haciéndolo más factible. Se trata de calentar un material por encima de su temperatura de recristalización, mantener una temperatura adecuada y después enfriar.

10 Se ha descubierto que las partículas de la invención ejercen un efecto biocida cuando están en contacto con microorganismos. Por lo tanto, otro aspecto de la invención se refiere a una composición biocida que comprende las micropartículas de óxido de zinc como se ha definido anteriormente y opcionalmente un vehículo.

15 Aunque cualquier vehículo adecuado conocido por los expertos en la materia puede ser empleado en las composiciones biocidas de esta invención, el tipo de vehículo variará dependiendo del tipo de aplicación. Las composiciones biocidas de la presente invención pueden formularse comprendiendo un vehículo líquido en el que ejemplos de vehículos líquidos incluyen, pero no se limitan a, un líquido, tal como agua, solución salina, alcohol,  
20 una grasa, una cera o un tampón, o un vehículo sólido ejemplos de vehículos sólidos incluyen, pero no se limitan a, un sólido tal como un polímero, manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa, carbonato de magnesio que puede, tanto vehículos líquidos como sólidos, portar una dispersión, suspensión o solución. Otros vehículos adecuados incluyen emulsiones, pastas, ungüentos,  
25 geles, cremas, lociones, polvos, aceites, lápices, desodorantes-cremas, geles, lociones, emulsiones, barras desodorantes, Roll-ons, pulverizadores, pulverizadores de bomba o lacas.

Los inventores han descubierto que las micropartículas de la invención tienen excelentes  
30 propiedades antimicrobianas, siendo adecuadas como agentes biocidas para cualquier tipo de organismos vivos unicelulares o multicelulares microscópicos tales como bacterias, arqueas, protozoos, hongos y algas. Además, las micropartículas de la invención actúan sobre microorganismos vivos por un mecanismo que, sorprendentemente, no está basado en la lixiviación de  $Zn^{2+}$  o en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto se  
35 pone de manifiesto en las figuras 6 y 7, así como en los ejemplos 5 y 6, y es un hallazgo de cambio de paradigma que va en contra de las enseñanzas de la técnica anterior.

El término "biocida", empleado en el contexto actual cuando se hace referencia a las micropartículas de la invención o una composición y/o material que comprende dichas micropartículas, debe interpretarse como la calidad inherente a las micropartículas de la invención para destruir, disuadir, hacer inofensivos, inhibir el crecimiento, ejercer un efecto  
5 de control o inducir apoptosis en cualquier microorganismo. En el contexto de la presente invención, el término "dosis" se refiere a la concentración requerida de micropartículas de ZnO de la presente invención para producir dicho efecto biocida. El término "biocida" también debe interpretarse como teniendo un significado similar como desinfectante, pesticida o conservante. De acuerdo con la presente descripción, es evidente para el  
10 experto que las micropartículas de ZnO biocidas tal como se han definido anteriormente se pueden incorporar en cualquier material adecuado para ser puesto en contacto cercano con cualquier superficie que requiera ser desinfectada.

Por lo tanto, en otro aspecto de la invención, la invención está dirigida a un producto  
15 cosmético, pintura, tinta, papel, cartón, textiles, alimentos, producto agrícola, cuidado del hogar, aire acondicionado, cuidado animal, higiene personal y del trabajo, lentes de contacto, material de cromatografía, equipo médico, producto dermatológico, laca, recubrimiento y/o producto plástico que contiene las micropartículas de óxido de zinc de la invención.

20 En una realización particular, la invención se dirige a un producto seleccionado de pinturas, tintas, producto agrícola, productos para el cuidado del hogar, aire acondicionado, cuidado animal, productos para higiene del trabajo, materiales de cromatografía, equipo médico, lacas, revestimientos y/o plásticos que contienen las micropartículas de óxido de zinc de la  
25 invención.

En otra realización particular, la invención se dirige a un producto cosmético, alimento, producto agrícola, cuidado de animales, productos para la higiene personal, lentes de contacto, equipo médico y/o producto dermatológico que contienen las micropartículas de  
30 óxido de zinc de la invención.

En todavía otra realización particular de la presente invención, las micropartículas como se definen anteriormente pueden usarse en la fabricación de materiales que están en contacto cercano con organismos humanos, animales o vegetales. Esta aplicación es posible debido  
35 a la baja dosis de partículas requeridas por la presente invención además de las propiedades ventajosas de las partículas de la invención: baja generación de especies

reactivas de oxígeno (ROS) y baja liberación de cationes  $Zn^{2+}$ . Por lo tanto, la presente invención se refiere también a composiciones que comprenden las micropartículas de óxido de zinc de la invención.

- 5 En otro aspecto, la invención se dirige a una composición biocida que comprende las micropartículas de óxido de zinc de la invención y opcionalmente un vehículo.

En todavía otro aspecto, la invención se dirige al uso de una composición biocida que comprende las micropartículas de óxido de zinc de la invención y opcionalmente un  
10 vehículo, para la eliminación, inhibición del crecimiento o inhibición de la progenie de los microorganismos. En una realización particular, dicho uso excluye cualquier tratamiento o métodos de diagnóstico en el cuerpo humano o animal.

En una realización preferida de la invención, la invención se dirige al uso de la composición  
15 biocida de la invención en la que los microorganismos se seleccionan de bacterias y hongos.

En una realización particular, la composición biocida de la invención es:

- una composición farmacéutica, o
- una composición de cuidado personal, o
- 20 - una composición de cuidado del hogar, o
- una composición de protección de materiales, o
- una composición utilizada para desinfección industrial, o de instituciones o de hospitales,  
o
- una composición de protección vegetal, preferiblemente una composición fungicida.

25 En una realización, la invención se dirige a una composición farmacéutica que comprende micropartículas de óxido de zinc de la invención y opcionalmente un vehículo farmacéuticamente aceptable.

30 En una realización particular, la invención se dirige a las micropartículas de óxido de zinc de la invención o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o prevención de una infección. Preferiblemente, para su uso en el tratamiento o prevención de una infección en un animal, más preferiblemente un ser humano.

35 En otra realización particular de la invención, la infección que se debe tratar o prevenir se selecciona de las infecciones de la piel, mucosa o membranas mucosas, superficies

dentales, uñas, pelo o lesiones en la piel y/o membranas mucosas.

En una realización preferida, la invención se dirige a las micropartículas de óxido de zinc de la invención o la composición farmacéutica de la invención para su uso en el tratamiento o  
5 prevención de una infección de la piel, membranas mucosas, uñas, lesiones de la piel y/o membranas mucosas.

En una realización particular, la invención se dirige al uso de las micropartículas de óxido de zinc de la invención o la composición farmacéutica de la invención, en el tratamiento o  
10 prevención de una infección. Preferiblemente, en el tratamiento o prevención de una infección en un animal, más preferiblemente un ser humano.

En una realización particular, la invención se dirige a las micropartículas de óxido de zinc de la invención o la composición farmacéutica de la invención, en la fabricación de un  
15 medicamento para el tratamiento o prevención de una infección. Preferiblemente, en el tratamiento de una infección en un animal, más preferiblemente un ser humano.

En otra realización, la invención se dirige a un método para tratar o prevenir una infección, comprendiendo el método administrar las micropartículas de óxido de zinc de la invención o  
20 la composición farmacéutica de la invención. Preferiblemente, la infección es en un animal, más preferiblemente en un ser humano.

Los términos "vehículo farmacéuticamente aceptable" según se utilizan en la presente invención incluye cualquier disolvente, medio de dispersión, recubrimiento, agentes  
25 isotónicos y retardantes de la absorción y similares que son compatibles con la actividad de las micropartículas y son fisiológicamente aceptables para el sujeto.

En el contexto de la presente invención, el término "bacteria" (plural "bacterias") se refiere tanto a microorganismos procariotas gram-negativos como gram-positivos, típicamente de  
30 unos pocos micrómetros de longitud y que tienen un gran número de formas, que van desde esferas a varillas y espirales. Ejemplos no limitativos de bacterias adecuadas para el uso de la composición biocida de la presente invención son *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Aspergillus niger* (*A. niger*).

35 En el contexto de la presente invención, el término "hongo" (plural "hongos") se refiere a microorganismos eucariotas que incluyen microorganismos unicelulares tales como

levaduras y mohos, así como hongos multicelulares que producen formas de fructificación familiares conocidas como hongos.

5 Ejemplos no limitativos de hongos adecuados para el uso de la composición biocida de la presente invención son la pudrición parda (*Poria* Sp.), la podredumbre blanca (*Polyporus* Sp.), el hongo de la descomposición de la madera (*Poria placenta*) y el mohó.

## EJEMPLOS

10 La presente invención se describirá a continuación a modo de ejemplos que sirven para ilustrar la construcción y ensayo de realizaciones ilustrativas. Sin embargo, se entiende que la presente invención no está limitada en modo alguno a los ejemplos que siguen.

### **Ejemplo 1.** Síntesis de una micropartícula ejemplar de la invención

15 Todos los productos químicos se utilizaron directamente sin purificación adicional. Se preparó una solución de nitrato de zinc hexahidratado ( $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ) 5M diluyendo 297,2 g  $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  (0,898 mol) en 166 ml de agua. Para comenzar el procedimiento, se añadieron 218 g de urea (3,6 mol,  $CO(NH_2)_2$ ) bajo agitación a temperatura ambiente a la  
20 solución de nitrato de zinc hexahidratado ( $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ) 5M.

La reacción se calentó en un baño de aceite a 100–120 °C y se agitó a 300 rpm durante 2 h. Después de enfriarse de forma natural a temperatura ambiente, se añadió agua caliente para obtener una suspensión blanca. Posteriormente, el precipitado se aisló por filtración y  
25 se lavó con agua y etanol para eliminar las impurezas. El producto en polvo blanco se secó a 80 °C durante 24 h para proporcionar una muestra A ejemplar (Figura 2, paneles a, g y m).

### **Ejemplo 2** Tratamiento de recocido térmico de una micropartícula ejemplar de la invención.

30 El producto seco obtenido en el ejemplo 1 (muestra A) se sometió adicionalmente a un tratamiento de recocido a temperaturas entre 350 °C y 700 °C, dando lugar a las muestras B (350 °C), C (400 °C), D (500 °C), E (600 °C) y F (700 °C). El tratamiento de recocido consistió en colocar una muestra de ZnO obtenida de un método tal como el del ejemplo 1, en un horno eléctrico (Nabertherm) durante 1 a 24 horas bajo atmósfera de aire. La Figura 2  
35 muestra imágenes SEM de las micropartículas ejemplares de las muestras B a F.

Respecto a la caracterización de la presente invención, se ha realizado un estudio estadístico de los principales parámetros morfológicos (Figura 3). La Figura 3(a) muestra que el tratamiento térmico tiene un papel importante en el tamaño de cristalito de la presente invención. Como puede verse en la figura 3(b), el diámetro de las plaquetas se encuentra entre 100 y 500 nm, donde el valor medio es 231 nm. La figura 3(c) muestra el histograma de longitud de borde entre 30 y 180 nm y cuyo promedio es 76 nm. El histograma de ángulo no nulo característico de esta invención se representa en la figura 3(d). El ángulo promedio es de 13°, pero puede variar entre  $> 0^\circ$  y  $35^\circ$ .

### 10 **Ejemplo 3.** Caracterización Raman de las micropartículas de la invención

El panel a de la Figura 4 muestra la micrografía electrónica de barrido de una micropartícula única ejemplar de la invención (muestra D), que comprende grupos de diferente forma cónica dispuestos en diferentes direcciones espaciales. Por motivos de simplicidad, se dibujó un eje x-y de referencia en la micrografía. Cada estructura de forma cónica comprendía un colector de plaquetas de ZnO apiladas. Esta micropartícula ejemplar se caracteriza por una forma de tipo flor. La misma micropartícula se observó bajo el microscopio óptico del microscopio Raman Confocal y la referencia del eje x-y se alineó en consecuencia. Se utilizó un láser polarizado a 534 nm a lo largo del eje x para espectroscopia Raman. Como puede verse en el panel b (Figura 4), la intensidad de la señal  $E_2^{\text{high}}$  varía con la orientación de cada grupo de forma cónica apilada que forma la micropartícula en forma de flor. En el caso de ZnO, el modo  $E_2^{\text{high}}$  Raman posee una intensidad Raman más alta cuando la luz polarizada está alineada perpendicularmente al plano cristalográfico [0001]. Los espectros Raman representados en el panel b de la Figura 4 se identifican con los correspondientes grupos de plaquetas de forma cónica mostrados en el panel a de la Figura 4. El pico Raman más intenso (5) corresponde al apilamiento de plaquetas orientado verticalmente. Sin embargo, los grupos de forma cónica orientados en el plano x-y (6, 7, 8) muestran picos  $E_2^{\text{high}}$  Raman menos intensos de acuerdo con la proyección en el eje y que también es perpendicular a la dirección de la luz polarizada. Los resultados anteriores apoyan que las plaquetas se apilan a lo largo de la dirección cristalográfica [0001]. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) confirma este resultado (panel c de la figura 4). La micrografía TEM muestra la alineación de la estructura cristalina [0001] paralela a la longitud de borde de una plaqueta de ZnO. En este caso, el plano cristalino observado en la micrografía TEM corresponde a la superficie  $[10\bar{1}0]$ , y la dirección de crecimiento preferencial del grupo de plaquetas apiladas es [0001], es decir, el eje c.

**Ejemplo 4.** Determinación de la superficie específica para las partículas de la invención.

La SSA de las micropartículas en forma de flor de ZnO ejemplares se determina mediante el método Brunauer-Emmett-Teller (BET). Para fines de comparación, en este estudio se utilizan dos productos comerciales de diferentes tamaños: microZnO (Asturiana de Zinc) y nanoZnO (Evonik). Los datos se representan en la Figura 5. El valor SSA correspondiente a la referencia nanoZnO se encuentra en el rango inseguro (superior a 10,7 m<sup>2</sup>/g), correspondiente al comportamiento de la nanoescala. El valor de SSA para la referencia comercial microZnO se encuentra en el límite de seguridad (entre 10,7 y 4,3 m<sup>2</sup>/g), cerca del comportamiento de la microescala. Con respecto a las estructuras de ZnO de tipo flor como las muestras de la A a la F (véanse los Ejemplos 1 y 2), los valores de SSA determinados experimentalmente son más bajos que los microZnO comerciales. Estas muestras están dentro del comportamiento de microescala (menos de 4,3 m<sup>2</sup>/g), y por lo tanto su toxicidad potencial se establece en el intervalo seguro. Además, la evolución de los valores de SSA con el tratamiento de recocido (flecha en la Figura 5) revela que para tratamientos de temperatura más alta, el área superficial específica disminuye (véase la tabla siguiente). Por lo tanto, se sugiere que al aumentar la temperatura de recocido, las plaquetas apiladas de la partícula de la invención pueden compactarse cada vez más entre sí, bloqueando algunos poros que posiblemente se crean durante la síntesis. Por lo tanto, la temperatura de recocido juega un papel importante en el proceso de compactación de plaquetas apiladas, lo que permite ajustar los valores de SSA en las partículas de la invención, alcanzando valores por debajo de 1 m<sup>2</sup>/g (muestra F).

Muestra	SSA (m <sup>2</sup> /g)
MicroZnO	4,61
NanoZnO	23,87
A	1,77
B	1,82
C	1,71
D	1,59
E	1,27
F	0,97

**Ejemplo 5.** Lixiviación de zinc catiónico para muestras de ZnO en agua de peptona.

25

Los inventores han descubierto sorprendentemente que las partículas de la invención no lixivian zinc catiónico en el medio ambiente cuando se comparan con muestras comerciales

de nanoZnO y que la cantidad de iones  $Zn^{2+}$  lixiviados por las partículas de la invención cae muy por debajo de los valores de muestras microZnO comerciales. A este respecto, se realizó un ensayo de lixiviación de  $Zn^{2+}$  para las muestras de la A a la F, así como para las muestras comerciales comparativas microZnO y nanoZnO en agua de peptona. El ensayo consistió en preparar una suspensión de 10 g/L de ZnO (muestras comerciales y muestras de la invención) en 25 mL de agua de peptona (PW) durante 24 horas a 37 °C y recoger la solución incolora obtenida. La Figura 6 muestra los resultados del ensayo de lixiviación representando la concentración de  $Zn^{2+}$  medida por ICP-AES en agua de peptona para cada una de las muestras. La concentración de liberación de  $Zn^{2+}$  para las partículas de ZnO de tipo flor de la invención se compara con las referencias comerciales (microZnO y nanoZnO). La Figura 5a muestra que la partícula no tratada térmicamente (muestra A) y la muestra de nanoZnO son responsables de una mayor lixiviación de  $Zn^{2+}$  en solución, mientras que la muestra comercial microZnO y las muestras de ZnO de tipo flor de la B a la F están muy por debajo de 1 mg/l. Además, la Figura 6b muestra en detalle la relación entre la cantidad de  $Zn^{2+}$  lixiviado y los tratamientos de recocido. El  $Zn^{2+}$  lixiviado disminuye con el aumento de la temperatura, posiblemente debido a la estabilización y compactación de la estructura apilada de plaquetas de ZnO. A 700 °C (muestra F) el  $Zn^{2+}$  liberado medido es igual a valores tan bajos como 0,02 mg/l. Por lo tanto, el uso de tratamiento térmico permite controlar la liberación de  $Zn^{2+}$ .

20

#### **Ejemplo 6.** Producción de especies reactivas de oxígeno.

Los inventores han descubierto sorprendentemente que las micropartículas de la invención no se implican en una producción significativa de especies reactivas de oxígeno (ROS) cuando se someten a la luz, contrariamente a las muestras comerciales de nanoZnO y microZnO. A este respecto, se evaluó el rendimiento fotocatalítico de las partículas de la invención (muestra D en el ejemplo 2) así como las muestras comerciales comparativas estudiando la fotodegradación del colorante orgánico naranja de metilo (MO) bajo luz UV. Los resultados de la fotodegradación de MO en presencia de una micropartícula ejemplar de la invención, muestras comerciales de nanoZnO y muestras comerciales de microZnO en función del tiempo se muestran gráficamente en la Figura 7. Como puede verse, la muestra comercial microZnO (triángulo sin relleno) provoca la completa degradación de MO a las 2 h y la muestra comercial de nanoZnO (cuadrado sin relleno) fotodegrada el MO en 3h. Sorprendentemente, las micropartículas de ZnO de tipo flor (muestra D, círculo relleno) son solo capaces de inducir la fotodegradación del 30 % del colorante MO, y esto después de 5 h de radiación. Este resultado indica claramente dos zonas en la figura 7, una donde

35

predomina la generación de Especies Reactivas de Oxígeno, ROS (9) (Figura 7) y otra donde no se producen ROS (10) (Figura 7). Por lo tanto, la generación de ROS en microZnO y nanoZnO comerciales, que se encuentran en la región gris (9) (Figura 7), es mucho mayor que las micropartículas de ZnO de tipo flor (muestra D). Además, este comportamiento de menor producción de ROS se extiende a otras muestras tales como B o F como puede verse en la tabla siguiente.

Tiempo (min)	MicroZnO (C/C <sub>0</sub> )	NanoZnO (C/C <sub>0</sub> )	Muestra D (C/C <sub>0</sub> )	Muestra B (C/C <sub>0</sub> )	Muestra F (C/C <sub>0</sub> )
0	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
10	0,892	0,868	1,000	1,000	1,000
20	0,766	0,760	0,996	0,992	1,000
30	0,373	0,578	0,998	0,989	1,000
60	0,056	0,438	0,979	0,958	0,988
120	0,011	0,116	0,915	0,904	0,905
180	0,009	0,015	0,862	0,832	0,802
240	0,007	0,010	0,764	0,766	0,708
300	0,005	0,009	0,722	0,710	0,615

### Ejemplo 7. Actividad biocida

10 Se estudió la amplia actividad biocida de las micropartículas de ZnO de la invención, ejemplificadas por las muestras de la A a la F (ejemplos 1 y 2) contra tres microorganismos: dos bacterias, *Escherichia coli* (CECT 516) y *Staphylococcus aureus* (CECT 240) y un hongo, *A. niger* (CECT 2807). Con respecto a las dos bacterias, *E. coli* es una bacteria Gram-negativa en forma de varilla, mientras que *S. aureus* es una bacteria Gram-positiva de forma redonda. El estudio de la actividad antibacteriana se realizó mediante el método de macrodilución conforme al Comité Nacional para Normas de Laboratorios Clínicos (NCCLS) con leves modificaciones. En la Figura 8 (paneles a y b) muestran los valores de actividad antibacteriana (designados como R) calculados a partir de unidades formadoras de colonias (CFU) de bacterias después de añadir 3 ppm de la muestra de ZnO en estudio (muestras comerciales y muestras A-F) y la incubación subsiguiente durante 24 h a 37 °C. Como puede verse a partir de los paneles a y b de la figura 8, microZnO y el nanoZnO comerciales inducen una disminución en la población bacteriana, alcanzando valores R de aproximadamente 2 para *E. coli* y de aproximadamente 1,5-2,3 para *S. aureus*. Por el contrario, la presencia de las partículas ejemplares de las muestras A-F muestra una

15

20

25

disminución dramática en la población bacteriana que alcanza valores R de

aproximadamente 3-3,7 para *E. coli* y aproximadamente 3-3,3 para *S. aureus*. Estos valores se traducen en que las partículas de la presente invención son capaces de potenciar la actividad antibacteriana del ZnO tradicional en aproximadamente un 70 % para bacterias Gram-negativas y un 50 % para bacterias Gram-positivas. Volviendo al crecimiento de hongos, el estudio se realizó recurriendo al método de Kirby-Bauer. El hongo *A. niger* (CECT 2807) se cultiva en placas petri que contienen las partículas de la presente invención, ejemplificadas por las muestras de la A a la F, tratadas térmicamente y se incuban a 37 °C durante 3 días. Para fines de comparación, se usaron referencias comerciales de diferentes tamaños como antes. La Figura 7 (panel c), muestra la reducción del crecimiento de hongos en presencia de las muestras A hasta F, así como referencias microZnO y nanoZnO. Los resultados mostraron que las partículas de la presente invención aumentan la actividad antifúngica en aproximadamente un 42 % con respecto a microZnO y un 26 % con respecto a nanoZnO. Estos resultados mostraron de nuevo que las partículas de la presente invención inhiben significativamente el crecimiento de *A. niger* y eran más eficaces que los productos comerciales de ZnO. En todos los casos, los ensayos se llevaron a cabo en la oscuridad, es decir, sin la presencia de luz UV, lo que significa que no se producen fenómenos fotoexcitados y, por consiguiente, la actividad biocida no depende de la formación de ROS.

Una ventaja de las micropartículas de la presente invención es que la actividad antibacteriana y antifúngica se alcanza a una dosis muy baja, solo 3 ppm o 3 mg/l, sin generación de ROS y baja liberación de  $Zn^{2+}$  que es altamente relevante para aplicaciones prácticas. La dosis de ZnO utilizada en el estado de la técnica está en el intervalo de 50-500 mg/l (A. Sirelkhatim y col. Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism. *Nano-Micro Lett.* (2015) 7: 219), y como consecuencia 10 mg/l de ZnO se consideran como dosis baja y preferiblemente 3 ppm se considera una dosis baja también.

**Ejemplo 8.** Acumulación de carga en las micropartículas de la presente invención y su efecto sobre microorganismos.

La Figura 9a muestra una representación esquemática de la microestructura de la presente invención. Las plaquetas (1) están organizadas en grupos apilados de forma cónica (3) unidos por su base a lo largo del eje c, como se menciona en la Figura 1. Cada plaqueta (1) unida a plaquetas adyacentes genera un dominio y cada frontera de dos plaquetas una pared de dominio (11). Estas paredes de dominio crean posibles barreras de energía para

los electrones, conocidas como barreras Schottky (12). Se cree que la presencia de multidominios, por lo tanto, las paredes de multidominios, y las barreras de Schottky generan cargas no compensadas que se acumulan en las paredes del dominio. Este fenómeno dio como resultado un potencial eléctrico distribuido por la estructura de la presente invención.

La microscopía de sonda Kelvin (KPM) es una versión modificada de la Microscopía de Fuerzas Atómicas (AFM). La KPM consiste en una técnica de superficie no destructiva sin contacto que permite imaginar perfiles bidimensionales de la diferencia de potencial de contacto (VCPD), es decir, la diferencia en las funciones de trabajo de la punta y la muestra. Para una muestra representativa de las micropartículas de la presente invención (muestra D), la tensión de diferencia de potencial de contacto (CPD) alcanzó valores alrededor de -5 V en la parte superior de la estructura. Los valores de carga negativa se confirmaron en solución acuosa de las micropartículas de la presente invención usando mediciones de potencial zeta (Figura 9b). Como puede verse, la presente invención muestra un valor de potencial zeta alrededor de -20 mV en el intervalo de pH de 6 a 10. Esta observación confirmó la existencia de acumulación de carga negativa a lo largo de la estructura de la presente invención.

Los efectos de las interacciones entre las partículas de la presente invención y los microorganismos seleccionados se representan en la Figura 10. Las micrografías SEM muestran el daño causado por las partículas de tipo flor de la invención en contacto con las bacterias *E. coli* (Figura 10a) y *S. aureus* (Figura 10b) y el hongo *A. niger* (Figura 10c). Se cree que el contacto se produce por interacciones electrostáticas entre la carga de las micropartículas de la presente invención y los microorganismos. Los principales daños a los microorganismos (flechas blancas) fueron abrasiones tales como arrugas, aplanamiento o ampollas, agrietamiento y/o rotura de la envoltura de la membrana. Como resultado, estas texturas anormales llevan a la membrana "agujereada" y finalmente a la muerte de microorganismos.

La catodoluminiscencia (CL) es un fenómeno óptico y electromagnético en el que un haz de electrones impacta sobre un material luminiscente que provoca la emisión de luz visible. Un detector de catodoluminiscencia unido a un microscopio electrónico de barrido (SEM), comúnmente denominado SEM-CL, es capaz de producir imágenes catodoluminiscentes digitales de alta resolución de materiales luminiscentes. La Figura 10d muestra SEM-CL de la microestructura de la presente invención (muestra D) contra el hongo *A. niger*. Las áreas

más luminiscentes que eran en su mayoría zonas terminales corresponden a defectos en el cristal de ZnO. Las áreas de defectos acumulan más carga. Las áreas con mayor carga afectan directamente a los microorganismos, en este caso *A. niger* (zonas oscuras). Como puede verse, la interacción a través de un mecanismo de contacto entre las partículas de tipo flor de la invención y el microorganismo no debilita su carga potencial. Por lo tanto, las micropartículas de la presente invención mantuvieron su actividad durante largos períodos de tiempo y a concentraciones o dosis muy bajas.

**Ejemplo 9.** Citotoxicidad de las micropartículas de la presente invención.

Después de observar un excelente comportamiento antimicrobiano de las micropartículas de ZnO de la presente invención contra bacterias y hongos, es importante conocer su citotoxicidad contra las células humanas. Para este estudio, las células humanas usadas son la línea celular epitelial tumoral HeLa (adenocarcinoma cervical). Las células HeLa crecieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % (v/v) de suero bovino fetal (FBS), 50 unidades/ml de penicilina y 50 µg/ml de estreptomycin. Los cultivos celulares se realizaron en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % a 37 °C y se mantuvieron en una incubadora Steri-Cult 2000 (Hucoa-Erloss, Madrid, España). Las células se sembraron en placas de 24 multipocillos (Falcon, St. Louis, MO, EE.UU.) Los experimentos se realizaron con células al 60-70 % de confluencia.

Antes de la adición de ZnO, las referencias comerciales nanoZnO y las micropartículas de la presente invención (tratadas térmicamente a 500 °C) se esterilizaron por calor seco a 110 °C durante 24 h. Una suspensión de partículas de ZnO (referencias y presente invención) se preparó en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Después de esto, las concentraciones de ZnO diferentes (0,1 mg/ml, 0,2 mg/ml y 0,5 mg/ml) se prepararon en DMEM a partir de la suspensión en PBS. Las células se incubaron durante 24 h con la concentración apropiada de ZnO. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron nuevamente con DMEM durante 24 h. Finalmente, la viabilidad celular se determinó después de los tratamientos por el bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, denominado ensayo MTT. El ensayo MTT es un método colorimétrico para medir la actividad de las enzimas mitocondriales. Las enzimas reducen el colorante amarillo de MTT hasta su formazán insoluble, que tiene un color púrpura. Por lo tanto, la cantidad de formazán formada es proporcional al número de células vivas. Para determinar la supervivencia celular, la banda de absorción de 540 nm se mide en cada ensayo. Los resultados se expresaron como porcentaje en comparación con las

células de control (Figura 11).

5 Como se muestra en la Figura 11, el tamaño de partícula de ZnO tiene una función importante en la citotoxicidad. El nanoZnO induce una reducción drástica en la población de células vivas al aumentar las concentraciones de nanopartículas de ZnO en el medio de cultivo, alcanzando valores del 40 % de supervivencia celular a una concentración de nanopartículas de ZnO de 0,5 mg/ml. Al contrario, las micropartículas de ZnO de la presente invención tratadas térmicamente a 500 °C mantienen una citotoxicidad baja de células HeLa a concentraciones elevadas (0,5 mg/ml), siendo la supervivencia celular > 88 % en todas las  
10 concentraciones.

Sorprendentemente, las partículas de la presente invención muestran actividad antimicrobiana elevada contra hongos y bacterias sin mostrar citotoxicidad hacia las células humanas. El diseño en pilas hexagonales organizadas de las partículas de la presente  
15 invención se considera un factor determinante. Sin pretender quedar limitado por la teoría, se cree que la pila organizada en la morfología de tipo estrella combina las propiedades beneficiosas de las nanopartículas de ZnO, tales como una actividad antimicrobiana elevada, y las propiedades beneficiosas de las micropartículas de ZnO, tales como una baja citotoxicidad en las células. Por lo tanto, las partículas de la presente invención se  
20 consideran potencialmente no citotóxicas para las células humanas, permitiendo el uso de las micropartículas de ZnO de la presente invención en aplicaciones tales como las aplicaciones cosméticas y médicas.

## REIVINDICACIONES

1. Micropartículas de óxido de zinc que comprenden plaquetas, en las que las plaquetas,
- 5 - son prismas con base de tipo hexagonal,  
- tienen una longitud de borde entre 30 y 200 nm, y  
- se apilan en contacto directo entre sí a lo largo del eje c de apilamiento, por medio de sus planos cristalinos  $[000\bar{1}]$  o  $[0001]$ , y  
- están rotadas por un ángulo no nulo con respecto a sus plaquetas adyacentes a lo largo
- 10 de dicho eje c de apilamiento;
- donde dichas micropartículas de óxido de zinc se caracterizan por una superficie específica que es menor o igual a  $4 \text{ m}^2/\text{g}$ .
- 15 2. Las micropartículas de óxido de zinc según la reivindicación 1, donde la superficie específica es inferior o igual a  $2 \text{ m}^2/\text{g}$ .
3. Las micropartículas de óxido de zinc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizadas por ser estructuras de micropartícula con forma de flor.
- 20 4. Método para preparar las micropartículas de óxido de zinc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas de:
- i) adicionar urea a una solución acuosa de sal de zinc, donde la solución de sal de zinc
- 25 tiene una concentración entre 3 y 10 M.  
ii) calentar la solución resultante de la etapa (i),  
iii) aislar el producto resultante de la etapa (ii), y  
iv) someter el producto aislado de la etapa (iii) a un tratamiento de recocido.
- 30 5. Método según la reivindicación 4, donde la solución de sal de la etapa (ii) se calienta a una temperatura entre  $80 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $140 \text{ }^\circ\text{C}$  durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 3 horas.
- 35 6. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, donde la etapa (iii) comprende:
- enfriar la solución resultante de la etapa (ii) a temperatura ambiente, y añadir un

disolvente acuoso caliente para obtener un producto precipitado, y

- aislar el producto precipitado.

7. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, donde el tratamiento de recocido de la etapa (iv) se realiza a una temperatura entre 350 °C y 700 °C.

8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, donde el tratamiento de recocido de la etapa (iv) se realiza durante un periodo de tiempo entre 1 y 24 horas.

9. Producto cosmético, pintura, tinta, papel, cartón, textiles, alimentos, producto agrícola, cuidado del hogar, aire acondicionado, cuidado de los animales, higiene personal y del trabajo, lentes de contacto, material de cromatografía, equipo médico, producto dermatológico, laca, revestimiento y/o producto plástico que contiene las micropartículas de óxido de zinc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3.

15

10. Composición biocida que comprende las micropartículas de óxido de zinc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y opcionalmente un vehículo.

11. Uso de la composición biocida según la reivindicación 10 para la eliminación, inhibición del crecimiento o inhibición de la progenie de microorganismos, excluyendo cualquier tratamiento o métodos de diagnóstico sobre el cuerpo humano o animal.

20

12. Uso de la composición biocida según la reivindicación 11, donde los microorganismos se seleccionan entre bacterias y hongos.

25

13. Las micropartículas de óxido de zinc según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o una composición farmacéutica que comprende las mismas para su uso en el tratamiento o prevención de una infección.

14. Las micropartículas de óxido de zinc o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 13, donde la infección es una infección de la piel, membranas mucosas, uñas, lesiones de la piel y/o membranas mucosas.

30

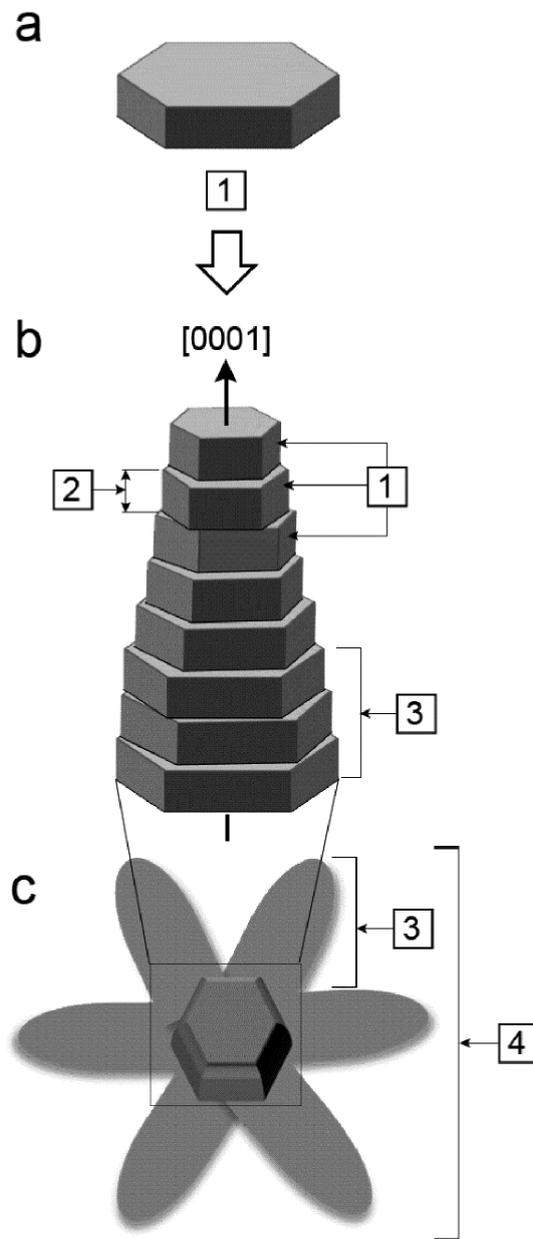


Fig. 1

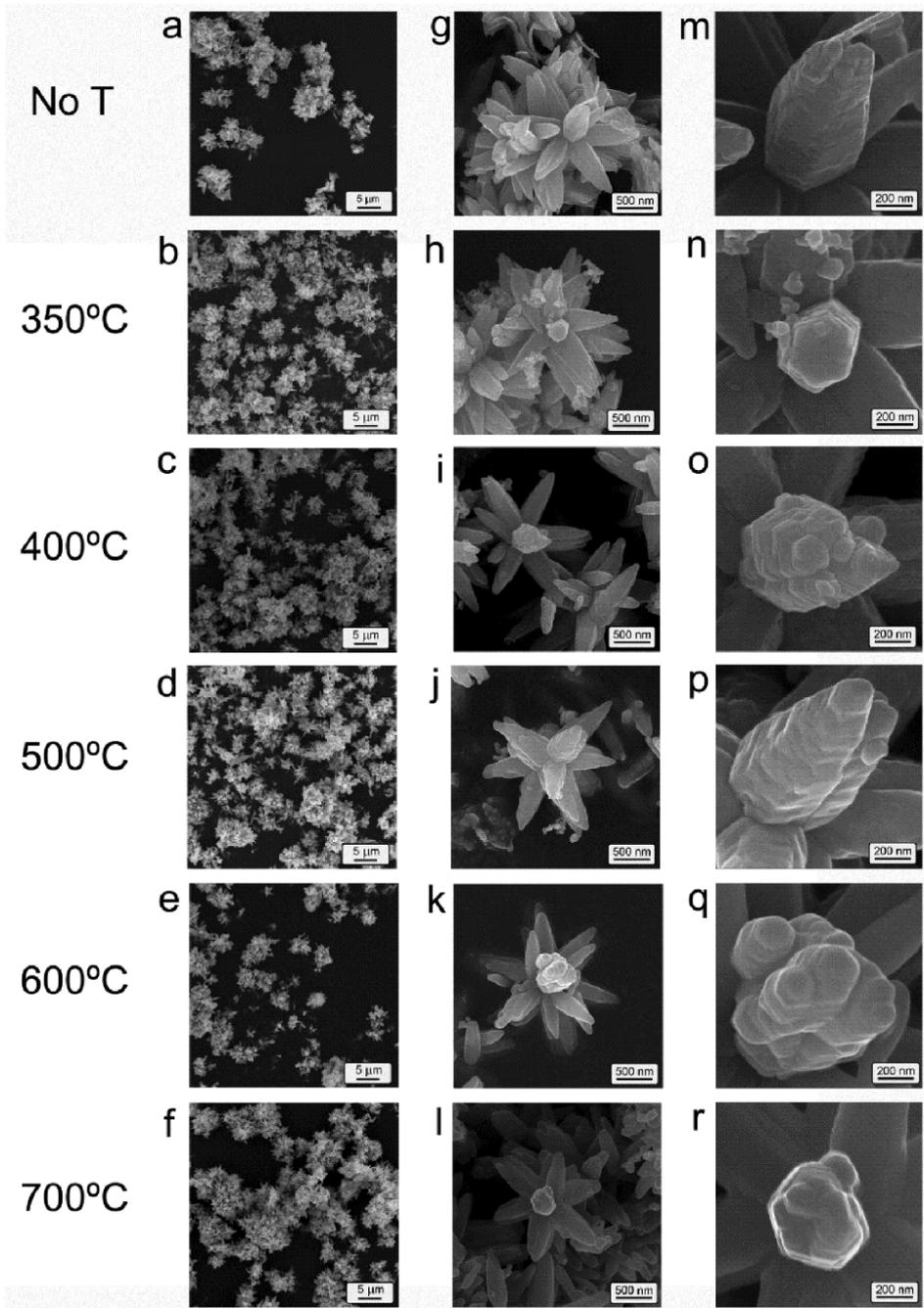


Fig. 2

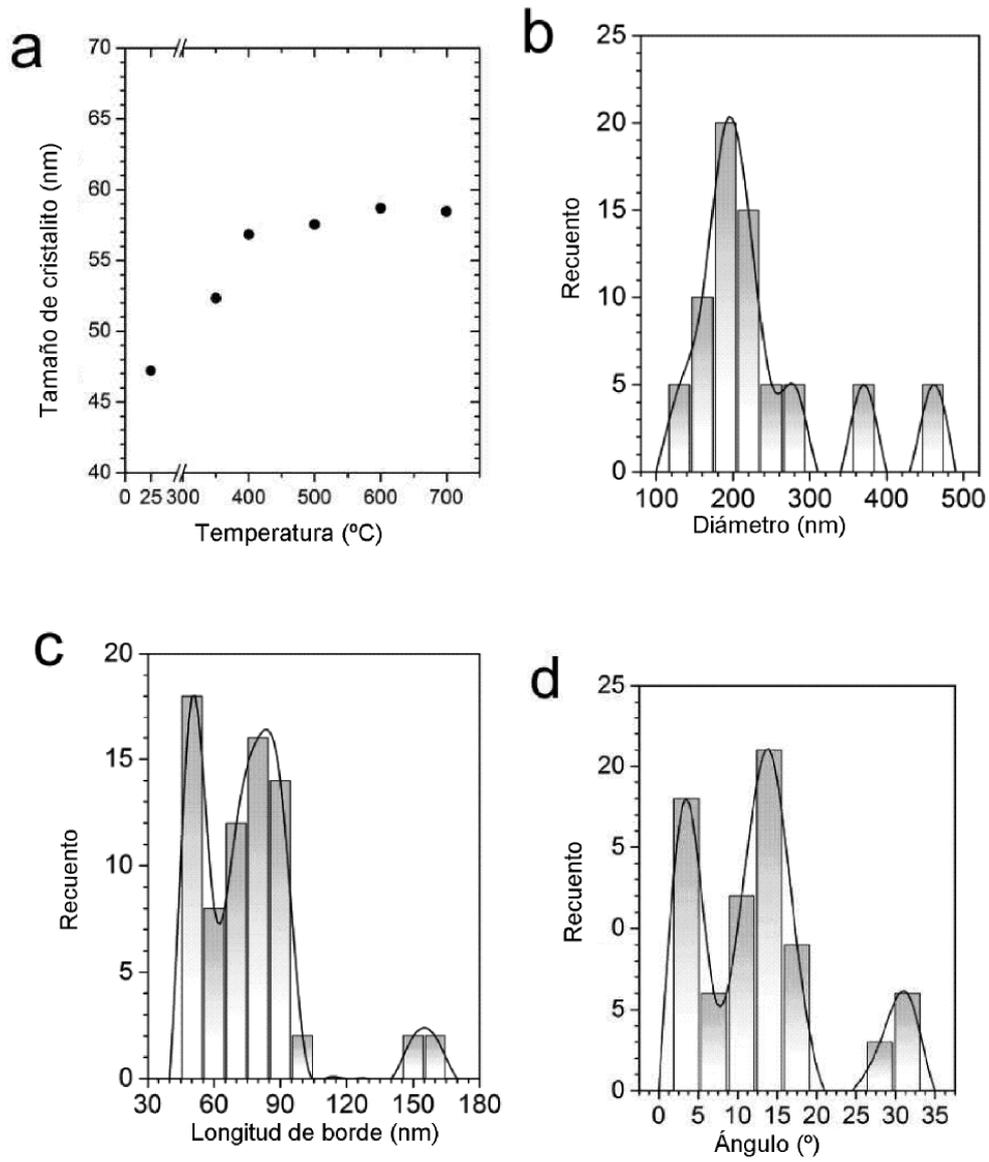


Fig. 3

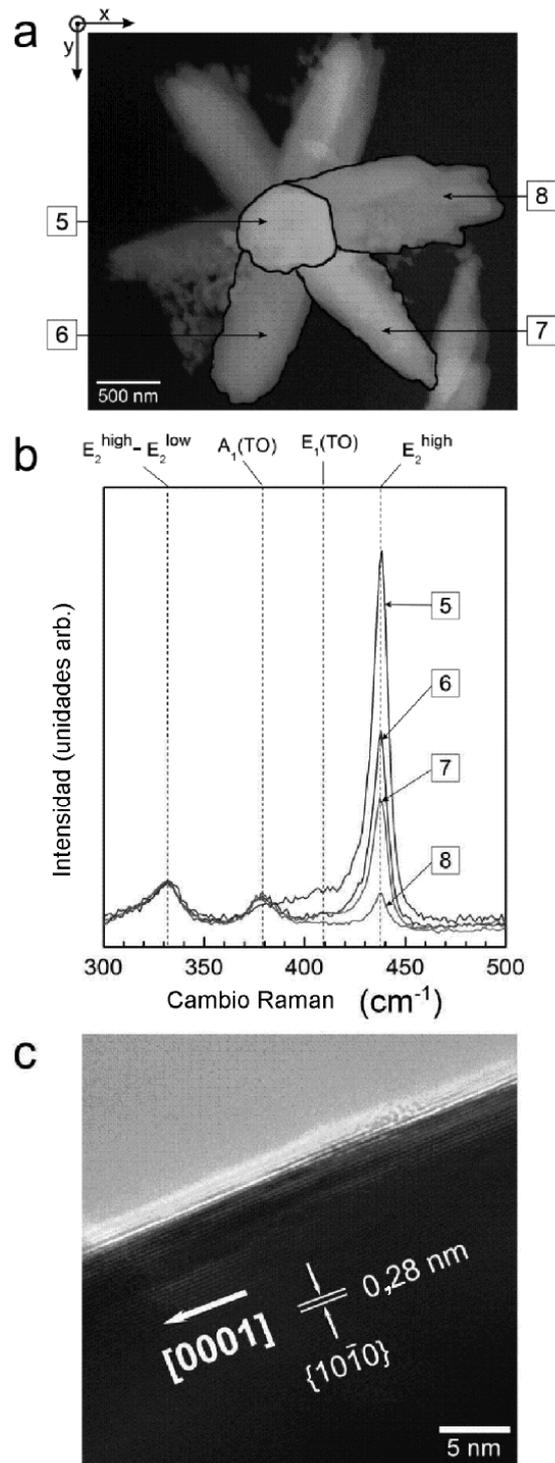


Fig. 4

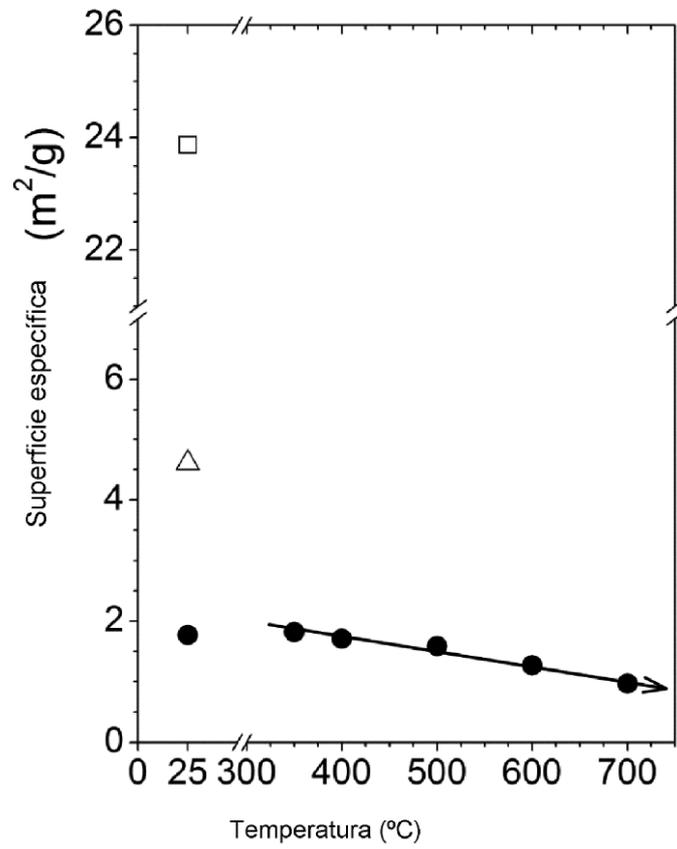


Fig. 5

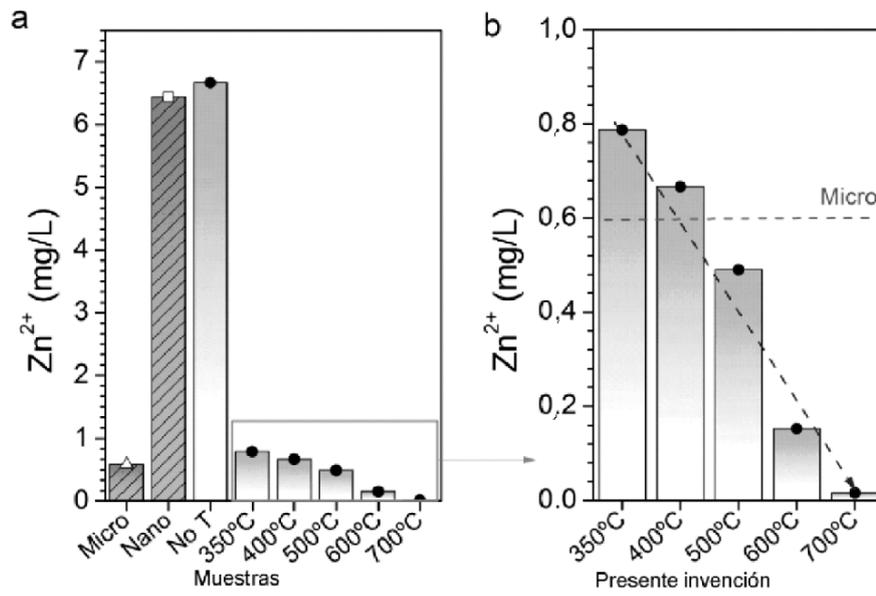


Fig. 6

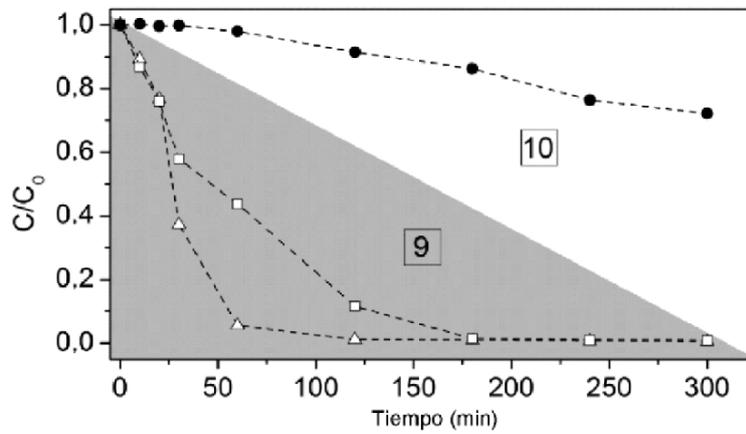


Fig. 7

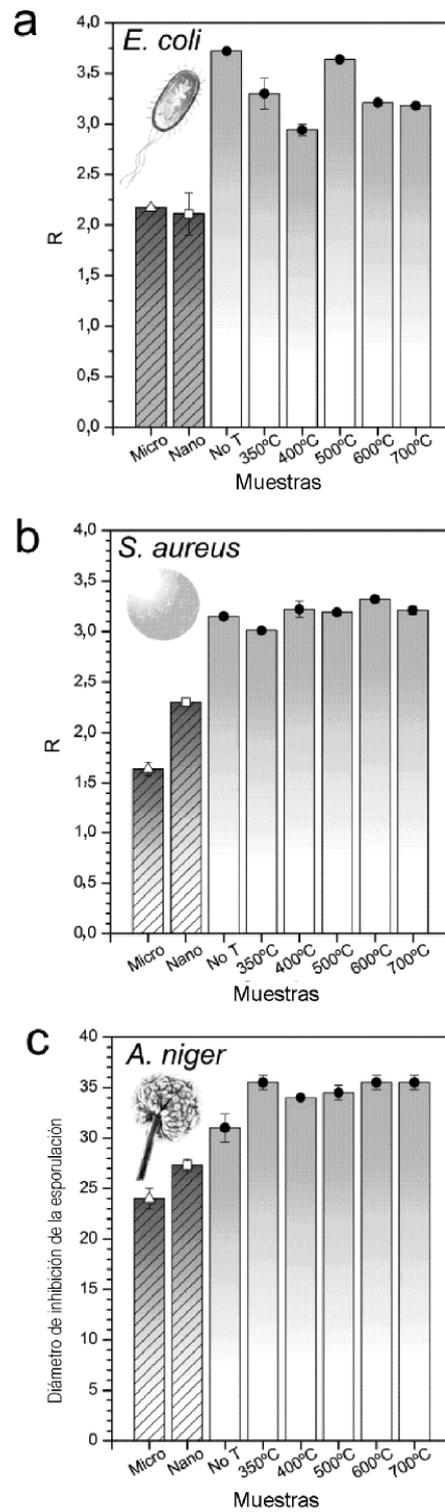


Fig. 8

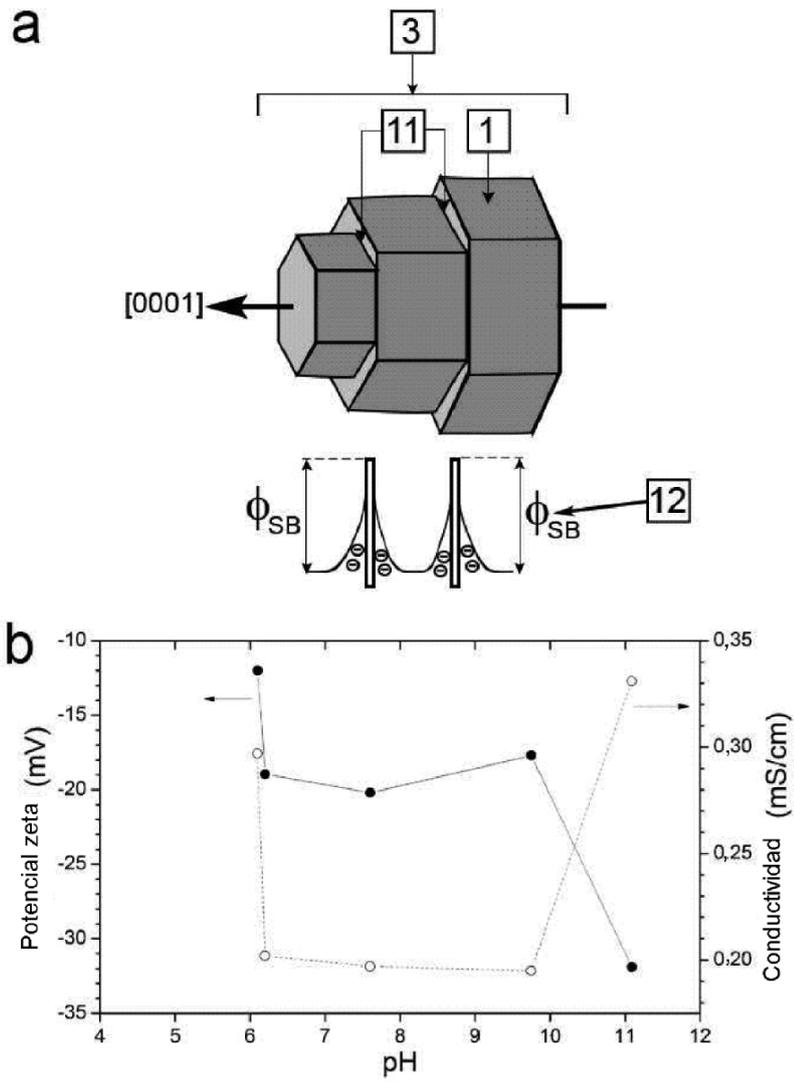


Fig. 9

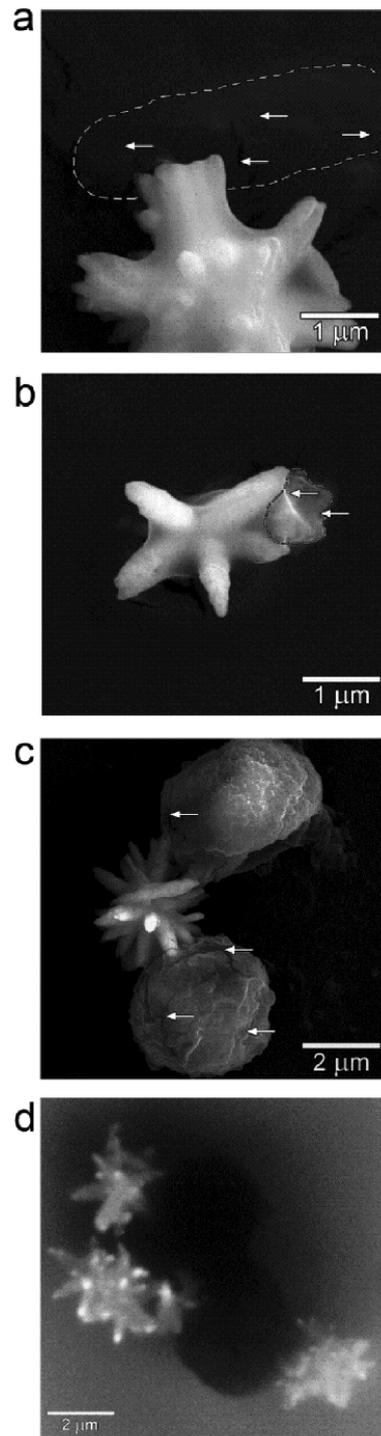


Fig. 10

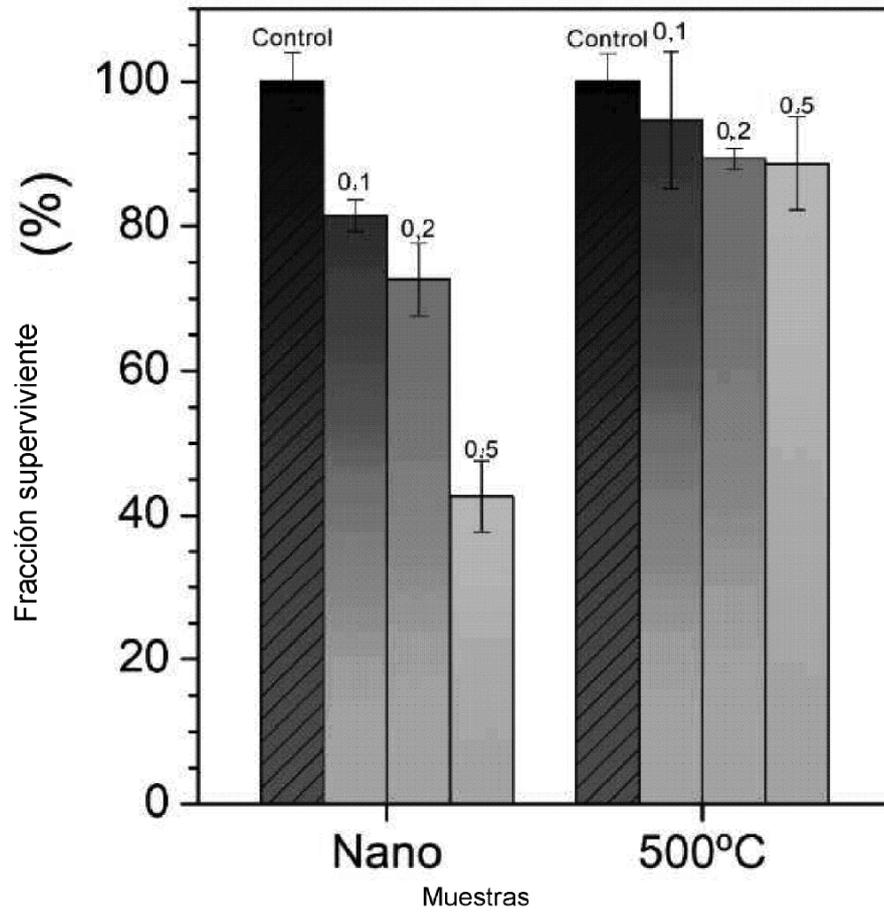


Fig. 11