

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 647 324**

21 Número de solicitud: 201630829

51 Int. Cl.:

C08G 63/12 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

B82Y 5/00 (2011.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.06.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

20.12.2017

71 Solicitantes:

**CASTRO MAYORGA, Jinneth Lorena (50.0%)
Avda. Agustín Escardino Benlloch, nº 7
46980 PATERNA (Valencia) ES y
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (50.0%)**

72 Inventor/es:

**CASTRO MAYORGA, Jinneth Lorena;
LAGARÓN CABELLO, Jose Maria;
FABRA ROVIRA, María José;
PRIETO JIMÉNEZ, María Auxiliadora y
SÁNCHEZ MORAGAS, Gloria**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE BIOPOLÍMEROS ANTIMICROBIANOS QUE
COMPRENEN POLIHIDROXIALCANOATOS Y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS**

57 Resumen:

Procedimiento para la obtención de biopolímeros antimicrobianos que comprenden polihidroxicanoatos y nanopartículas metálicas.

Un procedimiento de obtención de un biopolímero antimicrobiano que comprende al menos un polihidroxicanoato (PHA) y nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana, caracterizado porque el procedimiento comprende: a) inocular una biomasa que comprende microorganismos productores de PHA en un medio de producción adecuado para la producción de PHAs; b) sintetizar nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana in situ mediante la reacción de un compuesto precursor y un agente reductor; y c) extraer el biopolímero antimicrobiano que comprende al menos un polihidroxicanoato y las nanopartículas metálicas. Biopolímero antimicrobiano obtenido por el procedimiento descrito anteriormente y usos del biopolímero.

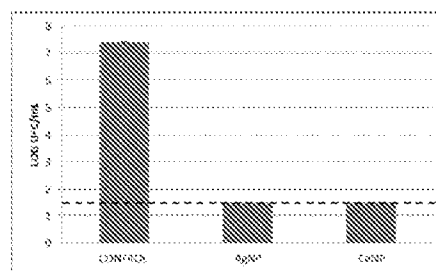


Fig. 3

DESCRIPCIÓN

PROCEDIMIENTO PARA LA OBTENCIÓN DE BIOPOLÍMEROS ANTIMICROBIANOS QUE COMPRENDEN POLIHIDROXIALCANOATOS Y NANOPARTÍCULAS METÁLICAS

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente solicitud de patente se sitúa en el sector de la fabricación de polímeros. En particular, esta solicitud se refiere a un procedimiento para la obtención de biopolímeros que comprenden polihidroxicanoatos y nanopartículas metálicas, donde estos biopolímeros se obtienen por fermentación y presentan actividad antimicrobiana, en particular actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral o anti-incrustaciones. Adicionalmente, la presente solicitud de patente se refiere al biopolímero antimicrobiano que comprende polihidroxicanoato y nanopartículas metálicas, así como su uso en la fabricación de películas o artículos plásticos; partículas tal como cápsulas y/o fibras de tamaño micro, submicro o nanométrico; o recubrimientos, todos ellos con propiedades antimicrobianas.

ESTADO DE LA TÉCNICA

Los polihidroxicanoatos (PHAs) comprenden un grupo de biopoliésteres sintetizados como materiales de reserva energética por una amplia gama de microorganismos. Estos biopolímeros poseen propiedades físico-químicas y mecánicas similares a las de los plásticos convencionales, por lo que proporcionan una buena alternativa frente al uso de materiales derivados de la industria petroquímica. Además, los PHAs son biodegradables, no tóxicos, biocompatibles y se pueden producir a partir de recursos renovables. Estos poliésteres se utilizan para aplicaciones en diversas áreas, en la industria de envasado de alimentos y cosméticos, en biomedicina como hueso sintético y materiales quirúrgicos, como recubrimiento para superficies en contacto con los alimentos, o como portadores biodegradables de medicamentos, hormonas, insecticidas y herbicidas (Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*, 54(4), 450-472+iii).

De la familia de los PHAs, el más extensamente conocido es el poli-3-hidroxicaproatato (PHB), este polímero posee un punto de fusión comparable al del polipropileno isotáctico, lo que le permite ser extruido y moldeado con equipos para procesamiento de polímeros convencionales. A pesar de estas ventajas, la utilización de PHB se ve afectada tanto por su

alto costo, como por su inestabilidad a altas temperaturas, alta cristalinidad y baja resistencia a la tracción. Para reducir la fragilidad del PHB se ha propuesto la introducción del ácido hidroxivalérico (HV) en el poli-3'-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), el mezclado con otros polímeros y la adición de plastificantes, de agentes nucleantes o nanorellenos (Ceccorulli, G., Pizzoli, M., & Scandola, M. (1992). Plasticization of bacterial poly(3-hydroxybutyrate). *Macromolecules*, 25(12), 3304-3306; Martínez-Sanz, M., Villano, M., Oliveira, C., Albuquerque, M.G.E., Majone, M., Reis, M., Lopez-Rubio, A. & Lagaron, J.M. (2014). Characterization of polyhydroxyalkanoates synthesized from microbial mixed cultures and of their nanobiocomposites with bacterial cellulose nanowhiskers. *New Biotechnology*, 31(4), 364-376).

Por su parte, el uso de materiales poliméricos con capacidad antimicrobiana es una de las tecnologías con mayor impacto en diversos sectores tales como la conservación de alimentos, la biomedicina, la purificación de aguas y la farmacología. Una de las metodologías de incorporación de agentes antimicrobianos en matrices poliméricas, en especial de aquellos que no resisten altas temperaturas, es su fijación a la superficie del material a través de enlaces covalentes. Este tipo de preparación requiere la disponibilidad de grupos funcionales, tanto en la superficie del polímero como en la estructura del agente antimicrobiano que se desea inmovilizar, además del uso de aditivos que favorezcan su dispersión y compatibilidad con el material, lo que hace que el procedimiento de obtención del material polimérico con capacidad antimicrobiana resulte técnicamente complejo, aumenta la cantidad de antimicrobiano a ser usada y los costos de producción.

Entre los antimicrobianos de naturaleza inorgánica más ampliamente utilizados, metales como la plata o el cobre, en forma de iones o nanopartículas, han surgido como una de las tecnologías más investigadas, dado que su incorporación en plásticos y superficies en contacto puede ayudar a prevenir la aparición de microorganismos patógenos y/o alterantes. La estabilidad térmica de los metales y su relativo bajo coste los hacen candidatos ideales para su incorporación en una amplia variedad de materiales. Sin embargo, se sabe que los metales con capacidad antimicrobiana, especialmente la plata y el cobre, experimentan cambios de color provocados por la presencia de ambientes oxido-reductores y/o su aglomeración, y este hecho limita sus posibilidades de aplicación.

Recientemente se han desarrollado distintos sistemas basados en el uso de plata como agente antimicrobiano con aplicación en el tratamiento de heridas, por ejemplo, la patente US6592888 B1 (Composition for wound dressings safely using metallic compounds to

produce anti-microbial properties; Jensen et al., publicada 2003) emplea formulaciones adhesivas en forma de hidrocoloides y plata metálica para la elaboración de vendajes antimicrobianos. Genetic Laboratories, Inc. comercializa actualmente un producto llamado E-Z DERM™, que consiste en una venda biosintética para el tratamiento de quemaduras que
5 tiene nitrato de plata incorporado.

La empresa DuPont ha introducido el MicroFree™, producto basado en la incorporación de tres tipos de sales de plata o cobre sobre soportes inorgánicos y agentes termoestables que pueden ser introducidos en la propia resina polimérica en el proceso de extrusión. En la
10 actualidad, se están ofertando tres tipos de MicroFree™, el Z-200 (plata en un soporte de zinc), el T-558 (plata, óxido de cobre y silicato de zinc en un soporte de dióxido de titanio), y el B-558 (plata, óxido de cobre y silicato de zinc en un soporte de sulfato de bario), los cuales han demostrado tener un efecto biocida sobre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* y *Staphylococcus aureus*.

15 La empresa Plasticopper comercializa un aditivo en base a nanopartículas de cobre, el cual puede colocarse sobre matrices poliméricas o resinas inertes para dotarlas de acción antimicrobiana, frente a microorganismos tales como el *Enterococo Vancomicino Resistente* (VRE), el *Staphylococcus Aureus Meticilino Resistente* (MRSA) y la *Enterobacteria Resistente a la Carbapenema* (ERC). Este producto se encuentra asociado a las solicitudes de patentes 201401881, 201302101 y 201202350 del Instituto Nacional de Propiedad Industrial (INAPI) de Chile.
20

Por otro lado, la solicitud de patente WO2015184561 (ALLUÉ) describe un material gelcoat
25 hecho a base de resina y nanopartículas de cobre, que puede ser usado para crear superficies con propiedades biocidas dentro de vehículos en todos sus tipos, pero preferentemente en ambulancias.

La solicitud de patente US20150374610 desarrolla un producto tópico para aplicaciones de
30 protección o descontaminación de la piel basado en micro y nanopartículas de óxidos metálicos covalentemente asociadas a matrices poliméricas.

La solicitud de patente US20150336804 describe el desarrollo de un método para síntesis *in situ* de nanopartículas de cobre en papel mediante la reducción con ácido ascórbico y su
35 aplicación como antimicrobiano contra *Escherichia coli*.

También se ha trabajado en la incorporación de iones de plata en soportes inertes como zeolitas sintéticas, un ejemplo de ello es el producto Apacider A[®] en el que los iones de plata se enlazan química y físicamente con fosfato cálcico en un soporte de zeolita. Sin embargo, este agente presenta problemas en su incorporación como aditivo de extrusión dado que
5 requiere de un gran número de agentes surfactantes para favorecer su dispersión en la matriz plástica y su migración hacia la superficie del alimento. La compañía Japan's Shinanen New Ceramics junto con Mitsubishi desarrollaron el Zeomic[®], donde se incorporan iones de plata en un soporte de zeolita, con un amplio espectro de acción y con un comportamiento relativamente bueno en el proceso de extrusión. Un producto similar,
10 conocido con el nombre de BactiBlock[®], basado en arcilla funcionalizada con plata iónica, es comercializado por la compañía Nanobiomatters como aditivo antimicrobiano para materiales poliméricos de aplicación en el sector de la construcción, la electrónica, la salud y la alimentación entre otros.

15 Además de los documentos de patentes ya citados, en fuentes de bibliografía científica, se ha reportado el uso de agentes estabilizantes sintéticos como polivinilalcohol, polietilenglicol y polivinilpirrolidona, Tween o Triton X-100, bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), polisorbato (Tween) o el dodecilsulfato sódico (SDS), se ha propuesto la síntesis de nanopartículas metálicas mediante microorganismos o plantas con capacidad reductora y el
20 uso de polímeros funcionalizados (Moritz, M., & Geszke-Moritz, M. (2013). The newest achievements in synthesis, immobilization and practical applications of antibacterial nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, 228, 596-613).

En el sector de envasado para conservación de alimentos, son varios los desarrollos que se
25 han realizado. En particular, la solicitud de patente WO99049823 A1 (Light-activated antimicrobial polymeric materials; Wilson, J.E. et al., publicada 1999) describe el procedimiento de obtención de distintos materiales antimicrobianos con aplicación en la industria de envasado de alimentos y la fabricación de cubiertas quirúrgicas y máscaras faciales, a base de azul de metileno en dispersión, el cual genera oxígeno singlete como
30 agente antimicrobiano. En este mismo ámbito, la patente US7981408 B2 (Method of preserving food using antimicrobial packaging; Schroeder, J.D. et al., publicada 2011) describe el desarrollo de materiales antimicrobianos con amonio cuaternario y sales de fosfonio unidas covalentemente al material polimérico, siendo estos materiales antimicrobianos de utilidad en la elaboración de películas o envases de alimentos,
35 cosméticos, equipos y dispositivos médicos.

La solicitud de patente WO2013149356 A1 (Envase que extiende la vida útil de los alimentos que contiene, especialmente berries, al incorporar en su superficie un agente antifúngico. particularmente berries. procedimiento de preparación y usos; Junqueira, M.P et. al.; publicada 2013) se refiere a la incorporación de sorbato de potasio como agente antifúngico en láminas de polietilentereftalato (PET) de aplicación en el envasado de frutos frescos. En este proceso, una vez extruida la lámina de PET, ésta es sumergida en una solución que contiene el agente antimicrobiano y silicona, enseguida es retirado el exceso de la solución, y la lámina es enrollada para posteriormente pasar al proceso de termoformación y producción del envase.

10

La solicitud de patente WO2001017356 A1 (Antimicrobial polymer; Collins A.N. et al., publicada 2001) describe un polímero antimicrobiano, polihexametil biguanida, que lleva un marcador cromóforo ligado covalentemente. Este polímero es susceptible de ser usado en la desinfección de aguas de refrigeración industrial, piscinas, látex, revestimientos de superficies, fluidos de perforación geológica y en formulaciones para el cuidado personal, tales como jabones y cosméticos. Dicho polímero se usa en productos comerciales como el apósito antimicrobiano de espuma Kendall™ AMD distribuido por la compañía Covidien.

15

La solicitud de patente WO2004056214 A2 (Method of preparation of bioactive packaging materials; Marek, M. et al., publicada 2004) se refiere a la elaboración de materiales de envases poliméricos con conservantes inmovilizados, donde la aplicación de una solución o dispersión de un polímero con conservantes en el material se hace por atomización, recubrimiento o inmersión, seguida por evaporación del solvente a temperatura ambiente o superior. En este documento se usan compuestos antimicrobianos derivados de fenol, bacteriocinas, ésteres de ácido p-hidroxibenzoico, monoglicéridos de ácidos grasos, ácido benzoico, ácido sórbico, quitosán, lisozima, nisina, entre otros.

20

25

Respecto al uso de biopolímeros como agentes estabilizantes de nanopartículas metálicas, existen sólo dos estudios preliminares, el realizado por Phukon et al. (2011) (Phukon, P., Saikia, J.P., & Konwar, B.K. (2011). Enhancing the stability of colloidal silver nanoparticles using polyhydroxyalkanoates (PHA) from *Bacillus circulans* (MTCC 8167) isolated from crude oil contaminated soil. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 86(2), 314-318) donde se describe la síntesis química de nanopartículas sobre PHA en suspensión; y el realizado por Castro-Mayorga et al. (2014) (Castro-Mayorga, J.L., Martínez-Abad, A., Fabra, M.J., Olivera, C., Reis, M., & Lagarón, J.M. Stabilization of antimicrobial silver nanoparticles by a polyhydroxyalkanoate obtained from mixed bacterial culture. *International Journal of*

30

35

Biological Macromolecules 71, 103-110) donde se emplea PHBV como agente estabilizante en la síntesis de nanopartículas de plata antimicrobianas.

5 Sin embargo, a pesar de los múltiples adelantos en la síntesis de nanopartículas metálicas, uno de los retos principales para la producción de materiales antimicrobianos a base de metales es la producción de nanopartículas estables, que no presenten aglomeración por efecto de las altas temperaturas de procesamiento de plásticos, y que además posean un mínimo tamaño y una distribución homogénea, ya que se ha demostrado que su efecto biocida depende en gran medida del tamaño y del estado de aglomeración (Castro-Mayorga, 10 J.L., Martínez-Abad, A., Fabra, M.J., Olivera, C., Reis, M., & Lagarón, J.M. Stabilization of antimicrobial silver nanoparticles by a polyhydroxyalkanoate obtained from mixed bacterial culture. *International Journal of Biological Macromolecules* 71, 103-110).

DESCRIPCIÓN

15

Breve descripción de la invención

La invención que aquí se presenta proporciona biopolímeros, es decir, materiales poliméricos de origen biotecnológico, que comprenden al menos un polihidroxiálcanoato (PHA) y nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana, donde estas nanopartículas han sido incorporadas al biopolímero durante el proceso de obtención del PHA por fermentación. Estos materiales poliméricos presentan características ideales para su uso como materia prima en la elaboración de plásticos por técnicas de procesamiento convencional, tanto por su estabilidad térmica, como por sus cualidades antimicrobianas y sus propiedades 20 ópticas. Los biopolímeros antimicrobianos obtenidos del procedimiento que aquí se describe superan el problema de la inestabilidad y aglomeración de las nanopartículas metálicas y, adicionalmente, poseen un efecto antimicrobiano contra microorganismos patógenos y/o alterantes, en particular bacterias y/o virus, incluso a dosis inferiores a las reportadas en la literatura para PHA antimicrobianos (0,1%-5% en peso) (Min, M., Shi, Y., Ma, H., Huang, H., 25 Shi, J., Chen, X., Liu, Y., & Wang, L. (2015). Polymer-nanoparticle composites composed of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and coated silver nanoparticles. *Journal of Macromolecular Science, Part B: Physics*, 54(4), 411-423; Yu, H., Sun, B., Zhang, D., Chen, G., Yang, X., & Yao, J. (2014). Reinforcement of biodegradable poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with cellulose nanocrystal/silver nanohybrids as bifunctional nanofillers. 30 *Journal of Materials Chemistry B*, 2(48), 8479-8489); o para otros polímeros comerciales 35

(0,3%-1% en peso) (Echegoyen, Y., & Nerín, C. (2013). Nanoparticle release from nano-silver antimicrobial food containers. *Food and Chemical Toxicology*, 62(0), 16-22.).

5 El procedimiento al que se hace mención en la presente solicitud permite la obtención de un biopolímero biodegradable, renovable y biocompatible con propiedades antimicrobianas. De forma ventajosa, este biopolímero puede obtenerse en una sola etapa de producción. No es necesaria la adición posterior de las nanopartículas metálicas, así como tampoco es necesaria la dispersión física o química, ni la estabilización, de estas nanopartículas. En el procedimiento de la presente invención, la síntesis de las nanopartículas metálicas tiene
10 lugar durante el proceso de obtención del PHA por fermentación y, en consecuencia, este procedimiento permite obtener una óptima dispersión y distribución de las nanopartículas en la matriz polimérica.

15 El biopolímero antimicrobiano obtenido por el procedimiento que se describe en esta solicitud de patente presenta una excelente estabilidad térmica y, por lo tanto, es adecuado para la fabricación de todo tipo de termoplásticos sin que las propiedades ópticas se vean afectadas. Concretamente, este biopolímero posee una alta transparencia y la ventaja de no presentar la coloración negra o marrón característica de los materiales poliméricos aditivados con sales o nanopartículas de plata o cobre conocidos hasta la fecha. Además, la
20 incorporación de nanopartículas metálicas puede favorecer las propiedades mecánicas y de barrera al oxígeno o al vapor de agua del material fabricado a partir de este biopolímero.

25 Cuando el biopolímero antimicrobiano de la presente invención se aplica como recubrimiento sobre matrices poliméricas comerciales, previa elaboración de un masterbatch de fibras y/o cápsulas de tamaño micro, submicro o nanométrico mediante la técnica de procesado electrodinámico, se favorece la dispersión y distribución de las nanopartículas metálicas y por ende su efecto antimicrobiano. De esta forma puede obtenerse un material recubierto dotado de una excelente capacidad antimicrobiana, incluso a concentraciones menores que las requeridas para la síntesis de materiales por moldeo por compresión.
30 Preferentemente, este recubrimiento no modifica las propiedades físico-químicas del material recubierto y, adicionalmente, presenta una migración específica de los componentes metálicos por debajo de los límites establecidos por la legislación europea (EFSA 2006, The EFSA Journal (2006) 395 to 401, 1-21.; EFSA 2011, REGLAMENTO (UE) No 10/2011 DE LA COMISIÓN de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos
35 destinados a entrar en contacto con alimentos).

En el caso de la síntesis de biopolímeros antimicrobianos conteniendo nanopartículas de plata, se prefiere utilizar el poder reductor de la biomasa para la biosíntesis de estas nanopartículas. De esta forma se puede evitar el uso de agentes reductores externos, en particular agentes reductores de origen sintético, que pueden llegar a ser tóxicos.

5

Además, los componentes orgánicos presentes en el medio de fermentación, incluyendo el mismo biopolímero, se pueden utilizar como estabilizantes de las nanopartículas metálicas, en particular nanopartículas de cobre y/o plata, lo que permite evitar el uso de estabilizantes de origen sintético.

10

La inmovilización de las nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana, en particular de plata y/o cobre, en la matriz polimérica de polihidroxialcanoato ayuda a controlar la liberación de especies activas desde la superficie al medio con el que estén en contacto.

15

De forma ventajosa, el procedimiento descrito es fácilmente escalable y acoplable a la infraestructura de producción de polihidroxialcanoatos (PHAs) a nivel industrial. En particular, este procedimiento no requiere de una infraestructura adicional en una planta de procesado, más que sistemas de bombeo de soluciones. Por lo tanto, el procedimiento de obtención de un biopolímero antimicrobiano que comprende al menos un PHA y nanopartículas metálicas de la presente invención puede aplicarse directamente en el proceso de producción de PHAs por vía fermentativa a escala industrial.

20

Adicionalmente, los biopolímeros antimicrobianos obtenidos por este procedimiento tienen aplicaciones potenciales en el área de materiales renovables y biodegradables en sectores tales como: el envasado activo, recubrimiento de superficies, sensores, cosmética, farmacia, purificación de proteínas y ácidos nucleicos, y la liberación controlada de sustancias antimicrobianas, en particular bactericidas o virucidas. Además, en todos aquellos sectores que precisen de las propiedades del biopolímero que aquí se presentan, como en el sector de la biomedicina para el desarrollo de productos para el cuidado de heridas, vendajes y suturas; en la potabilización de aguas, como parte del proceso de eliminación de organismos patógenos y/o alterantes; en la fabricación de materiales antimicrobianos usados como recubrimientos; en pinturas y revestimientos para muros, pisos, tuberías, paneles estructurales; como adhesivos y sellantes; en la fabricación de instrumental y mobiliario médico; en materiales para la construcción; textiles; calzado; dispositivos tecnológicos de uso diario, como por ejemplo teléfonos móviles, ordenadores,

30

35

electrodomésticos; y en la fabricación de contenedores plásticos de alimentos o de material quirúrgico. En general, los biopolímeros obtenidos por el procedimiento de la presente invención pueden utilizarse para todas las aplicaciones que requieran de propiedades antimicrobianas, así como en aplicaciones que requieran de una mejora de la resistencia
5 térmica, la biodegradabilidad, compostabilidad y/o biocompatibilidad de matrices plásticas en las que se aplica el biopolímero.

Descripción detallada de la invención

10 La presente invención propone un procedimiento que permite la elaboración de biopolímeros que comprenden al menos un PHA y nanopartículas metálicas de acción antimicrobiana efectiva y duradera contra microorganismos patógenos. De forma más específica, el procedimiento de la invención permite solventar el problema de la baja estabilidad y aglomeración de componentes metálicos durante el procesado con matrices poliméricas y,
15 como consecuencia, permite evitar la pérdida de la capacidad biocida del material, así como los efectos negativos que estos problemas originan en las propiedades físicas, especialmente ópticas, de los materiales.

En un primer aspecto, este documento describe un procedimiento de obtención de un
20 biopolímero antimicrobiano que comprende al menos un polihidroxialcanoato y nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana, caracterizado porque el procedimiento comprende:

a) inocular una biomasa que comprende microorganismos productores de polihidroxialcanoato en un medio de producción adecuado para la producción de PHAs,
25 preferentemente un medio de producción que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, macronutrientes y micronutrientes;

b) sintetizar nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana *in situ* mediante la reacción de un compuesto precursor, preferentemente una sal metálica, y un agente reductor; y

30 c) extraer el biopolímero antimicrobiano que comprende al menos un polihidroxialcanoato y las nanopartículas metálicas.

El polihidroxialcanoato (PHA) comprendido en el biopolímero antimicrobiano que se obtiene por el procedimiento de esta solicitud de patente puede estar formado por los monómeros
35 que se incluyen en la Tabla 1; puede ser un PHA funcionalizado formado por los monómeros precursores descritos en la Tabla 1 y radicales tipo alquil, ciclohexil, halogenados, acetoxi,

ester, alcoxi, epoxi, tio, ciano, nitro, benzoil, metilfenoxi, fenoxi, fenil; o puede ser un copolímero de los polihidroxicanoatos anteriores.

5 Tabla 1: Monómeros que conforman los PHA producidos por microorganismos (Steinbüchel A. y Valentin H. (1995). Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids FEMS Microbiol. Lett.128, 219-228)

Símbolo	Nombre del monómero	Tamaño de la cadena (# de carbonos)	Posición del grupo hidroxilo
3HP	Ácido 3-hidroxi-propiónico	3	3
3HB	Ácido 3-hidroxi-butírico	4	3
3HV	Ácido 3-hidroxi-valérico	5	3
3HHx	Ácido 3-hidroxi-hexanoico	6	3
3HHp	Ácido 3-hidroxi-heptanoico	7	3
3HO	Ácido 3-hidroxi-octanoico	8	3
3HN	Ácido 3-hidroxi-nonanoico	9	3
3HD	Ácido 3-hidroxi-decanoico	10	3
3HUD	Ácido 3-hidroxi-undecanoico	11	3
3HDD	Ácido 3-hidroxi-dodecanoico	12	3
3HTD	Ácido 3-hidroxi-tetradecanoico	14	3
3HHxD	Ácido 3-hidroxi-hexadecanoico	16	3
4HB	Ácido 4-hidroxi-butírico	4	4
4HV	Ácido 4-hidroxi-valérico	5	4
4HHx	Ácido 4-hidroxi-hexanoico	6	4
4HHp	Ácido 4-hidroxi-heptanoico	7	4
4HO	Ácido 4-hidroxi-octanoico	8	4
4HD	Ácido 4-hidroxi-decanoico	10	4
5HV	Ácido 5-hidroxi-valérico	5	5
5HHx	Ácido 5-hidroxi-hexanoico	6	5
6HDD	Ácido 6-hidroxi-dodecanoico	12	6

10 Debido a sus altos rendimientos de productividad, propiedades térmicas y mecánicas, bajo coste y alta dispersión en agua, se prefiere que el PHA comprendido en el biopolímero microbiano se seleccione del grupo que consiste en poli-3-hidroxi-butirato (PHB), poli-3-hidroxi-octanoato (PHO), o un copolímero de ácido 3-hidroxi-butírico y ácido 3-hidroxi-valérico (PHVB) y una combinación de los anteriores.

15 El PHA se puede obtener a partir de cultivos microbianos silvestres puros o mixtos, o cultivos microbianos puros o mixtos modificados mediante ingeniería genética. Para el medio de cultivo se prefiere usar como materia prima residuos agroalimentarios, residuos urbanos o aguas residuales, lo cual aporta la ventaja adicional de reducir los costes de producción.

En la presente invención debe entenderse que tanto el término “antimicrobiano” como la expresión “con capacidad antimicrobiana” hacen referencia a una sustancia o compuesto que tiene la capacidad de eliminar o reducir la proliferación de microorganismos. Los microorganismos atacados por el antimicrobiano pueden ser bacterias, virus, hongos, 5 parásitos o incluso incrustaciones provocadas por la formación de películas bacterianas o la acumulación de materia orgánica.

De forma más específica, en la presente invención debe entenderse que la expresión “nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana” hace referencia a nanopartículas 10 de cualquier metal que presente actividad antimicrobiana tal como, por ejemplo, plata, cobre, zinc o una cualquiera de sus combinaciones. Preferentemente, las nanopartículas metálicas se seleccionan del grupo que consiste en nanopartículas de plata, nanopartículas de cobre y una combinación de las anteriores.

15 Las nanopartículas metálicas generadas *in situ* en el procedimiento de obtención de un biopolímero antimicrobiano de la presente invención pueden tener un tamaño de partícula entre 1 y 500 nm, preferiblemente entre 1 y 100 nm, y más preferiblemente entre 1 y 20 nm, ya que en este intervalo se favorece su efecto antimicrobiano.

20 El compuesto precursor de las nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana utilizadas en el procedimiento de la presente invención puede ser cualquier compuesto del metal en cuestión, siempre que éste permita la síntesis de las nanopartículas metálicas en el medio de producción de polihidroxialcanoato, opcionalmente en presencia de compuestos auxiliares tal como agentes reductores y/o estabilizantes. Preferentemente, el compuesto 25 precursor es una sal metálica u óxido que comprende el metal con capacidad antimicrobiana en su forma iónica. Aún más preferentemente, el compuesto precursor es una sal metálica de plata, una sal metálica de cobre, un óxido de cobre o una combinación de los anteriores.

En aquellas realizaciones de la invención en las que el biopolímero comprende 30 nanopartículas de plata, el compuesto precursor puede ser una sal metálica de plata tal como, por ejemplo, nitrato de plata, bromuro de plata, cloruro de plata, yoduro de plata, acetato de plata, fosfato de plata, sulfadiazina de plata, y compuestos organometálicos de plata, tales como, perhalofenilderivados, compuestos mesitilo o sus derivados, carboxilatos de plata tal como estearato de plata, octanoato de plata o sus derivados, y cualquier 35 combinación de los anteriores.

En aquellas realizaciones de la invención en las que el biopolímero comprende nanopartículas de cobre, el compuesto precursor puede ser una sal metálica tal como, por ejemplo, sulfato de cobre (I), sulfato de cobre (II), citrato de cobre, nitrato de cobre, acetato de cobre, fosfato de cobre, cloruro de cobre o una combinación de los anteriores.

5 Adicionalmente, este precursor de las nanopartículas de cobre puede ser un óxido de cobre o un derivado del mismo.

Tal como se ha mencionado anteriormente, la síntesis de nanopartículas metálicas se produce *in situ*, es decir, en el mismo medio de producción que se utiliza para la biosíntesis
10 de PHA por fermentación. La formación de estas nanopartículas puede realizarse utilizando agentes reductores de origen sintético tal como, por ejemplo, ácido ascórbico, citrato de sodio, borohidruro de sodio o hidrato de hidracina. Se prefiere la utilización de estos agentes reductores cuando la síntesis de las nanopartículas metálicas requiere un fuerte poder reductor.

15 Adicionalmente, la síntesis de las nanopartículas metálicas, en particular de plata y/o cobre, puede realizarse mediante biosíntesis con microorganismos reductores, con compuestos orgánicos derivados de la fermentación bacteriana, o bien mediante el uso de extractos vegetales, u otros agentes reductores de origen natural como, por ejemplo, polisacáridos
20 marinos, dextrano, extractos de celulosa o dextrano. La utilización de agentes reductores de origen natural resulta ventajosa ya que éstos suelen tener una toxicidad menor a los agentes reductores de origen sintético.

En realizaciones preferidas de la presente invención, la síntesis de las nanopartículas de
25 plata tiene lugar *in situ* utilizando como agente reductor compuestos orgánicos derivados de la fermentación tal como el propio polihidroxicanoato, los microorganismos productores de polihidroxicanoatos inoculados en la etapa a) del procedimiento de la invención o una combinación de ambos.

30 Conforme a estas realizaciones preferidas, el procedimiento de obtención de un biopolímero antimicrobiano que se describe en esta solicitud de patente permite evitar el uso de agentes reductores sintéticos que pueden llegar a ser tóxicos, lo cual representa una ventaja significativa. Adicionalmente, la utilización del carácter reductor de los microorganismos
35 productores de PHA y/o de los compuestos derivados de la fermentación bacteriana resulta especialmente ventajosa ya que evita la adición de reactivos adicionales que podrían afectar

la estabilidad del sistema, en particular, de los microorganismos productores de PHA y, en consecuencia, disminuir la efectividad (rendimiento) del procedimiento.

En el procedimiento que se describe en esta solicitud de patente puede utilizarse cualquier
5 microorganismo productor de PHA por fermentación. Por ejemplo, los descritos en los siguientes documentos: González García, Y., Meza Contreras, J. C., González Reynoso, O., & Córdova López, J. A. (2013). Synthesis and degradation of polyhydroxyalkanoates: Plastic microbial. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29(1), 77-115; Khanna, S., & Srivastava, A. K. (2005). Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates.
10 *Process Biochemistry*, 40(2), 607-619.

Sin embargo, en particular en aquellas realizaciones en las que el biopolímero a sintetizar comprende nanopartículas de plata, se prefiere utilizar microorganismos que adicionalmente
15 tengan capacidad reductora, porque de esta forma se puede evitar el uso de agentes reductores inorgánicos externos. En particular, se prefiere que los microorganismos productores de PHA sean *Ralstonia eutropha* H16, *Pseudomonas putida* KT2440, *Cupriavidus metallidurans* (DSM 2839) o una combinación de los anteriores, ya que todas estas cepas tienen la capacidad de reducir la plata desde su forma iónica hasta nanopartículas metálicas.

20 *Ralstonia eutropha* H16 y *Pseudomonas putida* KT2440 son microorganismos productores de PHA, mientras que *Cupriavidus metallidurans* (DSM 2839) es un microorganismo metal-resistente que puede utilizarse en la producción de poli-3-hidroxibutirato (PHB), poli-3-hidroxi octanoato (PHO) o un copolímero de ácido 3-hidroxi butírico y ácido 3-hidroxi valérico
25 (PHBV).

En realizaciones preferidas de la presente invención, la biomasa inoculada en la etapa a) del procedimiento que se describe puede obtenerse mediante pre-cultivo de los
30 microorganismos productores de polihidroxi alcanoato en un medio nutritivo. Preferentemente, al final de esta etapa de pre-cultivo se obtiene una concentración de microorganismos en la biomasa entre 1×10^8 a 1×10^9 UFC/mL o entre 1-1,5 D.O.

El procedimiento de la presente invención comprende la producción de polihidroxi alcanoatos por fermentación bacteriana con cultivos puros o mixtos, de origen natural o sintético,
35 pudiendo emplearse, de forma alternativa, microorganismos productores de polihidroxi alcanoatos con resistencia natural o inducida a metales.

El procedimiento de la presente invención se puede llevar a cabo a escala de laboratorio, escala de planta piloto o a escala industrial, en biorreactores operando bajo régimen continuo, por lotes o lotes alimentados, en condiciones de temperatura, pH y agitación controladas.

5

Al realizarse la inoculación de la biomasa, preferiblemente con una concentración de microorganismos productores de PHAs entre 1×10^8 a 1×10^9 UFC/mL o entre 1-1,5 D.O, en el medio de producción adecuado para la producción de PHAs, en particular un medio de producción que comprende una fuente de carbono, una fuente de nitrógeno, macronutrientes y micronutrientes, se produce un estrés celular que resulta en la acumulación del biopolímero de polihidroxialcanoato y nanopartículas metálicas en el citoplasma celular de los microorganismos.

10

En la presente invención puede utilizarse cualquier medio de producción de uso habitual en la producción de PHAs por fermentación, siempre que el medio no interactúe con el metal a un nivel que pueda complejarse y perder actividad. El medio de producción puede comprender cualquier fuente de carbono que permita la acumulación de PHA en la célula. En particular, pueden utilizarse fuentes de carbono naturales o sintéticas, así como fuentes de carbono alternativas, por ejemplo, subproductos de la industria agroindustrial, residuos urbanos, aguas residuales y, más preferiblemente, residuos agroalimentarios como el suero de leche, aceites vegetales usados o los residuos de la fruta. También se puede utilizar como fuente de carbono, dióxido o monóxido de carbono atmosférico o procedente de la combustión de materia orgánica, metano (biogás), gas de síntesis procedente de gases industriales o de la gasificación y pirolisis de residuos.

20

25

Por otro lado, la composición y concentración de las fuentes de nitrógeno, micro- y macronutrientes comprendidos en el medio de producción pueden depender del microorganismo empleado. Sin embargo, para el experto en la materia es fácilmente reconocible que en el procedimiento de la presente invención pueden utilizarse las fuentes de nitrógeno, micro- y macronutrientes presentes en medios de producción utilizados para la producción de PHA.

30

Si carácter limitante, el medio de producción utilizado en el procedimiento de la presente invención puede comprender los siguientes componentes: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,39g/L, K_2SO_4 0,45g/L, H_3PO_4 12mL/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15mg/L, NH_4Cl 0,01%, gluconato de sodio 1%, y

35

elementos traza 24mL/L ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,6g/L).

5 El biopolímero puede extraerse mediante lisis de la membrana celular, por vía física, química o biológica, preferiblemente mediante un método inerte de fácil aplicación a nivel industrial como el uso de un homogeneizador de altas presiones. El biopolímero obtenido de la fermentación puede purificarse empleando solventes orgánicos, siendo preferible la utilización de procesos de bajo impacto ambiental como, por ejemplo, la purificación utilizando etanol y agua. De forma ventajosa, la materia orgánica producida durante el
10 proceso de fermentación, incluido el biopolímero, puede actuar como agente estabilizante y matriz de soporte para las nanopartículas metálicas.

Adicionalmente, el biopolímero obtenido por el procedimiento que se describe en este documento puede someterse a etapas adicionales de centrifugación y secado, y/o
15 liofilización.

Otro aspecto de la presente invención se refiere al biopolímero antimicrobiano que comprende al menos un polihidroxicanoato y nanopartículas metálicas, caracterizado porque se obtiene por el procedimiento que se describe en esta solicitud de patente. Tal
20 como se ha descrito en detalle anteriormente, en este procedimiento la formación de las nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana tiene lugar *in situ* durante el proceso de obtención del PHA por fermentación. De esta forma, el biopolímero antimicrobiano de la presente invención se caracteriza por comprender nanopartículas con un tamaño mínimo, más preferiblemente entre 1-20 nm, un bajo estado de aglomeración y una distribución
25 homogénea en la matriz polimérica de PHA. En particular, la síntesis de las nanopartículas metálicas *in situ* permite evitar que se agreguen entre ellas y, como resultado, las nanopartículas presentan un tamaño reducido y una distribución homogénea en el biopolímero que favorece su actividad antimicrobiana.

30 Adicionalmente, el biopolímero antimicrobiano que se describe en este documento se caracteriza por una mayor estabilidad térmica y propiedades ópticas mejoradas, en particular una elevada transparencia. El procedimiento de la presente invención evita la coloración negra o marrón característica de otros materiales poliméricos aditivados con sales o nanopartículas metálica tal como plata o cobre. Además, la incorporación de
35 nanopartículas metálicas mediante el procedimiento de la presente invención permite favorecer las propiedades mecánicas y de barrera al oxígeno o al vapor de agua del

material. En consecuencia, el biopolímero antimicrobiano obtenido por este procedimiento puede utilizarse de forma ventajosa para la fabricación de todo tipo de termoplásticos sin que se vean afectadas las propiedades ópticas del material.

- 5 En realizaciones preferidas de la presente invención, las nanopartículas metálicas son nanopartículas de plata, nanopartículas de cobre o una combinación de los anteriores.

El polihidroxicanoato (PHA) comprendido en el biopolímero antimicrobiano que se describe en esta solicitud de patente puede estar formado por los monómeros que se incluyen en la
10 Tabla 1; puede ser un PHA funcionalizado formado por los monómeros precursores descritos en la Tabla 1 y radicales tipo alquil, ciclohexil, halogenados, acetoxi, ester, alcoxi, epoxi, tio, ciano, nitro, benzoil, metilfenoxi, fenoxi, fenil; o puede ser un copolímero de los polihidroxicanoatos anteriores. Preferiblemente el biopolímero antimicrobiano comprende al menos PHA seleccionado del grupo que consiste en poli-3-hidroxi butirato (PHB), poli-3-
15 hidroxi octanoato (PHO) o un copolímero de ácido 3-hidroxi butírico y ácido 3-hidroxi valérico (PHVB) y una combinación de los anteriores. Estos PHAs se prefieren por sus altos rendimientos de productividad, propiedades térmicas y mecánicas, bajo coste y alta dispersión en agua.

20 El biopolímero antimicrobiano que comprende PHA y nanopartículas metálicas que se describe en esta solicitud de patente puede usarse directamente para la elaboración de películas, es decir, films poliméricos, o como másterbatch en combinación con otros polímeros, empleando técnicas convencionales de procesamiento de plásticos, tales como la deposición y evaporación del disolvente, operaciones típicamente utilizadas durante la
25 formulación de termoestables y elastómeros, mediante procesos de mezclado en fundido tal como extrusión, inyección o soplado; y/o métodos de polimerización *in situ* y, preferentemente, el moldeo por compresión. Por otro lado, el biopolímero antimicrobiano también puede utilizarse para la fabricación de micro, submicro o nanopartículas, en particular fibras y/o cápsulas, por la técnica de procesamiento electrodinámico y posterior
30 recubrimiento de superficies poliméricas.

Se describe la obtención de películas poliméricas (también denominados films en este documento) o artículos plásticos antimicrobianos mediante la incorporación de nanopartículas metálicas, preferentemente de plata, cobre o una combinación de ambos,
35 estabilizadas sobre matrices biopoliméricas de polihidroxicanoato (PHA), mediante la biosíntesis o síntesis química de las nanopartículas metálicas durante el proceso de

obtención del PHA por fermentación. De forma más específica, se describe la elaboración de films o artículos plásticos antimicrobianos mediante cualquier técnica de procesado de plásticos desde el fundido tal como, por ejemplo, y sin sentido limitativo, extrusión de film, soplado, inyección, calandrado, termoformado, técnicas de moldeo por compresión; así como la fabricación de fibras y/o cápsulas de tamaño micro, submicro, o nanométrico mediante técnicas de procesado electrohidrodinámico.

Los diferentes materiales obtenidos por los procesos que se describen en esta solicitud contienen nanopartículas metálicas homogéneamente distribuidas sobre la matriz polimérica de PHA y poseen una actividad antimicrobiana, en particular de carácter bactericida y virucida, contra agentes patógenos o alterantes. Además, los productos constituidos del biopolímero antimicrobiano que aquí se describe, o bien aquellos que los contienen dentro de su formulación, ofrecen una excelente estabilidad térmica y pueden incluso presentar una mejora en sus propiedades mecánicas y de barrera.

Por lo tanto, la presente invención también se refiere al uso del biopolímero antimicrobiano que se describe en esta solicitud de patente como masterbatch o concentrado de nanopartículas en la matriz del biopoliéster, para que pueda ser utilizado directamente o más comúnmente como componente de mezcla para diluir utilizando técnicas de proceso típicamente empleadas en la industria del plástico, con el mismo u otro polímero.

La presente invención también describe un proceso de obtención de una película polimérica o artículo plástico que comprende al menos un polihidroxialcanoato y nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana, donde este proceso comprende:

- i) obtener un biopolímero que comprende al menos un polihidroxialcanoato y nanopartículas metálicas según se describe en la presente solicitud de patente; y
- ii) obtener la película polimérica o artículo plástico a partir del biopolímero obtenido en i) mediante una técnica de procesado de plásticos desde el fundido, tal como, por ejemplo, y sin sentido limitativo, extrusión de film, soplado, inyección, calandrado, termoformado, técnicas de moldeo por compresión.

En particular, en la etapa ii) del proceso de formación de una película puede utilizarse la técnica de compresión desde el fundido, donde la temperatura y presión utilizadas pueden variar según la aplicación final a la que se vaya a destinar la película o artículo plástico, es decir, en función de la cristalinidad, espesor, propiedades térmicas y propiedades de barrera deseadas. Preferentemente, la etapa de moldeo por compresión puede tener lugar a una

temperatura próxima al punto de fusión del biopolímero, en particular entre 130 y 200 °C, y una presión entre 0,5 y 5 MPa.

La presente invención también se refiere a una película o artículo plástico que comprende al menos un polihidroxicanoato y nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana, preferentemente de plata, cobre o una combinación de ambos metales, donde la película o artículo plástico se obtiene por el proceso que se describe en esta solicitud de patente. La elevada estabilidad térmica del biopolímero permite emplear técnicas de conformación de plásticos habituales en el sector, preferentemente moldeo por compresión, sin que se vean afectadas negativamente las propiedades de la película polimérica o artículo plástico obtenido. En particular, el proceso de la presente invención permite, por ejemplo, la obtención de películas antimicrobianas por moldeo por compresión a una temperatura entre 130 y 200 °C y una presión entre 0,5 y 5 MPa, sin afectar negativamente la actividad antimicrobiana del biopolímero utilizado para ello, ni sus propiedades ópticas. Sin carácter limitante, se podrá procesar este material para obtener film monocapa o multicapa utilizando cualquier técnica de procesamiento de plásticos típicamente empleada en la industria. También se puede utilizar este material para formar envases rígidos o flexibles.

Por otro lado, la presente invención se refiere a un proceso de obtención de micro, submicro o nanopartículas, preferentemente fibras, cápsulas o una combinación de las anteriores, que comprenden al menos un polihidroxicanoato y nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana, caracterizado porque el proceso comprende:

- i) obtener un biopolímero que comprende al menos un polihidroxicanoato y nanopartículas metálicas tal como se describe en esta solicitud de patente; y
- ii) obtener micro, submicro o nanopartículas a partir del biopolímero obtenido en i) mediante una técnica de procesamiento electrodinámico.

En realizaciones particulares de la presente invención, la solución de electroestirado utilizada en la etapa ii) puede contener una concentración de entre 3-10 % en peso de sólidos totales respecto al peso total de la solución, el voltaje del inyector puede variar de entre 10 kV y 30 kV, el voltaje del colector puede variar entre 0 y 30kV y la distancia entre inyector y colector puede oscilar entre 5 cm y 40 cm. Sin embargo, estos parámetros pueden verse modificados, por ejemplo, por la viscosidad y tensión superficial de la solución de electroestirado, así como por la temperatura, la humedad relativa y la humedad del solvente empleado (por ejemplo: cloroformo, diclorometano, trifluoroetanol, acetona, sus combinaciones, o cualquier otro en el que el producto sea soluble y electroestirable).

Adicionalmente, puede ser necesario ajustar estos parámetros en función de las características de tamaño y morfología de las partículas que se desee obtener, en particular según se pretenda obtener fibras, cápsulas o una combinación de las anteriores.

5 La presente invención también se refiere a micro, submicro o nanopartículas que comprenden al menos un polihidroxialcanoato y nanopartículas metálicas, preferiblemente de plata, cobre o una combinación de ambos metales, obtenidas por el proceso que se describe en esta solicitud de patente. Preferiblemente, estas partículas son fibras, cápsulas o una combinación cualquiera de las anteriores obtenidas mediante la técnica de procesado
10 electrodinámico. El procesado electrodinámico permite la obtención de material sólido microestructurado o nanoestructurado, el cual es secado sin el uso de altas temperaturas.

Esta solicitud de patente también se refiere al uso del biopolímero antimicrobiano que comprende PHA y nanopartículas metálicas, preferiblemente de plata, cobre o una
15 combinación de ambos metales que se describe en esta solicitud de patente, en la fabricación de envases, el recubrimiento de superficies, la fabricación de sensores, en cosmética, biomedicina, purificación de proteínas y ácidos nucleicos o en la liberación controlada de sustancias antimicrobianas. Adicionalmente, esta solicitud también se refiere al uso de la película filmógena, artículo plástico y de las micro, submicro o nanopartículas
20 que describen en esta solicitud de patente para las aplicaciones mencionadas anteriormente en relación al biopolímero.

La presente solicitud de patente también refiere a un material recubierto que comprenda una matriz polimérica recubierta con el biopolímero antimicrobiano, la película polimérica o las
25 micro, submicro o nanopartículas que se describen en este documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La **Figura 1** corresponde a una imagen obtenida por Microscopía Electrónica de
30 Transmisión (TEM) de células bacterianas de *Ralstonia eutropha* conteniendo gránulos de PHAs y nanopartículas de plata en su citoplasma

La **Figura 2** muestra fotografías de los films de PHAs conteniendo nanopartículas de plata y cobre que se obtienen por el procedimiento descrito en la presente solicitud de patente: **(a)**
35 film de PHAs sin nanopartículas metálicas (para fines comparativos), **(b)** film de PHA conteniendo nanopartículas de plata, **(c)** film de PHAs conteniendo nanopartículas de cobre.

La **Figura 3** contiene los resultados de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los films desarrollados en la presente invención contra *Salmonella enterica*. La línea punteada representa el límite de detección (33 UFC/mL). La concentración de células bacterianas al inicio de la evaluación corresponde a $5,48 \pm 0,4$ UFC/mL.

La **Figura 4** corresponde a micrografías de Microscopía Electrónica de Barrido de microfibras de PHAs y nanopartículas de plata obtenidas por la técnica de procesamiento electrodinámico.

10

La **Figura 5** muestra una fotografía de un film de PHBV comercial recubierto con un mat de fibras de tamaño submicrométrico el cual posee propiedades antivirucidas.

Ejemplos

15

EJEMPLO 1: Incorporación de nanopartículas de plata (ejemplo 1.1) o de cobre (ejemplo 1.2) durante el proceso de fermentación de polihidroxicanoatos

En este ejemplo se utiliza un microorganismo productor de polihidroxicanoatos, como *Ralstonia eutropha* H16, *Pseudomonas putida* KT2440, o un microorganismo productor de PHA y metal-resistente, como *Cupriavidus metallidurans* (DSM 2839), para la producción de poli-3-hidroxi-butarato (PHB), poli-3-hidroxi-octanoato (PHO) o un copolímero de ácido 3-hidroxi-butírico y ácido 3-hidroxi-valérico, y la para la biosíntesis de nanopartículas de plata y de cobre.

25

En una aplicación particular (ejemplo 1.1), se utilizó *Ralstonia eutropha* (DSM 428) como microorganismo productor de PHB y nanopartículas de plata. La cepa se conservó a -80°C en glicerol, se reactivó mediante cultivo en placa en Luria Agar y luego se pasó a caldo nutritivo (extracto de res 3g/L, peptona 5g/L), se incubó durante 24 horas en un agitador orbital a 200 rpm y 30°C . Al finalizar este tiempo, se centrifugó a 4.000 rpm durante 15 minutos y se recuperó la biomasa. La biomasa es re-suspendida en medio de producción ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,39g/L, K_2SO_4 0,45g/L, H_3PO_4 12ml/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15mg/L, NH_4Cl 0,01%, gluconato de sodio 1%, elementos traza 24ml/L ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 100mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 100mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2,6g/L)), y se incubó a 30°C durante 24 horas más. Transcurrido este tiempo, se sintetizaron nanopartículas de plata en el medio de fermentación. Se añadió nitrato de plata a 3,5mM (333ml/L de medio de cultivo) como

35

precursor de las nanopartículas y se aprovechó el poder reductor de la biomasa. El resultado es la biosíntesis de nanopartículas de plata sin la necesidad de un agente reductor adicional ni de un agente estabilizante. Tras 16 horas de incubación a 30°C, en agitación continua a 100 rpm, las nanopartículas lograron atravesar la membrana bacteriana y fijarse en el biopolímero tal y como se confirmó en imágenes de Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM), en las cuales puede apreciarse células de *Ralstonia eutropha* H16 conteniendo nanopartículas de plata y biopolímero dentro del citoplasma celular (Figura 1).

En otra aplicación particular (ejemplo 1.2), se procedió de forma similar al procedimiento descrito en el párrafo anterior pero se añadió un hidrato de hidracina (30mL/L medio de cultivo) como agente reductor y una sal de cobre, en particular, sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 200mL/L medio) al medio de fermentación a fin de sintetizar nanopartículas de cobre.

El producto de la fermentación (conteniendo nanopartículas de plata (ejemplo 1.1) o de cobre (ejemplo 1.2)) se hizo pasar por un homogeneizador de altas presiones (2000 psi, 8 minutos en recirculación) para romper la membrana celular y liberar los gránulos de biopolímero conteniendo las nanopartículas metálicas. Se procedió a centrifugar el caldo de la fermentación durante 15 minutos a 9000 rpm y se desechó el sobrenadante. La biomasa obtenida se re-suspendió en cloroformo (10% peso seco/volumen), durante 16-20 horas a 50°C. Posteriormente se añadió agua (50% volumen/volumen), se separaron las fases por centrifugación (2000 rpm, 2 min) y se precipitó la fase orgánica sobre 10 volúmenes de metanol frío. El precipitado se secó en una estufa a vacío a 40°C durante 24 horas. Con el producto obtenido, se elaboraron películas poliméricas (films) de aproximadamente 100 µm de espesor mediante moldeo por compresión a 180°C y 1,8 MPa durante 5 minutos.

La apariencia física de los films obtenidos, conteniendo nanopartículas de plata o cobre, se aprecia en las fotografías de la Figura 2, en la cual, para fines comparativos, se ha incluido también la fotografía de un film de PHBV comercial y de un film recubierto con un masterbatch fabricado con el mismo procedimiento, pero sin contener nanopartículas metálicas. De estas fotografías se observa que la incorporación de las nanopartículas metálicas mejora las propiedades ópticas del material, en tanto que las películas no presentan la típica coloración negra (en el caso de la plata) o marrón (en el caso del cobre) característica de materiales poliméricos que son aditivados con sales de plata o cobre a altas concentraciones a fin de lograr el efecto antimicrobiano (en particular, bactericida o virucida) deseado.

La actividad antibacteriana y virucida de las películas poliméricas elaboradas se evaluó teniendo en cuenta el estándar JIS Z 2801: 2006 (ISO 22196: 2007) para evaluación de actividad antimicrobiana sobre superficies plásticas, con algunas modificaciones que se describen a continuación. Se inocularon películas de 3 cm x 3 cm con una suspensión bacteriana de 5×10^5 UFC/mL o de virus de 1×10^5 de dosis infecciosa 50 en cultivo celular (TCID₅₀) y se cubrieron con películas inertes de 2,5 cm x 2,5 cm de Polietileno de Baja Densidad (LDPE). El montaje se dejó en incubación a 25°C y 90% de humedad relativa durante 24 horas. Pasado este tiempo, se realizó un recuento de células viables en placas de agar soja tripticaseína (TSA) en el caso de bacterias o se midió el efecto citopático del virus sobre células CRFK (CCL-94). Los resultados de dicha evaluación se muestran en la Figura 3 y en la Tabla 3, donde se demuestra que tanto la plata contenida en los films, la cual equivale a un $0,084 \pm 0,009\%$ en peso, como el cobre, el cual corresponde a $0,201 \pm 0,009\%$ en peso, presentan un efecto bactericida contra las bacterias analizadas y reducen el daño celular causado durante el ciclo de replicación de virus entéricos. Los resultados expuestos, además de corroborar la estabilidad y óptima dispersión de las nanopartículas metálicas en las matrices biopoliméricas, facilitan su uso en aplicaciones que requieren control microbiológico, dado que se disminuye la dosis efectiva y se garantiza la eficiencia antibacteriana y virucida de los materiales.

20

EJEMPLO 2: Obtención de microfibras de polihidroxialcanoatos con nanopartículas metálicas mediante procesado electrodinámico y su uso como recubrimiento antimicrobiano.

El biopolímero antimicrobiano obtenido en el proceso de fermentación descrito en el ejemplo 1.1 se utilizó para la elaboración de un masterbatch constituido por fibras sub-micrométricas fabricadas mediante la técnica de procesado electrodinámico (también conocida como electrospinning).

En particular, se preparó una disolución del biopolímero conteniendo las nanopartículas metálicas en un solvente orgánico, 2,2,2-trifluoroetanol, la cual contenía un porcentaje de sólidos totales del 3% en peso y se sintetizaron microfibras por la técnica de procesado electrodinámico. El procesado electrodinámico se llevó a cabo en un equipo FLUIDNATEK™ a escala piloto, operado bajo un régimen de flujo estacionario y usando un inyector de alto rendimiento equipado con 20 agujas de acero inoxidable de 29mm de diámetro. Las condiciones del proceso en este ejemplo son: caudal de la disolución: 80mL/h, distancia entre el inyector y el colector: 20cm, voltaje en el colector 24kV, voltaje en el inyector 18kV,

35

tiempo de deposición: 15min. El material obtenido se usó como recubrimiento de superficies poliméricas. En particular, se recubrieron films de PHBV comercial (3%HV, Tianan, Biopolymer, Ningbo, China) con mats antimicrobianos de 80-100 μ m de espesor, 5-15% en peso respecto al film a recubrir. La Figura 4 muestra una imagen obtenida por Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) de las microfibras de biopolímero conteniendo nanopartículas de plata.

En una variación del proceso de electroestirado se utilizó un motor de desplazamiento horizontal, el cual desplazaba el inyector a lo largo del colector, favoreciendo el alineamiento de las microfibras y con ello la dispersión y distribución de las nanopartículas metálicas y la barrera del material al vapor de agua y al oxígeno.

Los films desarrollados en este ejemplo presentan actividad bactericida (Figura 3) y virucida. (Tabla 3). Por ejemplo, los films que contienen nanopartículas de plata reducen el número de células viables de *Salmonella enterica* hasta en 5 unidades logarítmicas y los films que contienen nanopartículas de cobre reducen el efecto citopático del Norovirus Murino en más de 2 log₁₀ TCID₅₀/ml. Además, la cantidad total de plata o cobre que migra desde el material (en un período de 10 días a 40°C) a un medio líquido que simula un alimento, tal como etanol al 10% representando alimentos hidrofílicos, se encuentra por debajo de los límites de la legislación vigente. En el caso de films de PHBV3 recubiertos con microfibras del biopolímero antimicrobiano a base de plata, la migración específica es dos veces inferior a la contemplada en la normativa europea (EFSA 2006, The EFSA Journal (2006) 395 to 401, 1-21.; EFSA 2011, REGLAMENTO (UE) No 10/2011 DE LA COMISIÓN de 14 de enero de 2011 sobre materiales y objetos plásticos destinados a entrar en contacto con alimentos). Así, los materiales obtenidos por el procedimiento anteriormente descrito, presentan actividad bactericida a menores concentraciones que las requeridas en las técnicas empleadas en el ejemplo 1.1, con la ventaja adicional de poseer excelentes propiedades ópticas, tal y como se observa en la Figura 5. Además, la incorporación de nanopartículas metálicas por esta vía, tiene poco o ningún efecto sobre las propiedades térmicas, mecánicas, de barrera o sobre la cristalinidad del material recubierto.

	Temperatura			
TIPO DE película	37°C		25°C	
	Valoración obtenida (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	Reducción	Valoración obtenida (log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	Reducción
Control	5,45 ± 0,00 A		5,76 ± 0,08 A	
AgNP	3,44 ± 0,00 B	2,01	5,32 ± 0,00 A	0,13
CuNP	<1,15 C	>3,59	3,19 ± 0,05 B	>2,57

La **Tabla 3** contiene los resultados de la evaluación de la actividad virucida de las películas poliméricas de PHAs conteniendo nanopartículas de plata o cobre frente a *Norovirus murino* (MNV) a 25 °C y 37°C.

REIVINDICACIONES

- 1.- Un procedimiento de obtención de un biopolímero antimicrobiano que comprende al menos un polihidroxicanoato y nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana, caracterizado porque el procedimiento comprende:
- 5
- a) inocular una biomasa que comprende microorganismos productores de polihidroxicanoato en un medio de producción adecuado para la producción de polihidroxicanoatos;
- b) sintetizar nanopartículas metálicas con capacidad antimicrobiana *in situ* mediante la reacción de un compuesto precursor y un agente reductor; y
- 10
- c) extraer el biopolímero antimicrobiano que comprende al menos un polihidroxicanoato y las nanopartículas metálicas.
- 2.- El procedimiento de obtención de un biopolímero según la reivindicación 1, donde las nanopartículas metálicas se seleccionan del grupo que consiste en nanopartículas de plata, nanopartículas de cobre y una combinación de las anteriores.
- 15
- 3.- El procedimiento de obtención de un biopolímero según la reivindicación 2, donde las nanopartículas metálicas son de plata y el agente reductor se selecciona del grupo que consiste en compuestos orgánicos derivados de la fermentación, los microorganismos productores de polihidroxicanoatos inoculados en la etapa a) y una combinación de los anteriores.
- 20
- 4.- El procedimiento de obtención de un biopolímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la biomasa comprende microorganismos productores de polihidroxicanoato seleccionados del grupo que consiste en *Ralstonia eutropha* H16, *Pseudomonas putida* KT2440, *Cupriavidus metallidurans* (DSM 2839) y una combinación de los anteriores.
- 25
- 5.- El procedimiento de obtención de un biopolímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde el polihidroxicanoato está formado por monómeros de ácido 3-hidroxi-propiónico, ácido 3-hidroxi-butírico, ácido 3-hidroxi-valérico, ácido 3-hidroxi-hexanoico, ácido 3-hidroxi-heptanoico, ácido 3-hidroxi-octanoico, ácido 3-hidroxi-nonanoico, ácido 3-hidroxi-decanoico, ácido 3-hidroxi-undecanoico, ácido 3-hidroxi-dodecanoico, ácido 3-hidroxi-tetradecanoico, ácido 3-hidroxi-hexadecanoico, ácido 4-hidroxi-butírico, ácido 4-
- 30
- 35

- 5 hidroxivalérico, ácido 4-hidroxi-hexanoico, ácido 4-hidroxi-heptanoico, ácido 4-hidroxi-octanoico, ácido 4-hidroxi-decanoico, ácido 5-hidroxi-valérico, ácido 5-hidroxi-hexanoico, ácido 6-hidroxi-dodecanoico; es un polihidroxicanoato funcionalizado formado por los monómeros nombrados anteriormente y radicales tipo alquil, ciclohexil, halogenados, acetoxi, ester, alcoxi, epoxi, tio, ciano, nitro, benzoil, metilfenoxi, fenoxi, fenil; o es un copolímero de los polihidroxicanoatos anteriores.
- 10 6.- El procedimiento de obtención de un biopolímero según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde el biopolímero se extrae mediante lisis física, química o biológica de la membrana celular de los microorganismos productores de polihidroxicanoato.
- 15 7.- Biopolímero antimicrobiano que comprende al menos un polihidroxicanoato y nanopartículas metálicas obtenido por el procedimiento que se describe en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
- 20 8.- Uso del biopolímero antimicrobiano que se describe en la reivindicación 7, como masterbatch o concentrado en mezclas con otros polímeros.
- 25 9.- Uso del biopolímero antimicrobiano obtenido por el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la obtención de una película o artículo plástico que comprende al menos un polihidroxicanoato y nanopartículas metálicas, mediante una técnica cualquiera de procesamiento de plásticos desde fundido.
- 30 10.- Uso del biopolímero antimicrobiano obtenido por el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para la obtención de micro, submicro o nanopartículas que comprenden al menos un polihidroxicanoato y nanopartículas metálicas, mediante una técnica de procesamiento electrodinámico.
- 35 11.- Uso del biopolímero de la reivindicación 7 en la fabricación de envases, el recubrimiento de superficies, fabricación de sensores, cosmética, biomedicina, purificación de proteínas y ácidos nucleicos o liberación controlada de sustancias antimicrobianas.

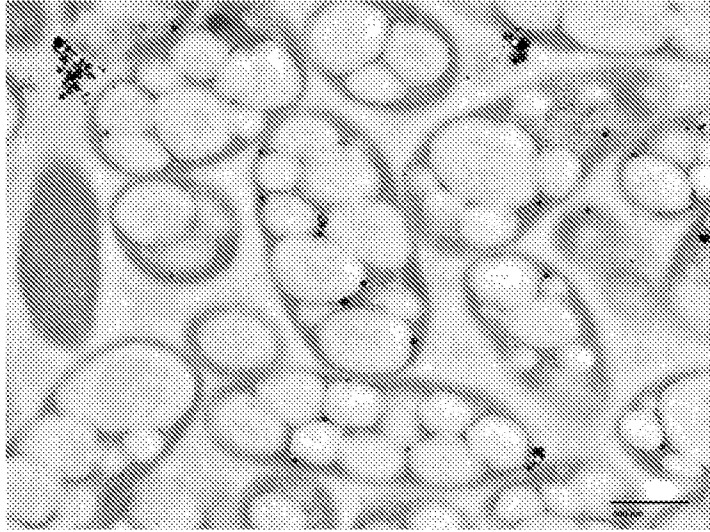


Fig. 1

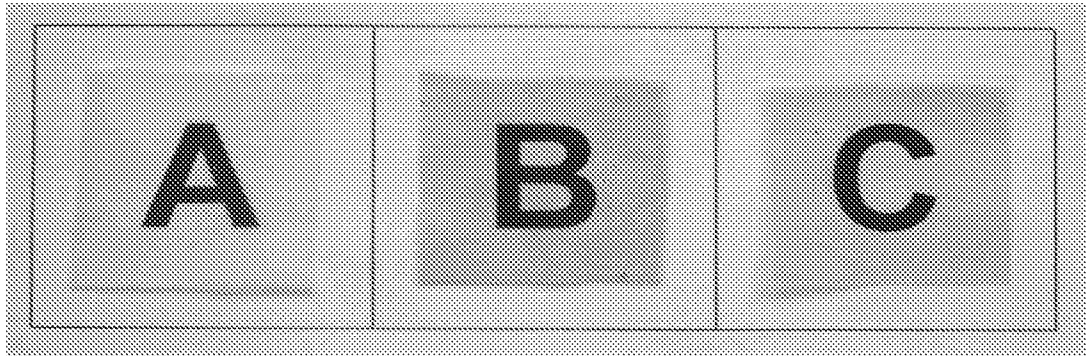


Fig. 2

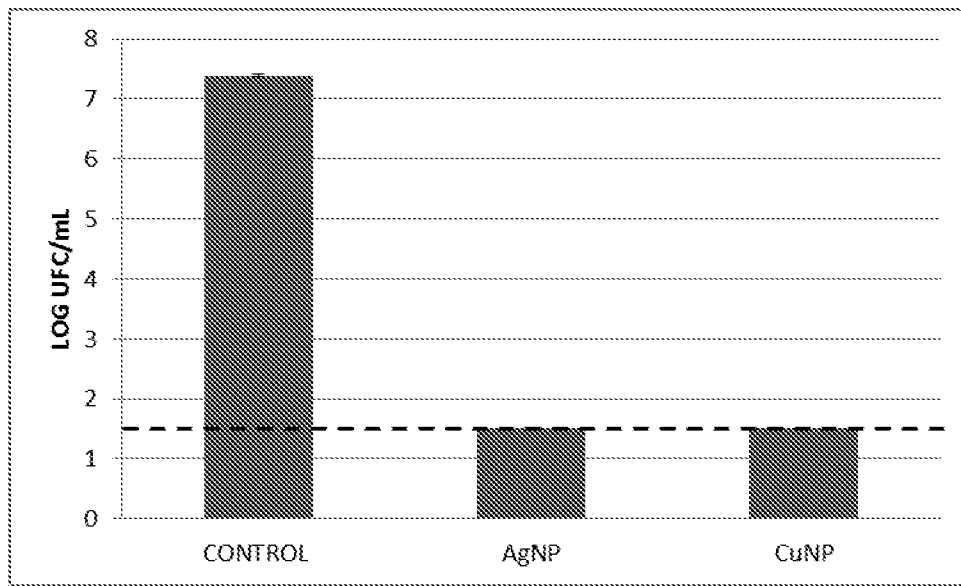


Fig. 3

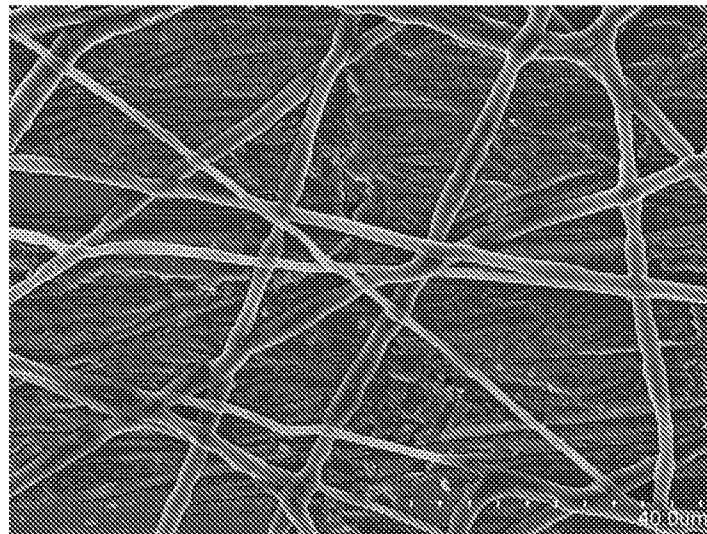


Fig. 4



Fig. 5



OFICINA ESPAÑOLA
DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

②¹ N.º solicitud: 201630829

②² Fecha de presentación de la solicitud: 20.06.2016

③² Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤ Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	CASTRO-MAYORGA, J. L., et al.. STABILIZATION OF ANTIMICROBIAL SILVER NANOPARTICLES BY A POLYHYDROXYALKANOATE OBTAINED FROM MIXED BACTERIAL CULTURE. <i>International journal of biological macromolecules</i> . 2014, Vol. 71, Páginas 103-110. Páginas 103-109.	1-2, 5, 7 y 11
X	CASTRO-MAYORGA, J. L.; FABRA, M. J.; LAGARON, J. M. . STABILIZED NANOSILVER BASED ANTIMICROBIAL POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) NANOCOMPOSITES OF INTEREST IN ACTIVE FOOD PACKAGING. <i>Innovative Food Science & Emerging Technologies</i> 2016 (disponible en internet el 12 de noviembre de 2015), Vol. 33, Páginas 524-533. Página 525.	1-2, 5, 7 y 9
A	RODRIGUEZ-CARMONA, Escarlata; VILLAVERDE, Antonio. NANOSTRUCTURED BACTERIAL MATERIALS FOR INNOVATIVE MEDICINES. <i>Trends in microbiology</i> . 2010, Vol. 18, Páginas 423-430. Todo el documento.	1-11
A	YUN, Jung Hyun; SAWANT, Shailesh S.; KIM, Beom Soo. PRODUCTION OF POLYHYDROXYALKANOATES BY RALSTONIA EUTROPHA FROM VOLATILE FATTY ACIDS. <i>Korean Journal of Chemical Engineering</i> . 2013, Vol. 30, Páginas 2223-2227. Todo el documento.	1-11

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
28.08.2017

Examinador
M. J. García Bueno

Página
1/4

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08G63/12 (2006.01)

C12P7/62 (2006.01)

B82Y5/00 (2011.01)

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

C08G, C12P, B82Y

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NPL, BIOSIS, GOOGLE SCHOLAR, GOOGLE PATENTS

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 28.08.2017

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones 1-11	SI
	Reivindicaciones	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP11/1986)	Reivindicaciones 3-4, 6, 8 y 10	SI
	Reivindicaciones 1-2, 5, 7, 9 y 11	NO

Se considera que la solicitud cumple con el requisito de aplicación industrial. Este requisito fue evaluado durante la fase de examen formal y técnico de la solicitud (Artículo 31.2 Ley 11/1986).

Base de la Opinión.-

La presente opinión se ha realizado sobre la base de la solicitud de patente tal y como se publica.

1. Documentos considerados.-

A continuación se relacionan los documentos pertenecientes al estado de la técnica tomados en consideración para la realización de esta opinión.

Documento	Número Publicación o Identificación	Fecha Publicación
D01	CASTRO-MAYORGA, J. L., et al.. STABILIZATION OF ANTIMICROBIAL SILVER NANOPARTICLES BY A POLYHYDROXYALKANOATE OBTAINED FROM MIXED BACTERIAL CULTURE. International journal of biological macromolecules, Vol. 71, Páginas 103-110	2014
D02	CASTRO-MAYORGA, J. L.; FABRA, M. J.; LAGARON, J. M. STABILIZED NANOSILVER BASED ANTIMICROBIAL POLY (3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE) NANOCOMPOSITES OF INTEREST IN ACTIVE FOOD PACKAGING. Innovative Food Science & Emerging Technologies, Vol. 33, Páginas 524-533	2016 (disponible en internet el 12 de noviembre de 2015)

2. Declaración motivada según los artículos 29.6 y 29.7 del Reglamento de ejecución de la Ley 11/1986, de 20 de marzo, de Patentes sobre la novedad y la actividad inventiva; citas y explicaciones en apoyo de esta declaración

La presente solicitud de invención consiste en un procedimiento de obtención de un biopolímero antimicrobiano que comprende un polihidroxicano y nanopartículas metálicas para la fabricación de plásticos y envases o recubrimientos de superficies en el campo de la cosmética y biomedicina (reivindicaciones 1-11).

1.- NOVEDAD (Art. 6.1 LP).

La solicitud de invención se considera nueva en el sentido del artículo 6.1 LP.

2.- ACTIVIDAD INVENTIVA (Art. 8.1 LP).**2.1.- Reivindicaciones 1-2, 5, 7, 9 y 11.**

Los documentos D01 y D02 divulgan un procedimiento de obtención de un biopolímero antimicrobiano que comprende el polihidroxicanoato poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxicvalerato y nanopartículas de plata, donde las nanopartículas se sintetizan in situ mediante la reacción de un compuesto precursor (nitrato de plata) y un agente reductor, el borohidruro de sodio (ver páginas 103-109 en D01 y página 525 en D02).

Los documentos D01 y D02 no divulgan las etapas de inocular una biomasa que comprende los microorganismos productores de PHA ni la extracción del polímero antimicrobiano. Sin embargo, dichas etapas resultan evidentes para un experto en la materia.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1, 2 y 5 no implican actividad inventiva en el sentido del artículo 8.1 LP.

El documento D01 también divulga el biopolímero antimicrobiano obtenido por el procedimiento reivindicado en la reivindicación 1 y el uso de dicho biopolímero en la fabricación de envases, recubrimiento de superficies y biomedicina.

El documento D02 también divulga el uso del biopolímero obtenido en la reivindicación 1 para la obtención de una película mediante una técnica cualquiera de procesamiento de plásticos desde el fundido.

Por lo tanto, las reivindicaciones 7, 9 y 11 no tienen actividad inventiva según el artículo 8.1 LP.

2.2.- Reivindicaciones 3-4, 6, 8 y 10.

Las reivindicaciones 3-4, 6, 8 y 10 implican actividad inventiva según el artículo 8.1 LP.

3.- PATENTABILIDAD (Art. 4.1 LP).**3.1- Reivindicaciones 1-2, 5, 7, 9 y 11.**

Las reivindicaciones 1-2, 5, 7, 9 y 11 no cumplen con los requisitos de patentabilidad según el artículo 4.1 LP.

3.2.- Reivindicaciones 3-4, 6, 8 y 10.

Las reivindicaciones 3-4, 6, 8 y 10 cumplen con el requisito de patentabilidad en el sentido del artículo 4.1 LP.