



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



① Número de publicación: **2 341 749**

② Número de solicitud: 200803695

⑤ Int. Cl.:

B22F 9/24 (2006.01)

B22F 1/00 (2006.01)

C01B 25/32 (2006.01)

B82B 1/00 (2006.01)

B82B 3/00 (2006.01)

A01N 59/26 (2006.01)

A01N 25/12 (2006.01)

⑫

SOLICITUD DE PATENTE

A1

⑫ Fecha de presentación: **24.12.2008**

⑬ Fecha de publicación de la solicitud: **25.06.2010**

⑭ Fecha de publicación del folleto de la solicitud:
25.06.2010

⑰ Solicitante/s: **Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC)**
c/ Serrano, 117
28006 Madrid, ES

⑱ Inventor/es: **Moya Corral, José Serafín;**
Díaz Muñoz, Marcos;
Barba Martín-Sonseca, María Flora;
Malpartida Romero, Francisco;
Miranda Fernández, Miriam;
Fernández Valdés, Adolfo;
Esteban Tejeda, Leticia;
López-Esteban, Sonia y
Torrecillas San Millán, Ramón

⑳ Agente: **Pons Ariño, Ángel**

⑳ Título: **Polvo compuesto nanoestructurado fosfato de calcio-plata. Procedimiento de obtención y sus aplicaciones bactericidas y fungicidas.**

㉑ Resumen:

Polvo compuesto nanoestructurado fosfato de calcio-plata. Procedimiento de obtención y sus aplicaciones bactericidas y fungicidas.

La presente invención lo constituye un polvo compuesto nanoestructurado fosfato de calcio-plata útil como antibactericida y/o fungicida, con una eficacia similar a la de productos comerciales y con una baja toxicidad. El segundo objeto de la presente invención lo constituye el procedimiento de obtención de dichos polvos compuestos nanoestructurados fosfato de calcio-plata, consistente en la preparación de fosfato de calcio nanométrico a partir de un procesamiento sol-gel y, a continuación, la deposición de nanopartículas de plata en su superficie. Este polvo nanoestructurado puede ser utilizado en la elaboración de una composición bactericida y/o fungicida útil como desinfectante universal para aplicaciones, por ejemplo, en implantes quirúrgicos, instalaciones de uso público alimentación, dental, pinturas, prendas de vestir y embalajes.

ES 2 341 749 A1

DESCRIPCIÓN

Polvo compuesto nanoestructurado fosfato de calcio-plata. Procedimiento de obtención y sus aplicaciones bactericidas y fungicidas.

Sector de la técnica

Aplicaciones bactericidas y fungicidas en el sector de los implantes quirúrgicos, instalaciones de uso público (sanitarias y hospitalarias, transporte, etc.), equipos de aire acondicionado, alimentación, dental, pinturas, prendas de vestir, embalajes (alimentos, domésticos, farmacéuticos, dispositivos médicos, etc.).

Estado de la técnica

Son bien conocidas las propiedades antibacterianas de la plata en bajas concentraciones frente a una amplia gama de patógenos, incluidas las cepas de bacterias comunes causantes de las infecciones asociadas a implantes, así como su no toxicidad para células de mamíferos. La mayor parte de los biomateriales que contienen plata como sustancia antimicrobiana consisten en la forma elemental o catiónica del metal soportada tanto por matrices orgánicas como inorgánicas. Está estudiada la actividad antimicrobiana en los casos de polímeros y biovidrios que contienen plata, pero no es así en el caso de materiales compuestos nanoestructurados fosfato de calcio-plata.

Recientemente, se han publicado estudios sobre la obtención de compuestos de hidroxiapatita (HA) con Ag mediante métodos de intercambio iónico (sol-gel o coprecipitación) [Han I-H, Lee I-S, Song J-H, Lee M-H, Park J-C, Lee G-H, Sun X-D, Chung S-M. Characterization of a silver-incorporated calcium phosphate film by RBS and its antimicrobial effects. *Biomed. Mater.* 2007; 2(3): S91-4; Chen W, Oh S, Ong A P, Oh N, Liu Y, Courtney H S, Appleford M and Ong J L 2007 *J. Biomed. Mater. Res. A* 82 899; Cheng R J, Hsieh M F, Huang K C, Perng L H, Chou F I and Chin T S 2005 *Journal of Solid Science and Technology* 33 229; Rameshbabu N, Sampath Kumar T S, Prabhakar T G, Sastry V S, Murty K V G K and Prasad Rao K 2007 *J. Biomed. Mater. Res. A* 80 581]. Esas rutas implican la sustitución de calcio por plata, obteniéndose hidroxiapatita deficiente en calcio. La respuesta antimicrobiana ante estos materiales es buena, pero se ha observado que presentan dos desventajas principales: i) la deficiencia en calcio puede tener efectos negativos sobre la estabilidad estructural de las nanopartículas de HA, además de en su capacidad osteoconductor de la HA, y ii) dependiendo del pH, se puede producir una liberación de la plata más rápida de lo deseable. Esto último ha provocado un aumento del interés en las nanopartículas de plata como una fuente bactericida gracias a su baja solubilidad en medios acuosos.

La actividad biocida de las nanopartículas de plata está influenciada por el tamaño de las mismas: a menor tamaño, mayor actividad antimicrobiana, por lo que la aglomeración de las nanopartículas presenta un problema. Una solución para evitar esa desventaja es trabajar con las nanopartículas soportadas sobre la superficie de distintos sustratos.

Descripción de la invención

Descripción breve

Un objeto de la invención lo constituye un polvo nanocompuesto o nanoestructurado, en adelante polvo nanocompuesto de la invención, constituido por un fosfato cálcico, preferentemente con tamaño de partícula inferior a 150 nm y que tiene adherida en su superficie nanopartículas de Ag, preferentemente inferiores a 50 nm.

Un objeto particular de la invención lo constituye el polvo nanocompuesto en el que el fosfato cálcico pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: hidroxiapatita, α -TCP, β -TCP y/o mezclas de ellos, preferentemente hidroxiapatita (HA).

Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención del polvo nanocompuesto de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- a. Preparación del fosfato cálcico nanométrico a partir de una ruta de procesamiento sol-gel, y
- b. Deposición de nanopartículas de plata en la superficie del fosfato cálcico.

Otro objeto de la invención lo constituye el uso del polvo nanocompuesto de la invención en la elaboración de una composición bactericida y/o fungicida útil como desinfectante universal para aplicaciones pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, al siguiente grupo: implantes quirúrgicos, instalaciones de uso público -sanitarias y hospitalarias, transporte, etc.-, alimentación, dental, pinturas, prendas de vestir y embalajes -alimentos, farmacéuticos, dispositivos médicos.

Descripción detallada

En esta invención se describe un polvo nanoestructurado constituido por nanopartículas de HA, de tamaño inferior a 140 nm, con nanopartículas metálicas de Ag adheridas a la superficie y homogéneamente dispersas, con tamaño de partícula inferior a 50 nm (Figuras 1 y 2), con actividad bactericida y fungicida basado en fosfatos de calcio como

ES 2 341 749 A1

sustrato con nanopartículas de plata en su superficie. Asimismo, se presenta un procedimiento alternativo, sencillo y de bajo coste para la obtención de dicho material compuesto nanoestructurado, más concretamente a través de dos métodos diferentes (Ejemplo 1).

5 La primera ventaja que aporta la presente invención respecto al estado de la técnica actual lo constituye el hecho de que se evita la aglomeración de las nanopartículas por encontrarse adheridas a la superficie de un sustrato. La segunda ventaja es su eficiencia bactericida y fungicida, similar a la de productos comerciales (Ejemplo 2). La tercera ventaja es su baja toxicidad, puesta de manifiesto al comprobar que este material lixivia 2 órdenes de magnitud menos de plata en el caso de HA/Ag (<5 ppm) que en el caso de Vitelinato (aprox., 800-1300 ppm), lo que implica una toxicidad
10 muy inferior a la del producto comercial y muy por debajo del nivel tóxico (La cantidad de plata utilizada es del orden de 1% en peso), y con una eficacia similar (Ejemplo 2). Además, la liberación de la plata es mucho más lenta y controlada que en el caso de los materiales en los que el Ca se ha sustituido por Ag, como se ha podido comprobar por análisis cuantitativo de la plata lixiviada. Por tanto, dado el efecto sinérgico del calcio y la plata en el comportamiento bactericida y fungicida, este nuevo material puede ser utilizado como desinfectante universal.

15 Así, un objeto de la invención lo constituye un polvo nanocompuesto o nanoestructurado, en adelante polvo nanocompuesto de la invención, constituido por un fosfato cálcico, preferentemente con tamaño de partícula inferior a 150 nm y que tiene adherida en su superficie nanopartículas de Ag, preferentemente inferiores a 50 nm.

20 Un objeto particular de la invención lo constituye el polvo nanocompuesto en el que el fosfato cálcico pertenece, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la invención, al siguiente grupo: hidroxiapatita, α -TCP, β -TCP y/o mezclas de ellos, preferentemente hidroxiapatita (HA).

Otro objeto particular de la invención lo constituye el polvo nanocompuesto en el que el contenido en partículas
25 metálicas de plata está comprendido entre 0.01% y 8% en peso, siendo el porcentaje óptimo el 1% en peso de plata.

Otro objeto de la invención lo constituye un procedimiento de obtención del polvo nanocompuesto de la invención, en adelante procedimiento de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- 30 a. Preparación del fosfato cálcico nanométrico a partir de una ruta de procesamiento sol-gel, y
b. Deposición de nanopartículas de plata en la superficie del fosfato cálcico.

35 Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que en la etapa a) el fosfato cálcico se ha preparado mediante un procedimiento sol-gel, que comprende las siguientes etapas:

- 40 a) Preparación de las correspondientes disoluciones acuosas con la cantidad necesaria de trietil fosfito y nitrato cálcico para obtener en la mezcla final la relación molar Ca/P deseada, preferentemente 1.67 en el caso de la hidroxiapatita,
b) Goteo de la disolución con fósforo sobre la de calcio mientras se agita fuertemente, manteniendo condiciones controladas de temperatura y pH,
45 c) Agitación de la suspensión coloidal resultante y posterior envejecimiento a temperatura ambiente, preferentemente durante 24 horas, para formar un gel, y
d) Secado del gel en estufa de vacío hasta la eliminación completa del disolvente y calcinación a temperaturas comprendidas entre 500°C y 1000°C, preferentemente 550°C, para obtener el polvo de tamaño nanométrico y bien cristalizado.

50 Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que en la etapa b) comprende los siguientes pasos (Método 1):

- 55 a) Preparación de una suspensión acuosa con el polvo obtenido en 6, ajustando el pH a 5 y a la que se le añade un surfactante aniónico en baja concentración,
b) Adición, en ausencia de luz, de una disolución acuosa de la sal de plata precursora con la concentración necesaria para que el contenido de plata elemental esté comprendida entre el 0.01 y el 8% peso en el compuesto final, referido al contenido en sólidos de fosfato cálcico, preferentemente al 1% en peso de plata,
60 c) Agitación fuerte de la suspensión, ajustando el pH a 9, de modo que se precipitan cationes Ag^+ como óxido, Ag_2O ,
65 d) Filtrado, lavado con agua destilada y secado del polvo resultante, y
e) Reducción en atmósfera de H_2/Ar en el intervalo de temperaturas comprendido entre 150 y 500°C, preferentemente 350°C.

ES 2 341 749 A1

Otro objeto particular de la invención lo constituye el procedimiento de la invención en el que en la etapa b) comprende los siguientes pasos (Método 2):

- a) Preparación de una suspensión acuosa con el polvo de hidroxiapatita obtenido en 6 a la que se le añade un surfactante aniónico en baja concentración,
- b) Ajuste del pH a 7 con una disolución acuosa de NaOH 0.1 N,
- c) Aplicación de una sonda de ultrasonidos durante 1-10 minutos y completa homogeneización y disgregación en molino de bolas,
- d) Adición gota a gota de la cantidad necesaria de la disolución del precursor de plata, AgNO_3 , para obtener en el producto final una concentración de Ag^0 comprendida entre el 0.01 y el 8% peso en el compuesto final, manteniendo fuerte agitación durante 10 minutos, preferentemente al 1% en peso de plata,
- e) Reducción química *in situ* de la plata, utilizando cualquier agente reductor, preferentemente NaBH_4 , que se adiciona gota a gota a la dispersión manteniendo la agitación fuerte, y
- f) Filtrado, lavado con agua destilada y secado en estufa a 60°C.

Por último, otro objeto de la invención lo constituye el uso del polvo nanocompuesto de la invención en la elaboración de una composición bactericida y/o fungicida útil como desinfectante universal para aplicaciones pertenecientes, a título ilustrativo y sin que limite el alcance de la presente invención, al siguiente grupo: implantes quirúrgicos, instalaciones de uso público -sanitarias y hospitalarias, transporte, etc.-, alimentación, dental, pinturas, prendas de vestir y embalajes - alimentos, farmacéuticos, dispositivos médicos.

Descripción de figuras

Figura 1.- Micrografía obtenida por Microscopía Electrónica de Transmisión en la que se muestra la distribución homogénea de nanopartículas de plata menores de 20 nm adheridas a la superficie de una nanopartícula de hidroxiapatita de tamaño 140 nm, aproximadamente obtenidas mediante el método 1.

Figura 2.- Micrografía obtenida por Microscopía Electrónica de Transmisión en la que se muestra un polvo nanocompuesto obtenido por el método 2, donde se observa que las nanopartículas de Ag son menores de 15 nm.

Ejemplos de realización de la invención

Ejemplo 1

Procedimiento de obtención de los polvos nanocompuesto de la invención

A continuación se describe el procedimiento de obtención del polvo nanocompuesto de la invención que comprende dos etapas principales de preparación del fosfato cálcico nanométrico a partir de una ruta de procesamiento sol-gel, y de una deposición de nanopartículas de plata en la superficie del fosfato cálcico, y que a continuación se detallan.

1.1.- Síntesis de hidroxiapatita (HA) como fosfato de calcio

Los precursores utilizados para la síntesis de HA utilizados fueron trietilfosfito (98%, Aldrich) y nitrato cálcico tetrahidratado ($\geq 99\%$, Fluka). El procedimiento seguido es el que se detalla a continuación:

1.- Se preparan las correspondientes disoluciones acuosas con la cantidad necesaria de estos precursores para obtener en la mezcla final una relación molar Ca/P de 1.67,

2.- La disolución de trietilfosfito se añade gota a gota sobre la de calcio mientras se agita fuertemente, manteniendo condiciones controladas de temperatura y pH,

3.- La suspensión coloidal resultante se mantiene en agitación y, después de un envejecimiento a temperatura ambiente de 24 h, forma un gel, y

4.- El gel resultante se seca en estufa a vacío hasta la eliminación completa del disolvente. Se calcina a 550°C, obteniendo un polvo de hidroxiapatita de tamaño nanométrico y bien cristalizado con un tamaño menor de 150 nm.

1.2.- Procedimiento de deposición de plata sobre las nanopartículas de HA

A partir de este punto, los polvos nanoestructurados de la invención se obtuvieron a través de dos métodos diferentes.

ES 2 341 749 A1

Método 1

Tras la síntesis de nanopartículas de HA por el método sol-gel y posterior calcinación, se produce la deposición de óxido de plata a partir de un precursor (por ejemplo, nitrato de plata) sobre HA dispersado en agua con la cantidad óptima de surfactante. A continuación, se procede a la reducción del catión Ag^+ a Ag^0 en horno en atmósfera de Ar/H_2 , tal y como se detalla a continuación:

a) Se prepara una suspensión acuosa con el polvo de hidroxiapatita obtenido en 1.1. Se ajusta el pH a 5 en agitación. Para conseguir una mejor dispersión de la hidroxiapatita se introduce un surfactante aniónico en baja concentración como dispersante (1% en peso respecto a la concentración en sólidos de hidroxiapatita);

b) Se añade, protegiendo de la luz, una disolución acuosa de la sal de plata precursora con la concentración necesaria para que el contenido de plata elemental esté comprendida entre el 0.01 y el 8% peso en el compuesto final HA-Ag (referido al contenido en sólidos de HA);

c) Mientras se agita fuertemente la suspensión, se ajusta el pH a 9, de modo que se precipitan cationes Ag^+ como óxido, Ag_2O , y

d) Tras filtrado y lavado, se seca y reduce en atmósfera de $\text{Ar}/10\%\text{H}_2$ en el intervalo de temperaturas comprendido entre 150 y 500°C.

Se obtuvo así un polvo nanocompuesto con nanopartículas de plata menores de 20 nm adheridas a la superficie de una nanopartícula de hidroxiapatita de tamaño 140 nm, aproximadamente, con una distribución homogénea.

Método 2

Tras la síntesis de nanopartículas de HA por el método sol-gel y posterior calcinación, se produce la deposición de nanopartículas de plata, Ag^0 , sobre hidroxiapatita a partir de un precursor de plata dispersado en agua en condiciones de pH y dispersante óptimas. La reducción se realiza *in situ* con un agente reductor a temperatura ambiente.

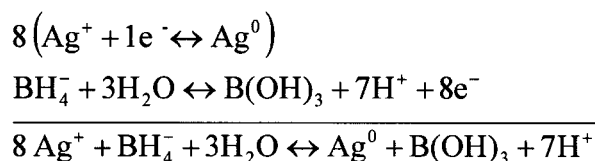
a) Se prepara una suspensión acuosa con el polvo de hidroxiapatita obtenido. Para conseguir una mejor dispersión de la hidroxiapatita se introduce un surfactante aniónico en baja concentración como dispersante (*Dolapix*);

b) Se ajusta el pH a 7 con una disolución acuosa de NaOH 0.1 N para conseguir una buena dispersión de las partículas de HA y evitar, al mismo tiempo, la precipitación de los iones Ag^+ como Ag_2O , que se produce a valores de pH por encima de 8;

c) Sonda de ultrasonidos de 1-10 minutos. Homogeneización y disgregación en molino de bolas;

d) Para obtener en el producto final una concentración de Ag^0 comprendida entre el 0.01 y el 8% peso en el compuesto final HA-Ag, se añade la cantidad necesaria de precursor, AgNO_3 . Una vez añadido gota a gota sobre la dispersión de HA, se deja agitando fuertemente 10 min antes de iniciar el siguiente paso. Este proceso es necesario hacerlo protegiendo de la luz la disolución con el precursor y la dispersión una vez añadido el precursor;

e) La reducción de la plata se realiza químicamente *in situ*, usando como agente reductor, por ejemplo, NaBH_4 , que reacciona con la plata en la relación molar 1:8 ($\text{NaBH}_4:\text{Ag}^+$), según las reacciones:



f) Se procede a la deposición gota a gota de la disolución de NaBH_4 sobre la dispersión; y

g) Se agita fuertemente, se procede a su filtrado, lavado con agua destilada y, por último, secado en estufa a 60°C.

Se obtuvo así un polvo nanocompuesto de la invención, donde se observa que las nanopartículas de Ag son menores de 15 nm.

Ejemplo 2

Ensayos de actividad biocida y lixiviado de los polvos nanocompuestos de la invención

5 Se realizaron tests bactericidas para investigar el efecto de las muestras que contenían plata sobre diferentes organismos: *Escherichia coli* JM 110 (Gram-negative bacteria), *Micrococcus luteus* (Gram-positive bacteria) e *Issatchenkia orientalis* (levadura). Los microorganismos se sembraron en medio sólido, placas Petri, de Luria Bertani (LB) (conteniendo: triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, CINa 1%, agar 1.5%) para *E. coli* JM110 y *M. luteus* ó Yeast Extract Destrosa (YEPD) (conteniendo: Extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%). Las placas se incubaron 24 horas a 37°C. A continuación, colonias aisladas de las placas anteriores de cada microorganismo se inocularon en 5 mL de LB (bacterias) ó YEPD (levadura) y se cultivaron a 37°C durante 5 horas para obtener los pre-cultivos. Paralelamente se prepararon suspensiones de 200 mg/ml (peso/peso) en agua de las preparaciones M1 y M2, conteniendo 1% de plata. Finalmente 10 µL de cada uno de los precultivos de los microorganismos se inocularon a 1 mL de LB o YEPD, según el microorganismo. A los cultivos se añadieron 150 µL de las muestras de HA/nAg (M1 y M2) resultando en una concentración final de 0.13% en peso de Ag. Asimismo, se prepararon como control muestras sin plata, consistentes en una mezcla de agua más el correspondiente nutriente. Los cultivos se incubaron a 37°C en agitación y se tomaron alícuotas de los distintos cultivos para el conteo de viables tras diluciones seriadas de los distintos cultivos.

2.1.- *Test biocida realizado con Micrococcus luteus*

20 Se preparó una suspensión acuosa (9% peso de sólidos) con el polvo de HA obtenido por el método 1 (se utilizó como precursor de plata AgNO₃, siendo el contenido en plata en el compuesto final, HA-Ag, de 1% peso (referido al contenido en sólidos de HA)). El test realizado con *Micrococcus luteus* muestra un título a las 24 horas <1.0·10⁴, mientras que el control es 3.0·10⁹.

25 Al cabo de 72 horas, la concentración de calcio lixiviado en el medio de cultivo se encontró en el rango 15-30 ppm. La concentración de plata fue <5 ppm. Igualmente, se probó a inocular la misma concentración de plata de partida a partir de Vitelinato de plata nanoestructurada comercial (*Argenol*, tamaño de partícula menor de 20 nm); observándose que se lixivieron 1300 ppm de plata, aproximadamente.

2.2.- *Test biocida realizado con Escherichia coli*

30 Se preparó una suspensión acuosa (9% peso de sólidos) con el polvo de HA obtenido por el método 1 (se utilizó como precursor de plata AgNO₃, siendo el contenido en plata en el compuesto final, HA-Ag, de 1% peso (referido al contenido en sólidos de HA)). El test realizado con *Escherichia coli* JM 110 muestra un título a las 24 horas <1.0·10⁴, mientras que el control es 1.4·10¹¹.

35 Al cabo de 72 horas, la concentración de calcio lixiviado en el medio de cultivo se encontró en el rango 15-30 ppm. La concentración de plata fue <5 ppm. Igualmente, se probó a inocular la misma concentración de plata de partida a partir de Vitelinato de plata nanoestructurada comercial (*Argenol*, tamaño de partícula menor de 20 nm); observándose que se lixivieron 900 ppm, aproximadamente.

2.3.- *Test biocida realizado con Issatchenkia orientalis*

40 Se preparó una suspensión acuosa (9% peso de sólidos) con el polvo de HA obtenido por el método 2 (se utilizó como precursor de plata AgNO₃, siendo el contenido en plata en el compuesto final, HA-Ag, de 1% peso (referido al contenido en sólidos de HA)). El test bactericida realizado con *Issatchenkia orientalis* mostró un título a las 24 horas de 1.0·10⁴, mientras que el control es 1.2·10¹¹.

45 Al cabo de 72 horas, la concentración de calcio lixiviado en el medio de cultivo se encontró en el rango 15-30 ppm. La concentración de plata fue <5 ppm. En paralelo, se inoculó la misma concentración de plata de partida a partir de Vitelinato de plata nanoestructurada comercial (*Argenol*, tamaño de partícula menor de 20 nm); observándose que lixivieron 800 ppm de plata, aproximadamente.

2.4.- *Test biocida realizado con Micrococcus luteus*

50 Se preparó una suspensión acuosa (9% peso de sólidos) con el polvo de HA obtenido por el método 2 (se utilizó como precursor de plata AgNO₃, siendo el contenido en plata en el compuesto final, HA-Ag, de 1% peso (referido al contenido en sólidos de HA)). El test realizado con *Micrococcus luteus* muestra un título a las 24 horas 4.0·10⁴, mientras que el control es 3.0·10⁹.

55 Al cabo de 72 horas, la concentración de calcio lixiviado en el medio de cultivo se encontró en el rango 15-30 ppm. La concentración de plata fue <5 ppm. Igualmente, se probó a inocular la misma concentración de plata de partida a partir de Vitelinato de plata nanoestructurada comercial (*Argenol*, tamaño de partícula menor de 20 nm); observándose que se lixivieron 900 ppm, aproximadamente.

ES 2 341 749 A1

2.5.- Test biocida realizado con *Escherichia coli* JM 110

Se preparó una suspensión acuosa (9% peso de sólidos) con el polvo de HA obtenido por el método 2 (se utilizó como precursor de plata AgNO_3 , siendo el contenido en plata en el compuesto final, HA-Ag, de 1% peso (referido al contenido en sólidos de HA)). El test realizado con *Escherichia coli* JM 110 muestra un título a las 24 horas $<1.0 \cdot 10^4$, mientras que el control es $1.4 \cdot 10^{11}$.

Al cabo de 72 horas, la concentración de calcio lixiviado en el medio de cultivo se encontró en el rango 15-30 ppm. La concentración de plata fue <5 ppm. Igualmente, se probó a inocular la misma concentración de plata de partida a partir de Vitelinato de plata nanoestructurada comercial (*Argenol*, tamaño de partícula menor de 20 nm); observándose que se lixiviaron 1300 ppm, aproximadamente.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

5 1. Polvo nanocompuesto **caracterizado** porque está constituido por un fosfato cálcico, preferentemente con tamaño de partícula inferior a 150 nm y que tiene adherida en su superficie nanopartículas de Ag, preferentemente inferiores a 50 nm.

2. Polvo nanocompuesto según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el fosfato cálcico pertenece al siguiente grupo: hidroxiapatita, α -TCP, β -TCP y/o mezclas de ellos.

10 3. Polvo nanocompuesto según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el fosfato cálcico es hidroxiapatita (HA).

4. Polvo nanocompuesto según la reivindicación 1 **caracterizado** porque el contenido en partículas metálicas de plata está comprendido entre 0.01% y 8% en peso, preferentemente el 1% en peso de plata.

15 5. Procedimiento de obtención del polvo nanocompuesto según las reivindicaciones 1 a la 4 **caracterizado** porque comprende las siguientes etapas:

a) Preparación del fosfato cálcico nanométrico a partir de una ruta de procesamiento sol-gel, y

20 b) Deposición de nanopartículas de plata en la superficie del fosfato cálcico.

25 6. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque en la etapa a) el fosfato cálcico se ha preparado mediante un procedimiento sol-gel, que comprende los siguientes pasos:

a) Preparación de las correspondientes disoluciones acuosas con la cantidad necesaria de trietil fosfito y nitrato cálcico para obtener en la mezcla final la relación molar Ca/P deseada, preferentemente 1.67 en el caso de la hidroxiapatita,

30 b) Goteo de la disolución con fósforo sobre la de calcio mientras se agita fuertemente, manteniendo condiciones controladas de temperatura y pH,

35 c) Agitación de la suspensión coloidal resultante y posterior envejecimiento a temperatura ambiente, preferentemente durante 24 horas, para formar un gel, y

d) Secado del gel en estufa de vacío hasta la eliminación completa del disolvente y calcinación a temperaturas comprendidas entre 500°C y 1000°C, preferentemente 550°C, para obtener el polvo de tamaño nanométrico y bien cristalizado.

40 7. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque en la etapa b) comprende los siguientes pasos:

45 a. Preparación de una suspensión acuosa con el polvo obtenido en 6, ajustando el pH a 5 y a la que se le añade un surfactante aniónico en baja concentración,

b. Adición, en ausencia de luz, de una disolución acuosa de la sal de plata precursora con la concentración necesaria para que el contenido de plata elemental esté comprendida entre el 0.01 y el 8% peso en el compuesto final, referido al contenido en sólidos de fosfato cálcico, preferentemente al 1% en peso de plata,

50 c. Agitación fuerte de la suspensión, ajustando el pH a 9, de modo que se precipitan cationes Ag⁺ como óxido, Ag₂O,

55 d. Filtrado, lavado con agua destilada y secado del polvo resultante, y

e. Reducción en atmósfera de H₂/Ar en el intervalo de temperaturas comprendido entre 150 y 500°C, preferentemente 350°C.

60 8. Procedimiento según la reivindicación 5 **caracterizado** porque en la etapa b) comprende los siguientes pasos:

a) Preparación de una suspensión acuosa con el polvo de hidroxiapatita obtenido en 6 a la que se le añade un surfactante aniónico en baja concentración,

65 b) Ajuste del pH a 7 con una disolución acuosa de NaOH 0.1 N,

ES 2 341 749 A1

c) Aplicación de una sonda de ultrasonidos durante 1-10 minutos y completa homogeneización y disgregación en molino de bolas,

5 d) Adición gota a gota de la cantidad necesaria de la disolución del precursor de plata, AgNO_3 , para obtener en el producto final una concentración de Ag^0 comprendida entre el 0.01 y el 8% peso en el compuesto final, manteniendo fuerte agitación durante 10 minutos, preferentemente al 1% en peso de plata,

10 e) Reducción química *in situ* de la plata, utilizando cualquier agente reductor, preferentemente NaBH_4 , que se adiciona gota a gota a la dispersión manteniendo la agitación fuerte, y

f) Filtrado, lavado con agua destilada y secado en estufa a 60°C .

15 9. Uso del polvo nanocompuesto según la reivindicaciones 1 a la 4 en la elaboración de una composición bactericida y/o fungicida útil como desinfectante para aplicaciones pertenecientes al siguiente grupo: implantes quirúrgicos, instalaciones de uso público -sanitarias y hospitalarias, transporte, etc-, alimentación, dental, pinturas, prendas de vestir y embalajes -alimentos, farmacéuticos, dispositivos médicos.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

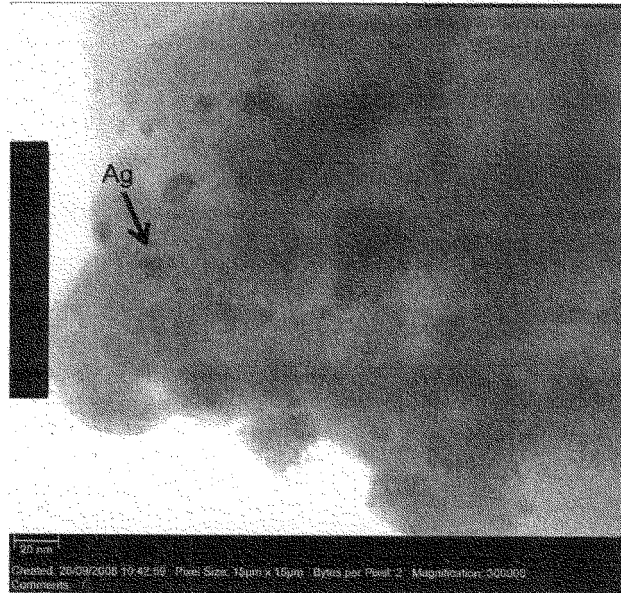


FIG. 1

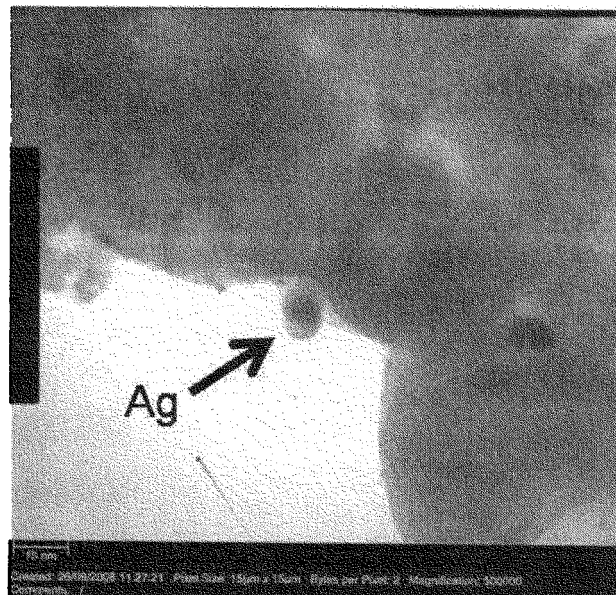


FIG. 2



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

① ES 2 341 749

② N° de solicitud: 200803695

③ Fecha de presentación de la solicitud: 24.12.2008

④ Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑤ Int. Cl.: Ver hoja adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
P,X	DIAZ, M., et al., Synthesis and antimicrobial activity of a silver-hydroxyapatite nanocomposite, Journal of Nanomaterials, 2009, artículo ID 498505, 6 páginas. Todo el documento.	1-9
P,X	ICHIKAWA, Y., et al., Hybridization of silver nanoparticles on hydroxyapatite in an aqueous solution, Journal of the Ceramic Society of Japan, 2009, Vol. 117, págs. 294-298. Todo el documento.	1-4,9
X	LIU, J.-K., et al., Preparation of silver/hydroxyapatite nanocomposite spheres, Powder Technology, 2008, Vol. 184, págs. 21-24. Todo el documento.	1-4,9
A	BERA, T., et al., Morphological changes in biomimetically synthesized hydroxyapatite and silver nanoparticles for medical applications, Journal of Materials Science (2009), 44(9), 2264-2270, publicado en línea el 05.09.2008.	1-9
A	FERRAZ, M.P., et al., Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies, Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics, 2004, Vol. 2, págs.74-80.	1-9
A	ARUMUGAN, S.K., et al., One step synthesis of silver nanorods by autoreduction of aqueous silver ions with hydroxyapatite: an inorganic-inorganic hybrid nanocomposite, Journal of Biomedical Research part A, 2006, Vol. 80, págs. 391-398.	1-9

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

19.05.2010

Examinador

M. García Poza

Página

1/4

CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

B22F 9/24 (2006.01)
B22F 1/00 (2006.01)
C01B 25/32 (2006.01)
B82B 1/00 (2006.01)
B82B 3/00 (2006.01)
A01N 59/26 (2006.01)
A01N 25/12 (2006.01)

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

B22F, C01B, B82B, A01N

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

INVENES, EPODOC, WPI, CAPLUS, XPESP, NPL

Fecha de Realización de la Opinión Escrita: 19.05.2010

Declaración

Novedad (Art. 6.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	5-8	SÍ
	Reivindicaciones	1-4,9	NO
Actividad inventiva (Art. 8.1 LP 11/1986)	Reivindicaciones	5-8	SÍ
	Reivindicaciones	1-4,9	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 ha sido publicada.

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	LIU, Powder Technology	2008

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 invención se refiere a un polvo nanocompuesto de fosfato cálcico con nanopartículas de plata, a su procedimiento de preparación y a su uso.

- Novedad (Art. 6.1 LP):

El documento D01 divulga un polvo nanocompuesto de hidroxiapatita con nanopartículas de plata, en su superficie, de 5,5 a 8,5 nanómetros de diámetro, en el que la concentración de las nanopartículas de plata es menor del 5% (resumen; apartados: "3.Results and discussion", "4.Conclusion"; figs. 4 a 7). Este documento divulga también el uso de este polvo como bactericida y desinfectante (apartados: "1.Introduction" y "4.Conclusion").

Por lo tanto, a la vista del estado de la técnica el polvo nanocompuesto de la invención, recogido en las reivindicaciones 1 a 4, y su uso, recogido en la reivindicación 9, carecen de novedad.

Con respecto al procedimiento de preparación del polvo nanocompuesto, recogido en las reivindicaciones 5 a 8, no se ha encontrado divulgado en el estado de la técnica un procedimiento que comprenda las etapas de: a) preparar el fosfato cálcico nanométrico a partir de una ruta de procesamiento sol-gel y b) depositar las nanopartículas de plata en la superficie del fosfato cálcico. Tampoco sería obvio para el experto en la materia llegar a este procedimiento a partir del estado de la técnica. Por lo tanto, se considera que el objeto de la invención recogido en las reivindicaciones 4 a 8 es nuevo y tiene actividad inventiva (Arts. 6.1 y 8.1 LP).