

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 958 909**

21 Número de solicitud: 202230668

51 Int. Cl.:

C08K 5/17 (2006.01)
C08K 3/015 (2008.01)
C08L 33/08 (2006.01)
C08L 5/08 (2006.01)
A01N 25/10 (2006.01)
A01N 43/16 (2006.01)
C01B 21/06 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

20.07.2022

43 Fecha de publicación de la solicitud:

16.02.2024

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
Ctt-Otri- Casa del Estudiante
C/ Real de Burgos, s/n
47001 Valladolid (Valladolid) ES

72 Inventor/es:

SÁNCHEZ HERNÁNDEZ, Eva;
SANTIAGO ALISTE, Alberto;
MARTÍN GIL, Jesús y
MARTÍN RAMOS, Pablo

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

54 Título: **NANOMATERIAL BASADO EN EL AUTOENSAMBLAJE DE g-C₃N₄ Y OLIGÓMEROS DE QUITOSANO, PROCESO DE OBTENCIÓN Y USOS**

57 Resumen:

Nanomaterial basado en el autoensamblaje de g-C₃N₄ y oligómeros de quitosano, proceso de obtención y usos.

El objeto de la invención es un nanomaterial que comprende un autoensamblaje de: (a) g-C₃N₄ puro o dopado con al menos un óxido metálico y/o nanoplata; y (b) oligómeros de quitosano que comprenden entre 5 y 10 monómeros, también denominados quito-oligosacáridos (COS) de bajo peso molecular, entendiéndose como tal un peso molecular comprendido entre 3000 y 6000 Da, donde dicho autoensamblaje está mediado mediante un agente de entrecruzamiento, dando lugar a un complejo de inclusión g-C₃N₄-COS. Es también objeto de la invención su proceso de obtención y su uso para la depuración de aguas y/o como fitosanitario.

ES 2 958 909 A1

DESCRIPCIÓN

NANOMATERIAL BASADO EN EL AUTOENSAMBLAJE DE $g-C_3N_4$ Y OLIGÓMEROS DE QUITOSANO, PROCESO DE OBTENCIÓN Y USOS

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención describe un nuevo nanomaterial polimérico, en forma de film, nanogel o polvo, capaz de actuar como agente polivalente y selectivo en remediación ambiental y gestión integrada de plagas.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La contaminación del agua provocada por tóxicos industriales, estrógenos, herbicidas, pesticidas, patógenos, antibióticos y otros componentes deletéreos plantea una amenaza grave para la salud humana y debe ser objetivo de remedio (Yang, X. et al., "*Recent advances in $g-C_3N_4$ -based photocatalysts for pollutant degradation and bacterial disinfection: Design strategies, mechanisms and applications*", Small 2021, 18). Dicho remedio puede acometerse por procedimientos que incluyen, entre otros, el encapsulado, el transporte y la fotólisis.

15

20

Las técnicas convencionales de desinfección del agua hacen uso de la oxidación química (empleando cloro, dióxido de cloro, cloraminas y ozono) para controlar eficazmente los microorganismos patógenos transmitidos por el agua. Sin embargo, existe un dilema entre la eficiencia de la desinfección y la formación de subproductos dañinos. Además, los desafíos operativos de estas sustancias corrosivas en los procesos de generación, transporte y almacenamiento plantean serias preocupaciones. Actualmente, las empresas de potabilización de aguas están utilizando la desinfección UV para superar las limitaciones anteriores. No obstante, la irradiación UV para la desinfección es más costosa e intensiva en energía en comparación con la oxidación química, y el proceso es menos eficaz para los patógenos resistentes a los rayos UV. Además, no se puede mantener ningún desinfectante residual después de la desinfección UV. Por ello, existe una necesidad de desarrollar técnicas de desinfección de aguas fáciles, estables, ecológicas y sostenibles, de bajo coste y alta eficiencia.

25

30

35

Por otro lado, las enfermedades asociadas a hongos fitopatógenos son responsables de importantes pérdidas económicas, afectando a los principales cultivos herbáceos y leñosos.

5

El método convencional para proteger los cultivos y mitigar los efectos de fitopatógenos se basa en recurrir a la pulverización (en muchos casos inespecífica) de pesticidas químicos. No obstante, los efectos deletéreos de estos productos sobre la salud humana y su impacto ambiental están conduciendo a su progresiva prohibición y hacen imprescindible la búsqueda de alternativas.

10

Una opción prometedora para la protección de cultivos leñosos frente a fitopatógenos es el uso de la nanotecnología. Los nanosistemas (como los nanotransportadores o *nanocarriers*) permiten aumentar la producción y calidad de la agricultura intensiva, disminuyendo las pérdidas económicas ocasionadas por los patógenos, pero con un impacto sobre la salud y el medio ambiente mucho menor, debido a la disminución drástica del uso de agroquímicos de síntesis.

15

En la presente invención se describe por primera vez un nuevo complejo formado por el autoensamblaje de: $g-C_3N_4$ puro o dopado con óxidos metálicos o nanoplata, un agente de entrecruzamiento (preferentemente anhídrido metacrílico (AM)) y oligómeros de quitosano (COS) de bajo peso molecular.

20

El nitruro de carbono gráfico ($g-C_3N_4$) es un fotocatalizador polimérico sensible a la luz visible que se ha convertido en un material importante en Química, Física e Ingeniería debido a sus métodos de preparación sencillos, económicos y respetuosos con el medio ambiente, con una estabilidad prometedora y buenas propiedades fisicoquímicas para su uso en una amplia gama de aplicaciones. Así, por ejemplo, se ha demostrado su eficacia en la degradación de contaminantes orgánicos, la desinfección del agua y el control bacteriano. El $g-C_3N_4$ se puede sintetizar fácilmente mediante varios métodos, obteniéndose un material con estructuras eléctricas y morfologías deseables y una alta estabilidad térmica de hasta 600 °C en el aire (Liu, X. et al., "Recent developments of doped $g-C_3N_4$ photocatalysts for the degradation of organic pollutants", Critical Reviews in Environmental Science and Technology 2020, 51, 751-790).

25

30

35

Los precursores más comunes utilizados para preparar $g\text{-C}_3\text{N}_4$ son: melamina, dicianidamida, cianamida, urea, tiourea y tiocianato de amonio. Con el fin de mejorar su rendimiento y modular sus propiedades, existen diferentes métodos, como el
5 dopado con óxidos metálicos, sulfuros metálicos, metales nobles y nanomateriales carbonosos (Ismael, M., “A review on graphitic carbon nitride ($g\text{-C}_3\text{N}_4$) based nanocomposites: Synthesis, categories, and their application in photocatalysis”, Journal of Alloys and Compounds 2020, 846, 156446). Entre las opciones anteriores, el empleo de óxidos metálicos es la más habitual para mejorar la eficiencia del $g\text{-C}_3\text{N}_4$, por ejemplo, aumentando su absorción de luz en el rango visible y reduciendo
10 la recombinación de electrones y huecos al promover la separación de los portadores de carga.

Por otra parte, el quitosano es un polisacárido lineal compuesto por $\beta\text{-(1-4)-D}$ -glucosamina (unidades desacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidades acetiladas). El quitosano proviene de la desacetilización de la quitina, componente estructural de las paredes celulares de hongos, del exoesqueleto de artrópodos y de componentes de otros organismos invertebrados. El quitosano y sus derivados son
15 polímeros de origen natural que han sido objeto de un gran interés en las últimas décadas, especialmente por su actividad antimicrobiana y sus características de biocompatibilidad, no toxicidad y biodegradabilidad. Mediante diferentes métodos de degradación, se pueden romper los enlaces O-glucosídicos entre cada molécula de glucosamina para generar cadenas más pequeñas u oligómeros de 5 a 10 monómeros (oligómeros de quitosano, COS), que son más reactivos que el
20 quitosano de alto peso molecular.

Frente a las alternativas conocidas del estado de la técnica, el nuevo nanomaterial polimérico desarrollado puede emplearse tanto en forma de film, como de nanogel o polvo, siendo capaz de actuar como agente polivalente y selectivo en remediación
30 ambiental y gestión integrada de plagas, como –por ejemplo– en: (i) control biológico (bacterias, virus y microalgas); (ii) captura, inactivación y eliminación de elementos radioactivos o contaminantes tóxicos; (iii) depuración y mejora de la calidad de aguas residuales; y (iv) realización de tratamientos fitosanitarios en cultivos agroforestales, al ser capaz de transportar de manera segura y eficaz compuestos bioactivos, tanto
35 naturales como de síntesis.

Se ha demostrado también que el nuevo nanomaterial desarrollado presenta una mayor actividad que la obtenida en caso de utilizar los componentes por separado. Adicionalmente, es de destacar que ofrece una nueva aplicación a los compuestos empleados para su síntesis como –por ejemplo– los COS, ampliamente usados como antimicrobianos. Asimismo, permite englobar principios bioactivos en el interior de la estructura del nanomaterial, como –por ejemplo– agentes bioactivos naturales, aptos para su uso en agricultura ecológica o convencional.

10 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

De este modo, es un primer objeto de la invención un nanomaterial caracterizado porque comprende un autoensamblaje de:

- g-C₃N₄ puro o preferentemente dopado con al menos un óxido metálico (preferentemente TiO₂) y/o nanoplata (partículas de plata de tamaño nanométrico), mejorando así (con la presencia del agente de dopado) el comportamiento del g-C₃N₄, al incrementar su *bandgap* (banda prohibida o brecha energética); y
- oligómeros de quitosano (de entre 5 y 10 monómeros) o quito-oligosacáridos (COS) de bajo peso molecular, entendiéndose como tal un peso molecular comprendido entre 3000 y 6000 Da,

donde dicho autoensamblaje está mediado mediante un agente de entrecruzamiento, preferentemente anhídrido metacrílico (AM), dando lugar a un complejo de inclusión g-C₃N₄-COS, pudiendo presentarse en forma de film, nanogel o polvo con un tamaño de nanopartícula que puede variar entre 100 y 300 nm, y preferentemente con un tamaño promedio de 200 nm.

Como alternativa al anhídrido metacrílico, podrían emplearse también otros agentes de entrecruzamiento, como por ejemplo el polimetilmetacrilato (PMMA) o la epiclohidrina.

En una realización particular de la invención, la relación molar del g-C₃N₄ y los quito-oligosacáridos (COS) en el nanomaterial reivindicado podrá variar entre 1:1 y 0,5:1.

De manera particular, el nanomaterial reivindicado podrá comprender adicionalmente

al menos un compuesto bioactivo (CBA) que interacciona con el compuesto reticulado por enlaces iónicos o de hidrógeno, dando lugar a un segundo complejo de inclusión, preferentemente con una relación molar g-C₃N₄:COS:CBA de 0,5:1:0,5 a 1:1:1. De manera preferente, dicho CBA puede consistir en un compuesto con actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos. Preferentemente, puede consistir en un compuesto agroquímico de síntesis (por ejemplo, estrobilurinas como la azoxistrobina o la piraclostrobina, triazoles como el tebuconazol, o carboxamidas como el boscalid, entre otros) o un agente natural, preferentemente seleccionado de un grupo que consiste en un polifenol, un terpeno, un aceite terpénico, un carotenoide, un ácido graso, un aceite, un lignano, un cumestato, un prebiótico, una vitamina y una xantofila, así como cualquiera de sus combinaciones. Más preferentemente, el CBA puede tratarse de un polifenol o una mezcla de polifenoles.

En una realización particular de la invención, dicho compuesto bioactivo puede consistir en un extracto natural de *Rubia tinctorum* (RT) u otras sustancias básicas conforme al Artículo 83 del Reglamento (CE) nº 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, referidas en la Parte C del Anexo al Reglamento 540/2011.

De manera preferente, el CBA seleccionado para ser encapsulado en el complejo de inclusión g-C₃N₄-COS tendrá al menos un grupo funcional con capacidad de unirse a la matriz formada por g-C₃N₄ y COS, bien por enlace iónico o, más preferentemente, por enlace de hidrógeno.

Como principales ventajas del nanomaterial desarrollado cabe destacar las siguientes:

1. el complejo g-C₃N₄-COS es un sistema de alta versatilidad, en tanto en cuanto reúne características de nanotransportador (encapsulante) y de fotocatalizador (en superficie);
2. el nuevo material incluye por primera vez el enlazamiento, mediado por un agente de entrecruzamiento (preferentemente anhídrido metacrílico), de g-C₃N₄ y COS, confiriendo a la entidad g-C₃N₄-COS propiedades inéditas, especialmente la reticulación. La reticulación entre el g-C₃N₄ y los COS, creada por la incorporación del agente de entrecruzamiento (preferentemente anhídrido metacrílico), confiere al material capacidad encapsulante (o de albergar productos activos en su interior);

3. el nuevo nanomaterial es susceptible de mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos cuyo encapsulado y transporte interese, sin necesidad de incorporar surfactantes u otros compuestos químicos usualmente utilizados;
- 5 4. adicionalmente, permite albergar en su interior agentes terapéuticos que cumplan con el Artículo 83 del Reglamento (CE) nº 1107/2009 y sean aptos para agricultura ecológica;
- 10 5. finalmente, el enlazamiento del g-C₃N₄ y los quito-oligosacáridos (COS) por un agente de entrecruzamiento (preferentemente AM) posee características de enlazamiento débil, lo cual confiere al complejo la capacidad adecuada de liberación de los compuestos biológicamente activos (CBA) que pueden incorporarse en el mismo.

Adicionalmente, es objeto de la invención el método de obtención de dicho nanomaterial. Dicho método puede comprender las siguientes etapas:

- 15 • Etapa 1: preparar una disolución de quitosano de alto peso molecular (entendiendo como tal un peso molecular comprendido entre 310000 y 375000 Da) en agua destilada, con una concentración de entre un 2% y un 5% en peso respecto al volumen total, añadiendo asimismo entre un 70% y un 90% en peso de ácido acético o ácido cítrico (preferentemente de alta pureza, superior al 20 98%) con agitación constante a una temperatura de entre 30 y 60 °C. Una vez obtenida la disolución, se añade neutrasa, preferentemente en un porcentaje comprendido entre un 30% y un 40% en peso, dando lugar a una disolución de COS de bajo peso molecular, entendiéndose como tal un peso molecular 25 comprendido entre 3000 y 6000 Da. De manera preferente, esta etapa se puede llevar a cabo manteniendo la temperatura entre 30 y 60 °C y aplicando ultrasonidos con una frecuencia de entre 10 y 20 kHz de manera intermitente (preferentemente en ciclos con sonicación de entre 10 y 15 minutos, con paradas entre ciclos de entre 5 y 10 minutos),
- 30 • Etapa 2: sintetizar un hidrogel de oligómeros de quitosano modificados mediante un agente de entrecruzamiento (preferentemente anhídrido metacrílico). Para ello, se procede a la adición del agente de entrecruzamiento a la disolución de COS obtenida en la etapa anterior, preferentemente en un porcentaje comprendido entre un 70% y un 80% en peso respecto al volumen 35 total de la disolución, en presencia preferentemente de tetrahidrofurano (o,

alternativamente, dioxano o diclorometano), preferentemente en un porcentaje comprendido entre un 20% y un 30% en peso respecto al volumen total de la disolución. De manera preferente, el proceso de síntesis se llevará a cabo mediante el procedimiento descrito en Gupta, B.; Gupta, A.K., *“Photocatalytic performance of 3D engineered chitosan hydrogels embedded with sulfur-doped C₃N₄/ZnO nanoparticles for Ciprofloxacin removal: Degradation and mechanistic pathways”*, International Journal of Biological Macromolecules, 2022, 198, 87-100, con dos modificaciones importantes: en lugar de usar quitosano se emplearán oligómeros de quitosano y, en lugar de epiclorohidrina como agente de entrecruzamiento, se empleará preferentemente anhídrido metacrílico. La adición del agente de entrecruzamiento modifica los grupos hidroxilo de la estructura de los COS, de forma que estos quedan disponibles para su interacción con grupos funcionales de los CBA susceptibles de encapsulación. Adicionalmente, los COS presentan gran cantidad de grupos funcionales, como el hidroxilo y el amino, y pueden ser considerados policationes, ya que poseen una alta densidad de cargas positivas, siendo por tanto activos para interactuar con compuestos de carga negativa. De manera preferente, esta etapa se puede llevar a cabo a una temperatura comprendida entre 30 y 60 °C y aplicando ultrasonidos con una frecuencia de entre 10 y 20 kHz de manera intermitente (preferentemente alternando ciclos con sonicación de entre 10 e 15 minutos, con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos);

- Etapa 3: sintetizar una forma porosa de g-C₃N₄ (puro o dopado) modificado mediante un agente de entrecruzamiento (preferentemente anhídrido metacrílico), siendo su morfología próxima a la de los nanotubos de carbono, mediante la reacción de g-C₃N₄ puro o dopado, preferentemente en un porcentaje comprendido entre un 84,5% y un 90% en peso, con un agente de entrecruzamiento (preferentemente anhídrido metacrílico), preferentemente en un porcentaje comprendido entre un 0,5% y un 1% en peso, en presencia de tetrahidrofurano (o, alternativamente, dioxano o diclorometano), preferentemente en un porcentaje comprendido entre un 9% y un 15% en peso. De manera preferente, esta etapa se llevará a cabo a una temperatura comprendida entre 30 y 60 °C, aplicando ultrasonidos con una frecuencia de entre 10 y 20 kHz de manera intermitente (preferentemente en ciclos con sonicación de entre 10 y 15 minutos, separados por ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos), dando lugar a una solución de g-C₃N₄ modificado

- mediante el agente de entrecruzamiento (preferentemente g-C₃N₄ metacrilado);
- Etapa 4: adicionar la solución de g-C₃N₄ modificado mediante el agente de entrecruzamiento (preferentemente g-C₃N₄ metacrilado), obtenido en la etapa 3, al hidrogel de oligómeros de quitosano modificados mediante el agente de entrecruzamiento (preferentemente COS metacrilados), obtenido en la etapa 2, y someter a la mezcla a un proceso de sonicación por ultrasonidos, preferentemente a una temperatura comprendida entre 30 y 60 °C y aplicando ultrasonidos con una frecuencia de entre 10 y 20 kHz de manera intermitente (preferentemente en ciclos de sonicación de entre 10 y 15 minutos intercalados con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos), dando lugar al complejo g-C₃N₄-COS en solución;
 - Etapa 5: finalmente, el complejo g-C₃N₄-COS en solución obtenido en la etapa anterior se mantiene a un pH preferentemente comprendido entre 4 y 5 bajo agitación, preferentemente durante 24 horas, siendo sometido a continuación a un proceso de centrifugación y lavado con agua (preferentemente bidestilada y desionizada (Milli-Q)), eliminando así el exceso de agente de entrecruzamiento (preferentemente AM) y dando lugar al complejo en forma de hidrogel con una relación molar g-C₃N₄:COS de entre 1:1 y 0,5:1.
- 20 En una realización particular en la que se desee formar el complejo g-C₃N₄-COS en forma sólida o en polvo, se llevará a cabo una etapa final adicional de liofilización.

En otra realización particular del método anteriormente descrito, el proceso podrá comprender una etapa adicional de adición al complejo g-C₃N₄-COS (en forma sólida o de hidrogel) del agente bioactivo (CBA) a encapsular, preferentemente en una proporción en peso de entre 1:0,5 y 1:1, seguida preferentemente de una etapa final de purificación. De este modo, el proceso puede comprender:

- a) llevar a cabo las etapas 1 a 4, según han sido anteriormente descritas, de preparación de una solución que comprende el complejo g-C₃N₄-COS;
- b) preparar una solución que comprende al menos un compuesto bioactivo (CBA), preferentemente en medio acuoso o hidrometanólico, con una concentración inicial de entre 3 y 6 mg/mL (más preferentemente, de 6 mg/mL). En caso de emplear un medio hidrometanólico, la mezcla metanol:agua presentará preferentemente una proporción 1:1 en volumen;
- c) mezclar ambas soluciones y someter a la mezcla a un proceso de sonicación

por ultrasonidos, preferentemente a una temperatura comprendida entre 30 y 60 °C y aplicando ultrasonidos con una frecuencia de entre 10 y 20 kHz de manera intermitente (preferentemente en ciclos con sonicación de entre 10 y 15 minutos intercalados con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos), para formar el complejo de inclusión ternario g-C₃N₄-COS-CBA. En particular, se forma una dispersión del compuesto bioactivo (CBA) y la matriz formada por g-C₃N₄-COS que posee características de disolución coloidal o verdadera; y

5 d) aislar el complejo de inclusión ternario g-C₃N₄-COS-CBA, preferentemente en estado sólido o en forma de gel. En una realización particular en la que el producto final se aísle en estado sólido, este proceso podrá llevarse a cabo preferentemente mediante eliminación del agua o la mezcla de agua y metanol por destilación a vacío y liofilización. En otra realización particular en la que el complejo de inclusión ternario g-C₃N₄-COS-CBA se aísle en forma de gel o de film, el proceso de deshidratación podrá llevarse a cabo en moldes de silicona y

10 atmósfera inerte (N₂).

15

Finalmente, es también objeto de la invención el uso de dicho nanomaterial en forma de polvo, film o nanogel, estando diseñado para ser utilizado de manera polivalente y selectiva en remediación ambiental y fitopatología ecológica, preferentemente para la depuración de aguas (en forma de polvo) y/o como fitosanitario (en forma de film o nanogel). De este modo, las partículas del agregado g-C₃N₄-COS pueden funcionar, simultáneamente, como agentes encapsulantes y de transporte superficial, pudiendo diseñarse para que predomine una u otra función. En una realización particular en la que el complejo se vaya a utilizar como polvo o sólido (por ejemplo, para la depuración de aguas), previamente será sometido a un proceso de liofilización. En otra realización particular en la que se emplee en forma de film o hidrogel (por ejemplo, como fitosanitario), el complejo se deshidratará previamente de forma controlada (gelificación).

20

25

30 Las características únicas de este tipo de nanomaterial polimérico permiten, por tanto, su aplicación para depurar aguas contaminadas (ríos, pozos, piscifactorías, depuradoras, etc.) mediante la captura y eliminación de hongos y bacterias, agentes tóxicos, herbicidas, materia orgánica (hidrocarburos aromáticos policíclicos, HAP, etc.) o elementos radiactivos. Adicionalmente, sus características técnicas permiten

35 que sea utilizado para el transporte selectivo de principios activos (como, por

ejemplo, agentes fitosanitarios) en diversos medios, pudiendo emplearse para controlar plagas, por ejemplo, en cultivos agroforestales y/o para tratar enfermedades causadas por fitopatógenos en plantas, tanto en la madera, como en su sistema vascular, así como enfermedades fúngicas (como el mal del plomo o enfermedad de la hoja plateada, verticilosis, botriosfera, septoria o antracnosis) y/o enfermedades bacterianas (como bacteriosis, chancros, necrosis o marchitez bacteriana de frutales con hueso). De manera particular, el nanomaterial podrá ser aplicado a los cultivos mediante pulverización, a través del riego o vía endoterapia.

10 En resumen, el nuevo nanomaterial desarrollado podrá emplearse, entre otras aplicaciones, para: (i) control biológico (bacterias, virus y/o microalgas); (ii) atrapamiento o captura, inactivación y eliminación de elementos radioactivos o contaminantes tóxicos en las aguas; (iii) depuración y mejora de la calidad de aguas residuales; y/o (iv) realización de tratamientos fitosanitarios en cultivos agroforestales, al ser capaz de transportar de manera segura y eficaz compuestos bioactivos.

En relaciones preferidas, el nanomaterial desarrollado puede actuar como nanotransportador para el tratamiento de:

- 20 a) al menos un hongo, preferentemente de los géneros *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Neofusicoccum*, *Fusarium*, *Cryphonectria*, *Dothiorella*, *Lasidiplodia*, *Phaeobotryosphaeria*, *Spencermartinsia*, *Phaeomoniella*, *Phaeoacremonium*, *Codophora*, *Fomitiporia*, *Inocutis*, *Phellinus*, *Stereum*, *Eutypa*, *Eutypella*, *Cryptosphaeria*, *Cryptovalsa*, *Diatrype*, *Diatrypella*, *Pleurostomophora* y
- 25 *Diaporthe*;
- b) y/o al menos un pseudo-hongo, preferentemente del género *Phytophthora*, como por ejemplo *P. cinnamomi* o *P. cactorum*;
- c) y/o al menos un hongo procedente de la pudrición blanca de la madera, preferentemente del género *Armillaria*.

30

Por otra parte, en caso de emplearse como fotocatalizador, puede ser utilizado para el tratamiento de:

- a) medios contaminados, por ejemplo, por *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA) o *Bacillus anthracis*;
- 35 b) aguas contaminadas por colorantes u otros contaminantes recalcitrantes

(incluyendo elementos radiactivos); y/o

c) aguas contaminadas por la industria de setas y hongos comestibles.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

5

Para complementar la descripción que se está realizando, y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompañan las siguientes figuras como parte integrante de dicha descripción, en donde, con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:

10

Figura 1.- Muestra la forma porosa de g-C₃N₄ obtenida mediante la reacción de g-C₃N₄ puro con anhídrido metacrílico;

15

Figura 2.- Muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM) donde se observan partículas cuasi-esféricas de 30 nm de diámetro de g-C₃N₄ metacrilado (Figura 2A). Por su parte, la Figura 2B muestra híbridos sencillos, tipo *nanocarrier*, de partículas de COS metacriladas. Las partículas del complejo g-C₃N₄-COS adoptan el aspecto de esferas afeadas de 200 nm de diámetro (Figura 2C) que, dependiendo de las condiciones de tiempo y sonicación, aparecen aisladas, geminadas o formando racimos (Figura 2D). La captura de un BCA (como es el extracto de *Rubia tinctorum*) por el complejo g-C₃N₄-COS se muestra en las Figuras 2E y 2F;

20

25

Figura 3.- Diámetro (en mm) del crecimiento del micelio de *Diplodia seriata* para diferentes concentraciones (de izq. a dcha.: 15,62; 23,43; 31,25; 46,87; 62,5; 93,75; 125; 187,5; 250; 375 µg/mL) del complejo g-C₃N₄-COS cargado con un extracto de *Rubia tinctorum*. Las mismas letras sobre las concentraciones indican que no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.

30

DESCRIPCIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

35

Como se ha descrito anteriormente, la presente invención se refiere a un nuevo nanomaterial polimérico, en forma de polvo, film o nanogel, que comprende: (i) g-C₃N₄, (ii) quito-oligosacáridos (COS), (iii) un agente de entrecruzamiento o reticulación (preferentemente, anhídrido metacrílico, AM) y, opcionalmente, (iv) al

menos un compuesto bioactivo (CBA), preferentemente un compuesto con actividad antimicrobiana.

5 En caso de que el compuesto bioactivo (CBA) encapsulado en el nanomaterial consista en un compuesto agroquímico de síntesis, el nanomaterial desarrollado podrá emplearse para proteger cultivos frente a fitopatógenos, aumentando la producción y calidad de la cosecha y disminuyendo las pérdidas económicas, el impacto sobre la salud y el medio ambiente, al reducirse la cantidad de producto activo que es necesario emplear en hasta un 75%.

10

Una de las ventajas de la presente invención es que el nanomaterial desarrollado presenta las características habituales de un nanotransportador en cuanto a su estructura, funcionalización y usos previstos. En particular, el nanomaterial objeto de la invención presenta:

15

- (i) una morfología esférica, de doble capa;
- (ii) una estructura en la que la doble capa está formada por $g-C_3N_4$ en la parte externa de la bicapa y los quito-oligosacáridos (COS) en la parte interna;
- (iii) la susceptibilidad del $g-C_3N_4$ tanto para actuar como fotocatalizador, como para capturar superficialmente moléculas contaminantes; y

20

- (iv) la susceptibilidad de los quito-oligosacáridos (COS) para encapsular determinadas moléculas contaminantes.

25

Un aspecto importante de la presente invención (constatado por ATR-FTIR) son las interacciones iónicas entre $g-C_3N_4$, COS y agente de entrecruzamiento (preferentemente AM). La formación del complejo de inclusión ocurre mediante un proceso de gelación iónica. La adición del compuesto biológicamente activo (CBA) ocurre por una interacción muy débil (enlace de hidrógeno o fuerzas electrostáticas), mientras que la interacción con metales pesados se produce por coordinación. En la aparición de los enlaces mencionados anteriormente es esencial la acción de los ultrasonidos, que se aplican tal y como se ha descrito anteriormente. De lo contrario, estos enlaces no aparecen o lo hacen de forma muy lenta, inviabilizando el proceso que se describe en esta patente.

30

35

El nanomaterial reivindicado empleado como nanotransportador (en caso de incorporar compuestos bioactivos antimicrobianos) presenta ventajas frente a otros

sistemas de vehiculización de compuestos bioactivos en aplicaciones fitosanitarias al evitar el uso de aminas sintéticas de reticulación y disolventes orgánicos. Adicionalmente, el nanotransportador de la presente invención presenta una elevada estabilidad en solución. En particular, se trata de un complejo vehiculable en agua, ya que, tras el proceso de sonicación por ultrasonidos, resulta nanodispersado, con características de disolución coloidal o verdadera.

Adicionalmente, el nanomaterial reivindicado presenta actividad sinérgica, de modo que su administración mejora los parámetros frente a la administración por separado de cada uno de sus componentes frente a los fitopatógenos.

A continuación, se recogen una serie de ejemplos para demostrar las características técnicas del objeto de la invención.

Ejemplo 1: Preparación del agregado de oligómeros de quitosano (COS)-anhídrido metacrílico (MA) y g-C₃N₄ y presentación alternativa en forma de sólido o como hidrogel

La síntesis de oligómeros de quitosano (COS) se realizó según el procedimiento de Santos-Moriano et al., *“Enzymatic production of fully deacetylated chitooligosaccharides and their neuroprotective and anti-inflammatory properties”*, Biocatal. Biotransform., 2017, 36, 57-67, con las modificaciones referidas por Buzón-Durán et al., *“Antifungal agents based on chitosan oligomers, ε-polylysine and Streptomyces spp. secondary metabolites against three Botryosphaeriaceae species”*, Antibiotics, 2019, 8, 99, según se describe a continuación:

Los oligómeros de quitosano fueron preparados a partir de quitosano de peso molecular medio 310000-375000 Da (Hangzhou Simit Chemical Technology Co. Ltd. Hangzhou, China). En el proceso, se disolvieron 20 g de quitosano en 1000 mL de agua Milli-Q, añadiendo ácido cítrico con agitación constante a 60 °C. Conseguida la disolución, se añadieron 0,8 L de la endoproteasa Neutrase® (1,67 g/L) para degradar las cadenas del polímero. La mezcla se sometió a ultrasonidos de 10 a 20 kHz durante 3 min en ciclos de 1 min con sonicación y 1 min sin sonicación para mantener la temperatura en el rango de 30 a 60 °C. Al final del proceso, se obtuvo una disolución con un pH en el intervalo de 4 a 6 con oligómeros de quitosano de

peso molecular inferior a 6000 Da.

La síntesis de los hidrogeles de oligómeros de quitosano metacrilado se llevó a cabo según el procedimiento de Gupta and Gupta (Gupta, B.; Gupta, A.K., "*Photocatalytic performance of 3D engineered chitosan hydrogels embedded with sulfur-doped C₃N₄/ZnO nanoparticles for Ciprofloxacin removal: Degradation and mechanistic pathways*", Int. J. Biol. Macromol. 2022, 198, 87-100), con dos modificaciones importantes: en lugar de usar quitosano se utilizaron oligómeros de quitosano, y, en lugar de epíclorohidrina como agente de entrecruzamiento, se empleó anhídrido acrílico (AM). En el presente ejemplo, la especie química co-encapsulante fue una forma porosa de g-C₃N₄ (Figura 1) que resultó del ataque del g-C₃N₄ puro con anhídrido acrílico (AM), cuya morfología resultó próxima a los nanotubos de carbono, presentando la propiedad de interactuar con el oligoquitosano metacrilado para formar el nuevo agregado.

15

a) Síntesis de liofilizados

En primer lugar, se realizó la metacrilación del g-C₃N₄ partiendo de 210 mg de g-C₃N₄ dispersados en una solución de anhídrido metacrílico (AM, $\rho=1,035 \text{ g/dm}^3$ y $P_m=154,16 \text{ g/mol}$) en tetrahidrofurano (THF), obtenida mediante la dispersión de 0,5 mL de AM en 25 mL de THF. La mezcla se sonicó durante 5 minutos en periodos de 1 min.

Por otra parte, se realizó la metacrilación de los oligómeros de quitosano (COS, 6000 ppm) mediante la adición de 420 mg de oligómeros dispersados en una solución de anhídrido metacrílico en THF, obtenida mediante la dispersión de 0,5 mL de AM en 25 mL de THF. La mezcla se sonicó durante 5 minutos en periodos de 1 min.

A continuación, se adicionó la solución de g-C₃N₄ sobre la solución de COS gota a gota con agitación, seguido de sonicación durante 5 minutos, alternando periodos de descanso de 1 minuto, y se mantuvo agitando durante 30 min. La solución resultante obedecía a la relación molar 1:1 de g-C₃N₄:COS. A continuación, la solución resultante se sonicó durante 1 hora, en periodos de 5 min, al tiempo que se controlaba tanto la temperatura de trabajo, inferior siempre a 60 °C, como el pH, preferiblemente, entre 4 y 5. La solución resultante se mantuvo durante 24 horas con

agitación y, por último, se centrifugó y se realizaron sucesivos lavados con agua bidestilada y desionizada (Milli-Q) con el objeto de eliminar el exceso de AM. Por tanto, la solución final obedeció a la relación molar g-C₃N₄:COS de 0,5:1. Finalmente, la solución se liofilizó. El material resultante se caracterizó mediante ATR-FTIR y
5 microscopía electrónica (TEM).

b) Síntesis de hidrogeles

Para la síntesis de hidrogeles se volvió a preparar, como se ha descrito
10 anteriormente, la mezcla g-C₃N₄, COS y AM. Una vez formada la solución y centrifugada, se procedió a verterla, gota a gota, sobre una solución acuosa de NaOH 0,5M durante un tiempo de 30 minutos. Seguidamente, la mezcla se sometió a sonicación durante otros 30 minutos, en periodos de 5 minutos. La solución resultante se dejó agitando a temperatura ambiente durante 12 horas y la solución
15 final se lavó con agua repetidamente. Finalmente, se procedió al secado durante 24 horas a 110 °C.

**Ejemplo 2: Encapsulación de un extracto de *Rubia tinctorum* (RT) en el nuevo complejo metacrilado g-C₃N₄-COS y su formulación en estado de liofilizado e
20 hidrogel**

Los ejemplares de *Rubia tinctorum* se recogieron de la ribera del río Carrión a su paso por la localidad de Palencia (España). Las plantas completas se secaron en la sombra y se pulverizaron en una trituradora mecánica hasta obtener un polvo fino.
25 Se preparó en este caso un medio hidroalcohólico, mezcla de metanol:agua (1:1 v/v). Se mezcló el polvo fino de *R. tinctorum* con el medio hidrometanólico en una relación 1:20 (p/v) y se calentó en un baño de agua a 60 °C durante 30 min, seguidos de 5 min de sonicación. La disolución fue centrifugada a 9000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se filtró a través de papel de filtro Whatman No. 1. Finalmente, se
30 liofilizó para obtener un polvo sólido.

Se adicionaron 105 mg de extracto liofilizado de *R. tinctorum* (compuesto bioactivo a encapsular) sobre el complejo metacrilado de g-C₃N₄:COS (obtenido según se ha descrito en el Ejemplo 1 (a)). La mezcla se sometió a sonicación durante 1 hora en
35 periodos de 5 min, mientras se controlaba la temperatura de trabajo (inferior siempre

a 60 °C) y el pH (4-5). La solución resultante obedeció a la relación molar $g-C_3N_4:CO_2:CBA$ de 0,5:1:0,5, siendo la concentración final del CBA (en este caso, extracto de *R. tinctorum*) del 25% en peso.

- 5 Finalmente, la solución resultante se liofilizó y se procedió a su caracterización mediante ATR-FTIR y microscopía electrónica (TEM).

La preparación de los hidrogeles se realizó del mismo modo referido, pero en este caso precipitando el hidrogel con NaOH 0,5M, sometiendo posteriormente al hidrogel a un proceso de lavado con agua abundante, caracterizándolo a continuación mediante ATR-FTIR y microscopía electrónica (TEM).

Ejemplo 3: Caracterización del nuevo complejo

- 15 **3.1. Caracterización por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y Reflectancia Total Atenuada (ATR)**

Se registraron espectros vibracionales infrarrojos (Tabla 1) usando un espectrómetro FTIR Nicolet iS50 de Thermo Scientific (Waltham, MA, EE.UU.) equipado con un sistema integrado de reflexión total atenuada (ATR) de diamante. Los espectros se registraron con una resolución espectral de 1 cm^{-1} en el rango de 400 a 4000 cm^{-1} , tomando los interferogramas resultantes de la co-adición de 64 escaneos.

25 **Tabla 1: Principales bandas en el espectro infrarrojo del complejo $g-C_3N_4:CO_2$ solo y tras encapsulado de un compuesto bioactivo (CBA) como es el extracto hidrometanólico de *R. tinctorum***

Número de onda (cm^{-1})		Asignación
$g-C_3N_4-CO_2$	$g-C_3N_4-CO_2-CBA$	
3254	3250	banda -NH ($g-C_3N_4$)
3161	3158	-
3093	3091	deformación C-H (aromáticos)
2930		alifáticos (CH y CH_3)
	2897	tensión C-H
2859		-
	2491	-
	2360	C=O simétrica y asimétrica
	2345	tensión antisimétrica de CO_2
1628	1629	característica de OH
1538	1537	combinación de vibraciones de

		flexión -NH y tensión C-N en complejos de amida
1455	1456	-
	1402	C=O tensión simétrica de grupos COO ⁻
1394		tensión C-N ⁺
1313	1315	oscilante CH ₂
1231	1234	tensión C-N
1204	1206	tensión C-O
	1074	tensión S=O
920		-
890	890	deformación C=C
806	807	tensión axial C-C
	703	flexión fuera del plano C-H
599		-
4945		-

3.2 Caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) del complejo g-C₃N₄-COS solo y tras la encapsulación de un CBA

- 5 La caracterización por TEM se realizó utilizando un microscopio JEOL (Akishima, Tokio, Japón) JEM 1011 HR. Las condiciones de operación fueron las siguientes: 100 kV; 25000-120000 aumentos. Las micrografías se obtuvieron con una cámara CCD GATAN ES1000W (4000 × 2672 píxeles) y se recogen en la Figura 2.
- 10 Las micrografías mostraron partículas cuasi-esféricas de 30 nm de diámetro de g-C₃N₄ metacrilado (Figura 2A). Por su parte, la Figura 2B representa híbridos sencillos, tipo *nanocarrier*, de las partículas de COS metacriladas. Las partículas del complejo g-C₃N₄-COS adoptaron el aspecto de esferas afechadas de 200 nm de diámetro que, dependiendo las condiciones de tiempo y sonicación, aparecieron
- 15 aisladas o geminadas (Figura 2C) o formando racimos (Figura 2D). La captura del CBA (extracto de *Rubia tinctorum*) por el nanotransportador g-C₃N₄-COS se muestra en las Figuras 2E y 2F.

20 Ejemplo 4: Ensayos de extracción, inactivación y eliminación de uranio(VI) y arsénico(III)

Inicialmente, se colocaron 30 mg del complejo metacrilado g-C₃N₄-COS liofilizado, que actuará como catalizador, y 3 mL de metanol como eliminador de huecos (0,5% en volumen) en una botella de cuarzo que contenía 60 mL de una solución de 2,5 g/L

de nitrato de uranilo ($\text{UO}_2(\text{NO}_3)_2$) para probar la fotorreducción de uranio(VI) a uranio(IV) mediada por luz visible. El pH de la solución se ajustó con una solución de HCl (2 mol/L) o NaOH (2 mol/L) al pH deseado. Antes de la reacción fotocatalítica, se burbujeó nitrógeno en el sistema y la solución se agitó durante 1 h antes de la irradiación con luz visible para obtener el equilibrio de adsorción. Posteriormente, se aportó luz visible con una lámpara de Xe de 300 W (350–700 nm de longitud de onda) equipada con un filtro de corte para el rango ultravioleta.

Con un intervalo de tiempo específico, se tomó una muestra de 1 mL de la suspensión y se filtró y separó inmediatamente a través de un filtro de membrana microporoso de 0,22 μm . La absorbancia del uranio(VI) en la suspensión filtrada a 650 nm se analizó por el método espectrofotométrico con arsenazo-III (ácido 2-(o-arsenofenilazo)-1,8-dihidroxinaftalen-3,6-disulfónico). La reducción fotocatalítica del uranio(VI) fue evaluada mediante la siguiente fórmula: $(C/C_0) \times 100$, donde C presenta la concentración de uranio(VI) en un momento dado, y C_0 representa la concentración inicial de uranio(VI).

Este ensayo también se realizó para la extracción, inactivación y eliminación del arsénico(III), confirmándose la alta eficacia de la reducción fotocatalítica del uranio(VI) y arsénico(III) por el complejo metacrilado g- C_3N_4 -COS bajo irradiación de luz visible. Estos resultados indican que el nanomaterial basado en g- C_3N_4 -COS es un candidato prometedor para la eliminación eficaz de uranio(VI) y arsénico(III) en aguas contaminadas.

25 **Ejemplo 5: Ensayo de extracción, inactivación y eliminación de contaminantes tóxicos (herbicidas, hidrocarburos aromáticos policíclicos): Rodamina B**

Para evaluar la actividad fotocatalítica del complejo, g- C_3N_4 -COS, se hizo flotar un film ($1 \times 1 \text{ cm}^2$) sobre la superficie de una solución acuosa que contenía rodamina B (RhB, 10 mg/L). Para obtener un equilibrio de adsorción-desorción entre fotocatalizador y RhB, la solución se agitó continuamente durante 1 h en total oscuridad.

A continuación, la solución se irradió a través de luz solar directa para aprovechar al máximo la energía solar. Cada 15 min, y en un tiempo de 2 h, se obtuvo un 1 mL de

la solución y se determinó la concentración de RhB mediante medidas de absorbancia a 553 nm con un espectrómetro UV-visible, confirmándose que este nanomaterial, basado en g-C₃N₄ y COS, ofrece un alto rendimiento fotocatalítico y una selectividad y versatilidad exclusivas para su empleo en remediación ambiental.

5

Ejemplo 6: Ensayos de actividad antifúngica del nuevo complejo g-C₃N₄-COS, solo y tras la encapsulación de un extracto de *Rubia tinctorum* como CBA

Se ensayó la inhibición del crecimiento micelial frente al fitopatógeno *Diplodia seriata* De Not. La actividad antifúngica de los diferentes tratamientos se determinó por dilución en agar, de acuerdo con los procedimientos estándar de pruebas de susceptibilidad antifúngica del EUCAST (“EUCAST definitive document EDef 7.2: method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts”), incorporando alícuotas de soluciones madre a un medio de agar de patata dextrosa (PDA) para obtener concentraciones en el rango de 15,62-375 µg/mL.

Se transfirió micelio fúngico (∅ = 5 mm) de los márgenes de un cultivo de *D. seriata* de una semana de edad a placas que incorporaban las concentraciones mencionadas para cada tratamiento (tres placas por tratamiento/concentración, con dos réplicas cada una). A continuación, las placas se incubaron a 25 °C en oscuridad durante una semana. Como control se utilizó el medio PDA sin ninguna modificación. La inhibición del crecimiento micelial se estimó según la fórmula: $((dc - dt)/dc) \times 100$, donde dc y dt representan los diámetros medios de la colonia fúngica del control y de la colonia fúngica tratada, respectivamente.

En la Figura 3 se muestra el diámetro de crecimiento del micelio de *D. seriata* para el complejo g-C₃N₄-COS cargado con *R. tinctorum*. Como puede observarse, se logra la inhibición del crecimiento micelial a la concentración de 62,5 µg/mL.

30

Ejemplo 7: Actividad antibacteriana del nuevo complejo g-C₃N₄-COS solo y tras la encapsulación de *R. tinctorum* como CBA

Con el objetivo de establecer el amplio espectro de actuación del nuevo complejo metacrilado, se realizaron ensayos de actividad antibacteriana contra *Xylophilus*

35

ampelinus (Panagopoulos) Willems et al. (sin. *Xanthomonas ampelina* y *Erwinia vitivora*). La actividad antibacteriana se evaluó por determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI). Se utilizó el método de dilución en agar, según la norma M07-11 del CLSI. Una colonia aislada de *X. ampelinus* se incubó en medio líquido TSB a 26 °C durante 18 h. Partiendo de una concentración de 10⁸ UFC/mL, se realizaron diluciones en serie para obtener un inóculo final de aproximadamente 10⁴ UFC/mL.

Posteriormente, la suspensión bacteriana se aplicó a la superficie de las placas de agar de soja tríptica (TSA) enmendadas con los tratamientos en concentraciones que iban de 15,62 a 375 µg/mL. Las placas se incubaron a 26 °C durante 24 h. Las CMIs se determinaron visualmente como las concentraciones más bajas a las que no se observó crecimiento bacteriano en las diluciones de agar. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y cada réplica consistió en tres placas por tratamiento/concentración.

El complejo g-C₃N₄-COS cargado con *R. tinctorum* inhibió el crecimiento de *X. ampelinus* a una concentración de 31,25 µg/mL.

20 **Ejemplo 8: Bioensayos en planta en condiciones de invernadero del complejo g-C₃N₄-MA-COS cargado con *R. tinctorum***

Se realizaron bioensayos con el complejo g-C₃N₄-COS cargado con un extracto hidrometanólico de *R. tinctorum* en plantas de vid jóvenes con el fin de conocer la actividad protectora de este nuevo nanomaterial contra dos especies seleccionadas de *Botryosphaeriaceae*. Cada planta se cultivó en una maceta de plástico de 3,5 L con un sustrato mixto de turba y tierra natural esterilizada (75:25), incorporando fertilizante de liberación lenta cuando fue necesario a lo largo del periodo de estudio.

Las plantas se mantuvieron en invernadero con riego por goteo y malla antihierbas durante 6 meses. Una semana después de colocarlos en macetas, las plantas jóvenes injertadas fueron inoculadas artificialmente con los patógenos y se aplicó como tratamiento el complejo g-C₃N₄-COS cargado con un extracto hidrometanólico de *R. tinctorum*. Se dispusieron quince repeticiones (plantas) para cada patógeno, junto con cinco controles positivos por patógeno, más cinco controles negativos (que incorporaron solo el tratamiento). Las inoculaciones de los patógenos y aplicaciones

del tratamiento se realizaron directamente sobre el tronco de las plantas vivas en dos sitios por tallo (separados más de 5 cm) por debajo del punto de injerto y sin llegar a la corona de la raíz.

5 Para los diferentes hongos, se emplearon como inóculo fúngico tacos de agar del margen de cultivos frescos de PDA de 5 días de cada especie. En los citados dos puntos de inoculación de cada planta de vid, se realizaron hendiduras de aproximadamente 15 mm de diámetro y 5 mm de profundidad con un bisturí. Posteriormente, se pusieron directamente en contacto con tejido vascular en el tallo
10 los tacos de agar de 5 mm de diámetro; simultáneamente, perlas de hidrogel de alginato de calcio con el producto bioactivo se colocaron a ambos lados del taco de agar; y todo el conjunto fue cubierto con algodón empapado en agua bidestilada estéril y sellado con cinta Parafilm™.

15 Al final del experimento, se retiraron las plantas y se prepararon dos secciones transversales de cada tallo inoculado, entre el punto de injerto y la corona de la raíz, y se seccionaron longitudinalmente. Los efectos de los hongos inoculados se evaluaron midiendo las longitudes de las necrosis vasculares longitudinales en cada dirección desde el punto de inoculación.

20 Dichas longitudes fueron significativamente menores en las plantas tratadas con g-C₃N₄-COS cargado con un extracto hidrometanólico de *R. tinctorum* que en los controles positivos, confirmándose la protección eficaz frente a ambos patógenos. En los controles negativos no se observaron síntomas de fitotoxicidad.

25 Los ejemplos anteriores demuestran la actividad del nuevo nanomaterial desarrollado en remediación ambiental frente a contaminantes como el uranilo (U VI), el arsenito (As III) y la rodamina B, así como frente a fitopatógenos de cultivos leñosos, que ponen en valor su aplicación como fitosanitario en el ámbito agroforestal.

30

REIVINDICACIONES

1. Nanomaterial caracterizado porque comprende un autoensamblaje de:
 - a) g-C₃N₄ puro o dopado con al menos un óxido metálico y/o nanoplata; y
 - 5 b) oligómeros de quitosano que comprenden entre 5 y 10 monómeros, también denominados quito-oligosacáridos (COS) de bajo peso molecular, entendiéndose como tal un peso molecular comprendido entre 3000 y 6000 Da,donde dicho autoensamblaje está mediado mediante un agente de entrecruzamiento,
10 dando lugar a un complejo de inclusión g-C₃N₄-COS.

2. Nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 1, donde el agente de entrecruzamiento es seleccionado de un grupo que consiste en anhídrido metacrílico (AM), polimetilmetacrilato (PMMA) y epiclohidrina.
15

3. Nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 1 o 2, donde dicho nanomaterial se presenta en forma de film, nanogel o polvo con un tamaño de nanopartícula comprendido entre 100 nm y 300 nm.

- 20 4. Nanomaterial de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la relación molar del g-C₃N₄ y los quito-oligosacáridos (COS) en el nanomaterial varía entre 1:1 y 0,5:1.

5. Nanomaterial de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones anteriores,
25 donde dicho nanomaterial comprende además, al menos, un compuesto bioactivo (CBA) que interacciona con el compuesto g-C₃N₄-COS por enlaces iónicos o de hidrógeno.

6. Nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 5, donde la relación molar g-
30 C₃N₄:COS:CBA varía de 0,5:1:0,5 a 1:1:1.

7. Nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 5 o 6, donde dicho CBA es un compuesto con actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos.

- 35 8. Nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 7, donde el CBA es un polifenol o una mezcla de polifenoles.

9. Nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 7, donde el CBA es un extracto natural de *Rubia tinctorum* (RT).

10. Proceso para obtener un nanomaterial de acuerdo a una cualquiera de las
5 reivindicaciones 1 a 4, donde dicho proceso comprende las siguientes etapas:

a) etapa 1: preparar una disolución de quitosano de alto peso molecular, entendiéndose como tal un peso molecular comprendido entre 310000 y 375000 Da, en agua, con una concentración de entre un 2% y un 5% en peso respecto al volumen total, añadiendo asimismo entre un 70% y un
10 90% en peso de ácido acético o ácido cítrico con agitación constante a una temperatura de entre 30 y 60 °C, dando lugar a una disolución a la cual se le añade neutrasa en un porcentaje comprendido entre un 30% y un 40% en peso, dando lugar a una disolución de COS de bajo peso molecular, entendiéndose como tal un peso molecular comprendido entre
15 3000 y 6000 Da, y donde dicha etapa 1 se lleva a cabo manteniendo la temperatura entre 30 y 60 °C y aplicando ultrasonidos con una frecuencia de entre 10 y 20 kHz de manera intermitente,

b) etapa 2: sintetizar un hidrogel de oligómeros de quitosano modificados mediante un agente de entrecruzamiento mediante la adición del agente de entrecruzamiento a la disolución de COS obtenida en la etapa 1, en un
20 porcentaje comprendido entre un 70% y un 80% en peso respecto al volumen total de la disolución, en presencia de tetrahidrofurano, dioxano o diclorometano, en un porcentaje comprendido entre un 20% y un 30% en peso respecto al volumen total de la disolución, y donde dicha etapa 2 se lleva a cabo a una temperatura comprendida entre 30 y 60 °C y aplicando ultrasonidos con una frecuencia de entre 10 y 20 kHz de
25 manera intermitente,

c) etapa 3: sintetizar una forma porosa de g-C₃N₄, puro o dopado, modificado mediante un agente de entrecruzamiento mediante la
30 reacción de g-C₃N₄ puro o dopado, en un porcentaje comprendido entre un 84,5% y un 90% en peso, con un agente de entrecruzamiento en un porcentaje comprendido entre un 0,5% y un 1% en peso, en presencia de tetrahidrofurano, dioxano o diclorometano, en un porcentaje comprendido entre un 9% y un 15% en peso, y donde dicha etapa 3 se lleva a cabo a
35 una temperatura comprendida entre 30 y 60 °C, aplicando ultrasonidos con una frecuencia de entre 10 y 20 kHz de manera intermitente, dando

lugar a una solución de g-C₃N₄ modificado mediante el agente de entrecruzamiento;

- 5
- d) etapa 4: adicionar la solución de g-C₃N₄ modificado mediante el agente de entrecruzamiento, obtenida en la etapa 3, al hidrogel de oligómeros de quitosano modificados mediante el agente de entrecruzamiento, obtenido en la etapa 2, y someter a la mezcla a un proceso de sonicación por ultrasonidos a una temperatura comprendida entre 30 y 60 °C y aplicando ultrasonidos con una frecuencia de entre 10 y 20 kHz de manera intermitente, dando lugar al complejo g-C₃N₄-COS en solución;
- 10
- e) etapa 5: mantener el complejo g-C₃N₄-COS en solución obtenido en la etapa 4 a un pH comprendido entre 4 y 5 bajo agitación, siendo sometido a continuación a un proceso de centrifugación y lavado con agua, eliminando así el exceso de agente de entrecruzamiento y dando lugar al nanomaterial en forma de hidrogel.

15

11. Proceso, de acuerdo a la reivindicación 10, donde dicho proceso comprende una etapa adicional final de liofilización, dando lugar al nanomaterial en forma sólida o en polvo.

20

12. Proceso, de acuerdo a la reivindicación 10 u 11, donde el agente de entrecruzamiento es seleccionado de un grupo que consiste en anhídrido metacrílico (AM), polimetilmetacrilato (PMMA) y epiclorhidrina.

25

13. Proceso, de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, donde dicho proceso comprende una etapa adicional de adición al complejo g-C₃N₄-COS, en forma sólida o de hidrogel, de al menos un compuesto bioactivo (CBA), en una proporción en peso de entre 1:0,5 y 1:1.

30

14. Uso de un nanomaterial de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para la depuración de aguas, en forma de polvo, y/o como fitosanitario, en forma de film o nanogel, aplicándose a los cultivos mediante pulverización, a través de riego o vía endoterapia.

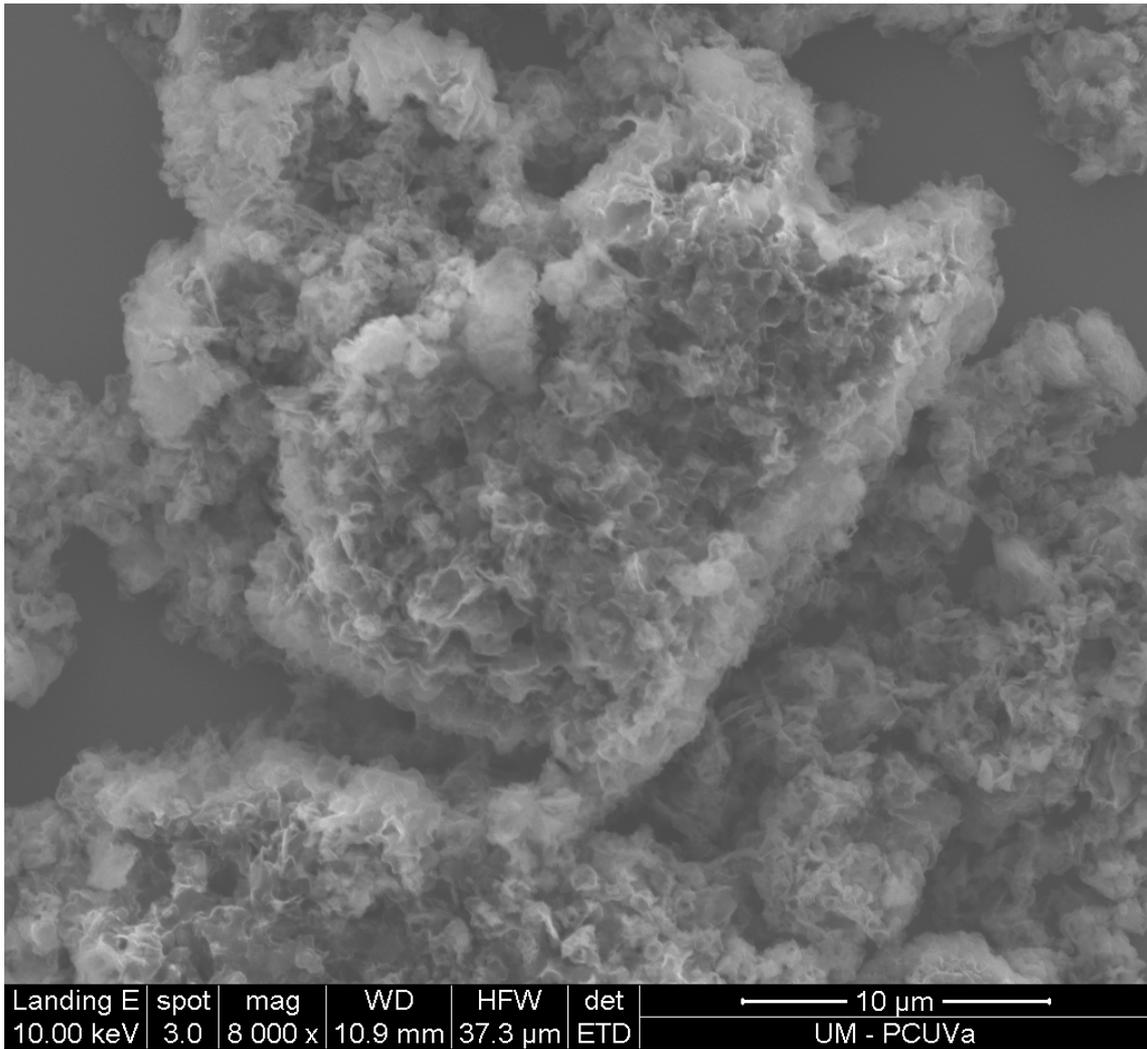


FIG.1

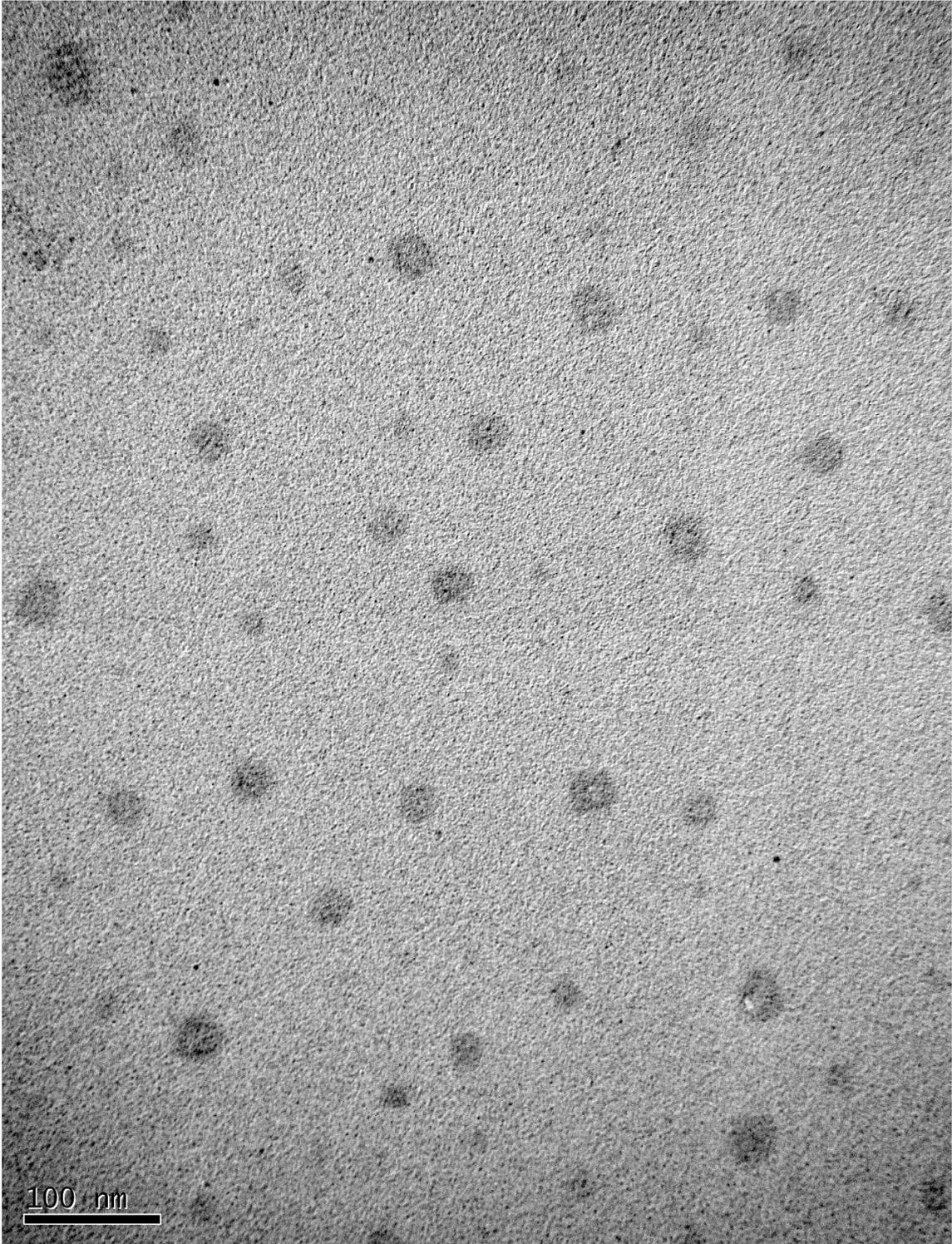


FIG. 2a

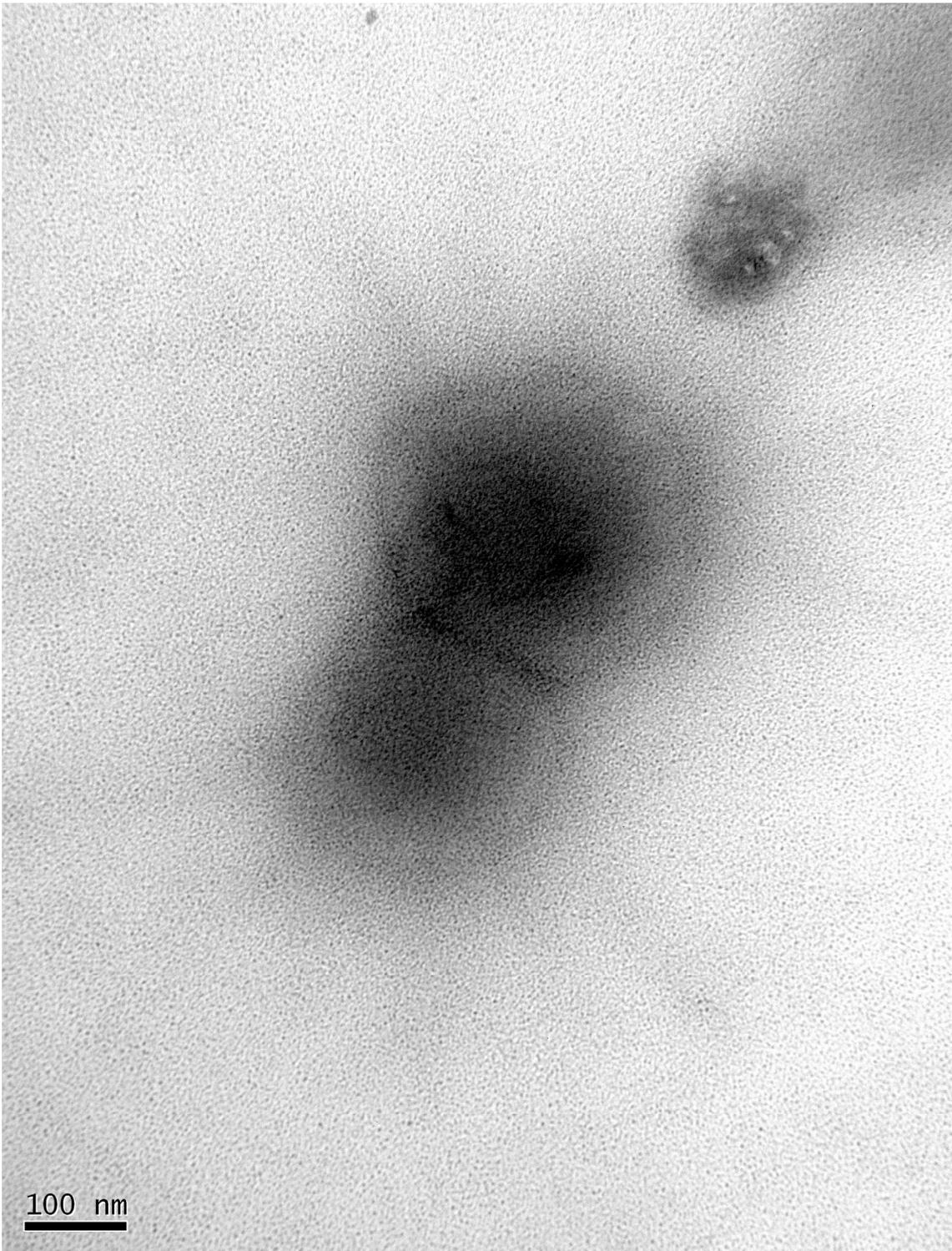


FIG. 2b

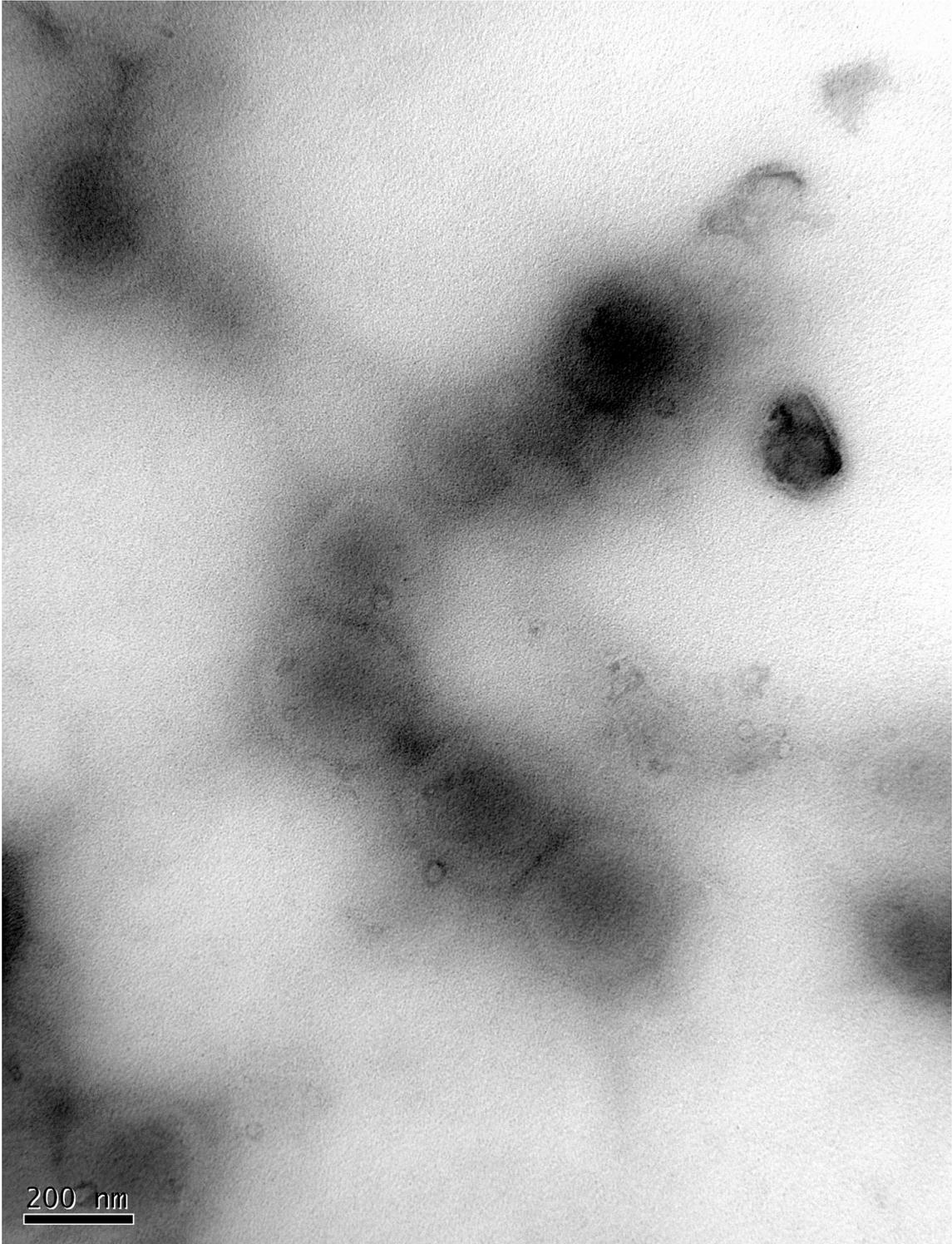


FIG. 2c

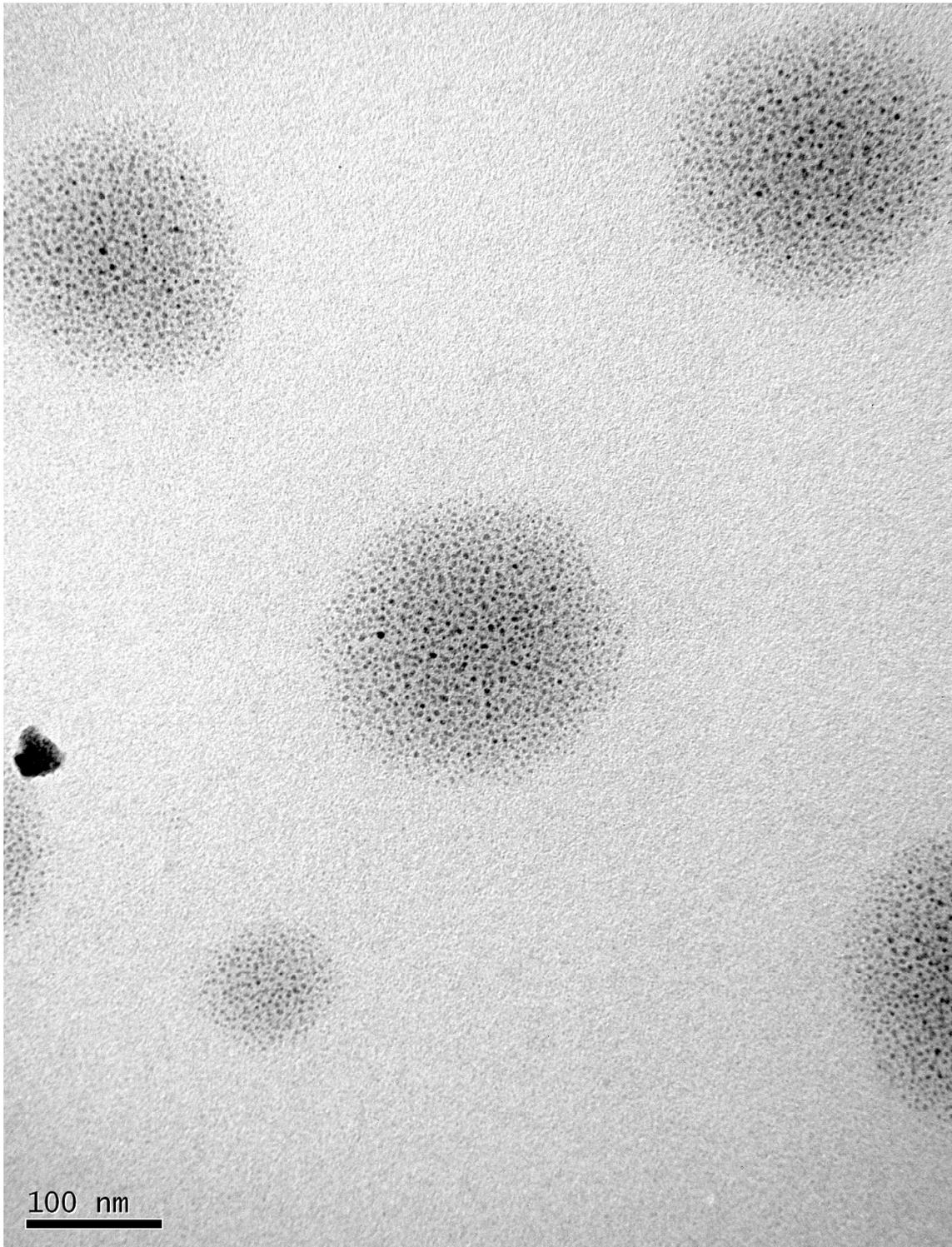


FIG. 2d

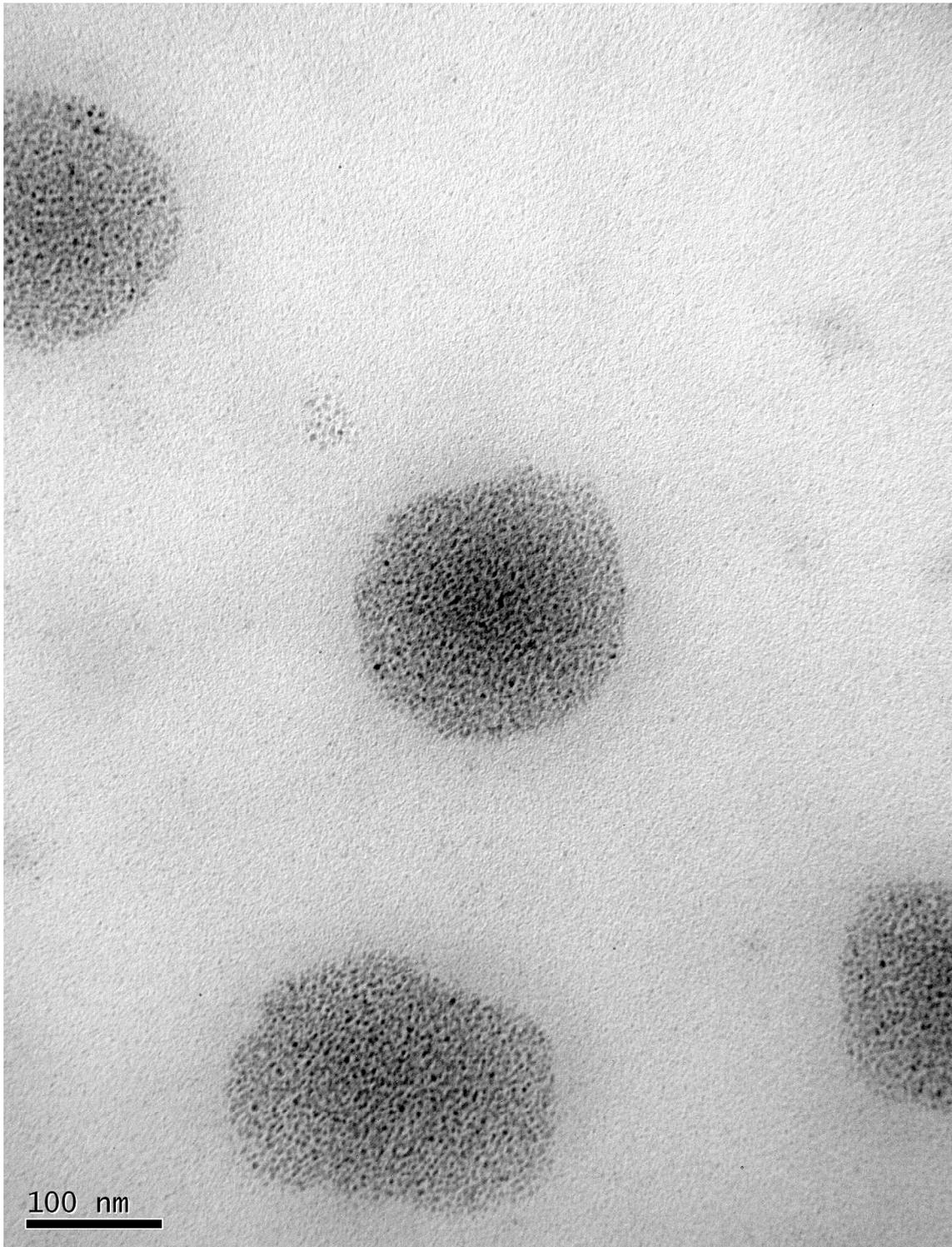


FIG. 2e

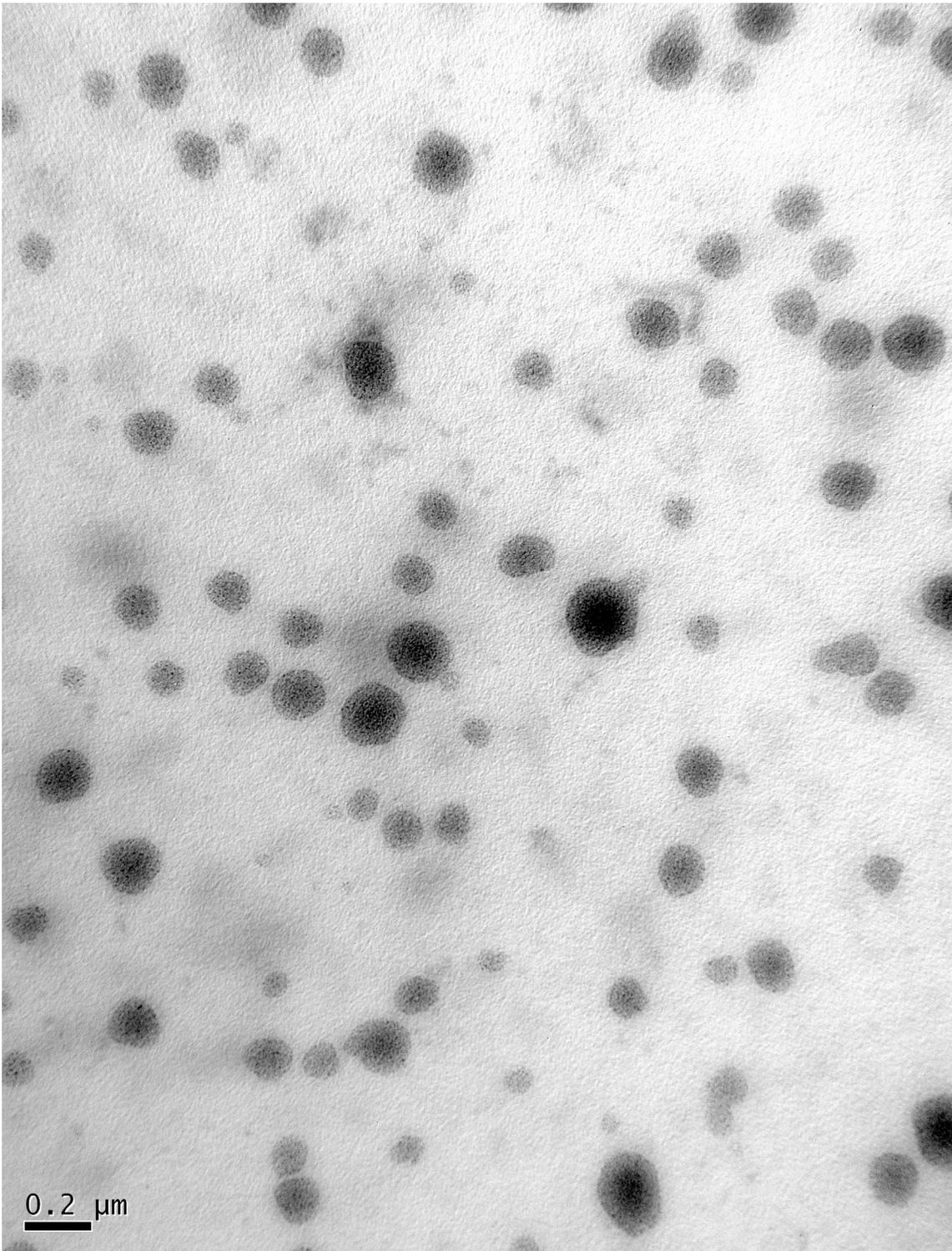


FIG. 2f

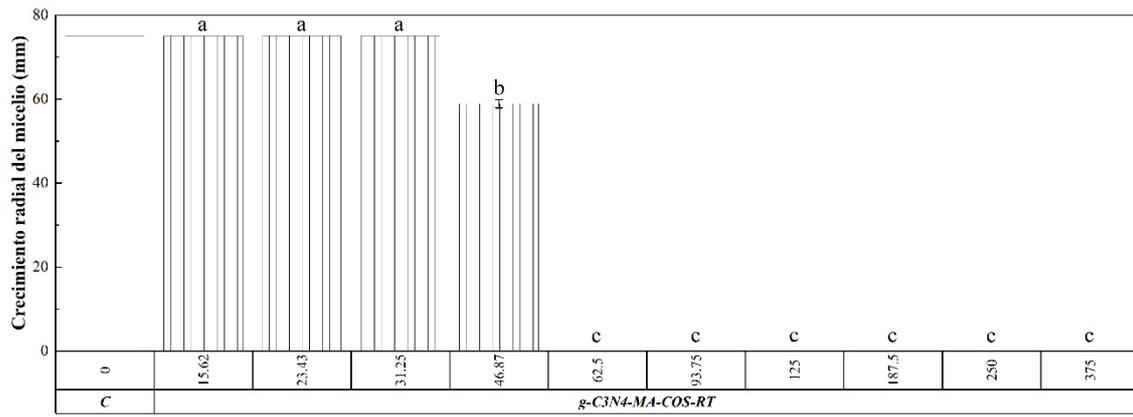


FIG. 3



- ②1 N.º solicitud: 202230668
②2 Fecha de presentación de la solicitud: 20.07.2022
③2 Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	CN 111250056 A (UNIV QINGDAO) 09/06/2020, (Resumen) World Patent Index [en línea]. Londres (Reino Unido) Thomson Publications, LTD. [Recuperado el 02/04/2020] DW 2020056, N° de acceso 2020-53743B; descripción.	1-14
A	RAJABZADEH-KHOSROSHAHI, M. et al. "Chitosan/agarose/graphitic carbon nitride nanocomposite as an efficient pH-sensitive drug delivery system for anticancer curcumin releasing". Journal of Drug Delivery Science and Technology, 2022, Vol. 74, Páginas 103443 [en línea] [recuperado el 21/05/2022]. Recuperado de Internet <URL: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103443>, <DOI: 10.1016/j.jddst.2022.103443>. Ver resumen; apartado 2.3.	1-14
A	SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, E. et al. "Lignin–Chitosan Nanocarriers for the Delivery of Bioactive Natural Products against Wood-Decay Phytopathogens". Agronomy, 2022, Vol. 12, Páginas 461 [en línea][recuperado el 12/02/2022]. Recuperado de Internet <URL: https://doi.org/10.3390/agronomy12020461>. Ver resumen; apartado 2.5.	1-14
A	GUPTA BRAMHA et al. "Photocatalytic performance of 3D engineered chitosan hydrogels embedded with sulfur-doped C ₃ N ₄ /ZnO nanoparticles for Ciprofloxacin removal: Degradation and mechanistic pathways". International Journal of Biological Macromolecules FEB 15 2022. , 15/02/2022, Vol. 198, Páginas 87-100, ISSN 0141-8130(print) ISSN 1879-0003(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.12.120>. Ver resumen; apartado 2.2.	1-14

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 n°:

Fecha de realización del informe
11.05.2023

Examinador
N. Martín Laso

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C08K5/17 (2006.01)
C08K3/015 (2018.01)
C08L33/08 (2006.01)
C08L5/08 (2006.01)
A01N25/10 (2006.01)
A01N43/16 (2006.01)
C01B21/06 (2006.01)

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

C08K, C08L, A01N, C01B

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, TXT-DB, NPL, XPESP, CAS