

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 977 176**

(21) Número de solicitud: 202430227

(51) Int. Cl.:

**C01G 41/00** (2006.01)  
**C01G 5/00** (2006.01)  
**A01N 59/16** (2006.01)  
**C09D 5/14** (2006.01)

(12)

## SOLICITUD DE PATENTE

A1

(22) Fecha de presentación:

**26.03.2024**

(43) Fecha de publicación de la solicitud:

**20.08.2024**

(71) Solicitantes:

**UNIVERSITAT JAUME I DE CASTELLÓ (57.0%)**  
Av. de Vicent Sos Baynat s/n  
12071 Castellón de la Plana (Castellón) ES y  
**FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO  
CARLOS (43.0%)**

(72) Inventor/es:

**ANDRÉS BORT, Juan Manuel;**  
**DE ASSIS, Marcelo;**  
**RIBEIRO DA SILVA, Lara Kelly;**  
**LONGO DA SILVA, Elison;**  
**DE FREITAS ANIBAL, Fernanda;**  
**PAIVA DE SOUSA, Cristina;**  
**DE ALMEIDA RODOLPHO, Joice Margareth;**  
**DIAS DE LIMA FRAGELLI, Bruna;**  
**MESQUITA ARANTES, Igor y**  
**OTTAIANO GONÇALVES, Mariana**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

(54) Título: **Procedimiento para obtener un material compuesto antimicrobiano, material así obtenido y uso del mismo**

(57) Resumen:

Procedimiento para obtener un material compuesto antimicrobiano, material así obtenido y uso del mismo. La presente invención se refiere a un material compuesto antimicrobiano basado en un soporte semiconductor ( $WO_3$ ), un metal (Ag) y un carbono. La presente invención también se refiere a su procedimiento de preparación en forma de quitosano y sal soluble de Ag y W. El material antimicrobiano puede utilizarse como aditivo o recubrimiento de superficie en muchos ámbitos diferentes, tal como en la industria automotriz y de la construcción.

**DESCRIPCIÓN****Procedimiento para obtener un material compuesto antimicrobiano, material así obtenido y uso del mismo**

5

La invención se refiere a un procedimiento para obtener un material compuesto semiconductor/metal/carbono con propiedades antimicrobianas. Por consiguiente, la presente solicitud se refiere además a dicho material y a su uso, preferentemente, como aditivo o recubrimiento de superficie en la industria automotriz y de la construcción.

10

**ESTADO DE LA TÉCNICA**

Hasta ahora, el desafío continuo de las enfermedades infecciosas causadas por microorganismos patógenos (microbios como hongos, bacterias y virus) que suponen 15 una enorme carga para la salud pública y las economías mundiales, hace que las enfermedades infecciosas sigan siendo un grave problema en todo el mundo. Estos patógenos suelen poder habitar en las superficies de multitud de objetos y dispositivos. Una vía importante de propagación de enfermedades es la transmisión de patógenos a través del contacto con superficies contaminadas. Los tratamientos de las superficies 20 pueden ayudar a reducir o incluso evitar estos peligros.

El diseño de materiales avanzados mediante la ingeniería de superficies antibacterianas es uno de los principales ámbitos de aplicación de los nuevos materiales. *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Escherichia coli* (*E. coli*) son uno de los principales 25 patógenos bacterianos causantes de diversas infecciones.

En vista de esto, el desarrollo de nuevas tecnologías antimicrobianas, no basadas en antibióticos tradicionales y sin contaminantes o metales pesados, es de gran interés.

30 Por tanto, en el estado de la técnica se ha descrito algunos materiales, tales como los descritos en el documento: Michał Jakubczak *et al. Materials Chemistry and Physics*, 297, 2023, 127333, en donde se utilizó carbono (C) activado como sustrato para la decoración *in situ* de superficies con partículas de óxido de grafeno (GO) y nanocomuestos bioactivos de TiO<sub>2</sub>/Ag. El nanocomuesto descrito en dicho 35 documento ha de fotoactivarse para que tenga un efecto antimicrobiano. Este

inconveniente también está presente en muchos otros compuestos antimicrobianos conocidos en el estado de la técnica. En el documento: H.I. Hamouda *et al. Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9(2), 2021,105034 se describen nanotubos de carbono de paredes múltiples decorados con nanopartículas de plata para aplicaciones antimicrobianas. En este caso, puede observarse una reducción de la concentración microbiana, en lugar de una inhibición completa. Otros problemas que afectan a algunos compuestos de la técnica anterior son su efecto citotóxico, su baja estabilidad y su escaso efecto antibacteriano. Para solucionar los inconvenientes mencionados de los materiales antimicrobianos de la técnica anterior, la presente invención proporciona un nuevo material compuesto con excelente estabilidad y actividad antibacteriana contra patógenos tales como *S. aureus* y *E. coli*, baja citotoxicidad y, de manera ventajosa, no es necesario fotoactivarlo.

Con objeto de solucionar los inconvenientes mencionados de los materiales antimicrobianos de la técnica anterior, la presente invención proporciona uno nuevo que presenta excelente estabilidad y actividad antibacteriana contra patógenos tales como *S. aureus* y *E. coli*, baja citotoxicidad y, de manera ventajosa, no es necesario fotoactivarlo.

## 20 DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Los inventores han demostrado que un material compuesto basado en un semiconductor ( $WO_3$ ), un metal (Ag) y un soporte de carbono (grafito), posee excelentes propiedades antimicrobianas, estabilidad y baja citotoxicidad, por lo que puede utilizarse como aditivo o recubrimiento antimicrobiano en multitud de campos, tal como en la industria automotriz y de la construcción.

Además, se ha desarrollado un procedimiento para preparar dicho material compuesto. Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención se refiere a un procedimiento para obtener un material compuesto que comprende:

- preparar una dispersión de quitosano en etanol,
- preparar una dispersión de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  en etanol,
- añadir la dispersión de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  a la dispersión de quitosano, en donde la cantidad de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  está comprendida entre el 0,1 y el 20 % en peso en

- relación con la cantidad de quitosano,
- d) secar el material resultante a una temperatura comprendida entre 50 y 100 °C durante 1 a 48 h,
  - e) calentar el material seco obtenido en la etapa d) a una temperatura comprendida entre 200-700 °C durante 10-360 min, generando el material compuesto final.
- 5

El procedimiento definido anteriormente conduce a la generación de un material compuesto que comprende partículas de plata (Ag) y trióxido de wolframio (WO<sub>3</sub>) ambos 10 en soporte de carbono, en particular grafito (Ag/WO<sub>3</sub> sobre grafito).

En una realización preferida, la dispersión de la etapa a) se prepara con ultrasonido, más preferentemente a una frecuencia entre 20-50 kHz, con un intervalo de energía preferido de 300-800 W durante 5-60 minutos preferentemente.

15

En una realización preferida, la dispersión de quitosano en la etapa a) se prepara añadiendo quitosano a etanol a una proporción de entre 0,001 g a 1,000 g por 20 ml de etanol.

20 Preferentemente, se utiliza quitosano de peso molecular medio. La expresión "peso molecular medio" se refiere al peso molecular promedio medio del quitosano, que está relacionado con el tamaño promedio de las cadenas poliméricas de quitosano. En términos numéricos, el peso molecular del quitosano de peso molecular medio está en el intervalo de 10<sup>3</sup> a 10<sup>4</sup> g/mol. El quitosano de peso molecular medio está disponible en 25 el comercio.

30 En una realización preferida, la dispersión de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> en la etapa b) se prepara añadiendo  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> a etanol a una proporción de entre 0,001 g a 1,000 g por 20 ml de etanol.

35

En una realización preferida, en la etapa c), la cantidad de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> está comprendida entre el 0,5 y el 10 % en peso en relación con la cantidad de quitosano, más preferentemente, entre el 1 y el 5 % en peso en relación con la cantidad de quitosano.

35 En una realización preferida, las etapas d) y e) se realizan en una estufa.

En una realización preferida, el  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> utilizado en la etapa b) se obtiene a través del método de coprecipitación en medio acuoso que comprende las siguientes etapas:

- i) preparar una solución de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O en agua,
  - ii) preparar una solución de AgNO<sub>3</sub> en agua,
  - 5      iii) calentar las soluciones preparadas en las etapas i) y ii) a una temperatura comprendida entre 50 y 100 °C, y después, añadir la solución de AgNO<sub>3</sub> a la solución de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, generando así un precipitado blanco,
  - iv) agitar constantemente la solución que contiene el precipitado blanco obtenido en la etapa iii) durante 10-360 min y después, centrifugar y lavar con agua destilada hasta que se obtenga un pH comprendido entre 5 y 7 en el agua de lavado,
  - 10     v) secar el precipitado obtenido en la etapa iv) a una temperatura comprendida entre 50-100 °C durante 6-48 h.
- 15     En la etapa iv), al lavar con agua, el pH disminuye, de manera que los iones no utilizados en la formación de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> se eliminan.

En una realización preferida, la concentración de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O en la solución de la etapa i) está comprendida entre 0,2x10<sup>-6</sup> y 2,0 mol/l. Más preferentemente, entre 1x10<sup>-5</sup> y 1x10<sup>-3</sup> mol/l.

20     En una realización preferida, la concentración de AgNO<sub>3</sub> en la solución de la etapa ii) está comprendida entre 0,4x10<sup>-6</sup> y 4,0 mol/l. Más preferentemente, entre 2x10<sup>-5</sup> y 2x10<sup>-3</sup> mol/l.

25     Las realizaciones preferidas de temperatura y tiempo utilizadas fueron 20-100 °C y 0,1-6 horas.

30     Un segundo aspecto de la invención se refiere al material compuesto obtenible mediante el procedimiento descrito en el primer aspecto de la invención (material compuesto de la presente invención). Dicho material compuesto comprende partículas de plata (Ag) y WO<sub>3</sub> depositadas sobre grafito.

35     Las partículas de Ag presentan estructura cristalina cúbica con grupo espacial Fm-3m; las partículas de WO<sub>3</sub> estructura cristalina monoclínica con grupo espacial P21/c y el

grafito tiene estructura cristalina hexagonal y grupo espacial P63mc. Estas partículas se obtuvieron de la descomposición térmica del quitosano con  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>, dando como resultado partículas micrométricas de carbono poroso (grafito) que varían entre 10 y 80  $\mu\text{m}$  de diámetro promedio, medido por microscopía electrónica de barrido (MEB), con 5 partículas de WO<sub>3</sub> y de Ag en su superficie, ambas de tamaños comprendidos entre 80 y 2000 nm de diámetro promedio, medido por microscopía electrónica de barrido (MEB).

El material compuesto descrito anteriormente puede utilizarse como recubrimiento sobre un sustrato para proporcionarle propiedades antimicrobianas, preferentemente, con 10 propiedades antibacterianas. Preferentemente, el sustrato es de acero inoxidable. Estos recubrimientos de superficie pueden utilizarse en la industria automotriz y de la construcción, por ejemplo, en la fabricación de barandillas, asideros, muebles, interruptores, entre otros.

15 En una realización preferida, el recubrimiento se fabrica mediante el método de recubrimiento por rotación. Este método comprende preferentemente las siguientes etapas:

20 -el sustrato, preferentemente un sustrato de acero inoxidable, se corta y se lija con papel de lija, y después el recubrimiento se realiza utilizando el método de recubrimiento por rotación que comprende:  
- 0,01-1,00 g del material compuesto de la presente invención, se añaden 0,010-1,00 g de polietilenglicol y 1-400  $\mu\text{l}$  de tensioactivo no iónico (preferentemente compuesto de polioxietilenos, que son éter de poliglicol derivado del polietileno) por 1-100 ml de agua,  
25 -la solución de agua formada en la etapa anterior se deja en agitación durante 1-48 h para una mejor homogeneidad del sistema,  
- la solución de agua homogeneizada obtenida en la etapa anterior se añade al sustrato en rotación (preferentemente a 300-5000 rpm) durante 30-360 seg y después el sustrato se calienta a 100-700 °C durante 10-360 min para una mejor 30 adhesión del recubrimiento. En una realización preferida, se añaden entre 10 y 500  $\mu\text{l}$  de la solución de agua homogeneizada por 40  $\text{mm}^2$  de la superficie de sustrato. Preferentemente, la solución de agua homogeneizada se añade al sustrato durante 30-360 seg.

35 La presente invención también se refiere a un sustrato recubierto, que comprende el

material compuesto descrito en el primer aspecto de la invención, depositado sobre al menos una parte del sustrato, preferentemente, sobre un sustrato de acero inoxidable.

Además, el material compuesto descrito en el segundo aspecto de la invención, puede 5 utilizarse como aditivo antimicrobiano (preferentemente antibacteriano). Más preferentemente, puede utilizarse como aditivo antimicrobiano (preferentemente antibacteriano) de matrices poliméricas, con aplicación preferentemente en la industria automotriz y de la construcción. Este aditivo puede incorporarse directamente en la fabricación de productos poliméricos inyectables y moldeables.

10

En resumen, la presente invención proporciona un material compuesto basado en un semiconductor ( $WO_3$ ), un metal (Ag) y grafito con propiedades antimicrobianas y que tiene notables ventajas sobre los materiales compuestos ya conocidos en el estado de la técnica, como se menciona a continuación:

15

- presenta una excelente estabilidad
- no ha de fotoactivarse para exponer su efecto antimicrobiano
- baja citotoxicidad
- mejora la actividad antimicrobiana (obteniendo una heterounión de nanopartícula semiconductor/metálica, es decir, un material formado por dos o más tipos de materiales diferentes, hace que el flujo de electrones entre el semiconductor y la nanopartícula aumente debido al efecto plasmónico, haciéndolo más eficaz para generar especies reactivas del oxígeno (ROS, *reactive oxygen species*), incluso en la oscuridad)
- aplicación versátil como un agente antimicrobiano en diferentes superficies y 20 como aditivo antimicrobiano en diversas bases poliméricas.

Además, el procedimiento utilizado para la preparación del material conlleva ventajas:

25

- síntesis en un solo recipiente
- condiciones de síntesis suaves (temperaturas y tiempos bajos)
- no generación de residuos secundarios sintéticos.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. En la puesta en 35 práctica de la presente invención pueden utilizarse métodos y materiales similares o

equivalentes a los que se describen en el presente documento. A lo largo de la descripción y las reivindicaciones, la palabra "comprende" y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Otros objetos, ventajas y características de la invención resultarán evidentes para los expertos

5 en la materia tras el examen de la descripción o podrán conocerse mediante la puesta en práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a título ilustrativo y no pretenden ser limitativos de la presente invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

10

**FIG. 1:** (A) patrones de DRX y (B) espectros Raman de las muestras sintetizadas sin  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> (QT) y con 1 (QT1A), 2 (QT2A) y 4 % (QT4A) en peso de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.

**FIG. 2:** Imágenes de MEB de las muestras (A)QT; (B) QT1A; (C) QT2A y; (D) QT4A.

15

**FIG. 3:** Crecimiento de (A) *E. coli* y (B) *S. aureus* en función de diferentes concentraciones de las muestras QT, QT1A, QT2A y QT4A.

**FIG. 4:** Viabilidad celular en % por el método MTT después de 24 horas de exposición.

20 Análisis de datos cuantitativos. (A) Tratamiento con QT, (B) QT1A, (C) QT2A y (D) QT4A. \* frente a CTRL: \* p<0,5; \*\* p<0,01; \*\*\* p<0,001; \*\*\*\* p<0,0001. Imágenes de microscopía óptica de células 3T3 después de 24 horas de exposición a (E) QT, (F) QT1A, (G) QT2A y (H) QT4A. Resolución final de 100X.

25 **FIG. 5:** (A) Imagen de MEB de la muestra SSQT4A; (B) ángulo de contacto del acero inoxidable (SS, *stainless steel*) y del acero inoxidable recubierto con la muestra QT4A (SSQT4A); Pruebas de destrucción temporal utilizando muestras SS y SSQT4A contra (C) *E. coli* y (D) *S. aureus*.

## 30 EJEMPLOS

Para ilustrar la invención, lo siguiente son ejemplos de la invención que han llevado a cabo los inventores.

### Ejemplo 1: Síntesis de $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>

35 En dos matraces distintos, se añadieron 50,0 ml de agua destilada, así como 1x10-

<sup>3</sup> moles de  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $2 \times 10^{-3}$  moles de  $\text{AgNO}_3$ , respectivamente, hasta su completa disolución, las soluciones se calentaron a 70 °C, y después, la solución de  $\text{AgNO}_3$  se añadió a la solución de  $\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , generando un precipitado blanco. Esta solución se dejó en agitación constante durante 20 min. y después se centrifugó y se  
5 lavó con agua destilada hasta alcanzar un pH = 7. A continuación, el precipitado se secó a 60 °C durante 12 h.

#### **Ejemplo 2: Síntesis de Ag/WO<sub>3</sub> en soporte de carbono**

En un matraz, se añadieron 1,00 g de quitosano (CAS: 9012-76-4, peso molecular  
10 medio, Sigma-Aldrich) a 20,0 ml de etanol y se dispersaron con ultrasonido durante 5 min. En otro matraz, también se dispersaron 0,01, 0,02 y 0,04 g de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  en 20,0 ml de etanol durante 5 min. Después de este tiempo, la dispersión de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  se añadió a la dispersión de quitosano durante 10 min. El material resultante se secó en una estufa durante 5 h a 60 °C. Después de secar, el material se llevó a una estufa  
15 convencional a 400 °C durante 30 min, generando el material final. Las muestras sin y con 1, 2 y 4 % en peso de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  recibieron el nombre de QT, QT1A, QT2A y QT4A.

#### **Ejemplo 3: Preparación de un recubrimiento sobre sustrato de acero inoxidable**

Los sustratos de acero inoxidable se cortaron en tamaños de 20 mm x 20 mm x 1 mm y  
20 se lijaron con papel de lija de grano 200, 400, 1000 y 1600. Los recubrimientos se realizaron utilizando el método de recubrimiento por rotación. A 1 ml de agua destilada, se añadieron 0,100 g de la muestra QT4A, 0,040 g de polietilenglicol y 10  $\mu\text{l}$  de tensioactivo no iónico (Triton X-100). Esta solución se dejó en agitación durante 12 h para una mejor homogeneidad del sistema. Se añadieron 30  $\mu\text{l}$  a los sustratos de acero  
25 inoxidable con una rotación de 3000 rpm durante 30 seg. Después de este proceso, los sustratos se llevaron a un horno de mufla convencional a 200 °C durante 30 min para una mejor adhesión del material.

#### **Ejemplo 4: Caracterización de los compuestos obtenidos en el ejemplo 2**

30 Para analizar las propiedades estructurales de las muestras después del tratamiento térmico, se realizó un análisis de difracción de rayos X (DRX) (Figura 1A). De hecho, se observa que la muestra QT se convierte completamente en grafito después del tratamiento térmico, con estructura hexagonal y grupo espacial P63mc. En cuanto a las muestras con 1 % (QT1A), 2 % (QT2A) y 4 % (QT4A) de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$ , además de la  
35 formación de grafito, la descomposición total de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  en  $\text{WO}_3$  (estructura

monoclínica con grupo espacial P21/c) y Ag (estructura cúbica con grupo espacial Fm-3m), demostraba que la atmósfera generada en la combustión del quitosano favorece los procesos redox para la formación de  $\text{WO}_3$  y Ag. De esta manera, hay una disminución de la temperatura de descomposición térmica de  $\alpha\text{-Ag}_2\text{WO}_4$  por la atmósfera generada en la combustión del quitosano. Este proceso de descomposición es intrínseco y diferente de los trabajos publicados hasta ahora. En la Figura 1B se pueden observar las bandas D ( $\sim 1350 \text{ cm}^{-1}$ ) y G ( $\sim 1570 \text{ cm}^{-1}$ ) de los materiales basados en carbono, que hacen referencia a defectos en las capas de grafito y a enlaces de carbono hibridado sp<sub>2</sub>, respectivamente.

10

En la Figura 2 se muestran imágenes de microscopía electrónica de barrido (MEB). Se observa que, después del tratamiento térmico, el quitosano tiene una estructura micrométrica extremadamente porosa (Figura 2A). Cuando se forma  $\text{WO}_3/\text{Ag}$  en la superficie del material carbónico, estructuras irregulares de estos materiales (partículas de alto contraste) llenan estos poros y se depositan en la superficie de este soporte carbónico (Figura 2B-C). Como era de esperar, a medida que aumenta la concentración de  $\text{WO}_3/\text{Ag}$ , la superficie se llena cada vez más de estas estructuras.

20

Se realizaron pruebas de concentración inhibidora mínima (CIM) con bacterias *E. coli* (ATCC 25922) y *S. aureus* (ATCC 29213) y se muestran en la Figura 3. Como control negativo en ambas pruebas, se utilizó el antibiótico gentamicina. Se observa que la muestra QT no muestra ninguna inhibición antimicrobiana significativa en ninguna de las concentraciones probadas con ambos microorganismos. En el caso de la bacteria gramnegativa *E. coli*, las muestras QT1A, QT2A y QT4A mostraron valores de CIM de 125, 62,5 y 31,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente. En el caso de la bacteria grampositiva *S. aureus*, las muestras QT1A, QT2A y QT4A presentaron valores de CIM de 250, 62,5 y 31,25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , respectivamente. Por tanto, se puede observar que la actividad antimicrobiana es proporcional a la cantidad de  $\text{WO}_3/\text{Ag}$  formada en la superficie del soporte de carbono. Las pruebas de concentración bactericida mínima (CBM) se realizaron con las suspensiones de pocillos sin turbidez, inoculadas en agar e incubadas durante 24 h. No se observó crecimiento bacteriano, confirmado que la CBM es igual a la CIM.

35

Para corroborar los resultados bactericidas, la citotoxicidad de las muestras se analizó utilizando células murinas 3T3. Esta cepa suele aplicarse en estudios con materiales

antes de la etapa con ensayos *in vivo*. La citotoxicidad de los materiales se analizó a través del % de viabilidad celular y los datos se muestran en la Figura 4A-D. La viabilidad de la muestra QT mostró una disminución significativa a las concentraciones más bajas (3,90 y 7,81 µg/ml). La muestra QT1A mostró una disminución en la viabilidad celular a 5 concentraciones de 31,25 y 62,5 µg/ml. La QT2A tuvo una disminución significativa a partir de la concentración de 15,62 µg/ml y el material QT4A a partir de 7,81 µg/ml. En orden ascendente de disminución de la viabilidad celular y aumento de la citotoxicidad es: QT= QT1A < QT2A< QT4A. El efecto de la citotoxicidad sobre la morfología celular se muestra en la Figura 4E-H. Se observa que a concentraciones inferiores a 3,90 y 10 7,81 µg/ml el número de células es tan grande como el control y la morfología se conserva. A concentraciones de 15,62, 31,25 y 62,5 µg/ml, el número de células comienza a disminuir y la morfología cambia respecto a la original, presente en el grupo de control, ya que la membrana celular está menos definida, tiene un contenido citoplásmico irregular y baja adherencia.

15

Ampliando la aplicación tecnológica de este material como agente antimicrobiano, se realizaron recubrimientos de acero inoxidable utilizando la muestra con la mayor capacidad antimicrobiana para analizar sus propiedades superficiales, así como su actividad antimicrobiana contra *S. aureus* y *E. coli*. La Figura 5A muestra la superficie 20 del sustrato de acero inoxidable después de la deposición de las partículas de WO<sub>3</sub>/Ag en soporte de carbono. Se observa que no toda la superficie del sustrato está completamente cubierta por el material, pero una gran parte del sustrato está cubierta. La humectabilidad de la superficie es una propiedad primordial que regula las interacciones entre las fases sólida y líquida en los sistemas biológicos. La fase líquida 25 moja una superficie sólida maximizando su área de contacto con la superficie. Esto, a su vez, aumenta la interacción entre el líquido y la superficie sólida. Por tanto, las superficies más hidrófobas pueden limitar la adhesión bacteriana. La **Figura 5B** muestra los ángulos de contacto del sustrato de acero inoxidable (SS) puro y después del recubrimiento (SSQT4A). El ángulo de contacto de la muestra SS fue de ~65°, mientras 30 que el de la muestra SSQT4A fue de ~93°. Por tanto, además del efecto de producción de ROS del recubrimiento, la actividad antimicrobiana de esta muestra puede amplificarse debido a la disminución de la humectabilidad de esta superficie.

35 La actividad antimicrobiana de la superficie con y sin recubrimiento se analizó mediante pruebas de destrucción temporal, analizando el crecimiento bacteriano en función del

tiempo de *E. coli* (**Figura 5C**) y *S. aureus* (**Figura 5D**) después de la interacción con la superficie de la muestra. En ambas bacterias, se observó un aumento del crecimiento bacteriano para el sustrato de SS puro. Sin embargo, en ambas bacterias, se observó una reducción repentina del crecimiento bacteriano utilizando el recubrimiento con la muestra QT4A, mostrando que el recubrimiento traslada su eficacia antimicrobiana a la superficie sobre la que se deposita.

5

## REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para obtener un material compuesto que comprende:

- 5 a) preparar una dispersión de quitosano en etanol,
- b) preparar una dispersión de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> en etanol,
- c) añadir la dispersión de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> a la dispersión de quitosano, en donde la cantidad de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> está comprendida entre el 0,1 y el 20 % en peso en relación con la cantidad de quitosano,
- d) secar el material resultante a una temperatura comprendida entre 50 y 10 100 °C durante 1 a 48 h,
- e) calentar el material seco obtenido en la etapa d) a una temperatura comprendida entre 200-700 °C durante 10-360 min, generando el material compuesto final.

15 2. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la dispersión de la etapa a) se prepara con ultrasonidos.

3. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, en donde los ultrasonidos son a una frecuencia entre 20-50 kHz, con un intervalo de energía de 300-800 W durante 5-20 60 minutos.

25 4. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la dispersión de quitosano en la etapa a) se prepara añadiendo quitosano a etanol a una proporción de entre 0,001 g a 1,000 g por 20 ml de etanol.

5. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la dispersión de  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> en la etapa b) se prepara añadiendo  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> a etanol a una proporción de entre 0,001 g a 1,000 g por 20 ml de etanol.

30 6. Procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el  $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> utilizado en la etapa b) se obtiene a través del método de coprecipitación en medio acuoso que comprende las siguientes etapas:

- 35 i) preparar una solución de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O en agua,
- ii) preparar una solución de AgNO<sub>3</sub> en agua,
- iii) calentar las soluciones preparadas en las etapas i) y ii) a una temperatura

- comprendida entre 50 y 100 °C, y después, añadir la solución de AgNO<sub>3</sub> a la solución de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O, generando así un precipitado blanco,
- iv) agitar constantemente la solución que contiene el precipitado blanco obtenido en la etapa iii) durante 10-360 min y después, centrifugar y lavar con agua destilada hasta que se obtenga pH comprendido entre 5 y 7 en el agua de lavado,
- v) secar el precipitado obtenido en la etapa iv) a una temperatura comprendida entre 50-100 °C durante 6-48 h.
- 10 7. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la concentración de Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O en la solución de la etapa i) está comprendida entre 0,2x10<sup>-6</sup> y 2,0 mol/l.
8. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde la concentración de AgNO<sub>3</sub> en la solución de la etapa ii) está comprendida entre 0,4x10<sup>-6</sup> y 4,0 mol/l.
- 15 9. Un material compuesto obtenible mediante el procedimiento descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende: partículas de plata (Ag) y WO<sub>3</sub> depositadas sobre grafito.
- 20 10. Uso no terapéutico del material compuesto definido en la reivindicación 9, como aditivo o recubrimiento antimicrobiano.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el antimicrobiano se selecciona de un antibacteriano, antivírico y antifúngico.
- 25 12. El uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 10 u 11, como un aditivo de matrices poliméricas.
13. Un sustrato recubierto, que comprende el material compuesto descrito en la 30 reivindicación 9, depositado sobre al menos una parte del sustrato.
14. Un sustrato recubierto, de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el sustrato es de acero inoxidable.

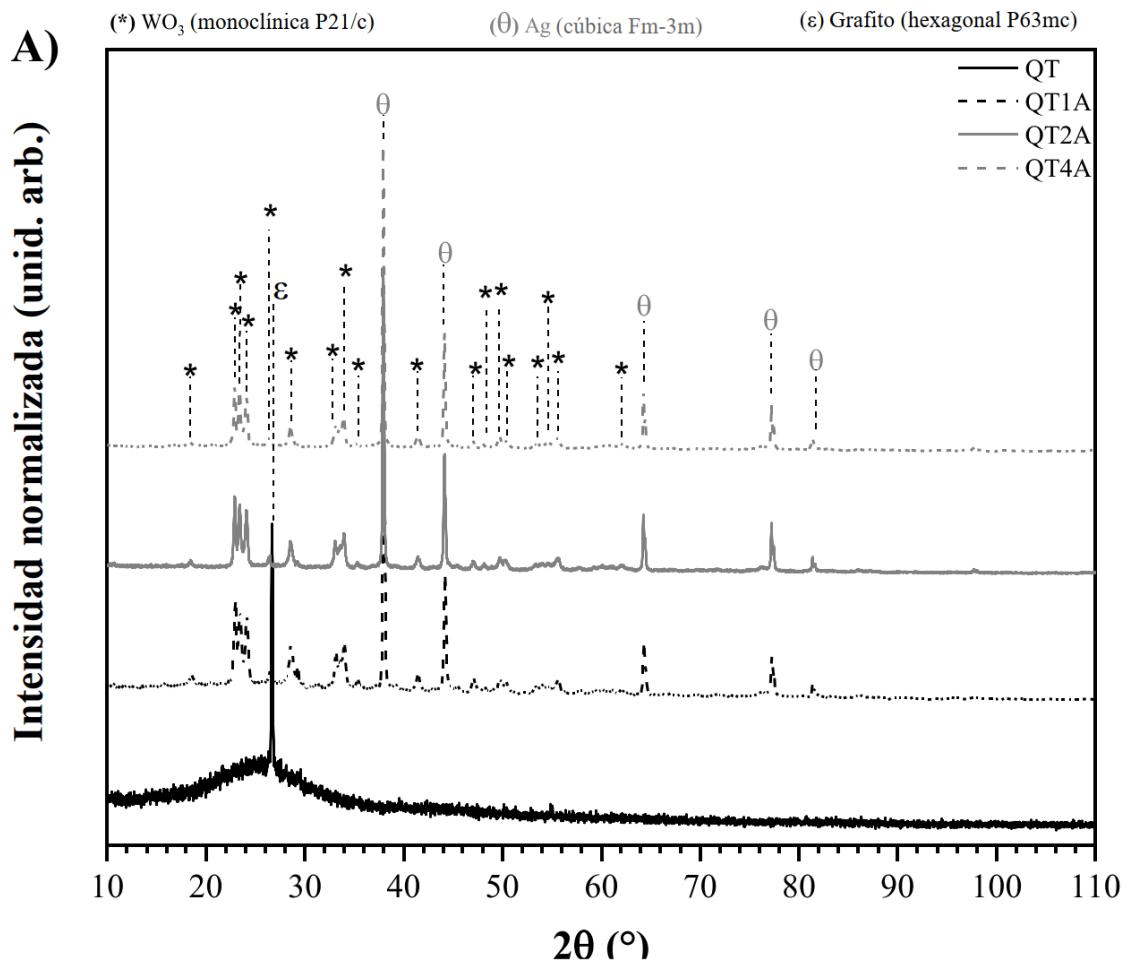


FIG. 1

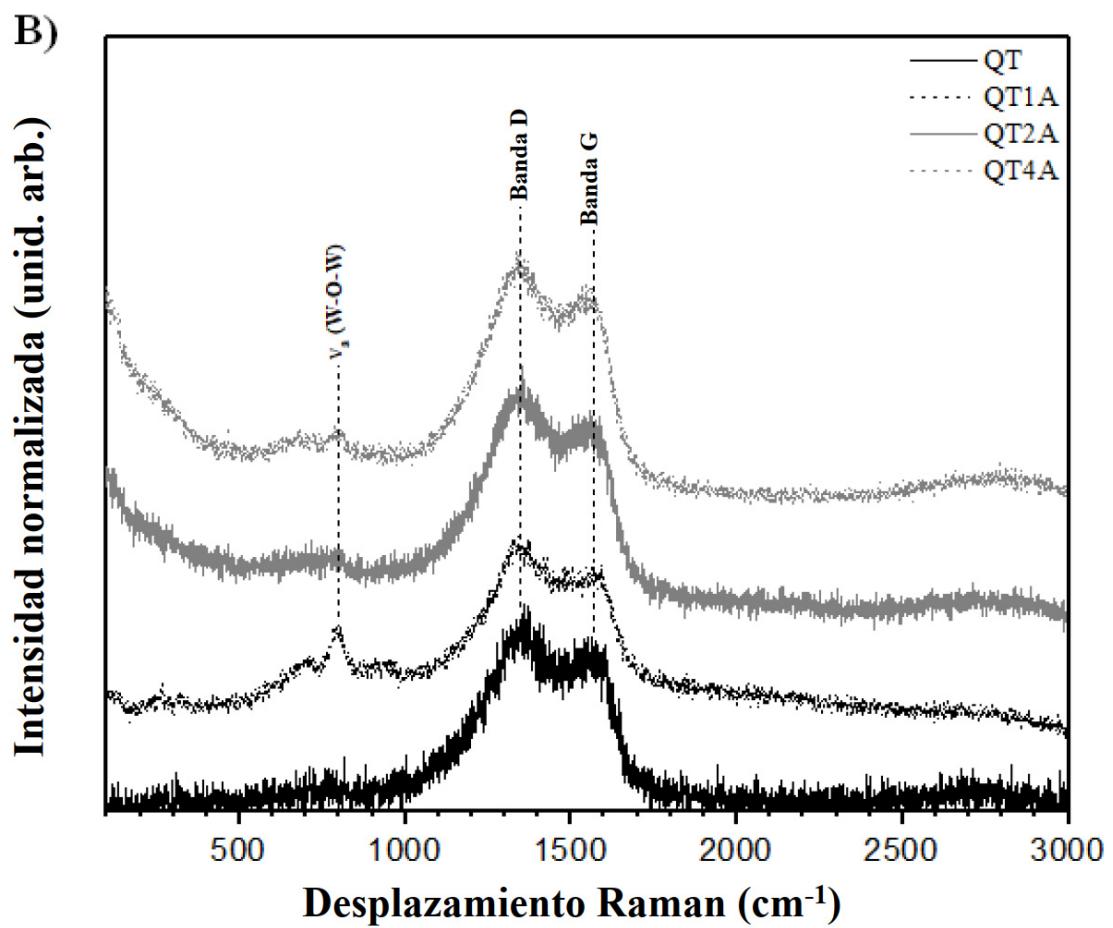


FIG. 1 cont.

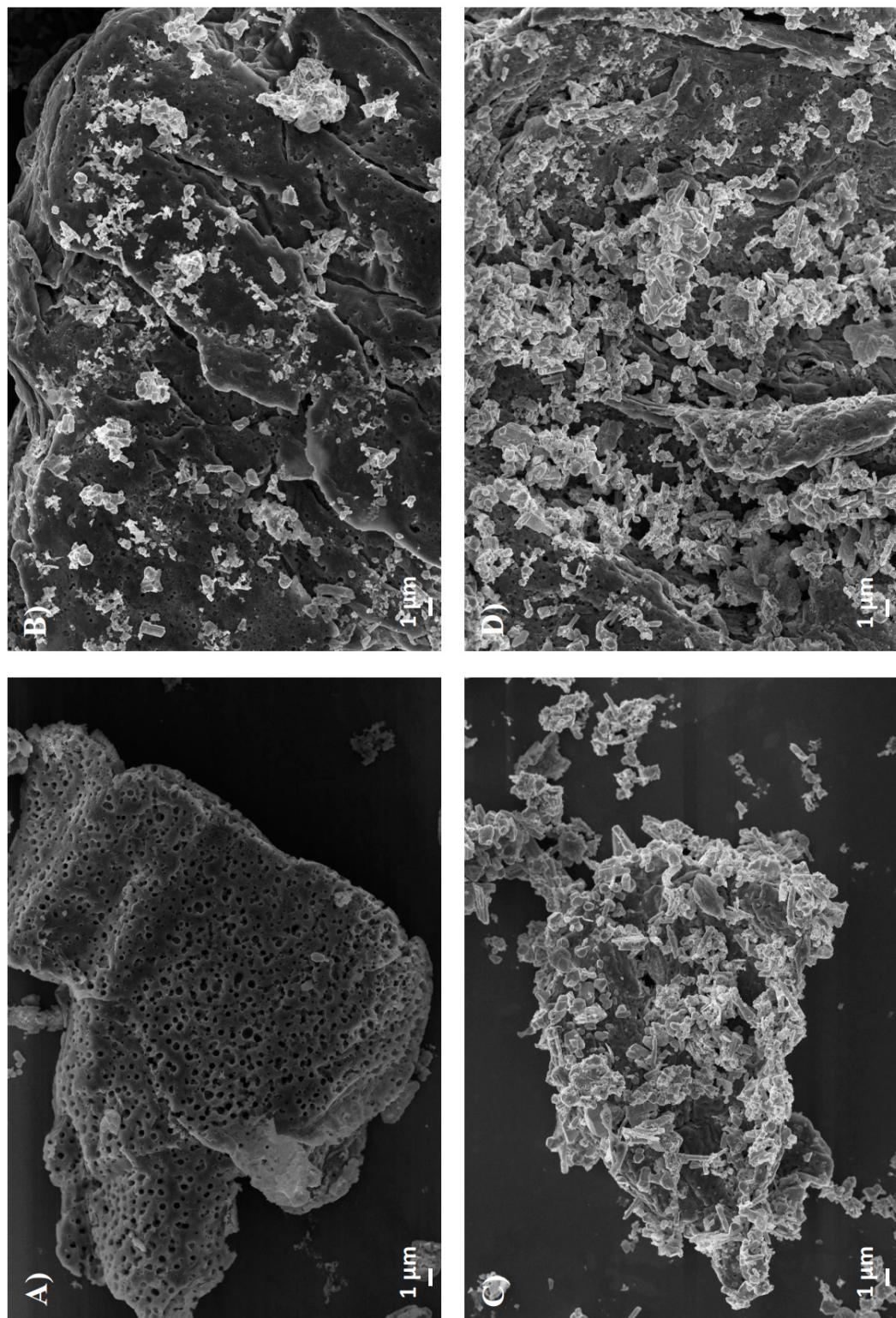
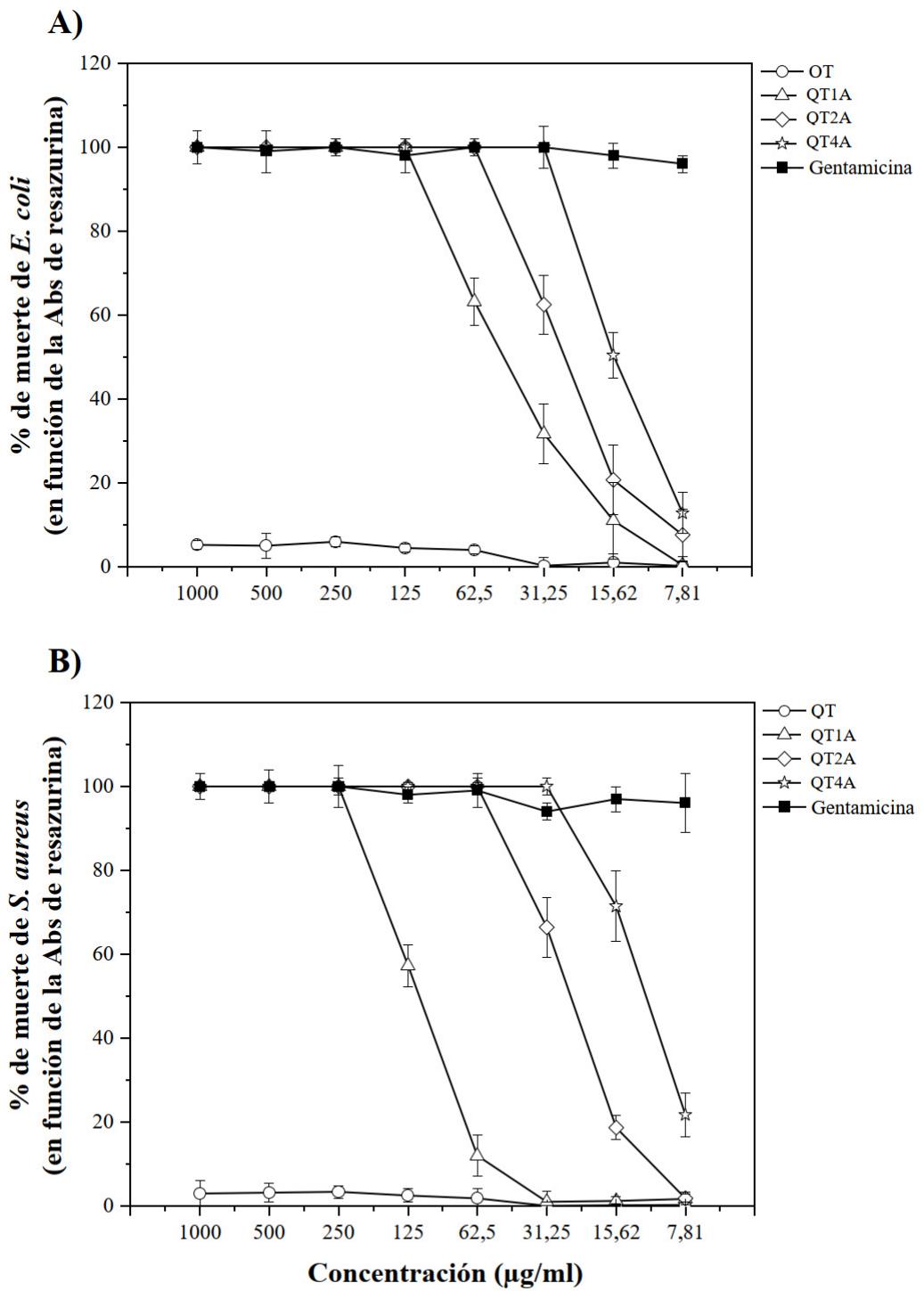


FIG. 2

**FIG. 3**

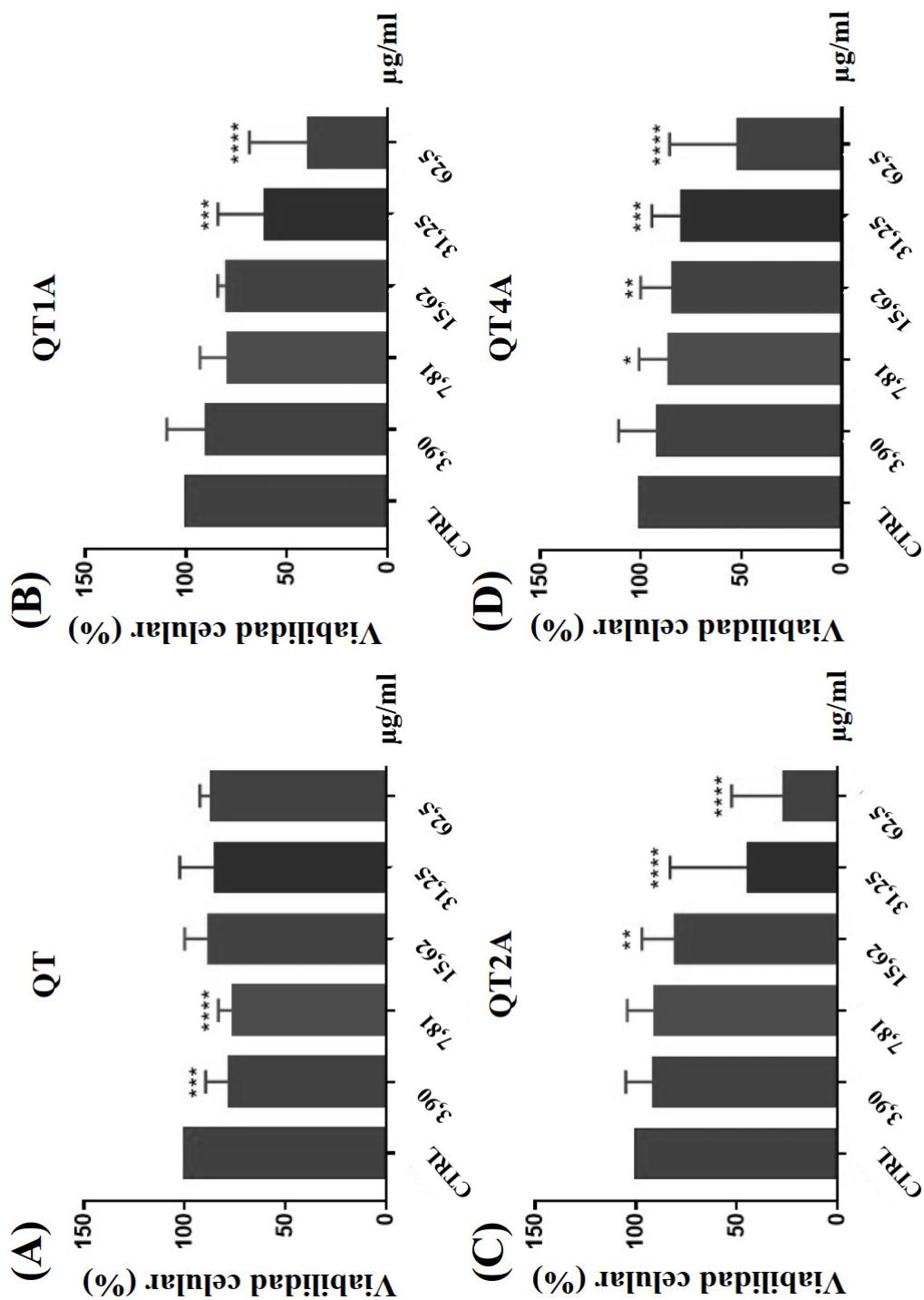


FIG. 4

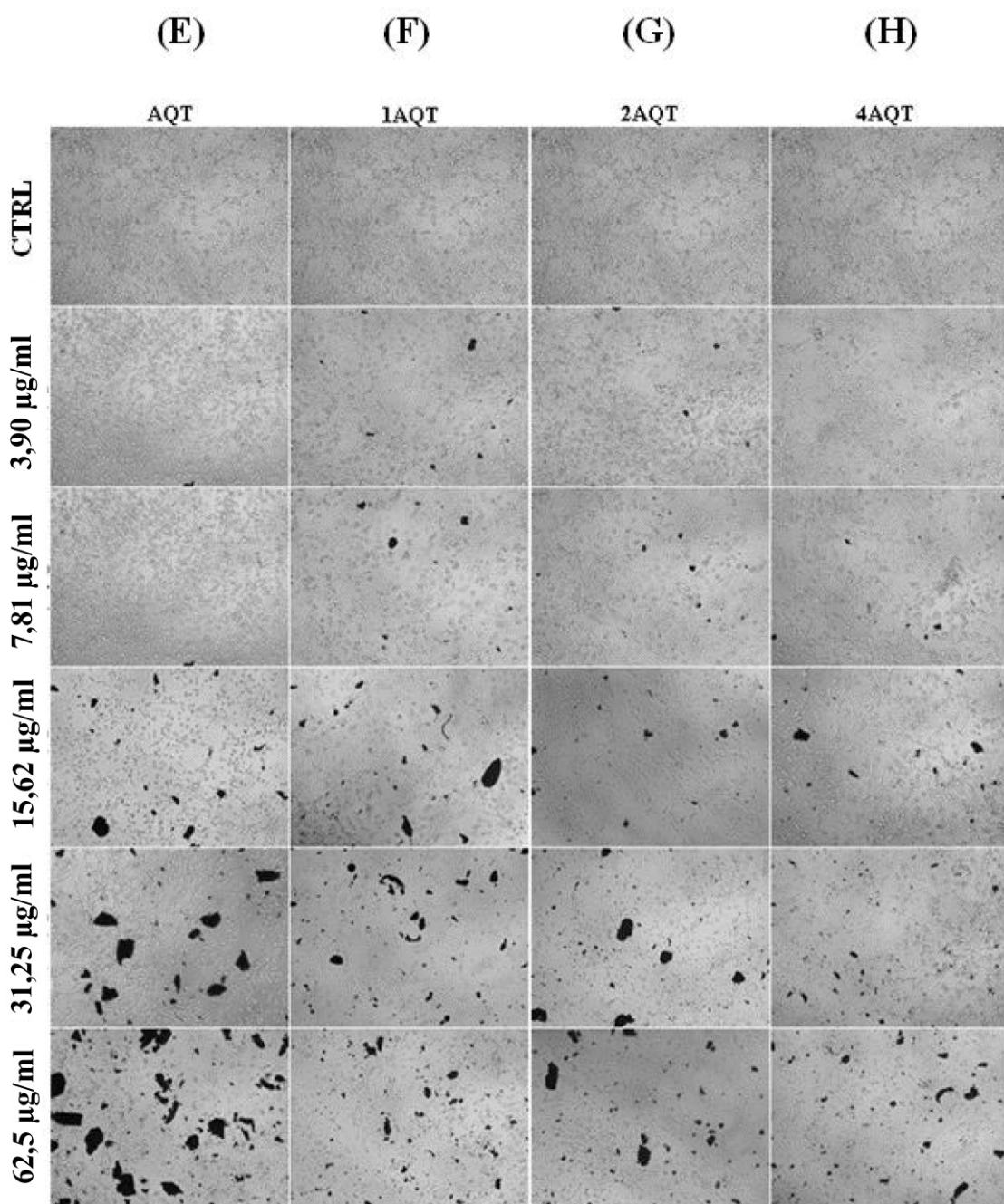
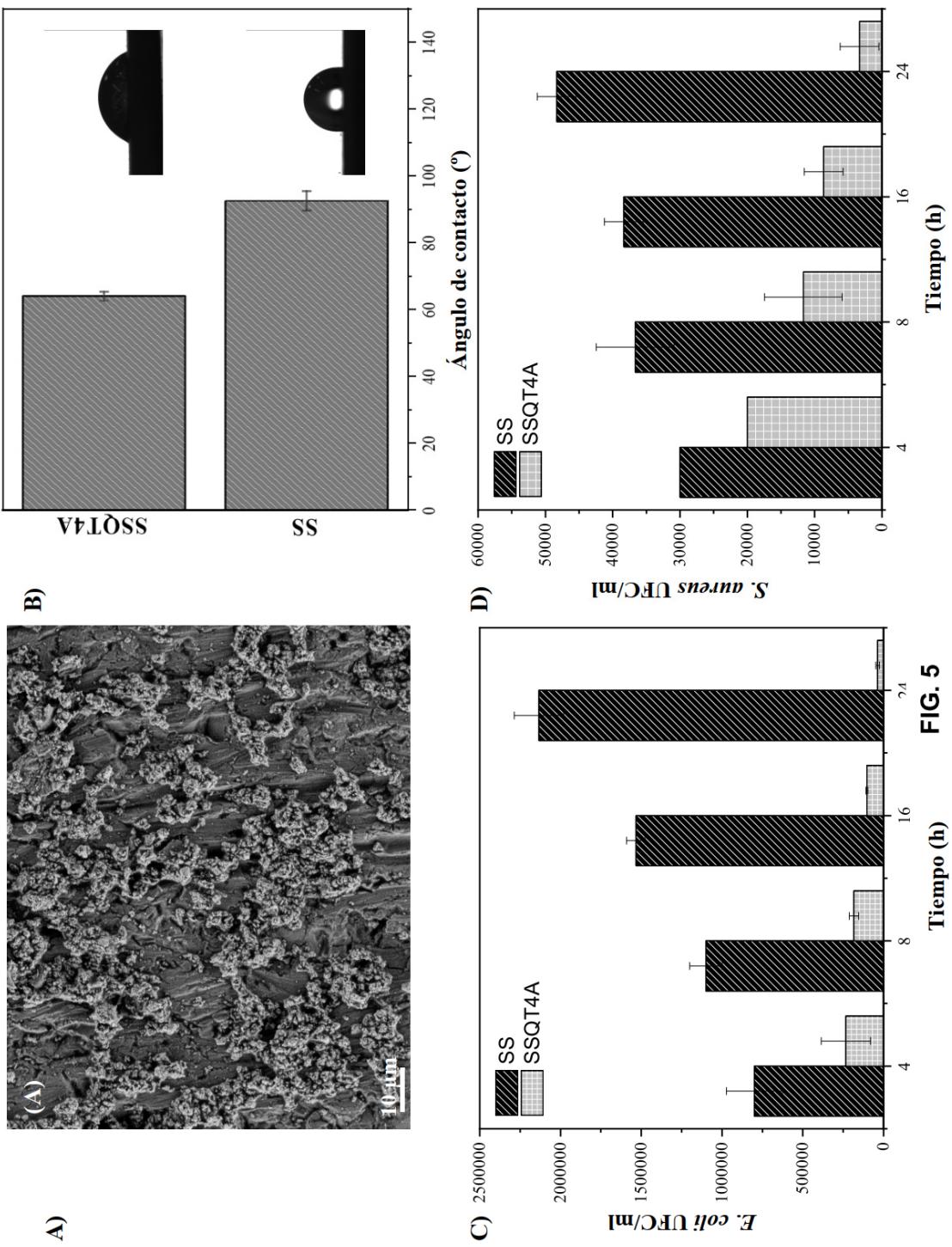


FIG. 4 CONT.





②1 N.º solicitud: 202430227

②2 Fecha de presentación de la solicitud: 26.03.2024

③2 Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤1 Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑥6 Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	PEREIRA PAULA FABIANA SANTOS <i>et al.</i> ; Inactivation of SARS-CoV-2 by a chitosan/alpha-Ag <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> composite generated by femtosecond laser irradiation. <i>Scientific Reports</i> MAY 17 2022, 17/05/2022, Vol. 12, Páginas Article No.: 8118, ISSN 2045-2322(print) ISSN 2045-2322(electronic), <DOI: doi:10.1038/s41598-022-11902-5>	1-14
A	ZHU WENYU <i>et al.</i> ; Ag loaded WO <sub>3</sub> nanoplates for efficient photocatalytic degradation of sulfanilamide and their bactericidal effect under visible light irradiation. <i>Journal of Hazardous Materials</i> , 20160701 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Sharma Virender K; Sirés Ignasi; Alcaide-Monterrubio Francisco, 01/07/2016, Vol. 318, Páginas 407 - 416, ISSN 0304-3894, <DOI: doi:10.1016/j.jhazmat.2016.06.066>	1-14
A	ASSISI M <i>et al.</i> ; Ag Nanoparticles/alpha-Ag <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> Composite Formed by Electron Beam and Femtosecond Irradiation as Potent Antifungal and Antitumor Agents. <i>Scientific Reports</i> JUL 9 2019, 09/07/2019, Vol. 9, Páginas Article No.: 9927, ISSN 2045-2322(print) ISSN 2045-2322(electronic), <DOI: doi:10.1038/s41598-019-46159-y>	1-14
A	MACEDO NADIA G <i>et al.</i> ; Tailoring the Bactericidal Activity of Ag Nanoparticles/alpha-Ag <sub>2</sub> WO <sub>4</sub> Composite Induced by Electron Beam and Femtosecond Laser Irradiation: Integration of Experiment and Computational Modeling. <i>ACS Applied Bio Materials</i> FEB 18 2019, 18/02/2019, Vol. 2, Nº 2, Páginas 824-837, ISSN 2576-6422(print) ISSN 2576-6422(electronic), <DOI: doi:10.1021/acsabm.8b00673>	1-14
A	KHARADE ROHINI R <i>et al.</i> ; Enhanced electrochromic coloration in Ag nanoparticle decorated WO <sub>3</sub> thin films. <i>Electrochimica Acta</i> , 20130329 ELSEVIER, AMSTERDAM, NL. Pumera Martin, 29/03/2013, Vol. 102, Páginas 358 - 368, ISSN 0013-4686, <DOI: doi:10.1016/j.electacta.2013.03.123>	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 nº:

Fecha de realización del informe 07.08.2024	Examinador N. Vera Gutierrez	Página 1/2
--	---------------------------------	---------------

## CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

**C01G41/00** (2006.01)

**C01G5/00** (2006.01)

**A01N59/16** (2006.01)

**C09D5/14** (2006.01)

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

C01G, A01N, C09D

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, PATENW, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE, NPL, XPESP