

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 991 400**

21 Número de solicitud: 202330435

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:

31.05.2023

43 Fecha de publicación de la solicitud:

03.12.2024

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE VALLADOLID (100.0%)
Ctt-Otri- Casa del Estudiante
C/ Real de Burgos, s/n
47011 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 ENCAPSULANTE FORMADO POR g-C₃N₄ Y OLIGÓMEROS DE QUITOSANO ENLAZADOS A HIDROXIAPATITO, PROCESO DE OBTENCIÓN Y USOS**

57 Resumen:

Nanomaterial encapsulante formado por g-C₃N₄ y oligómeros de quitosano enlazados a hidroxiapatito, proceso de obtención y usos

Es objeto de la invención un nanomaterial polimérico con estructura encapsulante constituido por: (a) g-C₃N₄ puro o dopado; y (b) oligómeros de quitosano o quito-oligosacáridos (COS) de bajo peso molecular, unidos mediante enlace directo a hidroxiapatito (HAp); cuyo ensamblaje está mediado por anhídrido metacrílico (AM) como agente de entrecruzamiento, dando lugar a un complejo ternario g-C₃N₄-COS-HAp, pudiendo presentarse en forma de *film*, nanogel o polvo. Es asimismo objeto de la invención su método de obtención y su uso.

ES 2 991 400 A1

DESCRIPCIÓN

NANOMATERIAL ENCAPSULANTE FORMADO POR g-C₃N₄ Y OLIGÓMEROS DE QUITOSANO ENLAZADOS A HIDROXIAPATITO, PROCESO DE OBTENCIÓN Y USOS

5

SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención describe un nuevo nanomaterial polimérico basado en la unión o ensamblaje de componentes minerales y orgánicos que, por su estructura encapsulante (esferoidal y hueca, propia de un portador), su tamaño (nanométrico) y su presentación (en
10 forma de *film*, nanogel o polvo), es especialmente adecuado para vehicular principios activos, así como para la liberación selectiva de distintos compuestos, siendo por tanto idóneo para fines de remediación ambiental de aguas y/o la gestión integrada de plagas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 El tratamiento de las aguas residuales, ya sea por métodos biológicos, físicos o químicos, es un gran reto debido a su generación masiva, al coste asociado y a la composición heterogénea de los contaminantes. Los metales pesados, los compuestos nitrogenados, los pesticidas, los hidrocarburos, los iones inorgánicos, los contaminantes orgánicos hidrofóbicos, los detergentes, los tintes y pigmentos, los componentes farmacéuticos y los
20 contaminantes microbianos están ampliamente presentes en las aguas residuales. Todos ellos se pueden bioacumular a través de las cadenas alimentarias y, en ocasiones, pueden tener efectos perjudiciales para las plantas, los animales y las personas. Se ha descubierto que pueden ser carcinógenos y mutágenos para los seres vivos en función del tiempo de exposición y la dosis. Por ello, se han propuesto distintas tecnologías de tratamiento para
25 eliminar concentraciones elevadas de contaminantes del agua, como la electrólisis, el intercambio de iones, la precipitación química, la filtración por membrana, o la adsorción. Entre estos métodos, la adsorción es una opción atractiva debido a su bajo coste, alta eficiencia y flexibilidad.

30 Por otra parte, las enfermedades asociadas a hongos fitopatógenos son responsables de importantes pérdidas económicas, afectando a los principales cultivos herbáceos y leñosos. El método convencional para proteger los cultivos y mitigar los efectos de fitopatógenos se basa en la pulverización (en muchos casos inespecífica) de pesticidas químicos. No obstante, los efectos deletéreos de estos productos sobre la salud y su impacto ambiental
35 están conduciendo a su progresiva prohibición, siendo imprescindible la búsqueda de

alternativas.

Una vía prometedora para abordar los desafíos anteriormente mencionados consiste en el empleo de nanotransportadores o *nanocarriers*. Esta tecnología, que ha contribuido sustancialmente al desarrollo de la medicina de precisión, también está encontrando aplicaciones en agricultura, al presentar ventajas en términos de aumento de producción de los cultivos, así como de reducción del impacto ambiental asociado a su protección. Los nanotransportadores permiten la vehiculación de moléculas con actividad biológica (fertilizantes, promotores del crecimiento, biorracionales, etc.) y su liberación *ad hoc* de forma controlada en el tiempo.

La presente invención tiene por objeto presentar un nuevo nanomaterial polimérico, cuyas características únicas permiten su aplicación en la captura y eliminación de hongos y bacterias, tóxicos, metales radiactivos y otros contaminantes de aguas (ríos, pozos, piscifactorías, depuradoras, etc.); en la formación de nuevos biocomposites o biosensores; así como en el transporte selectivo (en diversos medios) de agentes de biocontrol o compuestos bioactivos naturales o sintéticos que permitan el control de plagas (por ejemplo, en cultivos agroforestales).

En particular, se trata de un nuevo complejo ternario constituido por nitruro de carbono gráfico ($\text{g-C}_3\text{N}_4$), oligómeros de quitosano (COS, con peso molecular comprendido entre 3000 y 6000 Da), e hidroxapatito (HAp), enlazados mediante anhídrido metacrílico (AM) como agente de entrecruzamiento. Se trata, pues, de un nanomaterial $\text{g-C}_3\text{N}_4$ -COS-HAp.

El nitruro de carbono gráfico ($\text{g-C}_3\text{N}_4$) es un fotocatalizador polimérico sensible a la luz visible que se ha convertido en un material importante debido a sus métodos de preparación sencillos, económicos y respetuosos con el medio ambiente. Presenta además una buena estabilidad, así como óptimas 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. Los precursores más comunes utilizados para preparar $\text{g-C}_3\text{N}_4$ son la melamina, diciandiamida, cianamida, urea, tiourea y tiocianato de amonio. Con el fin de mejorar su rendimiento y modular sus propiedades, existen diferentes métodos, como el dopado con óxidos metálicos, sulfuros metálicos, metales nobles y nanomateriales carbonosos. Entre las opciones anteriores, el empleo de óxidos metálicos es la más habitual para mejorar la eficiencia del $\text{g-C}_3\text{N}_4$, por

ejemplo, aumentando su absorción de luz en el rango visible y reduciendo 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 β -(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 polímeros de origen natural que han sido objeto de 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 quitosano de alto peso molecular. Debido a la presencia de grupos funcionales reactivos amino e hidroxilo, muestra una excelente capacidad de formación de películas, una alta permeabilidad al agua, una buena adhesión y una susceptibilidad a las modificaciones químicas. La presencia de COS en el sistema g-C₃N₄-COS-HAp, aparte de conferir flexibilidad y funcionalización adicional al conjunto de estructura nanodendrímica, permite que la presentación del producto lo sea tanto en forma de *film* como de gel, haciéndolo idóneo para una utilización polivalente. En particular, las partículas del agregado g-C₃N₄-COS-HAp pueden funcionar, simultáneamente, como agentes encapsulantes y de transporte superficial pero, por síntesis *ad hoc*, pueden conseguirse formulaciones en las que predomine una u otra función.

El hidroxiapatito (HAp) es un material inorgánico biocompatible, principal constituyente de huesos y dientes, que se puede encontrar también en rocas ígneas, metamórficas y en el suelo. La actividad del HAp está determinada por su grado de cristalinidad y su anfotericidad. En concreto, cuando la cristalinidad es baja, el área superficial tiende a aumentar, mejorando la adsorción y eliminación de metales pesados. Por otro lado, en niveles de pH elevados, la superficie del HAp se carga negativamente, aumentando su rendimiento en la inmovilización y oxidación de contaminantes tóxicos. Otros factores que también influyen en su eficacia son su microestructura, la formación de redes y la porosidad. Por tanto, debido a su excelente biocompatibilidad y propiedades adsorbentes, el HAp puede utilizarse como biosensor de contaminantes potencialmente peligrosos en el agua, los alimentos y el medio ambiente.

Si bien en el estado de la técnica se ha descrito la posibilidad de combinar g-C₃N₄ con COS y/o HAp, el compuesto resultante de las síntesis realizadas hasta la fecha para el par g-C₃N₄-HAp (Vishwapriya, U., “Hydroxyapatite-Graphitic Carbon Nitride Based Composites: Synthesis, Characterization, and Evaluation of Bioactivity”, ECS Transactions 2022, 107, 16769-16778) no posee las características suficientes para ser considerado un material optimizado a efectos, por ejemplo, de transporte, vehiculación y deposición selectiva. Se impone, pues, la necesidad de desarrollar un nuevo proceso que confiera al par g-C₃N₄-HAp las características de un nanotransportador y que, al mismo tiempo, permita obtener un material de estructura encapsulante, con un tamaño nanométrico y que pueda presentarse como *film*, nanogel o polvo.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Es un primer objeto de la invención un nanomaterial polimérico con estructura encapsulante constituido por:

- g-C₃N₄ puro o dopado con al menos un heteroátomo u óxido metálico (preferentemente, TiO₂) con capacidad de mejorar su comportamiento al modificar su *bandgap* (banda prohibida o brecha energética) o formar heterouniones; y
- oligómeros de quitosano (de entre 5 y 10 monómeros) o quito-oligosacáridos (COS) de bajo peso molecular, entendiendo como tal un peso molecular comprendido entre 3000 y 6000 Da, unidos mediante enlace directo a hidroxiapatito (HAp);

cuyo ensamblaje está mediado por anhídrido metacrílico (AM) como agente de entrecruzamiento, dando lugar a un complejo ternario g-C₃N₄-COS-HAp, pudiendo presentarse en forma de *film*, nanogel o polvo, con un tamaño de nanopartícula que puede variar entre 50 y 200 nm, y preferentemente con un tamaño promedio de 100 nm.

De manera general, la proporción molar de los distintos componentes del nanomaterial g-C₃N₄-COS-HAp puede ser de 0,5:1:1 a 1:1:1.

El nanomaterial reivindicado se trata, por tanto, de un nuevo complejo ternario constituido por g-C₃N₄-COS-HAp, con estructura dendrímica y dimensiones nanométricas.

Respecto a su funcionalidad, es preciso tener en cuenta que, de sus componentes, el quitosano presenta gran cantidad de grupos funcionales, como el hidroxilo y el amino, y es considerado un polication, ya que posee una alta densidad de cargas positivas (lo que

explica su habilidad para unirse a moléculas con carga negativa). Por otra parte, el g-C₃N₄ permite mejorar las propiedades fotocatalíticas y de biosensor del nuevo biocomposite. Finalmente, el hidroxiapatito es un excelente material inorgánico, con múltiples usos en agricultura como fuente de fósforo para obtener fertilizantes de liberación lenta, para
 5 eliminación y/o inmovilización de metales pesados o como biosensor de contaminantes potencialmente peligrosos en el agua, los alimentos y el medio ambiente.

Como se ha descrito anteriormente, las partículas del nuevo agregado g-C₃N₄-COS-HAp pueden funcionar, simultáneamente, como agente encapsulante y de transporte superficial.
 10 Durante su proceso de síntesis, se puede conseguir que predomine una u otra función mediante hidratación del agente de ensamblaje, con objeto de lograr la liberación del compuesto bioactivo de forma controlada.

De manera particular, la estructura del nuevo nanomaterial se caracteriza por presentar:

- 15 i. una morfología esférica;
- ii. HAp, adecuado para actuar como agente de adsorción y biosensor de fosfatos y/o metales pesados (Cu, Sr, Ca);
- iii. g-C₃N₄, adecuado para actuar como fotocatalizador y capturar superficialmente ciertas moléculas contaminantes (como, por ejemplo, rodamina B o naranja de metilo); y
 20
- iv. COS, adecuados para encapsular determinadas especies químicas contaminantes (como, por ejemplo, cobre, hierro y arsénico), así como agentes de biocontrol (entendiendo como tales, por ejemplo, *Bacillus spp.* y *Trichoderma spp.*) o compuestos bioactivos naturales o sintéticos (entendiendo como tales extractos de
 25 especies vegetales como *Rubia tinctorum*, *Uncaria tomentosa*, etc.).

Entre las principales ventajas del nanomaterial reivindicado se pueden destacar las siguientes:

- 30 i. se trata de un sistema ternario (g-C₃N₄-COS-HAp) de alta versatilidad en tanto en cuanto aúna características de nanotransportador (encapsulante), de fotocatalizador y de biosensor (en superficie);
- ii. si bien los híbridos binarios metacrilados g-C₃N₄-AM; HAp-AM y COS-AM han sido descritos en el estado de la técnica, el nuevo material incluye como novedad el enlazamiento, mediado por anhídrido metacrílico, de g-C₃N₄, HAp y COS, confiriendo
 35 a la entidad g-C₃N₄-COS-HAp propiedades inéditas, especialmente la reticulación. La

reticulación entre el g-C₃N₄, COS e HAp, creada por la incorporación del anhídrido metacrílico, confiere al nanomaterial capacidad encapsulante (o de albergar productos activos en su interior);

- 5 iii. es susceptible de mejorar la solubilidad y biodisponibilidad de los compuestos bioactivos cuyo encapsulado y transporte interesa, sin necesidad de incorporar surfactantes u otros compuestos químicos usualmente utilizados. En particular, presenta ventajas frente a otros sistemas de vehiculización de compuestos bioactivos al evitar el uso de aminas sintéticas de reticulación y disolventes orgánicos y, además, presentar una elevada estabilidad en solución;
- 10 iv. permite albergar en su interior, entre otros, agentes terapéuticos con actividad antimicrobiana que cumplen con el Reglamento (CE) No. 1107/2009, relativo a la comercialización de productos fitosanitarios, y que son aptos para Agricultura Ecológica;
- 15 v. adicionalmente, el enlazamiento de las mitades g-C₃N₄, COS e HAp por AM posee características de enlazamiento débil, ofreciendo la capacidad adecuada de liberación de los compuestos biológicamente activos que puede contener en su interior.

En realizaciones particulares de la invención, el nanomaterial reivindicado podrá comprender
 20 adicionalmente al menos un compuesto bioactivo (CBA), de forma análoga a los complejos de inclusión. De manera preferente, dicho CBA puede consistir en un compuesto con actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos. De manera particular, 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
 25 otros) o un agente natural, preferentemente seleccionado entre un polifenol, un terpeno, un aceite terpénico, un carotenoide, un ácido graso, un aceite, un lignano, un prebiótico, una vitamina o una xantofila, así como cualquiera de sus combinaciones. Más preferentemente, el CBA puede tratarse de un polifenol o una mezcla de polifenoles.

30 De manera preferente, el CBA seleccionado tendrá al menos un grupo funcional con capacidad de unirse a la matriz del nanomaterial, preferentemente por enlace de hidrógeno.

Así, el nanomaterial reivindicado se trata de un complejo ternario formado por g-C₃N₄, oligómeros de quitosano e hidroxiapatito (g-C₃N₄-COS-HAp), donde dicho complejo forma
 35 una matriz en la que puede insertarse el compuesto bioactivo (CBA), preferentemente

extractos naturales u otras sustancias básicas referidas en el Reglamento (CE) No. 1107/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo.

La unión del CBA al complejo ternario reivindicado forma un complejo análogo a los conocidos como complejos de inclusión, cuya relación molar $g\text{-C}_3\text{N}_4\text{:COS:HAp:CBA}$ es preferentemente de 0,5:1:1:0,25.

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

- 1) preparar una disolución de quitosano de alto peso molecular (entendiendo como tal un peso molecular comprendido entre 310 y 375 kDa) en agua preferentemente 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 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, entendiendo como tal un peso molecular 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),
- 2) sintetizar un hidrogel de oligómeros de quitosano modificados mediante un agente de entrecruzamiento (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 1% y un 3% en peso respecto al volumen total de la disolución, en presencia preferentemente de tetrahidrofurano (o, alternativamente, dioxano o diclorometano), preferentemente en un porcentaje comprendido entre un 97% y un 99% 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 $\text{C}_3\text{N}_4/\text{ZnO}$ 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 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);

3) preparar hidroxiapatito modificado mediante un agente de entrecruzamiento (anhídrido metacrílico). La preparación del HAp se realiza según el procedimiento de sonicación descrito por Mehta, D., George, S. *"Hydroxyapatite: Synthesis and Characterization"*, Proceedings of International Conference on Materials for the Future - Innovative Materials, Processes, Products and Applications – ICMF 2013, 565-567, con modificaciones en las condiciones de sonicación (utilizando una frecuencia de entre 10 y 20 kHz y alternando ciclos de sonicación de entre 10 e 15 minutos con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos). En relación con la metacrilación propiamente dicha, se realiza preferentemente por dispersión del HAp en una solución de AM en tetrahidrofurano (o, alternativamente, dioxano o diclorometano), preferentemente, preferentemente en THF [por dispersión de 0,5 mL de AM ($\rho=1,035$ g/L y $P_m=154,16$ g/mol) en 25 mL de THF], dando lugar a una solución metacrilada de hidroxiapatito;

4) sintetizar una forma porosa de g-C₃N₄ (puro o dopado) modificado mediante un agente de entrecruzamiento (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 (anhídrido metacrílico), en un porcentaje preferentemente 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 $g-C_3N_4$ metacrilado);

- 5) adicionar la solución de $g-C_3N_4$ modificado mediante el agente de entrecruzamiento (preferentemente, $g-C_3N_4$ metacrilado), obtenido en la etapa 4, al hidrogel de oligómeros de quitosano modificados mediante el agente de entrecruzamiento (preferentemente COS metacrilados), obtenido en la etapa 2, y finalmente a la solución metacrilada de hidroxiapatito obtenida en la etapa 3, 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);
- 6) finalmente, el complejo en solución obtenido en la etapa anterior se mantiene a un pH preferentemente comprendido entre 4 y 5 bajo agitación, durante un periodo preferente de 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 (AM) y dando lugar al complejo $g-C_3N_4$ -COS-HAp, en forma de hidrogel, con una relación molar $g-C_3N_4$ -COS-HAp de entre 1:1:1 y 0,5:1:1.

Gracias al proceso de la metacrilación del quitosano (o de sus oligómeros), se modifican los grupos hidroxilo del mismo, de forma que estos quedan disponibles para su interacción con grupos funcionales ($g-C_3N_4$, CBA, HAp). Asimismo, el proceso de sonicación permite conseguir un enlazamiento débil entre los constituyentes del nanomaterial, lo cual permitirá la liberación adecuada de los compuestos biológicamente activos contenidos en su interior.

En una realización particular en la que se desee formar el complejo $g-C_3N_4$ -COS-HAp 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 ternario $g-C_3N_4$ -COS-HAp (en forma sólida o de hidrogel) de al menos un agente bioactivo (CBA), preferentemente en una proporción en peso de entre un 8 y un 10 % respecto al volumen total de la disolución, seguida preferentemente de una etapa final de purificación. De este modo, el proceso puede comprender:

- a) llevar a cabo las etapas 1 a 5, según han sido anteriormente descritas, de preparación

de una solución que comprende el complejo g-C₃N₄-COS-HAp;

- 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 g-C₃N₄-COS-HAp-CBA. En particular, se forma una dispersión del compuesto bioactivo (CBA) y la matriz formada por g-C₃N₄-COS-HAp que posee características de disolución coloidal o verdadera; y
- d) aislar el complejo g-C₃N₄-COS-HAp-CBA, preferentemente en estado sólido o en forma de gel. En una realización particular en la que el producto final se aísla 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 posterior liofilización. En otra realización particular en la que el complejo g-C₃N₄-COS-HAp-CBA se aísla en forma de gel o de *film*, el proceso de deshidratación podrá llevarse a cabo en moldes de silicona y atmósfera inerte (N₂).

Hay que tener en cuenta que, durante el proceso, el anhídrido metacrílico sobrante en las reacciones de metacrilación se elimina mediante sonicación, agitación y/o sucesivos lavados, siendo preferentemente la concentración molar del g-C₃N₄:COS:HAp de 0,5:1:1 y del g-C₃N₄:COS:HAp:CBA de 0,5:1:1:0,25.

Finalmente, es también objeto de la invención el uso de dicho nanomaterial en forma de *film*, nanogel o polvo, estando diseñado para ser utilizado de manera polivalente y selectiva en remediación ambiental y agricultura, 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 nanomaterial reivindicado pueden funcionar, simultáneamente, como agentes encapsulantes y de transporte superficial, pudiendo diseñarse para que predomine una u otra función. Cuando el complejo se utilice como polvo (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* (por ejemplo, como fitosanitario), el complejo se deshidratará previamente de forma controlada.

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

Adicionalmente, sus características técnicas permiten que sea utilizado para el transporte selectivo de principios activos, mejorando la solubilidad y biodisponibilidad de los mismos, sin necesidad de incorporar surfactantes u otros compuestos químicos usualmente utilizados. De este modo, podrá emplearse, por ejemplo, para el transporte de agentes fitosanitarios, de biocontrol (entendiéndose como agentes de biocontrol sustancias naturales que permiten el control de plagas y enfermedades en los cultivos) o compuestos bioactivos naturales o sintéticos (entendiéndose por compuestos bioactivos sustancias químicas que se encuentra en pequeñas cantidades en las plantas y ciertos alimentos) en diversos medios, pudiendo utilizarse para controlar plagas 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. En otras realizaciones alternativas, podrá emplearse como pasta cicatrizante para proteger cortes de poda y/o como recubrimiento para el tratamiento postcosecha durante el almacenamiento, en cuyo caso podrá aplicarse en forma de nanogel.

En resumen, el nuevo nanomaterial desarrollado puede emplearse tanto en forma de *film*, como de nanogel o polvo, siendo capaz de actuar como agente polivalente y selectivo en remediación ambiental y gestión integrada de plagas, como -por ejemplo- en: (i) control biológico; (ii) atrapamiento o captura, inactivación y eliminación de elementos radioactivos o contaminantes tóxicos en aguas; (iii) depuración y mejora de la calidad de aguas residuales; (iv) realización de tratamientos fitosanitarios en cultivos agroforestales, al ser capaz de transportar de manera segura y eficaz compuestos bioactivos, tanto naturales como de síntesis, o agentes de biocontrol; y (v) actuación como biosensor de contaminantes

potencialmente peligrosos para el ser humano, presentes en el agua, los alimentos y el medio ambiente.

En relaciones preferidas, el nanomaterial con capacidad encapsulante desarrollado puede actuar como nanotransportador para la entrega/liberación de agentes terapéuticos en el tratamiento de:

- a) al menos un hongo, preferentemente de los géneros *Botrytis*, *Botryosphaeria*, *Diplodia*, *Neofusicoccum*, *Fusarium*, *Cryphonectria*, *Dothiorella*, *Lasidiplodia*, *Phaeobotryosphaeria*, *Spencermartinsia*, *Phaeomoniella*, *Phaeoacremonium*, *Codophora*, *Fomitiporia*, *Inocutis*, *Phellinus*, *Stereum*, *Eutypa*, *Eutypella*, *Cryptosphaeria*, *Cryptovalsa*, *Diatrype*, *Diatrypella*, *Pleurostomophora* y *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*.

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*, virus o microalgas; y/o
- b) aguas contaminadas por colorantes u otros contaminantes recalcitrantes (incluyendo elementos radiactivos).

En realizaciones particulares adicionales de la invención, el nanomaterial reivindicado podrá emplearse, por sus propiedades químicas y físicas únicas, para la formación de biocomposites o biosensores de contaminantes tóxicos o potencialmente peligrosos para el ser humano, presentes en el agua, los alimentos o el medio ambiente.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

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:

- **Figura 1.-** Micrografías TEM de los nanotransportadores C₃N₄-COS-HAp sin CBA

encapsulado (izquierda y centro) y con extracto de *Uncaria tomentosa* encapsulado (derecha). El tamaño medio de los nanotransportadores es de 90 nm.

- **Figura 2.-** Diámetro (en mm) del crecimiento del micelio de *B. cinerea* para diferentes concentraciones (de izq. a dcha.: 5,62; 8,43; 11,25; 16,87; 22,5; 33,75; 45; 67,5; 90; y 135 µg/mL) de los nanotransportadores de g-C₃N₄-COS-HAp vacíos y cargados con un extracto de *U. tomentosa*. Las mismas letras sobre las concentraciones indican que no son significativamente diferentes a $p < 0,05$.
- **Figura 3.-** Visualización de la evolución de la podredumbre gris en frutos de fresa sin inocular (control negativo) e inoculados artificialmente con *B. cinerea* (no tratados, control positivo, y tratados con dos concentraciones del nanomaterial cargado con un CBA) durante su almacenamiento postcosecha.

DESCRIPCIÓN PREFERENTE DE LA INVENCION

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) nitruro de carbono grafitico (g-C₃N₄) (ii) oligómeros de quitosano (COS), e (iii) hidroxiapatito (HAp), empleando anhídrido metacrílico (AM) como agente de entrecruzamiento o reticulación, y opcionalmente (iv) al menos un compuesto bioactivo (CBA).

Un aspecto importante de la presente invención son el tipo de interacciones de g-C₃N₄, COS e HAp entre sí y con el anhídrido metacrílico (caracterizadas mediante espectroscopía infrarroja). La formación del complejo ternario metacrilado ocurre mediante un proceso de gelación iónica. En realizaciones particulares en las que se adicione un compuesto biológico activo (CBA), la unión del mismo al nanomaterial ocurre por una interacción muy débil (enlace de hidrógeno o fuerzas electroestáticas), mientras que la interacción con metales pesados ocurre por coordinación. En la aparición de los enlaces mencionados anteriormente es esencial la acción de los ultrasonidos que se aplican. De lo contrario, estos enlaces no aparecen o lo hacen de forma muy lenta, inviabilizando el proceso.

En particular, el nanomaterial reivindicado (que puede incorporar compuestos bioactivos antimicrobianos) es vehicuable en agua ya que, tras el proceso de sonicación por ultrasonidos, resulta nanodispersado, con características de disolución coloidal o verdadera. Adicionalmente, este complejo presenta actividad sinérgica, es decir, la administración de dicho nanomaterial mejora los parámetros frente a la administración por separado de cada uno de sus componentes frente a los fitopatógenos.

A continuación, se describen una serie de ejemplos desarrollados para demostrar las propiedades de la invención:

5 Ejemplo 1. Preparación del nanomaterial obtenido por ensamblaje de g-C₃N₄ con oligómeros de quitosano (COS) e hidroxiapatito (HAp) por medio de anhídrido metacrílico (AM) y su presentación alternativa en forma de sólido o como hidrogel

Los oligómeros de quitosano (COS) se prepararon según el procedimiento descrito en el trabajo 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 indicadas en Sánchez-Hernández, E. et al., *“Lignin–Chitosan Nanocarriers for the Delivery of Bioactive Natural Products against Wood-Decay Phytopathogens”*, Agronomy 2022, 12, 461. En resumen, los oligómeros de quitosano fueron preparados a partir de quitosano de peso molecular alto, de 310 a 375 kDa (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 y, conseguida la disolución, se añadieron de 1,6 a 1,8 mL 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 (preferentemente en ciclos con sonicación de entre 10 y 15 minutos intercalados con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos) para mantener la temperatura en el rango de 30 a 60 °C. Al final del proceso, se obtuvo una solución con un pH en el intervalo de 4 a 6 con oligómeros de peso molecular comprendido entre 3000 y 6000 Da, con un índice de polidispersidad de 1,6, dentro del rango habitual reportado en la literatura (Tian, M. et al., *“Molecular weight dependence of structure and properties of chitosan oligomers”*, RSC Advances 2015, 85). La metacrilación de los oligómeros de quitosano (COS) se llevó a cabo según el procedimiento de 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 utilizaron oligómeros de quitosano, y, en lugar de epiclorohidrina como agente de entrecruzamiento, se empleó anhídrido acrílico (AM). Así, 420 mg de oligómeros de quitosano fueron dispersados en una solución de AM ($\rho=1,035$ g/L y $P_m=154,16$ g/mol) en THF [por dispersión de 0,5 mL de AM en 25 mL de THF]. La mezcla se sonicó en ciclos de entre 10 y 15 minutos intercalados con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos y con una

frecuencia de 10 a 20 kHz. La metacrilación del quitosano (o de sus oligómeros) modifica los grupos hidroxilo y estos quedan disponibles para su interacción con grupos funcionales de otras especies co-encapsulantes (lignina, g-C₃N₄, HAp, entre otros) y con compuestos bioactivos (CBA) susceptibles de encapsulación.

5

A continuación, se obtuvieron nanohojas de alta pureza de g-C₃N₄ a partir de la pirólisis de cianurato de melamina en un crisol tapado bajo atmósfera de aire a 600 °C durante 50 min, según el procedimiento descrito en Dante, R.C. et al., *"Synthesis of crumpled nanosheets of polymeric carbon nitride from melamine cyanurate"*, Journal of Solid State Chemistry, 2013, 201, 153-163.

10

La metacrilación del g-C₃N₄ (dopado) se realizó partiendo de 210 mg de g-C₃N₄ dispersados en una solución de anhídrido metacrílico (AM, $\rho=1,035$ g/L y $P_m=154,16$ g/mol) en tetrahidrofurano (THF) [por dispersión de 0,5 mL de MA en 25 mL de THF]. La mezcla se sonizó en ciclos de entre 10 y 15 minutos intercalados con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos y con una frecuencia de 10 a 20 kHz.

15

Seguidamente, se realizó la metacrilación de 1200 mg de hidroxiapatito, siguiendo el procedimiento de sonicación descrito por Mehta, D.; George, S. *"Hydroxyapatite: Synthesis and Characterization"*, Proceedings of International Conference on Materials for the Future - Innovative Materials, Processes, Products and Applications – ICMF 2013, 565-567, con modificaciones en la frecuencia y tiempos de sonicación (la mezcla se sonizó en ciclos de entre 10 y 15 minutos intercalados con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos y con una frecuencia de 10 a 20 kHz) y la dispersión del HAp en una solución de AM en THF [0,5 mL de AM ($\rho=1,035$ g/L y $P_m=154,16$ g/mol) en 25 mL de THF]. Dicha sonicación generalmente conduce a la formación de polvo cerámico fino que tiene una alta porosidad (Poinern, G.E. et al., *"Thermal and ultrasonic influence in the formation of nanometer scale hydroxyapatite bio-ceramic"*, International Journal of Nanomedicine 2011, 6, 2083-2095).

20

En la siguiente etapa, de mezcla, se adicionó la solución metacrilada de g-C₃N₄ sobre la solución metacrilada de COS, gota a gota con agitación, seguido de sonicación en ciclos de entre 10 y 15 minutos intercalados con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos y con una frecuencia de 10 a 20 kHz, y se mantuvo agitando durante 30 min. Sobre la mezcla anterior, se adicionó la solución metacrilada de hidroxiapatito, gota a gota con agitación, seguido de sonicación durante 5 minutos, alternando periodos de descanso de 1 minuto, y

35

se mantuvo agitando durante 30 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. Finalmente, la solución se liofilizó, respondiendo a la relación molar de 0,5:1:1 g-C₃N₄-COS-HAp.

En el caso particular de que se opte el producto en forma de hidrogel, la preparación de la mezcla metacrilada de g-C₃N₄, COS y Hap se lleva a cabo según la descripción precedente, pero modificando la etapa final. En particular, una vez formada la solución y centrifugada, se procede a verter, gota a gota, sobre una solución acuosa de NaOH 0,5 M, durante aproximadamente 30 minutos. Seguidamente, la mezcla se somete a sonicación durante otros 30 minutos, en periodos de 5 minutos. La solución resultante se mantiene a temperatura ambiente durante 12 horas bajo agitación y, a continuación, se lava con agua repetidamente. Finalmente, se procede al secado durante 24 horas a 110 °C.

Ejemplo 2: Encapsulación de un extracto de *Uncaria tomentosa* (UT) en nanotransportadores de g-C₃N₄-COS-HAp y su formulación en estado de liofilizado e hidrogel

El extracto a encapsular fue obtenido a partir de corteza de uña de gato (*Uncaria tomentosa*) procedente de La Merced, Chanchamayo, Perú. Las muestras, de color dorado, fueron mezcladas, secadas y pulverizadas en una trituradora mecánica hasta obtener un polvo fino. Se mezcló el polvo de *U. tomentosa* con el medio hidroamoniaco en una relación 1:20 (p/v) y se calentó en un baño de agua a 50 °C durante 30 min, con ciclos de sonicación entre 10 y 15 minutos intercalados con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos y con una frecuencia de 10 a 20 kHz. La disolución fue centrifugada a 9000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se filtró a través de papel de filtro Whatman No. 1. Seguidamente, se liofilizó para obtener el polvo sólido utilizado como compuesto bioactivo a encapsular (CBA) en el complejo g-C₃N₄:COS:HAp. Para ello, se adicionaron 105 mg de este CBA sobre el complejo citado (obtenido según se ha descrito anteriormente, en el ejemplo 1) y la mezcla se sometió a sonicación en ciclos de entre 10 y 15 minutos intercalados con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos, con una frecuencia de 10 a 20 kHz, mientras se controlaba la temperatura de trabajo (inferior siempre a 60 °C) y el pH (entre 4 y 5). La solución resultante obedeció a la relación molar g-C₃N₄:COS:HAp:CBA de 0,5:1:1:0,25, siendo la concentración final del CBA del 9 %.

La preparación de los hidrogeles se realizó del mismo modo, pero añadiendo una etapa adicional de precipitación del hidrogel con NaOH 0,5M. Posteriormente, se procedió a lavar el hidrogel con agua abundante y se caracterizó según el ejemplo 3.

5

En cuanto a la eficiencia de encapsulación (EE) del extracto de la planta, se determinó utilizando el método indirecto propuesto por Fischer, J. et al., "*Targeted Drug Delivery in Plants: Enzyme-Responsive Lignin Nanocarriers for the Curative Treatment of the Worldwide Grapevine Trunk Disease Esca*", Advanced Science 2019, 6, 1802315. Brevemente, la muestra se centrifugó a 10.000 rpm (60 min) y el sobrenadante que contenía el extracto de la planta no encapsulado se liofilizó primero, posteriormente se redisolvió en metanol:agua (1:1, v/v), se pasó por un filtro de 0.2 µm y se analizó mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un sistema HPLC de la serie Agilent 1200. Las condiciones operativas de este análisis fueron las estipuladas en Krizsán et al., "*HPLC analysis of anthraquinone derivatives in madder root (Rubia tinctorum) and its cell cultures*", Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies 2006, 19, 2295-2314: fase móvil de metanol-5% - ácido acético (pH 3) (70 a 30); volumen de inyección de 10 µL; temperatura de la columna de 20 °C; caudal de 0,2 mL/min y detector G1315D, operado a 250 nm. La eficiencia de encapsulación se determinó como $EE(\%) = \frac{(m(\text{extracto inicial}) - m(\text{extracto sobrenadante}))}{m(\text{extracto inicial})} \times 100$, siendo superior al 95 %.

20

En cuanto a la eficiencia de liberación (EL), los ensayos de liberación se realizaron añadiendo una cantidad ponderada del nanotransportador o nanocarrier (NC) cargado con el compuesto bioactivo (CBA) liofilizado (obtenido previamente en el ensayo de eficiencia de encapsulación) y 2,5 U de quitosanasas (EC 3.2.1.132) a una solución de metanol:agua (1:1, v/v) bajo agitación ligera (150 rpm) en la oscuridad durante 2 h. Se tomó una alícuota del extracto de *U. tomentosa* liberado y se analizó por el mismo método empleado para determinar el extracto residual (es decir, no encapsulado). La eficacia de la liberación se calculó a partir de la cantidad de extracto liberado como porcentaje de la cantidad total de extracto encapsulado en las NC, siendo superior al 80 %.

30

Ejemplo 3: Caracterización del nuevo nanomaterial

Caracterización por espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR) y Reflectancia Total Atenuada (ATR)

35

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

Los espectros del nanomaterial de $g\text{-C}_3\text{N}_4\text{-COS-HAp}$ ensamblado mediante AM como agente de entrecruzamiento se recogen en la Tabla 1. La presencia de bandas a 806 y 890 cm^{-1} es atribuible al modo vibracional de “*breathing*” de las unidades de tri-s-triazina y al modo de deformación de los enlaces N-H, respectivamente. Las bandas ubicadas entre 1100 y 1700 cm^{-1} se asignan a los modos de tensión típicos de los heterociclos CN, mientras las bandas ubicadas entre 2200 y 2500 cm^{-1} se pueden asignar a la presencia de un triple o un doble enlace ($\text{C}=\text{N}$ o $\text{C}=\text{C}$). Adicionalmente, las bandas a 2800 y 3300 cm^{-1} son consistentes con la vibración de tensión N-H y/o C-H. Además de las bandas anteriores, atribuidas a $g\text{-C}_3\text{N}_4$, se observa una señal entre 900 y 1100 cm^{-1} correspondiente a los grupos PO_4^{3-} del hidroxiapatito, confirmando con ello su presencia en el material compuesto.

Tabla 1. Principales bandas en el espectro infrarrojo del nanomaterial $g\text{-C}_3\text{N}_4\text{-COS-HAp}$ puro (nanotransportadores vacíos) y tras encapsulado de un compuesto bioactivo (CBA) como es el extracto hidrometanólico de *Uncaria tomentosa*.

Número de onda (cm^{-1})		Asignación
$g\text{-C}_3\text{N}_4\text{-COS-HAp}$	$g\text{-C}_3\text{N}_4\text{-COS-HAp-CBA}$	
3254	3250	banda -NH ($g\text{-C}_3\text{N}_4$)
3161	3158	--
3093	3091	deformación C-H (aromáticos)
2930		alifáticos (CH y CH_3)
	2897	tensión C-H
2859		--tensión C-H
	2491	--C-H tensión simétrica
	2360	C=O simétrica y asimétrica
	2345	tensión antisimétrica de CO_2
1628	1629	característica de OH
1718, 1617, 1569		acrilado
1541	1537	combinación de vibraciones de flexión -NH y tensión C-N en complejos de amida
1458, 1411	1456	P-O
	1402	C=O tensión simétrica de grupos COO^-
1394		tensión C-N ⁺
1310	1315	oscilante CH_2

1231	1234	tensión C-N
1204	1206	tensión C-O
	1074	fosfato
920		CH ₂ tensión en el plano asimétrica--
890	890	deformación C=C
806	807	tensión axial C-C
	703	flexión fuera del plano C-H
563		P-O

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

La caracterización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó con un microscopio JEOL (Akishima, Tokio, Japón) JEM 1011 HR. Condiciones de funcionamiento: 100 kV; 25.000-120.000 aumentos. Las micrografías se obtuvieron con una cámara CCD GATAN ES1000W (4000 × 2672 píxeles). Se utilizó acetato de uranilo (2%) para la tinción negativa de las muestras. Los nanotransportadores se muestran en la Figura 1.

Ejemplo 4: Actividad fotocatalítica

Para evaluar la actividad fotocatalítica del nanomaterial g-C₃N₄-COS-HAp, se realizaron ensayos de degradación del colorante rodamina B (RhB) bajo irradiación de luz visible ($\lambda > 420$ nm), siguiendo el protocolo descrito por Dong, G.; Zhang, L. *“Porous structure dependent photoreactivity of graphitic carbon nitride under visible light”*, Journal of Materials Chemistry 2012, 22, 1160-1166, con pequeñas modificaciones. En concreto, los ensayos se llevaron a cabo a una concentración más elevada de RhB (10 mg/L en lugar de 5 mg/L) en el mismo volumen (100 mL). Se eligió como fuente de luz visible una lámpara de xenón de 300 W con un filtro de corte de 420 nm. Los nanotransportadores de g-C₃N₄-COS-HAp (0,1 g) se dispersaron en 100 mL de solución acuosa de 10 mg/L de RhB en un recipiente con una camisa de agua de refrigeración en el exterior. Para obtener un equilibrio de adsorción-desorción entre el material ensayado y el RhB, la solución se agitó en la oscuridad durante 2 h. Durante la irradiación, se tomaron unos 4 mL de las suspensiones a intervalos de 10 min (durante un periodo de 2 h) y posteriormente se centrifugaron para eliminar los nanotransportadores. La concentración de RhB se determinó mediante mediciones de absorbancia a 550 nm con un espectrofotómetro Multiskan GO Microplate (Fisher Scientific). La constante de reacción (k) se calculó como $\ln(C/C_0) = -kt$, donde C es la concentración para cada tiempo ensayado, y C_0 es la concentración inicial cuando se alcanzó el equilibrio de adsorción/desorción. El nanomaterial logró degradar la totalidad de la RhB en menos de 90 minutos. La constante de reacción fue de aproximadamente 0.03 min^{-1} .

Se realizaron ensayos fotocatalíticos adicionales sobre la capacidad del nanomaterial de g-C₃N₄-COS-HAp para reducir el U(VI) a U(IV) bajo luz visible, siguiendo la metodología descrita en Wang, J. et al., “*Tunable mesoporous g-C₃N₄ nanosheets as a metal-free catalyst for enhanced visible-light-driven photocatalytic reduction of U(VI)*”, Chemical Engineering Journal 2020, 383, 123193, con modificaciones en las cantidades empleadas. Se añadieron 30 mg de g-C₃N₄-COS-HAp en 60 mL de solución de UO₂(NO₃)₂ a una concentración de 3 mg/L (con 3 mL de metanol como agente sacrificial). El valor del pH se ajustó a 6,0. Al igual que en el procedimiento de degradación de la RhB descrito anteriormente, la irradiación con luz visible se obtuvo de una lámpara Xe de 300 W equipada con un filtro de corte de 420 nm. Antes de la irradiación, el sistema de reacción se burbujó con N₂ en la oscuridad durante 2 horas para alcanzar el equilibrio de adsorción-desorción y mantener las condiciones anaeróbicas. Durante la irradiación, se pipetearon alícuotas de 1 mL de suspensión, que se filtraron rápidamente. La concentración de U(VI) se midió por espectrofotometría UV-vis a 652 nm utilizando Arsenazo III. La constante de velocidad de fotorreacción (k) se calculó basándose en la cinética de pseudo primer orden como $\ln(C/C_0) = -kt$, donde C representa la concentración de uranio(VI) en un momento dado, y C_0 representa la concentración inicial. Se logró la completa reducción de U(VI) a U(IV) en menos de 45 minutos. La constante k resultó ser de en torno a 0.2 min⁻¹.

Ejemplo 5: Ensayos de actividad antifúngica del nuevo nanomaterial g-C₃N₄-COS-HAp, antes y después de la encapsulación de un extracto de *Uncaria tomentosa* (UT) como CBA

Los nanotransportadores g-C₃N₄-COS-HAp, vacíos (sin CBA) y cargados con extracto de *U. tomentosa* (con CBA), se ensayaron frente a *B. cinerea*. Su actividad antifúngica se determinó por el método de dilución en agar, según los procedimientos estandarizados de ensayo de eficacia 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 (de nanotransportadores vacíos o cargados con extracto *U. tomentosa*) en un medio de agar papata dextrosa (PDA) para obtener concentraciones en el intervalo de 62,5 a 1500 µg/mL⁻¹. Se transfirieron tapones de micelio fúngico ($\varnothing = 5$ mm) de los márgenes de un cultivo de *B. cinerea* en PDA 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). Las placas se incubaron a 25 °C en la oscuridad durante una semana. El medio PDA sin ninguna modificación se utilizó como control. La inhibición del crecimiento micelial se estimó según la

fórmula $((d_c - d_t)/d_c) \times 100$, donde d_c y d_t representan los diámetros medios de la colonia fúngica de control y de la colonia fúngica tratada, respectivamente. Las concentraciones efectivas (CE₅₀ y CE₉₀) se estimaron utilizando el análisis PROBIT en el software IBM SPSS Statistics v.25 (IBM; Armonk, NY, USA).

5

En la Figura 2 se muestra el diámetro de crecimiento del micelio de *B. cinerea* para los nanotransportadores de g-C₃N₄-COS-HAp vacíos y cargados con *U. tomentosa* (UT). Los componentes del nanotransportador presentan actividad antifúngica *per se*, inhibiendo al fitopatógeno a una concentración de 45 µg/mL, pero dicha actividad fue mejorada al encapsular el extracto de *U. tomentosa*, logrando la completa inhibición del crecimiento micelial a una concentración de 22,5 µg/mL.

10

Ejemplo 6: Ensayos de protección postcosecha en frutos de fresa frente a la infección por *B. cinerea*

15

En condiciones controladas de laboratorio, se evaluó la eficacia de los nanotransportadores de C₃N₄-COS-HAp cargados con el extracto de *U. tomentosa* (UT) para la protección post-cosecha de frutos de fresa de la variedad Fortuna, que fueron inoculados con el fitopatógeno de forma artificial. El protocolo se modificó ligeramente a partir del propuesto por Sánchez-Hernández *et al.* “Bark extract of *Uncaria tomentosa* L. for the control of strawberry phytopathogens”, Horticulturae, 2022, 8(8), 672-689, con la aplicación del tratamiento en forma de hidrogel para el recubrir los frutos. Las fresas se desinfectaron durante 2 minutos con una solución de NaOCl al 3%, después se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron en una campana de flujo laminar sobre papel absorbente estéril. Las fresas se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos homogéneos de 45 frutos (es decir, tres repeticiones con 15 frutos por repetición y tratamiento), asegurándose de que todos los frutos estuvieran en el intervalo de 20-30 g/fruto y que fueran mayores de 25 mm de diámetro. Se trataron dos grupos con la formulación para la que se registró mayor actividad *in vitro* contra *B. cinerea* en el Ejemplo 5, es decir, con los nanotransportadores de C₃N₄-COS-HAp cargados con extracto de *U. tomentosa* (UT), a diferentes concentraciones (MIC y MIC×2, es decir, 22,5 y 45 µg/mL), mientras que los otros grupos sirvieron como control negativo (sin tratamiento y sin patógeno) y positivo (con patógeno y sin tratamiento). Se hicieron heridas superficiales (Ø = 5 mm) en la zona ecuatorial de cada fruto; a continuación, se sumergieron las fresas en el tratamiento con la solución en forma de gel del tratamiento de C₃N₄-COS-HAp-UT durante cinco minutos, y se secaron a temperatura ambiente en una campana de flujo laminar, utilizando papel absorbente estéril. En las heridas superficiales se

30

35

colocó un tapón de un cultivo de PDA de *B. cinerea* (con el micelio orientado hacia la herida del fruto). Los frutos se colocaron en cajas de plástico tapadas y se almacenaron durante siete días a 4 °C y 95-98% HR, y después se expusieron a un periodo de conservación de 4 días a 20 °C y 95-98% HR. Durante el almacenamiento, se analizó el porcentaje de frutos infectados y la gravedad de la enfermedad (según una escala empírica con seis grados: 0, fruta sana; 1, 1-20% de superficie de fruta infectada; 2, 21-40% de superficie de fruta infectada; 3, 41-60% de superficie de fruta infectada; 4, 61-80% de superficie de fruta infectada; 5, más del 81% de superficie infectada con esporulación).

En cuanto a los atributos de calidad, la firmeza se midió en la zona central de las fresas (previamente cortadas en mitades) utilizando un analizador de textura TA-XT2 (Stable Micro Systems, Godalming, Reino Unido) con una sonda plana de 5 mm de diámetro. La profundidad de penetración fue de 5 mm y la velocidad de la cruceta fue de 5 mm/s. Los resultados se presentan en la Tabla 2 y la Figura 3. A una concentración de 22,5 µg/mL, el tratamiento evitó el desarrollo de la enfermedad hasta el séptimo día, y logró una reducción notable hasta el noveno día, pero la severidad el undécimo día fue significativa. A la concentración mayor (45 µg/mL), el control de podredumbre gris mejoró, logrando mantener el nivel de daño bajo hasta el undécimo día.

Tabla 2. Evolución de la severidad de la podredumbre gris en frutos de fresa sin inocular (control negativo) e inoculados artificialmente con *B. cinerea* (no tratados, control positivo, y tratados con dos concentraciones del nanomaterial cargado con un CBA) durante su almacenamiento postcosecha.

Tiempo (días)	Control negativo	Control positivo	C ₃ N ₄ -COS-HAp-Ut (22,5 µg/mL)	C ₃ N ₄ -COS-HAp-Ut (45 µg/mL)
1	0	0	0	0
3	0	0,3	0	0
5	0	0,8	0	0
7	0	1,3	0	0
9	0	3,1	1	0,3
11	0	4,5	3,7	1,6

REIVINDICACIONES

1. Nanomaterial polimérico con capacidad encapsulante caracterizado por que comprende:

- g-C₃N₄ puro o dopado; y
- oligómeros de quitosano (COS) de bajo peso molecular unidos mediante enlace directo a hidroxiapatito (HAp),

donde dicho nanomaterial consiste en un complejo ternario g-C₃N₄-COS-HAp constituido por un ensamblaje de g-C₃N₄, COS y HAp mediante anhídrido metacrílico (AM) como agente de entrecruzamiento.

2. Nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 1, donde dicho nanomaterial se presenta en forma de *film*, nanogel o polvo.

3. Nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 1 o 2, donde la proporción molar de los distintos componentes del nanomaterial g-C₃N₄-COS-HAp varía de 0,5:1:1 a 1:1:1.

4. Nanomaterial de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dicho nanomaterial comprende adicionalmente al menos un compuesto bioactivo (CBA) encapsulado.

5. Nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 4, donde la relación molar g-C₃N₄:COS:HAp:CBA es de 0,5:1:1:0,25.

6. Nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 4 o 5, donde el compuesto bioactivo encapsulado es un compuesto agroquímico de síntesis con actividad antimicrobiana frente a fitopatógenos.

7. Nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 4 o 5, donde el compuesto bioactivo encapsulado es un agente natural seleccionado de un grupo que consiste en polifenoles, terpenos, aceites terpénicos, carotenoides, ácidos grasos, aceites, lignanos, prebióticos, vitaminas y xantofilas, así como cualquiera de sus combinaciones.

8. Método de obtención de un nanomaterial de acuerdo a la reivindicación 1, caracterizado por que comprende las siguientes etapas:

- 1) preparación de una disolución de quitosano de alto peso molecular 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 90% en peso de ácido acético o ácido cítrico con agitación constante donde, una vez obtenida la disolución, se añade neutrasa, dando lugar a una disolución de COS de bajo peso molecular,

2) adición de un agente de entrecruzamiento que consiste en anhídrido metacrílico a la disolución de COS obtenida en la etapa 1, en presencia de tetrahidrofurano, dioxano o diclorometano, dando lugar a un hidrogel de oligómeros de quitosano modificados mediante anhídrido metacrílico como agente de entrecruzamiento;

3) adición de hidroxiapatito a una solución de anhídrido metacrílico en tetrahidrofurano, dioxano o diclorometano, dando lugar a una solución metacrilada de hidroxiapatito;

4) adición de g-C₃N₄ puro o dopado a una solución de anhídrido metacrílico en tetrahidrofurano, dioxano o diclorometano, dando lugar a una solución de g-C₃N₄ modificado mediante anhídrido metacrílico;

5) adición de la solución de g-C₃N₄ modificado mediante anhídrido metacrílico, obtenido en la etapa 4, al hidrogel de oligómeros de quitosano modificados mediante anhídrido metacrílico, obtenido en la etapa 2 y, a continuación, a la solución metacrilada de hidroxiapatito obtenida en la etapa 3, y someter a la mezcla a un proceso de sonicación por ultrasonidos a una temperatura comprendida entre 30 y 60 °C, aplicando ultrasonidos con una frecuencia de entre 10 y 20 kHz de manera intermitente, en ciclos de sonicación de entre 10 y 15 minutos intercalados con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos, dando lugar a una solución del complejo g-C₃N₄-COS-HAp metacrilado;

6) mantenimiento del complejo g-C₃N₄-COS-HAp metacrilado en solución obtenido en la etapa anterior 5 a un pH de entre 4 y 5 bajo agitación, siendo sometido a continuación a un proceso de centrifugación y lavado con agua, eliminando el exceso de anhídrido metacrílico y dando lugar al complejo g-C₃N₄-COS-HAp, en forma de hidrogel, con una relación molar g-C₃N₄-COS-HAp de entre 1:1:1 y 0,5:1:1.

9. Método de acuerdo a la reivindicación 8, donde las etapas (1) a (3) se llevan a cabo a una temperatura de entre 30 y 60 °C y aplicando ultrasonidos con una frecuencia de entre 10 y 20 kHz de manera intermitente, en ciclos de sonicación de entre 10 y 15 minutos intercalados con ciclos sin sonicación de entre 5 y 10 minutos.

10. Método de acuerdo a la reivindicación 8 o 9, donde dicho método comprende una etapa final de liofilización, dando lugar al complejo g-C₃N₄-COS-HAp en forma sólida o en polvo.

11. Método de acuerdo a la reivindicación 8 o 9, donde dicho método comprende una etapa adicional de adición al complejo g-C₃N₄-COS-HAp de al menos un agente bioactivo (CBA) mediante la mezcla de la solución del complejo g-C₃N₄-COS-HAp metacrilado
5 obtenida en la etapa (5) con una solución del agente bioactivo (CBA), sometiendo 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, en ciclos con 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-HAp-CBA en
10 estado gel.
12. Método de acuerdo a la reivindicación 11, donde dicho método comprende una etapa adicional de secado o liofilización, dando lugar al complejo g-C₃N₄-COS-HAp-CBA en estado sólido.
15
13. Uso de un nanomaterial de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para el transporte selectivo de al menos un principio activo o agente terapéutico.
14. Uso de un nanomaterial de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7
20 para la depuración de aguas y/o como agente fitosanitario, siendo aplicado a los cultivos mediante pulverización, a través del riego o vía endoterapia.
15. Uso de un nanomaterial de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para proteger cultivos, siendo aplicado como pasta cicatrizante en cortes de poda.
25
16. Uso de un nanomaterial de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el tratamiento postcosecha de cultivos, siendo aplicado como recubrimiento de protección durante su almacenamiento.
17. Uso de un nanomaterial de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7
30 como fotocatalizador.
18. Uso de un nanomaterial de acuerdo a una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 para la formación de biocomposites o biosensores de contaminantes tóxicos o
35 potencialmente peligrosos para el ser humano.

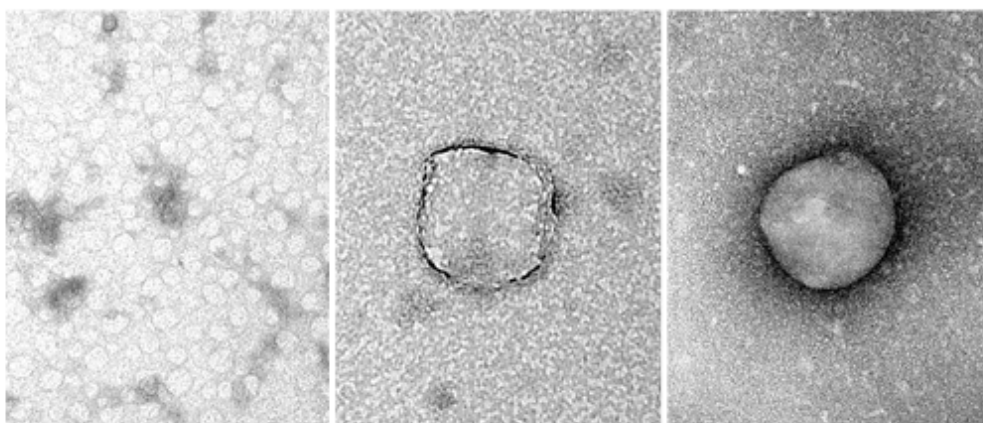


FIG. 1

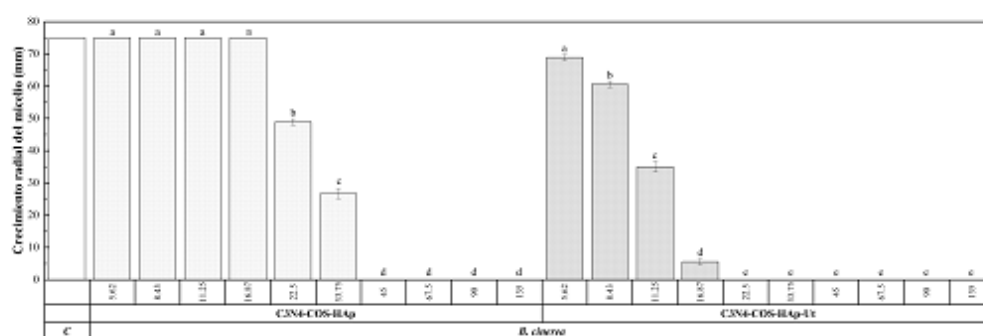


FIG. 2

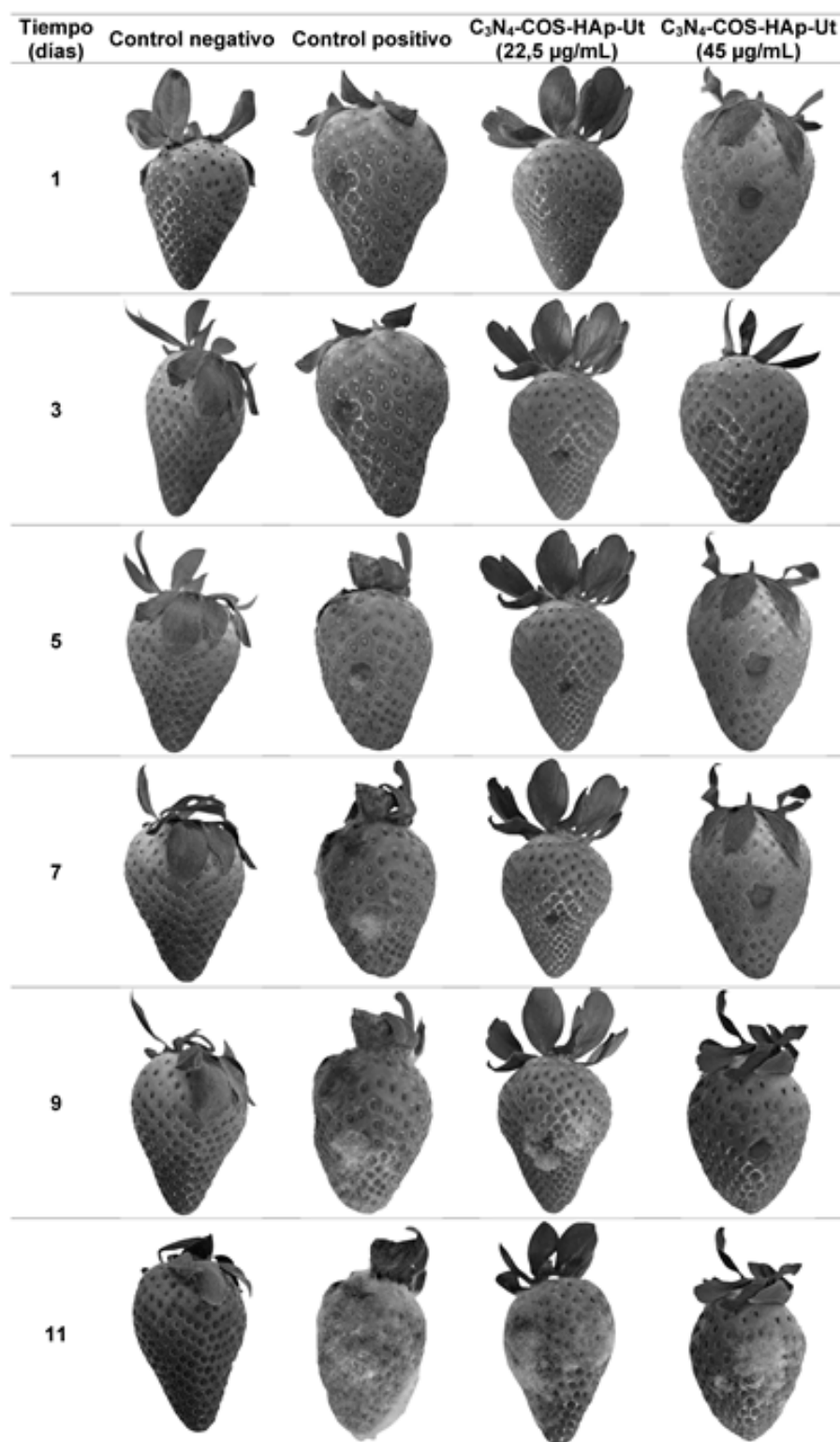


FIG. 3



- ②① N.º solicitud: 202330435
②② Fecha de presentación de la solicitud: 31.05.2023
②③ 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	SABZINI, M., et al., Development of chitosan/halloysite/graphitic-carbon nitride nanovehicle for targeted delivery of quercetin to enhance its limitation in cancer therapy: An in vitro cytotoxicity against MCF-7 cells, International Journal of Biological Macromolecules, 31/01/2023, Vol. 226, páginas 159-171, ISSN 0141-8130(print) ISSN 1879-0003(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.ijbiomac.2022.11.189>; resumen.	1-18
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, 21/05/2022, Vol. 74, páginas 103443, <DOI: https://doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103443>; resumen.	1-18
A	ABDOUSS, H., et al., Green synthesis of chitosan/polyacrylic acid/graphitic carbon nitride nanocarrier as a potential pH-sensitive system for curcumin delivery to MCF-7 breast cancer cells, International Journal of Biological Macromolecules, 29/05/2023, Vol. 242, N° Part 3, páginas Article No.: 125134, ISSN 0141-8130(print) ISSN 1879-0003(electronic), <DOI: doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.125134>; resumen.	1-18
A	WANG, W., et al., Chitosan/hydroxyapatite modified carbon/carbon composites: synthesis, characterization and: in vitro biocompatibility evaluation, RSC Advances, 29/07/2019, Vol. 9, N° 40, páginas 23362 - 23372, ISSN 2046-2069 (electronic), <DOI: doi: 10.1039/c8ra10396h>; resumen.	1-18
A	SUMATHRA, M., et al., Cisplatin-Loaded Graphene Oxide/Chitosan/Hydroxyapatite Composite as a Promising Tool for Osteosarcoma-Affected Bone Regeneration, ACS omega, 01/11/2018, Vol. 3, N° 11, páginas 14620 - 14633, ISSN 2470-1343 (Print), <DOI: doi:10.1021/acsomega.8b02090 pubmed:30555982>; resumen.	1-18

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
20.03.2024

Examinador
M. d. García Poza

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, MEDLINE, BIOSIS, INSPEC