

Armenia, 19 de abril de 2018

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Oficina de patentes.

Con respecto al requerimiento relacionado en el Oficio N° 1926 Ref. Expediente N° NC2016/0001633 nos permitimos expresar lo siguiente:

Sobre la Reivindicación No. 1:

El Coloide-cación de plata, producto y método de aplicación en plantaciones de plátano y banano infestados con la marchitez bacteriana y mal de panamá, respectivamente; se caracteriza por su baja concentración, lo que garantiza la fácil asimilación por inyección directa en el tallo de la planta, y por una distribución de tamaños de partícula que lleva a una alta efectividad en la reducción de los microorganismos que producen estas enfermedades.

Se trata de un producto para uso agrícola únicamente. En particular, la invención se refiere a una suspensión de cationes de plata, sintetizada por un método electroquímico, que contribuye a incrementar los rendimientos productivos del plátano, ya que elimina la marchitez bacteriana producida por *R. solanacearum* en el cultivo de plátano y el mal de panamá causado por el hongo *Fusarium oxysporum* en el cultivo de banano. Así mismo, la invención se refiere al producto y al método de aplicación.

En las últimas décadas en Colombia la bacteria *Ralstonia solanacearum* y el hongo *Fusarium oxysporum* han infectado gran parte de la zona productora de plátano, debido a la fácil propagación de estos microorganismos, que son considerados fitopatógenos altamente agresivos; lo que representa un problema económico y social (Hayward 1995; Castañeda *et al* 2005).

Uno de los métodos que han sido utilizados anteriormente para tratar de controlar esta enfermedad ha sido la aplicación de glifosato en las plantas enfermas, después se cubre la planta fumigada con un plástico transparente con filtro UV; esto provoca la muerte de la planta y de la bacteria (Patricio *et al* 2005), pero no es conveniente para la producción por el efecto que tiene sobre el suelo. Otro

método utilizado es el uso de lixiviado del compost de plátano que se produce de forma económica en las fincas y se puede utilizar como bioplaguicida en 75 días, pero no se ha demostrado que sea efectivo (Toomey 2004). Para contrarrestar el efecto de estas enfermedades también se han utilizado técnicas químicas, a través del uso de formaldehidos, sales y otros para desinfectar de forma rápida los suelos y se usan insecticidas para el control de transmisores (DIRECCIÓN NACIONAL DE MEDIO AMBIENTE, 2002). Estas prácticas no son eficaces para la erradicación de estas enfermedades, ni son rentables para la producción agrícola.

Otras estrategias de manejo y mitigación de daños de estas enfermedades consisten en la utilización de material semilla sano, detección a edades tempranas, erradicación de todas las plantas ubicadas en un radio de 5 a 10 m a partir del foco inicial y cuarentena durante al menos seis meses (Belalcazar&Merchan, 1991; Álvarez *et al* 2008), lo que tampoco es rentable para la producción agrícola.

En general el control de estas enfermedades es limitado, debido a la falta de tecnologías efectivas de manejo. Los únicos mecanismos de control a disposición de los agricultores son el uso de semilla limpia, desinfección de calzado y herramientas en el momento del deshoje, erradicación de plantas con síntomas de la enfermedad y marcación de los sitios afectados. Todos ellos recomendados por instituciones como el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) y el CIAT (Mesa y Triviño, 2007).

El uso de nanopartículas (NPs) para la mejoría de semillas y plantas es una práctica nueva, en el que se han obtenido resultados positivos; es el caso de los estudios preliminares de Elikagaienet *al* (2012) en el que muestran el potencial de los nanomateriales en la mejora de la germinación de semillas y el crecimiento, en la protección de plantas, en la detección de patógenos y en la detección de residuos de pesticidas y herbicidas.

Morones *et al* (2005) reportó cambios morfológicos y estructurales de bacterias después de ser tratadas con compuestos de plata. En las micrografías que presentan se muestran los daños a la membrana celular y a algunos elementos del citoplasma. No se ha podido determinar si la plata tiene uno o varios blancos de ataque; sin embargo, se piensa que su alta reactividad con compuestos de azufre hace que reaccione con enzimas, que contienen éste elemento y que se ubican en la membrana, responsable de la respiración y del control de intercambio de materiales. En la reacción la membrana pierde permeabilidad, la bacteria deja de respirar y finalmente muere.

Por otro lado Zhenget *al* (2005) estudió los efectos de NPs de TiO_2 sobre el crecimiento de las semillas de espinaca. Se informó que las semillas tratadas con nanopartículas- TiO_2 produjeron plantas que tenían un 73 % más de peso en seco, tres veces mayor tasa fotosintética y aumento del 45% en la formación de Clorofila en comparación con el grupo control sobre el período de germinación.

Por su parte Lin y Xing (2007) evaluaron la fitotoxicidad de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNTs) y nanomateriales de óxido de aluminio- Al_2O_3 , ZnO , Al y Zn y su impacto en las tasas de germinación en rábano, canola, raigrás, lechuga, maíz y pepino, ellos encontraron que las concentraciones más altas (2000 mg/L) de tamaño nanométrico de Zn (35 nm) y ZnO (20 nm) inhiben la germinación en raigrás y maíz, respectivamente, afectando significativamente la elongación de las raíces.

Así mismo, Sudheer *et al* (2011) valoró la inhibición del crecimiento de cinco diferentes tipos de bacterias por la acción de NPs de plata.

Aunque hay reportes como el de Khaydaron *et al*, sobre un método electroquímico para la para la fabricación de NPs de plata, de entre 2 y 20 nm de diámetro, suspendidas en agua, tanto los parámetros de crecimiento como los comportamientos de las variables son diferentes a los descritos en este documento para obtener el producto que corresponde a esta invención. Por otro

lado, aunque se han utilizado suspensiones de NPs de plata sintetizadas por reducción química para atacar la bacteria *Ralstonia solanacearum*, como lo reporta Chen et al, tanto las características de la solución como la forma de aplicación y plantas tratadas es diferente al referido en este documento. Mientras que este estudio se hizo con plantas de tabaco cultivadas en materas, expuestas a este microorganismo, el producto coloide-cación plata fue probado tanto sobre la bacteria directamente en condiciones de laboratorio, como sobre cultivos de plátano y banano infectados con la *R. solanacearum* como con el hongo *F. oxysporum*, respectivamente, con síntomas de la enfermedad. Mientras que la aplicación reportada por Chen et al se hizo rociando la raíz de las plantas con las NPs, de tamaño entre 10 y 100 nm, suspendidas en agua con adición de un agente surfactante o tensoactivo (polisorbato 80), en el procedimiento en cuestión (aplicación del coloide-cación de plata) se hizo la aplicación de la suspensión en agua destilada, sin el uso de ningún tensoactivo, de las NPs de Ag (crecidas por el método electroquímico descrito) de un tamaño entre 14 y 24 nm con jeringa sobre el tallo de las plantas.

Con respecto a la Reivindicación No. 2:

El coloide-cación de plata, producto y método de aplicación en plantaciones de plátano y banano infestados con la marchitez bacteriana y mal de panamá, que se caracteriza por la forma en la que es administrado a las plantas de plátano y banano, el producto aplicado no usa ningún tipo de tensoactivo ni estabilizante. Las dosis entre 5 y 15 mL con una concentración de 20 partes por millón son efectivas al ser aplicadas directamente en los cultivos. El producto es de bajo costo y amigable con el medio ambiente ya que no requiere de ningún tensoactivo y la síntesis es electroquímica sin que se liberen gases nocivos o se usen grandes cantidades de energía. El coloide-cación plata se inyecta directamente en los haces vasculares de la planta con la marchitez bacteriana o mal de panamá; este tratamiento proporciona un efecto de prevención y/o erradicación de la enfermedad similar al de las técnicas físicas y químicas, pero sin causar daños a

la planta, ni al suelo y sin contaminar el ambiente, con lo que se fortalece la sostenibilidad del producto agrícola.

El coloide-catión de plata es estable; este líquido es inyectado en dosis, se aplican entre 5 y 15 mL con una concentración de 20 partes por millón a una frecuencia entre una y dos veces en un tiempo de dos meses, lo que depende del estado de afectación de la enfermedad, en tres partes del pseudotallo de la planta de plátano o de banano infectada por la bacteria Gram negativa *Ralstonia solanacearum* o por el hongo *Fusarium oxysporum*, respectivamente.

Es importante aplicar nuevas alternativas que contribuyan al incremento de la productividad y que beneficien la sostenibilidad de la actividad agrícola, de tal manera que se evite la destrucción de las plantas y la contaminación del ambiente por el uso excesivo de los químicos empleados actualmente para solucionar esta problemática. Por lo anterior, se propone la aplicación de un nano coloide catión de plata para contrarrestar los efectos de la bacteria *R. solanacearum* y del hongo *F. oxysporum* en plantas de plátano y banano y de ésta manera reducir los daños causados en los cultivos de plátano y banano.

Sobre la Reivindicación No.3

El coloide-catión de plata, producto y método de aplicación en plantaciones de plátano y banano infestados con la marchitez bacteriana y mal de panamá, se caracteriza por su uso comprobado para erradicar, curar y/o controlar la enfermedad en plantas de plátano y banano que estén infestadas con la marchitez bacteriana y el mal de panamá.

Nuevamente, aunque se han utilizado suspensiones de NPs de plata sintetizadas por reducción química para atacar la bacteria *Ralstonia solanacearum*, como lo reporta Chen et al, tanto las características de la solución como la forma de aplicación y plantas tratadas es diferente al referido en este documento. Mientras que este estudio, referido por el revisor como afectación de patentabilidad, se hizo

con plantas de tabaco cultivadas en materas, expuestas a este microorganismo, el producto coloide-cación plata fue probado tanto sobre la bacteria directamente en condiciones de laboratorio, como sobre cultivos de plátano y banano infectados con la *R. solanacearum* como con el hongo *F. oxysporum*, respectivamente, con síntomas de la enfermedad. Mientras que la aplicación reportada por Chen et al se hizo rociando la raíz de las plantas con las NPs, de tamaño entre 10 y 100 nm, suspendidas en agua con adición de un agente surfactante o tensoactivo (polisorbato 80), en el procedimiento en cuestión se hizo la aplicación de la suspensión en agua destilada, sin el uso de ningún tensoactivo, de las NPs de Ag (crecidas por el método electroquímico descrito) de un tamaño entre 14 y 24 nm con jeringa sobre el tallo de las plantas.

Sobre la reivindicación No.4

El coloide-cación de plata, producto y método de aplicación en plantaciones de plátano y banano infestadas con la marchitez bacteriana y mal de panamá se caracteriza por el proceso químico de electrolisis que se usa para la obtención de la suspensión de NPs de Ag, mediante la aplicación de una corriente eléctrica continua (No alterna, ni pulsada; no se alterna la polaridad, como se manifiesta en uno de los artículos referidos por el revisor como afectación de patentabilidad) con lo que se mantiene una corriente constante de alrededor de un Amperio, con un voltaje que puede variar entre 5 y 25 voltios. Esto se hace con dos electrodos de plata pura (99.9%) dentro de un recipiente con agua destilada. La concentración de plata de dicha suspensión está entre 15-25 ppm, sin hacer uso alguno de estabilizadores como Poly(N-vinyl-2-pyrrolidone) (PVP), ni de procesos adicionales de filtrado o de aplicación de peróxido de hidrógeno como se reporta en los artículos referidos por el revisor como afectación de patentabilidad.

El gran espectro germicida de la plata no es específico de alguna enfermedad, pero es específico para algunas bacterias, hongos y virus. La aplicación de la suspensión del “coloide – cación de plata” generado eléctricamente en la presente solicitud de invención, será útil para contrarrestar la enfermedad de la marchitez

bacteriana en plantas de plátano y el mal de panamá en plantas de banano, ya que puede matar, erradicar o inactivar la bacteria *R. solanacearum* y el hongo *Fusarium oxysporum*, ya sea al contacto o poco después del contacto.

La aplicación continua de la suspensión de “coloide – catión de plata” es eficaz para curar infecciones actuales o prevenir nuevas infecciones de la bacteria y el hongo en plantas de plátano y banano, además permite que la planta se restaure naturalmente a un estado completamente funcional y evita la destrucción de la planta, como si lo hacen otro tipo de sustancias que se usan actualmente.

Es importante resaltar que al aplicar la suspensión de “coloide – catión de plata” no genera como resultado el desarrollo de resistencia bacteriana como sucede con los antibióticos.

Reivindicación No. 5

A diferencia de lo que se manifiesta en uno de los artículos referidos por el revisor como afectación de patentabilidad, el tratamiento con la suspensión de plata en aquellas plantas infectadas por la bacteria *R. solanacearum* y el hongo *F. oxysporum* se hace aplicando una cantidad y concentración de este medio acuoso con partículas de plata en los cultivos de plátano y banano, lo cual ha sido eficaz para reducir el número de organismos patógenos que atacan a la planta, manteniendo la planta viva y permitiendo un crecimiento vegetativo normal.

La suspensión del “coloide – catión de plata” aporta un método para tratar y prevenir las infecciones causadas por patógenos de las plantas de plátano y banano. El término "patógenos de las plantas" se entiende en este escrito como aquellas bacterias que causan la marchitez bacteriana y hongos que causan el mal de panamá en este tipo de cultivo, más en específico se refiere a la bacteria *Ralstonia solanacearum* y al hongo *F. oxysporum*. La nombrada enfermedad causada por dicha bacteria y hongo origina complicaciones y problemas en el cultivo en los que se incluyen pudrición del fruto, marchitamiento y amarillamiento del peciolo y hojas, los colinos se ponen negros y mueren, esto por el lado de síntomas externos; los síntomas internos se manifiestan en los haces vasculares

taponados y necrosados lo cual es índice de la presencia de colonias de esta bacteria y hongo, esto es evidenciado por un color negro a marrón en el centro del pseudotallo al realizar un corte trasversal de este.

Las partículas de plata de dicha suspensión son átomos o grupo de átomos que llevan una carga eléctrica positiva. Estas partículas generadas por la electrolisis son esencialmente una suspensión coloidal. El término Coloidal se refiere a sustancias que se difunden a través del agua, las dispersiones de estas moléculas forman agregados, en el que al mezclar el sólido (partículas de plata) y el líquido (agua destilada) el sólido no se disuelve, formando así una suspensión coloidal. Los coloides suelen ser amorfos y, por tanto, no tienen una forma definida, o una estructura cristalina distinta.

Reivindicación No. 6

El coloide-catión de plata, producto y método de aplicación en plantaciones de plátano y banano infestadas con la marchitez bacteriana y mal de panamá se caracteriza por el método de síntesis de la suspensión coloidal. A diferencia de lo que se manifiesta en uno de los artículos referidos por el revisor como afectación de patentabilidad, el equipo usado incluye un par de electrodos, cada electrodo incluye un ánodo de plata y un cátodo de plata, estos se extienden hasta un medio líquido (agua destilada que se mantiene a una temperatura entre 80 y 90 °C). Los electrodos están conectados eléctricamente a una fuente de voltaje continua. La suspensión del “coloide – catión de plata” se obtiene mediante la aplicación de una corriente eléctrica continua, de comportamiento muy diferente al descrito en el artículo de Khaydaron et al, en el que se alcanza una corriente de saturación cambiando la polarización de los electrodos. En nuestra descripción entre el ánodo y el cátodo hay una diferencia de potencial entre 5 y 25 voltios aproximadamente, esto logra que los electrodos de plata se desgasten ligeramente y desprendan NPs de plata. La cantidad de electricidad que pasa a través de los electrodos y la cantidad de partículas de plata producidas pueden determinarse a partir de la ley de Faraday. Por lo tanto, se puede determinar la concentración deseada en partículas de plata en función del voltaje empleado con el volumen del medio

líquido que se está utilizando. El agua destilada es depositada en un recipiente que pueda contener este medio acuoso. Los electrodos están suspendidos en este medio líquido. Permitiendo que las partículas de plata se generen en el líquido que contiene el recipiente.

Reivindicación No. 7

El coloide-cación de plata, producto y método de aplicación en plantaciones de plátano y banano infestadas con la marchitez bacteriana y mal de panamá se caracteriza por la aplicación de la suspensión de plata compuesta por NPs de una concentración de 10 a 20 ppm sin uso de tensoactivos o estabilizadores, puede ser aplicado e inyectado a las plantas en horas de la mañana de acuerdo con los horarios normales de riego. Se inyectan tres dosis, cada una entre 5 y 10 cm³ por cada planta infestada o con presencia de la marchitez bacteriana y mal de panamá, esto se hace en 3 partes diferentes del pseudotallo teniendo en cuenta que se realice de abajo hacia arriba, en total se habrá inyectado una dosis entre 15-30 cm por cada planta que presente el síntoma. Este procedimiento se realiza hasta un mes después, siempre y cuando la planta presente de nuevo los síntomas.

A diferencia de lo que se manifiesta en los artículos referidos por el revisor como afectación de patentabilidad, el producto no contiene tensoactivos y es aplicado específicamente a plantaciones de plátano y banano en campo, con resultados verificables soportados por evidencias concretas.

Carlos Humberto Henao Pabón.

Barrio Villa Hermosa Mz f casa 2

Armenia, Quindío.

BIBLIOGRAFIA

- Álvarez Restrepo J. A; Rodríguez Gaviria P. A; Marín Montoya M. Detección molecular de *Ralstonia solanacearum* en agroecosistemas bananeros de Colombia. Printed in Brazil: Copyright by the Brazilian Phytopathological Society. Tropical Plant Pathology, 2008. vol.33, 3, 197-203.
- Belalcázar, C.S., Merchán, V.V. Efecto de la época y el grado de defoliación sobre la producción. p 77-85. In: Belalcázar, C.S., Buriticá, C.P., Torregroza, C.M., Toro, M.J., Jaramillo, G.O., Baena, A.H., Valencia, M.J.T.:. Generación de tecnología para el cultivo y producción rentable de plátano en la zona central cafetera colombiana. Creced Quindío, ICA Armenia, Regional Nueve. Informe Técnico. 1991. Armenia, Quindío, Colombia.
- Castañeda D; Espinosa JA. Comportamiento e impacto de la enfermedad de moko en la zona de Urabá (Colombia), en las últimas tres décadas y media y propuesta de un índice de riesgo de la enfermedad. Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín; 2005, 58:2587-2599.
- Chen Juanni, Li Shili, Luo Jinxiang, Wang Rongsheng, and Ding Wei. Enhancement of the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles against Phytopathogenic Bacterium *Ralstonia solanacearum* by Stabilization. Journal of Nanomaterials, Volumen 2016. 1 de enero de 2016. Pág. 1-15.
- Dirección nacional de medio ambiente. Proceso de eliminación del Bromuro de metilo en Uruguay. Uruguay: Comisión Técnica Gubernamental de Ozono, 2002. 23 p.
- Elikagaien N; Segurtasunarako, Fundazioa E. La nanotecnología en la industria alimentaria: Nanotecnología alimentaria. Fundación vasca para la seguridad alimentaria, Noviembre. La aplicación de las nuevas tecnologías en la industria alimentaria, 2012.
- Elikagaien N; Segurtasunarako, Fundazioa E. La nanotecnología en la industria alimentaria: Nanotecnología alimentaria. Fundación vasca para la seguridad

alimentaria, Noviembre. La aplicación de las nuevas tecnologías en la industria alimentaria, 2012.

Hayward, A.C. Research on bacterial wilt: a perspective on international linkages and access to the literature, p. 1-8. In C. Allen, P. Prior & A.C. Hayward (eds.). Bacterial wilt: the disease and the *Ralstonia solanacearum* species complex. 1995. American Phytopathological Society, San Pablo, EEUU.

Khaydaron R. A., Khaydarov R. R., Gapurova O., Estrin Y., Scheper T.. Electrochemical method for the synthesis of silver nanoparticles. Journal of Nanoparticle Research. 2009; 11, 5, 1193–1200.

Lin, D; Xing, B. Phytotoxicity of nanoparticles: inhibition of seed germination and root growth. Environ. Pollut, 2007. 150, 243e250.

Mesa L; Triviño V. Evaluación microbiológica y físico-química de lixiviados de descomposición de residuos de plátano (*Musa AAB*) y su efecto sobre Moko. Tesis B.Sc. Biología. Universidad del Quindío. Armenia, Colombia, 2007. 25 p.

Morones, J; Elechiguerra, J; Holt, A; Kouri, K; Ramirez, J; Yamacan, J. The bacterial effect of silver nanoparticles. Nanotechnology. 2005; 16, 2346-53.

Patricio F, R; Almeida I, M; Santo A. S; Cabral O; Tessariolin J; Sinigaglia C; Berian L, O; Rodrigues N, J. Avaliação da solarização do solo para o controle de *Ralstonia solanacearum*. Fitopatologia Brasileira, 2005. 30: 475-481.

S. SudheerKhan, AmitavaMukherjee, N. Chandrasekaran. 2011. Studies on interaction of colloidal silver nanoparticles (SNPs) with five different bacterial species. Elsevier. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 87 129– 138.

ToomeyGerry. Campaña de Colombia para salvar del moko a los plátanos. Escritor científico. Diciembre. Green Ink Publishing ServicesLtd, 2004. e-mail g.toomey@cgnet.com; tel.1-819-827-1426.

Zheng, L; Hong, F; Lu, S; Liu, C; Effect of nano-TiO₂ on strength of naturally aged seeds and growth of spinach. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2005.104, 83e91.