

# MÉTODO PARA BIOSINTETIZAR CARBONATO DE CALCIO A PARTIR DE UN INÓCULO BACTERIANO MEDIANTE ÁCIDOS ORGÁNICOS

## **Campo técnico de la invención**

5

La presente invención está relacionada con el campo de la biotecnología, particularmente se refiere a la formación de materiales a partir de la biosíntesis de compuestos. En la presente invención la biosíntesis se realiza a partir de un microorganismo, donde el microorganismo es una bacteria y donde el compuesto biosintetizado es carbonato de calcio. La presente invención puede ser aplicada en ingeniería de tejidos para la regeneración de hueso, restauraciones dentales o en la liberación controlada de medicamentos.

10

## **Antecedentes de la invención**

15

20

25

La precipitación de carbonatos de calcio se puede dar por vía química o biológica, por medio de métodos de supersaturación y difusión de carbonatos de amonio. Con más detalle, algunos investigadores han encontrado por ejemplo, que los nanocarbonatos de calcio sintetizados químicamente no son aptos para el transporte de fármacos, debido a que ésta tiende a formar clústeres de tamaños micrométricos (lo cual es un problema para su procesamiento) y suelen introducir trazas de impurezas durante la síntesis. En estos casos, cuando se requiere un mineral con condiciones óptimas de pureza y homogeneidad implica consumir reactivos de alta pureza y precio, así como un despliegue técnico muy alto; lo que incrementa considerablemente los costos de producción. Algunos artículos científicos han reportado el uso de ácidos orgánicos en procesos de síntesis química de calcita, donde se ha observado que estos ayudan a modificar tanto los tamaños de grano, como la polimorfía del carbonato (calcita, vaterita o aragonita).

30

Por vía biológica existen diferentes rutas por las cuales se obtienen este tipo de minerales, ya sea implementando suelos ricos en urea o empleando proteínas específicas presentes en las conchas de algunas especies marinas, entre otras. Los métodos biológicos para inducir la producción de carbonatos de calcio han sido estudiados con varios microorganismos debido a que presentan grandes ventajas respecto a la producción por métodos químicos, como ser amigables con el ambiente, espontáneos, naturales y sostenibles.

35

40

Se encuentran en el estado del arte las patentes US20050214194A *Biological process for the preparation of mineral crystals using seeds*; WO2006066326A1 *Microbial biocementation*; CN1778934A *Preparation of calcium carbonate by microbe deposition*; CN101085880A *Nano layered calcium carbonate base bionic composite material and synthetic method thereof* y WO2008120979A1 *Microbiologically induced carbonate precipitation*, que se refieren a técnicas de biocementación, aplicaciones con microorganismos o productos

**FIG. 7** Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido cítrico adicionado al día cero.

**FIG. 8** Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido málico adicionado al día cero

**FIG. 9** Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido cítrico adicionado al día uno.

**FIG. 10** Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido málico adicionado al día uno.

**FIG. 11** Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido cítrico adicionado al día dos.

**FIG. 12** Cantidad de precipitado obtenido durante el proceso de bioprecipitación, a diferentes concentraciones de ácido málico adicionado al día dos.

**FIG. 13** Imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los precipitados obtenidos del proceso de bioprecipitación a diferentes concentraciones y día de adición del ácido cítrico. a) sin ácido, b) 0.05% día 0, c) 0.05% día 0, d) 0.10% día 1, e) 0.10% día 1 , f) 0.10% día 2, g) 0.10% día 2, h) 0.15% día 2 y i) 0.15% día 2.

**FIG. 14** Imágenes por microscopía electrónica de barrido (SEM) de los precipitados obtenidos del proceso de bioprecipitación a diferentes concentraciones y día de adición del ácido málico. a) sin ácido, b) 0.05% día 0, c) 0.05% día 0, d) 0.10% día 2, e) 0.15% día 2 y f) 0.15% día 2.

**Descripción detallada**

La presente invención divulga un método para biosintetizar carbonato de calcio mediante un medio biológico, particularmente divulga un método para biosintetizar carbonato de calcio a partir de un inóculo bacteriano que involucra los pasos de preparar y esterilizar un medio de cultivo modificado con un modulador; incubar un inóculo bacteriano a condiciones de crecimiento en el medio de cultivo modificado y finalmente separar y purificar el carbonato de calcio precipitado obtenido mediante el inóculo bacteriano.

Se entiende por “biosintetizar” al proceso mediante el cual un microorganismo produce algún tipo de material como resultado de su metabolismo. Para efectos de la presente invención el microorganismo es una bacteria. La bacteria puede adquirirse a través de un laboratorio certificado.

*Preparar y esterilizar un medio de cultivo modificado*

El método de la presente invención inicia con la preparación y esterilización de un medio de cultivo modificado con un modulador. Para el crecimiento de los microorganismos y biosíntesis de carbonatos de calcio es importante que el medio de cultivo en el que se encuentre tenga los componentes adecuados. En el proceso, se probaron diferentes medios

Entre las cepas de *Myxococcus xanthus* se encuentran ATCC 25232, ATCC 29618, ATCC 27924, ATCC 27926, ATCC 27923, ATCC 27925, ATCC 31046, ATCC 27927, ATCC 27922, ATCC 25565.

- 5 La incubación consiste en mantener el microorganismo en las condiciones de crecimiento o reproducción, por un tiempo determinado. En este caso las condiciones de crecimiento del inóculo bacteriano son tiempo de incubación, temperatura y agitación. El tiempo de incubación se refiere al tiempo que tarda el microorganismo en biosintetizar el mineral deseado, este se encuentra entre 1 y 10 días, entre 2 y 7 días, entre 3 y 9 días, o entre 4 y 8 días. La temperatura se encuentra entre 10 y 40°C, entre 15 y 35°C o entre 20 y 35°C. Las condiciones de agitación se encuentran entre 50 y 1000 rpm, particularmente entre 80 y 500rpm, o entre 100 y 400rpm, o entre 200 y 300rpm. En una modalidad la agitación se realiza mediante un agitador orbital.

#### 15 *Separación del precipitado*

- Finalmente se realiza la separación que alude a la desunión de las partículas sólidas biosintetizadas del medio de cultivo líquido que las contiene. La separación sólido-líquido se puede realizar mediante cualquier método conocido por una persona medianamente versada en la materia, por ejemplo decantación, filtración, centrifugación, evaporación, flotación o cristalización, entre otros. En una modalidad la separación del precipitado se logra mediante centrifugación entre 2000 y 5000 rpm por un periodo entre 5 y 15 minutos. Las partículas sólidas obtenidas son el carbonato de calcio biosintetizado.

- 25 El carbonato de calcio precipitado obtenido mediante la presente invención puede estar en cualquiera de sus tres polimorfos: calcita, vaterita y aragonita, de acuerdo con las sales de calcio utilizadas en el medio de cultivo.

- Con el fin de caracterizar los carbonatos biosintetizados se usan técnicas como Microscopía Electrónica de Barrido (SEM) que permite realizar imágenes del producto obtenido con y sin moduladores, y así observar las diferencias morfológicas del precipitado. Sin los moduladores, los precipitados son estructuras gruesas y muy aglomeradas, y después del proceso de biomodulación las estructuras comienzan a fraccionarse, las partículas que las conforman son más definidas y se ven menos aglomeradas. Simultáneamente se realizan pruebas de caracterización mineralógica de Difracción de rayos X (DRX) que permiten identificar las proporciones de las fases cristalinas del precipitado, y se observa que con la adición de los moduladores se ve favorecida una fase cristalina de los carbonatos denominada Vaterita, sobre Calcita, que es la fase prevaleciente en el proceso sin la implementación de los moduladores.

comenzaron con un pH de 8, y que el día 1, en el que se les agrega el ácido cítrico, su pH disminuye. Para la muestra con 0.15% p/v de ácido cítrico su pH disminuyó hasta 5.25 y con el paso del tiempo no aumentó. Las muestras con 0.05% y 0.10% p/v de ácido cítrico disminuyeron su pH hasta 6.8 y 5.7 respectivamente, logrando con el paso del tiempo aumentar hasta terminar en 9.

#### (c) Separación

La separación del carbonato de calcio precipitado se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 2

#### Caracterización del producto

Del proceso de biosíntesis se obtuvo entre 0,0 g/L y 3,4g/L de carbonatos de calcio cuando se agregó el modulador al día uno como se observa en la FIG. 9. Las cantidades variaron dependiendo de la cantidad de ácido cítrico implementadas, la concentración más alta de ácido (0,15%) obtuvo 0,0g/L y por el contrario con las otras concentraciones (0,05% y 0,10%) obtuvieron entre 3,3g/L y 3,4g/L. Se realizaron pruebas de caracterización mineralógica como en el Ejemplo 2 y se encontraron proporciones diferentes de los carbonatos dependiendo de la cantidad de modulador utilizada para la concentración de 0,05% Va: 94,5 y Ca: 5,5% y para 0,10% Va: 97,9% y Ca: 2,1. Y por microscopía electrónica de barrido se tomaron imágenes que permitieron observar las diferencias morfológicas de los carbonatos observando que con el modulador las estructuras pierden su forma y comienzan a fracturarse y desaglomerarse hasta formar películas. (Ver FIG. 13)

### **Ejemplo 5. Biosíntesis de carbonato de calcio a partir de *Bacillus cereus* con ácido málico adicionado al día uno como modulador en un medio de cultivo modificado**

#### (a) Preparación y esterilización del medio de cultivo modificado

El medio M3 modificado comprende 0.04% p/v de triptona, 0.05% p/v de acetato de calcio y ácido málico a 0.05%, 0.1% y 0.15% p/v. Se esteriliza en una autoclave, cada solución por aparte, a 121°C por 20min (15psi) y se deja enfriar a temperatura ambiente. Las soluciones de acetato de calcio y ácido málico se conservan en una nevera.

#### (b) Inoculación

En una cámara de flujo laminar se colocó el medio de cultivo y se adicionó 10mL de inóculo bacteriano (obtenido mediante el Ejemplo 1) en 90mL de medio M3 modificado. El acetato de calcio y el ácido málico se adicionaron al día 1 de cultivo. Las cepas se incubaron por 6 días en un agitador orbital, a una temperatura de 30°C  $\pm$  1°C y una velocidad de agitación de 180 rpm  $\pm$  2 rpm.

Se realizó seguimiento de pH para evaluar el proceso metabólico del microorganismo durante los días 0, 1, 2, 4 y 6, como se observa en la FIG. 4. La figura muestra que todas las muestras comenzaron con un pH de 8, y que al día 1 en que se adicionó el ácido málico, su valor disminuyó. Para la muestra que contenía 0.15% p/v de ácido málico su pH disminuyó hasta 5.3, y con el tiempo no aumentó. Por otro lado, las muestras con 0.05% y 0.10% p/v de ácido

málico disminuyeron su pH hasta 6.7 y 5.8 respectivamente, aumentando su valor con el paso del tiempo hasta obtener un valor de 8.5.

(c) *Separación*

45 La separación del carbonato de calcio precipitado se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 2

*Caracterización del producto*

Del proceso de biosíntesis se obtuvo entre 0,0 g/L y 3,0g/L de carbonatos de calcio cuando se agregó el modulador al día uno como se observa en la FIG. 10. Las cantidades variaron  
50 dependiendo de la cantidad de ácido málico implementadas, la concentración más alta de ácido (0,15%) obtuvo 0,0g/L y por el contrario con las otras concentraciones (0,05% y 0,10%) obtuvieron un precipitado alrededor de 3,0g/L. Se realizaron pruebas de caracterización mineralógica como en el Ejemplo 2 y se encontraron proporciones diferentes de los carbonatos dependiendo de la cantidad de modulador utilizada para la concentración  
55 de 0,05% Va: 91,0% y Ca: 9,0% y para 0,10% Va: 93,3% y Ca: 6,7%. Y por microscopía electrónica de barrido se tomaron imágenes que permitieron observar las diferencias morfológicas de los carbonatos observando que con el modulador las estructuras pierden su forma y comienzan a fracturarse y desaglomerarse hasta formar películas. (Ver FIG. 14)

60 **Ejemplo 6. Biosíntesis de carbonato de calcio a partir de *Bacillus cereus* con ácido cítrico adicionado al día dos como modulador en un medio de cultivo modificado**

(a) *Preparación y esterilización del medio de cultivo modificado*

El medio M3 modificado comprende 0.04% p/v de triptona, 0.05% p/v de acetato de calcio  
65 y ácido cítrico a 0.05%, 0.1% y 0.15% p/v. Se esteriliza en una autoclave, cada solución por aparte, a 121°C por 20min (15psi) y se deja enfriar a temperatura ambiente. Las soluciones de acetato de calcio y ácido cítrico se conservan en una nevera.

(b) *Inoculación*

En una cámara de flujo laminar se colocó el medio de cultivo y se adicionó 10mL de inóculo  
70 bacteriano (obtenido mediante el Ejemplo 1) en 90mL de medio M3 modificado. El acetato de calcio y el ácido cítrico se adicionaron al día 2 de cultivo. Las cepas se incubaron por 6 días en un agitador orbital, a una temperatura de 30°C  $\pm$  1°C y una velocidad de agitación de 180 rpm  $\pm$  2 rpm.

Se realizó seguimiento de pH para evaluar el proceso metabólico del microorganismo durante  
75 los días 0, 1, 2, 4 y 6, como se observa en la FIG. 5. La figura muestra que todas las muestras comenzaron con un pH de 8 y que comenzó a aumentar, pero el día 2 que se adicionó el ácido cítrico el pH disminuyó. Para las muestras con 0.05%, 0.10% y 0.15% p/v de ácido cítrico los pH disminuyeron hasta 7, 6.5 y 6 respectivamente, pero con el paso del tiempo el pH aumento hasta aproximadamente 8.5.

80 (c) *Separación*

La separación del carbonato de calcio precipitado se realizó de la misma manera que en el Ejemplo 2