

PROCESO Y MEDIO LÍQUIDO DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE VATERITA

CAMPO TÉCNICO

[001] La presente invención se encuentra enmarcada, especialmente, en el campo de producción de carbonato de calcio tipo vaterita que ofrece un amplio espectro de aplicaciones en diferentes sectores que van desde la química industrial, la biomedicina, la industria alimentaria, el medio ambiente y el uso como material filler o material de relleno.

RESUMEN DE LA INVENCION

[002] La presente invención hace referencia a un proceso de producción de carbonato de calcio tipo vaterita estable que comprende las etapas de reactivación de cepas bacterianas, preparación de un medio de cultivo líquido que comprende NaCl 0.5%, extracto de levadura 0.5%, peptona de caseína 1%, y acetato de calcio entre 3% y 10%; monitoreo de la formación de vaterita estable, separación y recolección de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita y caracterización mineralógica de los bioprecipitados. La invención también comprende el producto carbonato de calcio tipo vaterita obtenido mediante el proceso de la invención.

ESTADO DE LA TECNICA

[003] La vaterita es un carbonato de calcio (**CaCO₃**) que tiene gran interés en el sector biomédico, ambiental y en la industria de los materiales gracias a su baja toxicidad, alta biodegradabilidad y biocompatibilidad, con lo cual se convierte en un material propicio para actuar como agente vehiculizante, protector y liberador de compuestos terapéuticos, entre otros.

[004] A través del mecanismo de biomineralización, la mayoría de las formas vivas inducen la precipitación de materiales minerales como el carbonato de calcio. Esto ocurre en algunos microorganismos, tales como las bacterias calcificantes que comúnmente se han estudiado por su influencia en la formación de rocas, suelos y estructuras biológicas como conchas, arrecifes, dientes, huesos o como resultado de procesos patológicos en órganos humanos y animales como nefrolitos y cálculos biliares, entre otros. La mayoría de estos fenómenos se llevan a cabo mediante la inducción de la bioprecipitación química de cationes como Ca²⁺ y Mg²⁺ a través de

algunas enzimas como ureasa y anhidrasa carbónica, mientras que simultáneamente el CO_2 es biocapturado y transformado en HCO_3^- , lo que lleva a la formación de minerales como calcita, aragonita, dolomita, vaterita y carbonatos de calcio amorfo (CCA).

[005] Este mecanismo tiene un alto potencial para mejorar los problemas ambientales y desarrollar nuevos procesos y productos como: desalinización del agua, valorización desperdiciada, captura de contaminantes, autocurado de concreto, restauración del patrimonio histórico y generación de nuevos materiales. También, tienen aplicaciones en la administración de fármacos, nano encapsulación y regeneración de huesos y tejidos dentarios.

[006] Desde el ámbito de las patentes, se conocen métodos de preparación y aplicación para carbonatos de calcio, por ejemplo, la patente CN105858696 hace referencia a un método de preparación de carbonato de calcio de grado alimenticio de tipo vaterita en tamaño micrométrico, en donde el proceso se realiza de manera química al adoptar un proceso de carbonización de dos fases gas-líquido y un proceso de modificación de la superficie *in situ* para preparar carbonato de calcio de grado alimenticio tipo vaterita. El producto de carbonato de calcio preparado mediante el método proporcionado por dicha invención corresponde a partículas esféricas, finas y uniformes, que tienen buena dispersión y propiedad de suspensión con fuerte resistencia al asentamiento a fin de aplicarse directamente como agente reforzante del calcio en bebidas líquidas como leche, leche de soja y zumo de frutas, entre otros.

[007] De otra parte, el documento CN107082442 que se refiere a un método de preparación de carbonato cálcico tipo vaterita a través de un proceso químico que comprende las etapas de triturar y mezclar $\text{Ca}(\text{OH})_2$ sólido y urea sólida en un mezclador y agregar una mezcla sólida a un reactor de alta presión; introducir dióxido de carbono y hacer reaccionar la mezcla sólida con el dióxido de carbono; recoger el producto resultante del reactor de alta presión y separar la urea para obtener carbonato cálcico tipo vaterita. La tecnología de producción es simple y el proceso es amigable con el medio ambiente.

[008] También se conoce la patente CN109678191 que muestra un método químico para controlar y preparar carbonato cálcico tipo vaterita usando ácido sináptico. El método se caracteriza porque los granos cristalinos de carbonato de calcio con formas y morfologías cristalinas específicas y de diferentes tamaños se

controlan y preparan cambiando los parámetros del proceso, como la concentración, el pH y la temperatura de reacción del ácido sinápico proveniente de lignina y las concentraciones de CaCl_2 y Na_2CO_3 y plantea el hecho que el ácido sinápico es la materia orgánica que, según un principio de mineralización biológica, satisface las demandas de campos industriales específicos.

[009] Finalmente, la patente CN110589863 se refiere a un método químico para preparar rápidamente carbonato cálcico tipo vaterita metaestable micro-nano poroso de alta pureza a partir de un líquido residual de destilación de amoníaco. El método comprende las etapas de filtrar el líquido de desecho de la destilación de amoníaco; añadir agua en carbonato de amonio para una disolución completa y transferir el líquido de desecho de destilación de amoníaco filtrado en carbonato de amonio disuelto para una reacción, de modo que precipite completamente el ion Ca^{2+} en el líquido de desecho de destilación de amoníaco; y filtrar el producto de reacción, y realizar un lavado rápido y un secado inmediato, para obtener el carbonato cálcico tipo vaterita metaestable micro o nano poroso.

[010] En el ámbito de los artículos científicos se conoce el artículo “*Biom mineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments*” (Shiping Wei et al) que indica que la biomineralización es un fenómeno natural conocido asociado con una amplia gama de especies bacterianas y en el estudio se investigó la precipitación de carbonato de calcio inducida por bacterias de aislamientos marinos, entre las cuales se estudió tres géneros de bacterias ureolíticas, *Sporosarcina sp.*, *Bacillus sp.* y *Brevundimonas sp.* Para la precipitación de minerales de carbonato de calcio y de estas especies, la *Sporosarcina sp.* Se encontró que los aislados cultivados de *B. lentus* CP28 generan una mayor actividad de ureasa y facilitó una precipitación más eficiente de carbonato de calcio a $3,24 \pm 0,25 \times 10^{-4}$ mg/célula. La difracción de rayos X indicó que la fase de carbonato cálcico dominante era calcita. La microscopía electrónica de barrido mostró que las morfologías de los minerales estaban dominadas por cristales en forma de placas cúbicas, rómbicas y poligonales. El proceso dinámico de precipitación de carbonato de calcio microbiano reveló que *B. lentus* CP28 precipitó cristales de calcita a través de la hidrólisis enzimática de urea, y cuando las concentraciones de iones de amonio alcanzan 746 mM y el pH llega a 9.6, favorece la precipitación de calcita a una mayor proporción de 96 mg/L. Los resultados de esta investigación proporcionan evidencia de que una variedad de bacterias marinas que pueden inducir la precipitación de carbonato de calcio y puede influenciar el ciclo de carbonato marino en ambientes naturales.

[011] También se sabe del artículo “*Bacterial Mineralization*” (University of Edinburgh) que indica que en la actualidad se conocen más de 60 biominerales, la mayoría de los cuales son carbonatos de calcio, silicatos, andironoxidos o sulfuros (Baeuerlein, 2000). La biomineralización como campo de estudio involucra muchas disciplinas científicas, incluyendo la química inorgánica, la bioquímica, todos los campos de los organismos relacionados con la geología, cristalografía, ciencia de materiales, física de la materia condensada y biología molecular. Las bacterias son microorganismos procariotas que están presentes en la superficie, la sub-superficie terrestre y ambientes acuáticos. Los procariotas constituyen dos dominios (super-reinos) en la jerarquía biológica taxonómica que incluyen bacterias y las *Archae*. Las bacterias muestran una marcada diversidad tanto genética como metabólicamente, incluso en los tipos que habitan los mismos microhábitats.

[012] De acuerdo con lo anterior, existe una necesidad de encontrar rutas sintéticas alternas a las rutas químicas para la producción de carbonato de calcio en forma de vaterita como una forma cristalina estable en el tiempo. En este sentido, la presente invención hace un aporte al estado de la técnica ya que realiza la síntesis de vaterita en medios líquidos específicos involucrando bacterias. Adicionalmente, la presente invención, realiza la caracterización mineralógica del producto obtenido mediante el proceso y el medio líquido de cultivo para la producción de vaterita, junto con la aplicación de técnicas para la caracterización de minerales como difracción de rayos X (DRX), Microscopía electrónica con detector de rayos X de energía dispersiva (SEM/EDX) y espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier (FTIR).

[013] En este sentido, el producto obtenido mediante el proceso de la presente invención (carbonato de calcio tipo vaterita) obtenido, muestra resultados prometedores en cuanto al proceso de elaboración de vaterita más estable, mono dispersa y biocompatible a bajo costo y con altos rendimientos de producción, en donde el proceso o método comprende etapas de precipitación fáciles, confiables y rápidas. Las partículas (micropartículas) de vaterita pueden tener características de biocompatibilidad deseadas para aplicaciones en biomedicina y otras áreas industriales tales como química industrial, materiales de relleno o filler e industria alimentaria por su baja toxicidad.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[014] La figura 1 muestra un diagrama que relaciona el precipitado de vaterita en mg por 100 mililitros de medio y las distintas cepas encontradas como posibles productoras de carbonato de calcio tipo vaterita.

[015] La figura 2 muestra una microfotografía de los agregados bacterianos de *Sporosarcina pasteurii* embebidos en los cristales de carbonato de calcio tipo vaterita en donde se refleja la fuerte relación o influencia que tienen las bacterias en los procesos de precipitación de carbonatos.

[016] La figura 3 muestra una microfotografía que revela la disposición de carbonatos de calcio (CC) sobre las estructuras bacterianas con texturas o hábitos esferoidales con tamaños de partícula o grano entre 0.6 y 1.9 μm .

[017] La figura 4 muestra los espectros infrarrojos con transformada de Fourier (FT-IR) obtenidos durante la etapa de monitoreo del proceso de la invención para bioprecipitados producidos por diferentes cepas de bacterias.

[018] La figura 5 muestra los espectros de Difracción de rayos X DRX obtenidos durante la etapa de monitoreo del proceso de la invención para bioprecipitados producidos por diferentes cepas de bacterias.

[019] La figura 6 muestra gráficos de la interacción para producción de vaterita con el medio de cultivo B21LM (Medio de cultivo B21 Líquido Modificado) de acuerdo con la presente invención a pH 7.0 (a), 8.5 (b) y el resultado del rendimiento obtenido en el proceso ilustrado en el ejemplo de trabajo de acuerdo con la invención (c).

[020] La figura 7 muestra los resultados del proceso con el medio líquido B21LM de la presente invención para tres concentraciones de acetato de calcio y a pH 7.0 en ausencia de urea.

[021] La figura 8 ilustra la evolución de la formación de carbonato de calcio tipo vaterita en el medio de cultivo de acuerdo con la invención en la etapa de monitoreo para la producción de vaterita a partir de la bacteria *B. lentus* a una concentración de 3.0% de acetato de calcio en el medio de cultivo de la presente invención.

[022] La figura 9 muestra el resultado del análisis de estabilidad de vaterita en función del pH, tiempo y temperatura, específicamente a pH 4.5 y temperaturas de 30°C, 37.5°C y 40°C.

[023] La figura 10 muestra el resultado del análisis de estabilidad de vaterita en función del pH, tiempo y temperatura, específicamente a pH 7.2 y temperaturas de 30°C, 37.5°C y 40°C.

[024] La figura 11 muestra el resultado del análisis de estabilidad de vaterita en función del pH, tiempo y temperatura, específicamente a pH 1.8 y temperaturas de 30°C, 37.5°C y 40°C.

[025] La figura 12 muestra el resultado del análisis de disolución de vaterita en función del pH, tiempo y temperatura, específicamente a pH 1.8, 4.5 y 7.2 y temperatura de 30°C.

[026] La figura 13 muestra el resultado del análisis de disolución de vaterita en función del pH, tiempo y temperatura, específicamente a pH 1.8, 4.5 y 7.2 y temperatura de 37.5°C.

[027] La figura 14 muestra el resultado del análisis de disolución de vaterita en función del pH, tiempo y temperatura, específicamente a pH 1.8, 4.5 y 7.2 y temperatura de 40°C.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[028] El proceso para la producción de carbonato de calcio tipo vaterita estable de acuerdo con la presente invención, comprende cinco elementos primordiales que gobiernan este fenómeno de una manera coordinada. Entre ellos está i) presencia de iones calcio; ii) condiciones específicas de pH; iii) temperatura; iv) concentración de carbono inorgánico disuelto (DIC) y v) la presencia de sitios de nucleación. Cada uno de estos factores en virtud de su interacción en el interior de una solución rica en sales de calcio inducen la generación de cambios físicos y bioquímicos con tendencia al equilibrio, que dan lugar a la formación de estructuras carbonatadas tipo vaterita estable, con unas propiedades físico-químicas y mecánicas determinadas.

[029] El proceso de la presente invención se fundamenta en la biomineralización que se define como un mecanismo natural en el cual diversos sistemas biológicos inducen o controlan de manera directa o indirecta la bioprecipitación, generación y transformación de minerales.

[030] A continuación se mencionan algunos microorganismos (bacterias) reportados en la literatura por su capacidad de producción de carbonato de calcio.

Tabla No. 1

BACTERIAS CON CAPACIDAD BIOMINERALIZANTE DE CaCO ₃	POLIMORFO	AUTORES
<i>Pseudoalteromona putida</i>	Calcita-Aragonito	Biobrush et al.;2005
<i>Sporosarcina pasteurii</i>	Calcita - Aragonito	Ramachandran et al.; 2001; Warren et al.;2001;Achal et al., 2010; Burbank et al.; 2011; Gat et al.;2014; Srivastava et al.; 2015;
<i>Serratia sp</i>	Calcita	Srivastava et al.; 2015
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Calcita	Banks et al., 2010
<i>Bacillus. thuringiensis</i>	Calcita	Dhami et al.; 2013
<i>Escherichia coli</i>	Calcita	Chen et al.; 2012
<i>Bacillus pasteurii</i>	Calcita - Aragonito	Bang & Ramakrishnan 2001
<i>Micrococcus sp.</i>	Calcita - Aragonito	Tiano et al.,1999
<i>Sporosarcina ureae</i>	Calcita	George et al 2010
<i>Bacillus megaterium</i>	Calcita	Dhami et al.; 2013
<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	Calcita-Aragonito	Ramachandran et al 2001; Dick et al.;2006; Muynck et al.;2008; Kang et al., 2014
<i>Bacillus pseudofirmus</i>	Calcita	Jonkers et al., 2007
<i>Bacillus cohnii</i>	Calcita	Jonkers et al.; 2007
<i>Bacillus subtilis</i>	Calcita-Aragonito	Tiano et al.;1999 Marvasi et al.; 2012 Gat et al.;2014
<i>Bacillus lentus</i>	Calcita	Banks et al., 2010
<i>Bacillus pumilus</i>	Calcita - Vaterita	Banks et al., 2010 Daskalakis et al.; 2015
<i>Rodhococcus</i>	Calcita	Tiano et al.,1999
<i>Myxococcus xanthus</i>	Calcita - Vaterita	Rodríguez et al.; 2007
<i>Bacillus cerus</i>	Calcita	Banks et al., 2010; Jroundi et al., 2012; Han et al., 2013

[031] Se sabe que *Bacillus pumilus* y *Myxococcus xanthus* producen vaterita la cual rápidamente se transforma en su polimorfo más estable calcita. En unas condiciones de síntesis diferentes a las aplicadas en esta invención.

[032] A continuación se ilustran en la tabla No. 2 las cepas comerciales utilizadas en la presente invención, las cuales fueron adquiridas comercialmente en colecciones de microorganismos de carácter mundial (DSMZ) e importadas a Colombia que tienen capacidad de producción de carbonato de calcio y que son obtenidas y/o adquiridas fuera del territorio colombiano y de Comunidad Andina de Naciones.

Tabla No. 2

Cepa		Código Cepa
1.	<i>S.ureae</i>	DSM320
2.	<i>S.pasteurii</i>	DSM276
3.	<i>S.pasteurii</i>	DSM323
4.	<i>B.megaterium</i>	DSM-32
5.	<i>B.holodurans</i>	DSM-497
6.	<i>B.pseudofirmus</i>	DSM-8715
7.	<i>B.cohnii</i>	DSM-6307
8.	<i>B.lentus</i>	DSM-9
9.	<i>B.subtilis</i>	DSM-6397
10.	<i>B.pumilis</i>	DSM-766
11.	<i>Lysinibacillus sphaericus</i>	DSM-28
12.	<i>Corynebacterium amoniogenes</i>	DSM-20306

[033] De acuerdo con un aspecto de la presente invención, estas cepas pueden participar en el proceso a fin de producir carbonato de calcio tipo vaterita estable, pero no se limitan a las mismas ya que el proceso de la presente invención y el medio de cultivo B21LM son aplicables a cualquier microorganismo productor de carbonato de calcio.

[034] En un aspecto de la presente invención, la invención comprende un proceso o método para la producción de carbonato de calcio tipo vaterita estable, mono dispersa y biocompatible a partir de bacterias ureolíticas y no ureolíticas en un medio de biosíntesis líquido con unas condiciones específicas, en donde el proceso comprende las siguientes etapas:

- a) Reactivación de cepas bacterianas con capacidad de bioprecipitación de carbonato de calcio,

- b) Preparación del medio de cultivo líquido B21LM para la síntesis de vaterita,
- c) Adición de las cepas bacterianas reactivadas en el paso a),
- d) Monitoreo de la formación de vaterita estable,
- e) Separación y recolección de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita; y
- f) Caracterización mineralógica de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita.

[035] La etapa a) de reactivación de las cepas bacterianas crio-conservadas con glicerol, se hace mediante técnicas microbiológicas tradicionalmente utilizadas y recomendadas por la DSMZ y ATCC en medios de cultivos sólidos y líquidos enriquecidos, que propician el crecimiento exponencial, orgánico y natural de las bacterias conservando su viabilidad y vitalidad. Estos medios generalmente están constituidos de peptona de soya o de caseína 0.5%, extracto de carne 0.3% agar 1.5%, NaCl 0.5%, y suplementado por urea 2% según los requerimientos metabólicos del microorganismo a tratar (Ureasa positivos o ureasa negativos). La figura 1 muestra las cepas comercialmente adquiridas que pueden ser reactivadas y que pueden participar en el proceso de la invención, en donde se puede observar la capacidad individual de cada microorganismo y su desempeño para la biosíntesis de carbonato de calcio tipo vaterita bajo las mismas condiciones y medio de cultivo de acuerdo con la presente invención, en donde se evidencia que *Bacillus lentus* es el que tiene mayor desempeño y se eligió como microorganismo blanco y es preferido para llevar a cabo el proceso de la invención.

[036] La etapa b) la preparación del medio de cultivo líquido B21LM para la síntesis de vaterita, es una innovación de los medios tradicionalmente recomendados, los cuales tienen fuentes de calcio, nitrógeno y carbono en proporciones diferentes.

[037] El medio de cultivo B21LM de la etapa b) se caracteriza por estar constituido por NaCl desde 0.1% a 1.0% por cada 100 ml de volumen efectivo del medio, preferiblemente en un rango de 0.3 a 0.8%, más preferiblemente 0.5%.

[038] El medio de cultivo B21LM de la etapa b) comprende además extracto de levadura desde 0.1% a 1.0% por cada 100 ml de volumen efectivo del medio, preferiblemente entre 0.2% y 0.8% y más de preferencia a 0.5%.

[039] El medio de cultivo B21LM de la etapa b) también comprende peptona de caseína entre 0.5% y 2.0% por cada 100 ml de volumen efectivo del medio, más preferiblemente entre 0.8% y 1.5% y más de preferencia de 1.0%.

[040] Adicionalmente, el medio de cultivo B21LM de la etapa b) tiene como fuente de calcio, acetato de calcio en un rango desde 0.25% hasta 10% por cada 100 ml de volumen efectivo del medio, preferiblemente de 3,0%, 7,5% y 10% y más de preferencia a 3.0%.

[041] En una modalidad preferida de la invención, el medio de cultivo líquido B21LM comprende NaCl 0.5%, extracto de levadura 0.5%, peptona de caseína 1%, modificando las concentraciones de acetato de calcio a valores de 3%, 7,5% y 10%.

[042] La biosíntesis se desarrolla a escala de Erlenmeyer de 250 ml, luego en el paso c) mediante la adición de un volumen efectivo de 100 ml, con 10% el volumen de inóculo microbiano adquirido comercialmente en la colección DSMZ, a una concentración de 10^8 cell/ml a una temperatura que oscila entre 25°C y 35°C, preferiblemente a 30°C, y una agitación entre 100 rpm y 250 rpm, más de preferencia a 100 rpm, durante 1 a 21 días, hasta detectar la formación de sedimentos en el fondo del Erlenmeyer. El mayor pico se produce alrededor del día 6 al 15. Las concentraciones y condiciones para la etapa b) pueden escalarse a producciones industriales de carbonato de calcio tipo vaterita. Esta síntesis se desarrolla luego de la preparación del medio de cultivo líquido B21LM de acuerdo con la presente invención en la etapa b) colocando en contacto la cepa bacteriana adquirida comercialmente en la colección DSMZ con el medio y sometiendo el conjunto (cepa bacteriana específica y medio de cultivo) a las condiciones anteriormente expuestas. Las bacterias trabajan de manera independiente y no en consorcio.

[043] La etapa d) consiste en el monitoreo de la formación de vaterita estable, el cual se hace mediante una evaluación de la cantidad de bioprecipitados de carbonatos de calcio generados cada 3 días hasta completar un periodo total de 15 o 21 días. El monitoreo se realiza tomando una alícuota de 1 a 2 ml a la cual se mide el pH y la muestra se somete a centrifugación entre 1.000 y 3.000 rpm por un periodo de 5 a 15 minutos, preferiblemente 10 minutos a una temperatura constante entre 20°C y 30°C, preferiblemente de 25°C. Posteriormente, se retira el sobrenadante y se deja secar para luego hacer pesaje de los bioprecipitados generados para su posterior caracterización mineralógica y determinación de rendimiento. Una vez se determina mediante esta etapa de monitoreo que la

producción de vaterita estable es constante, lo cual es aproximadamente entre el día 15 a 21, se realiza la separación y recolección final del mineral.

[044] La etapa e) de separación y recolección de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita se realiza preferiblemente entre el día 15 y 21. Las partículas de vaterita sintetizadas se enjuagan por triplicado con agua destilada y son colectadas mediante centrifugación entre 1.000 y 3.000 rpm por un periodo de 5 a 15 minutos, preferiblemente 10 minutos a una temperatura constante entre 20°C y 30°C, preferiblemente de 25°C. Posteriormente, el sobrenadante es retirado y los precipitados de vaterita deben ser colectados y secados a temperatura ambiente o mediante su calentamiento en seco que no exceda los 100°C en un horno convencional, con lo cual se observó que la vaterita secada de esta última forma permanecía estable a través del tiempo.

[045] La etapa f) consiste en la caracterización mineralógica de precipitados de carbonato de calcio tipo vaterita. La caracterización puede ser realizada mediante:

- Técnica de Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR), con la finalidad de definir las fases de carbonato de calcio, su cristalinidad y la presencia de otros elementos orgánicos e inorgánicos como lípidos, amidas, grupos amino-carboxilo, grupos CH₃-CH₂, iones fosfatos y magnesio, posiblemente asociados a la formación de vaterita. En modo transmitancia, a un rango de barrido entre 400 y 4000 cm⁻¹ como se ilustra en la figura 8 que corresponden a espectros infrarrojos obtenidos en la etapa d) y f) del proceso de síntesis con el medio de cultivo líquido B21LM de la presente invención.
- Microscopia Electrónica de barrido con analizador de rayos X por energía dispersiva (SEM/EDS) con la finalidad de observar la morfología, hábito y tamaño de los granos de carbonato de calcio tipo vaterita generados y su composición elemental. Esto se puede realizar mediante un microscopio electrónico de barrido “Field Emission Scanning Electron Microscopy”, con detector EDS (Energy Dispersive X ray Spectrometer) a un voltaje de 15kV, distancia de trabajo de 10 mm, spot size alrededor de 50, señal de electrones secundarios (SE) y alto vacío. Las muestras deben ser recubiertas (metalizadas) con oro. En este sentido, las figuras 2 y 3 muestran los agregados bacterianos de *Sporosarcina pasteurii* (Fig. 2) embebidos en cristales de carbonato de calcio y la disposición de los granos de carbonato de calcio sobre las estructuras bacterianas con hábitos esferoidales y tamaños entre 0.8 y 1.09 micras (Fig. 3).

- Difracción de rayos X con la finalidad de identificar y analizar las estructuras y fases cristalinas, determinación de los parámetros de celda, elementos de simetría y grupos espaciales de los carbonatos de calcio tipo vaterita. Usando un equipo Rigaku Miniflex II, con radiación Cu K α 1 y filtro de níquel (30 kV y 45 mA). Dichos análisis se hacen de 6 a 60° 2 θ / min. Con un ángulo de inicio de 4.0, un ángulo de parada de 70, amplitud de 0.02 y un tiempo de conteo de 2.0 segundos. Las bandas entre 2 θ = 25.7, 27.14, 32.7, 44.6, 49.9 - 55.72 corresponden a vaterita (figura 5).

[046] Una etapa adicional que puede tener el proceso de la invención es la etapa g) en la cual se realiza un análisis de estabilidad de la vaterita obtenida ante soluciones que simulan los fluidos corporales a fin de evaluar su bioasimilación y estabilidad tanto a nivel intestinal, estomacal y lesiones tumorales.

[047] De manera sorprendente se ha encontrado que el proceso de la presente invención y con el medio líquido B21LM se puede aplicar a un sinnúmero de bacterias comercialmente disponibles, independientemente de su actividad ureolítica. No obstante, algunos microorganismos develan un mejor desempeño que otros. Estos pueden ser adquiridos en la ATCC o DSMZ. El proceso de producción de vaterita de la presente invención se ha evaluado con alrededor de 12 microorganismos comerciales provenientes de ceparios internacionales y que no han sido aislados en Colombia ni en algún país de la Comunidad Andina.

[048] En una modalidad, el proceso de la presente invención se resaltan 4 microorganismos del género *Bacillus* que develaron mejor desempeño para la precipitación de vaterita comercializados por la DSMZ (Leibniz Institute German Collection of Microorganisms and Cell Cultures GmbH); dos ureolíticas (*Bacillus lentus* DSM-9; *Sporosarcina pasteurii* DSM276) y dos no ureolíticas (*Bacillus subtilis* DSM-6397 y *Bacillus pumilus* DSM-766) y su comportamiento en la bioprecipitación de vaterita ante diferentes concentraciones de acetato de calcio, cambio de pH y presencia y ausencia de urea en el medio líquido de síntesis de la presente invención.

[049] A continuación se ilustra en la tabla 3 las variables y valores para la modalidad preferida del proceso de la presente invención.

Tabla 3

Variable	Valores
Concentración de acetato de calcio	3.0%; 7.5%; 10.0%
Microorganismos	<i>B. pumilus. B. subtilis. B. lentus. y B. pasteurii</i>
pH	7.0 y 8.5

[050] En este sentido, respecto al efecto de la concentración de acetato de calcio $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ en el medio líquido B21LM sobre la bioprecipitación de vaterita; como se denomina el medio líquido de la presente invención y de acuerdo con los resultados obtenidos se encontró que las concentraciones bajas de acetato de calcio (3.0%) favorecen la precipitación de vaterita en contraste con concentraciones más altas (7.5% - 10%). Estos resultados coinciden con las investigaciones de McConnaughey & Whelan, 1997; Hammes & Verstraete, 2002, quienes exponen que el ion calcio además de ser un elemento clave en los fenómenos de bioprecipitación de CC (carbonato de calcio) funciona como agente inductor y desencadenante de múltiples señales y funciones bioquímicas para la proliferación, secreción, contracción y supervivencia celular. También la presencia de sales de calcio y sodio generan un microambiente hipertónico que envuelve a las bacterias, disparando diversas reacciones bioquímicas al interior de la membrana celular, afectando el equilibrio osmótico de la célula, debido a la modificación de carga y voltaje de las proteínas transmembrana o proteínas canal, cuya función principal es regular el flujo pasivo y activo de iones de calcio, sodio, fosfatos, potasio y otros nutrientes. Este evento puede, en determinado momento, causar detrimento de la integridad celular, llevándola a una turgencia, lisis o muerte celular, generando como resultado la exposición adicional de remanentes proteicos que pueden actuar como agentes nucleantes promoviendo el fenómeno de bioprecipitación en virtud de la naturaleza electronegativa de las membranas celulares. (McConnaughey & Whelan 1997; Hammes & Verstraete 2002).

[051] Respecto a la combinación de baja concentración de calcio a nivel extracelular y pH neutro, se desencadena el transporte activo o expulsión del calcio a través de la membrana celular. Cooper & Hausman (2013), explican que el transporte activo de iones o moléculas en direcciones opuestas denominado *Antiport*, ocurre entre los iones $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ o $\text{Ca}^{++}/\text{H}^+$ el cual es mediado por la hidrólisis de ATP ($\text{ADP} + \text{P}$) a través de las quinasas denominadas (Ca-ATPasas) ($\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^+$) o ($2\text{Ca}^{2+}/4\text{H}^+$), mecanismo que promueve la salida de calcio, su precipitación y alcalinización del medio. Esta expulsión activa de calcio es ATPasa

dependiente, de manera adicional se da un aumento del metabolismo de CO₂, otro componente clave que influye en la generación de carbono inorgánico disuelto (DIC) para la bioprecipitación de calcio.

[052] Adicionalmente, evidenciando que a pH inicial 7.0, todos los microorganismos evaluados en esta invención (tabla 2 Microorganismos comerciales no aislados en Colombia o en otro país de la Comunidad Andina) de manera independiente revelan mejor desempeño en la bioprecipitación de vaterita en contraste al medio inicial con pH 8.5. Un punto a resaltar es la obtención de cantidades de bioprecipitación de vaterita de alrededor de 14gr/L, revelando mejor desempeño por parte de *B. lentus* y *B. pasteurii* en contraste con *B. pumilus* y *B. subtilis* (Figura 6). Los resultados obtenidos con el proceso y con el medio líquido B21LM de la presente invención permiten entonces la bioprecipitación de vaterita en ambientes más neutros, lo cual resulta ser un efecto sorprendente sobre la regla técnica que indica que el mecanismo de bioprecipitación de vaterita de las bacterias ocurre regularmente en ambientes alcalinos. (Trushina et al., 2014; Srivastava et al., 2015).

[053] Aunado a lo anterior, se encontró que con el bioproceso y el medio líquido B21LM de la presente invención, que la urea no es un factor determinante para la producción de vaterita independientemente de los requerimientos de las bacterias con capacidad ureolítica.

EJEMPLO

[054] Se realizó el proceso de la presente invención en las cepas urea positivas *Bacillus lentus* y *Sporosarcina pastuerii* y urea negativas *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus* que presentaron una mayor capacidad calcificante en medio líquido B21LM. El proceso comienza con la reactivación de las cepas anteriormente nombradas, en donde las cepas bacterianas están crio-conservadas con glicerol, mediante técnicas microbiológicas tradicionalmente utilizadas y recomendadas por la DSMZ y ATCC en medios de cultivos sólidos enriquecidos. Se empleó un medio constituido de peptona de soya o de caseína 0.5%, extracto de carne 0.3% agar 1.5%, NaCl 0.5%, y suplementado por urea 2% según los requerimientos metabólicos del microorganismo a tratar (ureasa positivos o ureasa negativos).

[055] Paralelamente se lleva a cabo la etapa b) que consiste en la preparación del medio de cultivo B21LM de acuerdo con la presente invención, en donde el medio B21LM comprende NaCl 0.5%, extracto de levadura 0.5%, peptona de caseína 1%

y acetato de calcio a 3%. Se mezclan las cantidades anteriormente indicadas en un recipiente o contenedor o un Erlenmeyer con un volumen efectivo de 100 ml y se fijan las condiciones de la siguiente manera: temperatura a 30°C, presión atmosférica (isobárico), agitación a 100 rpm, pH de inicio 7.0 y se agregaron a cada Erlenmeyer respectivamente un 10% de volumen de inóculo con una concentración de 10⁸ células/ml (*Bacillus lentus*, *Sporosarcina pastuerii*, *Bacillus subtilis* y *Bacillus pumilus*). Este momento se toma como el tiempo “0” o día “1”. El proceso se realizó bajo estas condiciones con cada una de las cepas anteriormente nombradas de manera independiente, es decir, cada cepa de manera individual en su respectivo recipiente.

[056] Luego se procedió con la etapa d) en donde se realizó el monitoreo de la formación de vaterita estable, mediante la toma de una muestra de 2 ml del medio en cada Erlenmeyer los días 3, 6, 9, 12, 15, 18 y 21. Cada una de las alícuotas se sometió a centrifugación a 3.000 rpm durante 10 minutos a temperatura ambiente (25°C) y luego se retiró el sobrenadante dejándose secar los viales previamente pesados a fin de determinar la producción en cada muestra. El monitoreo se llevó a cabo, por ejemplo y como se muestra en la figura 8 para el caso de *Bacillus lentus* a través de espectroscopia infrarroja con FTIR, en donde se observa la aparición de las bandas características de vaterita 745 cm⁻¹, 875 cm⁻¹ y 1070 cm⁻¹ entre el rango de 4000 cm⁻¹ y 400 cm⁻¹.

[057] Luego del día 15, se realiza la etapa e) en donde se lleva a cabo la separación y la recolección de bioprecipitados de carbonato de calcio tipo vaterita y se lleva a cabo la caracterización mineralógica de los precipitados. Por ejemplo, para el caso de *Sporosarcina pasteurii*, como se muestra en la figura 2 se observó la formación de carbonato de calcio tipo vaterita sobre la superficie de las bacterias y un comportamiento similar se observa en la figura 3 para *Bacillus pumillus* y *Bacillus subtilis* y *Bacillus lentus*.

Tabla 4. Rendimientos de obtención de carbonato de calcio tipo vaterita

Bacteria	Rendimiento
<i>Bacillus lentus</i>	1397.5 mg/100ml
<i>Sporosarcina pastuerii</i>	1388.5mg/100ml
<i>Bacillus subtilis</i>	901 mg/100ml
<i>Bacillus pumilus</i>	1028.5 mg/ml

[058] Como se puede observar en la figura 7, se obtiene un mayor rendimiento en el proceso de la presente invención para *Bacillus lentus* y *Sporosarcina pastuerii* con el medio líquido B21LM a una concentración de 3.0% de acetato de calcio a pH 7.0 y ausencia de urea, en contraste a las otras dos concentraciones de acetato de calcio de 7.5% y 10.0%.

[059] En relación con la etapa g) en la cual se realiza el análisis de estabilidad de la vaterita obtenida mediante el proceso de la invención, la experimentación se inició con la exposición del biomaterial vaterita a diferentes condiciones: temperatura 30°C, 37.5°C, 40°C, pH 1,8, 4,5, 7,2 y tiempo 1.5 h, 3 h y 15 h, con la finalidad de analizar el efecto de cada uno de estos factores sobre la estabilidad y transformación de fase de la vaterita en otros polimorfos (carbonato de calcio amorfo (ACC), calcita y aragonito), cambios de morfología, cambios de tamaño de partícula y el grado de solubilidad. Los resultados revelaron que la vaterita obtenida por este proceso mantiene la estabilidad de su estructura cristalina a pH 7.2-4.5, por periodos comprendidos entre 1.5 -15 horas se degrada a pH de 1.8, evidenciándose una notoria reacción de efervescencia en solución. Adicionalmente, se evidenció pérdida de su cristalinidad con la desaparición de las bandas características para el polimorfo vaterita 745 cm⁻¹ y 875 cm⁻¹ mediante FT-IR, y una rápida disolución de las partículas de vaterita en un 95-97%.

[060] Una vez llevado a cabo el proceso de bioprecipitación de carbonato de calcio tipo vaterita en medio líquido específico (B21LM), se analizó la estabilidad de la vaterita sintetizada por la **bacteria *Bacillus lentus***, microorganismo que reveló mejor desempeño y mayor capacidad de síntesis del biomineral a pH 7.0 y concentraciones de acetato de calcio del 3% y produciendo aproximadamente 14gr/L, del mismo modo incrementó su bioprecipitación a pH 7.0 en medio líquido B21LM, suplementado con urea y concentraciones de acetato de calcio al 10% duplicando su capacidad de biosíntesis alrededor de 26 gr/L.

[061] Para la evaluación de la estabilidad de la vaterita sintetizada se realizó un diseño factorial con múltiples niveles y dos réplicas. Los factores estudiados fueron tres: i) Temperatura (30°C, 37.5°C, 40°C) ii) pH (1,8. 4,5, 7,2) y iii) tiempo en horas (1.5h, 3h, 15h). Estos factores se estudiaron a fin de simular condiciones corporales y condiciones de estabilidad de la vaterita. En el caso de la temperatura, se estudió la temperatura de síntesis de la vaterita (30°C), la temperatura corporal y estados febriles (37.5°C) y la temperatura límite para la estabilidad de fase de la vaterita (40°C).

[062] En el caso del pH para estos ensayos se emplearon lapsos entre 1.5 h, 3 h y 15 h con dos réplicas (Austyn et al., 1994; Sheehan, 1997; Svenskaya et al., 2013; Rodríguez et al., 2007; Abbas et al., 2019) que corresponden a tiempos comúnmente utilizados en estudios asociados a liberación de medicamento “Drug Delivery”, la velocidad de degradación, disolución y asimilación de compuestos encapsulantes tipo vaterita en los organismos en condiciones estomacales (pH 1.8), duodeno (pH 7.2) y lesiones tumorales (pH 4.5) de acuerdo con los estudios de Han et al., 2006; Lopera et al., 2008; Malani, 2012; Qiu et al., 2012; Svenskaya et al., 2013; Bogdan et al., 2015; Dominique et al., 2016 y Rodríguez et al., 2007.

[063] En el caso de los tiempos de 1.5 h y 3 h, éstos coinciden con el margen de tiempo en el que se genera una respuesta inmunitaria aguda y el lapso de 15 h está asociado al periodo en el cual ocurren de manera coordinada los sucesos que conducen a un ciclo celular completo. Después de cumplidos los tiempos de exposición del mineral en la solución RPMI₁₆₄₀, el sedimento es separado del sobrenadante mediante centrifugación a 2500 rpm, secado y pesado, para su posterior caracterización mineralógica con FT-IR y SEM/EDX.

[064] Como se puede observar en la figura 9 a 11 que corresponden a espectros FTIR, el análisis de estabilidad de la vaterita en función del pH, Tiempo y Temperatura revelan que la vaterita sintetizada mediante este método de esta invención pierde su integridad y estabilidad a pH 1.8 por lapsos de tiempo entre 1,5h. 3h. y 15h. Detectándose de manera adicional que a mayor temperatura entre 37,5°C y 40°C y mayor tiempo de exposición es más notable la pérdida del estado de equilibrio de la vaterita, transformando su estructura y presentando baja cristalinidad como (ACC) y develando otros compuestos orgánicos como grupos metilo y etilo (CH₃-CH₂); grupos nitrogenados (amidas-C=N), grupos oxigenados (O-H) según (Lv et al., 2017) que están asociadas con la estabilidad y generación de este polimorfo. Los resultados obtenidos coinciden con los estudios de Svenskaya et al., 2013; Trushina & Antipina, 2016.

[065] De acuerdo con lo mostrado en las figuras 12, 13 y 14 se puede observar que la vaterita sintetizada mediante el método propuesto en la presente invención pierde su integridad y estabilidad especialmente a pH 1.8 (barras naranja), por lapsos de tiempo entre 1,5h. 3h y 15h. Las temperaturas entre 30°C (a). 37,5°C (b) y 40°C (c) afectan indistintamente en la transformación y disolución de la vaterita a carbonatos de calcio amorfos. Las barras naranja reflejan un incremento de la solubilidad de la

vaterita entre un 95% a un 97% en virtud de la acidificación del pH del medio según las mediciones de peso seco. Los resultados obtenidos coinciden con los estudios de Svenskaya et al., 2013; Trushina & Antipina, 2016 y son promisorios para la aplicación de la vaterita obtenida de acuerdo con el proceso de la invención como vehículo encapsulante para liberación de productos farmacéuticos o medicamentos.

[066] La persona versada en la materia entenderá que las condiciones del proceso y las concentraciones de los componentes del medio líquido de cultivo B21LM en la etapa b) de dicho proceso, podrán tener variaciones de acuerdo con los rangos estipulados en la presente descripción y que también estarán dentro del alcance de la presente invención y de las reivindicaciones que se establecen a continuación.