COMPOSICIÓN ANTIMICROBIANA DE NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS Y SU MÉTODO DE OBTENCIÓN

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención pertenece al sector de la nanotecnología, específicamente a composiciones antimicrobianas a base de nanopartículas inorgánicas sintetizadas a través de procesos biotecnológicos.

DESCRIPCIÓN DEL ESTADO DEL ARTE

La nanotecnología es un área en rápido crecimiento con potencial uso en múltiples áreas, desde la electrónica hasta la cosmética, que ha impulsado el desarrollo de tecnologías relacionadas con el diseño de materiales con propiedades únicas y mejoradas. Dentro de estos materiales, las nanopartículas basadas en metales y metaloides, son una tecnología versátil, con una amplia variedad de aplicaciones, por ejemplo como activos antimicrobianos en las industrias alimentaria, agrícola, textil y farmacéutica. (Dhand V, Soumya L, Bharadwaj S, Chakra S, Bhatt D, Sreedhar B. Green synthesis of silver nanoparticles using Coffea arabica seed extract and its antibacterial activity. Materials science & engineering. C, Materials for biological applications. Volumen 58, páginas 36-43, 2016.)

Las nanopartículas pueden ser sintetizadas usando varios métodos que incluyen reducción química, microemulsión, sonoquímica, descomposición termal, radiación asistida, procesos electroquímicos, sonoquímicos y síntesis asistida por microondas. Sin embargo, estos métodos usualmente involucran el uso de sustancias tóxicas y condiciones agresivas (pH, temperatura y presión) que tienen graves efectos sobre el medio ambiente y la salud humana.

En este sentido, el desarrollo de rutas de síntesis biológica de nanopartículas surge como alternativa sostenible, ecológica y más segura para la salud humana. Además, la síntesis biológica presenta ventajas sobre los métodos físicos y químicos, como un escalado sencillo

y simple, un procesamiento posterior, una manipulación y recuperación de biomasa más fácil y una viabilidad económica tangible.

Al respecto, se han realizado diversos esfuerzos para desarrollar nanopartículas mediante métodos biológicos, mediante el uso de agentes como plantas, semillas, bacterias, hongos, actinomicetos, líquenes y algas.

Por ejemplo, la solicitud US8394421B2 divulga un método para sintetizar nanopartículas de plata usando cultivos de células de *Trichoderma reesei* y nitrato de plata. El método comprende poner en contacto el hongo con nitrato de plata, lo que estimularía la producción de enzimas reductoras de plata para generar las nanopartículas.

El artículo *"Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Aspergillus fumigatus"* (Bhainsa, Kuber C, and S F D'Souza. Extracellular biosynthesis of silver nanoparticles using the fungus Aspergillus fumigatus. Colloids and surfaces. B, Biointerfaces. Volumen 47, número 2, páginas 160-164, 2006) es un estudio dirigido a evaluar la síntesis extracelular de nanopartículas de plata usando el hongo *Aspergillus fumigatus*. Particularmente el artículo describe un método que consiste en obtener un extracto de la biomasa purificada del hongo en agua desionizada Milli-Q y posteriormente mezclar el extracto con nitrato de plata para obtener nanopartículas de nitrato de plata.

Por su parte, el artículo "*Optimization of Biological Synthesis of Silver Nanoparticles using Fusarium oxysporum"* (Korbekandi, H., Ashari, Z., Iravani, S., & Abbasi, S. Optimization of Biological Synthesis of Silver Nanoparticles using *Fusarium oxysporum*. Iranian journal of pharmaceutical research. Volumen 12, número 3, páginas 289–298, 2013) es un estudio dirigido a optimizar la producción biológica de nanopartículas de plata usando *Fusarium oxysporum*, y a determinar la localización de la síntesis de nanopartículas en este microorganismo. En el método descrito en el artículo el microorganismo es directamente cutivado en un medio que contiene nitrato de plata como sustrato de biotransformación,

glucosa como donador de electrones y tampón fosfato. Como resultado, se obtuvieron nanopartículas de plata obtenidas esféricas adheridas a la superficie de las células fúngicas.

Si bien en el estado de la técnica se divulgan diferentes métodos de síntesis biológica para producir nanopartículas inorgánicas, particularmente nanopartículas de plata, aún persiste la necesidad de explorar mecanismos para sintetizar otros tipos de nanopartículas con actividad sobre una amplia gama de microorganismos, así como de desarrollar composiciones estables y versátiles para su uso como antimicrobianos de amplio espectro en diferentes materiales.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a una composición antimicrobiana que comprende una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa, en donde la solución acuosa comprende la fracción acelular del cultivo líquido de al menos un microorganismo productor de una enzima reductora de metales, surfactantes y estabilizantes, y a su método de producción.

La composición antimicrobiana de la invención representa una alternativa ecológica a las composiciones antimicrobianas tradicionales. Además, gracias a su amplio espectro de acción y versatilidad, resulta de especial interés para el tratamiento de diversos agentes patógenos de la industria agrícola, así como para desinfección de múltiples materiales en industrias que incluyen la industria de alimentos y textil.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1 Ilustra el efecto del medio de cultivo en el crecimiento de los microorganismos. Los medios contienen variaciones de los siguientes ingredientes la siguiente composición: M (malta), G (glucosa), Y (extracto de levadura) y P (extracto de papa) y en algunos casos sales. Particularmente los medios se componen de la siguiente manera: E1: MGYP, E2: MGYG + glucosa al 2%, E3: MGYP + sales, E4: MGYP + glucosa al 2% + sales, E5: MG.

FIG. 2 Análisis de los ácidos oránicos producidos durante el crecimiento del microorganismo en los diferentes medios de cultivo de la FIG. 1. Se muestran los resultados de los medios E1 (A), E2 (B), E3 (C) y E4 (D), el medio E5 se descartó debido a su bajo rendimiento.

FIG. 3 Muestra una el análisis de tamaño y composición de nanopartículas sintetizadas mediante el método del desarrollo. Las nanopartículas se muestran individuales o en aglomerados con tamaño entre 5nm a 100nm (FIG. 3A). La composición de la suspensión de nanopartículas se verificó por EDS como se describe en la (FIG 3B), en donde se evidenció la presencia de plata entre otros componentes del medio y metabolitos secundarios.

FIG. 4 Muestra micrografías de diferentes suspensiones de nanopartículas de SiO_2, donde se observan diferentes formas y tamaños entre 10 y 100nm. Las FIG. 4A y 4D muestran nanopartículas de SiO_2 sintetizadas usando como medio de cultivo de cultivo E1 suplementado con extracto de arroz integral y ceniza de la cascarilla de arroz como precursor; las FIG. 4B y 4E muestran nanopartículas de SiO_2 sintetizadas usando medio de cultivo de cultivo E1 y ceniza de la cascarilla de arroz como precursor; y las FIG 4C y 4F muestran nanopartículas muestran nanopartículas de SiO_2 sintetizadas usando medio de cultivo de cultivo E1 suplementado con 2% de glucosa y ceniza de la cascarilla de arroz como precursor.

FIG. 5 Muestra los resultados del ensayo de la determinación de la dosis mínima inhibitoria de las composiciones de la invención sobre diferentes microorganismos comparadas con composiciones de nanopartículas sintetizadas por vía química. Particularmente la FIG. 5A ilustra la inhibición del crecimiento de *Fusarium oxysporum* usando agua Mili-Q (control) (1), 1 mL de nanopartículas de plata sintetizadas por vía química (2), 2 mL de nanopartículas de plata sintetizadas por vía química (3), 1 mL de suspensión de nanopartículas de plata sintetizadas por el método de la invención sin surfactante (4), 2 mL de suspensión de nanopartículas de plata sintetizadas por el método de la invención sin surfactante (5), 1 mL de suspensión de nanopartículas de plata sintetizadas por el método de la invención con lauril sulfato de sodio (SLS) al 2% (6) y 2 mL de

suspensión de nanopartículas de plata sintetizadas por el método de la invención con SLS al 2% (7). La FIG. 5B ilustra la inhibición del crecimiento de *Saccharomyces cerivisiae* usando agua Mili-Q (control) (8), y 1 mL de suspensión de nanopartículas de plata sintetizadas por el método de la invención con SLS al 2% (9). La FIG. 5C ilustra la inhibición del crecimiento de *Bacillus subtilis* usando agua Mili-Q (control) (10), 1 mL de suspensión de nanopartículas de plata sintetizadas por el método de la invención con SLS al 2% (11) y 2 mL de suspensión de nanopartículas de plata sintetizadas por el método de la invención con SLS al 2% (12).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a una composición antimicrobiana que comprende una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa, en donde la solución acuosa comprende la fracción acelular del cultivo líquido de al menos un microorganismo productor de una enzima reductora de metales, surfactantes y estabilizantes. Así mismo la presente invención se refiere a un método para preparar la composición antimicrobiana.

Para propósitos de interpretar esta descripción, se debe tener en cuenta el significado usual en el campo técnico de los términos acá incorporados, a menos que se incorpore una definición particular o el contexto indique claramente lo contrario. A menos que se indique lo contrario, todas las partes y porcentajes del presente Capítulo Descriptivo están basados en porcentaje peso/volumen.

Composición antimicrobiana

En un primer aspecto, el desarrollo corresponde a una composición antimicrobiana. Para efectos de la presente invención, se entiende por *"composición antimicrobiana"* una mezcla de ingredientes que eliminan microorganismos y/o o afectan negativamente su reproducción. En particular, la composición de la invención ejerce su efecto antimicrobiano sobre bacterias, hongos.

La composición antimicrobiana del desarrollo, se caracteriza porque comprende una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa. Para efectos de la presente invención, se entiende por *"suspensión"* una mezcla heterogénea de un fluido que contiene partículas sólidas. Por lo tanto, *"suspensión de nanopartículas inorgánicas"* se refiere a una suspensión de partículas de elementos metálicos o metaloides. Particularmente, las nanopartículas inorgánicas del desarrollo, se seleccionan entre, pero no se limitan a nanopartículas de plata, zinc, cobre, oro, titanio, circonio y silicio, o mezclas de las mismas.

Las nanopartículas inorgánicas del desarrollo, se caracterizan por que tienen una forma variada, por ejemplo son esféricas y/o triangulares. Asimismo, las nanopartículas esféricas del desarrollo tienen un diámetro de entre 1nm y 100nm, preferiblemente entre 5nm y 100nm, entre10nm y 100nm, entre 20nm y 70nm, entre 30nm y 60nm, o entre 40nm y 100nm. Para efectos de la invención, la concentración de las nanopartículas en la composición antimicrobiana es entre 10% y 20% (%v/v).

En la composición antimicrobiana del desarrollo, la suspensión de nanopartículas se encuentra en solución acuosa, es decir el fluido en la suspensión de nanopartículas, es una solución acuosa. Para efectos del desarrollo, la solución acuosa comprende la fracción acelular del cultivo líquido de al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales y metaloides. En algunas modalidades, la solución acuosa comprende además un diluyente o una mezcla de diluyentes seleccionados entre agua, solución tampón pH 5,5 o mezclas de los mismos.

En las modalidades en donde la solución acuosa comprende un diluyente, la proporción de fracción acelular del cultivo líquido de al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales a diluyente es de 1:10 a 1:40, preferiblemente de 1:20.

En el presente desarrollo *"fracción acelular"* se refiere a la fracción residual del cultivo líquido de al menos un microorganismo productor enzimas reductoras de metales tras remover la biomasa del microorganismo. Es decir, la *"fracción acelular"* del cultivo líquido

de al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales comprende los componentes del medio de cultivo líquido no consumidos por el microorganismo o los microorganismos cultivados, y los metabolitos producidos por el microorganismo o los microorganismos durante su cultivo, particularmente las enzimas reductoras de metales, pero no comprende biomasa del microorganismo o de los microorganismos cultivados.

En una modalidad la *"fracción acelular"* del cultivo líquido de al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales, corresponde a la fracción acelular del cultivo de un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales. En otra modalidad, la *"fracción acelular"* del cultivo líquido de al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales, corresponde a una mezcla de *"fracciones acelulares"* de cultivos independientes de dos o más microorganismos productores de enzimas reductoras de metales.

En las modalidades en donde la fracción acelular corresponde a una mezcla de dos o más fracciones acelulares de cultivos independientes de dos o más microorganismos productores de enzimas reductoras de metales, cada cultivo incluido en la mezcla es de un microorganismo diferente, cada uno de los cuales, a su vez, produce al menos una enzima reductora de un metal diferente a los otros microorganismos cultivados. Por lo tanto, las fracciones acelulares que comprenden una mezcla de fracciones acelulares de varios cultivos de microorganismos, son fracciones acelulares que contienen dos o más enzimas reductoras, cada una de las cuales actúa sobre un metal o sustrato metálico o metaloide diferente.

En una modalidad preferida, la *"fracción acelular"* del cultivo líquido de microorganismos productores de enzimas reductoras de metales comprende entre 1 y 5, o entre 1 y 3 cultivos independientes de microorganismos productores de al menos una enzima reductora de metal diferentes.

Para efectos de la presente invención, los microorganismos cultivados se seleccionan entre, pero no se limitan a *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Aspergillus terreus, Lactobacillus sp., Fusarium oxysporum, Escherichia coli, Streptococcus thermophilus, Aspergilus niger,*

Aspergilus flavus, Aspergilus fumigatus, Penicilium sp., Pseudomonas aeruginosa y *Trichoderma viride.*

Además de los anteriores, cualquier microorganismo que produzca al menos una enzima reductora de metal está comprendido en el desarrollo. No obstante, microorganismos que producen más de una enzima reductora de metal, por ejemplo, dos, tres o cuatro enzimas reductoras de metales, también están comprendidos en el desarrollo.

Para efectos de la presente invención, debe entenderse *"enzima reductora de metal"* como una enzima extracelular capaz de catalizar la síntesis de nanopartículas de plata, zinc, cobre, oro, titanio, circonio o silicio a partir de precursores que comprenden dichos materiales, por ejemplo, sales de los mismos. Las enzimas reductoras de metales comprendidas en la invención abarcan, pero no se limitan a nitrogenasa reductasa, α-NADH, nitrato reductasa, sulfato reductasas, y cualquier enzima extracelular producida por microorganismos que catalice la síntesis de nanopartículas inorgánicas a partir de sus precursores. Asimismo, algunos ejemplos de precursores comprendidos en la invención, incluyen, pero no se limitan a nitrato de plata ($AgNO_3$), acetato de zinc ($ZnC_4H_6O_4$), nitrato de zinc ($Zn(NO_3)_2$), cloruro de zinc ($ZrCl_5$), dióxido de silicio (SiO_2) y dióxido de titanio (TiO_2).

En algunas modalidades, las enzimas transforman la totalidad de los precursores en nanopartículas, mientras en otras modalidades, las enzimas no consumen la totalidad de los precursores. En estos últimos casos, la solución acuosa puede comprender trazas de los precursores utilizados para la síntesis de nanopartículas.

La composición antimicrobiana del desarrollo también incluye uno o más surfactantes. Para efectos de la presente invención, los surfactantes se encuentran en la composición antimicrobiana en una concentración entre 0,5% y 10% (% p/v), preferiblemente entre 0,5% y 5% (% p/v), más preferiblemente entre 1,1% y 10%, y se seleccionan entre, pero no se limitan a polisorbato 20, polisorbato 80, carboximetilcelulosa (CMC), lauril sulfato de sodio

(SLS), dodecil sulfato de sodio (SDS), dimetilsulfóxido (DMSO), Tritón x-100, alcohol polivinílico, decanotiol, tripolifosfato de sodio (STP) o mezclas de los mismos.

Además, la composición antimicrobiana de la invención comprende al menos un estabilizante. Para efectos de la presente invención, un *"estabilizante"* hace referencia a una sustancia que se añade para mantener una mezcla homogénea de los componentes de la composición antimicrobiana. Debido a la naturaleza de la composición, los estabilizantes añadidos pueden ser a su vez, reguladores de pH.

Los estabilizantes se encuentran en la composición antimicrobiana a una concentración entre 0,1% y 15% (% p/v), preferiblemente entre 0,1% y 10 (% p/v), más preferiblemente entre 0,1% y 5% (% p/v), y se seleccionan entre albúmina, citrato de sodio, cloruro de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, tampón fosfato, polivinilpirrolidona (PVP30), o mezclas de los mismos.

La composición antimicrobiana del desarrollo se caracteriza por que tiene un pH entre 4,5 y 6,5, preferiblemente entre 4,5 y 6,0. Asimismo, la composición antimicrobiana de la invención se caracteriza porque tiene entre 5% y 30% (% v/v), preferiblemente entre 10% y 20% (% v/v) de nanopartículas inorgánicas, y absorbancia a una longitud de onda entre 440nm y 590nm.

La composición antimicrobiana de la invención se caracteriza por ser estable durante 5 semanas a temperatura entre 14ºC y 30ºC en condiciones de oscuridad, o durante 6 a 8 semanas a temperatura entre 2ºC y 10ºC en condiciones de oscuridad.

En una modalidad, la composición antimicrobiana del desarrollo comprende una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa, en donde la solución acuosa comprende la fracción acelular del cultivo líquido de <u>al menos</u> un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales, un surfactante a una concentración entre 0,5% y 5% p/v y un estabilizante a una concentración entre 0,1% y 10% p/v.

En otra modalidad, la composición antimicrobiana del desarrollo comprende una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa, en donde la solución acuosa comprende la fracción acelular del cultivo líquido de al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales, un surfactante a una concentración entre 0,5% y 5% p/v y un estabilizante a una concentración entre 0,1% y 10% p/v.

En una modalidad preferida, la composición antimicrobiana del desarrollo comprende una suspensión de nanopartículas de plata en solución acuosa, en donde la solución acuosa comprende la fracción acelular del cultivo líquido de al menos un microorganismo productor de nitrato deshidrogenasa, un surfactante a una concentración de 2% p/v y un estabilizante a una concentración de 1% p/v.

En otra modalidad preferida, la composición antimicrobiana del desarrollo comprende una suspensión de nanopartículas de silicio en solución acuosa, en donde la solución acuosa comprende la fracción acelular del cultivo líquido de un microorganismo productor de enzimas reductoras de SiO_2, un surfactante a una concentración entre 0,5% y 5% p/v y un estabilizante a una concentración entre 0,1% y 10% p/v.

En una modalidad preferida, la composición antimicrobiana del desarrollo comprende una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa, en donde la solución acuosa comprende las fracciones acelulares de los cultivos líquidos de dos microorganismos productores de enzimas reductoras de metales, un surfactante a una concentración entre 0,5% y 5% p/v y un estabilizante a una concentración entre 0,1% y 10% p/v.

En otra modalidad, la composición antimicrobiana del desarrollo comprende una suspensión de nanopartículas de zinc y cobre en solución acuosa, en donde la solución acuosa comprende la fracción acelular del cultivo líquido de un microorganismo productor de enzimas reductoras de zinc y la fracción acelular del cultivo líquido de un microorganismo productor

de enzimas reductoras de cobre, un surfactante a una concentración de 2% p/v y un estabilizante a una concentración entre 1% p/v.

En una modalidad adicional, la composición antimicrobiana del desarrollo comprende una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa, en donde la solución acuosa comprende las fracciones acelulares de los cultivos líquidos de tres microorganismos productores de enzimas reductoras de metales, un surfactante a una concentración entre 0,5% y 5% p/v y un estabilizante a una concentración entre 0,1% y 10% p/v.

Método de producción de la composición antimicrobiana

En un segundo aspecto, la presente invención proporciona un método para producir la composición antimicrobiana de la invención. Particularmente, el método para obtener una composición antimicrobiana de nanopartículas inorgánicas comprende (i) cultivar al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metal en un medio de cultivo inductivo líquido, (ii) remover la biomasa del microorganismo del cultivo de la etapa (i) para obtener la fracción acelular del cultivo, añadir a la fracción acelular del cultivo de la etapa (ii), uno o más precursores metálicos y permitir la formación de una suspensión de nanopartículas inorgánicas, y (iv) añadir a la suspensión de nanopartículas inorgánicas de la etapa (iii) surfactantes y estabilizantes.

(i) cultivar al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metal en un medio de cultivo inductivo líquido

El primer paso para llevar a cabo esta etapa es la preparación u obtención del medio de cultivo inductivo líquido. Para efectos de la presente invención, *"medio de cultivo inductivo líquido"* se refiere a un medio de cultivo líquido que tiene los nutrientes necesarios para el crecimiento del microorganismo, y que además induce la producción de enzimas reductoras de metales en el mismo. El medio de cultivo inductivo líquido de la presente invención, comprende al menos una fuente de carbohidratos, una fuente de proteína y ácidos orgánicos.

Para efectos del desarrollo, la fuente de carbohidratos se encuentra en el medio de cultivo inductivo en una concentración entre 2% y 15% (% p/v), entre 2% y 10% (% p/v) o entre 5% y 10% (% p/v). Ejemplos de fuentes de carbohidratos comprendidas en el desarrollo incluyen, pero no se limitan a sacarosa, maltosa, lactosa, glucosa, fructosa o mezclas de las mismas.

De otro lado, la fuente de proteína en el medio de cultivo inductivo está a una concentración entre 5% y 20% (% p/v), entre 2% y 15% (% p/v), entre 5% y 15% (% p/v), o entre 5% y 10% (% p/v), y se selecciona entre, pero no se limita a extracto de levadura, extracto de malta, extracto de proteína de soya, caseína hidrolizada o mezclas de las mismas.

En una modalidad preferida, el medio de cultivo inductivo líquido de la presente invención tiene una proporción de fuente de carbohidratos a fuente de proteína entre 1:1 a 1:6, preferiblemente de 1:6.

El medio de cultivo inductivo líquido de la presente invención tiene un pH entre 4,0 y 6,0. El pH del medio de cultivo se ajusta mediante la adición de ácidos orgánicos que incluyen, pero no se limitan a ácido cítrico, ácido láctico y ácido fumárico.

La presente invención abarca tanto medios de cultivo preparados en el laboratorio como medios de cultivo comercialmente disponibles que cumplan con las características acá descritas. Asimismo, el medio debe ser estéril, es decir debe cumplir uno o varios protocolos de esterilización conocidos en el campo técnico antes de su uso.

Una vez se tiene el medio de cultivo inductivo líquido estéril, se procede a inocular el medio de cultivo con un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales y cultivarlo. El cultivo se puede realizar a pequeña escala en frascos de cultivo o a gran escala en biorreactores. En ambos casos, el cultivo se lleva a cabo en las condiciones óptimas de crecimiento para cada microorganismo. De manera general el cultivo se lleva a cabo en

aireación, a una temperatura entre 22ºC y 37ºC, en agitación continua entre 100 y 300 RPM, preferiblemente a 240 RPM, durante 60h a 180h o hasta que el cultivo alcance un pico de absorbancia alrededor de los 430 nm.

En un aspecto, el método del desarrollo comprende cultivar al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales en un medio de cultivo inductivo líquido. Para efectos de la presente invención, *"al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metal"*, hace referencia a que esta primer etapa tiene como requisito mínimo, cultivar un microorganismo productor de enzimas reductoras de metal. No obstante, el desarrollo abarca modalidades en donde se cultiva más de un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales, particularmente, dos, tres, cuatro o cinco microorganismos productores de enzimas reductoras de metales.

En modalidades en donde se cultiva más de un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales, el cultivo de cada microorganismo se realiza de forma independiente. Además, cada microorganismo cultivado usado para una misma composición debe ser productor de al menos una enzima reductora de un metal distinto a las enzimas producidas por los otros microorganismos cultivados para uso en la misma composición. Por ejemplo, asumiendo que se va a producir una composición antimicrobiana que comprende cultivar dos microorganismos, cada uno de los microorganismos debe ser cultivado independientemente, y cada uno debe producir una enzima reductora que actúe sobre un metal o sustrato precursor metálico diferente.

Para efectos de la presente invención, los microorganismos utilizados pueden incluir bacterias y hongos. El requisito para que un microorganismo sea utilizado en el método de la invención es que produzca al menos una enzima reductora de metal. No obstante, microorganismos que producen dos o más enzimas reductoras de metal también están comprendidos dentro de la invención.

Ejemplos de microorganismos que están comprendidos por la invención, incluyen pero no se limitan a *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Aspergillus terreus, Lactobacillus sp., Fusarium oxysporum, Escherichia coli, Streptococcus thermophilus, Aspergilus niger, Aspergilus flavus, Aspergilus fumigatus, Penicilium sp., Pseudomonas aeruginosa* y *Trichoderma viride.*

Para efectos de la presente invención, como se definió para la composición antimicrobiana, *"enzima reductora de metal"* es una enzima extracelular capaz de catalizar la síntesis de nanopartículas de plata, zinc, cobre, oro, titanio, circonio o silicio a partir de precursores de dichos elementos. Las enzimas reductoras de metales comprendidas en la invención abarcan, pero no se limitan a nitrogenasa reductasa, α-NADH, nitrato reductasa, y sulfato reductasas. La Tabla 1, ilustra algunas enzimas de interés en la invención, así como algunos de los precursores (sustratos) sobre los que actúan y algunos microorganismos que las producen.

Tabla 1. Enzimas reductoras de metales producidas por microorganismos

Enzima	**Sustratos**	**Microorganismo**
α-NADH	SiO_2 $AgNO_3$	*Fusarium oxysporum*
Nitrato reductasa	$AgNO_3$	*Fusarium oxysporum*
L-alanina	$Zn(NO_3)_2$ $ZnC_4H_6O_4$	*Aspergillus fumigatus;* *Aspergillus terreus;* *Pseudomonas aeruginosa;* *Lactobacillus sp.*
Reductasa dependiente de NADH	$AgNO_3$	*Aspergillus fumigatus*

(ii) <u>*remover la biomasa del microorganismo del cultivo de la etapa (i) para obtener la fracción acelular del cultivo*</u>

Una vez el cultivo de cada microorganismo alcanza un pico de absorbancia alrededor de 430 nm, se detienen las condiciones de cultivo y se procede a remover la biomasa del microorganismo. Para efectos de la presente invención *"biomasa del microorganismo"* debe interpretarse como la materia originada del crecimiento del microorganismo, es decir las células bacterianas o fúngicas contenidas en el cultivo, según sea el caso.

Las técnicas para remover la biomasa de un microorganismo de un cultivo son conocidas en el campo técnico. Algunas técnicas incorporadas a la invención incluyen pero no se limitan a filtración y centrifugación. Cualquiera de las anteriores técnicas puede ser usada sola o en combinación con otras para remover la biomasa del microorganismo, con la condición de que la técnica o combinación de técnicas empleadas, remueva la biomasa del microorganismo y no remueva otros componentes del cultivo. Particularmente no deben ser removidas del cultivo proteínas extracelulares, especialmente las enzimas reductoras de metales.

Para garantizar que solo se remueva la biomasa del microorganismo, cuando se emplean técnicas de filtración, el tamaño de poro de la membrana o filtro utilizado es entre 30 µm y 0,2 µm. Preferiblemente el tamaño de poro es de 0,2 µm. Por otra parte, si se remueve la biomasa del microorganismo mediante centrifugación, el proceso debe realizarse entre 4000 a 6000 RMP durante 10 a 30 minutos, preferiblemente durante 20 minutos. En ambos casos, al remover la biomasa del microorganismo, se obtendrá una fracción líquida que, para efectos del desarrollo se denomina *"fracción acelular del cultivo"*. Esta fracción debe ser reservada para su procesamiento en la siguiente etapa.

En algunas modalidades, la fracción acelular del cultivo proviene del cultivo de un solo microorganismo. En estos casos, la fracción acelular del cultivo contendrá las enzimas reductoras de metales producidas por dicho microorganismo.

En otras modalidades, la fracción acelular del cultivo comprende las fracciones acelulares de varios cultivos de microorganismos diferentes. En estas modalidades, cada microorganismo es cultivado independientemente, se remueve de cada cultivo la biomasa de cada

microorganismo, según corresponda, y posteriormente se mezclan las fracciones acelulares individuales para dar origen a la fracción acelular final, que se reserva para la siguiente etapa del proceso.

Las fracciones acelulares de cultivos obtenidas por la mezcla de varias fracciones acelulares de cultivos de diferentes microorganismos, tendrán una mezcla de las enzimas producidas por cada uno de los microorganismos cultivados.

Para efectos de la presente invención, las fracciones acelulares que comprenden mezclas de varias fracciones acelulares, pueden corresponder a mezclas de entre 2 y 5 fracciones acelulares de cultivos diferentes.

Opcionalmente la fracción acelular se diluye con un diluyente o una mezcla de diluyentes seleccionados entre agua, solución tampón pH 5,5 o mezclas de los mismos. En estas modalidades, la proporción de fracción acelular del cultivo líquido a diluyente es de 1:10 a 1:40, preferiblemente de 1:20.

(iii) *añadir a la fracción acelular del cultivo de la etapa (ii), uno o más precursores metálicos y permitir la formación de una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa*

En la presente invención, *"precursor metálico"* hace referencia una sustancia, compuesto, sal de un compuesto o cualquier otro elemento o materia que sirva de sustrato a las enzimas reductoras de metales para la síntesis de nanopartículas inorgánicas.

Particularmente, los precursores metálicos de la invención incluyen, pero no se limitan a nitrato de plata ($AgNO_3$), acetato de zinc ($ZnC_4H_6O_4$), nitrato de zinc ($Zn(NO_3)_2$), cloruro de zinc ($ZrCl_5$), dióxido de titanio (TiO_2) y dióxido de silicio (SiO_2).. Para efectos del desarrollo, estos precursores metálicos pueden ser incorporados como reactivos puros o

pueden estar contenidos en materias primas, como es el caso de la ceniza de cascarilla de arroz que actúa como materia prima que contiene al precursor dióxido de silicio (SiO_2).

Para efectos de la presente invención, los precursores metálicos se agregan a la fracción acelular del cultivo en una concentración final entre 0,5mM y 0,3M, preferiblemente entre 0,5mM y 0,1M.

En una modalidad, se agrega un solo tipo de precursor metálico a la fracción acelular del cultivo. En estas modalidades, solo se producirán suspensiones de nanopartículas de un elemento.

En otra modalidad, se agregan dos, tres, cuatro o cinco precursores metálicos diferentes a la fracción acelular del cultivo, en donde cada precursor añadido será sustrato para la formación de un tipo de nanopartículas diferentes, por lo tanto, el número y tipo de precursores añadidos a la fracción acelular, depende del tipo de enzimas que se encuentren en la misma. En estas modalidades cada precursor es añadido a una concentración final entre 0,5mM y 0,3M, preferiblemente entre 0,5mM y 0,1M. Asimismo, en las modalidades donde se agrega más de un precursor a una misma fracción acelular del cultivo, se producirán suspensiones de nanopartículas de más de un elemento.

Una vez se agrega el precursor o los precursores metálicos, se mantiene la reacción en condiciones adecuadas para que se forme una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa. Estas condiciones en modalidades preferidas son incubación entre 25ºC y 40ºC, en agitación a 100 a 300 RPM, durante 1h a 60h, preferiblemente durante 12h a 48h. En algunas modalidades particulares, esta etapa debe llevarse a cabo en oscuridad debido a la fotosensibilidad de algunos tipos de nanopartículas.

Opcionalmente, la formación de nanopartículas se detecta mediante espectroscopía a longitudes de onda en el espectro UV-visible, microscopía electrónica de barrido (SEM), dispersión de luz dinámica (DLS) y espectroscopía de infrarrojo con transformada de Furier

(FTIR). En esta etapa la concentración de las nanopartículas obtenidas debe ser entre 10% y 20% (% v/v) de la suspensión.

(iv) *<u>añadir a la suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa de la etapa (iii) surfactantes y estabilizantes</u>*

La etapa final para la preparación de la composición antimicrobiana del desarrollo es la adición de uno o más surfactantes y de uno o más estabilizantes a la suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa obtenida en la etapa anterior.

Para efectos de la presente invención, los surfactantes se añaden a la suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa a una concentración entre 0,5% y 10% (% p/v), preferiblemente entre 0,5% y 5% (% p/v), más preferiblemente 2% y 5% (% p/v). La invención incluye la adición de uno o más surfactantes seleccionados entre, pero sin limitarse a polisorbato 20, polisorbato 80, carboximetilcelulosa (CMC), lauril sulfato de sodio (SLS), dodecil sulfato de sodio (SDS), dimetilsulfóxido (DMSO), Tritón x-100, alcohol polivinílico, decanotiol, tripolifosfato de sodio (STP) o mezclas de los mismos.

Para efectos de la presente invención, los estabilizantes se incorporan a la suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa a una concentración entre 0,1% y 15% (% p/v), preferiblemente entre 0,1% y 10 (% p/v), más preferiblemente entre 0,1% y 5% (% p/v), y se seleccionan entre albúmina, citrato de sodio, cloruro de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido láctico, tampón fosfato, polivinilpirrolidona (PVP30), o mezclas de los mismos.

La composición obtenida mediante el método de la invención se caracteriza por que tiene un pH entre 4,5 y 6,5, preferiblemente entre 4,5 y 6,0 y una concentración de nanopartículas inorgánicas de 10% a 20% (%v/v).

Opcionalmente, la composición antimicrobiana de la invención se puede almacenar en oscuridad a una temperatura entre 2ºC y 10ºC.

Opcionalmente, la composición se dispersa antes de ser utilizada, mediante técnicas conocidas en el campo, como ultrasonido.

Usos

La composición antimicrobiana de la presente invención es útil como antimicrobiano de amplio espectro. Particularmente, la composición antimicrobiana es efectivo contra hongos filamentosos, levaduras, bacterias Gram positivas y bacterias Gram negativas.

Por lo anterior, la composición antimicrobiana de la invención es útil como producto agente antimicrobiano. Asimismo la composición de la invención es útil como agente para el control de microorganismos fitopatógenos causantes de enfermedad en diferentes cultivos agrícolas, particularmente, pero sin limitarse a enfermedades causadas por especies de *Colletotrichum sp., Fusarium sp., Alternaria sp, Botrytis cinerea, Penicillium sp., y Candida sp.* .

La presente invención será presentada en detalle a través de los siguientes ejemplos, los cuales son suministrados solamente con propósitos ilustrativos y no con el objetivo de limitar su alcance.

EJEMPLOS

Ejemplo 1. Preparación de composiciones antimicrobianas

Se prepararon medios de cultivo que contenían los componentes descritos en la Tabla 2. Cada medio de cultivo se esterilizó en autoclave a 120ºC y 1 atm de presión durante 30 minutos y se distribuyó en alícuotas de 200 mL.

Tabla 2. Composición de los medios de cultivo

Componente	Cantidad (g)	Volumen	pH

MEDIO DE CULTIVO A			
Extracto de papa	23	1000 mL	5,0
Glucosa	20		
Extracto de malta	20		
Extracto de levadura	5		
Ácido cítrico 1,0M	0,5 ml		
MEDIO DE CULTIVO B			
Extracto de papa	30	1000 mL	5,5
Lactosa	50		
Sacarosa	20		
Caseína hidrolizada	140		
ácido clorhídrico 0,1M	0,1 ml		
MEDIO DE CULTIVO C			
Dextrosa	20	1000 ml	5,0
Peptona	10		
Ácido láctico 1,0 M	0,1 ml		

A continuación, se inocularon los medios de cultivo y se cultivaron los microorganismos durante 120 h a 25ºC en agitación continua a 240 RPM. Posteriormente se removió la biomasa de los microorganismos de cada medio. Se obtuvieron así, diferentes fracciones acelulares, en donde algunas fracciones se componían de la fracción acelular de un solo cultivo, y otras de la mezcla de varias fracciones acelulares de cultivos diferentes. Las características de cada cultivo, el método de remoción utilizado y la composición de cada fracción acelular se describen en la Tabla 3.

Tabla 3. Cultivo y obtención de fracciones acelulares de los cultivos

Microorganismo inoculado	Cantidad de microorganismo inoculado	Medio de cultivo	Método de remoción de biomasa	Fracción acelular

Fusarium oxysporum	5%	Medio A	Filtración	Fracción acelular 1
Trichoderma viride	5%	Medio A	Filtración	Fracción acelular 2
Bacillus subtilis	5%	Medio C	Centrifugación	Fracción acelular 3
Aspergillus fumigatus	5%	Medio A	Filtración	
Lactobacillus spp.	5%	Medio C	Centrifugación	
Fusarium oxysporum	5%	Medio A	Filtración	Fracción acelular 4

Una vez obtenidas las fracciones acelulares se agregaron los precursores químicos y se permitió la formación de nanopartículas. Las fracciones acelulares con los precursores se mantuvieron en agitación a 180 RPM, a temperatura de 25ºC y en oscuridad durante 48h. Posteriormente, se midió la absorbancia de las suspensiones de nanopartículas obtenidas a longitudes de onda entre 400 y 590nm. Los precursores agregados en cada fracción acelular se describen en la Tabla 4.

Tabla 4. Proceso de obtención de suspensiones de nanopartículas inorgánicas

Material de las nanopartículas	**Fracción acelular**	**Precursor**	**Concentración del precursor**
Nanopartículas de plata	Fracción acelular 1	$AgNO_3$	1mM
Nanopartículas de Zinc	Fracción acelular 2	$Zn(NO_3)_2$	2Mm
Nanopartículas de zinc, titanio y plata	Fracción acelular 3	$Zn(NO_3)_2$	2mM
		TiO_2	0,2M
		$AgNO_3$	2mM

Nanopartículas de silicio	Fracción acelular 4	Cáscara de arroz (precursor de óxido de silicio)	0,3 M

Finalmente a las suspensiones de nanopartículas obtenidas se les añadieron surfactantes y estabilizantes para producir las composiciones antimicrobianas finales ilustradas en la Tabla 5, las cuales fueron caracterizadas y evaluadas para determinar su efecto antimicrobiano como se describe en los Ejemplos 2 y 3.

Tabla 5. Composición de las composiciones antimicrobianas

Composición antimicrobiana	**Suspensión de nanopartículas**	**Surfactantes y/o estabilizantes**	**Concentración de surfactantes y/o estabilizantes**	**pH de la composición**
Composición A	Nanopartículas de plata	Lauril sulfato de sodio	2%	5,0
Composición B	Nanopartículas de zinc	PVP	1%	5,5
Composición C	Nanopartículas de titanio, zinc y plata	Ácido láctico	2%	5,0
		SDS	0,5%	
		CMC	0,5%	
Composición D	Nanopartículas de silicio	Lauril sulfato de sodio	2%	5,0

Ejemplo 2. Caracterización de las composiciones antimicrobianas

Las composiciones antimicrobianas producidas fueron evaluadas para determinar el tamaño, composición y potencial Z de las nanopartículas, así como la estabilidad de las composiciones como se describe a continuación.

Los tamaños de partícula y la distribución de partícula en las composiciones se evaluaron mediante microscopia electrónica de barrido (SEM-EDX), microscopia de transmisión (TEM) y finalmente usando un equipo zetasizer mediante tecnología de dispersión de luz dinámica DLS. Para el análisis en microscopio electrónico de barrido, una muestra de nanopartículas se colocó en una estufa por 24h a 50ºC y luego se depositó sobre una cinta de carbono en un porta muestras para su análisis mediante SEM. Para el caso de nanopartículas de silicio, fue necesario recubrir la muestra con una fina capa de oro previamente ala la determinación semicuantitativa de las composiciones elementales (EDX) (FIG. 3B).

Para el análisis em TEM, fue necesario diluir las muestras de nanopartículas al 0,1% en etanol y luego fueron analizadas en el microscopio. Los resultados se ilustran en las FIG. 3A y 4. Para la técnica mediante tecnología de dispersión de luz dinámica DLS, las muestras fueron diluidas al 0,1% y analizadas en solución acuosa.

La estabilidad de las nanopartículas de los diferentes sistemas fue evaluada a través de la medida del potencial zeta usando un Zetasizer Nano (Malvern) en el pH de la composición. Los resultados se ilustran en la Tabla 6.

Tabla 6. Caracterización de tamaño y distribución de partícula en las composiciones

Composición antimicrobiana	**Distribución de partícula**	**Tamaño promedio de las nanopartículas**	**Composición de las nanopartículas**	**Potencial Z (mV)**
Composición A	bimodal	40nm y 100nm	plata (20%)	-66
Composición B	bimodal	20 y 40 nm	zinc (15%)	-70
Composición C	bimodal	20 y 100 nm	zinc, TiO_2, plata (20%) en relación 0,5:1:1	-68
Composición C	monomodal	30nm	SiO_2 (20%)	-100

Finalmente las nanopartículas se almacenaron durante 60 días a 28ºC en oscuridad. Posteriormente, las composiciones antimicrobianas se sometieron a dispersión mediante ultrasonido por 5 minutos y posteriormente se midió el potencial zeta y el espectro de absorción variando la longitud de onda entre 400 y 590nm.

Ejemplo 3. Evaluación de la actividad antimicrobiana de las composiciones

Se evaluó el efecto antimicrobiano de las composiciones de la invención frente a *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)*, e Fusarium oxyspoporum* (ATCC 7620) y *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 2345). Las cepas se adquirieron en la Fundación de cultivos tropicales Andre Tosello. Se realizaron cultivos axénicos de cada uno de estos microorganismos en agar PDA para *Fusarium oxysporum* y *Saccharomyces cerevisiae*, y en agar nutritivo para *Bacillus subtilis*, y se evaluó el efecto en la inhibición del crecimiento de 1 y 2 mL de nanopartículas sintetizadas por vía química, suspensiones de nanopartículas desarrolladas por síntesis biológica sin surfactantes y composiciones de nanopartículas de la invención, como se ilustra en la FIG. 5.

Se encontró que una dosis de 2mL de la composición de nanopartículas de plata en solución acuosa con surfactante al 2% (COMPOSICIÓN A), generó fuerte inhibición en el crecimiento de *Fusarium oxysporum* y *Bacillus subtilis*.

Se debe entender que la presente invención no está limitada a las modalidades descritas e ilustradas, pues como será evidente para una persona versada en el arte, existen variaciones y modificaciones posibles que no se apartan del espíritu de la invención, definido por las siguientes reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición antimicrobiana que comprende:

una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa, en donde la solución acuosa comprende la fracción acelular del cultivo líquido de al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metales;

un surfactante a una concentración entre 0,5% y 10% p/v; y

un estabilizante a una concentración entre 0,1% a 15% p/v.

2. La composición de la Reivindicación 1, en donde las nanopartículas son de plata, zinc, cobre, oro, titanio, circonio, silicio o mezclas de las mismas.

3. La composición de las Reivindicaciones 1 o 2, en donde las nanopartículas tienen un tamaño de partícula entre 5nm y 100nm.

4. La composición de la Reivindicación 1, en donde el surfactante se selecciona de polisorbato 20, polisorbato 80, carboximetilcelulosa (CMC), lauril sulfato de sodio (SLS), dodecil sulfato de sodio (SDS), dimetilsulfóxido (DMSO), Tritón x-100, alcohol polivinílico, decanotiol, tripolifosfato de sodio (STP) o mezclas de los mismos.

5. La composición de la Reivindicación 1, en donde los estabilizantes se seleccionan de albúmina, citrato de sodio, cloruro de sodio, ácido clorhídrico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido fumárico, tampón fosfato, polivinilpirrolidona (PVP), o mezclas de los mismos.

6. Un método para obtener una composición antimicrobiana de nanopartículas inorgánicas que comprende:

(i) cultivar al menos un microorganismo productor de enzimas reductoras de metal en un medio de cultivo inductivo líquido;

(ii) remover la biomasa del microorganismo del cultivo de la etapa (i) para obtener la fracción acelular del cultivo;

(iii) añadir a la fracción acelular del cultivo de la etapa (ii), uno o más precursores metálicos y permitir la formación de una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa;

(iv) añadir a la suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa de la etapa (iii) surfactantes y estabilizantes.

7. El método de la Reivindicación 6, en donde el microorganismo productor de enzimas reductoras de metales se selecciona de *Bacillus subtilis, Bacillus cereus, Aspergillus terreus, Lactobacillus sp., Fusarium oxysporum, Escherichia coli, Streptococcus thermophilus, Aspergilus niger, Aspergilus flavus, Aspergilus fumigatus, Penicilium sp., Pseudomonas aeruginosa* y *Trichoderma viride.*

8. El método de la Reivindicación 6, en donde el medio de cultivo inductivo líquido comprende una fuente de carbohidratos a una concentración entre 2% y 15% y una fuente de proteína a una concentración entre 5% y 20%.

9. El método de la Reivindicación 6, en donde el precursor metálico se selecciona entre nitrato de plata ($AgNO_3$), acetato de zinc ($ZnC_4H_6O_4$), nitrato de zinc ($Zn(NO_3)_2$), cloruro de zinc ($ZrCl_5$), dióxido de titanio (TiO_2), dióxido de silicio (SiO_2), o mezclas de los mismos.

10. El método de las Reivindicaciones 6 y 10, en donde el precursor metálico se agrega a una concentración entre 0,5mM y 0,3M.

RESUMEN

La presente invención se refiere a una composición antimicrobiana que comprende una suspensión de nanopartículas inorgánicas en solución acuosa, en donde la solución acuosa comprende la fracción acelular del cultivo líquido de al menos un microorganismo productor de una enzima reductora de metales, surfactantes y estabilizantes, y a su método de producción. La composición antimicrobiana de la invención representa una alternativa ecológica a las composiciones antimicrobianas tradicionales. Además, gracias a su amplio espectro de acción y versatilidad, resulta de especial interés para la eliminación de un amplio espectro de agentes causantes de enfermedad en múltiples industrias, incluyendo la industria agrícola, la industria textil y la industria farmacéutica.

FIGURAS

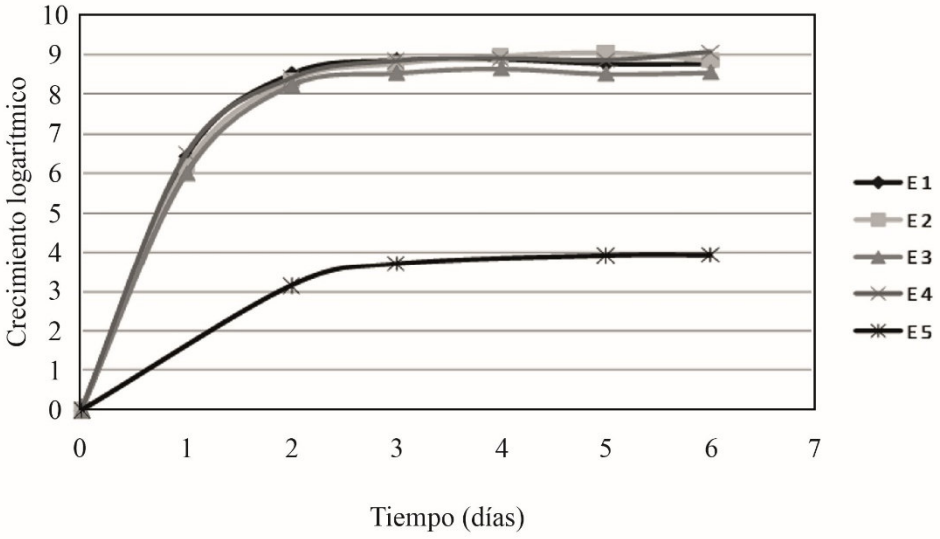
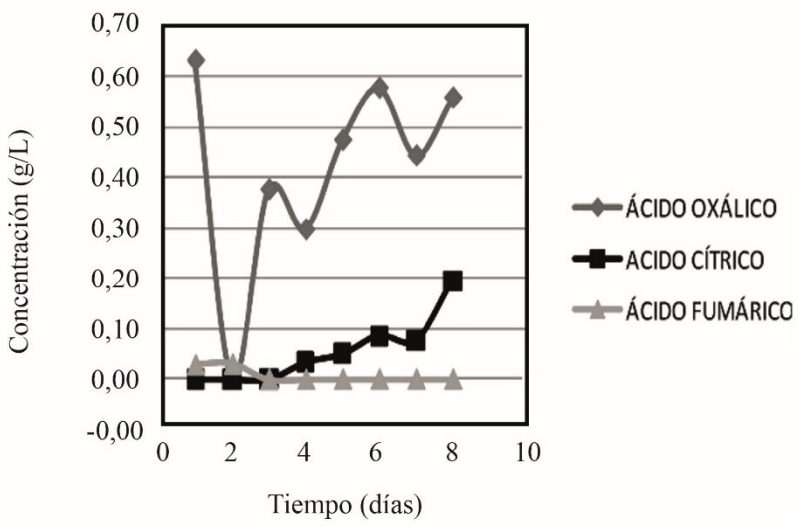


FIG. 1

A


0,70
0,60
0,50
0,40
0,30
0,20
0,10
0,00
-0,00
Concentración (g/L)
0
2
4
6
8
10
Tiempo (días)
ÁCIDO OXÁLICO
ACIDO CÍTRICO
ÁCIDO FUMÁRICO

B

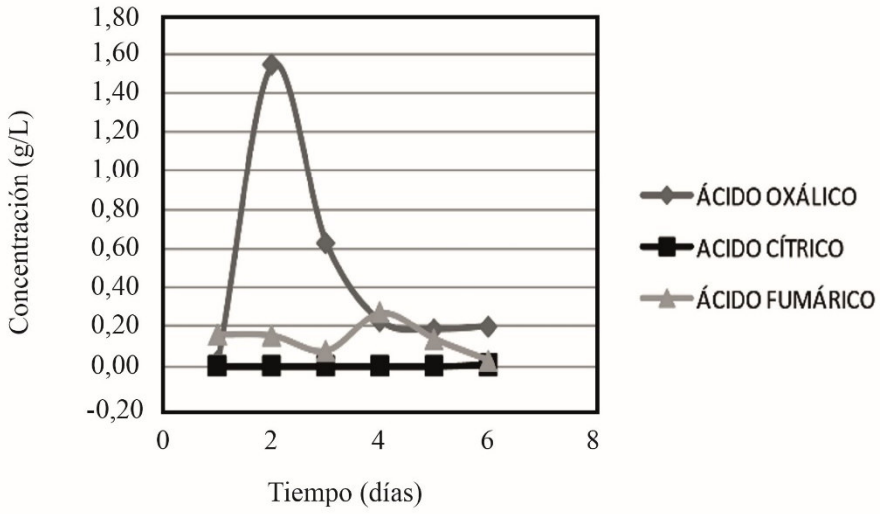
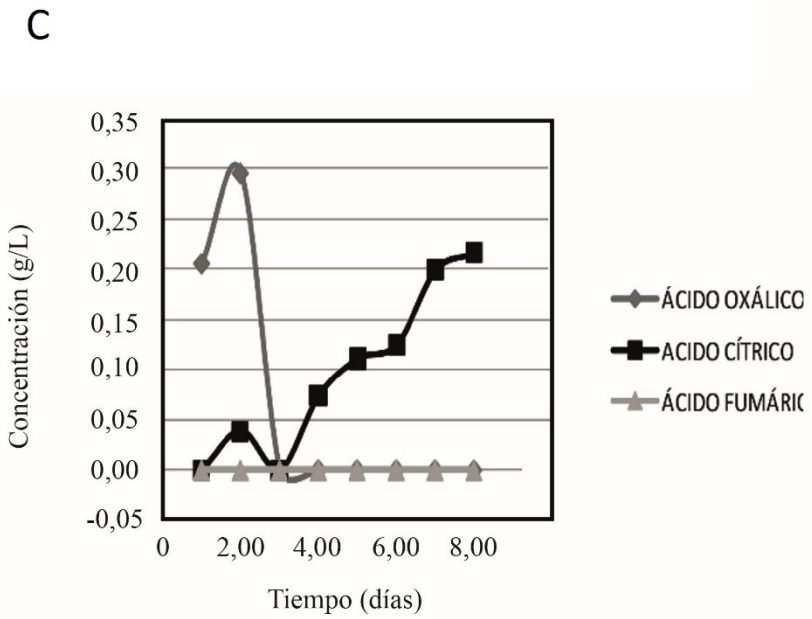

1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
-0,20
Concentración (g/L)
0
2
4
6
8
Tiempo (días)
ÁCIDO OXÁLICO
ACIDO CÍTRICO
ÁCIDO FUMÁRICO

FIG. 2


C
0,35
0,30
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
-0,05
Concentración (g/L)
0
2,00
4,00
6,00
8,00
Tiempo (días)
ÁCIDO OXÁLICO
ACIDO CÍTRICO
ÁCIDO FUMÁRIC

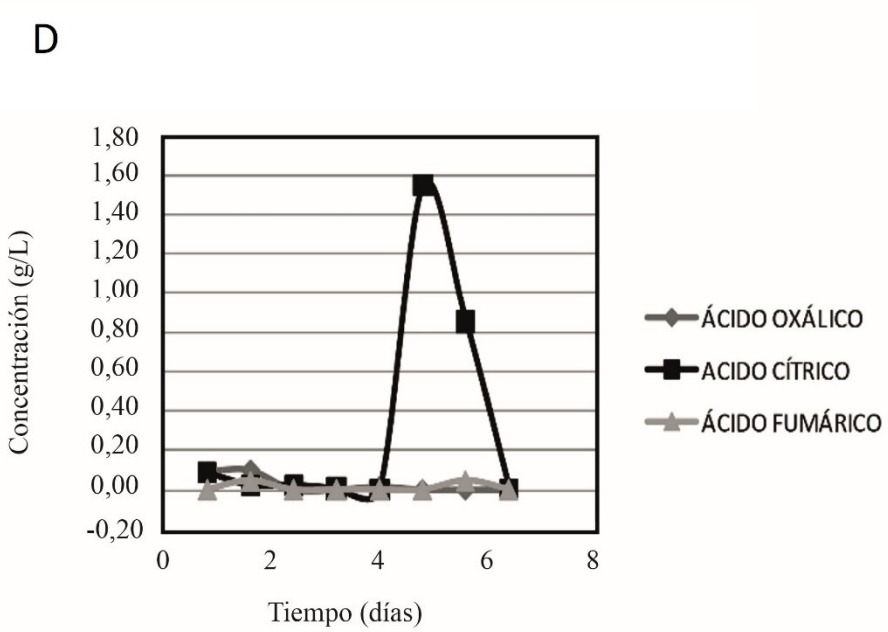

D
1,80
1,60
1,40
1,20
1,00
0,80
0,60
0,40
0,20
0,00
-0,20
Concentración (g/L)
0
2
4
6
8
Tiempo (días)
ÁCIDO OXÁLICO
ACIDO CÍTRICO
ÁCIDO FUMÁRICO

FIG. 2

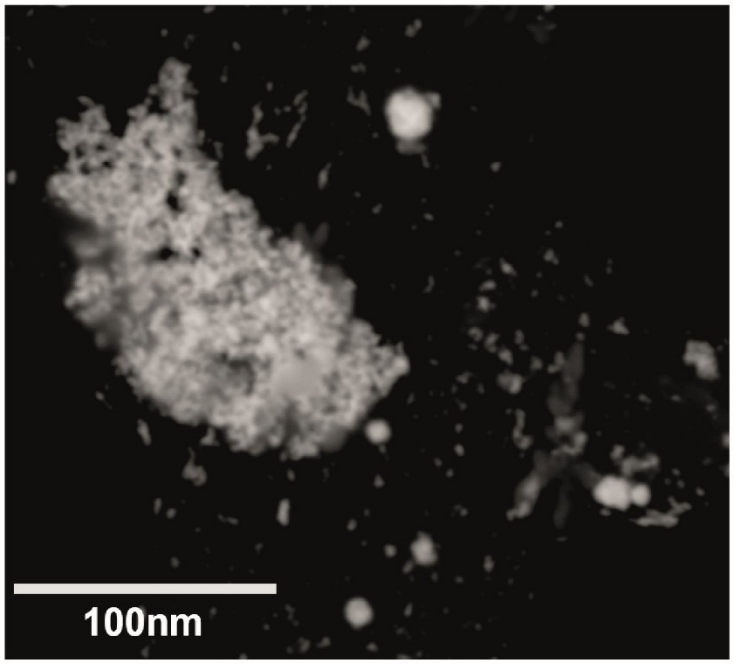


FIG. 3A

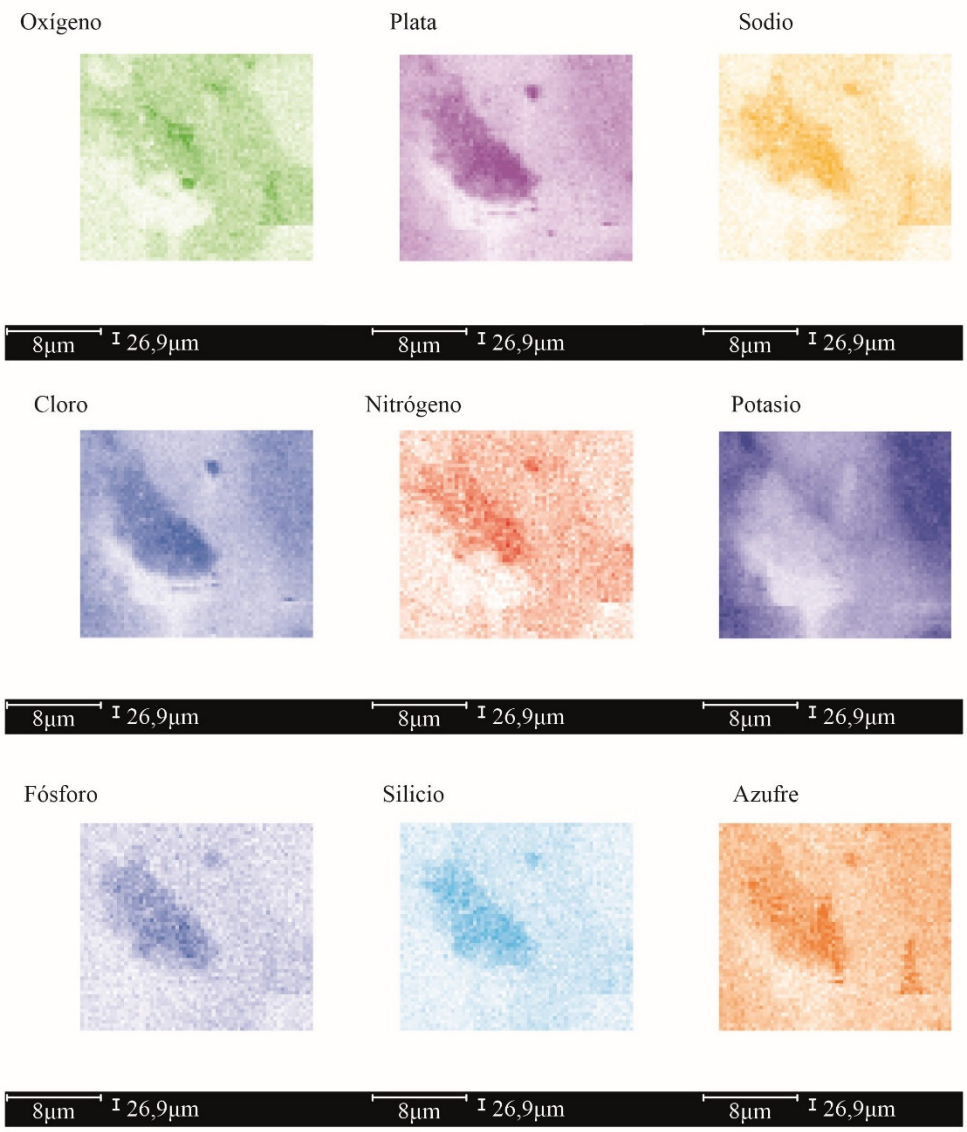

Oxígeno
Plata
Sodio
8µm
26,9µm
8µm
26,9µm
8µm
26,9µm
Cloro
Nitrógeno
Potasio
8µm
26,9µm
8µm
26,9µm
8µm
26,9µm
Fósforo
Silicio
Azufre
8µm
26,9µm
8µm
26,9µm
8µm
26,9µm

FIG. 3B

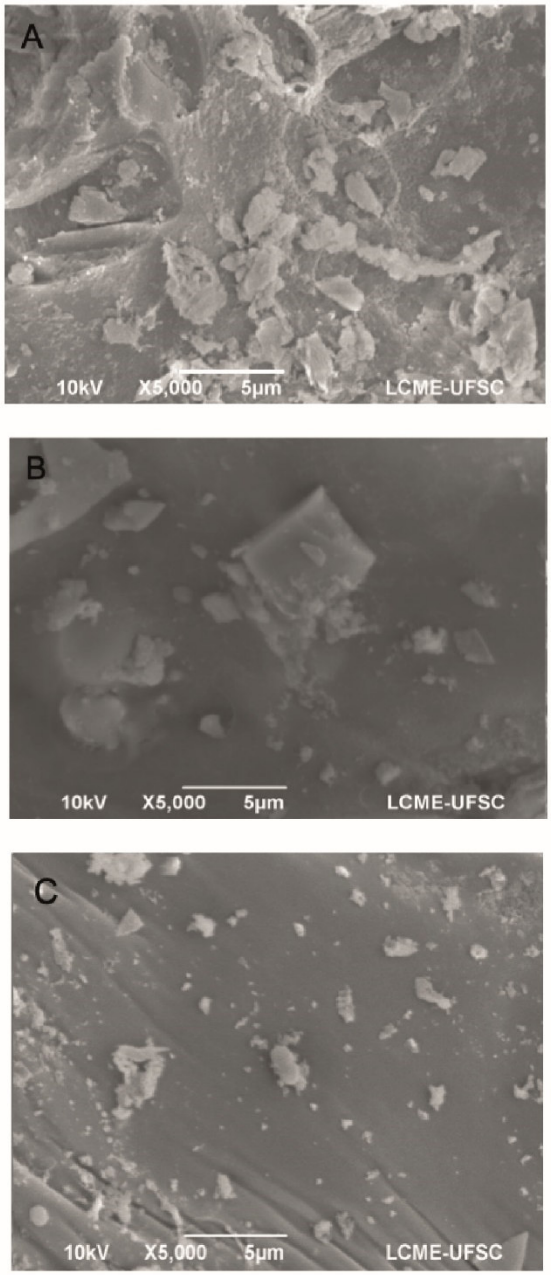

A
10kV X5,000 5μm LCME-UFSC
B
10kV X5,000 5μm LCME-UFSC
C
10kV X5,000 5μm LCME-UFSC

FIG. 4

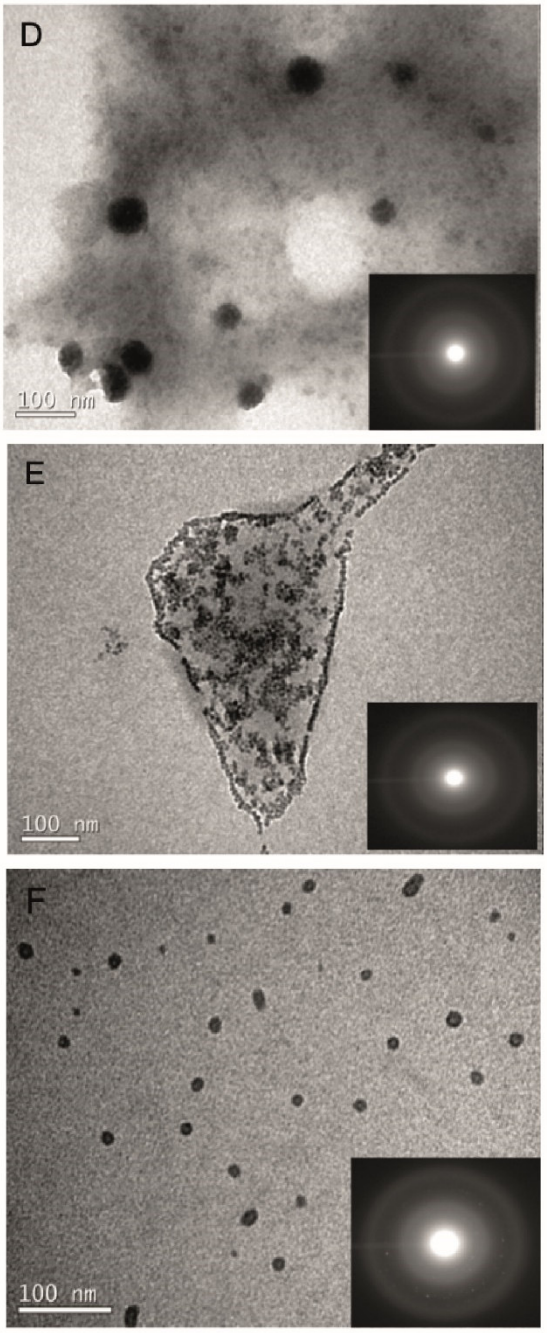


FIG. 4

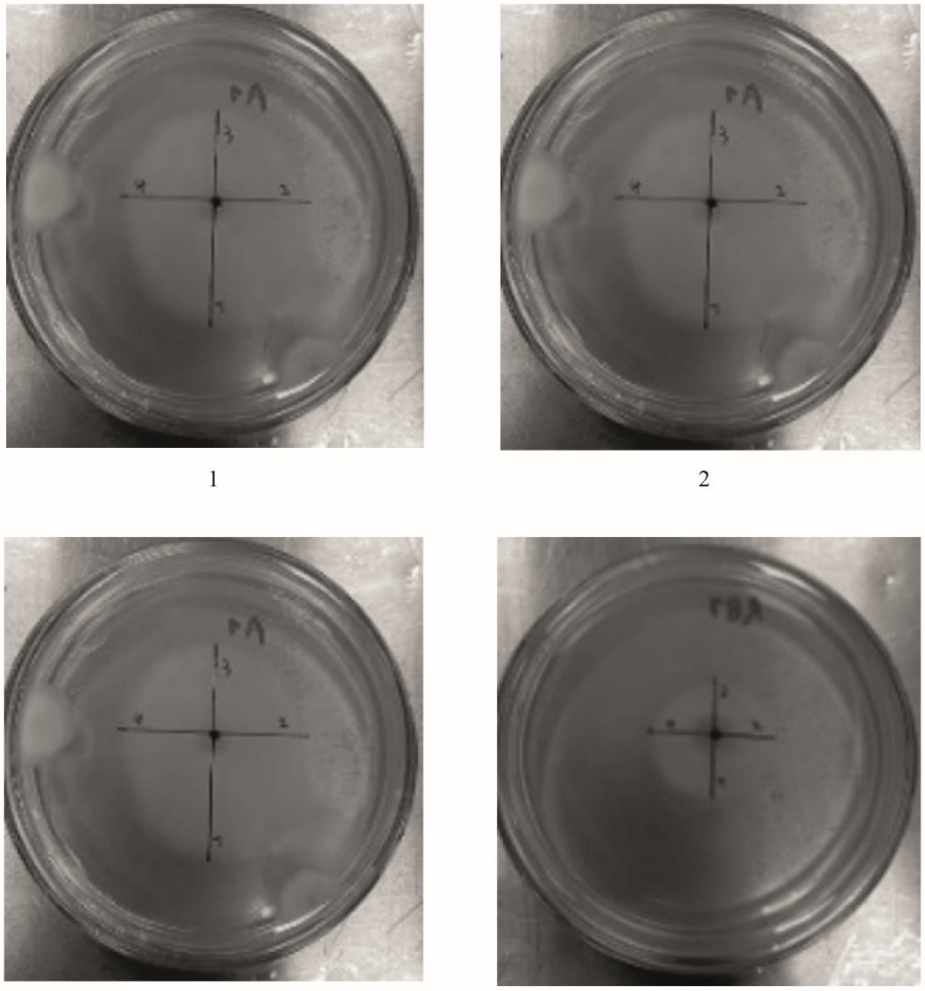
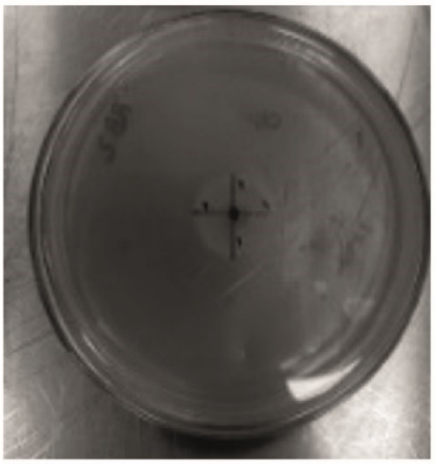
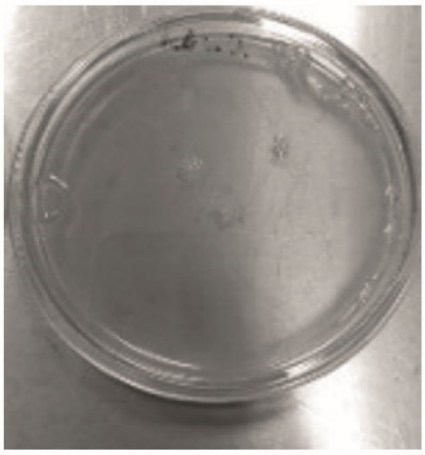


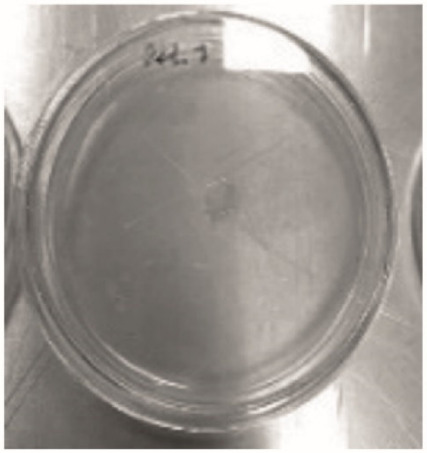
FIG. 5A



5



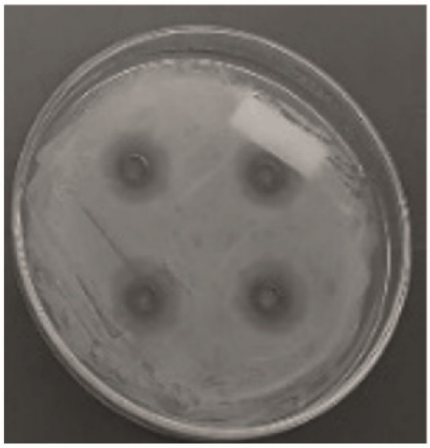
6



7

FIG. 5A

8



9

FIG. 5B

10

11

12

FIG. 5C