

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 683 345**

51 Int. Cl.:

**A01N 25/08** (2006.01)  
**A01N 25/12** (2006.01)  
**A01N 59/00** (2006.01)  
**A01N 31/00** (2006.01)  
**A01N 25/04** (2006.01)  
**A01N 25/34** (2006.01)  
**A01N 59/20** (2006.01)  
**B82Y 5/00** (2011.01)  
**A01N 25/28** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.03.2011** **PCT/US2011/030305**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **13.10.2011** **WO11126832**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.03.2011** **E 11766455 (7)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.05.2018** **EP 2552196**

54 Título: **Composiciones y geles a base de sílice multifuncional, métodos de hacer las mismas, y métodos de uso de las mismas**

30 Prioridad:

**30.03.2010 US 319037 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.09.2018**

73 Titular/es:

**UNIVERSITY OF CENTRAL FLORIDA RESEARCH  
FOUNDATION, INC. (100.0%)  
12201 Research Parkway, Suite 501  
Orlando, FL 32826, US**

72 Inventor/es:

**SANTRA, SWADESHMUKUL**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 683 345 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Composiciones y geles a base de sílice multifuncional, métodos de hacer las mismas, y métodos de uso de las mismas

## Antecedentes

- 5 La industria de los cítricos a nivel mundial está luchando actualmente contra dos enfermedades potencialmente devastadoras: el enverdecimiento de los cítricos, también conocido como Huanglongbing o HLB (por sus siglas en inglés), y el chancro de los cítricos.
- 10 El enverdecimiento de los cítricos es la enfermedad más destructiva y altamente infecciosa de la mayoría de las variedades de cítricos comerciales. Esta enfermedad está causada por la bacteria Gram-negativa HLB que pertenece al género *Candidatus Liberibacter* según se reporta por J. M. Bove en "Huanglongbing: A destructive, newly-emerging, century-old disease of citrus", Journal of Plant Pathology 2006, 88, (1), 7-37. El HLB amenaza a la industria de los cítricos a nivel mundial y puede causar daños a la industria de los cítricos, y en la economía en el Estado de Florida. El problema puede ser severo y extermina árboles de cítricos. La enfermedad causa que los frutos sean amargos y deformes, de pequeño tamaño y con poco color, haciendo que no sean utilizables ni comercializables. Actualmente, no hay cura para el HLB.
- 15 El Psílido Asiático de los Cítricos (ACP, por sus siglas en inglés) es un insecto invasivo que se alimenta del floema que causa un daño grave a las plantas de cítricos y a las plantas de cítricos relacionadas. Las puntas quemadas y las hojas torcidas son el resultado de una plaga del ACP (por sus siglas en inglés) en los nuevos crecimientos. Además, el ACP (por sus siglas en inglés) es un vector del HLB (por sus siglas en inglés), y porta el HLB (por sus siglas en inglés) y puede extender rápidamente la enfermedad de un huerto a otro.
- 20 Las estrategias integradas para la gestión de plagas que incluyen el uso de árboles de viveros libres de la enfermedad, la rápida eliminación de los árboles con síntomas, y el control agresivo de los ACPs (por sus siglas en inglés) usando insecticidas foliares han sido el enfoque principal para gestionar los huertos infectados con el HLB (por sus siglas en inglés) según A. Morris et al. en "Economic tradeoffs of citrus greening management" Citrus Industry 2008, 89 (4), 26-28 y P. L. Hollis en "Scientists combining efforts to combat greening in Florida's citrus industry " Southeast Health Press 2008, 35 (15), 35.
- 25 Desafortunadamente, el uso de insecticidas foliares parece ser la única solución disponible para los cultivadores en estos días para evitar la Infección por el HLB, incluso aunque tales prácticas integradas sean caras y de gran cantidad de mano de obra.
- 30 El chancro de los cítricos es otra enfermedad seria, causada por la bacteria *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*, que afecta a la mayoría de las variedades de cítricos comerciales y que ha provocado pérdidas económicas a nivel mundial según T. R. Gottwald en "The citrus canker epidemic in Florida: The scientific basis of regulatory eradication policy for an invasive species," Phytopathology 2001, 91, (1), 30-34. El chancro causa lesiones necróticas sobre diversas partes de los árboles que incluyen frutos, hojas y tallos. La severidad de la enfermedad o infección se manifiesta como desfoliación, caída prematura de los frutos, frutos con defectos, y deterioro general del árbol como se indica por J. H. Graham en "*Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*: factors affecting successful eradication of citrus canker", Molecular Plant Pathology 2004, 5, (1), 1-15, y por A. K. Das en "Citrus Canker-A Review", J. Appl. Hort. 2003, 5 (1), 52-60.
- 35 Mientras que no existía una cura para la enfermedad del HLB, las pérdidas por el chancro se han controlado mediante el uso de agentes antibacterianos apropiados tales como compuestos a base de cobre (Cu), que incluyen, pero no se limitan a, oxicloruro de Cu, sulfato de Cu, hidróxido de Cu, óxido de Cu, carbonato de amonio-Cu, antibióticos, tales como estreptomycin, tetraciclina, y compuestos de resistencia sistémica inducida, que incluyen acibenzolar-S-metilo, proteína harpin. Hasta fecha, el cobre (Cu) ha sido el patrón de oro para controlar la enfermedad del chancro de los cítricos en todo el mundo debido a su efectividad en la protección contra la posibilidad de infección y al desarrollo mínimo de resistencia al Cu por un patógeno.
- 40 Debido a la naturaleza destructiva de las enfermedades por el HLB y el chancro de los cítricos, existe la necesidad de encontrar soluciones para combatir las enfermedades por el HLB y el chancro los de cítricos.
- 45 Y. H. Kim, et al., "Preparation and characterization of the antibacterial Cu nanoparticle formed on the surface of SiO<sub>2</sub> nanoparticles", J. Phys. Chem. B., Volumen 110, 2006, páginas 24923-24928, XP055096566, describe la formación de nanopartículas de dióxido de silicio con cobre metal que se deposita únicamente sobre la superficie de las nanopartículas. No se describen formas de cobre diferentes a las de cobre metal.
- 50 El documento de Patente de los EE.UU. de Número US 2010/0015236 A1 (Magdassi et al.) describe un polvo redispersable y las dispersiones acuosas de nanopartículas de pesticidas orgánicos insolubles en agua. Se describen los métodos para la preparación y el uso de los pesticidas.

## Resumen

Aspectos de la presente invención incluyen una composición como se reivindica en la reivindicación 1, un gel como se reivindica en la reivindicación 11, y los métodos como se reivindican en las reivindicaciones 14, 15, 16 y 20. Descritas brevemente, las realizaciones de esta descripción incluyen, entre otros, las composiciones, los geles, los métodos para sintetizar el gel de nanopartículas a base de sílice multifuncional, el método de tratamiento, prevención, o tanto de tratamiento como de prevención de una enfermedad en una especie vegetal, el método para tratar simultáneamente plantas de cítricos contra el chancro de los cítricos y prevenir la invasión de un vector de Psílido Asiático de los Cítricos (ACP, por sus siglas en inglés) que porta el patógeno y disemina la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos en las plantas de cítricos, y similares.

## 10 Breve descripción de las figuras

La Figura 1a es un gráfico de los datos de la cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) del DSDM (control).

La Figura 1b, es un gráfico de los datos de la cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) de un extracto de cloroformo del material de DSDM-CuSiNG.

15 La Figura 2 es un gráfico de los datos de la cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) de un extracto de cloroformo del material de DSDM-SiNG, sin iones de cobre.

La Figura 3a es un gráfico de los datos de la cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) de un extracto de cloroformo del polvo liofilizado de CuSiNG seco con DSDM añadido que presenta los picos característicos del DSDM.

20 La Figura 3b es un gráfico de los datos de la cromatografía de gases-espectroscopía de masas (GC-MS, por sus siglas en inglés) de un extracto de cloroformo del SiNG seco con DSDM añadido como un control que no muestra los picos del DSDM.

## Descripción detallada

25 Antes de que se describa la presente descripción con mayor detalle, se debe entender que esta descripción no se limita a las realizaciones particulares descritas y, por supuesto, estas pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en este documento es con el propósito de describir únicamente las realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente descripción estará limitado únicamente por las reivindicaciones anexas. Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, a la décima parte de unidad del límite inferior a menos que el contexto indique claramente lo contrario, entre el límite superior e inferior de ese intervalo y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese intervalo establecido, está comprendido dentro de la descripción. Los límites superior e inferior de estos intervalos más pequeños pueden estar incluidos independientemente en los intervalos más pequeños y también están comprendidos dentro de la descripción, sometidos a cualquier límite específicamente excluido en el intervalo establecido. Cuando el intervalo establecido incluye uno o ambos límites, los intervalos que excluyen cualquiera o ambos de estos límites incluidos también están incluidos en la descripción.

35 A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente invención tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la cual pertenece esta descripción. Aunque en la práctica o prueba de la presente descripción también se pueden usar cualquier método y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente invención a continuación, se describen los métodos y materiales preferidos.

La cita de cualquier publicación es por su descripción antes de la fecha de presentación y esto no se debe interpretar como una admisión de que la presente descripción no tiene derecho a la fecha de esta publicación en virtud de una descripción anterior. Además, las fechas de publicación proporcionadas podrían ser diferentes de las fechas de publicación reales, y por lo tanto pueden necesitar de ser confirmadas de una forma independiente.

45 Como será evidente para los expertos en la técnica al leer esta descripción, cada una de las realizaciones individuales descritas e ilustradas en la presente invención tiene componentes y características discretas que se podrán separar fácilmente o combinar con características de cualesquiera otras realizaciones sin apartarse del alcance o espíritu de la presente descripción. Cualquier método mencionado se puede llevar a cabo en el orden de los sucesos citados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible.

50 Las realizaciones de la presente descripción emplearán, a menos que se indique de otra manera, técnicas de química, botánica, biología, y similares, que están dentro de la experiencia de la técnica.

Los siguientes ejemplos se exponen para de ese modo proporcionar a los expertos en la técnica una descripción y exposición completas de cómo realizar los métodos y usar las pruebas descritas y reivindicadas en la presente invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números (por ejemplo, cantidades,

temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, la temperatura está dada en °C, y la presión está cerca o es la atmosférica. La temperatura y presión estándar se definen como 20°C y 1 atmósfera.

5 Antes de que se describan en detalle las realizaciones de la presente descripción, se debe entender que, a menos que se indique lo contrario, la presente descripción no se limita a materiales, reactivos y materiales de reacción, y procesos de fabricación particulares, o similares, ya que los mismos pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en la presente invención es con el propósito de describir únicamente las realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante. En la presente descripción también es posible que se puedan ejecutar etapas en secuencias diferentes en las que esto sea lógicamente posible.

10 Se debe señalar que, como se usa en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "uno", "una" y "el" incluyen referencias al plural a menos que el contexto dicte claramente otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" incluye una pluralidad de compuestos. En esta memoria descriptiva y en las reivindicaciones que siguen, se hará referencia a un número de términos que se definirán para que tengan los siguientes significados a menos que sea evidente una intención contraria.

15 Definiciones y abreviaturas:

Si se usa en la presente invención para dar a entender dióxido de silicio, que también se conoce comúnmente como "sílice".

NG, se establece para "Nanogel", que es la sustancia similar al gel formado por la interconexión de nanopartículas, por ejemplo, la interconexión de nanopartículas a base de sílice multifuncional.

20 NP se establece para "Nanopartícula", que puede tener un tamaño de partícula (por ejemplo, diámetro para nanopartículas esféricas o sustancialmente esféricas) de aproximadamente 10 a 500 nm, de aproximadamente 10 a 250 nm, de aproximadamente 10 a 100, o de aproximadamente 10 nm a 50 nm. El diámetro puede variar desde unos pocos nanómetros a cientos de nanómetros ajustando adecuadamente los parámetros de la síntesis, tales como las cantidades del precursor de silano, las cantidades de los agentes de hidrólisis, la polaridad del medio de reacción, y similares.

CuSiNP se establece para nanopartículas de sílice cargadas con cobre.

CuSiNG se establece para un nanogel de sílice cargado con cobre.

30 HCuSiNG se establece para nanogel de sílice híbrida cargado con Cu, donde la matriz de SiNG se carga con un segundo compuesto de silano para conseguir una cobertura de la superficie de la planta uniforme o sustancialmente uniforme.

Plaguicida/bactericida Kocide® 3000; Kocide es una marca comercial registrada de E. I. Du Pont de Nemours and Company.

35 "Cobertura uniforme de la superficie de la planta" se refiere a una superficie húmeda uniforme y completa (por ejemplo, aproximadamente el 100%) debido a la aplicación por pulverización de las realizaciones de la presente descripción. En otras palabras, la aplicación por pulverización causa que las realizaciones de la presente descripción se extiendan a través de la superficie de la planta.

"Cobertura uniforme y sustancial de la superficie de la planta" se refiere a aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, o más de una cobertura uniforme de la superficie de la planta.

40 "Cubrir sustancialmente" se refiere a la cobertura de aproximadamente el 70%, aproximadamente el 80%, aproximadamente el 90%, o más, de las hojas y ramas de una planta.

"Planta" se refiere a árboles, plantas, arbustos, flores, y similares, así como a partes de la planta tales como ramitas, hojas, tallos, y similares. En una realización particular, el término planta incluye un árbol frutal, tal como un árbol de cítricos (por ejemplo, árbol de naranja, árbol de limón, árbol de lima, y similares).

45 Los términos "alq" o "alquilo" se refieren a grupos hidrocarburo de cadena lineal o ramificada que tienen de 1 a 12 átomos de carbono, preferiblemente de 1 a 8 átomos de carbono, tal como metilo, etilo, n-propilo, i-propilo, n-butilo, t-butilo, pentilo, hexilo, heptilo, n-octilo, dodecilo, octadecilo, amilo, 2-etilhexilo, y similares. Alquilo puede incluir alquilo, dialquilo, trialquilo, y similares.

50 Como se usa en la presente invención, "tratar", "tratamiento", "tratado", y similares se refieren a actuar sobre una enfermedad o condición con una nanopartícula o gel a base de sílice multifuncional de la presente descripción para afectar a la enfermedad o condición mejorando o alterando la misma. Además, "tratamiento" incluye prevenir completa o parcialmente (por ejemplo, aproximadamente un 70% o más, aproximadamente un 80% o más, aproximadamente un 90% o más, aproximadamente un 95% o más, o aproximadamente un 99% o más) para que una forma de planta adquiera una enfermedad o condición. La frase "prevención" se puede usar en lugar de tratamiento para este

significado. "Tratamiento", como se usa en la presente invención, cubre uno o más tratamientos de una enfermedad en una planta, e incluye: (a) reducir el riesgo de ocurrencia de la enfermedad en una planta predispuesta a la enfermedad pero que todavía no se ha diagnosticado como infectada con la enfermedad, (b) impedir el desarrollo de la enfermedad, y/o (c) aliviar la enfermedad, por ejemplo, causando la regresión de la enfermedad y/o aliviando uno o más síntomas de la enfermedad.

El término "antibacteriano" se refiere a un compuesto o composición que destruye bacterias, suprime o previene el crecimiento de las bacterias, y/o suprime, previene o elimina la capacidad de las bacterias para reproducirse.

El término "antifúngico" se refiere a un compuesto o composición que destruye hongos, suprime o previene el crecimiento de los hongos, y/o suprime, previene o elimina la capacidad del hongo para reproducirse.

Discusión:

Las realizaciones de la presente descripción incluyen nanopartículas a base de sílice multifuncional, métodos de hacer las nanopartículas a base de sílice multifuncional, geles de nanopartículas a base de sílice multifuncional, métodos de hacer geles de nanopartículas a base de sílice multifuncional, métodos de uso de los métodos de hacer nanopartículas a base de sílice multifuncional y de los métodos de hacer geles de nanopartículas a base de sílice multifuncional, y métodos de tratar plantas, y similares. Las realizaciones de la presente descripción proporcionan una composición que se puede usar para múltiples propósitos. Las realizaciones de la presente descripción son ventajosas porque pueden liberar lentamente uno o más agentes que se pueden usar para prevenir o prevenir sustancialmente y/o tratar o tratar sustancialmente una enfermedad o condición en una planta, actuar como un antibacteriano y/o antifúngico, y/o actuar como un repelente de ciertos tipos de insectos. Otra ventaja de una realización de la presente descripción es que el(los) agente(s) se puede(n) liberar de manera controlable durante un largo período de tiempo (por ejemplo, desde el día de la aplicación a unas cuantas semanas o meses (por ejemplo, aproximadamente 6 o 8 meses). Las realizaciones de la presente descripción, y las características y ventajas de estas realizaciones se discutirán con mayor detalle en la presente invención.

Las realizaciones de la nanopartícula a base de sílice multifuncional pueden incluir un primer componente y un segundo componente. Además, las realizaciones de la presente descripción pueden incluir un gel de nanopartículas a base de sílice multifuncional que incluye nanopartículas a base de sílice multifuncional. La nanopartícula a base de sílice multifuncional y/o el gel de nanopartículas a base de sílice multifuncional se pueden incluir en una composición que se vaya a administrar (por ejemplo, mediante pulverización) a una planta. El gel de nanopartículas a base de sílice multifuncional incluye nanopartículas a base de sílice multifuncional interconectadas en un material de sílice amorfa. Las nanopartículas pueden estar interconectadas covalentemente (por ejemplo, a través de enlaces -Si-O-Si-), asociadas físicamente a través de fuerzas de Van der Waal, y/o a través de interacciones iónicas (por ejemplo, iones de cobre cargados positivamente y nanopartículas de sílice cargadas negativamente). Los primer y segundo componentes pueden estar dentro del material amorfo, así como en la nanopartícula a base de sílice multifuncional.

El primer componente puede funcionar como un antibacteriano y/o antifúngico, específicamente, tratando o tratando sustancialmente, previniendo o previniendo sustancialmente enfermedades de las plantas tales como la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos (HLB, por sus siglas en inglés) y el chancro de los cítricos. El primer componente (por ejemplo, Cu) se puede liberar desde la nanopartícula o del gel a base de sílice multifuncional de manera que pueda actuar como un agente antibacteriano y/o antifúngico durante un período de tiempo (por ejemplo, desde la aplicación a días o meses). El segundo componente funciona como un repelente para insectos que pueden dañar las plantas y/o transportar bacterias, enfermedades, hongos, y similares, que pueden dañar las plantas (por ejemplo, un árbol frutal). El segundo componente (por ejemplo, un compuesto de azufre) de la nanopartícula o del gel a base de sílice multifuncional puede actuar como repelente del Psílido Asiático de los Cítricos (ACP, por sus siglas en inglés) durante un período de tiempo (por ejemplo, desde la aplicación a días o meses). Las realizaciones de la presente descripción tienen propósitos multifuncionales para combatir enfermedades en plantas tales como en árboles, arbustos, y similares, por ejemplo, para el tratamiento de las enfermedades del enverdecimiento de los cítricos y el chancro de los cítricos.

En una realización, la velocidad de liberación del primer y/o segundo componente se puede controlar de tal manera que las características de uno o de ambos puedan ser efectivas para períodos de tiempo de días a semanas o a meses. En otras palabras, el primer componente y/o el segundo componente se pueden liberar desde la nanopartícula o del gel a base de sílice multifuncional comenzando desde el día de la aplicación y continuar la liberación hasta aproximadamente una semana, aproximadamente un mes, aproximadamente dos meses, aproximadamente tres meses, aproximadamente cuatro meses, aproximadamente cinco meses, aproximadamente seis meses, aproximadamente siete meses, o aproximadamente ocho meses.

La nanopartícula a base de sílice multifuncional incluye un núcleo y una cubierta. El núcleo incluye sílice cargada con un primer tipo de primer componente (por ejemplo, iones Cu). La cubierta de sílice puede soportar un segundo tipo de primer componente (por ejemplo, óxido de cobre), mientras que también incluye el primer componente (por ejemplo, iones Cu). Aunque no se pretende estar limitados por la teoría, en una realización el segundo componente puede interactuar con el primer componente (por ejemplo, iones Cu) vía un tipo de interacción de transferencia de carga,

donde la interacción entre el primer componente y el segundo componente puede ocurrir en la nanopartícula y/o en el material de sílice amorfa.

En una realización, el primer componente puede incluir un componente de cobre, un componente de cinc, un componente de titanio, un componente de cerio, un componente de magnesio, un componente de circonio, polietilenimina (PEI), un componente de carbono (por ejemplo, hollín o carbono mixto), fullereno, nanotubos de carbono, y una combinación de los mismos. Específicamente, el primer componente puede incluir un ion de cobre, cobre metálico (Cu), sal de cobre, complejo de cobre, un ion de cinc, cinc metálico (Zn), óxido de cinc, sal de cinc, un ion de plata, plata metálica (Ag), sal de plata, complejo de plata, un ion de titanio, dióxido de titanio (TiO<sub>2</sub>), un ion de cerio, óxidos de cerio, un ion de magnesio, óxido de magnesio, un ion de circonio, óxido de circonio, y una combinación de los mismos.

En una realización, el componente de cobre puede incluir un ion de cobre, cobre metálico, óxido de cobre, oxocloruro de cobre, sulfato de cobre, hidróxido de cobre, y una combinación de los mismos. El componente de cobre puede incluir iones de cobre que están electrostáticamente unidos al núcleo de las nanopartículas de sílice o a la matriz de sílice amorfa, cobre unido covalentemente a la superficie hidratada del núcleo de la nanopartícula o a la matriz de sílice amorfa, y/o óxidos de cobre y/o hidróxidos unidos a la superficie de la nanopartícula o a la matriz de sílice amorfa. En una realización, la nanopartícula y/o el gel a base de sílice multifuncional incluye el componente de cobre en dos o en todos estos tres estados.

En una realización, el componente de cobre puede estar en una forma soluble (amorfa) y en una forma insoluble (cristalina). Al controlar la relación de las formas soluble e insoluble, se puede controlar la velocidad de liberación del componente de cobre en función del tiempo. Como resultado, se puede controlar la velocidad de liberación del componente de cobre de manera que las características antibacterianas y/o antifúngicas puedan ser efectivas para períodos de tiempo de días a semanas o a meses. En otras palabras, el componente de cobre se puede liberar desde la nanopartícula o el gel a base de sílice multifuncional comenzando desde el día de la aplicación y continuar la liberación hasta aproximadamente una semana, aproximadamente un mes, aproximadamente dos meses, aproximadamente tres meses, aproximadamente cuatro meses, aproximadamente cinco meses, aproximadamente seis meses, aproximadamente siete meses, o aproximadamente ocho meses. La relación del componente de cobre soluble a insoluble se puede ajustar para controlar la velocidad de liberación. En una realización, la relación del cobre soluble al cobre insoluble (por ejemplo, (Cu quelado)<sub>x</sub> (Cu cristalino)<sub>1-x</sub>) puede ser de 0:1 a 1:0, y se puede modificar en incrementos de aproximadamente 0,01 para producir la relación que libera el Cu durante el período de tiempo deseado. Los parámetros que se pueden usar para ajustar la relación incluyen: polaridad del disolvente y su naturaleza prótica (es decir, capacidad de unión de hidrógeno), concentración del precursor de Cu (por ejemplo, sulfato de Cu), temperatura, concentración del precursor de silano (tal como tetraetilortosilicato, TEOS), y similares.

En una realización, el segundo componente puede incluir un compuesto de azufre. El compuesto de azufre no reacciona o reacciona muy poco (por ejemplo, a un porcentaje tan bajo o a una velocidad tan lenta que los primer y segundo componentes pueden funcionar todavía de una manera y para un período de tiempo descrito en la presente invención) con el primer componente. El compuesto de azufre puede incluir sulfuros de alquilo, disulfuros de alquilo, trisulfuros de alquilo, tetrasulfuros de alquilo, análogos de cada uno, y una combinación de los mismos, en los que el alquilo puede incluir alquilo, dialquilo, y trialquilo. En particular, el compuesto de azufre puede incluir compuestos de disulfuro de dimetilo (DSDM), sulfuro de dimetilo, disulfuro de dietilo, trisulfuro de dietilo, tetrasulfuro de dietilo, y una combinación de los mismos. La velocidad de liberación del segundo componente se puede controlar para liberar comenzando desde el día de la aplicación a aproximadamente una semana, aproximadamente un mes, aproximadamente dos meses, aproximadamente tres meses, aproximadamente cuatro meses, aproximadamente cinco meses, aproximadamente seis meses, aproximadamente siete meses, o aproximadamente ocho meses.

En una realización, el compuesto de azufre es DSDM. Se debe señalar que el compuesto de azufre se puede usar como un repelente de ACP (por sus siglas en inglés) y es una estrategia atractiva para controlar el HLB (por sus siglas en inglés). Se debe apreciar que el DSDM es tóxico para los insectos porque interrumpe el sistema de la oxidasa del citocromo de la mitocondria, y se considera un fuerte repelente del ACP (por sus siglas en inglés). El DSDM puede interactuar con el primer componente (por ejemplo, ion Cu) en un tipo de interacción de transferencia de carga. De ese modo, al controlar la cantidad del primer componente con la que puede interactuar el DSDM se puede usar la cantidad del primer componente para controlar la cantidad del DSDM presente en la nanopartícula o en el gel a base de sílice multifuncional. Aunque no se pretende estar limitado por la teoría, el azufre (elemento electronegativo, polarizable) en el DSDM se une débilmente a los iones cobre (tipo de interacción ion-dipolo). Una vez que se libera el Cu desde el producto, el DSDM se liberará en su mayor parte ya que no hay otra interacción fuerte entre el DSDM y la matriz de nanopartícula de sílice/nanogel distinta de la fuerza de Van der Waals.

En una realización, el gel de sílice amorfo no tiene una estructura (por ejemplo, definida) ordenada (opuesta a la estructura cristalina) de manera que un "gel amorfo" se refiere a un material de gel que tiene una composición estructural amorfa. En una realización, el número de nanopartículas a base de sílice multifuncional en un gramo de gel de nanopartículas a base de sílice multifuncional puede ser difícil de determinar con precisión. Sin embargo, lo siguiente proporciona cierta guía.

Suponer un gel de sílice amorfo (completamente deshidratado) que incluye aproximadamente partículas interconectadas de un tamaño (diámetro) de aproximadamente 10 nm como material de prueba. El número de partículas por gramo de material se podría estimar de forma aproximada de la siguiente manera:

Masa (m) de una única partícula = densidad de la partícula (d) x volumen de la partícula (v)

$$D = 2,648 \text{ g/cm}^3 \text{ (aprox.)}$$

$$V = (4/3) \pi (r)^3$$

Donde r es el radio de la partícula.

$$\pi = 3,14; r = (10/2 \text{ nm}) = 5 \text{ nm} = 5 \times 10^{-7} \text{ cm.}$$

Si se sustituyen en estos números,  $v = 5,23 \times 10^{-19} \text{ cm}^3$

$$\text{Luego, } m = (5,23 \times 10^{-19} \text{ cm}^3) (2,648 \text{ g/cm}^3)$$

$$\text{O, } m = 1,38 \times 10^{-18} \text{ g}$$

El producto de nanopartículas multifuncionales/nanogel contiene dos componentes activos, el DSDM y un primer componente (por ejemplo, Cu) y un segundo componente (por ejemplo, DSDM). Experimentalmente, se puede cargar aproximadamente del 33 al 45% en peso de Cu en el material de nanopartículas de sílice (medido por análisis ICP-AAS (por sus siglas en inglés); ICP establecido para Espectroscopia de Absorción Atómica de Plasma Inductivamente Acoplado). Por ejemplo, la carga de Cu es de aproximadamente un 33% en el material de nanogel de sílice cargado con Cu sintetizado en una mezcla ácida de etanol-agua que contiene etanol (95%) al 45,5% del volumen total. La carga de Cu es aproximadamente un 45% en el material de nanopartículas de sílice cargado con Cu, sintetizado únicamente en agua ácida. Aproximadamente un átomo de Cu puede contener al menos una molécula de DSDM. Estas estimaciones se pueden aplicar al primer componente y al segundo componente.

Una realización de la nanopartícula y del gel a base de sílice multifuncional se describen en la Solicitud de Documento de Patente PCT de los Estados Unidos de Número US 2009/006496 titulada "Silica-based Antibacterial and Antifungal Nanoformulation". Además, en la antes mencionada Solicitud de Documento de Patente PCT se describen los métodos de hacer una realización de la nanopartícula y del gel a base de sílice multifuncional.

Preferiblemente, el material precursor para hacer nanopartículas y gel a base de sílice multifuncional se puede preparar mezclando un compuesto de silano (por ejemplo, alquil-silano, tetraetoxisilano, tetrametoxisilano, silicato de sodio, o un precursor de silano que pueda producir ácido silícico o ácido silícico como intermedios y una combinación de estos compuestos de silano) con un componente precursor del primer componente en un medio ácido (por ejemplo, agua ácida) que puede contener un alcohol tal como etanol. Después de mezclar durante un período de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 30 minutos a unas pocas horas), se forma una mezcla que incluye nanopartículas de sílice cargadas con el primer componente (también referida como una "nanopartícula de sílice cargada"). Después de que se forman las nanopartículas de sílice cargadas, el medio se puede llevar a un pH de aproximadamente 7 y mantenerlo durante un período de tiempo (por ejemplo, unas pocas horas a un día) para formar un material precursor que incluye un gel de nanopartículas de sílice cargado, donde las nanopartículas están interconectadas. Este proceso se puede realizar usando un único recipiente de reacción o se pueden usar múltiples recipientes de reacción.

Una vez que se hace la nanopartícula de sílice cargada, se pueden formar nanopartículas y el gel a base de sílice multifuncional. La nanopartícula de sílice cargada se puede disponer en un recipiente de reacción en un medio de reacción acuoso (por ejemplo, agua ácida) o se puede secar y mezclar en forma de polvo. El segundo componente (por ejemplo, DSDM) también se añade al recipiente de reacción que incluye la mezcla de reacción acuosa o el material precursor seco. La relación de la cantidad del material precursor y del segundo componente (seco) puede ser de aproximadamente 1 a 1. Esta mezcla se mezcla durante un período de tiempo (por ejemplo, de minutos a horas) para formar las nanopartículas y el gel a base de sílice multifuncional. Las nanopartículas y el gel a base de sílice multifuncional se pueden separar (por ejemplo, centrifuga) de la disolución acuosa y secar (por ejemplo, secado al aire). La mezcla no requiere purificación adicional alguna, aunque se puede realizar purificación y procesamiento adicionales. Este proceso se puede realizar usando un único recipiente de reacción o se pueden usar múltiples recipientes de reacción, y se puede realizar a temperatura y presión ambiente.

En una realización particular, el segundo componente es DSDM y se puede añadir bajo agitación mecánica después de preparar la nanoformulación de sílice cargada con Cu. Sin embargo, el DSDM se puede añadir en cualquier momento durante el proceso de preparación de la nanoformulación. En una realización, se añaden aproximadamente 100 microgramos de DSDM a aproximadamente 45 equivalentes-gramo de Cu.

En otra realización de la presente descripción, el gel de nanopartículas a base de sílice multifuncional se puede formar usando un segundo compuesto de silano, donde la adición del segundo compuesto de silano mejora la uniformidad de la cobertura de la superficie de la planta. Durante la etapa cuando se añade el compuesto de silano, también se puede añadir el segundo compuesto de silano. El segundo compuesto de silano puede incluir compuestos tales como

alquil-silanos. El segundo compuesto de silano puede ser de aproximadamente el 0,01 al 30% o de aproximadamente el 10 al 30% en peso del compuesto de silano. La mezcla de silano resultante puede incluir el primer componente y/o el segundo componente, tal como los descritos anteriormente. La nanopartícula es la misma o similar a la nanopartícula descrita anteriormente y en la presente invención. Se debe apreciar que un objetivo en esta realización es adaptar la hidrofiliidad o hidrofobicidad de la superficie de las nanopartículas/nanogel para mejorar adicionalmente la propiedad de adherencia de las nanoformulaciones. Por ejemplo, las hojas de los cítricos son cerosas (hidrófobas). Para mejorar la adherencia de la nanoformulación a la superficie cerosa por medio de una interacción hidrófoba-hidrófoba, se puede modificar adicionalmente el material de nanopartículas de sílice/nanogel con un reactivo de silano hidrófobo tal como metil- o propil- o butil-silano.

Como se mencionó anteriormente, las realizaciones de la presente descripción son efectivas para el tratamiento de enfermedades que afectan a plantas tales como plantas y árboles de cítricos. Además, las realizaciones de la presente descripción pueden ser efectivas como una barrera protectora contra el ACP que se alimenta del floema ya que cubre uniformemente la superficie de la planta (por ejemplo, la superficie de la hoja). En particular, se pueden usar realizaciones de la presente descripción para combatir las enfermedades del chancro y del enverdecimiento (HLB, por sus siglas en inglés) de los cítricos. El diseño de la nanopartícula o del gel a base de sílice multifuncional facilita una cobertura uniforme de la superficie de la planta o cobertura sustancialmente uniforme de la superficie de la planta. En una realización, la nanopartícula o el gel a base de sílice multifuncional que se aplica a las plantas puede tener una propiedad de adherencia superior en diversos tipos de exposición a condiciones atmosféricas tales como lluvia, viento, nieve, y luz solar, de manera que no se elimine sustancialmente durante el periodo de tiempo de la liberación de los primer y/o segundo componentes. En una realización, la nanopartícula o el gel a base de sílice multifuncional tiene un efecto fitotóxico reducido sobre las plantas y un estrés ambiental reducido debido al contenido mínimo de Cu.

Las realizaciones de la presente descripción se pueden aplicar en los períodos de tiempo consistentes con la liberación de los primer y segundo componentes, y estos períodos de tiempo pueden incluir desde el primer día de la aplicación a aproximadamente una semana, aproximadamente un mes, aproximadamente dos meses, aproximadamente tres meses, aproximadamente cuatro meses, aproximadamente cinco meses, aproximadamente seis meses, aproximadamente siete meses, o aproximadamente ocho meses.

Una realización específica de la nanopartícula o del gel a base de sílice multifuncional puede incluir una nanopartícula o nanogel a base de sílice multifuncional co-cargados con disulfuro de dimetilo (DSDM) y cobre (DSDM-CuSiNP/NG) que se puede usar para combatir las enfermedades que se describen del chancro y del enverdecimiento de los cítricos. Cuando la composición se aplica a plantas de cítricos, es efectiva para controlar simultáneamente en una única aplicación durante una estación del crecimiento del cítrico las enfermedades del chancro y del enverdecimiento de los cítricos.

#### Ejemplo Comparativo 1 - Material y propiedades del CuSiNG

Los datos experimentales a escala de laboratorio confirmaron lo siguiente: (i) propiedades antibacterianas muy mejoradas del material de CuSiNG en comparación con los controles, Kocide® 3000 (un producto de DuPont; material de hidróxido de Cu) y sulfato de Cu, (ii) propiedad de adherencia excepcionalmente fuerte a la superficie de la hoja del cítrico en comparación con los controles, y (iii) cobertura mejorada de la superficie, completamente uniforme, bajo aplicación por pulverización. En base a los datos de caracterización de materiales (patrones de Microscopía Transmisión de Electrones de Alta Resolución y de Difracción de Electrones de Área Seleccionada), se confirma que el Cu está presente en la matriz del nanogel de sílice (SiNG) en dos formas diferentes y en dos estados de oxidación diferentes, óxido de Cu cristalino (estado Cu+1) y complejo de Cu amorfo (estado Cu+2). Por lo tanto, el CuSiNG es un nanomaterial único diseñado mediante nano-tecnología. El ensayo de difusión en disco confirmó que el material de CuSiNG tiene la capacidad de difundirse desde la localización de la aplicación. Esta propiedad de difusión tendrá un fuerte impacto en la protección de las superficies de las hojas y de los frutos jóvenes que se expanden rápidamente.

#### Ejemplo 2 - CuSiNG cargado de DSDM en disolución

En la presente descripción, se preparan materiales a base de nanogel de sílice co-cargados con Cu y DSDM (DSDM-CuSiNG) y sus formulaciones relacionadas. La investigación multidisciplinaria se usa para desarrollar y estudiar los materiales cargados con DSDM, conducir un número de bioensayos a escala de laboratorio para probar la eficacia, y realizar un estudio de campo para evaluar la eficacia en el control de las enfermedades del chancro y del HLB de los cítricos.

La carga del DSDM en el CuSiNG se ha estudiado en estado de disolución (como formulación líquida de CuSiNG sintetizado) y se ha caracterizado mediante Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas (GC-MS, por sus siglas en inglés). En estado de disolución, la carga del DSDM en el material de CuSiNG se llevó a cabo añadiendo directamente el DSDM a la mezcla de reacción acuosa que contenía el material de CuSiNG. Se continuó la agitación para asegurar una mezcla uniforme del DSDM con el material de CuSiNG. La composición del medio de reacción facilita en gran medida la carga directa del DSDM en el material de CuSiNG. Al cabo de 24 horas, se centrifugó el material de DSDM-CuSiNG y se secó al aire durante más de siete días. Se pudo oler un fuerte olor a azufre.



La Figura 1a es un espectro de GC-MS (por sus siglas en inglés) del DSDM usado como control bajo condiciones en donde el nanogel de sílice (SiNG) no contiene cobre. La Figura 1b es un espectro de GC-MS (por sus siglas en inglés) del material de DSDM-CuSiNG. Incluso después de siete días es discernible un olor de DSDM procedente del polvo de DSDM-CuSiNG. Para la preparación de la muestra del GC-MS (por sus siglas en inglés), se añadió cloroformo de calidad espectroscópica al polvo y al DSDM. Los datos del GC-MS del DSDM (control) y del extracto de cloroformo del DSDM-CuSiNG se muestran en la Figura 1a y en la Figura 1b, respectivamente. En la Figura 2 se muestra el pico molecular característico para el DSDM a 93 (m/z) junto con otros picos para su estructura fragmentada donde en ambos casos se encontraron los espectros de GC-MS de los productos del material de DSDM-SiNG, confirmando la presencia del DSDM en la muestra de DSDM-CuSiNG.

También se realizó un experimento similar con SiNG (en lugar de CuSiNG). Después de 3 días, no se fue capaz de detectar el olor característico del DSDM procedente del material de DSDM-SiNG, y el análisis de GC-MS (por sus siglas en inglés) no mostró los picos característicos del DSDM como se muestra en la Figura 2. Estos resultados sugieren que los iones  $\text{Cu}^{2+}$  juegan un papel crítico con la carga y la retención del DSDM.

#### Ejemplo 3 - Carga del DSDM en CuSiNG en estado seco

La carga del DSDM en estado seco usando polvo de CuSiNG liofilizado se llevó cabo mediante la adición de DSDM (100  $\mu\text{ml}$  puros) directamente a una muestra de CuSiNG (150 mg de polvo secado al vacío) en un vial de vidrio de 20 ml. Para fines de comparación rápida, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  puros de DSDM en otro vial de vidrio de 20 ml (control). Ambos viales se mantuvieron juntos dentro de una campana de humos de laboratorio para permitir que se evaporara el DSDM a la misma velocidad. Después de 3 días, se fue capaz de oler el fuerte olor del DSDM procedente de la muestra de CuSiNG tratada únicamente con DSDM.

Posteriormente, se añade cloroformo a ambos viales y en las Figuras 3a y 3b se muestran los resultados. En la Figura 3a se muestra el espectro del GC-MS (por sus siglas en inglés) del DSDM añadido al polvo liofilizado de CuSiNG seco. En la Figura 3b se toma un extracto de control del DSDM y se realiza un GC-MS (por sus siglas en inglés). Como se esperaba, se obtuvieron los picos característicos del DSDM en la muestra de DSDM-CuSiNG (Figura 3a) y no se obtuvieron estos picos en el control (Figura 3b). Los experimentos preliminares anteriores confirmaron así que el material de CuSiNG es capaz de cargar, retener y liberar lentamente el DSDM. En los Documentos de Patente de los EE.UU. de Números US 6.548.264 de Tan et al., US 6.924.116 de Tan et al., y US 7.332.351 de Tan et al se reporta un método de síntesis para la preparación de una matriz de sílice con partículas metálicas embebidas. La síntesis de CuSiNG se describe en la Solicitud del Documento de Patente Internacional de Número PCT/US2009/006496 presentada el 10 de Diciembre de 2009.

#### Ejemplo 4 - Caracterización del material de DSDM-CuSiNG

Se usaron las siguientes técnicas de caracterización de materiales para caracterizar el material de DSDM-CuSiNG de la presente descripción. En primer lugar, un estudio de GC-MS (por sus siglas en inglés) confirma cualitativamente la carga del DSDM en los materiales de CuSiNG y SiNG. El segundo estudio de detección basado en una Microbalanza de Cristal de Cuarzo (QCM, por sus siglas en inglés) confirma la carga y liberación del DSDM en tiempo real. Al considerar la aplicación práctica del material de DSDM-CuSiNG en el campo, es deseable realizar un estudio cuantitativo para monitorear los procesos de carga/liberación del DSDM en tiempo real. Por lo tanto, la tecnología de detección basada en la QCM (por sus siglas en inglés) se adapta para las mediciones cuantitativas de la carga/liberación del DSDM y para determinar las cinéticas. La sensibilidad de la técnica de la QCM (por sus siglas en inglés) se reporta a nivel de partes por billón por J. W. Gardner et al, "A brief-history of electronic noses". Sensors and Actuators B-Chemical 1994, 18, (1-3), 211-220. La caracterización del DSDM-CuSiNG clarifica la naturaleza de la interacción del DSDM con el material de CuSiNG. El objetivo es investigar el entorno físico-químico alrededor del DSDM y el papel del Cu en la adsorción del DSDM.

Brevemente, el dispositivo experimental incluye el uso de una muestra de material de CuSiNG que se aplica por pulverización sobre el sensor de la QCM (por sus siglas en inglés) seguido por exposición al DSDM en una cámara cerrada. Se espera que con el tiempo la frecuencia de resonancia de la QCM (por sus siglas en inglés) continúe disminuyendo a medida que se carga más y más DSDM en el material de CuSiNG. Una vez alcanzado el equilibrio, no tendrá lugar ninguna caída adicional de la frecuencia. Se retira el sensor de la cámara y se observa la monitorización del proceso de liberación del DSDM con tiempo. Se espera observar un incremento en la frecuencia a medida que se libera más y más DSDM. Se llevan a cabo experimentos similares para el material de SiNG, como control.

#### Ejemplo 5 - Papel de los iones Cu II en la carga del DSDM

La carga del DSDM en la matriz está favorecida por los enlaces de hidrógeno entre la superficie de sílice/poros que contienen el grupo silanol ( $-\text{Si}-\text{OH}$ ) (donante de protones) y el átomo de azufre del DSDM (aceptor de protones), según R. W. Glass, et al. en "Surface studies of adsorption of sulfur-containing gases at 423 degree K on porous adsorbents. 1. Adsorption of hydrogen sulfide, methanethiol, ethanethiol, and dimethyl sulfide on silica gels". Journal of Physical Chemistry 1973, 77, (21), 2571-2576.

A deferencia del SiNG, se espera que el ambiente físico-químico del DSDM en el CuSiNG sea algo diferente debido a la presencia de los iones Cu (II). Los resultados preliminares sugieren que el olor característico del DSDM no cambia

con el tiempo, lo que indica que el DSDM no es reactivo con los iones Cu (II). Sin embargo, el átomo de azufre rico en electrones del DSDM tiene la capacidad de interactuar débilmente con el ion de Cu (II) deficiente en electrones. Esto podría facilitar adicionalmente la adsorción del DSDM en el CuSiNG. Se realizan estudios completos de FT-IR (por sus siglas en inglés) para comprender la naturaleza de las interacciones intermoleculares que existen entre el DSDM y el SiNG. Además, se usa el análisis termogravimétrico (TGA, por sus siglas en inglés), los estudios de calorimetría y de detección con la QCM (por sus siglas en inglés) para obtener las características de carga/liberación del DSDM (isotermas) frente a los materiales de CuSiNG y de SiNG para determinar el papel de los iones Cu II en la carga del DSDM. Un análisis comparativo de los datos de isoterma junto con el análisis de FT-IR (por sus siglas en inglés) revela el efecto del Cu en el proceso de carga/liberación del DSDM.

#### 10 Ejemplo 6 – Carga del DSDM en el CuSiNG a través de la manipulación a nano-escala

La manipulación del entorno molecular alrededor del DSDM al nivel de nano-escala se llevó a cabo para mejorar la eficiencia de la carga del DSDM en los materiales de CuSiNG y de SiNG.

Primero se sintetizaron los materiales de nanogel de sílice híbrida (HSiNG) y HSiNG cargado con Cu (CuHSiNG). Durante la síntesis del HSiNG se usaron una combinación de dos precursores de sílice no costosos que consisten en un éster a base de silano y un silano a base de alquilo (por ejemplo, metilo o propilo). La razón de introducir polímeros de pequeña cadena de alquilo en la matriz de sílice es que esto mejora la interacción con el DSDM mediante la interacción intermolecular hidrófoba-hidrófoba.

Se realizaron una serie de experimentos variando la relación de estos dos precursores de sílice para optimizar la carga tanto del Cu como del DSDM en el material de HSiNG. Tanto el material de DSDM-HSiNG como el de DSDM-HCuSiNG se caracterizan sistemáticamente. Se evalúa la eficiencia de la carga del DSDM a los materiales de HSiNG y de HCuSiNG, y los resultados se comparan con el material de DSDM-CuSiNG. Para los bioensayos y las pruebas de campo, solo se selecciona un material de DSDM-CuSiNG que tiene una carga máxima de Cu y de DSDM, los dos componentes activos responsables de la prevención de las enfermedades chancro y del HLB (por sus siglas en inglés), respectivamente.

Caracterización: la eficiencia de la carga del Cu se determina cuantitativamente mediante espectroscopía de absorción atómica (AAS, por sus siglas en inglés) mientras que la cinética de la carga/liberación del DSDM se determina mediante el estudio de la QCM (por sus siglas en inglés). Además, se usan varias técnicas de caracterización de materiales tales como TEM/HRTEM (por sus siglas en inglés) (tamaño y morfología), SAED (por sus siglas en inglés) (cristalinidad), XPS (por sus siglas en inglés) (identificación de estados de oxidación del Cu), XRD (por sus siglas en inglés) (cristalinidad en estado bruto), SEM-EDAX (por sus siglas en inglés) (análisis elemental para estimar la relación de Cu a Si), BET (por sus siglas en inglés) (mediciones del área de la superficie/porosidad), y FT-IR (por sus siglas en inglés) (estudio de la interacción del DSDM así como del Cu con la matriz de sílice) para la caracterización sistemática de los materiales de HSiNG y de CuHSiNG. Se espera una mejora adicional de la carga del DSDM en el HSiNG y en el HCuSiNG debido a interacciones intermoleculares hidrófoba-hidrófoba adicionales entre los grupos metilo del DSDM y los grupos alquilo del precursor de silano.

#### Ejemplo 7 – Comparación de la eficacia del DSDM-CuSiNG y del DSDM-HCuSiNG

Los bioanálisis de laboratorio para la evaluación de la eficacia de los materiales cargados con DSDM incluyen, análisis de difusión en discos frente a *X. alfalfae* y bioanálisis con olfatómetro frente al ACPs (por sus siglas en inglés) y el análisis de difusión en disco. Para probar la actividad antibacteriana de los materiales de DSDM-CuSiNG y de DSDM-HCuSiNG, se usa el conocido método de "análisis de difusión en disco".

En resumen, se extiende una dilución adecuada de un cultivo de crecimiento durante la noche de *X-alfalfae* (200 µl de aproximadamente 106 ufc/ml basada en la dilución del estándar de Farland 0,5 Mc) sobre placas con agar nutritivo (90 mm) para conseguir un cultivo confluyente de crecimiento. Se realiza el análisis comparativo de la inhibición del crecimiento mediante diferentes concentraciones de los materiales de prueba (DSDM-CuSiNG y DSDM-HCuSiNG) usando DSDM-SiNG y DSDM-HSiNG como controles negativos, y sulfato de Cu y Kocide® 3000 como controles positivos para encontrar la diferencia en los intervalos de las concentraciones mínimas inhibitoras bajo las condiciones de prueba. Por disco se aplica el mismo volumen conteniendo diferentes concentraciones de cada formulación para evitar cualquier variación desigual del perímetro de difusión sobre la placa de agar. El nivel de la capacidad antibacteriana se determina midiendo la zona de inhibición después de 24 horas de incubación a 30°C. La concentración mínima inhibitoria (MIC, por sus siglas en inglés) de todos los compuestos mencionados anteriormente, que incluyen DSDM-CuSiNG y DSDM-HCuSiNG, también se determina mediante el extendido de la dilución adecuada de un cultivo de *X. alfalfae* sobre placas con agar nutritivo que contienen diluciones en serie log<sup>2</sup> (dobles) del(de los) compuesto(s) de prueba para correlacionar los resultados de la zona de inhibición en la prueba de difusión en disco y para refinar la concentración del DSDM-CuSiNG y del DSDM-HCuSiNG necesaria para la destrucción efectiva de los patógenos.

Todas las placas de prueba se incuban durante períodos prologados más allá de 24 horas para detectar cualquier crecimiento retardado del organismo de prueba mediante la formación de colonias aisladas en la zona de inhibición o en las placas de agar en la serie de dilución al nivel de la MIC (por sus siglas en inglés). Esto indicaría tentativamente

la diferencia de estabilidad entre el DSDM-CuSiNG (o DSDM-HCuSiNG) y el Kocide® 3000 o sulfato de Cu bajo las condiciones de la prueba, lo que será una evaluación indirecta de la diferencia en la cinética de la liberación del Cu del DSDM-CuSiNG (o DSDM-HCuSiNG) y del Kocide® 3000. Siempre que sea apropiado también se generan los gráficos de dosis-respuesta. En resumen, se varía la dosificación del compuesto de Cu y se determinan la respuesta relativa o los porcentajes del control de la enfermedad a esas dosis.

Análisis estadístico: Se probará la significancia de la actividad antibacteriana mediante diferentes análisis estadísticos tales como ANNOVA discutido en Design and Analysis of Experiment por Hinkelmann, K; Kempthorne, O, Wiley: 2008; Volúmenes I y II (Segunda edición). Se miden el diámetro de la zona de inhibición con todos los materiales antibacterianos respectivos a diferentes concentraciones y tiempos de incubación para su uso en el análisis estadístico, para evaluar la idoneidad del CuSiNG y del H-CuSiNG como un material antibacteriano mejor con respecto a los controles.

Los beneficios de aplicar la nanotecnología en la investigación de cítricos son enormemente altos. La matriz de nanogel de sílice proporciona un entorno único para co-albergar Cu y DSDM, y la elaboración de nanomateriales de DSDM-CuSiNG multifuncionales para combatir las enfermedades tanto del chancro como del enverdecimiento de los cítricos. Estudios recientes sugieren que el nanogel de sílice es capaz de dispersarse lentamente desde el punto de la aplicación en un ambiente húmedo. El impacto sería tremendamente alto, ya que este CuSiNG formará un revestimiento del tipo película uniforme sobre la superficie con el tiempo. Se identifican dos ventajas principales de la película de nanogel de sílice; (i) la capacidad para proteger las superficies de frutos y hojas jóvenes que crecen rápidamente, y (ii) la capacidad para servir como barrera protectora contra los ACPs (por sus siglas en inglés) que se alimentan de floema.

La tecnología del DSDM-CuSiNG ofrece los siguientes beneficios: (a) una formulación dos-en-uno para combatir tanto el chancro como el enverdecimiento, (b) biodisponibilidad y longevidad superior del Cu, (c) liberación sostenida del DSDM para proteger contra la invasión de ACP (por sus siglas en inglés) (mecanismo primario de defensa), (d) revestimiento robusto de DSDM-CuSiNG sobre la superficie de las hojas (mecanismo secundario de defensa contra el ACP (por sus siglas en inglés)), (e) técnica sencilla de síntesis volumétrica en un único recipiente, (f) ingredientes económicos (coste de materias primas de ~\$3,00 por 0,404 hectáreas (~\$3,00 por acre)), y (g) no se requieren múltiples aplicaciones.

Gracias a la ingeniería a nivel de nano-escala, el CuSiNG de la presente descripción tiene las siguientes ventajas con respecto a los compuestos a base de Cu existentes: cobertura uniforme de la superficie de la planta debido a un tamaño de partícula ultra-pequeño, una mejor propiedad de adherencia debido a la nanoestructura de tipo gel, perfil de liberación del Cu sostenido (a largo plazo), mejor control sobre la velocidad de liberación del Cu (relación de Cu "soluble" a "insoluble" ajustable), mayor actividad antibacteriana/antifúngica con menor cantidad de contenido de Cu, efecto fitotóxico reducido debido a una relación ajustable de Cu "soluble" a "insoluble", y un ambiente seguro debido a un menor contenido de Cu, sin formación de subproductos perjudiciales, síntesis en base agua, uso del exceso de CuSiNG como nutriente para plantas, y mínima posibilidad de tener una concentración local de Cu elevada que podría causar toxicidad medioambiental.

El protocolo de síntesis tiene las siguientes ventajas: (i) simplicidad, (ii) base agua, (iii) escalable para aplicaciones en campo, (iv) método de síntesis en un único recipiente, que no requiere de etapas de purificación, y (v) material de CuSiNG concentrado que se puede diluir fácilmente para aplicación en campo. Una persona no técnica puede realizar esta tarea añadiendo una cantidad apropiada de agua, reduciendo así los costes de transporte. El método también usa productos químicos económicos y se produce fácilmente de una manera rentable.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición, que comprende

una nanopartícula a base de sílice multifuncional que incluye un primer componente y un segundo componente, en donde la nanopartícula a base de sílice multifuncional incluye un núcleo y una cubierta, en donde el núcleo incluye sílice cargada con un primer tipo de dicho primer componente, en donde la cubierta incluye un primer tipo de dicho primer componente, y un segundo tipo de dicho primer componente, en donde el primer componente funciona como un antibacteriano, un antifúngico, o una combinación de los mismos, y en donde segundo componente funciona como un repelente para insectos.

2. La composición de la reivindicación 1, en donde el primer componente se selecciona de un componente de cobre, un componente de cinc, un componente de titanio, un componente de cerio, un componente de magnesio, un componente de circonio, una polietilenimina (PEI), un fullereno, un nanotubo de carbono, y una combinación de los mismos; y el segundo componente es un compuesto de azufre.

3. La composición de la reivindicación 2, en donde el componente de azufre se selecciona de: un sulfuro de alquilo, un disulfuro de alquilo, un trisulfuro de alquilo, un tetrasulfuro de alquilo, y una combinación de los mismos.

4. La composición de la reivindicación 2, en donde el componente de azufre se selecciona de: disulfuro de dimetilo (DSDM), sulfuro de dimetilo, disulfuro de dietilo, trisulfuro de dietilo, tetrasulfuro de dietilo, y una combinación de los mismos.

5. La composición de la reivindicación 4, en donde el primer componente es un componente de cobre.

6. La composición de la reivindicación 5, en donde el componente de cobre se selecciona de ion de cobre, cobre metálico, óxido de cobre, oxiclورو de cobre, sulfato de cobre, hidróxido de cobre, y una combinación de los mismos.

7. La composición de la reivindicación 6, en donde el componente de azufre se selecciona de: un sulfuro de alquilo, un disulfuro de alquilo, un trisulfuro de alquilo, un tetrasulfuro de alquilo, y una combinación de los mismos.

8. La composición de la reivindicación 6, en donde el componente de azufre se selecciona de: disulfuro de dimetilo (DSDM), sulfuro de dimetilo, disulfuro de dietilo, trisulfuro de dietilo, tetrasulfuro de dietilo, y una combinación de los mismos.

9. La composición de la reivindicación 6, en donde el componente de azufre es disulfuro de dimetilo (DSDM).

10. La composición de la reivindicación 9, en donde el DSDM se une a la nanopartícula a base de sílice multifuncional vía iones de cobre.

11. Un gel que comprende:

una pluralidad de nanopartículas a base de sílice multifuncional de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 dispuestas en un material de sílice amorfa, en donde el material de sílice amorfa incluye uno o ambos del primer componente y del segundo componente.

12. El gel de la reivindicación 11, que comprende además un compuesto de silano.

13. El gel de la reivindicación 12, en donde el compuesto de silano se selecciona del grupo que consiste en: metilfosfonato de 3-(trihidroxisilil)propilo, alquilsilano, tetraetoxisilano, tetrametoxisilano, silicato de sodio, un precursor de silano que pueda producir ácido silícico o ácido silícico como productos intermedios, y una combinación de los mismos.

14. Un método para sintetizar un gel de nanopartículas a base de sílice multifuncional, comprendiendo el método:

añadir una porción de una nanopartícula de sílice cargada a un medio de reacción acuoso para formar la mezcla I en donde la nanopartícula de sílice cargada se forma por mezcla de un compuesto de silano con un compuesto precursor del primer componente en medio ácido;

añadir una porción de un segundo componente directamente al medio de reacción acuoso que contiene la mezcla I para formar la mezcla II; y

mezclar la mezcla II para formar un gel de nanopartículas de sílice multifuncional que incluye nanopartículas de sílice multifuncional de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

15. Un método para sintetizar un gel de nanopartículas a base de sílice multifuncional, comprendiendo el método:

añadir una porción de una nanopartícula de sílice cargada en polvo a un recipiente de reacción, en donde la nanopartícula de sílice cargada se forma por mezcla de un compuesto de silano con un compuesto precursor del primer componente en medio ácido;

añadir una porción de un segundo componente directamente al polvo para formar la mezcla A; y

mezclar la mezcla A para formar un gel de nanopartículas de sílice multifuncional que incluye las nanopartículas de sílice multifuncional de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

5 16. Un método de tratar, prevenir, o tanto de tratar como de prevenir una enfermedad en una especie vegetal, que comprende:

administrar una composición que incluye las nanopartículas a base de sílice multifuncional de las reivindicaciones 1 a 10, el gel de nanopartículas a base de sílice multifuncional de las reivindicaciones 10 a 13, o una mezcla de los mismos, a la planta.

17. El método de la reivindicación 16, en donde la planta tratada es un miembro de la especie de cítricos.

10 18. El método de la reivindicación 17, en donde la enfermedad tratada se selecciona del grupo que consiste en el chancro de los cítricos, el enverdecimiento de los cítricos, y una combinación de las mismas.

19. El método de la reivindicación 16, en donde el primer componente, el segundo componente, o tanto el primer componente como el segundo componente se liberan de una manera sostenida para el tratamiento de la planta durante un período de tiempo desde el día en que se administra la composición hasta aproximadamente ocho meses.

15 20. Un método para tratar simultáneamente plantas de cítricos para el chancro de los cítricos y prevenir la invasión de un vector de Psílido Asiático de los Cítricos (ACP, por sus siglas en inglés) que porta el patógeno y esparce la enfermedad del enverdecimiento de los cítricos en las plantas de cítricos, que comprende las etapas de:

administrar una composición que incluye nanopartículas a base de sílice multifuncional de las reivindicaciones 1 a 10, gel de nanopartículas a base de sílice multifuncional de las reivindicaciones 11 a 13, o una mezcla de los mismos, a la planta de cítricos, en donde la administración incluye cubrir sustancialmente las hojas y las ramas de la planta de cítricos.

20 21. El método de la reivindicación 20, que comprende, además:

permitir la lixiviación de los iones de Cu y del disulfuro de dimetilo (DSDM) en una liberación lenta, de una manera no-fitotóxica con la exposición a condiciones atmosféricas seleccionadas de al menos una de lluvia, viento, nieve, y luz solar, en donde una pluralidad de iones de cobre y el disulfuro de dimetilo se difunden desde una ubicación de aplicación sobre una superficie de tejido vegetal y cubren la superficie de tejido expuesta de los frutos y de las hojas de rápido crecimiento, minimizando de esta manera la frecuencia de aplicación por etapa de crecimiento, aumentando la cobertura de la superficie de la planta y la longevidad de la cobertura de las plantas de cítricos que requieran del tratamiento para la enfermedad del chancro de los cítricos y del enverdecimiento de los cítricos.

25 22. El método de la reivindicación 20, en donde la formulación a base de sílice incluye además un segundo compuesto de silano para conseguir una cobertura uniforme de la superficie de la planta para modular la velocidad de liberación de los iones de cobre, mejorar la resistencia a la lluvia, y aumentar la longevidad de la cobertura de la superficie de la planta.

30 23. El método de la reivindicación 22, en donde el segundo compuesto de silano se selecciona del grupo que consiste en: metilfosfonato de 3-(trihidroxisilil)propilo, alquilsilano, tetraetoxisilano, tetrametoxisilano, silicato de sodio, un precursor de silano que puede producir ácido silícico o ácido silícico como productos intermedios, y una combinación de los mismos.

35 24. El método según la reivindicación 20, en donde la administración incluye el rociado.

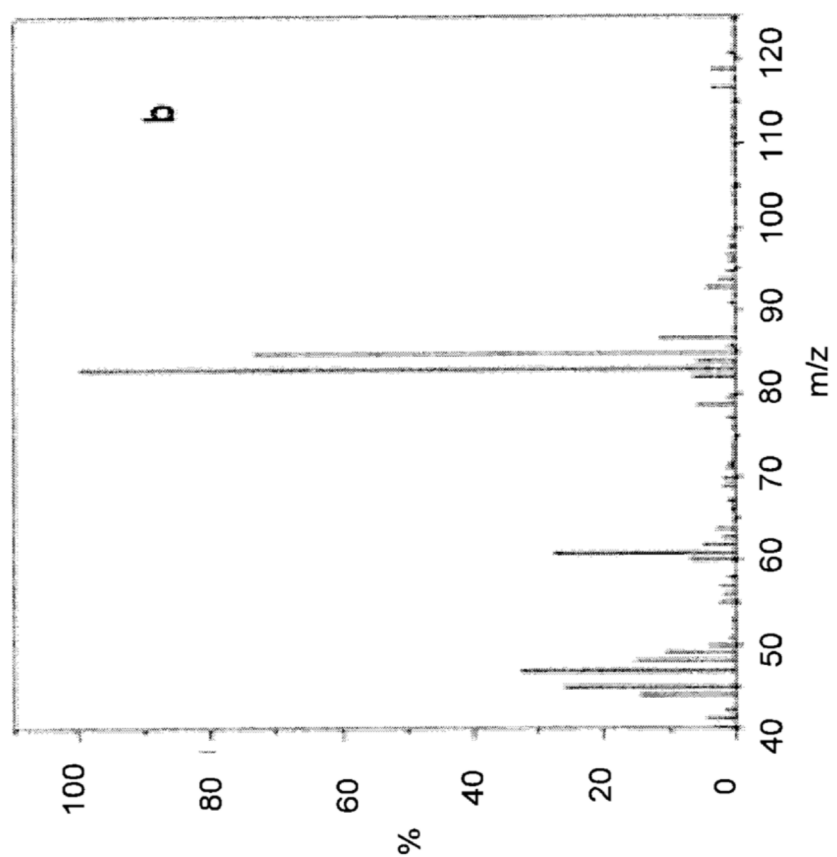


Figura 1b

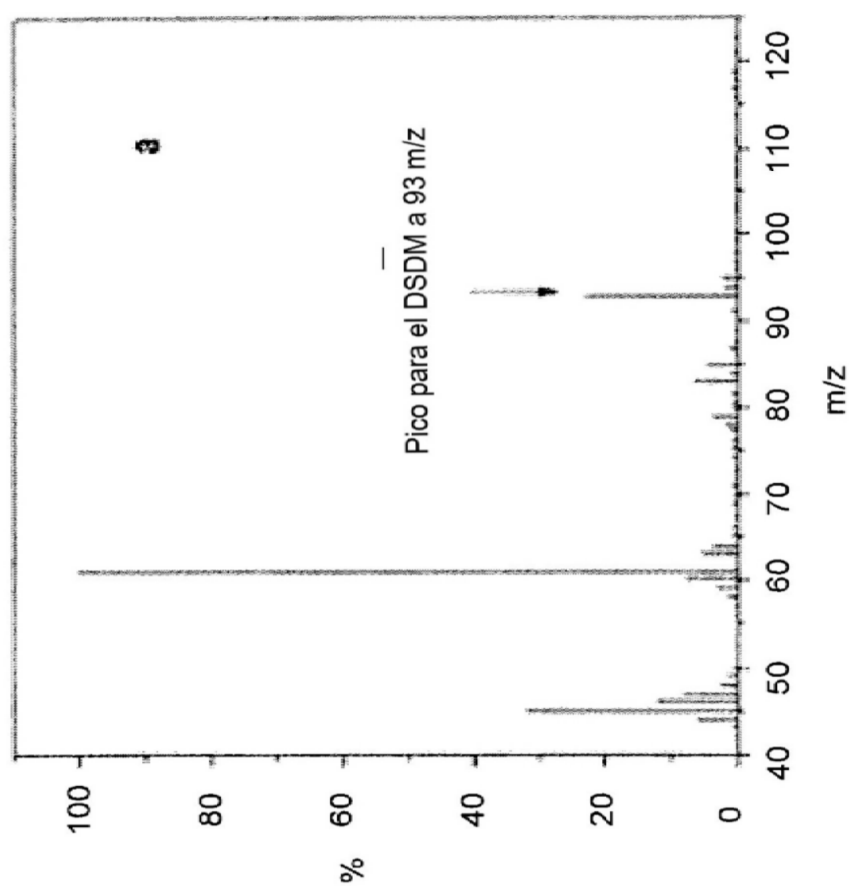


Figura 1a

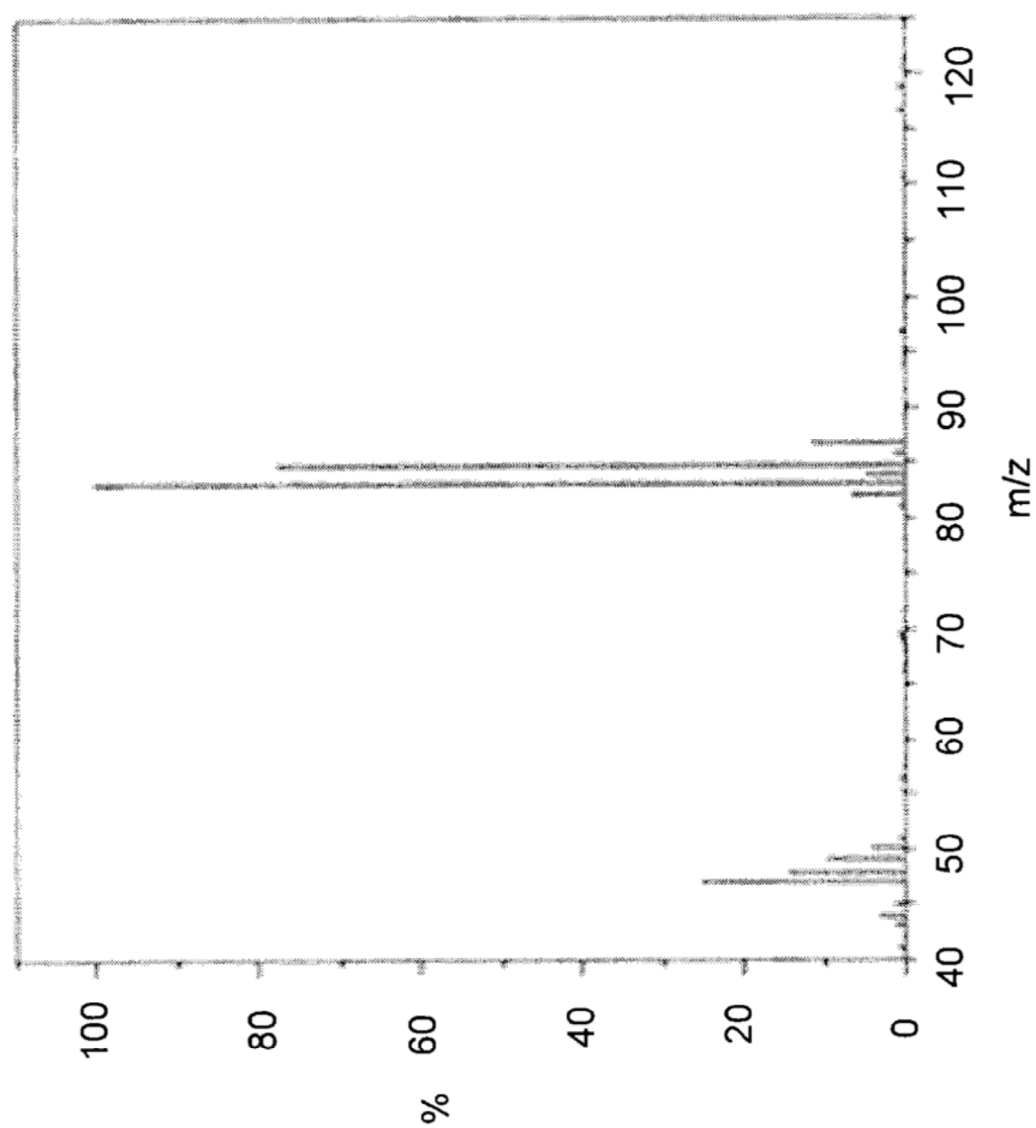


Figura 2

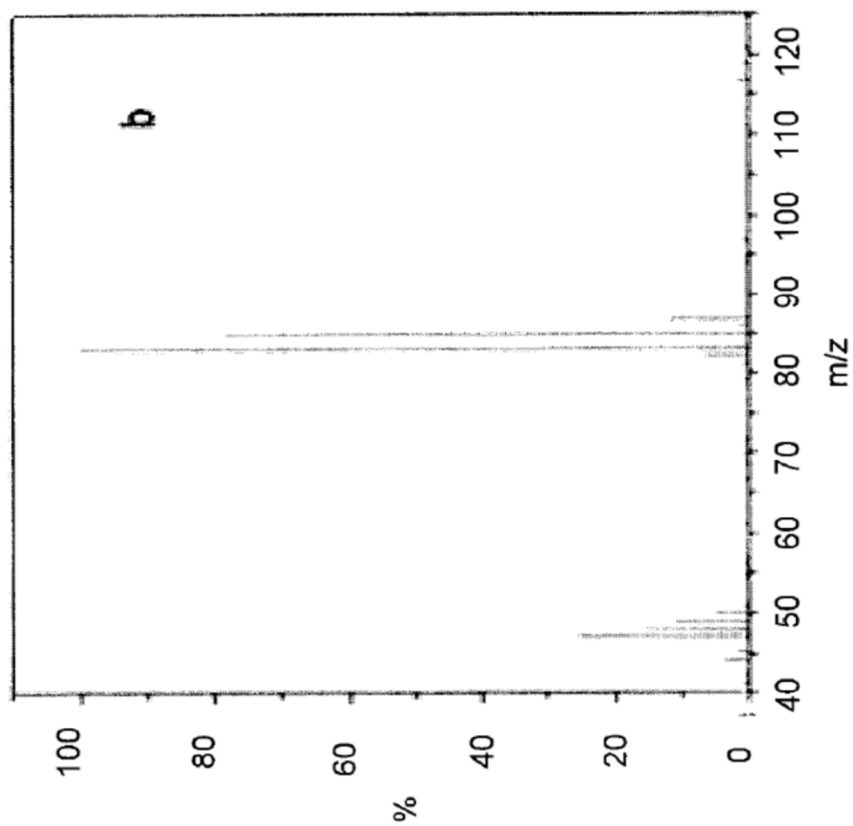


Figura 3b

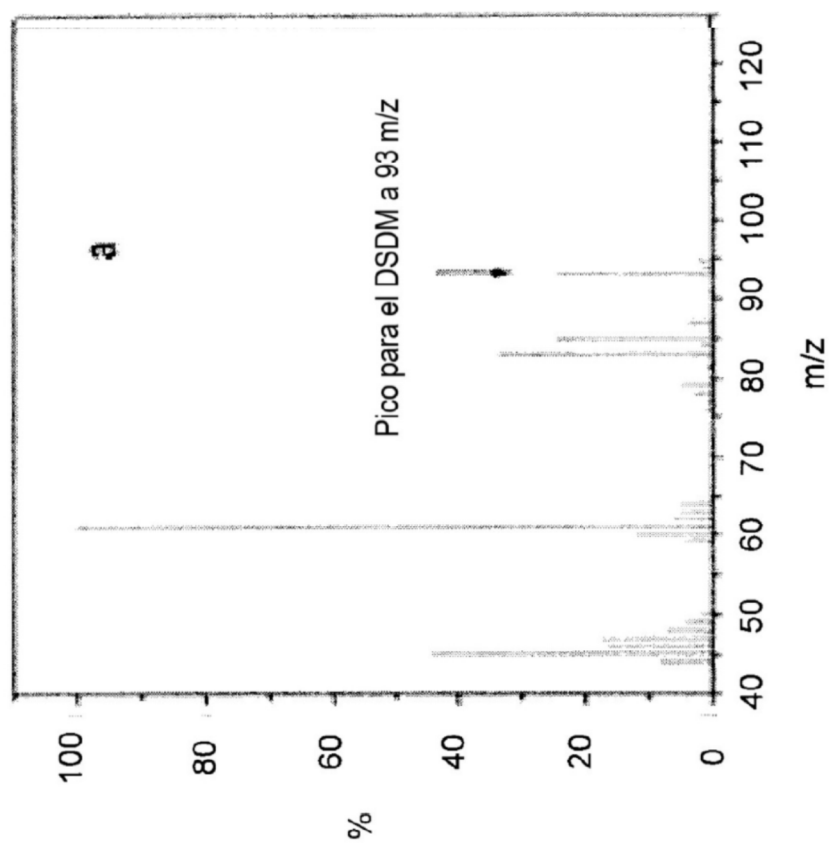


Figura 3a