

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 529 557**

21 Número de solicitud: 201331112

51 Int. Cl.:

**A01N 59/00** (2006.01)

**A01N 59/06** (2006.01)

**A01N 59/14** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION

B1

22 Fecha de presentación:

**23.07.2013**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**23.02.2015**

Fecha de la concesión:

**25.11.2015**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**02.12.2015**

56 Se remite a la solicitud internacional:

**PCT/ES2014/070595**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (100.0%)**

**Serrano, 117**

**28006 Madrid (Madrid) ES**

72 Inventor/es:

**MOYA CORRAL, José Serafín;**

**TORRECILLAS SAN MILLÁN, Ramón;**

**CABAL ÁLVAREZ, María Belén y**

**ÁLVAREZ DÍAZ, Eduardo**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO**

57 Resumen:

Procedimiento para la inhibición del crecimiento microbiano.

El objeto de la presente invención se refiere a un método para la inhibición del crecimiento microbiano en el cual se utiliza un vidrio con una composición en la cual se incluyen diversos óxidos de elementos tales como calcio, cinc, silicio y boro.

La invención hace referencia igualmente al uso de dicho procedimiento en la fabricación de envases, fármacos, dispositivos médicos, implantes quirúrgicos, tejidos, medios de transporte, instalaciones de aire o instalaciones de agua.

ES 2 529 557 B1

## PROCEDIMIENTO PARA LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO MICROBIANO

### DESCRIPCIÓN

#### SECTOR DE LA TÉCNICA

5 La presente invención está relacionada con un procedimiento para impedir el crecimiento de microorganismos mediante el empleo de materiales inorgánicos, y más concretamente de compuestos que incluyen boro.

Asimismo, la invención está relacionada con el uso de dicho procedimiento en la fabricación  
10 de envases, fármacos, dispositivos médicos, implantes quirúrgicos, tejidos, medios de transporte, instalaciones de aire o instalaciones de agua.

#### ESTADO DE LA TÉCNICA.

El empleo de vidrios con capacidad antimicrobiana es conocido. Así, existen numerosas  
15 referencias en el estado del arte que reivindican la capacidad antimicrobiana de vidrios de fosfato, conocidos como biovidrios [Munukka E, Leppäranta O, Korkeamäki M, Vaahtio M, Peltola T, Zhang D, Hupa L, Ylänen H, Salonen JI, Viljanen MK, Eerola E.J. Mater. Sci: Mater. Med. 19: 27-32 (2008)], [Patente EP1601623 de 11/04/2007]. La capacidad antimicrobiana estos vidrios se debe fundamentalmente al aumento del pH y de la presión  
20 osmótica del medio provocado por la lixiviación de iones de sodio, calcio, fosfato y silicato, si bien también es conocido el efecto perturbador que provoca la alta concentración de los iones alcalinos lixiviados en el potencial de membrana y que por tanto pueden tener consecuencias en la capacidad antimicrobiana de los biovidrios.

25 Por otro lado se ha descrito el uso biocida de vidrios sodocálcicos en los que la actividad biocida se asocia a la presencia en el vidrio de óxido de calcio (CaO)[patente ES2361695 de 27/04/2012]. En esta patente los inventores establecen un contenido mínimo del 10% en peso de CaO como requisito para que el vidrio presente actividad biocida. Asimismo la actividad biocida de este vidrio sodocalcico es atribuida a la interacción directa entre la  
30 partícula de vidrio y la membrana celular de la bacteria u hongo que produciría una interferencia, parcial o total, con el metabolismo de dicha bacteria u hongo.

Por otro lado, es conocido el uso de vidrios con propiedades antimicrobianas caracterizados por contener metales como cobre o plata ya sea en forma de sales [patente ES2190732 de

16/06/2004], [patente US6921546 de 26/07/2005], [solicitud de patente WO2005030665 de 07/04/2005] o como nanopartículas [Esteban-Tejeda L, Malpartida F, Esteban-Cubillo A, Pecharromán C, Moya JS Nanotechnology 25; 20(8):085103 (2009)], [Esteban-Tejeda L, Malpartida F, Esteban-Cubillo A, Pecharromán C, Moya JS, Nanotechnology 5 16;20(50):505701 (2009)]. La actividad en este tipo de vidrios viene atribuida a la presencia de estos elementos metálicos. Es sabido el uso de estos iones o nanopartículas metálicas como bactericidas, fungicidas y alguicidas.

10 Sin embargo no son conocidos vidrios con uso antimicrobiano cuya eficacia se pueda atribuir exclusivamente al óxido de cinc (ZnO).

### DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

15 Se ha desarrollado un método que permite la inhibición del crecimiento de microorganismos de una forma duradera mediante el empleo de un vidrio con una particular composición que incluye un contenido en óxido de cinc superior al 15%. A diferencia de los vidrios conocidos el vidrio empleado en la invención no requiere la presencia de metales como plata o cobre y no pertenece a la familia de vidrios de fosfato ni sodocálcicos.

20 En la presente invención se entiende por "vidrio" un material inorgánico amorfo y que por tanto no presenta fases cristalinas.

25 Por "biocida" se entiende cualquier sustancia sintética o de origen natural destinada a destruir, contrarrestar, neutralizar, impedir la acción o ejercer un control de otro tipo sobre cualquier organismo considerado nocivo para el hombre.

Por "bactericida" se entiende cualquier sustancia de origen natural o sintetizada que es capaz de destruir bacterias.

30 El objeto de la invención consiste de esta forma en un método para la inhibición del crecimiento microbiano caracterizado por el uso de un vidrio, en adelante vidrio de la invención, que no contiene fósforo y que incluye en su composición al menos óxido de silicio (SiO<sub>2</sub>), óxido de boro (B<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), óxido de cinc (ZnO) con un contenido en óxido de zinc superior a 15% en peso y óxido de calcio con un contenido inferior al 10% en peso.

Un aspecto preferente de la invención es la presencia en el vidrio empleado para la inhibición del crecimiento microbiano de la invención de un porcentaje de óxido de zinc inferior al 55% en peso.

- 5 Otro aspecto preferente es la presencia en el vidrio de la invención de un contenido en óxido de boro comprendido entre el 30 y 40% en peso.

El método de inhibición del crecimiento microbiano reivindicado en la invención puede ser aplicado siguiendo diferentes procedimientos. Así un aspecto preferente de la invención  
10 consiste en el empleo del vidrio de la invención en forma particulada, de fibra o de esfera. Un modo particular de realización consiste en la incorporación del vidrio de la invención como material de relleno en materiales poliméricos.

Asimismo, se ha comprobado el efecto biocida de recubrimientos realizados con el vidrio de  
15 la invención. Por ello, otro modo de realización particular lo constituye el empleo con fines biocidas de recubrimientos formados con el vidrio de la invención.

El método objeto de la invención puede ser empleado en diversas aplicaciones. De forma preferente este método para la inhibición del crecimiento microbiano puede aplicarse a  
20 envases, fármacos, dispositivos médicos, implantes quirúrgicos, tejidos, medios de transporte, instalaciones de aire o instalaciones de agua.

### **EJEMPLOS DE REALIZACIÓN**

Los siguientes ejemplos se presentan como guía adicional para el experto medio en la  
25 materia y en ningún caso deben considerarse como una limitación de la invención. En estos ejemplos se muestran resultados de ensayos realizados que ponen de manifiesto la especificidad y efectividad del vidrio biocida, así como de resinas en las que se introduce el vidrio como material de relleno y de recubrimientos realizados con el vidrio biocida.

#### **30 Ejemplo 1.- Ensayo de actividad biocida del vidrio de la invención en forma particulada**

Se preparó un vidrio de composición química (% peso): 4,97% de  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ; 5,38% de  $\text{Na}_2\text{O}$ ; 18,7% de  $\text{SiO}_2$ ; 0,10% de  $\text{K}_2\text{O}$ ; 0,17% de  $\text{TiO}_2$ ; 34,7% de  $\text{ZnO}$ ; 0,024% de  $\text{SrO}$ ; 33,2% de  $\text{B}_2\text{O}_3$ ; 0,45% de  $\text{CeO}_2$ ; 2,25% de  $\text{ZrO}_2$  y 0,056% de otros.

Para evaluar el efecto biocida del vidrio en su forma particulada se realizaron ensayos bactericidas frente a la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* DH10B. El valor de la eficacia antimicrobiana se determinó siguiendo el procedimiento descrito en la norma ASTM E2149. Este método está diseñado para determinar la actividad biocida en condiciones dinámicas. Asegura un buen contacto entre la bacteria y el material biocida mediante agitación constante de la muestra en una suspensión del microorganismo seleccionado durante un periodo de tiempo determinado. La actividad antimicrobiana se determina comparando el número de microorganismos viables en la suspensión, antes y después del tiempo de contacto estipulado.

El microorganismo se sembró utilizando placas Petri en medio sólido de Luria Bertani (LB) cuya composición es (%peso): Triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1% y agar 1.5%. Las placas se incubaron 18 horas a 37 °C. A continuación, colonias aisladas de las placas anteriores se inocularon en 1 mL de LB líquido y se cultivaron a 37°C durante 6 horas para obtener los precultivos a una densidad de entre  $10^7$  a  $10^8$  colonias viables por mililitro de cultivo. Paralelamente se preparó una suspensión de 200 mg/mL en agua del polvo de vidrio y se esterilizó durante 30 minutos a 125°C. Finalmente 10  $\mu$ L del precultivo se inoculó en 1 mL de LB. Por último, a este cultivo se añadió 75  $\mu$ L de la suspensión del vidrio a ensayar. Asimismo, se preparó como control el mismo medio en el que la cantidad de vidrio fue sustituida por un volumen equivalente de agua. Los distintos cultivos se incubaron en agitación horizontal, realizando extracciones cada 24 horas con el fin de proceder a titular los microorganismos sobrevivientes mediante plaqueo en medio LB sólido utilizando diluciones seriadas desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-8}$ .

Las muestras ensayadas mostraron una desinfección total a las 24 horas, presentado un logaritmo de reducción superior a 5. Esto significa una disminución del número de bacterias superior al 99.999% frente a la población inicial.

### **Ejemplo 2.-Ensayo de actividad biocida del vidrio de la invención aplicado como recubrimiento sobre aleaciones de titanio**

Los recubrimientos se llevaron a cabo con el vidrio biocida en forma particulada descrito en el ejemplo 1, sobre placas de la aleación de titanio Ti-6Al-4V, de dimensiones 12,5 x 8,3 x 1mm y con un 99,0% de pureza.

Para evaluar el efecto bactericida del polvo de vidrio se realizaron ensayos bactericidas frente a la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* DH10B. El valor de la eficacia antimicrobiana se determinó siguiendo el procedimiento descrito en la norma ISO 22196.

5

Esta norma ha sido adoptada a nivel internacional como norma de referencia para evaluar la eficacia antimicrobiana de superficies no porosas, cerámicas, plásticos, etc. Según esta norma, la actividad antimicrobiana se determina comparando los resultados obtenidos entre la superficie tratada y una superficie control, sin agente biocida (blanco), después de un periodo de incubación de 48 horas a 37°C, temperatura óptima para el crecimiento del microorganismo seleccionado.

La norma ISO 22196 define la actividad antimicrobiana de una superficie como la diferencia entre el número de bacterias en la muestra control (blanco, A) y el número de bacterias en la muestra tratada (B), según la ecuación:  $\log \eta = \log A - \log B$

15

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto la capacidad biocida del recubrimiento. A las 48 horas se alcanzó en todas las muestras biocidas ensayadas un logaritmo de reducción superior a 5. Esto significa una disminución del número de bacterias superior al 99.999% frente a la población inicial.

20

### **Ejemplo 3.- Ensayo de actividad biocida de un polímero el cual contiene el vidrio de la invención en forma particulada como material de relleno**

Como polímero se seleccionó un polímero termoplástico: poliuretano. Como material de relleno se seleccionó un vidrio en forma particulada similar al que se describe en el ejemplo 1. Se adicionó una carga en peso del vidrio biocida del 50%. El mezclado homogéneo de todos los integrantes de la formulación se realizó en caliente. Mediante una extrusora, la formulación se obtuvo en forma de hilos, los cuales fueron posteriormente procesados en forma de láminas mediante la utilización de una prensa hidráulica de platos calientes. De manera análoga se obtuvieron controles que sólo contienen el polímero sin aditivo biocida.

30

Para evaluar el efecto biocida del polvo de vidrio se realizaron ensayos bactericidas frente a la bacteria Gram-negativa *Escherichia coli* DH10B. El valor de la eficacia antimicrobiana se determinó siguiendo el procedimiento descrito en la norma ISO 22196. La norma indica que

el índice de eficacia bactericida debe ser superior a 2 para ser considerado como tal. En todos los casos estudiados el valor obtenido fue superior a 5. Esto significa una disminución del número de bacterias superior al 99.999% frente a la población inicial.

## REIVINDICACIONES

1. Método para la inhibición del crecimiento microbiano caracterizado por el uso de un vidrio que no contiene fósforo y que comprende, óxido de calcio en un contenido entre 0 y 10%, óxido de zinc en un contenido superior al 15% en peso, óxido de silicio y óxido de boro.
2. Método para la inhibición del crecimiento microbiano según la reivindicación 1, caracterizado porque el contenido en óxido de zinc del vidrio es inferior al 55% en peso.
3. Método para la inhibición del crecimiento microbiano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, caracterizado porque el contenido en óxido de boro del vidrio está comprendido entre 30 y 40% en peso.
4. Método para la inhibición del crecimiento microbiano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, caracterizado porque el vidrio se emplea en forma particulada, de fibra o de esfera.
5. Método para la inhibición del crecimiento microbiano según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, caracterizado porque el vidrio está incorporado como material de relleno en materiales poliméricos.
6. Método para la inhibición del crecimiento microbiano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado porque el vidrio forma parte de un recubrimiento.
7. Método para la inhibición del crecimiento microbiano según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la aplicación como biocida se selecciona entre envases, fármacos, dispositivos médicos, implantes quirúrgicos, tejidos, medios de transporte, instalaciones de aire o instalaciones de agua.