



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 677 155**

⑫ Número de solicitud: 201631733

⑮ Int. Cl.:

B01L 3/00 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)
A61B 8/00 (2006.01)



PATENTE DE INVENCIÓN

B1

⑬ Fecha de presentación:

30.12.2016

⑭ Fecha de publicación de la solicitud:

30.07.2018

Fecha de concesión:

29.04.2019

⑮ Fecha de publicación de la concesión:

08.05.2019

⑯ Se remite a la solicitud internacional:

PCT/ES2017/070869

⑬ Titular/es:

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA (45.0%)
Avda. Blasco Ibáñez, 13
46010 València (Valencia) ES;
FUNDACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN
HOSPITAL UNIVERSITARIO Y POLITÉCNICO LA
FE DE LA COMUNIDAD VALENCIANA (45.0%) y
FORSCHUNGVERBUND BERLIN (FVB) E.V. (10.0%)

⑭ Inventor/es:

MORAIS DE LIMA, Mauricio;
HEREDERO CALERO, Julián;
FERNÁNDEZ GONZÁLEZ, Pascual ;
CANTARERO SÁEZ, Andrés;
RAMÍREZ GALLEYMORE, Paula;
FERNÁNDEZ RIVERO, Marcelo Ernesto ;
GORDÓN SAHUQUILLO, Mónica y
VENTURA SANTOS, Paulo

⑯ Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

⑭ Título: **PORTA-CUPONES PARA BIOPELÍCULAS MICROBIANAS, SISTEMA Y REACTOR DE BIOPELÍCULAS QUE INCLUYE AL PORTA-CUPONES, Y MÉTODO PARA OPERAR EL REACTOR**

⑮ Resumen:

Porta-cupones para biopelículas microbianas, sistema y reactor de biopelículas que incluye al porta-cupones, y método para operar el reactor.

El porta-cupones (P) comprende un cuerpo alargado (1) con una porción extrema proximal (1a), de agarre, y una porción extrema distal (1b) fabricada de un material biocompatible y que incluye por lo menos una superficie diana (D) apta para el crecimiento de biopelículas microbianas, un transductor eléctrico (Z) y/o un sensor eléctrico dispuesto en la porción extrema distal (1b), y medios de suministro de electricidad conectados operativamente con el transductor eléctrico (Z) y/o un sensor eléctrico.

El sistema comprende al porta-cupones (P) de la presente invención y a un generador de energía eléctrica remoto.

El reactor (R) comprende al porta-cupones (P) de la presente invención.

El método está adaptado para operar un reactor de biopelículas (R) definido según la presente invención.

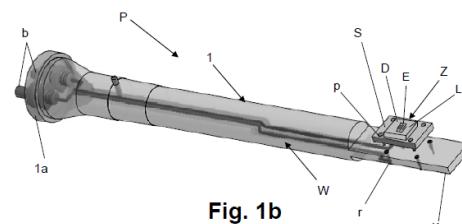


Fig. 1b

DESCRIPCIÓN

PORTE-CUPONES PARA BIOPELÍCULAS MICROBIANAS, SISTEMA Y REACTOR DE BIOPELÍCULAS QUE INCLUYE AL PORTA-CUPONES, Y MÉTODO PARA OPERAR EL REACTOR

5

Sector de la técnica

La presente invención concierne en general, en un primer aspecto, a un porta-cupones para biopelículas microbianas, y más particularmente a un porta-cupones que incluye un transductor eléctrico y/o un sensor eléctrico próximo(s) a una superficie diana apta para el crecimiento de biopelículas microbianas, y que posibilita el suministro de electricidad al transductor eléctrico y/o sensor eléctrico.

Un segundo aspecto de la presente invención concierne a un sistema que incluye al porta-cupones del primer aspecto.

Un tercer aspecto de la presente invención concierne a un reactor de biopelículas que comprende al porta-cupones del primer aspecto.

Un cuarto aspecto de la presente invención se refiere a un método para operar un reactor de biopelículas según el tercer aspecto de la invención.

Estado de la técnica anterior

Los dispositivos biomédicos son esenciales para prevenir y tratar un gran número de enfermedades, sin embargo, su utilización no está exenta de complicaciones y una de las más graves es la infección asociada a su uso. Este tipo de infecciones está relacionada con la capacidad de los microorganismos de colonizar la superficie de un biomaterial y formar en ella una comunidad microbiana compleja denominada “biofilm”, biocapa o biopelícula. En la actualidad, existen una gran cantidad de laboratorios y centros de investigación trabajando en el desarrollo de nuevas tecnologías que impidan la formación de la biopelícula microbiana sobre la superficie de distintos biomateriales.

El reactor de biopelículas CDC es un dispositivo cada vez más utilizado en la actualidad, dadas sus evidentes ventajas: posee una metodología estandarizada por la “American Society for Testing Materials”, permite integrar en cada ensayo múltiples variables como microorganismo, tiempo, biomaterial, fármaco, etc., y ha sido validado por el “Center for Disease Control de los Estados Unidos” (CDC) como método de elección para estudiar la interacción entre microorganismos y materiales. No obstante, el reactor de biopelículas CDC

posee ciertas limitaciones a la hora de realizar algunos estudios, en particular asociadas a los tipos de porta-cupones disponibles.

En este sentido, en el estado de la técnica son conocidos porta-cupones para biopelículas microbianas que reúnen las características del preámbulo de la reivindicación 1, es decir

- 5 que comprenden un cuerpo alargado con una porción extrema proximal, de agarre, y una porción extrema distal fabricada de un material biocompatible y que incluyen por menos una superficie diana apta para el crecimiento de biopelículas microbianas.

Todos los porta-cupones para biopelículas microbianas conocidos en el estado de la técnica, tanto los de los reactores CDC como los de otros sistemas, son claramente mejorables, ya

- 10 que constituyen meros elementos pasivos de soporte de los cupones, membranas o elementos equivalentes que incluyen a la superficie diana.

Aparece, por tanto, necesario ofrecer una alternativa al estado de la técnica que cubra las lagunas halladas en el mismo, mediante la provisión de un porta-cupones, y aspectos asociados, que mejore considerablemente a los conocidos, en particular por lo que se refiere

- 15 a las prestaciones a ofrecer, que vayan más allá de las relativas a ser meros soportes pasivos.

Explicación de la invención

Con tal fin, la presente invención concierne, en un primer aspecto, a un porta-cupones para biopelículas microbianas, que comprende, de manera en sí conocida, un cuerpo alargado

- 20 con una porción extrema proximal, de agarre, y una porción extrema distal fabricada de un material biocompatible y que incluye por lo menos una superficie diana apta para el crecimiento de biopelículas microbianas.

A diferencia de los porta-cupones conocidos en el estado de la técnica, el propuesto por el primer aspecto de la presente invención, de manera característica, comprende un

- 25 transductor eléctrico y/o un sensor eléctrico dispuesto en la mencionada porción extrema distal, y medios de suministro de electricidad conectados operativamente con el transductor eléctrico y/o el sensor eléctrico.

Si bien, de acuerdo a un ejemplo de realización, la citada superficie diana forma parte de un elemento en forma de disco conocido en el estado de la técnica como cupón, que se acopla

- 30 a un alojamiento definido en la porción extrema distal del cuerpo del porta-cupones, para otros ejemplos de realización tal superficie diana está constituida por otra clase de elemento, tal como una membrana, que se monta directamente sobre una región de la porción extrema distal del cuerpo del porta-cupones o que se encuentra fijada a la misma. En cualquier caso,

en el presente documento el término porta-cupones debe entenderse como un elemento portador de al menos una de tales superficies diana, independientemente que sea a través de un cupón, de una membrana u de otro elemento equivalente y adecuado para el mismo fin.

- 5 De acuerdo con un ejemplo de realización preferido, el porta-cupones del primer aspecto de la invención comprende el citado transductor eléctrico, el cual es un transductor electro-acústico, tal como un transductor interdigital que incluye un substrato de material piezoelectrónico (por ejemplo Niobato de Litio) y unos electrodos depositados sobre el mismo, configurado y dispuesto para emitir ondas acústicas superficiales (SAW) sobre la
- 10 mencionada superficie diana para la prevención de la formación de biopelículas microbianas sobre la misma o la erradicación de las mismas.

Para un ejemplo de realización, la superficie exterior del citado substrato piezo-eléctrico define la superficie diana.

- 15 Sin embargo, para otros ejemplos de realización, la superficie diana no es de material piezo-eléctrico, sino que se encuentra definida por la cara exterior de la porción extrema distal del cuerpo alargado, o por unos cupones, membranas o elementos equivalentes adosados, encajados o montados sobre tal porción extrema distal, próximos al transductor electro-acústico, en contacto o sin contacto con el mismo, por encima, por debajo o a un lado del mismo, según una disposición que permita que las ondas acústicas generadas se
- 20 propaguen por las regiones que no son piezo-eléctricas y que definen a la superficie diana.

En general, el transductor electro-acústico está configurado y dispuesto para emitir ondas acústicas superficiales con un valor de frecuencia dentro de un rango que va desde los miles de kHz hasta las decenas de GHz, preferentemente superior a 10 MHz, al recibir desde los medios de suministro de electricidad al menos dicha señal eléctrica determinada.

- 25 De acuerdo a un ejemplo de realización preferido, dicho valor de frecuencia está sustancialmente dentro de un rango de entre 33 y 37 MHz.

Ventajosamente, el transductor electro-acústico está configurado y dispuesto para emitir ondas acústicas superficiales con una potencia tal que se obtenga una densidad potencia de entre 4 y 6 mW/cm² sobre la superficie diana.

- 30 Para otro ejemplo de realización, el porta-cupones del primer aspecto de la presente invención comprende el citado sensor eléctrico (adicionalmente al transductor o de manera alternativa), el cual es un sensor electro-óptico o electro-químico, configurado y dispuesto para detectar biopelículas microbianas formadas sobre la superficie diana.

De acuerdo con otro ejemplo de realización, el porta-cupones comprende al citado transductor eléctrico o un transductor eléctrico adicional, el cual es un transductor electro-térmico (tal como una resistencia calefactora) configurado y dispuesto para emitir calor sobre dicha superficie diana. Es decir que, para el presente ejemplo de realización, el porta-5 cupones comprende, adicionalmente o de manera complementaria a la inclusión del citado transductor electro-acústico, un transductor electro-térmico.

Según un ejemplo de realización, los citados medios de suministro de electricidad comprenden unos conductores eléctricos que discurren por el cuerpo alargado desde su porción extrema proximal hasta su porción extrema distal, con unos primeros extremos 10 conectados a unos terminales eléctricos del sensor eléctrico y/o del transductor eléctrico y unos segundos extremos ubicados en la porción extrema proximal.

Ventajosamente, los citados conductores eléctricos discurren por el interior del cuerpo alargado, en su totalidad o durante gran parte de su longitud (al menos el 80 %), debidamente aislados tanto eléctricamente como frente a interferencias electromagnéticas, 15 en general, al estar constituidos mediante unos respectivos cables coaxiales. Alternativamente, los conductores eléctricos discurren por el exterior del cuerpo alargado, también debidamente aislados y protegidos.

Para un ejemplo de realización, el porta-cupones del primer aspecto de la presente invención comprende sendos bornes de conexión conectados eléctricamente con los 20 segundos extremos de los conductores eléctricos, dispuestos en la porción extrema proximal del cuerpo alargado y aptos para su conexión eléctrica con un generador de energía eléctrica remoto para recibir al menos una señal eléctrica desde el mismo.

Para otro ejemplo de realización, el porta-cupones del primer aspecto de la presente invención comprende un generador de energía eléctrica local dispuesto en la porción 25 extrema proximal del cuerpo alargado, y que comprende unos respectivos terminales de salida conectados a los segundos extremos de los conductores eléctricos, estando el generador de energía eléctrica local configurado para generar al menos una señal eléctrica y proporcionarla por sus respectivos terminales de salida.

Alternativamente, los citados medios de suministro de electricidad comprenden una unidad 30 eléctrica/electrónica local y una unidad eléctrica/electrónica remota comunicadas entre sí, vía cable o de manera inalámbrica, cooperando para generar al menos una señal eléctrica y proporcionarla por unos terminales de salida de la unidad eléctrica/electrónica local a unos terminales eléctricos del sensor eléctrico y/o del transductor eléctrico conectados a dicho terminales de salida.

De manera preferida, el porta-cupones del primer aspecto de la presente invención, está configurado y dimensionado para su montaje, de manera amovible, en un cabezal de un reactor de biopelículas, mediante su introducción en una abertura pasante del mismo de manera que la porción extrema distal y la porción extrema proximal de dicho cuerpo alargado permanezcan, respectivamente, dentro y fuera de un vaso del reactor de biopelículas sobre el que está colocado el cabezal.

5 De manera aún más preferida, el citado reactor de biopelículas es de tipo CDC. Diferentes modelos de tal reactor se encuentran definidos y comercializados por la compañía "BioSurface Technologies Corporation", tal como el modelo CBR-2203. La definición de tales 10 modelos hecha por tal compañía se incorpora en el presente documento como referencia, para, entre otros propósitos, definir las dimensiones y relaciones dimensionales de todos los elementos del reactor y, en particular, del porta-cupones de la presente invención, cuyas dimensiones son adecuadas para su uso en un reactor CDC.

15 Un segundo aspecto de la presente invención concierne a un sistema que comprende al porta-cupones del primer aspecto según el ejemplo de realización para el que éste comprende sendos bornes de conexión, y al citado generador de energía eléctrica remoto, el cual a su vez comprende unos respectivos terminales de salida conectados a los mencionados bornes de conexión, estando el generador de energía eléctrica remoto configurado para generar por lo menos una señal eléctrica y proporcionarla por sus 20 respectivos terminales de salida.

En un tercer aspecto, la presente invención concierne a un reactor de biopelículas, que comprende, de manera en sí conocida:

- un vaso para contener un medio de cultivo en agitación continua;
- unos porta-cupones para biopelículas microbianas, donde cada uno de ellos comprende un 25 cuerpo alargado con una porción extrema proximal, de agarre, y una porción extrema distal fabricada de un material biocompatible y que incluye al menos una superficie diana apta para el crecimiento de biopelículas microbianas; y
- un cabezal de soporte acoplable a la embocadura de dicho vaso, a modo de tapa, y que comprende unas aberturas pasantes para el paso y montaje, de manera amovible, de dichos 30 porta-cupones.

De manera característica, en el reactor de biopelículas propuesto por el tercer aspecto de la presente invención, como mínimo uno los citados porta-cupones es un porta-cupones definido según el primer aspecto de la invención.

De acuerdo a un ejemplo de realización preferido, el reactor de biopelículas del tercer aspecto de la presente invención es de tipo CDC.

La presente invención también concierne, en un cuarto aspecto, a un método para operar un reactor de biopelículas según el segundo aspecto, que comprende:

- 5 - introducir un medio de cultivo y un inóculo microbiano en el vaso del reactor de biopelículas;
- acoplar el cabezal de soporte a la embocadura del vaso, cerrándola;
- montar por lo menos un porta-cupones para biopelículas microbianas, definido según el primer aspecto de la presente invención, en el cabezal de soporte, previamente o tras 10 acoplar el cabezal de soporte en la embocadura del vaso;
- suministrar por lo menos una señal eléctrica al transductor eléctrico y/o sensor eléctrico dispuesto en la porción extrema distal del cuerpo alargado del porta-cupones;
- incubar el inóculo microbiano durante un tiempo determinado, sometido a agitación continua dentro del medio de cultivo, y manteniendo dicho suministro de dicha señal 15 eléctrica al transductor eléctrico y/o sensor eléctrico; e
- inspeccionar la superficie diana, por lo menos tras dicho tiempo determinado, con el fin de detectar posibles biopelículas microbianas sobre la misma.

Para un ejemplo de realización preferido, el método del cuarto aspecto de la presente invención comprende utilizar un porta-cupones con un transductor electro-acústico, y la 20 citada etapa de suministro de por lo menos una señal eléctrica comprende suministrar al transductor electro-acústico por lo menos una señal eléctrica determinada para hacer que el transductor emita ondas acústicas superficiales sobre la superficie diana para la prevención de la formación de biopelículas microbianas sobre la misma o la erradicación de las mismas.

En general, la citada señal eléctrica determinada es una señal alterna configurada para 25 hacer que el transductor electro-acústico emita ondas acústicas superficiales dentro de un rango que va desde los miles de kHz hasta las decenas de GHz, preferentemente superior a 10 MHz.

De acuerdo a un ejemplo de realización preferido, la señal alterna está configurada para hacer que el transductor electro-acústico emita ondas acústicas superficiales con un valor de 30 frecuencia sustancialmente dentro de un rango de entre 33 y 37 MHz.

Ventajosamente, la señal eléctrica determinada es una señal alterna configurada para hacer que el transductor electro-acústico emita ondas acústicas superficiales con una potencia tal que se obtenga una densidad potencia de entre 4 y 6 mW/cm² sobre la superficie diana, preferentemente de sustancialmente 4,9 mW/cm².

- 5 Otros rangos de frecuencia, diferentes a los anteriormente indicados como preferidos, así como otros valores de densidad de potencia, también se encuentran cubiertos por la presente invención (en sus cuatro aspectos), para otros ejemplos de realización, adaptándose éstos al tipo de transductor utilizado. Por ejemplo, para el caso de que éste sea un transductor interdigital, el rango de frecuencias dependerá del material del substrato
- 10 piezoeléctrico, de su geometría y dimensiones y de la geometría y disposición de los electrodos sobre el mismo. A mayor número de dedos de los electrodos en forma de peine el rango de frecuencias será más estrecho, lo que hará que se necesite una densidad de potencia menor para generar el mismo efecto de prevención/erradicación de biopelículas microbianas. El límite superior del rango de frecuencias de trabajo está dado por la
- 15 capacidad de disponer sobre el substrato piezoeléctrico electrodos con separación entre los dedos suficientemente pequeña.

En cualquier caso, de acuerdo con la presente invención, la densidad de potencia será la suficiente para prevenir/erradicar la formación de biopelículas microbianas.

- De acuerdo a un ejemplo de realización, el citado inóculo microbiano incluye por lo menos
- 20 un aislado clínico de *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, o de una combinación de los mismos.

- De acuerdo a un ejemplo de realización, el volumen de reacción, medio de cultivo más inóculo microbiano, es tal que no llega a cubrir la superficie diana, generando un ambiente de cámara húmeda contaminada dentro del vaso del reactor de biopelículas, aunque el
- 25 método del cuarto aspecto de la presente invención también es válido para el caso de que la superficie diana esté inmersa en el volumen de reacción.

- Por lo que se refiere, al citado tiempo determinado, éste está dentro de un rango de varias horas hasta varios días, siendo el necesario para que se formasen biopelículas en superficies que no estuviesen sometidas a los efectos del transductor y/o sensor eléctrico, y
- 30 estará en función del tipo de bacterias y de las condiciones empleadas.

Breve descripción de los dibujos

Las anteriores y otras ventajas y características se comprenderán más plenamente a partir de la siguiente descripción detallada de unos ejemplos de realización con referencia a los dibujos adjuntos, que deben tomarse a título ilustrativo y no limitativo, en los que:

5 Las Figuras 1a y 1b son dos vistas en perspectiva, tomadas desde abajo y desde arriba, respectivamente, del porta-cupones del primer aspecto de la presente invención, para un ejemplo de realización;

La Figura 2 muestra, de manera esquemática, un ejemplo de realización del porta-cupones y del reactor de biopelículas propuestos por la presente invención, donde los conductores eléctricos han sido dibujados mediante líneas discontinuas;

10 La Figura 3 muestra, de manera esquemática, al reactor de biopelículas propuesto por la presente invención, para un ejemplo de realización para el que incluye a dos porta-cupones definidos según el primer aspecto de la presente invención, solamente al transductor de uno de los cuales se le ha suministrado electricidad, durante un ensayo experimental;

15 Las Figuras 4, 5 y 6 son unas gráficas que muestran los resultados obtenidos mediante el citado ensayo experimental, en términos de cuantificación de células viables de *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, respectivamente.

Las Figuras 7a a 7d son unas gráficas que muestran la conversión de energía eléctrica en ondas acústicas superficiales en función de la frecuencia aplicada al transductor del porta-cupones del primer aspecto de la presente invención, para un ejemplo de realización, 20 durante un proceso de montaje, esterilización, funcionamiento y finalización del ensayo experimental.

Descripción detallada de unos ejemplos de realización

En las Figuras 1a, 1b y 2, se ilustra el porta-cupones P para biopelículas microbianas, para unos ejemplos de realización, para el que el porta-cupones P comprende un cuerpo 25 alargado 1 con una porción extrema proximal 1a, de agarre, y una porción extrema distal 1b fabricada de un material biocompatible y que incluye como mínimo una superficie diana D apta para el crecimiento de biopelículas microbianas, así como un transductor electro-acústico Z, configurado y dispuesto para emitir ondas acústicas superficiales sobre la superficie diana D para la prevención de la formación de biopelículas microbianas sobre la 30 misma o la erradicación de las mismas, y medios de suministro de electricidad que comprenden unos conductores eléctricos W que discurren por dentro del cuerpo alargado 1 desde la porción extrema proximal 1a hasta la porción extrema distal 1b, con unos primeros

extremos conectados a unos terminales eléctricos del transductor eléctrico Z (conexión no ilustrada) y unos segundos extremos ubicados en la porción extrema proximal 1a.

En las Figuras 1a, 1b y 2, la superficie diana D se ha indicado como definida por parte del propio transductor Z. Ello es así porque en tal caso, el transductor Z es un transductor 5 interdigital que comprende unos electrodos metálicos E en forma de peine, entrelazados, depositados sobre un substrato piezo-eléctrico L, cuya superficie exterior define la mencionada superficie diana D.

Para la realización ilustrada en las Figuras 1a, 1b y 2, el transductor Z se encuentra montado (mediante los tornillos T para la realización de la Figura 2) sobre una placa aislante 10 de soporte S, por ejemplo de Nylon.

Los presentes inventores han fabricado un prototipo del porta-cupones P del primer aspecto de la presente invención según el diseño de las Figuras 1a y 1b, donde el cuerpo alargado 1 ha sido fabricado en Nylon (aunque diversos materiales pueden ser utilizados, como por ejemplo el PET o el acero inoxidable) y que posee las mismas dimensiones externas que un 15 porta-cupones estándar para un reactor de biopelículas CDC, en particular según el modelo CBR-2203 de “BioSurface Technologies Corporation”.

Tal y como se aprecia en las Figuras 1a y 1b (y de manera más esquemática, en la Figura 2), en la parte superior, el porta-cupones P posee dos bornes b del tipo SMA o BNC que permiten la conexión eléctrica con un equipo externo. Los bornes de conexión b están 20 conectados eléctricamente con los segundos extremos de los conductores eléctricos W y son aptos para su conexión eléctrica con un generador de energía eléctrica remoto (no ilustrado) para recibir la señal o señales eléctricas desde el mismo. Los conductores eléctricos W en general están constituidos por sendos cables coaxiales que permiten la transmisión de señales eléctricas alternas de alta frecuencia con baja atenuación y reducido 25 ruido, y recorren el eje central del porta-cupones P llevando la corriente eléctrica desde los bornes superiores b hasta unos bornes inferiores r.

Tal y como se ha indicado anteriormente, en la porción extrema distal 1b del cuerpo alargado 1, una placa aislante de soporte S, por ejemplo de Nylon, se acopla a los bornes inferiores r del porta-cupones P mediante cuatro contactos metálicos p fabricados, por 30 ejemplo, en oro. Sobre esta placa aislante de soporte S se monta (por ejemplo mediante unos tornillos de plástico T, ver Figura 2) el transductor o transductores Z, en general de tipo interdigital, conectándose eléctricamente (conexión no ilustrada) a los bornes inferiores r, en general a través de al menos parte de los contactos metálicos p. La corriente eléctrica suministrada por el generador remoto accede así a la superficie del transductor o

transductores Z desde los bornes inferiores r, pasando a través de los contactos p y de varios filamentos metálicos (no ilustrados), por ejemplo de aluminio, oro, plata o cobre.

El prototipo de porta-cupones P fabricado por los presentes inventores puede ser utilizado en cualquier unidad de reactor de biopelículas de tipo CDC estándar, y permite llevar 5 electricidad hasta el biomaterial en estudio. El diseño presentado está adaptado para estudiar concretamente el efecto de las ondas acústicas superficiales (SAWs) generadas sobre la superficie de un material piezoeléctrico, es decir el substrato piezoeléctrico L del transductor Z, y sus posibles beneficios en la erradicación de la biopelícula microbiana.

En su diseño y fabricación se han tenido en cuenta las siguientes ideas fundamentales:

- 10 2) Debe soportar la esterilización mediante autoclave a 121°C, 20 minutos.
- 3) Debe tener las mismas dimensiones que el porta-cupones estándar de manera tal que el nuevo porta-cupones modificado pueda ser utilizado en cualquier unidad de reactor de biopelículas de tipo CDC
- 15 4) Debe ser capaz de transmitir un impulso eléctrico desde un generador externo hasta la superficie del biomaterial en estudio.

En la Figura 2 se ilustra esquemáticamente también al reactor de biopelículas CDC que incluye al porta-cupones P, de acuerdo a un ejemplo de realización, para el que el reactor R comprende:

- un vaso V para contener un medio de cultivo en agitación continua;

20 - un cabezal de soporte H acoplado a la embocadura del vaso V, a modo de tapa, y que comprende unas aberturas pasantes Ap para el paso y montaje, de manera amovible, de unos porta-cupones P; y

25 - un porta-cupones P para biopelículas microbianas, definido según se ha explicado anteriormente, y montado, de manera amovible, en el cabezal H, mediante su introducción en una de las aberturas pasantes Ap del mismo de manera que la porción extrema distal 1b y la porción extrema proximal 1a del cuerpo alargado 1 permanezcan, respectivamente, dentro y fuera del vaso V del reactor de biopelículas R sobre el que está colocado el cabezal H.

Ensayo experimental:

Los presentes inventores realizaron un ensayo experimental con el porta-cupones P y reactor R de la presente invención, aplicando también el método de la presente invención, según se describe a continuación:

- 5 Para el ensayo se equipó una unidad de reactor de biopelículas CDC con dos porta-cupones estándar, cargados con obleas control de titanio y teflón (no ilustradas) que definen respectivas superficies diana para el crecimiento de biopelículas, y dos porta-cupones definidos según el primer aspecto de la presente invención cargados con obleas A, B de Niobato de Litio que conforman unos respectivos substratos piezoeléctricos L (de unos 10 respectivos transductores Z) que definen respectivas superficies diana D. Se realizaron pruebas de generación de ondas acústicas superficiales antes de la esterilización y después de la esterilización, con resultados positivos. El transductor electro-acústico Z de una de las obleas de Niobato de litio, en particular de la identificada en la Figura 3 como B, permaneció desconectado durante todo el experimento, como control, mientras que el transductor Z del 15 resto de obleas, en particular de la oblea A en la Figura 3, se mantuvo alimentado eléctricamente durante todo el ensayo.

El ensayo se realizó utilizando aislados clínicos de *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, los cuales fueron caracterizados previamente y clasificados como fuertemente formadores de biopelícula, según la tinción de cristal violeta 20 en placas de 96 pocillos.

Se añadieron 50ml de medio de cultivo al CDC Biofilm Reactor y 1ml del inóculo microbiano que aportó un total de 108 ufc/ml. Tal y como se ilustra esquemáticamente en la Figura 3, en esta situación, el nivel Lv del volumen de reacción V fue tal que no llegó a cubrir las obleas A, B, generando un ambiente de cámara húmeda contaminada.

- 25 Se ajustó la frecuencia del transductor Z (no ilustrado en la Figura 3) de la Oblea A en un rango entre 33 y 37 MHz y una amplitud de 20 dBm y se mantuvo en esta situación durante 24 horas, manteniendo el volumen de reacción en agitación continua mediante el agitador S.

Tras las 24 horas de incubación en el reactor R de biopelículas CDC, se extrajeron las obleas A y B y se sometieron a un procedimiento de agitación vorticial a 2500 rpm y 30 sonicación a 50 kHz para liberar la biopelícula. Se determinó el número de células viables adheridas a la superficie de las obleas A, B y los biomateriales control mediante un cultivo cuantificado del caldo tras sonicación en agar BHI. Este procedimiento de cultivo tras sonicación es un protocolo estándar en microbiología clínica para el estudio de las

infecciones relacionadas con dispositivos biomédicos como prótesis, catéteres, etc. Este protocolo permite liberar las células adheridas a una superficie y recogerlas en un medio líquido para después, mediante cultivo microbiológico cuantitativo, proceder a determinar el número de las mismas que se encontraba presente sobre la superficie.

- 5 En las Figuras 4, 5 y 6, en conjunción con las tablas 1, 2 y 3 asociadas a las mismas, que se incluyen a continuación, se pueden observar el recuento de células viables de *C. albicans*, *P. aeruginosa* y *S. aureus* respectivamente, presentes sobre la superficie de los biomateriales control (titánio y PTFE), del transductor conectado (Oblea A) y del transductor desconectado (Oblea B).

10

Tabla 1 (relativa a la Figura 4):

| Biomaterial | Recuento (ufc/cm ²) | Recuento (log ufc/cm ²) |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| TITANIO | 951 | 2,98 |
| TEFLON | 618 | 2,79 |
| OBLEA A | 0 | 0,00 |
| OBLEA B | 1471 | 3,17 |

Tabla 2 (relativa a la Figura 5):

| Biomaterial | Recuento (ufc/cm ²) | Recuento (log ufc/cm ²) |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| TITANIO | 2705882 | 6,43 |
| TEFLON | 2098039 | 6,32 |
| OBLEA A | 0 | 0,00 |
| OBLEA B | 3019608 | 6,48 |

Tabla 3 (relativa a la Figura 6):

| Biomaterial | Recuento (ufc/cm ²) | Recuento (log ufc/cm ²) |
|----------------|---------------------------------|-------------------------------------|
| TITANIO | 313725 | 5,50 |
| TEFLON | 7255 | 3,86 |
| OBLEA A | 0 | 0,00 |
| OBLEA B | 7059 | 3,85 |

15

Observando las tablas 1, 2 y 3, y las Figuras 4, 5 y 6, puede afirmarse que los resultados obtenidos demuestran claramente que la implementación de la presente invención en el ensayo experimental aquí descrito, ha sido capaz de prevenir la colonización de la superficie de la oblea A con una eficacia del 100% utilizando un rango de frecuencias entre 33 y 35

- 5 MHz y una amplitud de 20 dbm. El transductor Z ha sido eficaz en la prevención de la colonización por parte de tres microorganismos distintos: un hongo (*Candida albicans*), una bacteria gram positiva (*Staphylococcus aureus*) y una gram negativa (*Pseudomonas aeruginosa*).

Finalmente, en las gráficas de las Figuras 7a a 7d se puede observar la conversión de 10 energía eléctrica en ondas acústicas superficiales en función de la frecuencia aplicada al transductor Z. El óptimo operativo se situó entre 33 y 37 MHz, valor que no sufrió cambios significativos durante el proceso de montaje (Figura 7a), esterilización en autoclave (Figura 7b), funcionamiento (Figura 7c) y finalización del ensayo experimental a las 24 horas (Figura 7d).

- 15 Se repitió el ensayo experimental para otros tiempos de incubación, en particular para 48 y 72 horas, ofreciendo en ambos casos también unos resultados positivos (no ilustrados).

Un experto en la materia podría introducir cambios y modificaciones en los ejemplos de realización descritos sin salirse del alcance de la invención según está definido en las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

- 1.- Porta-cupones (P) para biopelículas microbianas, que comprende un cuerpo alargado (1) con una porción extrema proximal (1a), de agarre, y una porción extrema distal (1b) fabricada de un material biocompatible y que incluye al menos una superficie diana (D) apta para el crecimiento de biopelículas microbianas, **caracterizado** porque comprende un transductor eléctrico (Z) y/o un sensor eléctrico dispuesto en dicha porción extrema distal (1b), y medios de suministro de electricidad conectados operativamente con dicho transductor eléctrico (Z) y/o dicho sensor eléctrico.
- 5 2.- Porta-cupones (P) según la reivindicación 1, que comprende dicho transductor eléctrico (Z), el cual es un transductor electro-acústico, configurado y dispuesto para emitir ondas acústicas superficiales sobre dicha superficie diana (D) para la prevención de la formación de biopelículas microbianas sobre la misma o la erradicación de las mismas.
- 10 3.- Porta-cupones (P) según la reivindicación 2, en el que dicho transductor electro-acústico (Z) está configurado y dispuesto para emitir ondas acústicas superficiales con un valor de frecuencia dentro de un rango que va desde los miles de kHz hasta las decenas de GHz, al recibir desde dichos medios de suministro de electricidad al menos una señal eléctrica determinada.
- 15 4.- Porta-cupones (P) según la reivindicación 3, en el que dicho transductor electro-acústico (Z) está configurado y dispuesto para emitir ondas acústicas superficiales con un valor de frecuencia superior a 10 MHz, al recibir desde los medios de suministro de electricidad al menos dicha señal eléctrica determinada.
- 20 5.- Porta-cupones (P) según la reivindicación 4, en el que dicho transductor electro-acústico (Z) está configurado y dispuesto para emitir ondas acústicas superficiales con un valor de frecuencia sustancialmente dentro de un rango de entre 33 y 37 MHz, al recibir desde dichos medios de suministro de electricidad al menos una señal eléctrica determinada.
- 25 6.- Porta-cupones (P) según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en el que dicho transductor electro-acústico (Z) está configurado y dispuesto para emitir ondas acústicas superficiales con una potencia tal que se obtenga una densidad potencia de entre 4 y 6 mW/cm² sobre la superficie diana (D).
- 30 7.- Porta-cupones (P) según una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 6, en el que el transductor electro-acústico (Z) es un transductor interdigital que comprende unos electrodos metálicos (E) en forma de peine, entrelazados, depositados sobre un substrato piezo-eléctrico (L) cuya superficie exterior define dicha superficie diana (D).

- 8.- Porta-cupones (P) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende dicho sensor eléctrico, el cual es un sensor electro-óptico o electro-químico, configurado y dispuesto para detectar biopelículas microbianas formadas sobre la superficie diana (D).
- 5 9.- Porta-cupones (P) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende dicho transductor eléctrico (Z) o un transductor eléctrico adicional, el cual es un transductor electro-térmico configurado y dispuesto para emitir calor sobre dicha superficie diana (D).
- 10 10.- Porta-cupones (P) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dichos medios de suministro de electricidad comprenden unos conductores eléctricos (W) que discurren por dicho cuerpo alargado (1) desde dicha porción extrema proximal (1a) hasta dicha porción extrema distal (1b), con unos primeros extremos conectados a unos terminales eléctricos de dicho sensor eléctrico y/o de dicho transductor eléctrico (Z) y unos segundos extremos ubicados en la porción extrema proximal (1a).
- 15 11.- Porta-cupones (P) según la reivindicación 10, que comprende sendos bornes de conexión (b) conectados eléctricamente con dichos segundos extremos de dichos conductores eléctricos (W), dispuestos en la porción extrema proximal (1a) del cuerpo alargado (1) y aptos para su conexión eléctrica con un generador de energía eléctrica remoto para recibir al menos una señal eléctrica desde el mismo.
- 20 12.- Porta-cupones (P) según la reivindicación 10, que comprende un generador de energía eléctrica local dispuesto en la porción extrema proximal (1a) del cuerpo alargado (1), y que comprende unos respectivos terminales de salida conectados a dichos segundos extremos de dichos conductores eléctricos (W), estando dicho generador de energía eléctrica local configurado para generar al menos una señal eléctrica y proporcionarla por dichos respectivos terminales de salida.
- 25 13.- Porta-cupones (P) según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, configurado y dimensionado para su montaje, de manera amovible, en un cabezal (H) de un reactor de biopelículas (R), mediante su introducción en una abertura pasante (Ap) del mismo de manera que la porción extrema distal (1b) y la porción extrema proximal (1a) de dicho cuerpo alargado (1) permanezcan, respectivamente, dentro y fuera de un vaso (V) del reactor de biopelículas (R) sobre el que está colocado el cabezal (H).
- 30 14.- Porta-cupones (P) según la reivindicación 13, en el que dicho reactor de biopelículas (R) es de tipo CDC.

15.- Sistema, que comprende al porta-cupones (P) según la reivindicación 11 y a dicho generador de energía eléctrica remoto, el cual a su vez comprende unos respectivos terminales de salida conectados a dichos bornes de conexión (b), estando dicho generador de energía eléctrica remoto configurado para generar al menos una señal eléctrica y 5 proporcionarla por dichos respectivos terminales de salida.

16.- Reactor de biopelículas (R), que comprende:

- un vaso (V) para contener un medio de cultivo en agitación continua;
- unos porta-cupones (P) para biopelículas microbianas, donde cada uno de ellos comprende un cuerpo alargado (1) con una porción extrema proximal (1a), de agarre, y una 10 porción extrema distal (1b) fabricada de un material biocompatible y que incluye al menos una superficie diana (D) apta para el crecimiento de biopelículas microbianas; y
- un cabezal de soporte (H) acoplable a la embocadura de dicho vaso (V), a modo de tapa, y que comprende unas aberturas pasantes (Ap) para el paso y montaje, de manera amovible, de dichos porta-cupones (P);

15 **caracterizado** porque al menos uno de dichos porta-cupones (P) es un porta-cupones definido según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14.

17.- Reactor de biopelículas (R) según la reivindicación 16, donde el reactor (R) es de tipo CDC.

18.- Método para operar un reactor de biopelículas (R) según la reivindicación 16 ó 17, que 20 comprende:

- introducir un medio de cultivo y un inóculo microbiano en el vaso (V) del reactor de biopelículas (R);
- acoplar el cabezal de soporte (H) a la embocadura del vaso (V), cerrándola,
- montar al menos un porta-cupones (P) para biopelículas microbianas definido según una 25 cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el cabezal de soporte (H), previamente o tras acoplar el cabezal de soporte (H) en la embocadura del vaso (V);
- suministrar al menos una señal eléctrica al transductor eléctrico (Z) y/o sensor eléctrico dispuesto en la porción extrema distal (1b) del cuerpo alargado (1) del porta-cupones (P);
- incubar el inóculo microbiano durante un tiempo determinado, sometido a agitación 30 continua dentro del medio de cultivo, y manteniendo dicho suministro de dicha al menos una señal eléctrica al transductor eléctrico (Z) y/o sensor eléctrico; e

- inspeccionar la superficie diana (D), al menos tras dicho tiempo determinado, con el fin de detectar posibles biopelículas microbianas sobre la misma.
- 19.- Método según la reivindicación 18, que comprende utilizar un porta-cupones (P) con un transductor electro-acústico (Z), y en el que dicha etapa de suministro de al menos una señal eléctrica comprende suministrar a dicho transductor electro-acústico (Z) al menos una señal eléctrica determinada para hacer que el transductor electro-acústico (Z) emita ondas acústicas superficiales sobre la superficie diana (D) para la prevención de la formación de biopelículas microbianas sobre la misma o la erradicación de las mismas.
- 10 20.- Método según la reivindicación 19, en el que dicha señal eléctrica determinada es una señal alterna configurada para hacer que el transductor electro-acústico (Z) emita ondas acústicas superficiales con un valor de frecuencia dentro de un rango que va desde los miles de kHz hasta las decenas de GHz.
- 15 21.- Método según la reivindicación 20, en el que dicha señal alterna está configurada para hacer que el transductor electro-acústico (Z) emita ondas acústicas superficiales con un valor de frecuencia superior a 10 MHz.
- 22.- Método según la reivindicación 21, en el que dicha señal alterna está configurada para hacer que el transductor electro-acústico (Z) emita ondas acústicas superficiales con un valor de frecuencia sustancialmente dentro de un rango de entre 33 y 37 MHz.
- 20 23.- Método según la reivindicación 22, en el que la señal eléctrica determinada es una señal alterna configurada para hacer que el transductor electro-acústico (Z) emita ondas acústicas superficiales con una potencia tal que se obtenga una densidad de potencia de entre 4 y 6 mW/cm² sobre la superficie diana (D).
- 25 24.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 23, en el que dicho inóculo microbiano incluye al menos un aislado clínico de *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*, o de una combinación de los mismos.
- 25 26.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 24, en el que volumen de reacción, medio de cultivo más inóculo microbiano, es tal que no llega a cubrir la superficie diana (D), generando un ambiente de cámara húmeda contaminada dentro del vaso (V) del reactor de biopelículas (R).
- 30 26.- Método según una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 25, en dicho tiempo determinado está dentro de un rango que va desde varias horas hasta varios días.

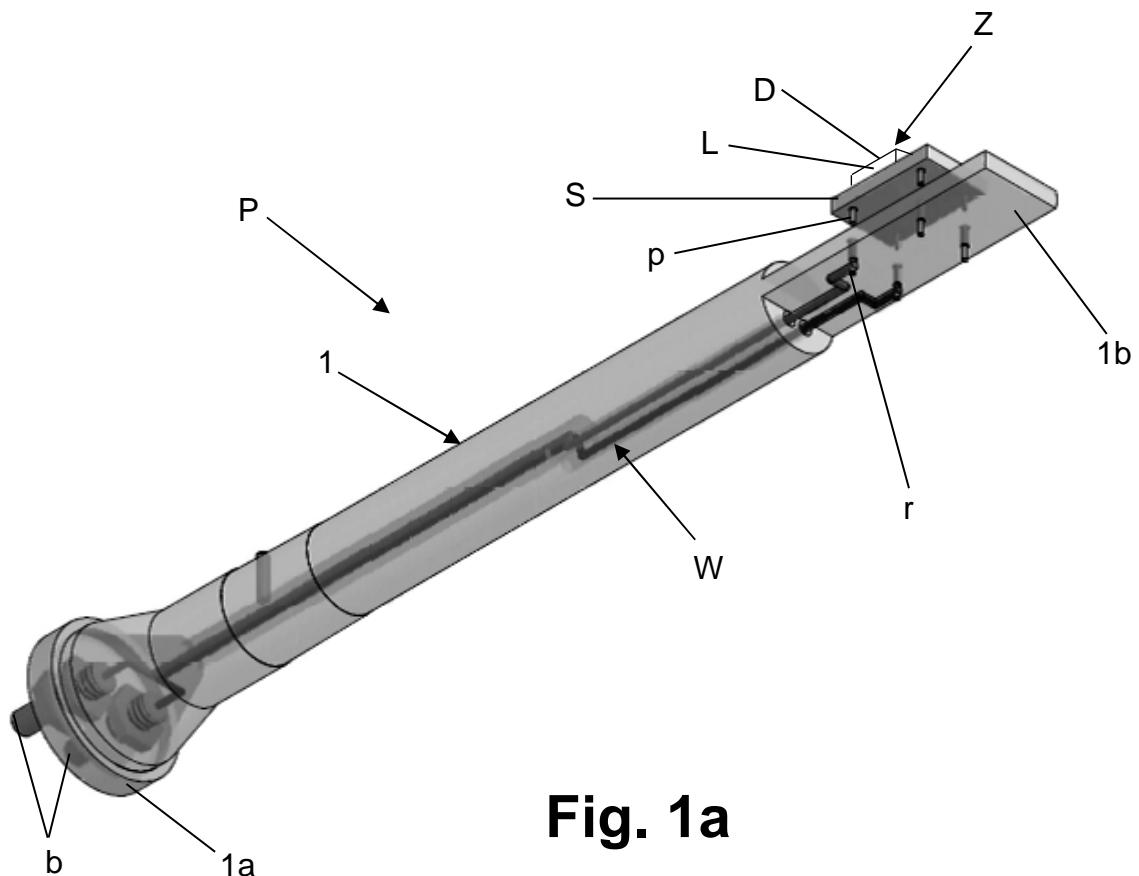


Fig. 1a

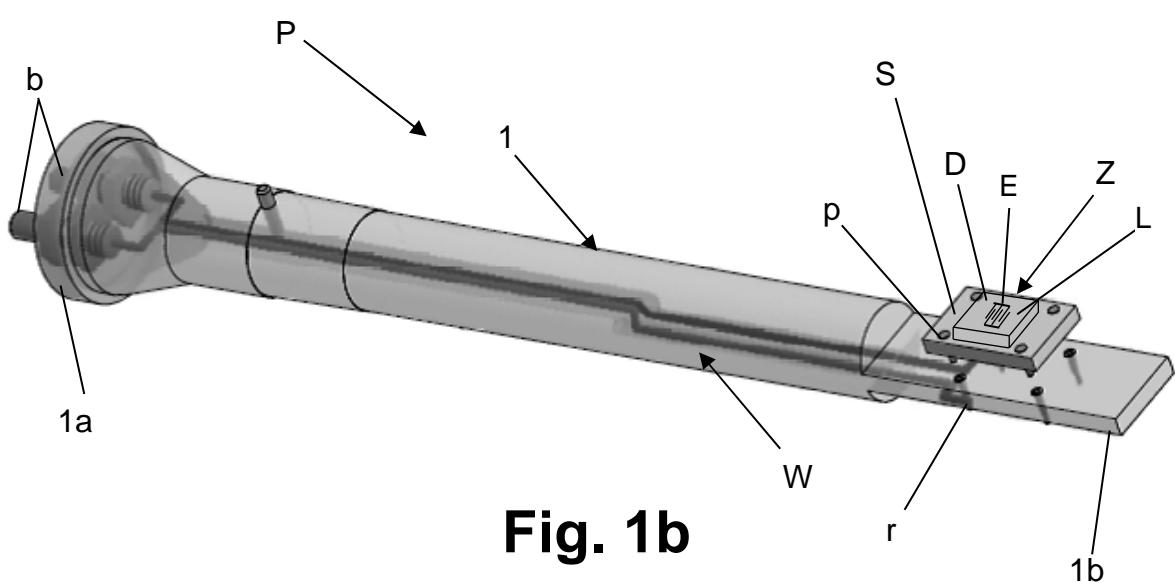


Fig. 1b

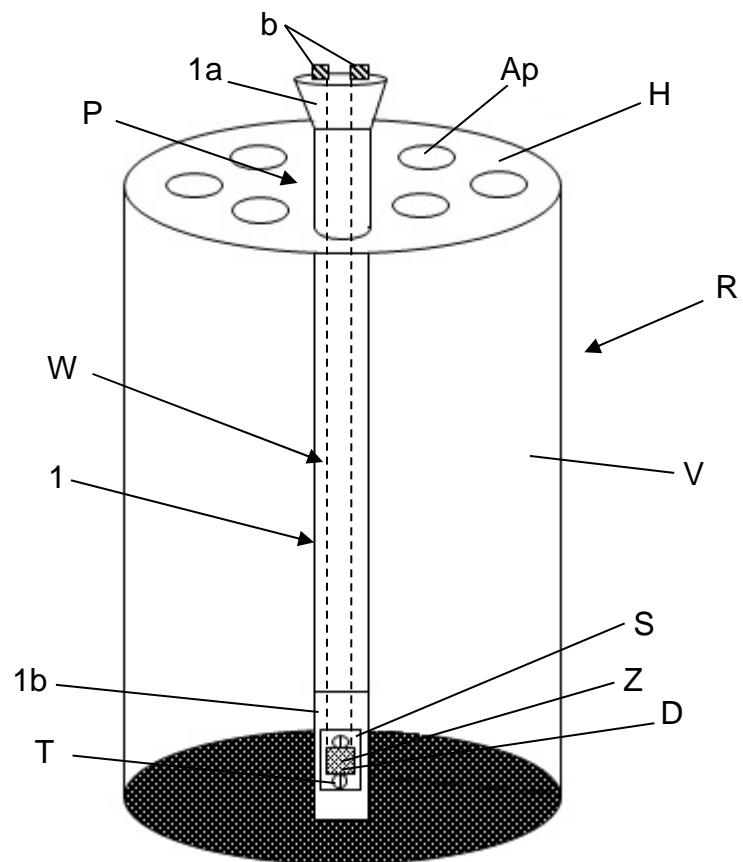


Fig. 2

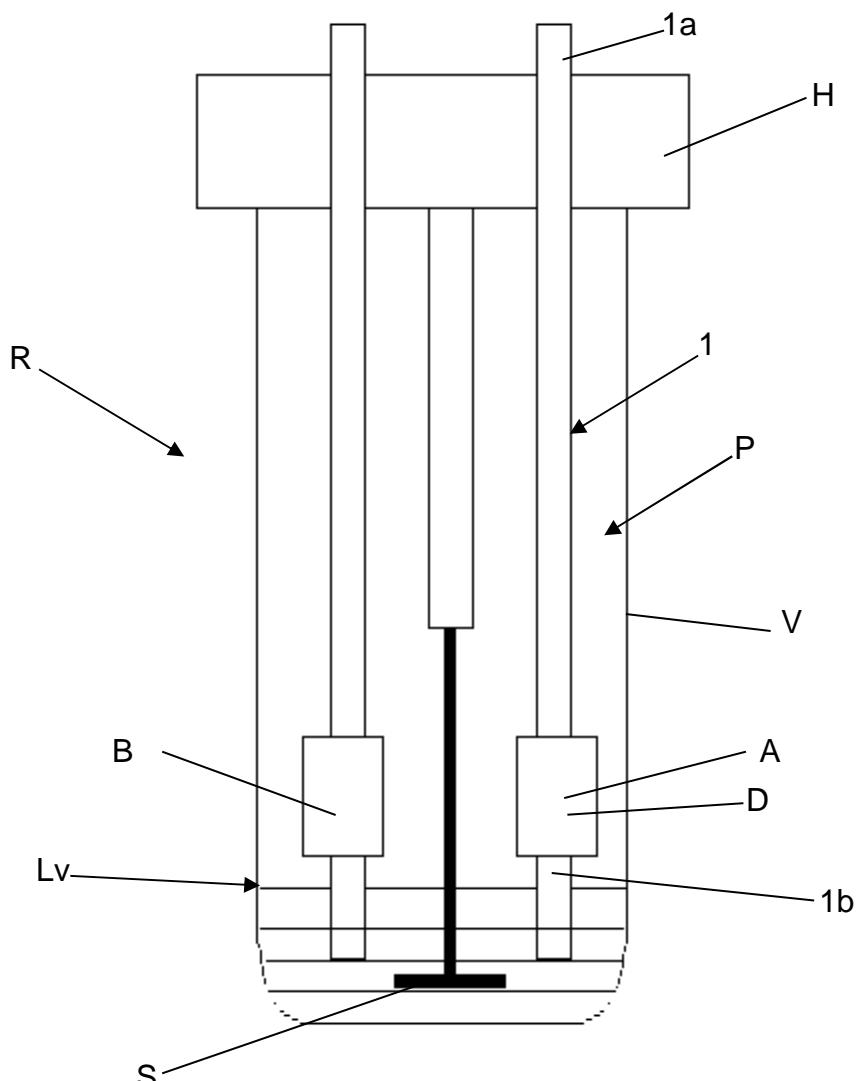


Fig. 3

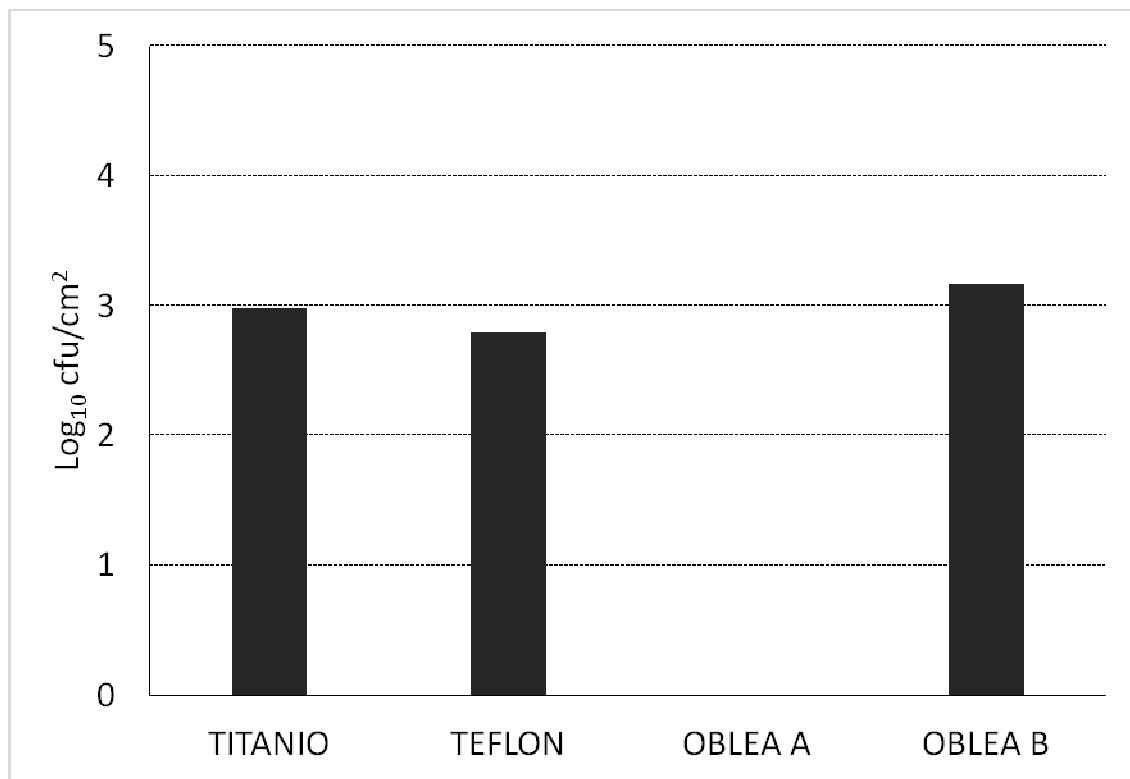


Fig. 4

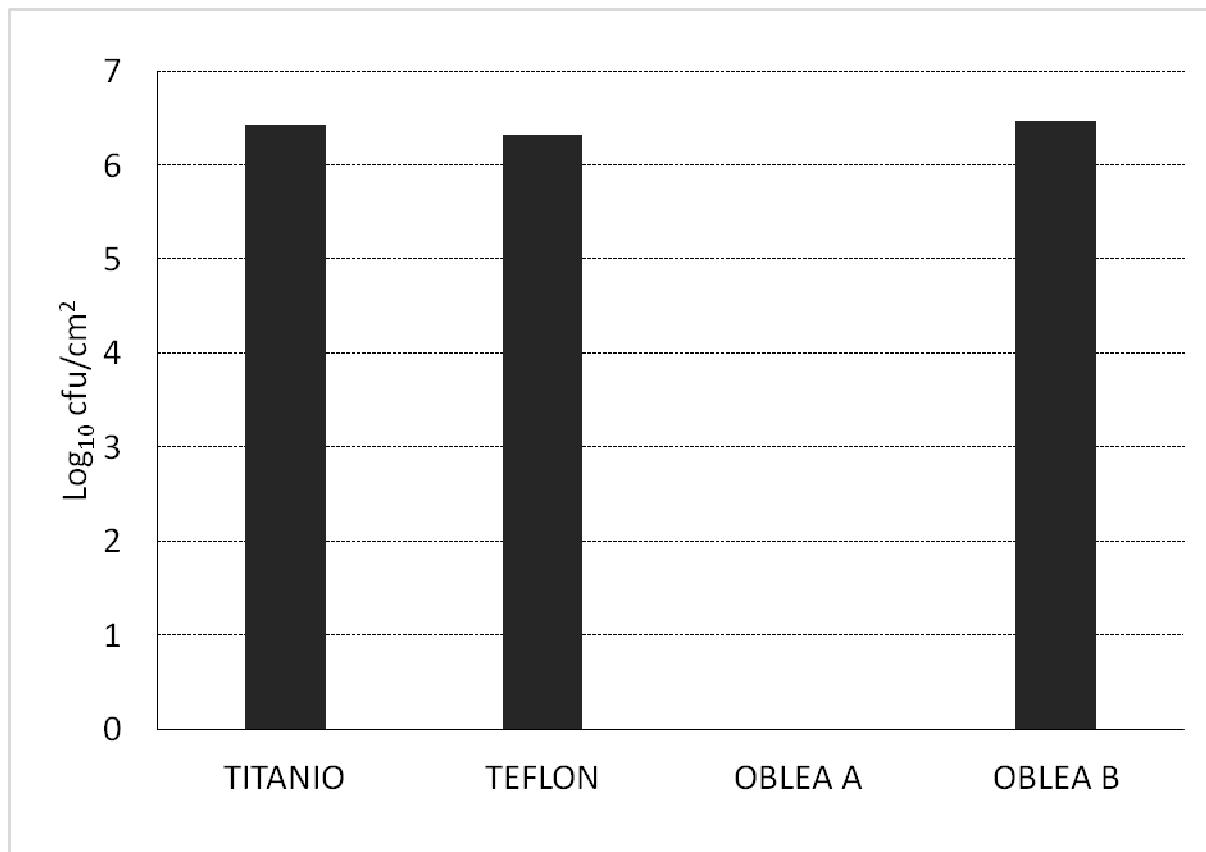


Fig. 5

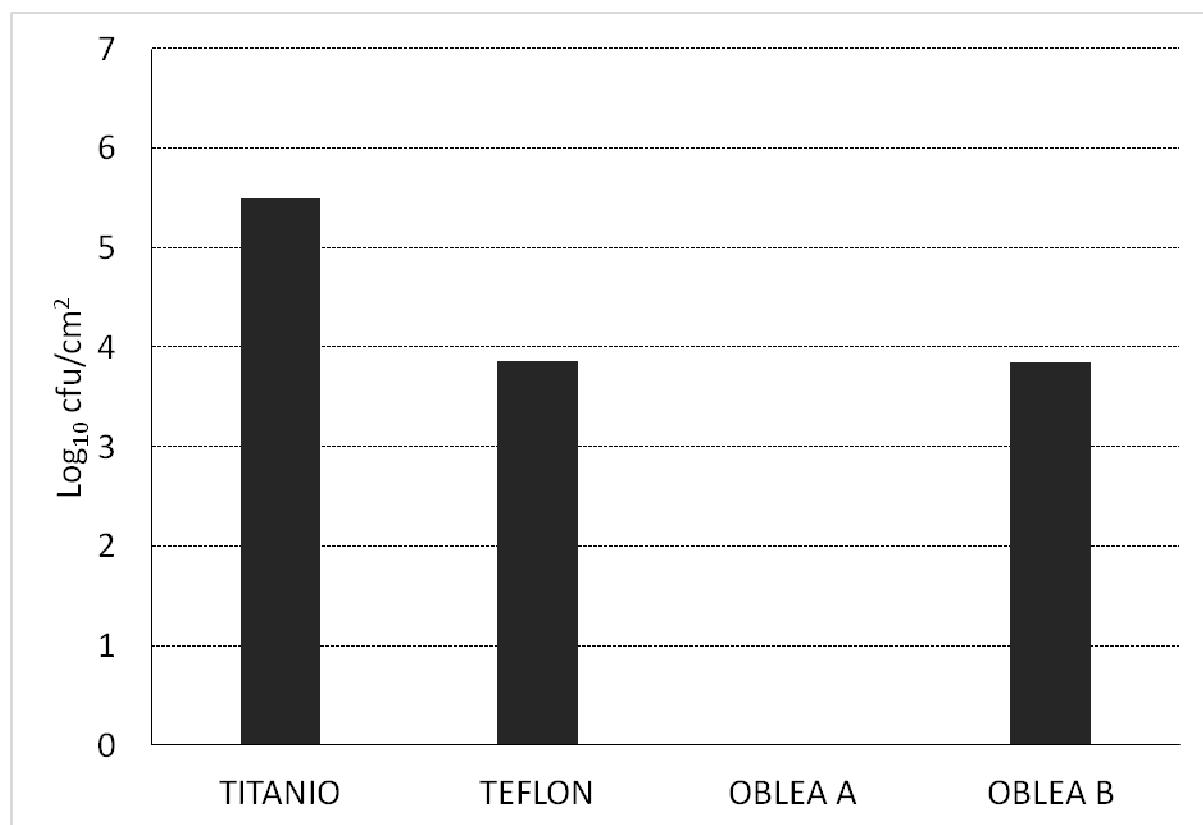


Fig. 6

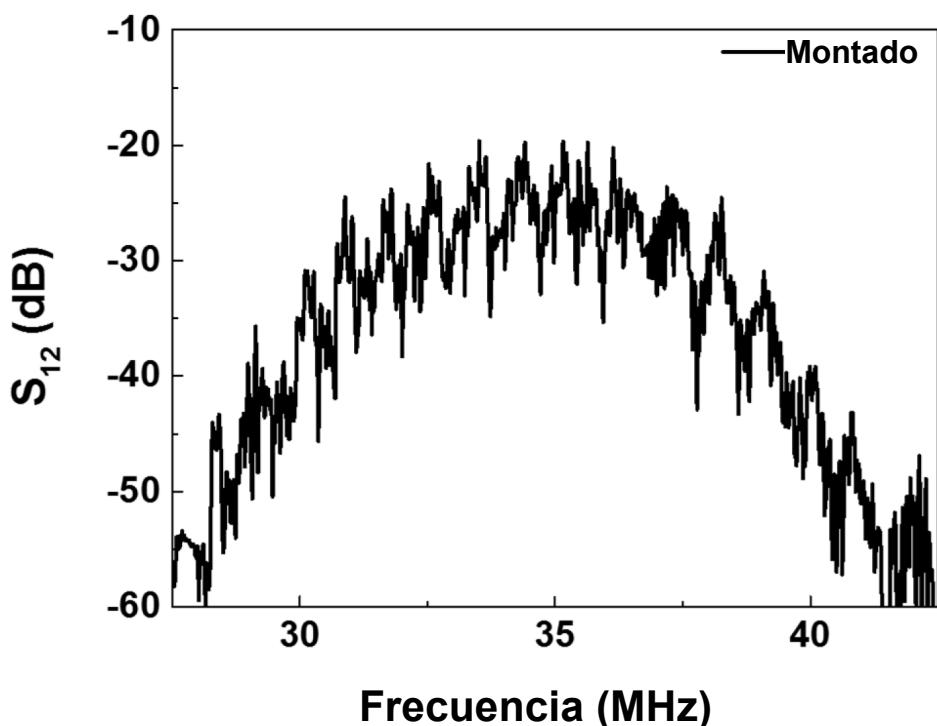


Fig. 7a

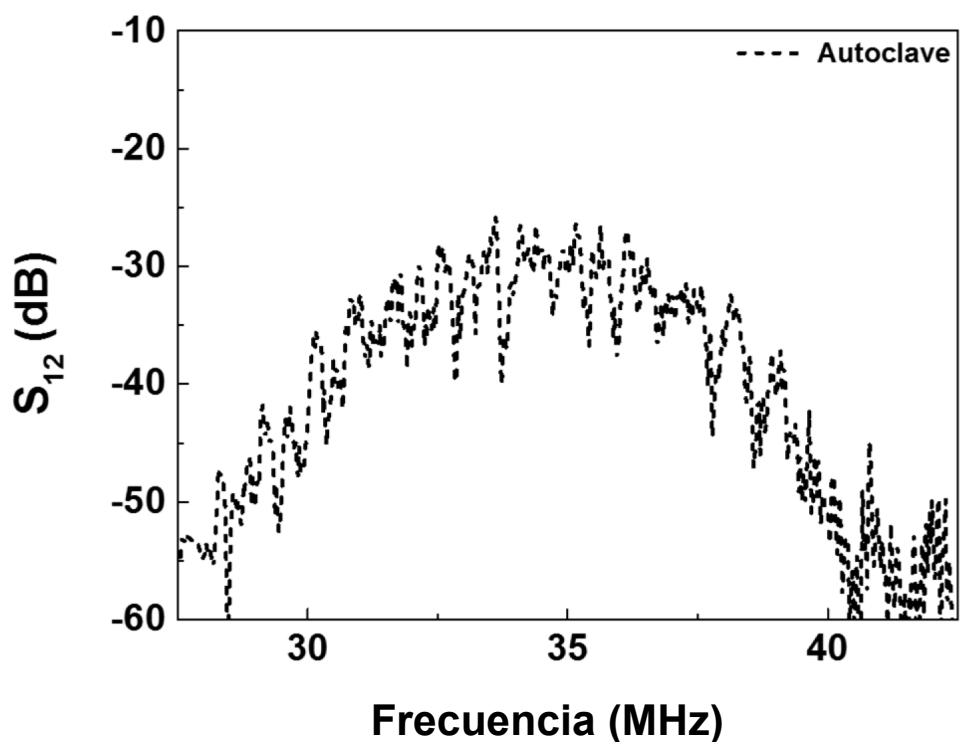


Fig. 7b

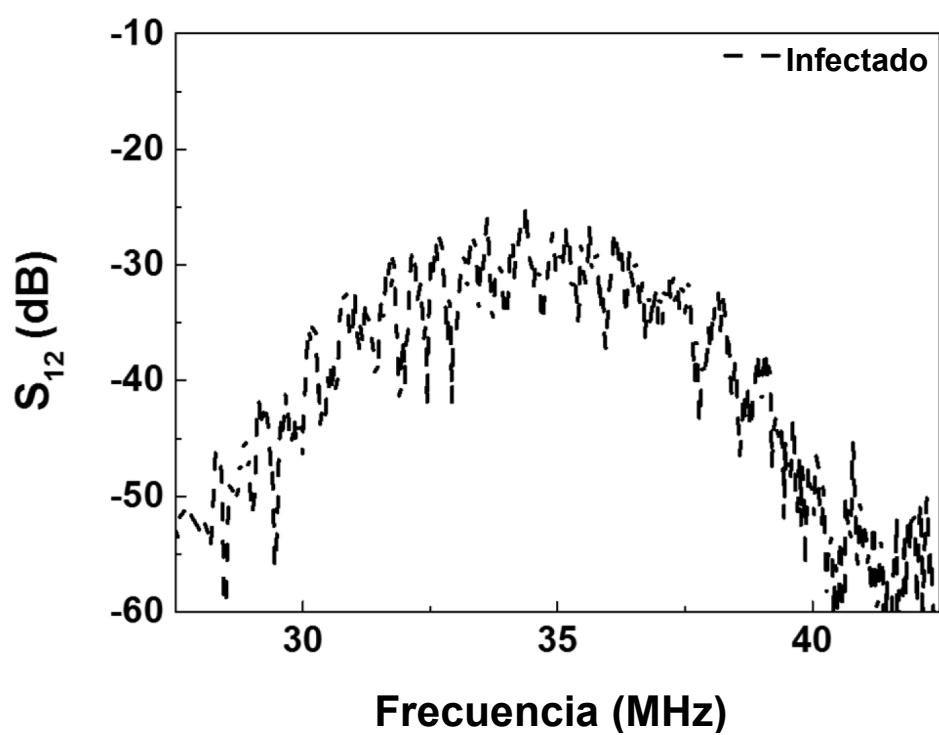


Fig. 7c

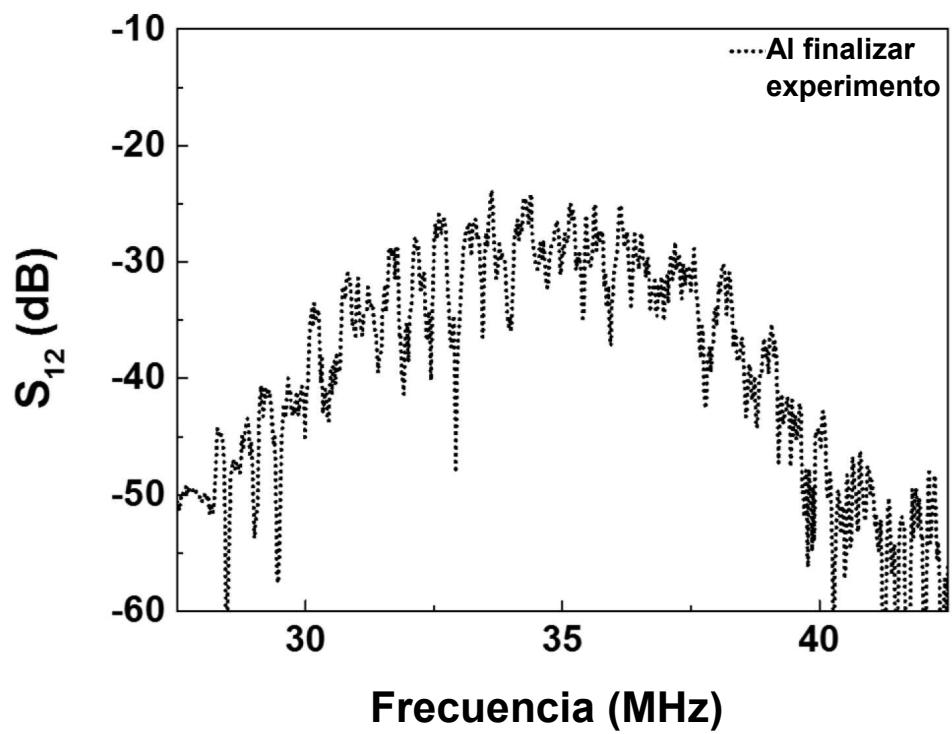


Fig. 7d