

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 913 493**

21 Número de solicitud: 202031199

51 Int. Cl.:

D01F 6/02 (2006.01)

B82Y 30/00 (2011.01)

C08F 2/04 (2006.01)

B82Y 40/00 (2011.01)

A61L 2/232 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

02.12.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.06.2022

71 Solicitantes:

UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (100.0%)
Plaza de San Diego, s/n
28801 Alcalá de Henares (Madrid) ES

72 Inventor/es:

GONZÁLEZ MOSQUERA, Marta Elena;
ROSAL GARCÍA, Roberto;
GHOSH, Srabanti y
AMARIEI, Georgiana

54 Título: **NANOFIBRAS DE POLÍMEROS AROMÁTICOS CONJUGADOS CON CAPACIDAD ANTIMICROBIANA FOTOACTIVADA PARA APLICACIÓN EN SUPERFICIES FOTODESINFECTABLES**

57 Resumen:

Nanofibras de polímeros aromáticos conjugados con capacidad antimicrobiana fotoactivada para aplicación en superficies fotodesinfectables.

La presente invención se refiere un material antimicrobiano polimérico nanoestructurado formado por nanofibras de polímeros conjugados aromáticos y que es activado con luz, contra la proliferación de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas y evitando la formación de biopelículas, así como su fabricación y aplicación. Dichas nanoestructuras ejercen acción antibacteriana fotoactivada tanto en suspensiones como en recubrimientos sobre diferentes soportes producidos por métodos convencionales tales como pulverización, o recubrimiento por inmersión. La presente invención se encuadra dentro del sector de la tecnología de materiales, en el subsector de materiales para el control de la proliferación microbiana y con aplicación en superficies limpias para la industria biomédica y alimentaria.

ES 2 913 493 A1

DESCRIPCIÓN

**NANOFIBRAS DE POLÍMEROS AROMÁTICOS CONJUGADOS CON CAPACIDAD
ANTIMICROBIANA FOTOACTIVADA PARA APLICACIÓN EN SUPERFICIES
FOTODESINFECTABLES**

5

La presente invención se refiere un material antimicrobiano polimérico nanoestructurado formado por nanofibras de polímeros conjugados aromáticos y que es activado con luz, 10
contra la proliferación de bacterias tanto grampositivas como gramnegativas y evitando la formación de biopelículas, así como su fabricación y aplicación. Dichas nanoestructuras ejercen acción antibacteriana fotoactivada tanto en suspensiones como en recubrimientos sobre diferentes soportes producidos por métodos convencionales tales como pulverización, o recubrimiento por inmersión. La presente invención se 15
encuadra dentro del sector de la tecnología de materiales, en el subsector de materiales para el control de la proliferación microbiana y con aplicación en superficies limpias para la industria biomédica y alimentaria.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Debido al incremento de la resistencia a los antibióticos, y el riesgo que esto supone para la salud pública, se precisan nuevas estrategias antimicrobianas. Los polímeros biocidas poseen importantes ventajas en comparación con los antibióticos tradicionales, tales como síntesis de bajo coste, buena estabilidad química, y adecuada solubilidad o dispensabilidad en agua. Además, es posible prepararlos de forma que no liberen 25
productos tóxicos, lo cual supone una ventaja muy importante para su aplicación en el campo de biomedicina. Se ha referido la preparación de nanopartículas poliméricas de tamaños en el rango de 10- 1000 nm con diversas morfologías incluyendo nanoesferas o nanocápsulas en las que ciertos fármacos o compuestos antimicrobianos pueden ser disueltos, encapsulados o unidos de diversas formas a la nanopartícula con el objetivo 30
de ser liberado en condiciones específicas, mejorando así su eficacia y selectividad.

También, se ha determinado que dispersiones coloidales de polianilina estabilizada con polímeros tales como poli(vinil alcohol), poli(vinil acetato), polietilenglicol o polivinilpirrolidona inhiben la proliferación de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* 35
concentraciones de 3.5 g L⁻¹ y 8.5 g L⁻¹, respectivamente. Otros autores han medido

concentraciones de inhibición similares para materiales basados en polianilina.

Los polímeros conjugados nanoestructurados constituyen una nueva generación de materiales con una conductividad eléctrica relativamente elevada y gran superficie específica lo que los hace adecuados para aplicaciones relacionadas con la conversión
5 de energía y la catálisis. Se han descrito recientemente nanopartículas de polímeros conjugados funcionalizadas con moléculas con capacidad de absorción de radiación visible que se utiliza para la liberación controlada de fármacos que se liberan al ser irradiados.

10 Es conocido el uso de fotocatalizadores basados en semiconductores como materiales antimicrobianos es un área conocida y se considera una tecnología sostenible para evitar la proliferación de diversos microorganismos tales como bacterias, virus, hongos o levaduras empleado la luz solar, sin embargo la posibilidad de utilizar la capacidad de fotoactivación de nanopartículas o nanoestructuras basadas en polímeros conjugados
15 para producir materiales biocidas o antimicrobianos no se ha estudiado previamente.

No se conocen ejemplos de inactivación bacteriana o de inhibición de la formación de biopelículas utilizando nanofibras de polímeros conjugados activadas con luz como las que se proponen en esta invención.

20

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un material caracterizado por que es un sólido pulverulento, donde dicho sólido está formado por nanofibras de longitud de entre 1 μm y 2 μm y de un diámetro de entre 20 nm y 80 nm, donde dichas
25 nanofibras son de un polímero conjugado aromático y donde dichas fibras se encuentran crecidas aleatoriamente en las tres direcciones del espacio formando agregados de dichas nanofibras entrecruzadas y/o entrelazadas entre sí en las tres dimensiones del espacio.

30 En la presente invención se entiende por "sólido pulverulento" a cualquier material que tiene aspecto de polvo o en estado de polvo.

En la presente invención se entiende por "polímero conjugado aromático" a aquellos polímeros cuya unidad de repetición básica comprendan un sistema conjugado
35 monocíclico y plano que contiene $(4n + 2)$ π -electrones para números enteros n son

aromáticos y exhiben una estabilidad inusual, y en los que alguno de los carbonos que forman dicho ciclo puede estar sustituido por un heteroátomo y donde en la presente invención los polímeros conjugados aromático son, sin limitarse, poli(3,4-etilendioxitiofeno), polianilina, poli(2-metil-anilina) y poli(3-isobutilanilina).

5

En la presente invención se entiende por “nanofibras entrecruzadas” a cualquier disposición de las nanofibras en las que están dispuestas en el espacio unas sobre otras en cualquier dirección del espacio donde una nanofibra pasa al menos una vez por arriba de una primera nanofibra y al menos una vez por debajo de una segunda nanofibra.

10

En la presente invención se entiende por “nanofibras entrelazadas” a cualquier disposición de las nanofibras en las que están dispuestas en el espacio unas sobre otras en cualquier dirección del espacio donde una nanofibra pasa al menos una vez por arriba y por debajo de una primera y/o segunda nanofibra.

15

Dicho material al ser irradiados por luz ultravioleta de baja energía (longitud de onda comprendida entre 315 y 400 nm) muestran actividad antimicrobiana. Dicha actividad se manifiesta en una inhibición de la capacidad de formación de colonias de bacterias grampositivas (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*) y gramnegativas (por ejemplo, *Escherichia coli*). El efecto de la irradiación de los materiales se debe a la formación de especies oxidantes capaces de interactuar con las envueltas celulares bacterianas y alterar el metabolismo celular, lo que conduce a la disminución de la actividad enzimática y a la muerte celular.

25

En una realización preferida los polímeros conjugados aromáticos están seleccionados de entre aromáticos heterocíclicos y homocíclicos. En una realización más preferida el aromático es homocíclico y el polímero se selecciona de entre polianilina, poli(2-metil-anilina), poli(3-isobutilanilina), poli(ácido 2-anilinesulfónico) y poli(ácido 3-anilinesulfónico).

30

En otra realización más preferida el aromático es heterocíclico y el polímero se selecciona de entre poli-3,4-etilendioxitiofeno, poli(3-metil-4-metoxitiofeno), poli(3-metil-4-etoxitiofeno), poli(3-carboxitiofeno), poli(3-metil-4-carboxitiofeno), poli(3-metil-4-carboxietiltiofeno) y poli(3-metil-4-carboxibutyltiofeno). En una realización todavía más

35

preferida el aromático heterocíclico es poli-3,4-etilendioxitiofeno, para el que la eficacia antimicrobiana es mayor en el caso de que la bacteria sea grampositiva, por ejemplo, *S. aureus* con un 99,5 % de reducción en el número de colonias viables frente a un 95 % para *E. coli*.

5

Otro aspecto de la invención es el procedimiento de obtención del material antimicrobiano según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que comprende las siguientes etapas

- 10 a) disolver 0,005-0,05 M de un surfactante catiónico, preferiblemente bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB), en HCl acuoso en concentración de entre 0,8 M y 1,2 M, y posteriormente añadir a la disolución obtenida 0,01-0,1 M de persulfato de amonio como iniciador;
- b) mantener la disolución obtenida en el paso (a) a una temperatura de entre 1 °C y 10 °C durante un tiempo de entre 5 min y 25 min;
- 15 c) añadir a la disolución obtenida en la etapa (b) el monómero seleccionado de entre aromático heterocíclico y homocíclico en una concentración de entre 1 M y 2 M, durante un tiempo de entre 20 h y 30 h, a una temperatura de entre 1 °C y 10 °C;
- 20 d) filtrar el sólido obtenido en la etapa (c), y lavar al menos una vez con un disolvente polar, seleccionado de entre agua destilada, etanol, metanol.

En una realización preferida del procedimiento de la presente invención, el monómero de la etapa (c) es un aromático heterocíclico seleccionado de entre 3,4-etilendioxitiofeno, (3-metil-4-metoxitiofeno), (3-metil-4-etoxitiofeno), (3-carboxitiofeno), 25 (3-metil-4-carboxitiofeno), (3-metil-4-carboxietiltiofeno) y (3-metil-4-carboxibutyltiofeno).

En otra realización preferida del procedimiento de la presente invención, el monómero de la etapa (c) es un aromático homocíclico seleccionado de entre polianilina, poli(2-metil-anilina), poli(3-isobutilanilina), poli(ácido 2-anilinesulfónico) y poli(ácido 3-anilinesulfónico). 30

Un tercer aspecto de la presente invención es el uso del material descrito anteriormente en la presente como antimicrobiano e inhibidor de biopelículas.

35 En la presente invención se entiende por "biopelícula" a cualquier ecosistema

microbiano organizado, conformado por una o varias especies de microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas. Este tipo de conformación microbiana ocurre cuando las células planctónicas se adhieren a una superficie o sustrato, formando una comunidad, que se caracteriza
5 por la excreción de una matriz extracelular adhesiva protectora.

En una realización preferida del uso del material como antimicrobiano de las bacterias seleccionadas de entre grampositivas y gramnegativas, y preferiblemente si son grampositivas se seleccionan de entre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y
10 *Enterococcus faecalis*, y si son gramnegativas se seleccionan de entre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.

Un cuarto aspecto de la presente invención es el método para la inhibición, reducción o tratamiento de una biopelícula desarrollada sobre una superficie que comprende

- 15
- a. aplicar o recubrir la superficie con el material descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; e
 - b. irradiar la superficie obtenida del paso (a) con luz ultravioleta de baja energía de longitud de onda comprendida entre 315 y 400 nm.

20 Tras la irradiación presencia de especies reactivas de oxígeno en todos los especímenes irradiados efecto sobre la membrana celular bacteriana se debe a la formación de especies reactivas de oxígeno tales como el radical superóxido debido a la cesión de un electrón fotoexcitado a una molécula de oxígeno. Los materiales nanofibrosos conjugados a los que se refiere esta invención no son citotóxicos para
25 células somáticas. En concreto no presentan inhibiciones superiores al 7% en la viabilidad de cultivos celulares de fibroblastos humanos para concentraciones de hasta 650 μ /L. Por lo tanto, la ventaja es la seguridad biológica de los materiales por su baja citotoxicidad, ya que no son tóxicas para células humanas no tumorales.

30 En una realización preferida del método, la película formada en la etapa a) tiene un espesor de al menos de 75 μ g/cm².

En una realización preferida del método, la luz ultravioleta de baja intensidad se irradia mediante

- 35
- un LED a una longitud de onda de entre 315 nm y 400 nm, preferiblemente de

365 nm, e irradiancia de entre 100 mW cm⁻² y 120 mW cm⁻², y más preferiblemente 110,5 mW cm⁻²;

- una fuente emisora de luz negra; y
- fuentes de irradiación UV-A, preferiblemente luz solar.

5

Un quinto aspecto es una disolución que comprende el material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una cantidad de entre 1 y 1,5 mg/L y una disolución tampón fosfato salino un pH de entre 6,8 y 7,4.

10 Un sexto aspecto de la presente invención es un film que comprende el material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una concentración de entre 1 y 2 µg/cm² sobre un sustrato de vidrio.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y figuras se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

20

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig. 1. Se representa la estructura química general del polímero conjugado con actividad antimicrobiana en las que se detalla la unidad funcional de polianilina (PANI).

25 **Fig. 2.** La figura muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (1') y fotografías de microscopía electrónica de barrido (1'') del material polimérico conjugado nanofibroso PANI.

Fig. 3. Se representa la estructura química general del polímero conjugado con actividad antimicrobiana en las que se detalla la unidad funcional de poli-3,4-etilendioxitiofeno (PEDOT).

30 **Fig. 4.** La figura muestra imágenes de microscopía electrónica de transmisión (2') y fotografías de microscopía electrónica de barrido (2'') del material polimérico conjugado nanofibroso PEDOT.

35

Fig. 5. Inhibición de unidades formadoras de colonia de *S. aureus* y *E. coli* en contacto con suspensiones de distintas concentraciones de nanofibras de PEDOT y el material no nanoestructurado (“bulk”). L(-): en oscuridad; L(+) 1.0 kW-h m⁻²; L(++): 2.0 kW-h m⁻² con una longitud de onda de irradiación de 365 nm.

Fig. 6. Imágenes de microscopía confocal con el fluorocromo FilmTracer™ FM™ 1-43 Green Biofilm Cell Stain (barra 50µm) para cultivos de *S. aureus* recubriendo superficies de vidrio funcionalizadas con PEDOT. La irradiación corresponde a luz de 365 nm con irradiancia de 2.0 kW-h m⁻².

EJEMPLOS

A continuación, se ilustrará la invención mediante unos ensayos realizados por los inventores, que pone de manifiesto la efectividad del producto de la invención.

Ejemplo 1

El material de la presente invención se obtiene una polimerización empleando un surfactante como plantilla en condiciones oxidantes. Para ello, disolver 0,01 M de un surfactante catiónico (CTAB) en 1 M de HCl acuoso, y posteriormente añadir a la disolución obtenida 0,02 M de persulfato de amonio como iniciador. La reacción se mantiene a 5 °C durante 15 minutos. Añadir el monómero anilina con una concentración de 1 M en la disolución obtenida anteriormente y dejar que la polimerización tenga lugar durante 24 h a la misma temperatura de 5 °C. Finalmente, separar el producto obtenido por filtración, y purificar con agua destilada y etanol. El producto obtenido es Polianilina (Figura 1) que se obtiene como un sólido con un rendimiento superior al 90% y consiste en nanofibras de al menos una micra de longitud y diámetro comprendido entre 20 y 80 nm (Figura 2).

Ejemplo 2

El material de la presente invención se obtiene una polimerización empleando un surfactante como plantilla en condiciones oxidantes. Para ello, disolver 0,01 M de un surfactante catiónico (CTAB) en 1 M de HCl acuoso, y posteriormente añadir a la disolución obtenida 0,02 M de persulfato de amonio como iniciador. La reacción se mantiene a 5 °C durante 15 minutos. Añadir el monómero 3,4-etilendioxitiofeno con una concentración de 1 M en la disolución obtenida anteriormente y dejar que la

polimerización tenga lugar durante 24 h a la misma temperatura de 5 °C. Finalmente, separar el producto obtenido por filtración, y purificar con agua destilada y etanol. El producto obtenido es Poli-3,4-etilendioxitiofeno (PEDOT) (Figura 3) que se obtiene como un sólido con un rendimiento superior al 90% y consiste en nanofibras de al menos una micra de longitud y diámetro comprendido entre 20 y 80 nm (Figura 4).

Ejemplo 3

Los materiales obtenidos según los ejemplos 1 y 2 se utilizan depositando una película de dicho material sobre una superficie. Para ello se dispersa en una fase líquida, que es tampón fosfato salino, y se utiliza un método de deposición gota a gota ("drop casting"), pulverización ("spray coating"), inmersión ("dip coating"), centrifugación ("spin-coating") y arrastre con cuchilla ("doctor blade") o aplicador de película, generando una película de menos de 75 µg/cm². Finalmente, la superficie se fija por secado a temperatura ambiente durante al menos 12 h o en estufa de secado a menos de 50 °C y durante al menos 6 h. Una vez depositados en forma de película fina sobre un soporte, muestran actividad antimicrobiana al ser irradiados por luz ultravioleta de baja energía (longitud de onda comprendida entre 315 y 400 nm).

Ejemplo 4

La actividad antimicrobiana del producto obtenido en el ejemplo 1 tras ser irradiado o tras ser depositado según el ejemplo 3, se manifiesta en una inhibición de la capacidad de formación de colonias de bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*) y gramnegativas (*Escherichia coli*). El efecto de la irradiación de los materiales se debe a la formación de especies oxidantes capaces de interactuar con las envueltas celulares bacterianas y alterar el metabolismo celular, lo que conduce a la disminución de la actividad enzimática y a la muerte celular.

Dicha acción antimicrobiana de los materiales se determina a partir del contacto de suspensiones de nanomateriales o de superficies funcionalizadas con nanofibras del polímero conjugado aromático PANI con cultivos de bacterias grampositivas o gramnegativas, tales como *Staphylococcus aureus* (CETC 240) o *Escherichia coli* (CETC 516). Los ensayos en suspensión se llevan a cabo en placas de 24 pocillos con un volumen total de 2,4 mL a concentraciones entre cero y 1,4 mg/L. Los ensayos sobre superficies funcionalizadas se realizan utilizando cubreobjetos circulares de vidrio borosilicato de 13 mm de diámetro con las densidades de recubrimiento inferiores a 75

$\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Los cubreobjetos funcionalizados, junto con sus correspondientes controles, se colocan en placas de 24 pocillos con la superficie funcionalizada hacia arriba y en contacto los cultivos bacterianos. El mismo polímero no nanoestructurado; es decir, en forma no nanofibrosa se utiliza como control y comparación.

5

Para los ensayos microbiológicos, los materiales se mantienen en contacto con cultivos con una densidad celular inicial de 10^8 - 10^{10} células/mL en medio NB 1/500 (NB, 10 g/L peptona, 5 g/L cloruro sódico, 5 g/L extracto de carne, pH 7,0) y se incuban a 37 °C durante 20 h sin agitación. Tras la incubación, los especímenes se irradian utilizando una lámpara UV-LED con emisión monocromática a 365 nm (Lasing, 50W, Type-H. Precision LED Spotlights with Uniform Illumination) u otras fuentes de irradiación UV-A. Las irradiancias se ajustan a valores de entre 1.0 y 2.0 kW-h m^{-2} como estimaciones representativas de condiciones de invierno y verano respectivamente en latitudes templadas. La determinación del número de colonias viables se realiza mediante conteo en placas de agar con el mismo medio NB (15 g/L de agar sólido) tras incubación de diluciones seriadas en tampón fosfato a 37 °C.

Las nanofibras poliméricas conjugadas y las superficies funcionalizadas con ellas muestran una gran actividad antibacteriana en contacto con las cepas indicadas de *S. aureus* y *E. coli*. La eficacia es mayor en el caso de la bacteria grampositiva *S. aureus*. En contraste, las suspensiones de los materiales no nanofibrosos (“bulk” o polímeros no nanoestructurados) no muestran inhibición apreciable en el número de unidades formadoras de colonia hasta concentraciones del orden de 1000 ppb.

25 **Ejemplo 5**

La actividad antimicrobiana del producto obtenido en el ejemplo 2 tras ser irradiado o tras ser depositado según el ejemplo 3, se manifiesta en una inhibición de la capacidad de formación de colonias de bacterias grampositivas (*Staphylococcus aureus*) y gramnegativas (*Escherichia coli*). El efecto de la irradiación de los materiales se debe a la formación de especies oxidantes capaces de interactuar con las envueltas celulares bacterianas y alterar el metabolismo celular, lo que conduce a la disminución de la actividad enzimática y a la muerte celular.

Dicha acción antimicrobiana de los materiales se determina a partir del contacto de suspensiones de nanomateriales o de superficies funcionalizadas con nanofibras del

polímero conjugado aromático PEDOT con cultivos de bacterias grampositivas o gramnegativas, tales como *Staphylococcus aureus* (CETC 240) o *Escherichia coli* (CETC 516). Los ensayos en suspensión se llevan a cabo en placas de 24 pocillos con un volumen total de 2,4 mL a concentraciones entre cero y 1,4 mg/L. Los ensayos sobre superficies funcionalizadas se realizan utilizando cubreobjetos circulares de vidrio borosilicato de 13 mm de diámetro con las densidades de recubrimiento inferiores a 75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. Los cubreobjetos funcionalizados, junto con sus correspondientes controles, se colocan en placas de 24 pocillos con la superficie funcionalizada hacia arriba y en contacto los cultivos bacterianos. El mismo polímero no nanoestructurado; es decir, en forma no nanofibrosa se utiliza como control y comparación.

Para los ensayos microbiológicos, los materiales se mantienen en contacto con cultivos con una densidad celular inicial de 10^8 - 10^{10} células/mL en medio NB 1/500 (NB, 10 g/L peptona, 5 g/L cloruro sódico, 5 g/L extracto de carne, pH 7,0) y se incuban a 37 °C durante 20 h sin agitación. Tras la incubación, los especímenes se irradian utilizando una lámpara UV-LED con emisión monocromática a 365 nm (Lasing, 50W, Type-H. Precision LED Spotlights with Uniform Illumination) u otras fuentes de irradiación UV-A. Las irradiancias se ajustan a valores de entre 1.0 y 2.0 kW-h m^{-2} como estimaciones representativas de condiciones de invierno y verano respectivamente en latitudes templadas. La determinación del número de colonias viables se realiza mediante conteo en placas de agar con el mismo medio NB (15 g/L de agar sólido) tras incubación de diluciones seriadas en tampón fosfato a 37 °C.

Las nanofibras poliméricas conjugadas y las superficies funcionalizadas con ellas muestran una gran actividad antibacteriana en contacto con las cepas indicadas de *S. aureus* y *E. coli*. La eficacia es mayor en el caso de la bacteria grampositiva *S. aureus* con un 99.5 % de reducción en el número de colonias viables frente a un 95 % para *E. coli* (datos correspondientes al polímero conjugado PEDOT). En contraste, las suspensiones de los materiales no nanofibrosos (“bulk” o polímeros no nanoestructurados) no muestran inhibición apreciable en el número de unidades formadoras de colonia hasta concentraciones del orden de 1000 ppb (Figura 5).

Ejemplo 6

La actividad de los nanomateriales sobre biopelículas formadas sobre superficies funcionalizadas antes de la irradiación se puede observar con los fluorocromos

adecuados en imágenes de microscopía confocal. En ensayos con biopelículas bacterianas formadas durante 24 h antes de la irradiación se observa la presencia de células muertas marcadas en rojo con yoduro de propidio. Utilizando fluorocromos capaces de revelar los cuerpos celulares la matriz de las biopelículas (FilmTracer™ FM™ 1-43 Green Biofilm Cell Stain y FilmTracer™ SYPRO™ Ruby Biofilm Matrix Stain) se observa una importante actividad de los materiales contra la formación de biopelículas (Figura 6) tras la irradiación corresponde a luz de 365 nm con irradiancia de 2.0 kW-h m⁻² para cultivos de *S. aureus* recubriendo superficies de vidrio funcionalizadas con PEDOT.

10

El modo de acción de los nanomateriales poliméricos conjugados se comprueba mediante la utilización de la sonda fluorescente diacetato de diclorofluorescina 2'-7' (DCFH-DA) que revela la presencia de especies reactivas de oxígeno en todos los especímenes irradiados. El efecto sobre la membrana celular bacteriana se debe a la formación de especies reactivas de oxígeno tales como el radical superóxido debido a la cesión de un electrón fotoexcitado a una molécula de oxígeno. Los materiales nanofibrosos conjugados a los que se refiere esta invención no son citotóxicos para células somáticas. En concreto no presentan inhibiciones superiores al 7% en la viabilidad de cultivos celulares de fibroblastos humanos para concentraciones de hasta 650 µ/L.

20

REIVINDICACIONES

1. Un material caracterizado por que es un sólido pulverulento, donde dicho sólido está formado por nanofibras de longitud de entre 1 μm y 2 μm y de un diámetro de entre 20 nm y 80 nm, donde dichas nanofibras son de un polímero conjugado aromático y donde dichas fibras se encuentran crecidas aleatoriamente en las tres direcciones del espacio formando agregados de las nanofibras entrecruzadas y/o entrelazadas entre sí en las tres dimensiones del espacio.
2. Material según la reivindicación 1, donde los polímeros conjugados aromáticos están seleccionados de entre aromáticos heterocíclicos y homocíclicos.
3. Material según la reivindicación 2, donde el aromático es homocíclico y el polímero se selecciona de entre polianilina, poli(2-metilanilina) y poli(3-isobutilanilina).
4. Material según la reivindicación 2, donde el aromático es heterocíclico y el polímero es poli-3,4-etilendioxitiofeno.
5. Procedimiento de obtención del material según las reivindicaciones 1 a 4, caracterizado por que comprende las siguientes etapas
 - a) disolver 0,005-0,05 M de un surfactante catiónico en HCl acuoso en concentración de entre 0,8 M y 1,2 M, y posteriormente añadir a la disolución obtenida 0,01-0,1 M de persulfato de amonio como iniciador;
 - b) mantener la disolución obtenida en el paso (a) a una temperatura de entre 1 °C y 10 °C durante un tiempo de entre 5 min y 25 min;
 - c) añadir a la disolución obtenida en la etapa (b) el monómero seleccionado de entre aromático heterocíclico y homocíclico, en una concentración de entre 1 M y 2 M, durante un tiempo de entre 20 h y 30 h, a una temperatura de entre 1 °C y 10 °C;
 - d) filtrar el sólido obtenido en la etapa (c), y lavar al menos una vez con un disolvente polar, seleccionado de entre agua destilada, etanol y metanol.
6. Procedimiento según la reivindicación 5, donde el monómero de la etapa (c) es un aromático heterocíclico seleccionado de entre 3,4-etilendioxitiofeno, (3-metil-4-metoxitiofeno), (3-metil-4-etoxitiofeno), (3-carboxitiofeno), (3-metil-4-carboxitiofeno), (3-metil-4-carboxietiltiofeno) y (3-metil-4-carboxibutyltiofeno).

7. Procedimiento según la reivindicación 5, donde el monómero de la etapa (c) es un aromático homocíclico seleccionado de entre polianilina, poli(2-metilnilina), poli(3-isobutilnilina), poli(ácido 2-anilinesulfónico) y poli(ácido 3-anilinesulfónico).
- 5
8. Uso del material según las reivindicaciones 1 a 4, como antimicrobiano e inhibidor de biopelículas.
9. Uso del material según la reivindicación 8 como antimicrobiano de las bacterias seleccionadas de entre seleccionadas de entre Gram-positivas y Gram-negativas.
- 10
10. Uso del material según la reivindicación 9, donde las bacterias son Gram-positivas y se seleccionan de entre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecalis*.
- 15
11. Uso del material según la reivindicación 9, donde las bacterias son Gram-negativas se seleccionan de entre *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*.
- 20
12. Método para la inhibición, reducción o tratamiento de una biopelícula desarrollada sobre una superficie que comprende
- aplicar o recubrir la superficie con el material descrito en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4; e
 - irradiar la superficie obtenida del paso (a) con luz ultravioleta de baja energía
- 25
- de longitud de onda comprendida entre 315 y 400 nm.
13. Método según la reivindicación 12, donde la película formada en la etapa (a) tiene un espesor de al menos de 75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.
- 30
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 12 o 13, donde la luz ultravioleta de baja intensidad se irradia mediante
- un LED a una longitud de onda de entre 315 nm y 400 nm, preferiblemente de 365 nm, e irradiancia de entre 100 mW cm^{-2} y 120 mW cm^{-2} , y más preferiblemente 110,5 mW cm^{-2} ;
- 35
- una fuente emisora de luz negra; y

- fuentes de irradiación UV-A, preferiblemente luz solar.

15. Una disolución que comprende el material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una cantidad de entre 1 y 1,5 mg/L y una disolución tampón fosfato salino a un pH de entre 6,8 y 7,4.

5

16. Un film que comprende el material según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en una concentración de entre 1 y 2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ sobre un sustrato, preferiblemente dicho sustrato es vidrio.

10

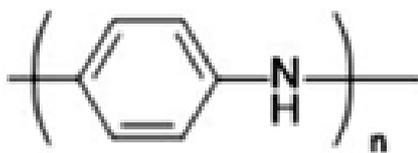


FIG. 1

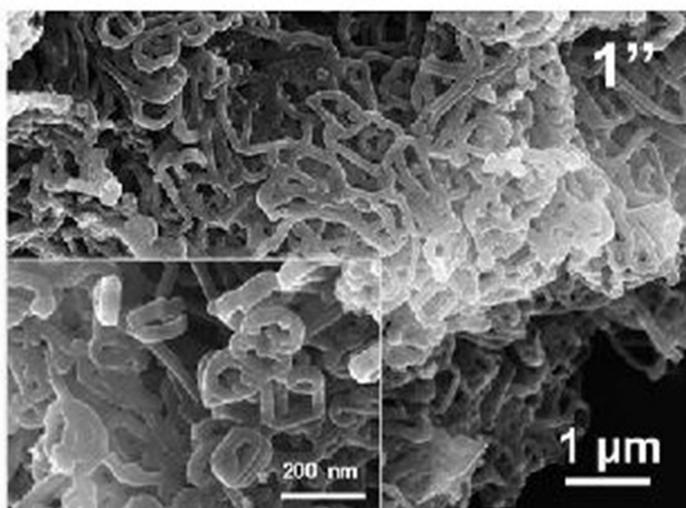
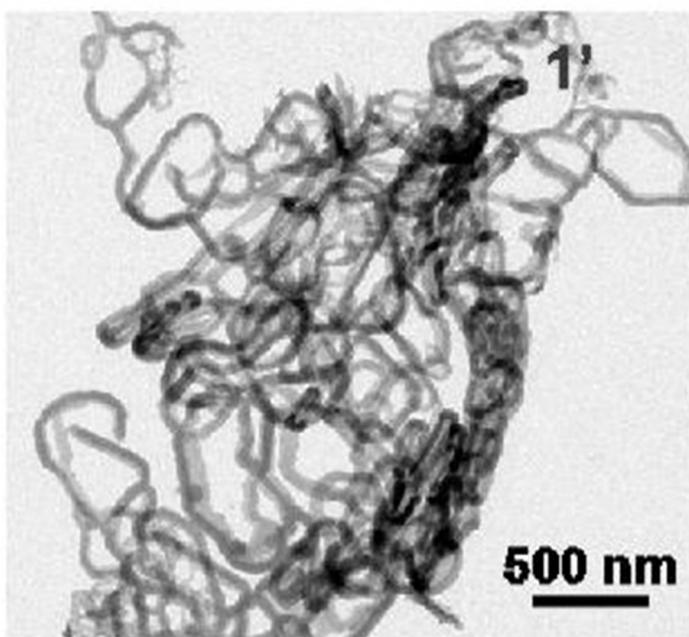


FIG. 2

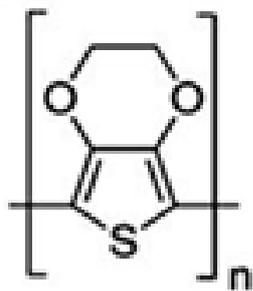


FIG. 3

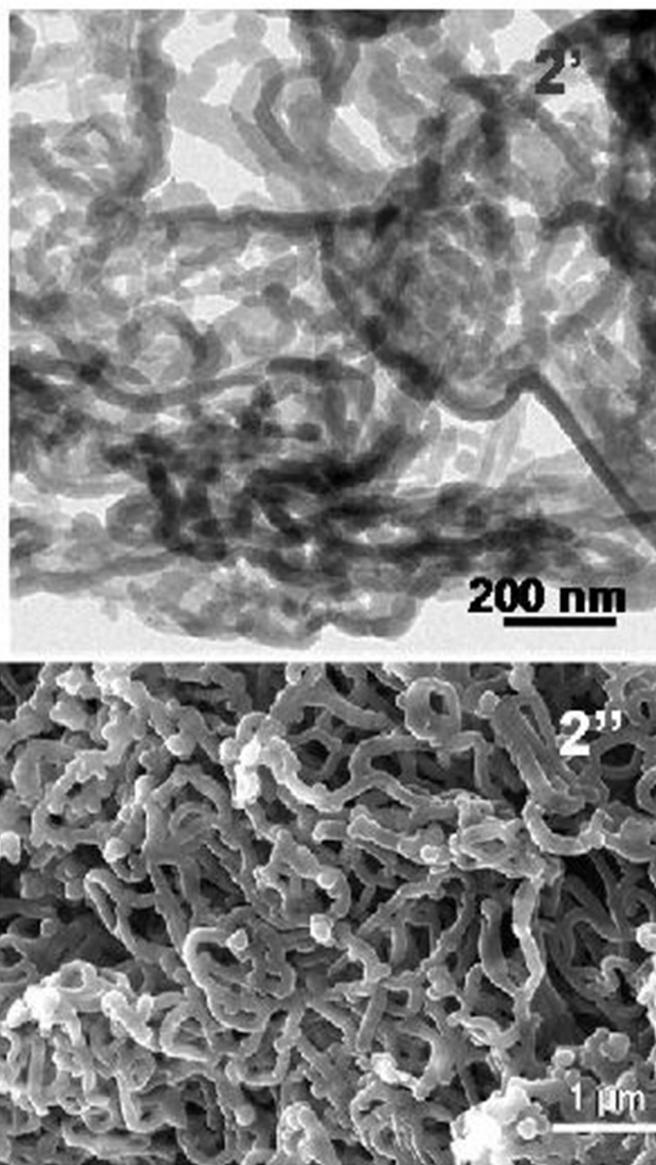


FIG. 4

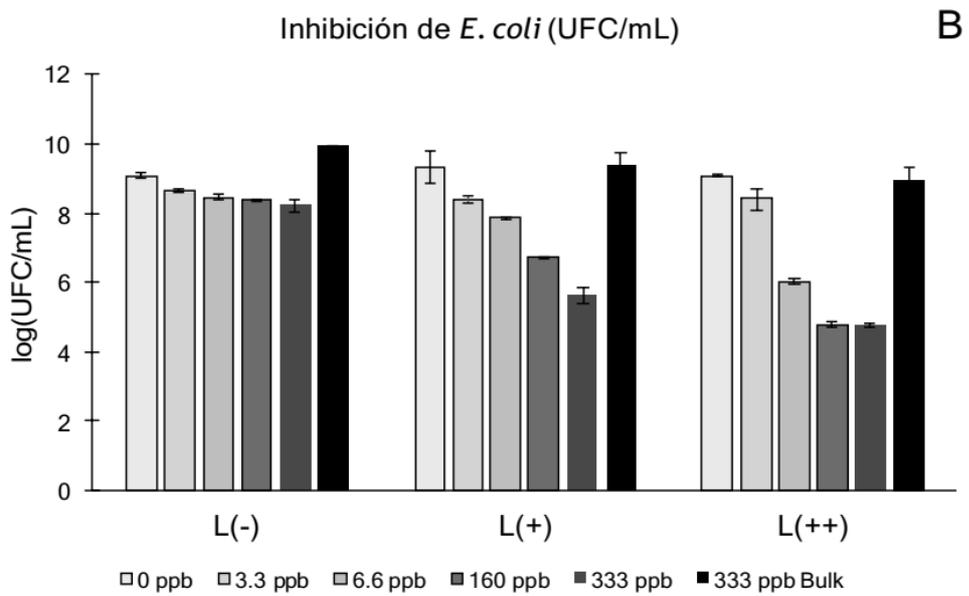
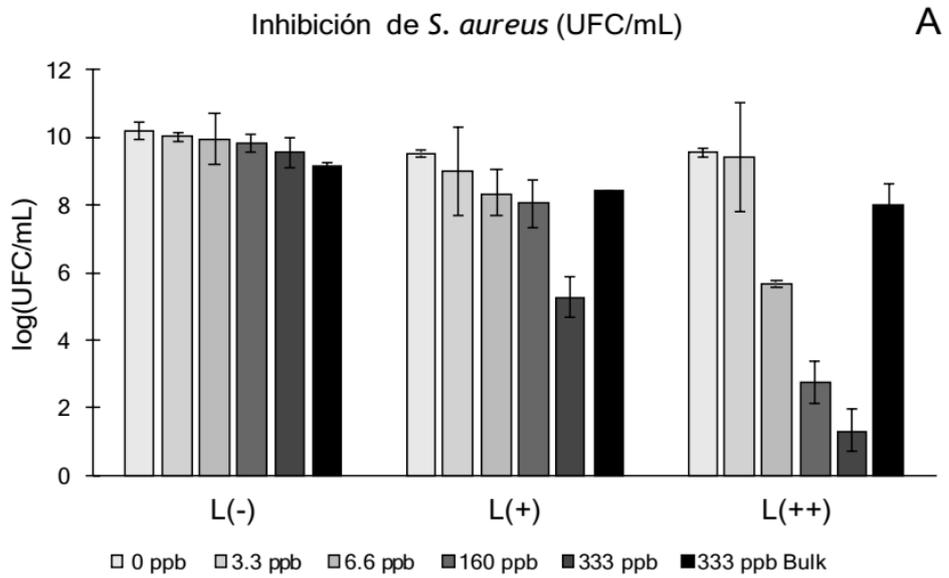


FIG. 5

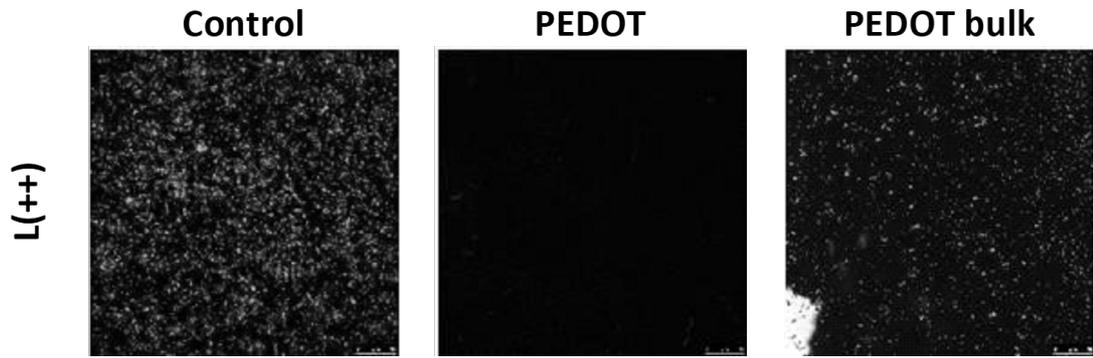


FIG. 6



②① N.º solicitud: 202031199

②② Fecha de presentación de la solicitud: 02.12.2020

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	ZHANG, S., et al., Surfactant-template preparation of polyaniline semi-tubes for oxygen reduction, Catalysts, 31/08/2015, Vol. 5, N° 3, pág. 1202-1210, ISSN 2073-4344 (print), <DOI: doi:10.3390/catal5031202>; resumen, fig. 1, apartados "Results and discussion", "Experimental Section").	1-3, 5, 7, 15,16
Y		8-11
Y	KUMAR, R.R., et al., Evaluation of antimicrobial activities of polyaniline nanoparticles, Progressive Research-An International Journal, 2018, Vol. 13, pág. 658-661, Print ISSN: 0973-6417, Online ISSN : 2454-6003; resumen, apartados: "Materials and methods" y "Results and discussion".	8-11
Y	LASHKENARI, M.S., et al., Chemical Synthesis and Characterization of Novel Antibacterial Polycyclic Polymer, Polycyclic Aromatic Compounds, 26/08/2014, Vol. 34, pág. 620-631, DOI: 10.1080/10406638.2014.934483; resumen, apartado: "Antibacterial Activity Test".	8-11
X	SUN, T., et al., Facile synthesis of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) nanostructure with controlled morphologies by using an aqueous surfactant soft-template-assisted technique, Materials Letters, 05/01/2017, Vol. 191, pág. 61 - 64, ISSN 0167-577X, <DOI: doi:10.1016/j.matlet.2016.12.135>; resumen, fig. 1, apartado "Results and discussion".	1, 2, 4, 15, 16
A	FANG, F.F., et al. Effect of oxidants on morphology of interfacial polymerized polyaniline nanofibers and their electrorheological response, Polymer, 05/12/2018, Vol. 158, pág. 176 - 182, ISSN 0032-3861 (print), <DOI: doi:10.1016/j.polymer.2018.10.065>; resumen.	1-16
A	WEN, Q, et al., Clip-like polyaniline nanofibers synthesized by an in situ chemical oxidative polymerization and its strong electrorheological behaviour, Synthetic Metals, 30/04/2018, Vol. 239, pág. 1-12, ISSN 0379-6779 (print), <DOI: doi:10.1016/j.synthmet.2018.02.007>; resumen.	1-16
A	US 2020062951 A1 (LEVI NICOLE HOPE) 27/02/2020; resumen.	1-16

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
26.08.2021

Examinador
M. d. García Poza

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

D01F6/02 (2006.01)
B82Y30/00 (2011.01)
C08F2/04 (2006.01)
B82Y40/00 (2011.01)
A61L2/232 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

D01F, B82Y, C08F, A61L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, XPESP, NPL, INSPEC, MEDLINE