

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

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

02.12.2020

43 Fecha de publicación de la solicitud:

02.06.2022

Fecha de modificación de las reivindicaciones:

18.10.2022

Fecha de concesión:

21.11.2022

45 Fecha de publicación de la concesión:

28.11.2022

73 Titular/es:

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.

Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 41 LP 24/2015.
Dentro de los seis meses siguientes a la publicación de la concesión en el Boletín Oficial de la Propiedad Industrial cualquier persona podrá oponerse a la concesión. La oposición deberá dirigirse a la OEPM en escrito motivado y previo pago de la tasa correspondiente (art. 43 LP 24/2015).

ES 2 913 493 B2

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
10 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
15 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.

20 **ANTECEDENTES DE LA INVENCION**

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
25 dispensabilidad en agua. Además, es posible prepararlos de forma que no liberen
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
30 disueltos, encapsulados o unidos de diversas formas a la nanopartícula con el objetivo
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
35 polivinilpirrolidona inhiben la proliferación de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*

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.

5 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 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
10 irradiados.

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
15 o levaduras empleado la luz solar, sin embargo la posibilidad de utilizar la capacidad de fotoactivación de nanopartículas o nanoestructuras basadas en polímeros conjugados 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
20 que se proponen en esta invención.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un material caracterizado por
25 que es un sólido pulverulento, donde dicho sólido está formado por nanofibras de longitud de entre $1 \mu\text{m}$ y $2 \mu\text{m}$ 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 dichas nanofibras entrecruzadas y/o entrelazadas entre sí en las tres dimensiones del
30 espacio.

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

35 En la presente invención se entiende por “polímero conjugado aromático” a aquellos

polímeros cuya unidad de repetición básica comprendan un sistema conjugado monocíclico y plano que contiene $(4n + 2)$ electrones- π 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
 5 invención los polímeros conjugados aromáticos son, sin limitarse, poli(3,4-etilendioxitiofeno), poli(3-metil-4-etoxitiofeno) y poli(3-metil-4-carboxietiltiofeno).

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
 10 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.

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
 15 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.

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
 20 alterar el metabolismo celular, lo que conduce a la disminución de la actividad enzimática y a la muerte celular.

En la realización preferida de la presente invención los polímeros conjugados aromáticos son heterocíclicos seleccionados 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 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
 35 número de colonias viables frente a un 95 % para *E. coli*.

Otro aspecto de la invención es el procedimiento de obtención del material antimicrobiano según la reivindicación 1 que comprende las siguientes etapas

- 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;
 - c) añadir a la disolución obtenida en la etapa (b) el monómero heterocíclico seleccionado 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, metanol.
- En la 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, 3-metil-4-carboxitiofeno, 3-metil-4-carboxietiltiofeno y (3-metil-4-carboxibutyltiofeno.
- Un tercer aspecto de la presente invención es el uso del material descrito anteriormente en la presente como antimicrobiano e inhibidor de biopelículas.

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 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 *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

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

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 células somáticas. En concreto no presentan inhibiciones superiores al 7% en la viabilidad de cultivos celulares de fibroblastos humanos para concentraciones de hasta 650 μL . 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.

En una realización preferida del método, la película formada en la etapa a) tiene un espesor de al menos de 75 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

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

- a) 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} ;
- b) una fuente emisora de luz negra; y
- c) fuentes de irradiación UV-A, preferiblemente luz solar.

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.

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 poli-3,4-etilendioxitiofeno (PEDOT).

5

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

10 **Fig. 3.** 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 L(++): 2.0 kW-h m⁻².

15 **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

20 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
25 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 1) que se obtiene como un sólido con un rendimiento superior al 90% y consiste en nanofibras de al menos una
30 micra de longitud y diámetro comprendido entre 20 y 80 nm (Figura 2).

Ejemplo 2

Los materiales obtenidos según el ejemplo 1 se utilizan depositando una película de dicho material sobre una superficie. Para ello se dispersa en una fase líquida, que es
35 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 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. 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 3

La actividad de los nanomateriales del producto obtenido en el ejemplo 1 sobre biopelículas formadas antes de la irradiación sobre superficies funcionalizadas según el ejemplo 2. Para los ensayos microbiológicos, los materiales se mantienen en contacto con cultivos de bacterias gram-positivas o gram-negativas, tales como *Staphylococcus aureus* (CETC 240) o *Escherichia coli* (CETC 516) 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.

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 3) 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.

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.

REIVINDICACIONES

1. Un material caracterizado por que es un sólido pulverulento formado por nanofibras de longitud de entre 1 μm y 2 μm y de un diámetro de entre 20 nm y 80 nm, preparado mediante el procedimiento siguiente:
 - a) se prepara una disolución 0,005-0,05 M de un surfactante catiónico en HCl acuoso en concentración de entre 0,8 M y 1,2 M, y se añade a la disolución obtenida 0,01-0,1 M de persulfato de amonio como iniciador;
 - b) se mantiene 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) se añade a la disolución obtenida en la etapa (b) un monómero 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 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) se filtra el sólido obtenido en la etapa (c), y se lava al menos una vez con un disolvente polar, seleccionado de entre agua destilada, etanol y metanol.
2. Uso del material elaborado según la reivindicación 1 para la inhibición, reducción o tratamiento de una biopelícula bacteriana desarrollada sobre una superficie y que comprende la aplicación o recubrimiento de la superficie con el material descrito en la reivindicación 1, y la irradiación de la superficie obtenida del paso (a) con luz ultravioleta de baja energía de longitud de onda comprendida entre 315 y 400 nm que se puede obtener mediante:
 - a) 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} ;
 - b) una fuente emisora de luz negra; o
 - c) fuentes de irradiación UV-A, preferiblemente luz solar.

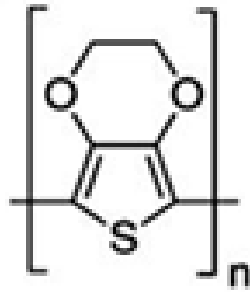


Fig. 1

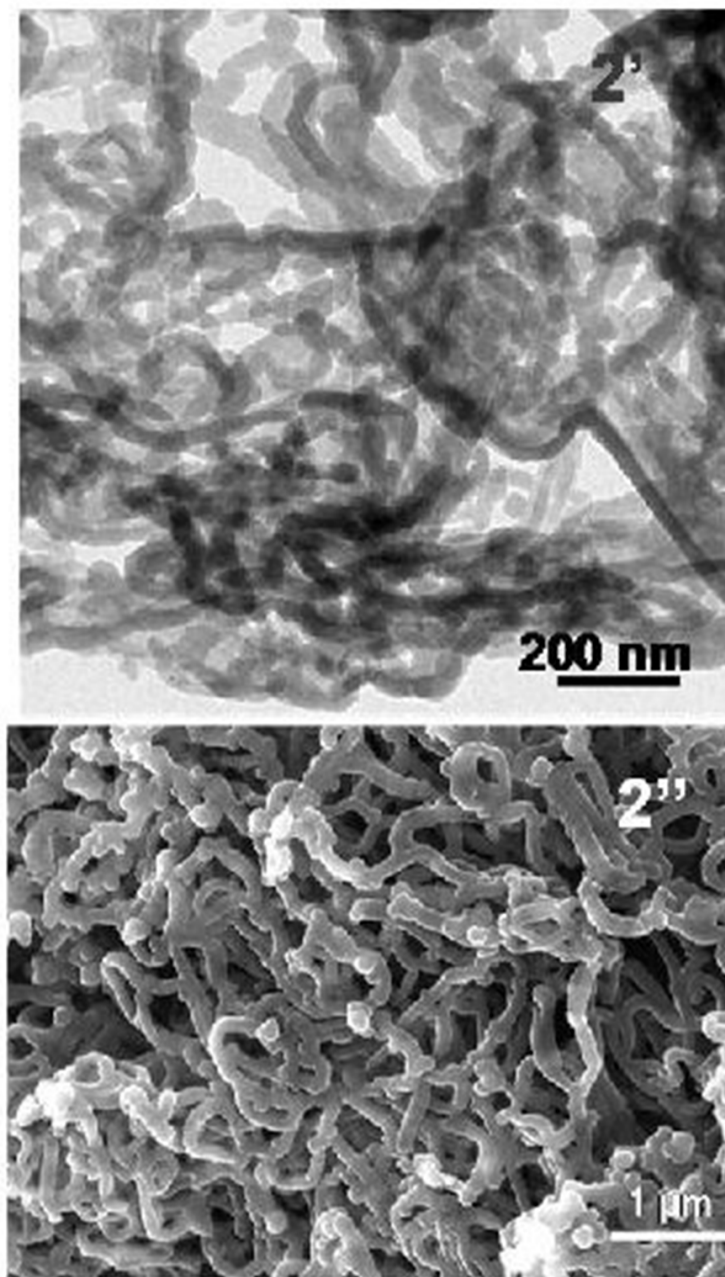


Fig. 2

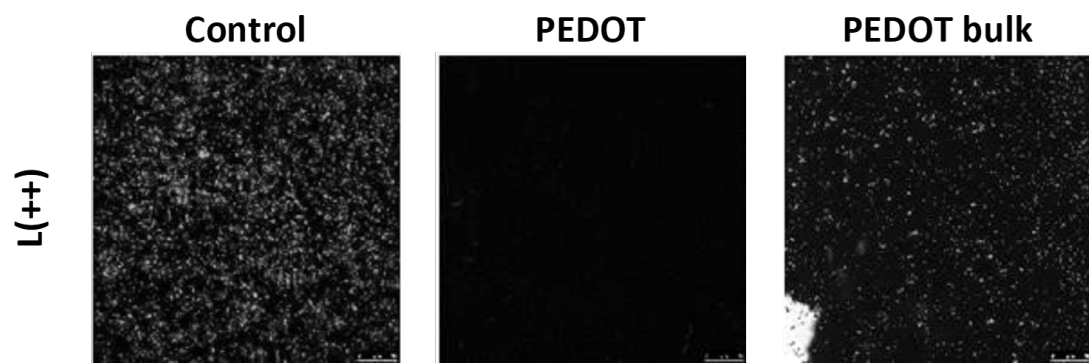


Fig. 3