

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 928 009**

21 Número de solicitud: 202130430

51 Int. Cl.:

**B01J 23/16** (2006.01)

**B01J 23/06** (2006.01)

12

PATENTE DE INVENCION CON EXAMEN

B2

22 Fecha de presentación:

**11.05.2021**

43 Fecha de publicación de la solicitud:

**14.11.2022**

Fecha de concesión:

**27.03.2023**

45 Fecha de publicación de la concesión:

**03.04.2023**

73 Titular/es:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS (CSIC) (78.0%)  
C/ Serrano, 117  
28006 Madrid (Madrid) ES y  
UNIVERSIDAD DE ALCALÁ (22.0%)**

72 Inventor/es:

**IGLESIAS JUEZ, Ana;  
BACHILLER BAEZA, Belén;  
CASTILLEJOS LÓPEZ, Eva;  
FRESNO GARCÍA, Fernando;  
ALCAMÍ PERTEJO, Antonio;  
VÁZQUEZ CALVO, Ángela;  
VALENZUELA ÁVILA, Laura y  
ROSAL GARCÍA, Roberto**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

54 Título: **Recubrimiento fotocatalítico con propiedades antimicrobianas**

57 Resumen:

Recubrimiento fotocatalítico con propiedades antimicrobianas.

La presente invención se refiere a un recubrimiento fotocatalítico con propiedades antimicrobianas basado en un nanocomposite resultado de una heterounión de  $\text{BiVO}_4$  y  $\text{ZnO}$  obtenida mediante un proceso sol-gel. Este recubrimiento tiene acción viricida y bactericida, ya que por un lado reduce la adhesión bacteriana a las superficies, lo que dificulta su colonización (en condiciones oscuras) y, por otro, además presenta una alta inactivación fotocatalítica de virus y bacterias tras ser irradiado, por lo que las superficies de los sustratos permanecen libres de virus, de colonización bacteriana y de formación de biopelículas.

ES 2 928 009 B2

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).

## DESCRIPCIÓN

### Recubrimiento fotocatalítico con propiedades antimicrobianas

5 La presente invención se refiere a un recubrimiento fotocatalítico con propiedades antimicrobianas basado en un nanocomposite resultado de una heterounión de BiVO<sub>4</sub> y ZnO obtenida mediante un proceso sol-gel. Este recubrimiento tiene acción viricida y bactericida, ya que por un lado reduce la adhesión bacteriana a las superficies, lo que dificulta su colonización (en condiciones oscuras) y, por otro, además presenta una alta  
10 inactivación fotocatalítica de virus y bacterias tras ser irradiado, por lo que las superficies de los sustratos permanecen libres de virus, de colonización bacteriana y de formación de biopelículas.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

15 Las infecciones por diferentes tipos de patógenos causan enfermedades contagiosas que pueden conducir a una significativa mortalidad, particularmente en pacientes ancianos e inmunodeprimidos, como es el caso de las infecciones víricas que afectan de forma aguda el tracto respiratorio. Los coronavirus pueden infectar al ser humano  
20 causando enfermedades que van desde el resfriado común hasta enfermedades más graves, como bronquitis, bronquiolitis, neumonías y síndromes respiratorios agudos, entre otras, y la mayoría de las personas se infectan por estos virus en algún momento de su vida. Desde finales del 2019, la aparición de un nuevo tipo de coronavirus llamado Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), [Gorbalenya, A.E.  
25 et al. *Nat. Microbiol.*, 2020, 5, 536-544.] ha producido una pandemia mundial que está causando un elevado número de fallecimientos y pacientes infectados con serias secuelas de salud. El tiempo de supervivencia de los virus en el medio ambiente es relativamente bajo, aunque algunos virus pueden sobrevivir durante más tiempo dependiendo de las condiciones ambientales locales (temperatura, humedad y  
30 velocidad del aire) y el tipo de material sobre el que se depositan las partículas víricas. Se ha demostrado que el SARS-CoV-2, como muchos otros virus estudiados, puede sobrevivir en distintas superficies durante varias horas, incluso días [Warnes, S.L. et al. *MBio*, **2015**, 6, e01697-e15; van Doremalen, N. et. al *N. Engl. J. Med.*, **2020**, 382, 1564-1567]. Esto supone un importante riesgo de contagio dado que se pueden transferir por  
35 contacto.

Además, en las últimas décadas, el aumento de la resistencia de las bacterias a los antibióticos convencionales ha causado serios problemas de salud. Se sabe que más del 70% de las infecciones bacterianas son resistentes a uno o más de los antibióticos que se utilizan generalmente para erradicar la infección.

5

Como resultado, el contagio de microbios patógenos sigue siendo una de las causas más comunes de muerte. Todo esto ha llevado a importantes investigaciones en el desarrollo de soluciones tecnológicas que se puedan implementar para prevenir la diseminación de estos agentes (tanto virus como bacterias) sobre superficies (de  
10 trabajo, de instrumental, de tránsito...) y evitar su transmisión por contacto.

En este sentido, las superficies antimicrobianas que contienen un agente biocida actúan como barrera de contención ya que inhiben o reducen la capacidad de crecimiento de los microorganismos en la superficie de los materiales. Los recubrimientos antimicrobianos fotocatalíticos basados en nanopartículas de óxidos metálicos  
15 presentan un prometedor potencial para inactivar una amplia gama de microorganismos [Liu, Y. et al. *Chem. Soc. Rev.* **2019**, 48, 428–446, Gian Luca Guerrini, G.L. *J. Photocatal.*, **2021**, 2, 25-34}. Estos óxidos semiconductores, que exhiben actividad antimicrobiana, son capaces de catalizar diversas reacciones al ser activados mediante  
20 luz y no implican la liberación de ningún compuesto dañino. Suponen un enfoque emergente que se usa para inactivar una amplia variedad de microorganismos, y de esta forma prevenir problemas de transmisión e infección [Yemmireddy, V. K. & Hung, Y. C. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **2017**, 16, 617–631].

Entre los semiconductores inorgánicos, el óxido de zinc (ZnO) es uno de los fotocatalizadores más prometedores debido a su abundancia natural, bajo costo, escasa toxicidad y su compatibilidad con la piel humana, que hacen que sea un aditivo adecuado para los materiales textiles y las superficies que entran en contacto con el cuerpo humano. Asimismo, presenta, buena estabilidad química, la posibilidad de crear  
30 diferentes arquitecturas nanométricas, un band-gap ancho (3.37 eV) y una energía de excitación alta (60 meV). Además, el ZnO muestra actividad antimicrobiana contra diferentes microorganismos gracias principalmente a la generación de radicales (especies reactivas de oxígeno, ROS) y la liberación de cationes metálicos (Zn<sup>2+</sup>). Sin embargo, su acción está limitada al empleo solo de luz ultravioleta (región de absorción  
35 de su band-gap) y es necesario reducir la recombinación de los huecos y electrones

fotogenerados, que conduce a rendimientos cuánticos bajos, siendo estos los principales inconvenientes en el uso del ZnO como fotocatalizador, que condicionan su aplicación práctica.

5 Por otra parte, el vanadato de bismuto ( $\text{BiVO}_4$ ) es un óxido mixto de dos metales, y un fotocatalizador que es activado con luz visible gracias a un menor band gap de 2,4 eV. Además, presenta una alta movilidad de las cargas fotogeneradas. El  $\text{BiVO}_4$  existe en cuatro formas polimorfas: ortorrómbico, tetragonal y monoclinico, además de una fase tetragonal reversible, formada a partir de la monoclinica a 528 K.

10

Existen ya en la literatura combinaciones tipo p-n del  $\text{BiVO}_4$  con otros semiconductores como el  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{BiFO}_3$  y ZnO, entre otros, con aplicaciones como electrodos, fundamentalmente como ánodos aplicados en el proceso de *wáter splitting* [Huang, X. et al. *Mater. Sci. Semicond. Process.*, **2019**, 97, 106–111].

15

Existen diversas técnicas para depositar nanopartículas como una película delgada o monocapa sobre un sustrato, y la elección depende fundamentalmente del área que se va a cubrir, la elección del disolvente, la concentración de partículas... Para sustratos relativamente pequeños ( $\sim 1\text{-}2\text{ cm}^2$ ), el método de *drop-casting* (deposición por gota) es  
20 fácil y rápido. En principio, el espesor de la película depende del disolvente, del volumen dispersado y de la concentración de partículas, los cuales pueden variarse fácilmente y puede ajustarse de forma sencilla. El método de *spin-coating* es también una técnica simple y con la que se pueden obtener capas muy homogéneas y uniformes sobre superficies planas [Kawa, M. et al. *Nat. Commun.*, **2012**, 3, 1–8]. Se puede controlar el  
25 espesor y la topografía de la película mediante deposición de capas sucesivas de películas del material optimizando la cantidad y las velocidades de rotación. Otras ventajas que aporta esta técnica es la rapidez de operación, una buena reproducibilidad y rentabilidad. Otras técnicas alternativas, como la deposición electroquímica, la pulverización o la electro-pulverización, presentan múltiples variables acopladas,  
30 haciendo la optimización del proceso mucho más compleja.

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a la preparación de recubrimientos con propiedades  
35 biocidas muy eficientes para evitar la transmisión e infección por bacterias y virus a

través del contacto con las superficies donde se depositan. Estos recubrimientos son activos gracias a la optimización de los procesos de transferencia de carga tras iluminar y la estabilidad de los materiales. En consecuencia, inactivan bacterias y virus en las superficies.

5

Por lo tanto, este recubrimiento por un lado reduce la adhesión bacteriana a las superficies, lo que dificulta su colonización (en condiciones oscuras), y presenta, además, una actividad fotocatalítica de alta eficiencia tras ser irradiado (iluminación solar o de sala), por lo que las superficies de los sustratos permanecen libres de colonización bacteriana y formación de biopelículas. Por otro lado, inactiva virus depositados en las superficies tras ser irradiadas con luz UVA de baja potencia.

Para ello, la presente invención se refiere, por un lado, a un recubrimiento que comprende un nanocomposite fotoactivo basado en  $\text{BiVO}_4/\text{ZnO}$  y su procedimiento de obtención, y, por otro, a su aplicación como superficie fotoactiva con alta función biocida. La invención se enmarca por tanto en el sector de la salud y tiene su aplicación no sólo en el ámbito hospitalario y de la industria alimentaria para evitar infecciones, sino que también se puede extender a todos aquellos entornos con gran tránsito de personas, como guarderías y colegios, aeropuertos, gimnasios, instalaciones deportivas, restaurantes, hoteles, oficinas, estaciones de transporte masivo, edificios públicos, áreas comerciales y residenciales, cuyas superficies de contacto se convierten en focos de propagación de infecciones y enfermedades, por las condiciones de aglomeración, calor y humedad.

Para tal fin, inicialmente se sintetizaron separadamente nanopartículas de  $\text{ZnO}$  y  $\text{BiVO}_4$ . Las nanopartículas de  $\text{ZnO}$  presentan estructura tipo *Wurtzite* y se forman por un procedimiento sol-gel, dando lugar a suspensiones estables de nanopartículas del óxido en un medio alcohólico; mientras que el  $\text{BiVO}_4$  se sintetizó mediante el método hidrotermal. Posteriormente, los diferentes composites  $\text{BiVO}_4/\text{ZnO}$  se obtuvieron mezclando la suspensión sol-gel de  $\text{ZnO}$  con diferentes proporciones de  $\text{BiVO}_4$  siguiendo un novedoso protocolo definido de agitación y sonicación. La suspensión obtenida con ambos óxidos fue finalmente depositada sobre superficies de vidrio, particularmente mediante las técnicas de *spin-coating* y *drop-casting*.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un recubrimiento que

comprende una composición de agregados de ZnO de entre 50 y 100 nm dispersos sobre agregados de BiVO<sub>4</sub>, con un contenido en BiVO<sub>4</sub> de entre el 5 y el 50% en peso con respecto a la composición final.

- 5 Los agregados de BiVO<sub>4</sub> se encuentran en forma de láminas delgadas como entidades 2D de 200x200 nm<sup>2</sup>.

En una realización preferida el contenido en BiVO<sub>4</sub> es del 15% en peso.

- 10 Un segundo aspecto de la invención se refiere a un material que comprende el recubrimiento de la invención según se ha descrito anteriormente, y un sustrato donde se encuentra depositado dicho recubrimiento.

- En una realización preferida el sustrato se selecciona de entre sustratos de vidrio,  
15 metálicos, poliméricos, cerámicos, textiles, maderas, entre otros. Más preferiblemente, el sustrato es vidrio.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de obtención del material de la invención, que comprende las siguientes etapas:

- 20 i) síntesis a través de un procedimiento sol-gel de los agregados de ZnO;  
ii) síntesis a través de un procedimiento hidrotermal de los agregados de BiVO<sub>4</sub>;  
iii) dispersión de los agregados de BiVO<sub>4</sub> obtenidos en la etapa ii) en el sol-gel de agregados de ZnO de la etapa i) hasta una concentración final de entre el 5 y el 50% en peso;  
25 iv) deposición de la suspensión de BiVO<sub>4</sub>/ZnO procedente de la etapa iii) sobre un sustrato.

En una realización preferida la concentración de BiVO<sub>4</sub> en la etapa ii) es del 15% en peso.

30

En una realización más preferida la dispersión de la etapa iii) tiene lugar mediante una combinación de ultrasonidos y agitación magnética.

- En otra realización preferida el sustrato de la etapa iv) se selecciona de entre sustratos  
35 de vidrio, metálicos, poliméricos, cerámicos, textiles, y maderas, entre otros.

Por otro lado, los recubrimientos de la invención, tal y como han sido definidos anteriormente, presentan propiedades fotocatalíticas antimicrobianas, representando una solución eficaz para inactivar una amplia variedad de microorganismos y prevenir problemas de transmisión e infección.

5

Por lo tanto, otro aspecto de la invención es el uso del recubrimiento de la invención tal y como ha sido descrito anteriormente, y/o del material que lo comprende, como bactericida y/o viricida.

10

En una realización preferida el recubrimiento y/o material de la invención se emplea para la eliminación de bacterias Gram-positivas seleccionadas de entre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguis*, *Clostridium tetani*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*.

15

En otra realización preferida el recubrimiento y/o material de la invención se emplea para la eliminación de bacterias Gram-negativas seleccionadas de entre *Escherichia coli.*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Brucella abortus*, *Francisella tularensis*, *Pasteurella multocida*.

20

En otra realización preferida el recubrimiento y/o material de la invención se emplea para la eliminación de virus, preferiblemente con envoltura lipídica, aún más preferiblemente de la familia *Coronaviridae* (coronavirus), y aún más preferiblemente del género *Alphacoronavirus* seleccionados de entre *HCoV-229E*, *HCoV-NL63*, *Alphacoronavirus 1*, *FCoV*, *TGEV*, *Miniopterus 1*, *Miniopterus HKU8*, *Rhinolophus HKU2* y *Scotophilus 512*.

25

En otra realización preferida el recubrimiento y/o material de la invención se emplea para la eliminación de coronavirus del género *Betacoronavirus* seleccionados de entre *SARS-CoV*, *SARS-CoV-2*, *HCoV-OC43*, *HCoV-HKU1*, *BtCoV-HKU9* y *MERS-CoV*.

30

En la presente invención, el término “agregados de ZnO” se refiere a nanopartículas con un tamaño comprendido entre 50 y 100 nm obtenidas mediante un método sol-gel que involucra una suspensión coloidal de nanopartículas.

35

En la presente invención, el término "sustrato" se refiere a cualquier superficie sobre la cual puede depositarse el recubrimiento de la invención. Los ejemplos de sustratos incluyen sin restricción vidrio, poliméricos, metal y madera, entre otros.

5 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  
10 que sean limitativos de la presente invención.

### **BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS**

**Fig. 1.** Unidades formadoras de colonias (CFU), Condiciones de oscuridad: L(-).  
15 Condiciones de iluminación diurna: L(+). *S. aureus*, aerosol.

**Fig. 2.** Unidades formadoras de colonias (CFU), Condiciones de oscuridad: L(-).  
Condiciones de iluminación diurna: L(+). *E. coli*, aerosol.

20 **Fig. 3.** Unidades formadoras de placas (PFU), Condiciones de oscuridad: L(-).  
Condiciones de iluminación con luz UVA durante 120 min: L(+). (A) *HCoV-229E* y (B) *SARS-CoV-2*.



## EJEMPLOS

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

5

### Ejemplo 1. Síntesis de agregados de ZnO

Los agregados de óxido de zinc se preparan mediante una síntesis sol-gel de acuerdo con un método mejorado derivado de Spanhel y Anderson [Valenzuela, L., Iglesias, A.,  
10 *et al.*, *Hazard. Mater.*, **2019**, 665–673]. Para ello se disuelve 0,14 M de acetato de zinc hidratado ( $\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{H}_2\text{O}$ ) en metanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ ) y se agita magnéticamente durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, sobre esta solución se añade, gota a gota, hidróxido de tetrametilamonio 0,14 M ( $(\text{CH}_3)_4\text{NOH}$ ) 25% en peso en metanol. Después de 48 horas en agitación, se obtiene un sol-gel estable de ZnO que se usa sin  
15 ningún acondicionamiento posterior.

### Ejemplo 2. Síntesis de los agregados de $\text{BiVO}_4$

El  $\text{BiVO}_4$  se sintetiza mediante un procedimiento hidrotermal. Para ello se prepararon  
20 dos soluciones: la primera solución contiene 5 mmol de  $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  en 10 ml de  $\text{HNO}_3$  4M. La segunda solución contiene 5 mmol de  $\text{NH}_4\text{VO}_3$  en 10 ml de 2M NaOH. Posteriormente, la segunda solución se vierte en la primera, formando una solución naranja intensa. El pH de la solución se eleva a 7 usando NaOH 2M y controlando el valor con un medidor de pH. A través de la basificación, se forma una suspensión  
25 amarilla. En este procedimiento hidrotermal, la suspensión se deja en agitación durante 30 minutos, y luego se transfiere a un autoclave de acero inoxidable con revestimiento de teflón que se calienta en un horno de convección a 453 K durante 24 h. El sólido amarillo final se separa por centrifugación, se lava en profundidad con  $\text{H}_2\text{O}$  y etanol, y se seca al aire a temperatura ambiente durante 12 h, y posteriormente a 373 K durante  
30 2 h.

De esta manera, el  $\text{BiVO}_4$  se obtuvo en fase monoclinica, con objeto de obtener el mejor rendimiento fotocatalítico. Sin embargo, presenta una baja área superficial, lo cual limitaría su aplicación catalítica.

35

### Ejemplo 3. Síntesis de los recubrimientos basados en BiVO<sub>4</sub>/ZnO

La cantidad apropiada de BiVO<sub>4</sub> (para obtener composiciones con concentraciones de BiVO<sub>4</sub> de entre el 5 y el 50% en peso) se dispersó en el sol-gel de agregados de ZnO  
5 obtenido en el Ejemplo 1 mediante una combinación de ultrasonidos y agitación magnética. De esta forma, el BiVO<sub>4</sub> se disgrega homogéneamente dentro de la suspensión favoreciendo un contacto íntimo entre los dos componentes. El composite que se obtiene está formado por láminas delgadas de BiVO<sub>4</sub> (entidades 2D de 200x200 nm<sup>2</sup>) decoradas con nanopartículas de ZnO.

10

Esta estrategia de combinar ambos materiales permitió superar los inconvenientes descritos para los materiales empleados individualmente, consiguiendo la obtención de un composite dirigido a favorecer el empleo de luz solar y reducir la recombinación de los pares electrón-hueco fotogenerados durante las reacciones fotocatalíticas y así  
15 aumentar las velocidades de fotoactividad evitando los fenómenos de desactivación.

Asimismo, la interacción entre ambos componentes, BiVO<sub>4</sub> y el ZnO, contrarresta la baja área superficial detectada para el BiVO<sub>4</sub>, al favorecer su dispersión, y por otro lado mejora en gran medida la actividad fotocatalítica debido a la separación eficiente de los  
20 pares de electrones-huecos fotogenerados al irradiar con la luz.

Por lo tanto, esta incorporación de BiVO<sub>4</sub> tipo p y ZnO tipo n y el campo eléctrico interno resultante en la interfaz de unión p-n conducen a aplicaciones fotocatalíticas y fotoelectrónicas mejoradas.

25

Finalmente, la suspensión de BiVO<sub>4</sub>/ZnO se deposita sobre sustratos de vidrio mediante la técnica de recubrimiento por rotación, *spin-coating*, para formas cuadradas (tamaños 1x1 cm<sup>2</sup> aprox.) y, mediante deposición por gota, *drop-casting*, para formas circulares (20 mm de diámetro). Antes del proceso de deposición, los sustratos de vidrio se  
30 limpiaron secuencialmente en un baño de ultrasonidos con detergente, agua destilada, acetona, etanol y agua destilada, y posteriormente se secaron a 423 K durante 10 minutos. El proceso de recubrimiento por rotación se realiza con un equipo WS-650-23B (Laurell Technologies Corporation) usando un método dinámico de 0,2 segundos de proyección a 500 rpm, seguido de 15 segundos de aceleración a 500 rpm y pasos de  
35 secado a 1500 y 3500 rpm, respectivamente. Después, los recubrimientos se secan a

423 K durante 10 minutos con objeto de evaporar el disolvente residual. El procedimiento de deposición por *spin-coating* se repite diez veces, es decir, deposición de 10 capas sucesivas. El proceso de recubrimiento por *drop-casting* se realiza usando una pipeta pasteur y depositando un total de 5 gotas. Después, los recubrimientos se secan a 423 K durante 10 minutos con objeto de evaporar el disolvente residual. En ambas técnicas, los recubrimientos finales se calcinan a 573 K durante 1 hora para obtener las películas de nanocomposite de BiVO<sub>4</sub>/ZnO, logrando una densidad de masa por superficie de  $0,11 \pm 0,05 \text{ mg cm}^{-2}$  y  $0,31 \pm 0,05 \text{ mg cm}^{-2}$ , respectivamente.

#### 10 **Ejemplo 4. Ensayos de actividad antimicrobiana y procedimientos bioanalíticos**

La actividad antibacteriana de los recubrimientos de BiVO<sub>4</sub>/ZnO sobre sustratos de vidrio de 1x1 cm<sup>2</sup> se investigó utilizando cultivos de bacterias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*) y Gram-negativas (*Escherichia coli*) formadoras de biopelículas, según la norma ISO 22196 referida a la "Actividad antibacteriana de superficies plásticas y otras superficies no porosas". Se ensayaron diferentes dosis de irradiación. La bioactividad de los recubrimientos se evaluó cuantificando el número de bacterias cultivables y visualizando la formación de biopelículas.

Los bioensayos se realizaron utilizando la metodología de exposición a los microorganismos por pulverización con aerosol. Se cargó una suspensión de células en un nebulizador, que generó un aerosol sobre los cubreobjetos de vidrio, recubiertos con el fotocatalizador y sin recubrir (denominado blanco o control). El aerosol que contenía bacterias se pulverizó en una cámara de polipropileno sellada. La temperatura se mantuvo a 310 K y la humedad relativa se controló por encima del 96%. Se permitió que las bacterias colonizaran las superficies y formaran biopelículas durante 20 horas a 310 K en oscuridad.

Inmediatamente después de la incubación, las muestras se irradiaron usando una lámpara de Xenon (simulador solar) con una irradiancia de 18,2 W.m<sup>-2</sup> (menor que la equivalente a la exposición natural diurna). También se realizaron ensayos con exposición a luz de sala o laboratorio. Se utilizaron distintos tiempos de exposición (3, 6 y 120 minutos).

Tras la irradiación, se realizó un recuento de colonias. El número de bacterias viables

adheridas a la superficie se determinó mediante el recuento en placa siguiendo la norma estándar ISO 22196. Para recuperar las bacterias adheridas a la superficie, se utilizó caldo SCDLP. Se realizaron diluciones seriadas 1/10 en placas estériles de 96 pocillos y se depositaron gotas de 10  $\mu$ L en placas Petri que contenían agar de recuento. Las  
5 placas Petri se incubaron a 310 K durante 24 horas y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) se determinó utilizando al menos tres réplicas con dos diluciones en serie como mínimo.

Se observa en las Figuras 1 y 2 que estas superficies presentan notables propiedades  
10 biocidas ya que inhiben en gran medida la adhesión bacteriana (en ausencia completa de luz) y combinadas con luz se mantienen libres de bacterias viables. La alta actividad fotocatalítica tiene efectos bactericidas sobre ambos tipos de bacterias Gram-positivas (*S. aureus*) y Gram-negativas (*E. coli*). Las superficies recubiertas con el composite con un contenido de  $\text{BiVO}_4$  del 15% en peso mostraron la mayor actividad antimicrobiana,  
15 con resultados de los más altos presentados en la literatura, tras solo unos minutos de iluminación. Las superficies permanecieron libres de colonización bacteriana y de formación de biopelículas. La mejora del rendimiento bactericida por la adición de  $\text{BiVO}_4$  se debe a la reducción efectiva de la recombinación de pares de electrones-hueco fotogenerados y se correlaciona con una mayor generación de radicales  $\text{HO}^\bullet$  (especies  
20 ROS). Estas especies ROS fotogeneradas causan daño en la membrana celular y producen un alto estrés oxidativo intracelular en las bacterias.

#### **Ejemplo 5. Ensayos de actividad viricida**

25 La actividad viricida de los recubrimientos de  $\text{BiVO}_4/\text{ZnO}$  sobre sustratos de vidrio circulares de 20 mm de diámetro se investigó utilizando virus con envoltura lipídica de la familia *Coronaviridae* (virus *HCoV-229E* y *SARS-CoV-2*). La bioactividad de los recubrimientos se evaluó cuantificando el número de unidades formadoras de placas (ufp) recuperadas en células susceptibles.

30

Los bioensayos se realizaron utilizando la metodología de exposición a los virus por  
inoculación de 100  $\mu$ l de la suspensión del virus sobre la superficie de vidrio recubierta con el fotocatalizador o sin recubrir (control).

35 Inmediatamente después de la incubación, las muestras se irradiaron usando dos

lámparas de luz UVA (pico centrado en 368 nm) con una irradiancia de 3,6 W.m<sup>2</sup>. Se utilizaron distintos tiempos de exposición (30, 60, 90 y 120 minutos).

Tras la irradiación, se recuperó el virus adherido a la superficie mediante lavados con el  
5 medio de recuperación de virus [DMEM completo con 2% suero fetal bovino (SFB)]. A partir de la solución de virus recuperado, se realizaron diluciones en serie de 10 veces en placas estériles de 48 pocillos. El número de virus viables recuperado se determinó mediante un ensayo de titulación viral en medio semisólido por duplicado. Para ello, se emplearon 200 µl de cada dilución para infectar monocapas de células HuH7, en el caso  
10 del virus *HCoV-229E*, o Vero E6, en el caso del virus *SARS-CoV-2*, crecidas en placas de 12 pocillos. Tras la primera hora de infección, se retiró el inóculo y se añadió medio semisólido (0,7% agar noble, 2% SFB y 0,045 mg/ml DEAE-dextrano en DMEM, en el caso de *HCoV-229E*, o medio DMEM con carboximetilcelulosa al 4% SFB para *SARS-CoV-2*). Posteriormente, en el caso de la titulación del virus *HCoV-229E*, las placas  
15 fueron incubadas a 306 K durante 4 días, tiempo tras el cual se fijaron con una solución de 2% formaldehído durante 15 minutos. Para la titulación del virus *SARS-CoV-2*, las placas fueron incubadas a 310 K durante 3 días y se fijaron con una solución de 10% formaldehído durante 45 minutos. Tras la fijación, en ambos casos, se retiró el medio semisólido y las placas se tiñeron con 0,02% cristal violeta en 10% etanol y 2%  
20 formaldehído. Finalmente se contaron las unidades formadoras de placas (ufp) formadas (ver Figura 3).

## REIVINDICACIONES

1. Un recubrimiento que comprende una composición de agregados de ZnO de entre 50 y 100 nm dispersos sobre agregados bidimensionales de BiVO<sub>4</sub> con un contenido en BiVO<sub>4</sub> de entre el 5 y el 50% en peso con respecto a la composición final.  
5
2. Recubrimiento según la reivindicación anterior donde el contenido en BiVO<sub>4</sub> es del 15% en peso.
- 10 3. Un material que comprende el recubrimiento según cualquiera de las reivindicaciones anteriores y un sustrato donde se encuentra depositado dicho recubrimiento.
4. Material según la reivindicación anterior, donde el sustrato se selecciona de entre sustratos de vidrio, madera, poliméricos y metal.  
15
5. Un procedimiento de obtención del material según cualquiera de las reivindicaciones 3 y 4, que comprende las siguientes etapas:
  - i) síntesis a través de un procedimiento sol-gel de los agregados de ZnO;
  - 20 ii) síntesis a través de un procedimiento hidrotermal de los agregados de BiVO<sub>4</sub>;
  - iii) dispersión de los agregados de BiVO<sub>4</sub> obtenidas en la etapa ii) en el sol-gel de agregados de ZnO de la etapa i) hasta una concentración final de entre el 5 y el 50% en peso;
  - iv) deposición de la suspensión de BiVO<sub>4</sub>/ZnO procedente de la etapa iii) sobre  
25 un sustrato.
6. Procedimiento según la reivindicación anterior donde la concentración de BiVO<sub>4</sub> en la etapa ii) es del 15% en peso.
- 30 7. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 6 donde la dispersión de la etapa iii) tiene lugar mediante una combinación de ultrasonidos y agitación magnética.
8. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 5 a 7 donde el sustrato de la etapa iv) se selecciona de entre sustratos de vidrio, poliméricos, madera, y metal.  
35

9. Uso de un recubrimiento descrito según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2 y/o del material descrito según cualquiera de las reivindicaciones 3 o 4 como bactericida y/o viricida.
- 5
10. Uso según la reivindicación anterior como bactericida contra bacterias Gram-positivas seleccionadas de entre *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyrogenes*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus sanguis*, *Clostridium tetani*, *Bacillus anthracis*, *Clostridium botulinum*,
- 10 *Clostridium perfringes*.
11. Uso según la reivindicación 9 como bactericida contra bacterias Gram-negativas seleccionadas de entre *Escherichia coli*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Salmonella typhi*, *Salmonella enteritidis*, *Haemophilus influenzae*,
- 15 *Bordetella pertussis*, *Brucella abortus*, *Francisella tularensis*, *Pasteurella multocida*.
12. Uso según la reivindicación 9 como viricida contra virus con envoltura lipídica de la familia *Coronaviridae*.
- 20
13. Uso según la reivindicación anterior contra virus del género *Alphacoronavirus* seleccionados de entre *HCoV-229E*, *HCoV-NL63*, *Alphacoronavirus 1*, *FCoV*, *TGEV*, *Miniopterus 1*, *Miniopterus HKU8*, *Rhinolophus HKU2* y *Scotophilus 512*.
- 25
14. Uso según la reivindicación 12 contra virus del género *Betacoronavirus* seleccionados de entre *SARS-CoV*, *SARS-CoV-2*, *HCoV-OC43*, *HCoV-HKU1*, *BtCoV-HKU9* y *MERS-CoV*.

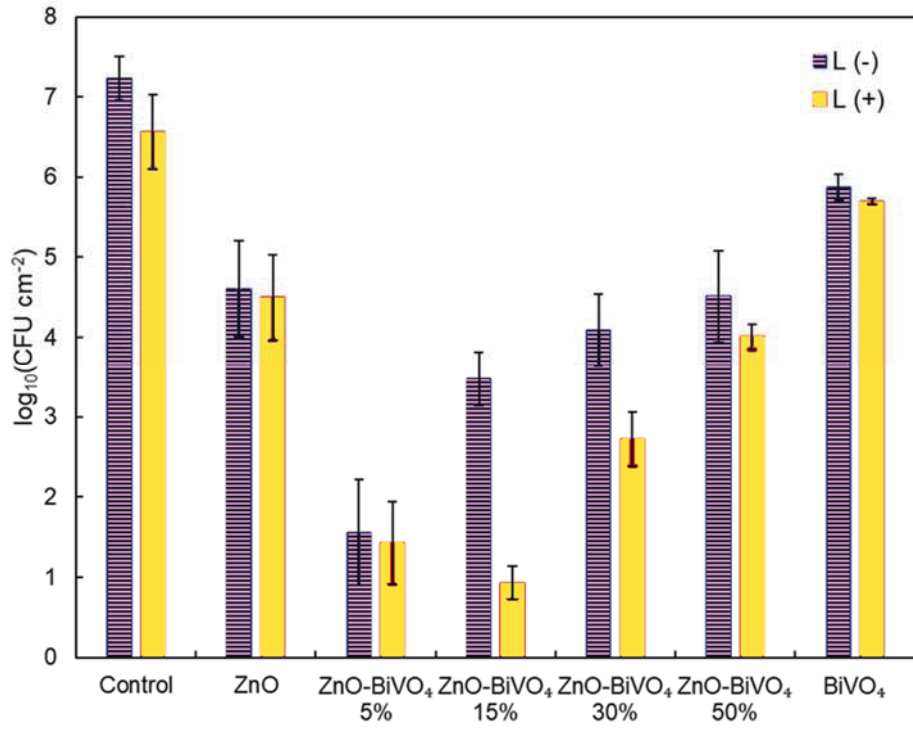


Fig. 1

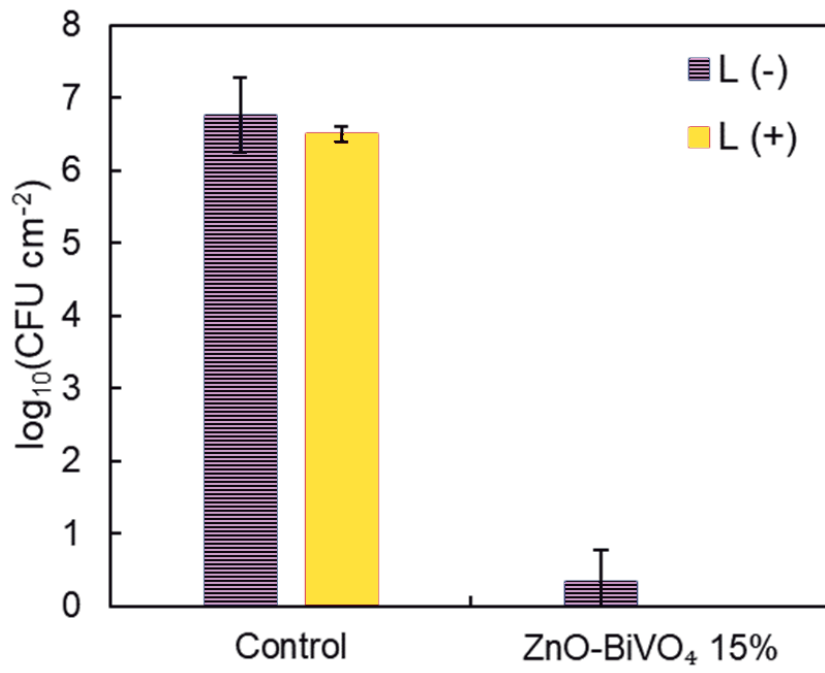


Fig. 2



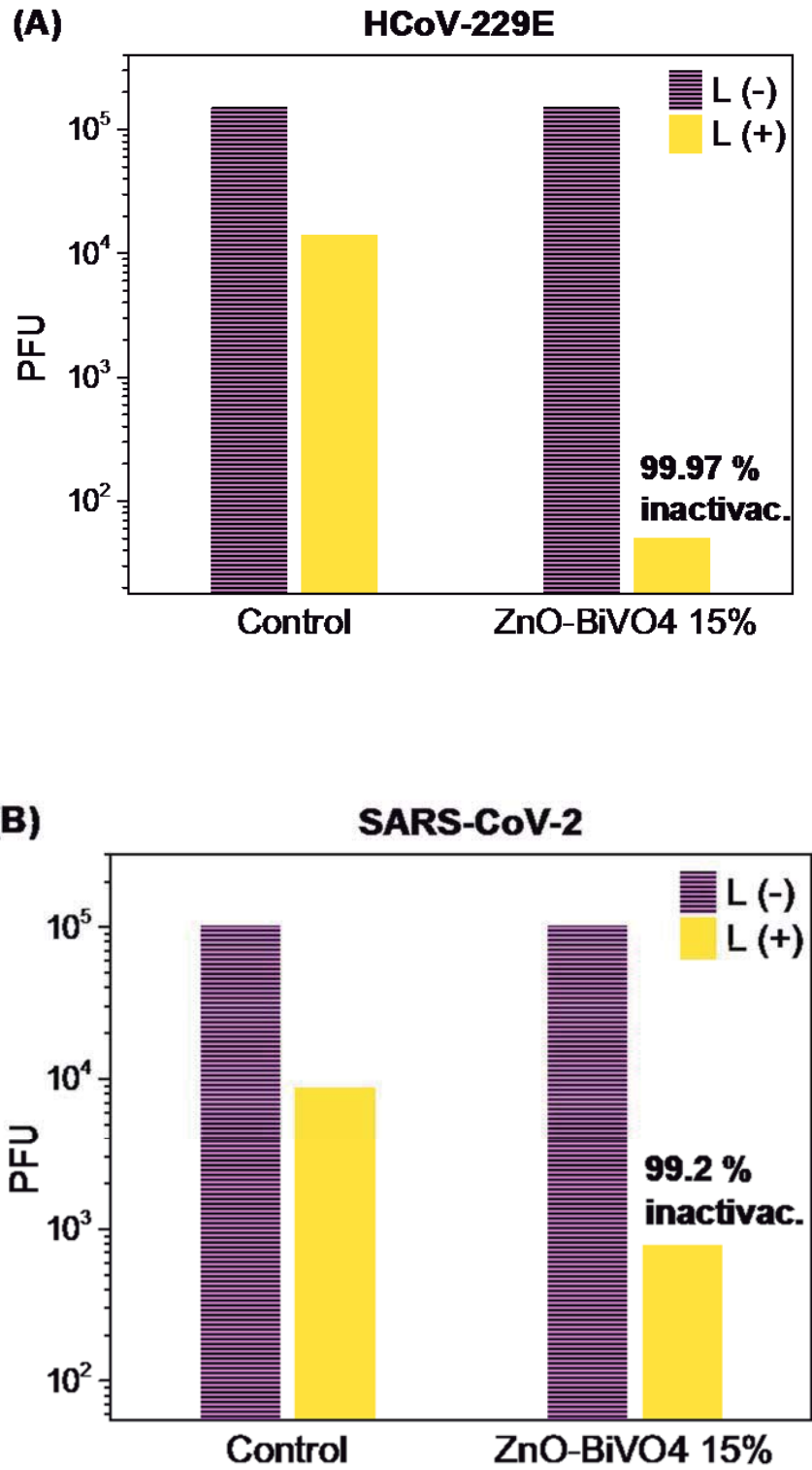


Fig. 3