

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
23 de enero de 2025 (23.01.2025)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2025/017233 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:

A01N 25/10 (2006.01) *A01N 35/04* (2006.01)
A01N 55/00 (2006.01) *A01P 1/00* (2006.01)
A01N 55/10 (2006.01) *C09D 5/14* (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:

PCT/ES2024/070445

(22) Fecha de presentación internacional:

12 de julio de 2024 (12.07.2024)

(25) Idioma de presentación:

español

(26) Idioma de publicación:

español

(30) Datos relativos a la prioridad:

P202330594 14 de julio de 2023 (14.07.2023) ES

(71) Solicitante: **UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA** [ES/ES]; Camino De Vera, S/N, 46022 Valencia (ES).

(72) Inventores: **MEDAGLIA, Serena**; Camino De Vera, S/N, 46022 Valencia (ES). **BERNARDOS BAU, Andrea**; Camino De Vera, S/N, 46022 Valencia (ES). **MARCOS MARTÍNEZ, María Dolores**; Camino De Vera, S/N, 46022 Valencia (ES). **MARTÍNEZ MAÑEZ, Ramón**; Camino De Vera, S/N, 46022 Valencia (ES).

(74) Mandatario: **ISERN JARA, Jorge**; Avda. Diagonal 463 Bis, 08036 Barcelona (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaraciones según la Regla 4.17:

— sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
— antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: ANTIMICROBIAL COATINGS

(54) Título: RECUBRIMIENTOS ANTIMICROBIANOS

(57) Abstract: The present invention relates to an antimicrobial coating. More specifically, the invention relates to a coating comprising a layer of silica and bioactive molecules functionalised with a linker molecule, wherein the functionalised bioactive molecules are covalently immobilised on the surface of the silica by means of covalent bonds, to its preparation process and use thereof in the prevention of microbial growth, biofilm formation, the inhibition of microbial adhesion and/or the removal of microbial cells adhered to it.

(57) Resumen: La presente invención se refiere a un recubrimiento antimicrobiano. Más concretamente, la invención se refiere a un recubrimiento que comprende una capa de sílice y moléculas bioactivas funcionalizadas con una molécula de enlace, donde las moléculas bioactivas funcionalizadas están inmovilizadas covalentemente a la superficie de la sílice mediante enlaces covalentes, a su proceso de preparación y su uso en la prevención del crecimiento microbiano, formación de biopelículas, la inhibición de la adhesión microbiana y/o la eliminación de células microbianas adheridas al mismo.



WO 2025/017233 A1

DESCRIPCIÓN

Recubrimientos antimicrobianos

Campo Técnico

5

La presente invención se refiere a un recubrimiento antimicrobiano, a su proceso de preparación y su uso en la prevención del crecimiento microbiano, formación de biopelículas, la inhibición de la adhesión microbiana y/o la eliminación de células microbianas adheridas al mismo.

10

Antecedentes de la Invención

15

Las infecciones nosocomiales constituyen uno de los problemas más importantes que se presentan en el sistema de salud, siendo una de las principales causas de mortalidad y aumento de la morbilidad en los pacientes hospitalizados. Una de las principales razones de estas infecciones es la capacidad microbiana de adherirse a superficies sólidas (bióticas o abióticas). Esta capacidad provoca la formación de estructuras poliméricas denominadas biopelículas. La función de las biopelículas es actuar como una trampa para los nutrientes y como una barrera física que impide la penetración y difusión de antibióticos y desinfectantes comunes.

20

25

La formación de biopelículas comienza con la adhesión de células planctónicas individuales a una superficie. Estas células adherentes se convierten en micro colonias que luego proliferan en biopelículas maduras. Las biopelículas maduras producen componentes de matriz extracelular (ECM) que son críticos para mantener las estructuras distintivas de los agregados celulares.

30

Una estrategia efectiva para prevenir la formación de biopelículas en superficies bióticas y abióticas es depositar una capa antimicrobiana en la superficie del material. Existen varios estudios basados en la inmovilización o liberación de sustancias antimicrobianas sobre diferentes superficies, sin embargo, dependiendo de la aplicación, no son completamente exitosos debido a su limitada eficacia o toxicidad.

35

La inmovilización o liberación de sustancias antimicrobianas, como derivados de metales, sales de poliamonio y antibióticos, ha mostrado resultados alentadores. Aun así, su uso puede estar asociado con efectos secundarios como citotoxicidad, hipersensibilidad y

respuestas inflamatorias. Además, el uso indiscriminado de estas sustancias ha generado un problema mayor, que es la resistencia antimicrobiana. La resistencia a los antimicrobianos (RAM) ocurre cuando las bacterias, los virus, los hongos y/o los parásitos cambian con el tiempo y ya no responden a los medicamentos, lo que hace que las infecciones sean más difíciles de tratar y aumenta el riesgo de propagación de enfermedades, enfermedades graves y muerte. Como resultado de la resistencia a los medicamentos, los antibióticos y otros medicamentos antimicrobianos se vuelven ineficaces y las infecciones se vuelven cada vez más difíciles o imposibles de tratar.

Se han empleado varios enfoques en la búsqueda de superficies antimicrobianas efectivas, incluida la resistencia a la adhesión, la destrucción por contacto y la lixiviación de biocidas. Entre estos enfoques, la muerte bacteriana por contacto parece ser la ruta más prometedora; este enfoque implica modificaciones químicas o físicas para unir un agente antimicrobiano a la superficie.

Entre las estrategias más comúnmente aplicadas para la modificación de superficies se encuentran la adsorción (a través de interacciones electrostáticas), el acoplamiento ligando-receptor y la unión covalente (Vasilev K, Cook J, Griesser HJ. Antibacterial surfaces for biomedical devices. Expert Rev Med Devices. 2009;6(5):553-567).

La unión covalente ofrece varias ventajas al proporcionar los enlaces más estables entre el compuesto bioactivo y la superficie. Algunos estudios han reportado la inmovilización sobre superficies de acero inoxidable u otras superficies (plástico, titanio y otras) de ciertas moléculas bioactivas como péptidos antibacterianos como magainina, nisina y lisozima o la inmovilización de biopolímeros como el quitosano.

Algunas de las estrategias desarrolladas recientemente se describen a continuación.

La solicitud de patente española EP3326971A1, "Sistema antimicrobiano", divulga la funcionalización de antimicrobianos naturales con grupos trialcóxidosilano sobre la superficie de un soporte mesoporoso de sílice.

El artículo "Antibacterial isoeugenol coating on stainless steel and polyethylene surfaces prevents biofilm growth" (Nielsen, C. K., et al. "Antibacterial isoeugenol coating on stainless steel and polyethylene surfaces prevents biofilm growth". Journal of applied microbiology

124.1 (2018): 179-187) divulga recubrimientos de superficies de acero inoxidable y de polietileno con eugenol, para evitar el crecimiento de biofilms.

El documento "Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles" (Ruiz-Rico, María, et al. "Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles." Food chemistry 233 (2017): 228-236.) divulga la inmovilización de aceites esenciales mediante 3-aminopropil trietoxisilano, sobre tres soportes distintos de silicio.

El documento "Métodos y soportes para la inmovilización de componentes de aceites esenciales y su efecto sobre la actividad antimicrobiana y antioxidante" (Cebrián Cabo, Santiago. "Métodos y soportes para la inmovilización de componentes de aceites esenciales y su efecto sobre la actividad antimicrobiana y antioxidante." (2020)) describe la inmovilización de componentes de aceites esenciales en nanopartículas de sílice.

La solicitud de patente internacional WO2021107870A1 divulga un polímero antimicrobiano y la preparación de recubrimientos de superficies para aplicaciones antimicrobianas.

La solicitud de patente internacional WO2022067358A1 divulga recubrimiento antimicrobiano que comprende un sustrato, una molécula de enlace y un biosurfactante, donde el biosurfactante se une covalentemente a la superficie del material del sustrato.

No obstante, las estrategias descritas en estado de la técnica presentan varios inconvenientes tales como la poca robustez de la unión con la molécula bioactiva que eventualmente resulta en una baja actividad microbiana y potencial de reutilización de la superficie bajo. Además, los sistemas descritos no son fácilmente aplicables a distintas superficies, por ejemplo, paredes o encimeras, y/o elementos, por ejemplo, material quirúrgico o prótesis.

La presente invención proporciona una solución a ese problema.

Sumario de la invención

En un primer aspecto, la invención se refiere a un recubrimiento antimicrobiano que comprende una capa de sílice y moléculas bioactivas funcionalizadas con una molécula de

enlace, donde las moléculas bioactivas funcionalizadas están inmovilizadas covalentemente a la superficie de la sílice mediante enlaces covalentes.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un proceso para depositar un recubrimiento antimicrobiano de acuerdo al primer aspecto de la invención que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar un sustrato,
- b) activación de la superficie del sustrato mediante el tratamiento del sustrato con una solución de ácido sulfúrico y peróxido de hidrógeno.
- c) deposición de una capa de sílice en la superficie del sustrato mediante la polimerización de precursores de sílice en medio alcalino,
- d) funcionalización de las moléculas bioactivas mediante su reacción con la molécula de enlace en fase líquida,
- e) inmovilización covalente de las moléculas bioactivas funcionalizadas obtenidas en la etapa d) sobre la capa de sílice generada en la etapa c) mediante la deposición de una solución alcohólica que comprende las moléculas bioactivas funcionalizadas, y
- f) secado de la superficie a temperatura ambiente.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a un elemento, por ejemplo, herramientas quirúrgicas, o superficies, por ejemplo, paredes o suelos, que comprende al menos parcialmente un recubrimiento antimicrobiano de acuerdo al primer aspecto o un recubrimiento preparado de acuerdo al segundo aspecto de la invención.

En un cuarto aspecto, la invención se refiere al uso de un recubrimiento antimicrobiano de acuerdo al primer aspecto, un recubrimiento antimicrobiano preparado de acuerdo al segundo aspecto o de un elemento o superficie de acuerdo al tercer aspecto de la invención en la prevención del crecimiento microbiano, formación de biopelículas, la inhibición de la adhesión microbiana y/o la eliminación de células microbianas adheridas al mismo.

Descripción de las figuras

Figura 1. Análisis HR-FESEM EDX de las superficies SS y SS-SiO₂ para la determinación del grosor de la capa de sílice de la superficie SS-SiO₂.

Figura 2. Comparativa de recuentos (UFC, %) de la bacteria *S. epidermidis* después del contacto con superficies funcionalizadas (SS-SiO₂-Van) y no funcionalizadas (SS, SS-OH y SS-SiO₂) en función del tiempo.

5

Figura 3. Robustez del efecto antimicrobiano de las superficies SS-SiO₂-Van frente a *S. epidermidis* tras varios test sucesivos.

Figura 4. Comparativa de recuentos (log CFU/ml, %) de la bacteria *E. coli* después del contacto con superficies funcionalizadas (PP-SiO₂-Van) y no funcionalizadas (PP, PP-OH y PP-SiO₂) después de 24h.

10

Figura 5. Capacidad inhibitoria para la formación de biopelículas de superficies SS-SiO₂-Van frente a *S. epidermidis* después de 24h.

15

Figura 6. Análisis HR-FESEM EDX de las superficies SS, SS-SiO₂, SS-SiO₂-Van y SS-SiO₂-Van después del ensayo contra biofilm.

Figura 7. Análisis HR-FESEM EDX de las superficies SS, SS-Van y SS-Van después del ensayo contra biofilm.

20

Figura 8. Ensayo antimicrobiano de inhibición de la formación de biofilms de las distintas superficies de acero frente a *S. epidermidis*.

Figura 9. Ensayo antimicrobiano de inhibición de la formación de biofilms de las distintas superficies de acero frente a *S. epidermidis* en un segundo ciclo de uso.

25

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un recubrimiento antimicrobiano que comprende una capa de sílice y moléculas bioactivas funcionalizadas con una molécula de enlace, donde las moléculas bioactivas funcionalizadas están inmovilizadas covalentemente a la superficie de la sílice mediante enlaces covalentes.

30

El uso de recubrimientos antimicrobianos mejorados por una inmovilización covalente de una molécula antimicrobiana bioactiva en la superficie mediante una capa intermedia de

35

sílice, supone una novedad en este campo técnico. En particular en lo que se refiere a la bacteria *S. epidermidis*, considerada una de las causas más frecuentes de infecciones nosocomiales y principal patógeno responsable de las infecciones crónicas asociadas al biopelículas en tejidos como la piel, las vías respiratorias y los dispositivos médicos.

5

El término “antimicrobiano” se refiere a un elemento que impide la formación o el desarrollo de los microorganismos. En particular, se refiere a un recubrimiento que previene el crecimiento microbiano, la formación de biopelículas, inhibe la adhesión microbiana y/o elimina las células microbianas adheridas al mismo.

10

El término “molécula bioactiva” se refiere a moléculas que poseen actividad antimicrobiana, en particular antibacteriana, antifúngica y/o antiviral.

15

El término “polímero(s)” en el contexto de esta solicitud significa oligómero(s), polímero(s) y copolímero(s), sus mezclas y principalmente también su formación de composites con base orgánica y/o sustancialmente orgánica. Habitualmente, el (los) “polímero(s)” en el contexto de esta solicitud se presenta(n) predominantemente o completamente en forma de polímero(s) y/o copolímero(s).

20

El término “funcionalizar” se refiere a la modificación de una superficie o molécula para incorporar ciertos elementos, por ejemplo, grupos funcionales o moléculas, que doten dicha superficie de propiedades fisicoquímicas particulares.

25

El término “activar” se refiere a la capacidad, en un paso procedimental posterior, por ejemplo, una etapa de inmersión, de una solución y/o una dispersión acuosa, cerca de la superficie del sustrato, de generar grupos hidroxilo. En el procedimiento de acuerdo con la invención se crea de esta manera una condición de que puede formarse una capa secuencial sobre el sustrato.

30

El término “inmovilización covalente” se refiere a la unión mediante un enlace covalente. En particular se refiere a la unión entre sustrato y sílice y a la unión sílice y molécula bioactiva mediante enlaces covalentes.

35

Más específicamente, la presente invención se basa en la mejora y superación de los inconvenientes y desventajas que presentan los métodos ya conocidos, en particular aquellos descritos en WO 2022067358. En particular los métodos conocidos presentan

lixiviación de los sitios activos, actividades antimicrobianas baja y mala reproducibilidad en el recubrimiento de materiales.

Este recubrimiento antimicrobiano puede actuar frente a los microorganismos que se desee, ya sean bacterias, virus o también hongos microscópicos, levaduras o protozoos. Así, el recubrimiento testado en *S. epidermidis* constituye un modelo para otros microorganismos.

El recubrimiento del primer aspecto se une de manera covalente a la superficie del sustrato (S) mediante enlaces S-O-Si entre el sustrato y la capa de sílice. La unión covalente entre sustrato y recubrimiento mediante una capa de sílice dota al recubrimiento de gran robustez y permite que las moléculas bioactivas se mantengan ancladas en el sustrato durante un periodo prolongado de tiempo y por tanto se mantenga la eficacia antimicrobiana de la superficie recubierta.

La capa de sílice dispuesta sobre el sustrato se caracteriza por un grosor entre 0,10 μm y 10 μm , preferiblemente la capa de sílice dispuesta sobre el sustrato tiene un grosor entre 0,10 μm y 5 μm , y todavía más preferiblemente entre 0,10 μm y 2 μm .

En las estrategias descritas en el estado de la técnica, por ejemplo, en WO 2022067358, el enlace de la molécula bioactiva se lleva a cabo mediante un anclaje directo de la molécula de enlace sobre la superficie del acero, resultando en una unión covalente de tipo Fe-O-Si. Este tipo de enlace no es muy robusto porque el enlace Fe-O es bastante susceptible a la hidrólisis y por ello el recubrimiento resultante tiene una capacidad de reutilización bajo. Sin embargo, en el recubrimiento de la invención, la capa de sílice refuerza los anclajes al acero, y el anclaje final de la molécula de enlace se lleva a cabo a través de enlaces Si-O-Si, siendo estos mucho más estables.

Los sustratos que pueden ser recubiertos por los recubrimientos de la invención son muy variados, como, por ejemplo, metales, polímeros, materiales cerámicos y/o vidrio. Los metales adecuados incluyen, entre otros, titanio, cobre, oro, estaño, níquel, aluminio, hierro, cobalto, plata, platino, magnesio, manganeso, zinc y aleaciones de metales como aceros, bronce o latón.

En el grupo de los polímeros se incluyen polímeros convencionales, como, por ejemplo, cloruro de polivinilo (PVC), ácido de polivinilo (PVA), polietileno (PE), poliestireno (PS),

polipropileno (PP), policarbonato (PC), tereftalato de polietileno (PET), poliamida (PA), poliuretano (PU), estireno, butadieno, acrilonitrilo (ABS), o polímeros biodegradables, como, por ejemplo, ácido poli láctico (PLA), colágeno, biogomas, o celulosa.

- 5 Los materiales cerámicos de interés incluyen, a modo de ejemplo, TiO_2 , Al_2O_3 , materiales tipo cermet, por ejemplo, WC-Co o WC-Co-Cr, o materiales bi-componente como pueden ser $\text{TiO}_2 + \text{NiAl}$.

10 Los recubrimientos de la invención pueden recubrir la superficie del sustrato de manera total o parcial según sea necesario.

En dichos recubrimientos antimicrobianos, se prefiere que las moléculas bioactivas se seleccionen del grupo de componentes de aceites esenciales (CAE), ácidos orgánicos, polímeros naturales, bacteriocinas, y/o enzimas. En una realización preferida, la molécula bioactiva es un componente de aceite esencial. En la realización más preferida la molécula bioactiva se selecciona del grupo de componentes de aceites esenciales siguiente: carvacrol, cinamaldehído, perillaldehído, eugenol, timol, vainillina, geraniol, cafeno, timoquinona, dialyldisulfito, alil isotiocianato o mezclas de los mismos. En la realización aún más preferida la molécula bioactiva es vainillina. La actividad antimicrobiana de los CAE no se atribuye a un único mecanismo, sino que es una cascada de reacciones (degradación de la pared celular, daño de la membrana citoplásmica, daño de la proteína de la membrana, coagulación del citoplasma y agotamiento del poder de los protones) que da como resultado la destrucción de las células de los microorganismos. Además, los CAE pueden penetrar en biopelículas formadas y matar los microorganismos protegidos.

25 En los recubrimientos de la invención, la molécula bioactiva se encuentra presente en un rango de concentraciones de 0,5 a 1,5 mg/cm^2 , preferiblemente en un rango de 0,8 a 1,05 mg/cm^2 . La molécula bioactiva en estos rangos de concentración asegura se produzca el efecto antimicrobiano deseado.

30 En lo que se refiere a la molécula espaciadora, se prefiere que la molécula de enlace sea un alcóxilisilano, preferiblemente la molécula de enlace se selecciona del siguiente grupo 3-aminopropil trietoxisilano (APTES), clorometil trietoxisilano, cloroetil trietoxisilano, cloropropiletil trietoxisilano, (3-mercaptopropil) trietoxisilano, (4-Clorofenil trietoxisilano, 3-(Trietoxisilil)propionitrilo, 3-(Trietoxisilil)propil isocianato, más preferiblemente la molécula de enlace es 3-aminopropil trietoxisilano (APTES).

En la realización preferida del primer aspecto las moléculas bioactivas funcionalizadas están unidas a la sílice mediante enlaces covalentes silicio-oxígeno-silicio (Si-O-Si). Este enlace covalente Si-O-Si entre molécula bioactiva y sílice asegura una unión fuerte y duradera, de manera que el recubrimiento es resistente al paso del tiempo y a múltiples lavados, manteniendo su actividad antimicrobiana.

En su segundo aspecto, la invención se refiere a un proceso para depositar un recubrimiento antimicrobiano de acuerdo al primer aspecto en sustratos que comprende las siguientes etapas:

- a) proporcionar un sustrato;
- b) activación de la superficie del sustrato mediante el tratamiento del sustrato con una solución activadora;
- c) deposición de una capa de sílice en la superficie del sustrato mediante la polimerización de precursores de sílice en medio alcalino;
- d) funcionalización de las moléculas bioactivas mediante su reacción con la molécula de enlace en fase líquida;
- e) inmovilización covalente de las moléculas bioactivas funcionalizadas obtenidas en la etapa d) sobre la capa de sílice generada en la etapa c) mediante la aplicación de una solución que comprende la molécula bioactiva funcionalizadas, y,
- f) secado de la superficie.

En una realización preferida del segundo aspecto, los sustratos que pueden ser recubiertos por la invención son muy variados, como, por ejemplo, metales, polímeros, materiales cerámicos y/o vidrio. Los metales adecuados incluyen, entre otros, titanio, cobre, oro, estaño, níquel, aluminio, hierro, cobalto, plata, platino, magnesio, manganeso, zinc y aleaciones de metales como aceros, bronce o latón. En el grupo de los polímeros se incluyen, entre otros, cloruro de polivinilo (PVC), ácido de polivinilo (PVA), polietileno (PE), poliestireno (PS), polipropileno (PP), policarbonato (PC), tereftalato de polietileno (PET), poliamida (PA), poliuretano (PU), estireno, butadieno, acrilonitrilo (ABS), ácido poli láctico (PLA), colágeno, biogoma, o celulosa. Los materiales cerámicos de interés incluyen, a modo de ejemplo, TiO_2 , Al_2O_3 , materiales tipo cermet, por ejemplo, WC-Co o WC-Co-Cr, o materiales bi-componente como pueden ser $\text{TiO}_2 + \text{NiAl}$.

En la realización del segundo aspecto, la solución activadora de la etapa b) es una solución ácida y/u oxidante. En una realización preferida del segundo aspecto, la superficie del sustrato se activa mediante una solución activadora que consiste en una solución acuosa de ácido sulfúrico, ácido nítrico, persulfato de potasio, peróxido de oxígeno o una mezcla de los mismos. La activación de la superficie se lleva a cabo durante menos de 15 min, preferiblemente 10 min. El contacto entre la solución acuosa y la superficie del sustrato debe ser corta para evitar los efectos corrosivos de la misma y a la vez generar suficientes grupos hidroxilos en la superficie del sustrato.

En una realización preferida del segundo aspecto, la deposición de la capa de sílice de la etapa c) se produce mediante la generación in situ de sílice a partir de un precursor seleccionado del grupo de ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS), metiltrimetoxisilano (MTMS), feniltrimetoxisilano (PTMS), dimetildimetoxisilano (DMDMS) y metacriloxipropiltrimetoxisilano (MPTMS). La opción más preferida de precursor es el ortosilicato de tetraetilo (TEOS).

En una realización preferida del segundo aspecto, la molécula bioactiva se selecciona del grupo de aceites esenciales, ácidos orgánicos, polímeros naturales, bacteriocinas, enzimas, preferiblemente la molécula bioactiva es un aceite esencial. En una realización más preferida la molécula bioactiva es un componente de aceite esencial. En una realización aún más preferida la molécula bioactiva se selecciona del grupo de componentes de aceites esenciales (CAE) constituido por carvacrol, cinamaldehído, perillaldehído, eugenol, timol, vainillina, geraniol, cafeína, timoquinona, dialyldisulfito, alil isotiocianato o mezclas de los mismos. En la realización más preferida la molécula bioactiva es vainillina.

En una realización preferida del segundo aspecto, la molécula de enlace empleada en la etapa d) es un alcoxisilano, preferiblemente la molécula de enlace se selecciona del siguiente grupo 3-aminopropil trietoxisilano, clorometil trietoxisilano, cloroetil trietoxisilano, cloropropil trietoxisilano, (3-mercaptopropil) trietoxisilano, (4-Clorofenil trietoxisilano, 3-(Trietoxisilil)propionitrilo, 3-(Trietoxisilil)propil isocianato. En la realización más preferida la molécula de enlace es 3-aminopropil trietoxisilano.

En una realización preferida del segundo aspecto, la solución de la etapa e) que comprende la molécula bioactiva funcionalizada es una solución de pentano, ciclopentano, hexano, ciclohexano, benceno, tolueno, 1,4-dioxano, cloroformo, éter dietílico, diclorometano (DCM), tetrahidrofurano (THF), acetona, dimetilformamida (DMF), acetonitrilo (MeCN),

dimetilsulfóxido (DMSO), ácido fórmico, n-butanol, alcohol isopropílico (IPA), metanol, etanol, agua o sus mezclas. En una realización más preferida, la solución es una solución acuosa alcohólica, preferiblemente una solución de etanol y agua. En una realización preferente el secado de la etapa d) se produce a temperatura ambiente.

5

En su tercer aspecto, la invención se refiere a un elemento o superficie que comprende al menos parcialmente un recubrimiento antimicrobiano de acuerdo al primer aspecto o un recubrimiento preparado de acuerdo al segundo aspecto de la invención.

- 10 Los elementos o superficies que pueden comprender el recubrimiento de la invención pueden ser distintos materiales, en particular pueden ser de metal, polímeros, materiales cerámicos y/o vidrio. Los metales adecuados incluyen, entre otros, titanio, cobre, oro, estaño, níquel, aluminio, hierro, cobalto, plata, platino, magnesio, manganeso, zinc y aleaciones de metales como aceros, bronce o latón. En el grupo de los polímeros se
- 15 incluyen, entre otros, cloruro de polivinilo (PVC), ácido de polivinilo (PVA), polietileno (PE), poliestireno (PS), polipropileno (PP), policarbonato (PC), tereftalato de polietileno (PET), poliamida (PA), poliuretano (PU), estireno, butadieno, acrilonitrilo (ABS), ácido poli láctico (PLA), colágeno, biogoma, o celulosa. Los materiales cerámicos de interés incluyen, a modo de ejemplo, TiO_2 , Al_2O_3 , materiales tipo cermet, por ejemplo, WC-Co o WC-Co-Cr, o
- 20 materiales bi-componente como pueden ser $\text{TiO}_2 + \text{NiAl}$.

- Entre los elementos cuya superficie tendría mayor interés recubrir, pueden citarse: una mascarilla higiénica, un tejido, una tela, instrumental de uso clínico, una pared, un suelo, un mueble, un pasamanos, un dispositivo móvil, una pantalla táctil o un filtro de aire. En
- 25 general, puede tener interés cualquier superficie de cualquier objeto presente en un lugar donde debe predominar la higiene y debe hacerse lo posible por mantenerla, pero donde, desgraciadamente, es habitual la presencia de distintos microorganismos.

- En su cuarto aspecto la invención se refiere a uso de un recubrimiento antimicrobiano de
- 30 acuerdo al primer aspecto, un recubrimiento antimicrobiano preparado de acuerdo al segundo aspecto o de un elemento o superficie de acuerdo al tercer aspecto en la prevención del crecimiento microbiano, formación de biopelículas, la inhibición de la adhesión microbiana y/o la eliminación de células microbianas adheridas al mismo.

- 35 El microorganismo puede ser una bacteria, pero también un virus, un hongo microscópico, levaduras o un protozoo. Se tiene preferencia por una bacteria.

La invención se explicará ahora con mayor detalle mediante los Ejemplos y Figuras que aparecen a continuación.

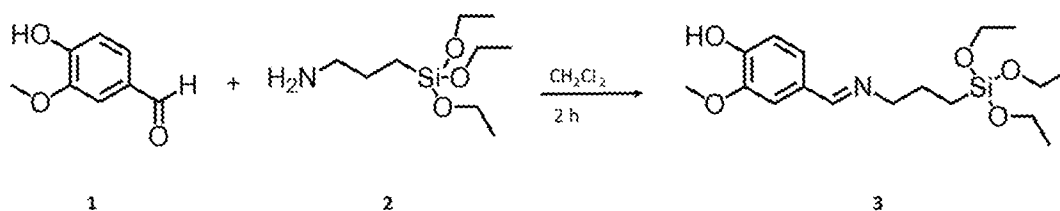
5 Ejemplos

Ejemplo 1. Funcionalización de moléculas bioactivas

Ejemplo 1.1. Funcionalización de moléculas bioactivas - vainillina

10

Para funcionalizar la molécula bioactiva, en este caso la vainillina, primeramente, se suspendió 1 g de vainillina en 25 mL de diclorometano y luego se añadieron a la mezcla 1,2 mL de 3-aminopropil trietoxisilano (APTES). La relación molar entre los reactivos fue de 1:1 de vainillina:APTES (Esquema 1). La mezcla se agitó durante 2 h, y después de
15 esto, la suspensión se evaporó a presión reducida para obtener el correspondiente derivado de alcoxisilano, (E)-2-metoxi-4-(((3-trietoxisilil)propil)imino)metil)fenol. En este primer paso, la reacción entre la vainillina y APTES da lugar al producto 3 en el que la vainillina se une al grupo etoxi por medio de un enlace imina (Esquema 1).



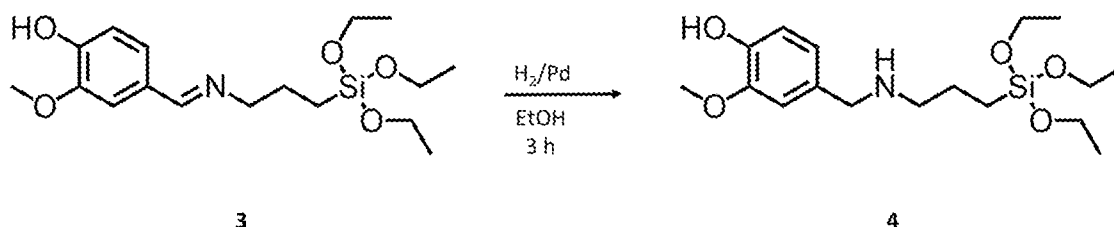
20

Esquema 1

En un segundo paso, 5 mmol de derivado de alcoxisilano (producto 3) se solubilizaron en etanol y se añadieron 340 mg de Pd/C. Posteriormente, se pasó un flujo de gas N₂ a través del matraz de reacción para desplazar el O₂. Luego, se agregó flujo de H₂. La mezcla se
25 agitó durante 3 h en atmósfera inerte. Finalmente, el derivado reducido, 2-metoxi-4-(((3-(trietoxisilil)propil)amino)metil)fenol (Van-APTES), producto 4, se filtró y evaporó a presión reducida para obtener el compuesto puro como un sólido amarillo pálido.

El enlace imina formado entre el grupo aldehído de vainillina y el grupo amina de APTES (3) se redujo para estabilizar la unión del grupo vainillina al grupo trietoxisilano (4), Van-

APTES. La reacción de reducción del enlace imina se llevó a cabo mediante una hidrogenación química utilizando H_2 y paladio sobre carbono (Pd/C) como catalizador (Esquema 2).



Esquema 2

Ejemplo 1.2. Funcionalización de moléculas bioactivas - carvacrol, el eugenol y el timol

10 Para funcionalizar otras moléculas bioactivas, en este caso carvacrol, el eugenol y el timol, primeramente, se transformaron en derivados de aldehído. En un segundo paso, los aldehídos de carvacrol, eugenol y timol reaccionaron con 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) para producir los derivados de alcoxisilano correspondientes.

15 Los aldehídos del carvacrol y del timol se sintetizaron por formilación directa utilizando paraformaldehído.

En una síntesis típica, se colocaron 150 ml de acetonitrilo, 40 mmol de carvacrol o timol, 150 mmol de trimetilamina y 40 mmol de $MgSO_4$ anhidro dentro de un matraz de fondo redondo. La mezcla se colocó en una atmósfera de argón y se agitó durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadieron 270 mmol de paraformaldehído y la mezcla de reacción se calentó a reflujo durante 3,5 h a 83 °C. Luego se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente. La solución se acidificó con una solución de HCl al 5% (320 ml) y se agitó durante 30 min en atmósfera inerte. Finalmente, la porción orgánica se extrajo con éter dietílico y los disolventes se eliminaron a presión reducida para obtener el aldehído de carvacrol o del timol.

20

25

El aldehído del eugenol se sintetizó mediante una reacción de Reimer-Tiemann. En una síntesis típica, 150 ml de agua se calentaron a 80 °C, en un matraz de fondo redondo, y 22 mmol de eugenol se disolvieron en el agua. El calor se redujo a 60 °C, luego se agregaron

30

400 mmol de KOH y 88 mmol de cloroformo. Como la reacción fue exotérmica, se añadió cloroformo a una velocidad de 1 ml/h durante un período de 7 horas por razones de seguridad. La mezcla de reacción se mantuvo a 60 °C durante un período adicional de 8 horas. Luego, la solución se acidificó con una solución de H₂SO₄ al 10%. La porción orgánica se extrajo con n-butanona y los disolventes se eliminaron a presión reducida.

Para facilitar la inmovilización covalente de los componentes de aceites esenciales a la capa de sílice, se sintetizaron los correspondientes derivados de aceites esenciales. Para ello se hicieron reaccionar 2 ml de los aldehídos de carvacrol, timol o eugenol con 2,3 ml (10 mmol) de (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) en presencia de diclorometano (20 ml) y MgSO₄, dando lugar a las correspondientes iminas, que posteriormente se reducen de la misma manera que lo descrito para Van-APTES en el ejemplo 1.1. La mezcla se calentó a reflujo durante 1 h, luego se filtró y se evaporó a presión reducida para obtener un líquido transparente.

Ejemplo 2. Preparación del recubrimiento antimicrobiano

A continuación, se describe la preparación de los recubrimientos de la invención.

Ejemplo 2.1 Activación del sustrato – acero inoxidable (SS)

El primer paso en la funcionalización de SS es la preparación de la superficie de acero inoxidable.

Antes de depositar la capa de sílice, la superficie del material SS debe desengrasarse adecuadamente mediante ultrasonidos en varios solventes como etanol y acetona, y luego con agua. Para ese fin, se colocaron placas de acero inoxidable (placas SS) en un vaso de precipitados (1 placa en 1 vaso de precipitados) y se sonicaron durante 10 min en cada uno de los siguientes productos químicos en sucesión: acetona (70 % v/v), etanol y agua desionizada.

Después del procedimiento de lavado, la superficie SS debe tratarse químicamente con una solución ácida o alcalina para activar la superficie metálica y exponer los grupos hidroxilo de la superficie. Los grupos hidroxilo se forman por quimisorción disociativa de moléculas de agua y, en general, se considera que la hidratación y la hidroxilación se producen en los sitios de iones metálicos reticulares expuestos en la superficie. Esta

activación es importante porque la cantidad de grupos hidroxilo obtenidos durante el proceso de activación influye fuertemente en el inicio de la unión del silano y, por lo tanto, en la formación de la película de sílice. Luego, para el procedimiento de activación, los materiales SS lavados se trataron con solución piraña y se obtuvieron los materiales SS-OH.

La solución piraña correspondiente consistió en la adición de peróxido de hidrógeno en un vaso de precipitados, al cual se le añadió lentamente ácido sulfúrico concentrado, en una proporción de ácido sulfúrico a peróxido de hidrógeno de 7:3 (v/v). A continuación, la mezcla resultante se agitó suavemente antes de su uso.

Las placas SS limpias se sumergieron en la solución de piraña durante 10 min. Pasado este tiempo, las placas se retiraron y se colocaron en una segunda solución de piraña durante 5 min. Después del segundo tratamiento con piraña, las placas SS se enjuagaron dos veces en agua ultrapura antes de colocarlas en un baño de agua ultrapura durante 24 h. Las placas resultantes se denominarán SS-OH. Así, las superficies de SS y SS-OH, difieren únicamente en la presencia en las superficies SS-OH de los grupos hidroxilo generados.

Los grupos hidroxilo son esenciales en la formación de fuertes enlaces covalentes con los grupos silanol de la sílice del recubrimiento.

Ejemplo 2.2 Deposición de la capa de sílice sobre el soporte

Las placas SS-OH se trataron con TEOS mediante un procedimiento sol-gel. Las placas de SS-OH se colocaron en una solución acuosa básica, se calentaron a 80 °C y luego se añadieron gota a gota 5 mL de TEOS y la mezcla se agitó durante treinta minutos. Las placas se enjuagaron dos veces en agua ultrapura y se secaron a 100 °C durante la noche. La hidrólisis del TEOS produce grupos silanol (Si-OH) en presencia de agua y facilita la rápida adsorción de las entidades de silicato en la superficie del SS- material OH a través de enlaces de hidrógeno, para condensar aún más y formar un enlace covalente metal-siloxano (Me-O-Si-OH).

Los grupos silanol facilitan la unión covalente de moléculas orgánicas a la superficie, lo que resulta en una funcionalización estable debido a su excelente estabilidad térmica, mecánica y química.

Se utilizó microscopía electrónica de barrido por emisión de campo (HR-FESEM) para estudiar el grosor de la capa de sílice, comparando SS con SS-SiO₂ (Fig. 1). Como se observa en la figura, en la zona de la capa de sílice ha aumentado el % de O y S, y disminuye el % C y Fe. En ningún caso aparece nitrógeno, demostrándose que la capa de sílice es exclusivamente sílice.

Ejemplo 2.3 Funcionalización de la capa de sílice con las moléculas bioactivas - vainillina

Para la funcionalización la superficie de SS-SiO₂, este material se puso en contacto con el derivado de vainillina (Van-APTES) previamente sintetizado formando así los materiales SS-SiO₂-Van. La unión a las superficies se produce por hidrólisis de los grupos etoxi del derivado Van-APTES que conduce a la formación de silanoles. Los silanoles de Van-APTES se condensan con los silanoles de la superficie SS-SiO₂ y conducen a la formación de enlaces covalentes Si-O-Si.

Se solubilizó 1 g de Van-APTES en etanol. La solución se vertió en las placas de SS-SiO₂ y las placas se agitaron durante 5,5 horas a temperatura ambiente. Luego, las placas se lavaron con etanol y se secaron a temperatura ambiente, dando lugar a las superficies SS-SiO₂-Van

Ejemplo 2.4 Activación del sustrato – polipropileno (PP)

Enfocándonos en lo citado anteriormente, esta invención presenta también como ejemplo la inmovilización de un aceite esencial funcionalizado con un alcóxisilano (aminopropiltriétoxisilano, APTES), como pueda ser la molécula bioactiva antimicrobiana Vainillina, sobre una superficie, como puede ser por ejemplo el polipropileno (PP).

El primer paso en la funcionalización de PP es la preparación de la superficie de polipropileno. La superficie PP debe tratarse químicamente para exponer los grupos hidroxilo de la superficie. Para ello, se trató la superficie del plástico polipropileno (PP) con un agente oxidante (peroxidisulfato de potasio) para generar grupo hidroxilo (PP-OH), importante para la funcionalización.

El peroxidisulfato de potasio se utiliza como fuente de radicales en solución acuosa, es bien conocido como iniciador de la polimerización por radicales libres y como agente oxidante.

- 5 Los grupos hidroxilo del PP se forman por la extracción de un hidrógeno (del carbono terciario presente en cada unidad de repetición del polímero) que conduce a la formación de un macroradical que posteriormente reacciona con un segundo radical hidroxilo, dando lugar a la introducción de grupos hidroxilo en la superficie del PP. Esta activación es importante porque la cantidad de grupos hidroxilo obtenidos durante el proceso de
- 10 activación influye fuertemente en el inicio de la unión del silano y, por lo tanto, en la formación de la película de sílice.

Los grupos hidroxilo son esenciales en la formación de fuertes enlaces covalentes con los grupos silanol de la sílice del recubrimiento.

15

A continuación, se depositó un recubrimiento de capa de sílice e inmovilizó covalentemente con molécula bioactiva funcionalizada con APTES como los llevados a cabo en los procesos descritos en los ejemplos Ejemplo 2.2 y 2.3, dando lugar a las superficies PP-SiO₂ y finalmente PP-SiO₂-Van.

20

Ejemplo 3. Cuantificación de la funcionalización con las moléculas bioactivas - SS-SiO₂-Van.

- Para cuantificar la funcionalización de la superficie SS-SiO₂-Van, se realizó un ensayo
- 25 colorimétrico de superficie. Para este propósito, se usó ninhidrina como agente de prueba colorimétrica. Generalmente, la ninhidrina se usa en ensayos colorimétricos para el reconocimiento de grupos amina, en estos ensayos se observa un cambio de color de amarillo a púrpura intenso solo en el caso de la presencia de grupos amino en la solución. El color púrpura intenso, conocido como violeta de Ruhemann, se produce cuando dos
- 30 moléculas del compuesto ninhidrina (2,2-dihidroxiindano-1,3-diona) reaccionan con una amina primaria, una amina secundaria o un aminoácido.

- Considerando esto, el ensayo de ninhidrina se desarrolló sumergiendo placas de SS, SS-OH, SS-SiO₂ y SS-SiO₂-Van en la solución de ninhidrina y las placas se dejaron en contacto
- 35 con la solución durante 10 min a 80 °C. Después de este tiempo, se observó que solo las placas de SS-SiO₂ -Van se tornaron de color púrpura, lo que confirma el proceso de

funcionalización de la vainillina en la superficie. Después de eso, las placas de SS-SiO₂-Van se sumergieron en 5 ml de etanol y se sonicaron durante varias horas para separar el complejo Van-ninhidrina de la superficie. Cuando se liberó todo el color de las placas SS debido a la ninhidrina unida, se cuantificó el contenido de Van-ninhidrina del disolvente de etanol midiendo su absorbancia a 400 nm. Previamente se preparó una curva de calibración con el complejo Van-ninhidrina obtenido al hacer reaccionar la ninhidrina con el derivado Van-APTES en etanol (de 0,9 a 10,5 mg/mL) y se utilizó para la cuantificación. La misma metodología se realizó para las superficies desnudas y de control: placas SS (superficie desnuda), placas SS-OH y SS-SiO₂ (superficies de control).

El resultado obtenido fue de $0,95 \pm 0,1$ mg/cm² de funcionalización sobre cada superficie de acero SS-SiO₂-Van. Para las placas de SS, SS-OH y SS-SiO₂ el resultado obtenido fue de 0 mg/cm².

Ejemplo 4. Evaluación de la viabilidad microbiana - SS-SiO₂-Van y PP-SiO₂-Van.

La actividad antimicrobiana de los recubrimientos de la invención, en particular los del ejemplo 2 (SS-SiO₂-Van), frente a los microorganismos se evaluó mediante ensayos *in-vitro* con *S. epidermidis*.

La evaluación de la viabilidad microbiana se realizó en medio líquido, para permitir el contacto entre las bacterias y las superficies funcionalizadas y no funcionalizadas durante la incubación, seguido de placas para enumerar las unidades formadoras de colonias (UFC) viables restantes. Se compararon materiales recubiertos con el recubrimiento de la invención con materiales como el acero inoxidable (SS), acero inoxidable activado (SS-OH) y acero inoxidable recubierto con sílice (SS-SiO₂), estos fueron considerados como controles negativos.

La eficacia antimicrobiana se realizó en medio líquido, en solución de fosfato (PBS). Se prepararon diluciones inoculadas con *S. epidermidis* en PBS para obtener una concentración de 10⁴ células/mL. Un matraz que contenía las superficies SS-SiO₂-Van funcionalizadas, se inoculó con 1 mL de suspensión de *S. epidermidis* para obtener una concentración final de 10³ células/mL. Las placas de SS, SS-OH y SS-SiO₂ se trataron siguiendo el mismo procedimiento que SS-SiO₂-Van. Finalmente, todas las muestras se incubaron con agitación orbital (120 rpm) a 37 °C durante 24 h.

Para contabilizar las células viables, se tomaron alícuotas de 100 µl de cada suspensión de muestra (SS, SS-OH, SS-SiO₂ y SS-SiO₂-Van) y se distribuyeron en placas de agar soja triptona (TSA, por sus siglas en inglés). Después de la incubación de la placa a 37 °C durante 24 h, se contaron las colonias y los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de log UFC/mL. Todos los tratamientos se probaron por triplicado.

Las superficies SS-SiO₂-Van mostraron un efecto antimicrobiano contra *S. epidermidis*, lo que llevó a la eliminación total del microorganismo después de 24 h de tratamiento en comparación con las superficies no tratadas (SS, SS-OH y SS-SiO₂). Los resultados pueden observarse en la Figura 2.

Adicionalmente, se comprobó la robustez de la actividad antimicrobiana con sucesivos ciclos. Se evaluó el efecto antimicrobiano de las mismas placas ya utilizadas para confirmar la presencia de la molécula antimicrobiana (Van-APTES) en las superficies.

La eficacia de la actividad antimicrobiana (Figura 3) se mantuvo en los dos ensayos siguientes (Ensayo II y Ensayo III) y se obtuvo una reducción total de la viabilidad bacteriana después de un tratamiento de 72 horas. Sin embargo, se observó una disminución en la actividad antimicrobiana de los materiales SS-SiO₂-Van en los siguientes ciclos de prueba. Así, la eficacia de las placas alcanzó un 80% en el caso del Ensayo IV y un 40% en el Ensayo V (Figura 3) tras 72 horas de incubación en presencia de bacterias. A pesar de esta disminución, la actividad antimicrobiana de las placas es notable.

La actividad antimicrobiana de los recubrimientos de la invención, en particular los del ejemplo 2.4 (PP-SiO₂-Van), frente a los microorganismos se evaluó mediante ensayos *in-vitro* con *Escherichia coli*, lo que llevó a la eliminación total del microorganismo después de 24 h de tratamiento en comparación con las superficies no tratadas (PP, PP-OH y PP-SiO₂). Los resultados pueden observarse en la Figura 4. Los resultados mostraron que las superficies de polipropileno funcionalizadas con un CAEs, como es la Vainillina, redujeron la viabilidad bacteriana de un 100% (Figura 4).

Ejemplo 5. Comprobación de la adhesión microbiana- SS-SiO₂-Van.

Otro ejemplo realizado para confirmar la capacidad antimicrobiana de nuestras superficies, fue evaluar la capacidad de las superficies SS-SiO₂-Van para inhibir la formación de

biopelículas o biofilms. Los ensayos de adhesión bacteriana con SS-SiO₂-Van se realizaron en medio líquido, caldo de triptona y soja (TSB, por sus siglas en inglés Tryptic Soy Broth). Se prepararon diluciones de *S. epidermidis* en TSB para obtener una concentración de 10⁴ células/mL.

5

Un matraz que contenía las placas SS-SiO₂-Van funcionalizadas se inoculó con 1 mL de suspensión de *S. epidermidis* para obtener una concentración final de 10³ células/mL. Finalmente, todas las muestras se incubaron a 37 °C durante 24 h. Las placas de SS, SS-OH y SS-SiO₂ también se sumergieron en una suspensión bacteriana similar como control.

10 Después de la incubación, las bacterias no adheridas se eliminaron lavando suavemente las placas con una solución de fosfato (PBS) estéril (pH 7,4). Cada placa con bacterias adheridas se colocó en un matraz que contenía 3 ml de PBS estéril y se sonicó durante 5 min. Las soluciones sonicadas, que contenían las bacterias recuperadas, se diluyeron en serie y se distribuyeron 100 µL de cada dilución en placas de Tryptic Soy Agar (TSA). Las
15 placas se incubaron durante la noche a 37 °C y el número de colonias se contó al día siguiente. La viabilidad de las bacterias se expresó como % de UFC. Todos los tratamientos se ensayaron por triplicado.

Los resultados en la Figura 5 mostraron que las superficies SS-SiO₂-Van pudieron inhibir
20 el 75 % de la formación de biopelículas en comparación con las placas SS, SS-OH y SS-SiO₂.

Ejemplo 6. Preparación del recubrimiento antimicrobiano comparativo (SS-Van)

25 A modo de ejemplo comparativo se prepararon recubrimientos antimicrobianos de acuerdo al estado de la técnica, en particular siguiendo los procedimientos descritos en WO2022067358A1. Estos procedimientos se resumen brevemente en las siguientes etapas:

- 30 a) proporcionar un sustrato,
b) activación de la superficie del sustrato mediante el tratamiento del sustrato con una solución de ácido sulfúrico y peróxido de hidrogeno.
c) modificar las moléculas bioactivas
d) funcionalización de la superficie con la molécula APTES de enlace en fase
35 líquida,

- e) inmovilización covalente de las moléculas bioactivas modificadas en c) sobre la superficie con APTES de la etapa d).

Este procedimiento resulta en una unión directa entre el acero y la molécula bioactiva (vainillina) derivatizada con APTES, a través de un anclaje directo de la molécula de enlace (APTES) sobre la superficie del acero (superficie SS-Van).

Ejemplo 7. Cuantificación del % atómico de las diferentes superficies.

Se realizaron análisis de % atómico mediante HR-FESEM-EDX (Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo de alta resolución con detector de rayos X) de las superficies SS, SS-SiO₂, SS-SiO₂-Van y SS-Van, estas dos últimas antes y después del ensayo de inhibición de biofilm, para comprobar la efectividad de la funcionalización de las moléculas bioactivas sobre aceros antes y después del ensayo contra biofilm.

La Figura 6 muestra la presencia de nitrógeno, de silicio, una disminución del porcentaje de Fe (25,1 para SS-SiO₂ y 0% para SS-SiO₂-Van) y un aumento del porcentaje de C (59,7% para SS-SiO₂-Van), confirmando la inmovilización del derivado de vainillina en la superficie.

Además, la superficie SS-SiO₂-Van después del ensayo antibiofilm mantuvo la presencia de nitrógeno, de silicio, se observó una disminución del porcentaje de Fe con respecto a SS y un aumento del porcentaje de C, confirmando la robustez del enlace de la vainillina a la superficie y por tanto la robustez del recubrimiento.

En la Figura 7 se observa en SS-Van la presencia de nitrógeno, la presencia de silicio, una disminución del porcentaje de Fe (0% para SS-Van) y un aumento del porcentaje de C (61% para SS-Van), confirmando la inmovilización del derivado de vainillina en la superficie. Sin embargo, la superficie SS-Van después del ensayo antibiofilm pierde totalmente el nitrógeno y silicio (que se encuentran en el APTES que hace de molécula de enlace entre la vainillina y el acero) y cuya presencia se mantiene exactamente igual en el caso de la superficie SS-SiO₂-Van antes y después del ensayo antibiofilm.

También destacar que el porcentaje de Fe con respecto a SS que se observó para SS-SiO₂-Van después del ensayo antibiofilm fue de un 2,7%, mientras que el porcentaje de Fe con respecto a SS que se observaba para SS-Van después del ensayo antibiofilm es de

un 7,5%, confirmando la pérdida del derivado de vainillina en SS-Van y la robustez de los recubrimientos SS-SiO₂-Van en comparación a SS-Van.

Ejemplo 8. Ensayo comparativo antimicrobiano de inhibición de la formación de biofilms.

La capacidad antimicrobiana, la inhibición de la adhesión bacteriana y, por lo tanto, la reducción de la formación de biofilms en las superficies SS-Van (basadas en el documento WO2022067358A1) y SS-SiO₂-Van (recubrimiento de la invención) se evaluaron en medio líquido contra la bacteria *Staphylococcus epidermidis* siguiendo el mismo procedimiento que el ejemplo 5.

Se realizó un ensayo de adhesión bacteriana con una concentración de 10⁴ células/mL en caldo de triptona y soja (TSB, por sus siglas en inglés Tryptic Soy Broth). También se usan como controles las superficies SS, SS-OH (activada con una solución de ácido sulfúrico y peróxido de hidrogeno) y SS-SiO₂.

Las superficies SS, SS-OH, SS-SiO₂, SS-Van y SS-SiO₂-Van se inocularon con 1 mL de suspensión de *S. epidermidis* para obtener una concentración final de 10³ células/mL y todas las muestras se incubaron a 37 °C durante 24 h. Después de la incubación, las bacterias no adheridas se eliminaron lavando suavemente las placas con una solución de fosfato (PBS) estéril (pH 7,4). Después, se realizó el plantado para enumerar las bacterias adheridas a las superficies.

Los resultados, ver Figura 8, muestran que la superficie SS-SiO₂-Van inhibió el 75 % de la formación de biofilm, mientras que la superficie SS-Van sólo pudo inhibir un 12% la formación de biofilm, en comparación con las placas SS, SS-OH y SS-SiO₂.

Además, se evaluó la robustez de la actividad antimicrobiana de las mismas superficies mediante un ciclo sucesivo. Para ello, se probó el potencial de las superficies ya utilizadas en un primer ensayo como inhibidoras de la formación de biofilms.

Como se puede observar en la Figura 9, la superficie SS-SiO₂-Van siguió inhibiendo el 40 % de la formación de biofilm en su segundo ciclo de uso, mientras que la superficie SS-Van en este segundo ciclo fue incapaz de inhibir la formación de biofilm.

REIVINDICACIONES

1. Un recubrimiento antimicrobiano que comprende una capa de sílice y moléculas bioactivas funcionalizadas con una molécula de enlace, donde las moléculas bioactivas funcionalizadas están unidas a la superficie de la sílice mediante enlaces covalentes.
2. El recubrimiento antimicrobiano de acuerdo a la reivindicación anterior, donde la moléculas bioactiva se selecciona del grupo de componentes de aceites esenciales (CAE), ácidos orgánicos polímeros naturales, bacteriocinas, enzimas, preferiblemente la molécula bioactiva es un aceite esencial, más preferiblemente la molécula bioactiva es un componente de aceite esencial (CAE) seleccionado del grupo constituido por carvacrol, cinamaldehído, perillaldehído, eugenol, timol, vainillina, geraniol, cafeno, timoquinona, dialyldisulfito, alil isotiocianato o mezclas de los mismos.
3. El recubrimiento antimicrobiano de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la molécula de enlace es un alcóxisilano, preferiblemente la molécula de enlace se selecciona del siguiente grupo 3-aminopropil trietoxisilano, clorometil trietoxisilano, cloroetil trietoxisilano, cloropropiletil trietoxisilano, (3-mercaptopropil) trietoxisilano, (4-Clorofenil trietoxisilano, 3-(Trietoxisilil)propionitrilo, 3-(Trietoxisilil)propil isocianato, más preferiblemente la molécula de enlace es 3-aminopropil trietoxisilano.
4. El recubrimiento antimicrobiano de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, aplicado al menos parcialmente sobre un sustrato seleccionado del siguiente grupo: metales, polímeros, materiales cerámicos y/o vidrio.
5. El recubrimiento antimicrobiano de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde las moléculas bioactivas funcionalizadas están unidas a la sílice mediante enlaces covalentes silicio-oxígeno-silicio (Si-O-Si).
6. Proceso para depositar un recubrimiento antimicrobiano de acuerdo a cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en sustratos que comprende las siguientes etapas:
 - a) proporcionar un sustrato;
 - b) activación de la superficie del sustrato mediante el tratamiento del sustrato con una solución activadora;
 - c) deposición de una capa de sílice en la superficie del sustrato mediante la polimerización de precursores de sílice en medio alcalino;

- d) funcionalización de las moléculas bioactivas mediante su reacción con la molécula de enlace en fase líquida;
- e) inmovilización covalente de las moléculas bioactivas funcionalizadas obtenidas en la etapa d) sobre la capa de sílice generada en la etapa c) mediante la deposición de una solución que comprende las moléculas bioactivas funcionalizadas; y
- f) secado de la superficie.

7. El proceso de acuerdo a la reivindicación 6, donde la deposición de la capa de sílice de la etapa c) se produce mediante la generación in situ de sílice a partir de un precursor seleccionado del grupo de ortosilicato de tetrametilo (TMOS), ortosilicato de tetraetilo (TEOS), metiltrimetoxisilano (MTMS), feniltrimetoxisilano (PTMS), dimetildimetoxisilano (DMDMS) y metacriloxipropiltrimetoxisilano (MPTMS), más preferiblemente a partir de ortosilicato de tetraetilo (TEOS).

8. El proceso de acuerdo a las reivindicaciones 6 a 7, donde la molécula bioactiva se selecciona del grupo de componentes de aceites esenciales, ácidos orgánicos, polímeros naturales, bacteriocinas, enzimas, preferiblemente la molécula bioactiva es un aceite esencial, más preferiblemente la molécula bioactiva es un componente de aceite esencial seleccionado del grupo constituido por carvacrol, cinamaldehído, perillaldehído, eugenol, timol, vainillina, geraniol, cafeno, timoquinona, dialilidisulfito, alil isotiocianato o mezclas de los mismos.

9. El proceso de acuerdo a las reivindicaciones 6 a 8, donde la molécula de enlace empleada en la etapa d) es un alcóxido, preferiblemente la molécula de enlace se selecciona del siguiente grupo: 3-aminopropil trietoxisilano, clorometil trietoxisilano, cloroetil trietoxisilano, cloropropil trietoxisilano, (3-mercaptopropil) trietoxisilano, (4-clorofenil trietoxisilano, 3-(Trietoxisilil)propionitrilo, 3-(Trietoxisilil)propil isocianato, más preferiblemente la molécula de enlace es 3-aminopropil trietoxisilano.

10. Un elemento o superficie que comprende al menos parcialmente un recubrimiento antimicrobiano de acuerdo a cualquier de las reivindicaciones anteriores 1 a 5 o un recubrimiento preparado de acuerdo a la reivindicación 6 a 9.

11. El uso de un recubrimiento antimicrobiano de acuerdo a las reivindicaciones 1 a 5, un recubrimiento antimicrobiano preparado de acuerdo a la reivindicación 6 a 9 o de un elemento o superficie de acuerdo a la reivindicación 10 en la prevención del crecimiento microbiano, formación de biopelículas, la inhibición de la adhesión microbiana y/o la
- 5 eliminación de células microbianas adheridas al mismo.

FIGURAS

FIG. 1

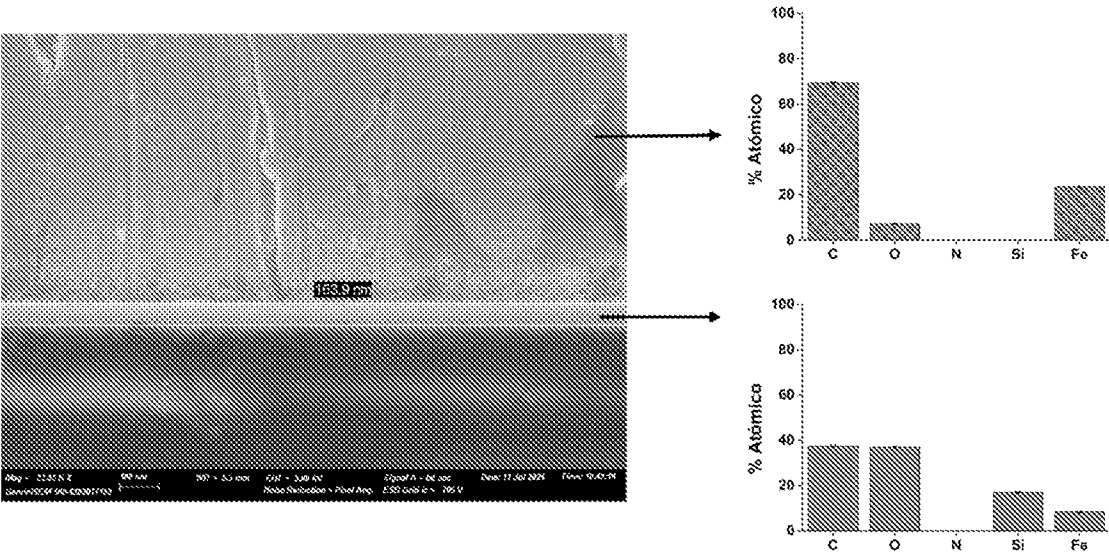


FIG. 2

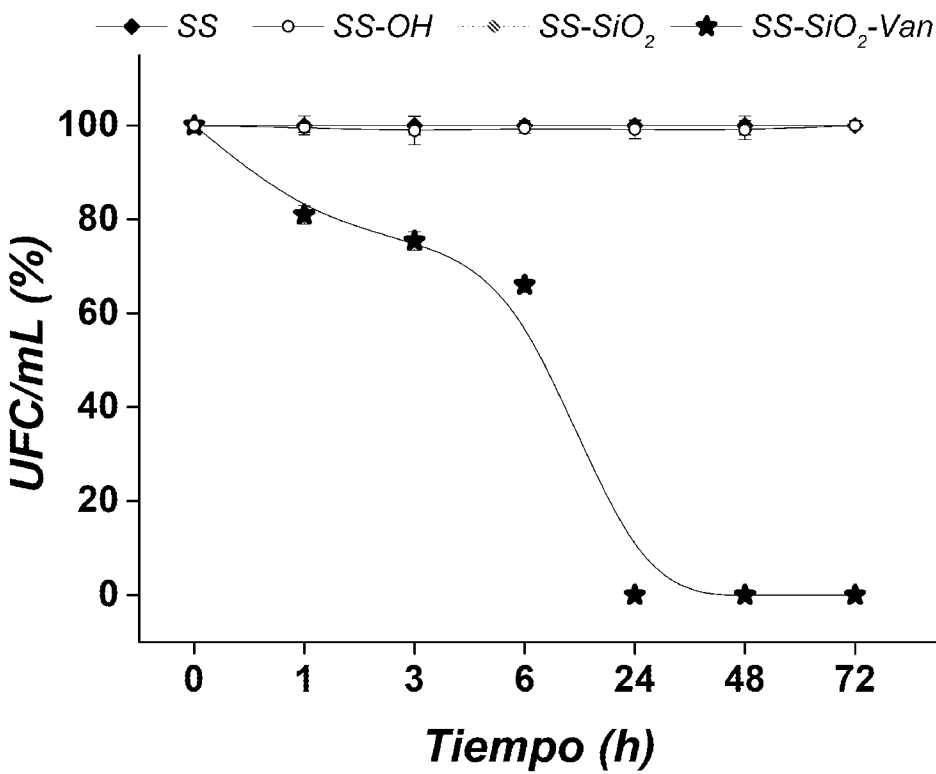


FIG. 3

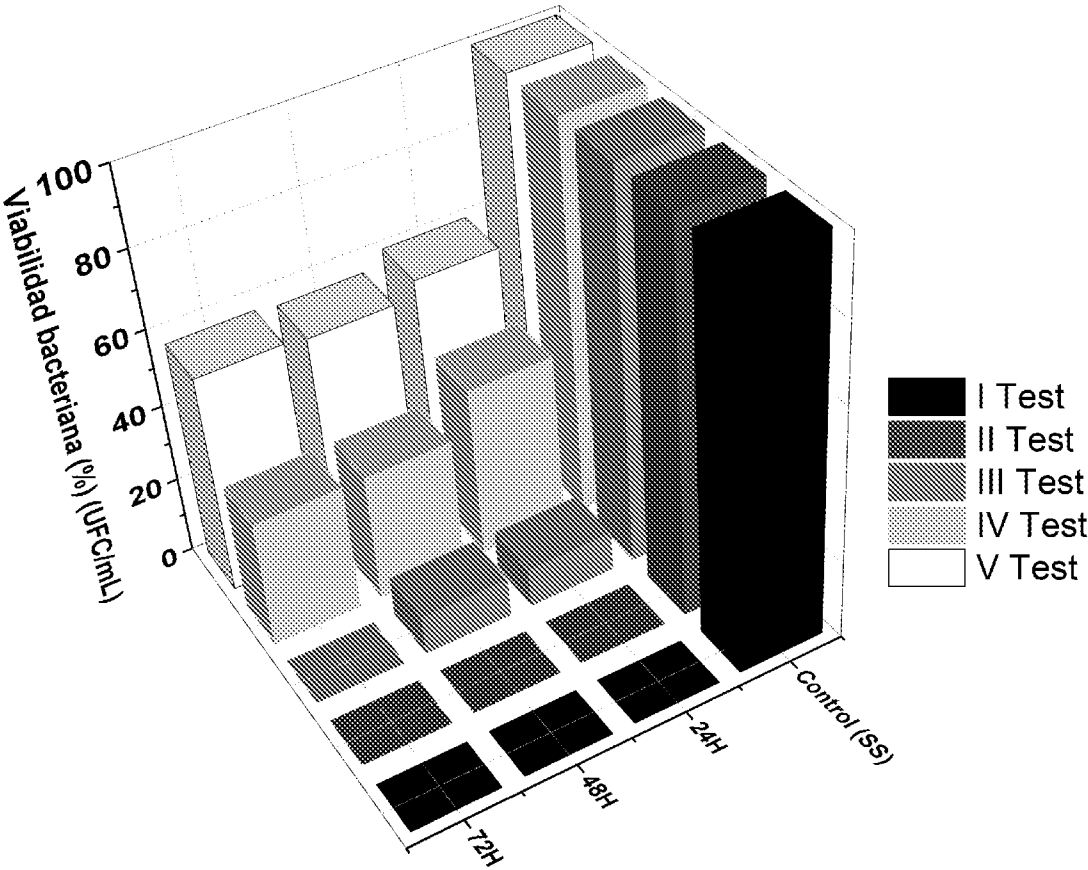


FIG. 4

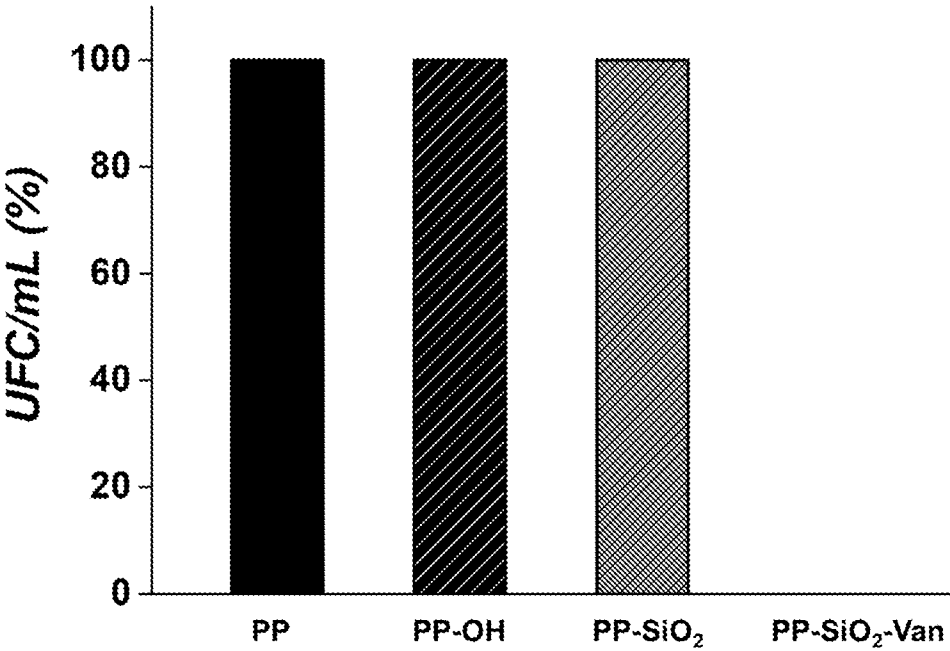


FIG. 5

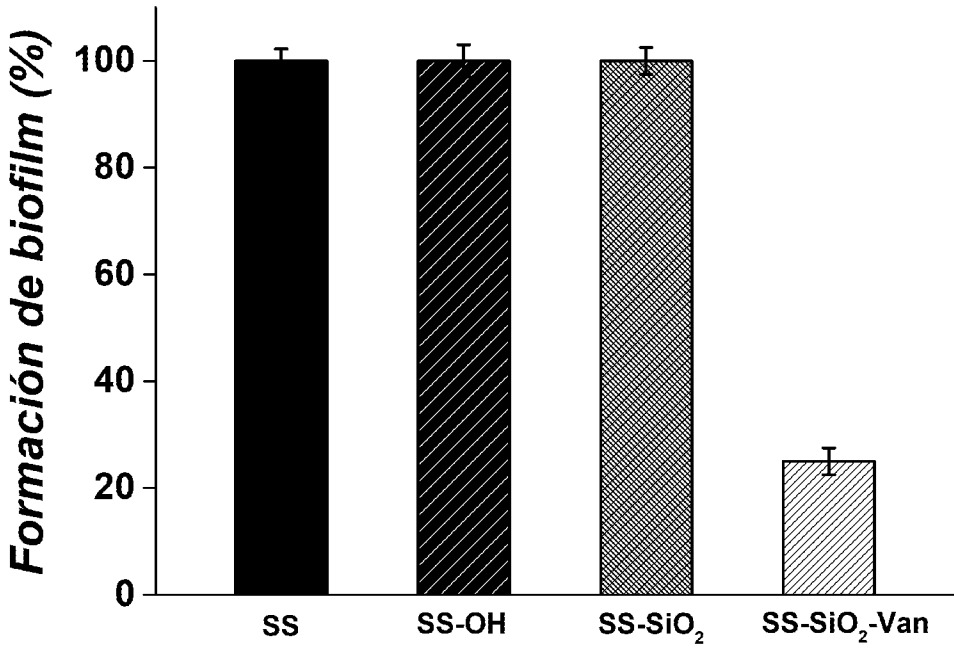


FIG. 6

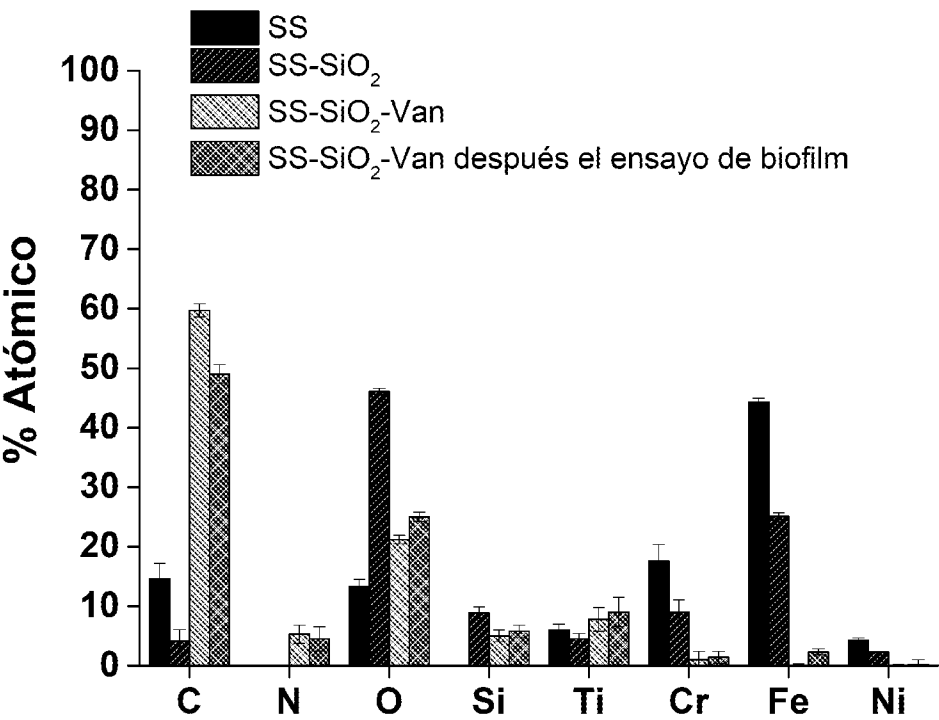


FIG. 7

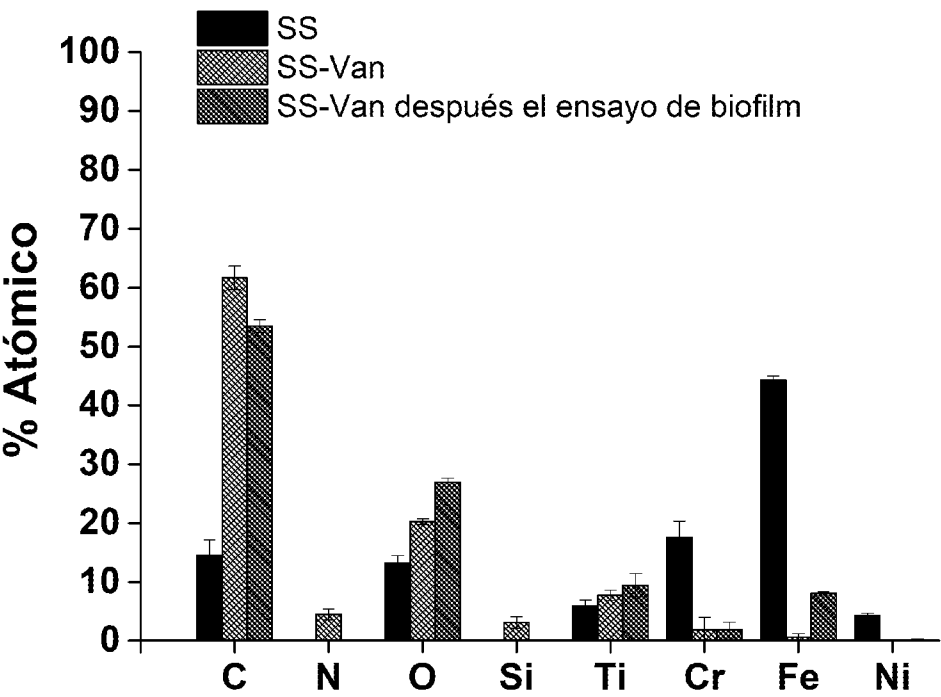


FIG. 8

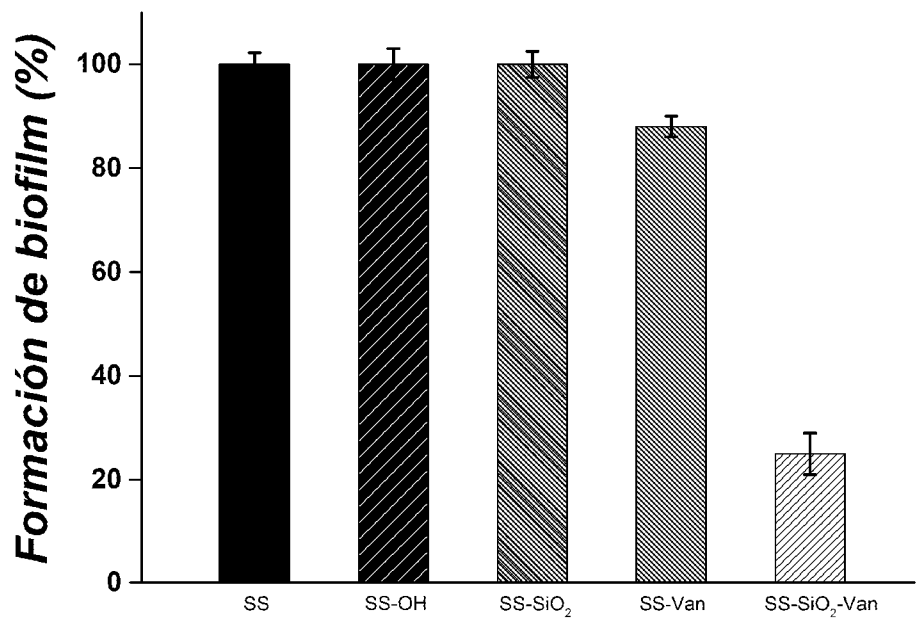
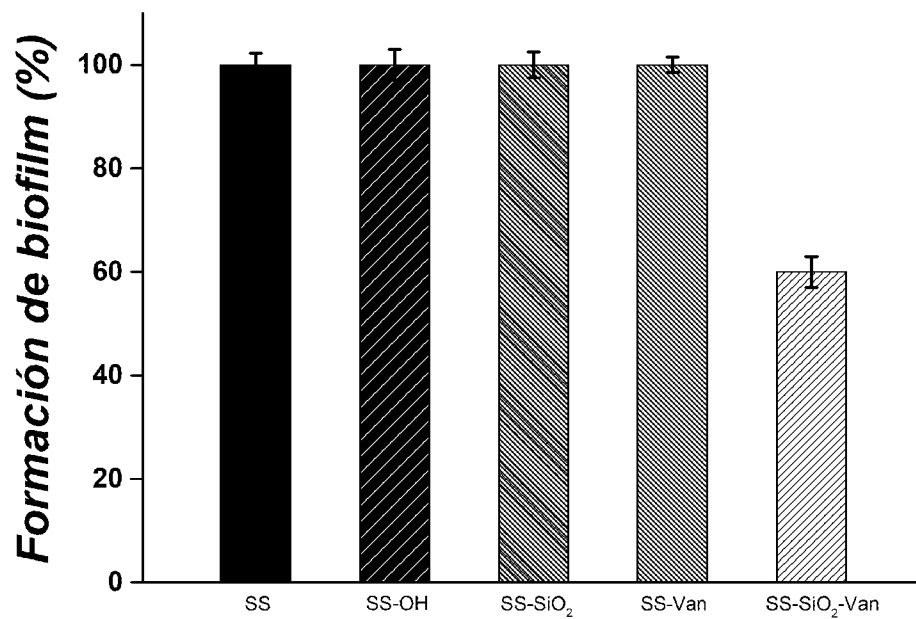


FIG. 9



A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

A01N 25/10(2006.01)i; A01N 55/00(2006.01)i; A01N 55/10(2006.01)i; A01N 35/04(2006.01)i; A01P 1/00(2006.01)i; C09D 5/14(2006.01)i

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

A01N; A01P; C09G; C09D

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

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

EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	WO 2022049583 A1 (UNIV BAR ILAN [IL]) 10 marzo 2022 (2022-03-10) reivindicaciones 1-61	1, 2, 4
X	WO 2017013294 A1 (UNIV VALENCIA POLITECNICA [ES]) 26 enero 2017 (2017-01-26) reivindicaciones 1-15	1-11
X	RUIZ-RICO MARÍA ET AL. "Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles" FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL, Vol. 233, 20 abril 2017 (2017-04-20), páginas 228-236 DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2017.04.118 ISSN: 0308-8146, XP085491852 citado en la solicitud resumen esquema 1; página 229	1-11

☒ En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.
"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional

04 diciembre 2024

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

07 enero 2025

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la Funcionario autorizado búsqueda internacional

European Patent Office
p.b. 5818, Patentlaan 2, 2280 HV Rijswijk
Países Bajos (Reino de los)

N° de teléfono: (+31-70)340-2040

N° de fax: (+31-70)340-3016

Funcionario autorizado

Marie, Gérald

N° de teléfono:

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X	RUIZ-RICO MARÍA ET AL. "In vitro antimicrobial activity of immobilised essential oil components against" WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, Vol. 36, No. 1, 12 diciembre 2019 (2019-12-12), [recuperado el 2019-12-12] DOI: 10.1007/S11274-019-2782-Y ISSN: 0959-3993, XP036956611 resumen	1-11
A	WO 2022067358 A1 (UNIV STELLENBOSCH [ZA]) 31 marzo 2022 (2022-03-31) citado en la solicitud reivindicaciones 1-15	1-11

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL
Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/ES2024/070445

Documento de patente citado en al informe de búsqueda			Fecha de publicación (día/mes/año)	Miembro(s) de la familia de patentes			Fecha de publicación (día/mes/año)
WO	2022049583	A1	10 marzo 2022	IL	301166	A	01 mayo 2023
				US	2024287351	A1	29 agosto 2024
				WO	2022049583	A1	10 marzo 2022
WO	2017013294	A1	26 enero 2017	CN	108135862	A	08 junio 2018
				DK	3326971	T3	15 febrero 2021
				EP	3326971	A1	30 mayo 2018
				ES	2549685	A1	30 octubre 2015
				ES	2850125	T3	25 agosto 2021
				HK	1256549	A1	27 septiembre 2019
				US	2018177184	A1	28 junio 2018
				WO	2017013294	A1	26 enero 2017
				WO	2022067358	A1	31 marzo 2022
US	2024026166	A1	25 enero 2024				
WO	2022067358	A1	31 marzo 2022				

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2024/070445

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. A01N25/10 A01N55/00 A01N55/10 A01N35/04 A01P1/00 C09D5/14		
ADD. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A01N A01P C09G C09D		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2022/049583 A1 (UNIV BAR ILAN [IL]) 10 March 2022 (2022-03-10) claims 1-61 -----	1, 2, 4
X	WO 2017/013294 A1 (UNIV VALENCIA POLITECNICA [ES]) 26 January 2017 (2017-01-26) claims 1-15 ----- - / - -	1 - 11
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance;; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 4 December 2024		Date of mailing of the international search report 07/01/2025
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Marie, Gérald

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2024/070445

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	RUIZ-RICO MARÍA ET AL: "Enhanced antimicrobial activity of essential oil components immobilized on silica particles", FOOD CHEMISTRY, ELSEVIER LTD, NL, vol. 233, 20 April 2017 (2017-04-20), pages 228-236, XP085491852, ISSN: 0308-8146, DOI: 10.1016/J.FOODCHEM.2017.04.118 cited in the application abstract scheme 1; page 229 -----	1 - 11
X	RUIZ-RICO MARÍA ET AL: "In vitro antimicrobial activity of immobilised essential oil components against", WORLD JOURNAL OF MICROBIOLOGY AND BIOTECHNOLOGY, SPRINGER NETHERLANDS, DORDRECHT, vol. 36, no. 1, 12 December 2019 (2019-12-12), XP036956611, ISSN: 0959-3993, DOI: 10.1007/S11274-019-2782-Y [retrieved on 2019-12-12] abstract -----	1 - 11
A	WO 2022/067358 A1 (UNIV STELLENBOSCH [ZA]) 31 March 2022 (2022-03-31) cited in the application claims 1-15 -----	1 - 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/ES2024/070445

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2022049583 A1	10-03-2022	IL 301166 A	01-05-2023
		US 2024287351 A1	29-08-2024
		WO 2022049583 A1	10-03-2022
WO 2017013294 A1	26-01-2017	CN 108135862 A	08-06-2018
		DK 3326971 T3	15-02-2021
		EP 3326971 A1	30-05-2018
		ES 2549685 A1	30-10-2015
		ES 2850125 T3	25-08-2021
		HK 1256549 A1	27-09-2019
		US 2018177184 A1	28-06-2018
		WO 2017013294 A1	26-01-2017
WO 2022067358 A1	31-03-2022	GB 2614185 A	28-06-2023
		US 2024026166 A1	25-01-2024
		WO 2022067358 A1	31-03-2022