

(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
01 de octubre de 2020 (01.10.2020)

WIPO | PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 2020/193830 A1

(51) Clasificación internacional de patentes:
C23C 16/00 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2020/070195

(22) Fecha de presentación internacional:
20 de marzo de 2020 (20.03.2020)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P201930265 25 de marzo de 2019 (25.03.2019) ES

(71) Solicitantes: **UNIVERSIDAD DE LA RIOJA** [ES/ES];
Avenida De La Paz 93, 26006 Logroño (La Rioja) (ES).
FUNDACIÓN RIOJA SALUD [ES/ES]; C/ Piqueras 98,
26006 Logroño (La Rioja) (ES).

(72) Inventores: **SÁENZ DOMÍNGUEZ, Yolanda**; Funda-
ción Rioja Salud, C/ Piqueras 98, 26006 Logroño (La Rio-
ja) (ES). **ALBA ELÍAS, Fernando**; Universidad de La
Rioja, Avenida De La Paz 93, 26006 Logroño (La Rio-
ja) (ES). **LÓPEZ MARTÍNEZ, María**; Fundación Rio-
ja Salud, C/ Piqueras 98, 26006 Logroño (La Rioja) (ES).
SAINZ GARCÍA, Elisa; Universidad de La Rioja, Avenida
De La Paz 93, 26006 Logroño (La Rioja) (ES). **LOZANO
FERNÁNDEZ, Carmen**; Universidad de La Rioja, Ave-
nida De La Paz 93, 26006 Logroño (La Rioja) (ES). **MÚ-
GICA VIDAL, Rodolfo**; Universidad de La Rioja, Aveni-
da De La Paz 93, 26006 Logroño (La Rioja) (ES). **ROJO
BEZARES, Beatriz**; Fundación Rioja Salud, C/ Piqueras
98, 26006 Logroño (La Rioja) (ES). **GONZÁLEZ MAR-
COS, Ana**; Universidad de La Rioja, Avenida De La Paz 93,
26006 Logroño (La Rioja) (ES). **TOLEDANO REGALA-
DO, Paula**; Fundación Rioja Salud, C/ Piqueras 98, 26006
Logroño (La Rioja) (ES). **MURO FRAGUAS, Ignacio**;
Universidad de La Rioja, Avenida De La Paz 93, 26006 Lo-
groño (La Rioja) (ES).

(74) Mandatario: **MASLANKA KUBIK, Dorota Irena**; C/
Vara de Rey 5 TER, 3º, Oficina 5, 26003 Logroño (La Rio-
ja) (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, CZ, DE, DJ, DK,
DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA,
MD, ME, MG, MK, MN, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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).

Publicada:

— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))

(54) Title: PRO-BIOFILM COATING, PRODUCTION METHOD THEREOF, AND SUBSTRATE COATED WITH SAME

(54) Título: RECUBRIMIENTO PRO-BIOFILM, MÉTODO PARA SU PRODUCCIÓN Y SUSTRATO RECUBIERTO POR EL MISMO

(57) Abstract: The invention relates to a pro-biofilm coating applied by means of cold atmospheric plasma polymerisation of a precursor on a substrate. The coating has a roughness that promotes the creation of more than 100% biofilm on the substrate, 100% biofilm being that produced on the same substrate without the pro-biofilm coating. The invention also relates to a method for producing the pro-biofilm coating, and to a substrate coated with same.

(57) Resumen: La invención se refiere a un recubrimiento pro-biofilm aplicado mediante polimerización de un precursor por plasma atmosférico frío sobre un sustrato. El recubrimiento presenta una rugosidad tal que promueve la creación de más del 100% de biofilm sobre el sustrato, siendo el 100% de biofilm el producido sobre el mismo sustrato carente de dicho recubrimiento pro-biofilm. La invención también se refiere a un método de producción de dicho recubrimiento pro-biofilm y a un sustrato recubierto por el mismo.



WO 2020/193830 A1

RECUBRIMIENTO PRO-BIOFILM, MÉTODO PARA SU PRODUCCIÓN Y SUSTRATO
RECUBIERTO POR EL MISMO

Campo de la invención

- 5 La presente invención se refiere al campo del control bacteriano, más específicamente del control de biofilms bacterianos, y en particular al fomento de la aparición de biofilms bacterianos.

Antecedentes de la invención

- 10 El biofilm es una agrupación de microorganismos rodeados por una matriz de sustancias poliméricas extracelulares que incluyen agua, polisacáridos, proteínas, lípidos, ácidos nucleicos y otros biopolímeros. Esta matriz extracelular favorece la adhesión de los microorganismos a superficies, les protege de condiciones ambientales adversas y de agentes antimicrobianos, y les ayuda a captar nutrientes del medio para
15 facilitar la proliferación microbiana.

- El desarrollo de un biofilm tiene lugar en las siguientes etapas: una etapa de fijación inicial en la que las células bacterianas se adhieren y colonizan superficies sólidas. Le siguen las etapas de proliferación y maduración en las que, mediante la activación de sistemas de comunicación intercelular, se comienzan a formar
20 microcolonias y la matriz extracelular, alcanzando una densidad de población óptima y una estructura madura de biofilm. Finalmente se produce la etapa de dispersión en la que células bacterianas o componentes del biofilm pueden separarse del mismo, migrar y colonizar otras superficies, lo que supone una fuente persistente de diseminación y contaminación.

- 25 En la mayoría de los casos, la aparición de un biofilm conlleva una serie de problemas y consecuencias perjudiciales; por lo que se emplean y desarrollan técnicas enfocadas principalmente a la prevención y eliminación de los biofilm, como los recubrimientos o procedimientos anti-biofilm.

- Los biofilm deterioran productos o superficies en las que se desarrollan, pero
30 además, cuando están formados por microorganismos de naturaleza patógena, son motivo de gran preocupación en la industria alimentaria, farmacéutica o clínica ya que suponen una fuente de contaminación de los productos y un riesgo para la salud pública. Por ejemplo, en el caso de los equipos de procesamiento y transformación de los alimentos; así como en las superficies de contacto con los mismos, la eliminación de biofilm
35 patógeno desempeña un papel vital para garantizar un estado óptimo de calidad

microbiológica alimentaria. El biofilm actúa como un reservorio que puede proteger o liberar bacterias patógenas en estado libre (planctónico), organismos ubicuos especialmente difíciles de controlar, lo que da como resultado persistencia bacteriana en la planta de producción y episodios de contaminación cruzada de alimentos, con riesgos evidentes para la seguridad alimentaria.

Sin embargo, existen ciertas situaciones en la que la generación de más biofilm supone una ventaja. Un ejemplo es el caso de la industria médica, con fines de diagnóstico y de elección del tratamiento. Cuando se estudia un microorganismo patógeno (que provoca una enfermedad) en el laboratorio (*in vitro*), es deseable que este microorganismo se comporte de manera similar a la que lo haría en el interior del paciente (*in vivo*). Tradicionalmente los laboratorios de microbiología han centrado sus actividades en aislar y realizar estudios de sensibilidad sobre bacterias en forma planctónica. Sin embargo, extrapolar los datos de sensibilidad a los antimicrobianos (incluidos biocidas) a esa misma bacteria cuando está creciendo en el interior de un biofilm, conduce a fracasos terapéuticos, problemas técnicos industriales, recurrencia de las infecciones crónicas, incrementa las probabilidades de contaminación de los productos alimentarios o las superficies industriales, entre otros muchos problemas.

Para realizar estudios *in vitro* de microorganismos sería deseable disponer de un modelo sencillo, manejable y que sea capaz de prever una terapia adecuada *in vivo*. De este modo se evitarían problemas por la elección del agente antibiótico incorrecto o de dosis inadecuadas. Además, sería deseable disponer de un recubrimiento pro-biofilm que permitiera producir biofilm en dicho modelo de manera rápida para así acelerar los estudios *in vitro* anteriormente mencionados.

Otros casos en el que puede ser deseable fomentar la aparición de un biofilm específico son la industria alimentaria y los procesos de biodegradación o biorremediación ambiental. En estos casos, sería deseable disponer de un recubrimiento pro-biofilm que, al aplicarse por ejemplo a un tanque de fermentación e inocularse con un microorganismo beneficioso, permita fomentar la producción de un biofilm del mismo. Dicho microorganismo beneficioso permitirá a su vez proteger al tanque de fermentación frente a la colonización por parte de otros microorganismos perjudiciales.

El documento JP2013173715A da a conocer un método de formación de biofilm mediante tratamiento de irradiación por plasma de una superficie tal como una placa de policarbonato. El tratamiento con plasma produce una modificación química del policarbonato que favorece la adhesión de microorganismos que pueden llegar a formar

un primer biofilm. Este primer biofilm favorece a su vez la adhesión de nuevos microorganismos que formarán un nuevo biofilm. Sin embargo, la modificación química de la superficie mediante tratamiento con plasma depende del material que constituye dicha superficie, y por tanto no todas las superficies podrán modificarse de manera favorable mediante dicho método. Además, la capacidad adhesiva de especies generadas en la superficie de policarbonato mediante tratamiento con plasma disminuye gradualmente a lo largo del tiempo.

Por tanto, sería deseable disponer de un recubrimiento pro-biofilm que favorezca la producción de biofilm independientemente de la superficie sobre la que se aplique dicho recubrimiento y que conserve sus propiedades pro-biofilm a lo largo del tiempo.

Sumario de la invención

Para resolver los problemas indicados anteriormente, la presente invención da a conocer, en un primer aspecto de la misma, un recubrimiento pro-biofilm aplicado mediante polimerización de un precursor por plasma atmosférico frío sobre un sustrato. El recubrimiento según la presente invención presenta una rugosidad tal que promueve la creación de más del 100% de biofilm sobre el sustrato, siendo el 100% de biofilm el producido sobre el mismo sustrato carente de dicho recubrimiento pro-biofilm.

En un segundo aspecto, la presente invención da a conocer un método de producción de un recubrimiento pro-biofilm tal como se definió en el primer aspecto de la invención. El método comprende aplicar un flujo de plasma atmosférico frío y material precursor sobre una superficie de sustrato a recubrir hasta obtener una rugosidad tal que promueve la creación de más del 100% de biofilm sobre el sustrato.

La invención también se refiere a un sustrato que se recubre por un recubrimiento pro-biofilm según el primer aspecto de la invención.

Breve descripción de los dibujos

La presente invención se entenderá mejor con referencia a los siguientes dibujos que ilustran realizaciones preferidas de la presente invención, proporcionadas a modo de ejemplo, y que no deben interpretarse como limitativas de la invención de ninguna manera:

La figura 1 es una vista en sección transversal esquemática de un dispositivo para llevar a cabo un método de producción de recubrimiento pro-biofilm según la realización preferida de la presente invención.

La figura 2 es un gráfico que muestra la relación entre pasadas, rugosidad del

recubrimiento y % de biofilm producido con respecto al control, empleándose poliestireno como sustrato y (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) como material precursor, según una realización preferida de la presente invención.

Las figuras 3A y 3B muestran imágenes de microscopía de fuerza atómica (AFM) y de microscopía de barrido de electrones (SEM), respectivamente, de recubrimientos obtenidos según una realización preferida de la presente invención, en las que también se indica el porcentaje de biofilm obtenido con respecto al control.

La figura 4 es un gráfico que muestra la relación entre la rugosidad del recubrimiento y el % de biofilm obtenido con respecto al control, empleándose poliestireno como sustrato y APTES como material precursor, según una realización preferida de la invención.

La figura 5 es un gráfico que muestra la relación entre la rugosidad del recubrimiento y el % de biofilm obtenido con respecto al control según otra realización preferida de la invención en la que se emplea una mezcla de metacrilato de metil éter de polietilenglicol (PEGMA) e isopropanol (IPA) como material precursor.

La figura 6 muestra imágenes SEM de recubrimientos obtenidos según otra realización preferida de la presente invención, en las que también se indica el porcentaje de biofilm obtenido con respecto al control.

La figura 7 es un gráfico que muestra la relación del porcentaje atómico de carbono (C), oxígeno (O), silicio (Si) y nitrógeno (N) con respecto al número de pasadas según una realización de la presente invención.

La figura 8 muestra gráficos que representan la deconvolución del espectro de alta resolución del carbono para distintos números de pasadas según una realización preferida de la invención.

La figura 9 es un gráfico que representa la relación entre la rugosidad del recubrimiento y el ángulo de contacto con el agua de recubrimientos según una realización preferida de la invención.

La figura 10 es un gráfico que muestra el crecimiento bacteriano en función del tiempo con distintos recubrimientos obtenidos según una realización preferida de la presente invención.

La figura 11 es un esquema del mecanismo de sobre-producción de biofilm (PRO-Biofilm) que se produce en el recubrimiento de la presente invención.

La figura 12 representa imágenes SEM (Microscopia Electrónica de Barrido) de: [a] Sustrato sin recubrir (x2000), [b] Recubrimiento 72p (x2000) y [c] Recubrimiento 72p (x4000).

La figura 13 muestra un esquema de la sobre-producción de biofilm a medida que aumenta la rugosidad con las pasadas: [a] Sin recubrimiento 0p, [b] 4 pasadas 4p, [c] 12 pasadas, 12p y [d] 72 pasadas, 72p.

La figura 14 muestra un esquema del funcionamiento de la molécula de APTES.

5 La figura 15 es un gráfico que muestra la cantidad de biofilm producida a lo largo del tiempo con un recubrimiento según una realización preferida de la presente invención en comparación con el control.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

10 El plasma es el estado que alcanza un gas cuando se le aporta una cantidad de energía que logra ionizar sus moléculas y átomos. Es decir, el paso de la materia de estado gaseoso a estado de plasma se produce mediante una disociación de enlaces moleculares, acompañada de un aumento o disminución de los electrones de los átomos, lo que da lugar a la formación de iones con carga positiva o negativa. En función
15 de si se da o no un equilibrio térmico entre las partículas del plasma, se distingue el plasma térmico del frío.

Un plasma frío o no equilibrado es aquel en el que la temperatura de los electrones (105-5000°C) es mucho mayor que la de las partículas más pesadas (partículas neutras e iones), las cuales se encuentran a temperaturas próximas a la del
20 ambiente (25–100°C). De esta forma, la temperatura de un plasma frío se mantiene generalmente por debajo de 100°C, lo que permite su empleo en tratamientos superficiales sobre gran variedad de materiales sin provocar el deterioro de los mismos debido a un calentamiento excesivo.

La generación de plasma frío se puede llevar a cabo a presión atmosférica en un
25 entorno abierto, es decir, no requiere la utilización de sistemas de vacío ni cámaras dentro de las cuales se establezcan unas condiciones concretas. Estas características dotan a la tecnología del plasma atmosférico frío de una gran versatilidad, relativa simplicidad y bajo coste. Desde el punto de vista de su aplicación industrial, el plasma se ha convertido en una importante herramienta para llevar a cabo multitud de
30 tratamientos superficiales.

Una de las principales modificaciones a las que puede someterse la superficie de un sustrato tratada con plasma es la “polimerización por plasma”. Esta modificación consiste en la deposición de recubrimientos finos utilizando monómeros en estado líquido como precursores a través de su exposición al flujo de plasma.

35 En una realización específica de la presente invención, para la aplicación de

recubrimientos pro-biofilm sobre placas Petri objeto de estudio, se empleó el método de polimerización por plasma utilizando un equipo de plasma atmosférico no equilibrado o frío (APPJ). La selección de los distintos precursores que van a depositarse y parámetros operativos del plasma (variables de entrada), determinan las características específicas del recubrimiento obtenido. Esta versatilidad es de vital importancia cuando se pretenden modificar de una manera específica las propiedades físico-químicas de los recubrimientos superficiales.

Otra característica que hace muy atractiva esta tecnología es que funciona a temperatura ambiente y a presión atmosférica, lo que facilita en gran medida su posible aplicación en líneas de producción ya existentes.

El equipo APPJ empleado (véase la figura 1) consiste en dos electrodos coaxiales (10, 12), entre los cuales circula el gas (14) para generar el plasma (en este caso concreto, se empleó nitrógeno (N_2) con un flujo de 80 slm). El electrodo interior (10) está conectado a tierra, mientras que el electrodo exterior (12) se excita con una determinada frecuencia (corriente de alta tensión) mediante un generador (16) con una potencia de 300 W. A través del electrodo interior (10) se introduce el material precursor (18) (1,5 slm de N_2 que atomiza y transporta el material precursor líquido) hasta la zona de actuación del plasma (20).

Según la realización preferida de la presente invención, y haciendo aún referencia a la figura 1, el método de producción de recubrimiento pro-biofilm comprende en primer lugar la etapa de activar la superficie de la placa Petri (22) (u otro sustrato a recubrir) mediante un chorro de plasma (por ejemplo, plasma de N_2) sin material precursor polimerizable. Esta activación y limpieza de la superficie se realiza preferiblemente mediante 4 pasadas de plasma. El experto en la técnica entenderá que, en otras realizaciones según la invención, puede omitirse esta etapa previa de activación de la superficie.

A continuación, se realiza la etapa de aplicación propiamente dicha de un flujo (20) de plasma atmosférico frío (14) y material precursor (18) sobre la superficie de la placa Petri (22).

Además, el método comprende preferiblemente también la etapa de realizar, de manera simultánea con la aplicación del flujo de plasma, un desplazamiento relativo entre el sustrato a recubrir y el flujo de plasma para recubrir toda la superficie del sustrato.

El flujo de plasma (20) proyectado sobre la superficie (que transforma, transporta y proyecta el material precursor sobre la base de la placa Petri) tiene aproximadamente

10 mm de diámetro. Por tanto, para la aplicación homogénea del recubrimiento (realización preferida) por toda la base de la placa Petri (22), este chorro debe desplazarse por la totalidad de la misma (de 30 mm de diámetro). Dado que el flujo de plasma (80 slm de N₂) y del precursor (1,5 slm de N₂ que atomiza y transporta el material precursor) son constantes, para aplicar un recubrimiento homogéneo, este desplazamiento debe realizarse a velocidad constante.

Para ello, la placa Petri (22) gira y se desplaza (en un eje) de manera simultánea con la aplicación del flujo de plasma (20). Mientras tanto, el equipo de aplicación de plasma permanece fijo. Evidentemente, según realizaciones alternativas, la placa Petri puede permanecer fija mientras que se desplaza una boquilla de aplicación de plasma. Según otra alternativa adicional, tanto la placa Petri como la boquilla de aplicación de plasma pueden moverse simultáneamente una con respecto a la otra.

La velocidad lineal (tangencial) de recubrimiento (V_t) es constante (10 mm/s). Cada vez que se recubre una vuelta (a un determinado radio) la velocidad de giro (ω) se modifica (se reduce en el borde, se aumenta en el centro) para que la velocidad lineal (V_t) permanezca siempre constante. Por cada vuelta completa realizada por la placa Petri (22), ésta se desplaza a lo largo del eje una distancia de avance determinada (24). El hecho de mantener la velocidad lineal (V_t) constante permite que el recubrimiento aplicado sea homogéneo.

Se define como “pasada” cada vez que el chorro de plasma recubre totalmente la base de la placa Petri. Se han obtenido distintos recubrimientos aplicando desde 2 hasta 96 pasadas, tal como se describirá a continuación en el presente documento.

Siguiendo el método anteriormente descrito, se realizaron diversos recubrimientos pro-biofilm empleando como material precursor o bien (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) o bien una mezcla en diversas proporciones de metacrilato de metil éter de polietilenglicol (PEGMA, MW: 500) e isopropanol (IPA). Asimismo, se emplearon placas Petri o bien de poliestireno (PS) de 30 mm de diámetro (previamente tratadas con plasma y sin recubrimiento) o bien de vidrio de 90 mm de diámetro. En la tabla 1 a continuación se detallan las propiedades de las diversas muestras de recubrimientos realizadas según el método de la presente invención:

Tabla 1

Muestra	Pasadas	Sustrato	Precursor
0p	0	PS	-
2p	2	PS	APTES (100%)
4p	4	PS	APTES (100%)
12p	12	PS	APTES (100%)
24p	24	PS	APTES (100%)
48p	48	PS	APTES (100%)
72p	72	PS	APTES (100%)
96p	96	PS	APTES (100%)
0V	0	Vidrio	-
48V	48	Vidrio	APTES (100%)
PG5	2	PS	PEGMA (5%) / IPA (95%)
PG10	2	PS	PEGMA (10%) / IPA (90%)
PG100	2	PS	PEGMA (100%)

Para la cuantificación del porcentaje de biofilm producido (con respecto al producido por un control de placa Petri sin recubrir) que genera la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* sobre las muestras estudiadas, se empleó una técnica con diacetato de fluoresceína (FDA). Dicha técnica, según la bibliografía, se utiliza tanto para medir la actividad microbiana dentro del biofilm total (Adam y Duncan, 2001; Schnürer y Rosswall, 1982; Taylor *et al.*, 2001), como para cuantificar la biomasa de biofilm (Honraet *et al.*, 2005; Prieto *et al.*, 2004). La cuantificación del biofilm se realizó tras 24 horas de incubación a 37°C.

Tal como puede apreciarse en la figura 2, en el caso de los recubrimientos de APTES aplicados sobre PS (poliestireno) existe una relación directa entre el número de pasadas, la rugosidad del recubrimiento y el % de biofilm producido con respecto al control (sustrato de PS sin recubrimiento). Al aumentar el número de pasadas, aumentan tanto la rugosidad como el % de biofilm. A medida que se suceden las pasadas, la morfología del recubrimiento pasa de ser prácticamente lisa ($R_a = 6,69$ nm con 2 pasadas) a presentar una estructura granular ($R_a = 105$ nm con 96 pasadas) típica de los recubrimientos basados en óxidos de silicio (el APTES es un siloxano que al polimerizarse por plasma produce óxidos de silicio). Esta estructura granular puede identificarse en las imágenes AFM y SEM (véanse las figuras 3A y 3B) y es la que justifica el aumento de la rugosidad del recubrimiento (figura 2).

En la figura 4 se muestra la relación entre la rugosidad de los recubrimientos basados en APTES y el % de biofilm que se produce en cada uno de ellos. Los recubrimientos que generan menos biofilm que el producido en la muestra control (la que no ha sido recubierta, 0p, equivalente al 100% de biofilm) se definen como anti-biofilm (<100%), mientras que los que generan más del 100% de biofilm se definen como pro-biofilm (>100%).

Teniendo en cuenta lo anterior, se define como "límite pro-biofilm" aquella rugosidad a partir de la cual se obtiene un biofilm superior al 100% (con respecto al generado en el control 0p).

En la figura 4 puede identificarse que en los recubrimientos aplicados sobre PS y obtenidos mediante polimerización por plasma basados en APTES, el límite pro-biofilm es una rugosidad Ra mínima de aproximadamente 10 nm (Ra: rugosidad media aritmética).

A continuación, se repitió el método anterior empleando como sustrato una placa Petri de vidrio, en lugar de PS. Las placas de vidrio presentan una rugosidad muy similar a las de PS (PS sin recubrir; 0p → Ra= 4,87±1,13 nm y vidrio sin recubrir; 0V → Ra=4,67±0,98 nm).

Se recubrió una placa de vidrio con 48 pasadas.

Por lo demás, el método de recubrimiento fue idéntico al empleado con las placas Petri de PS anteriormente descrito y se empleó APTES como material precursor líquido.

Se determinó experimentalmente que el recubrimiento aplicado sobre la placa de vidrio con 48 pasadas (48V) presentaba una rugosidad y % de biofilm con respecto al control (Ra= 33,2±1,27 nm y 368±18%) muy similar a la muestra 24p con el recubrimiento aplicado sobre una placa de PS con 24 pasadas (Ra= 33,4±1,3 nm y 300±3,5%).

Según esto, puede concluirse que aquellos recubrimientos basados en APTES que presentan una rugosidad muy similar, generan un % de biofilm similar independientemente del sustrato sobre el que se haya aplicado. La única diferencia que ha existido en este caso es que, para obtener sobre el vidrio un recubrimiento con una rugosidad similar a la del PS, ha sido preciso aplicar más pasadas (48 pasadas para el vidrio y 24 pasadas para el PS).

Según todo lo anterior, se puede concluir que un recubrimiento basado en APTES, con una determinada rugosidad, genera una cantidad similar de biofilm, independientemente del sustrato (poliestireno, vidrio u otro) sobre el que se aplique.

A continuación, se repitió el método de recubrimiento anteriormente descrito

empleando, en lugar de APTES, mezclas de PEGMA (MW500) e IPA en distintas concentraciones.

En este caso, se fijó el número de pasadas a 2 y se varió el porcentaje en peso de PEGMA en una dilución de PEGMA e IPA (5, 10 y 100% en peso).

- 5 En la figura 5 se muestra la relación entre la rugosidad y el % de biofilm de recubrimientos aplicados sobre PS empleando APTES (realización anterior) y PEGMA+IPA (presente realización) como materiales precursores líquidos. En dicha figura se observa que los recubrimientos basados en PEGMA requieren una mayor rugosidad para conseguir la cantidad de biofilm generada con los recubrimientos basados en APTES. En este sentido, si bien el límite pro-biofilm de los recubrimientos de APTES es de aproximadamente 10 nm (rugosidad a partir de la cual se obtiene un biofilm superior al 100% con respecto al control), en el caso de los recubrimientos basados en PEGMA el límite pro-biofilm es de 160 nm (figura 5).

- 15 A partir de estos resultados, puede concluirse que no es posible definir un límite pro-biofilm común a recubrimientos basados en distintos materiales precursores. Una de las posibles razones que justifique la no existencia de un límite pro-biofilm común puede estar relacionada con el hecho de que cada material precursor produce un recubrimiento con un patrón superficial específico. Si se tiene en cuenta que la morfología superficial (rugosidad) tiene una relación significativa con la cantidad de biofilm generada, es razonable pensar que patrones superficiales distintos harán que los microorganismos produzcan cantidades de biofilm diferentes. En la figura 6 se muestran imágenes SEM de las 3 muestras recubiertas con PEGMA+IPA. En todos los casos, se aprecia que la morfología de la superficie del recubrimiento es sensiblemente distinta de la de las muestras recubiertas empleando APTES (figuras 3A y 3B). Resulta especialmente interesante el caso de la muestra PG10 en el que la morfología de su recubrimiento sigue un patrón similar a fibras, mientras que el de cualquier muestra basada en APTES presenta un patrón basado en partículas.

- 25 En cualquier caso, independientemente del precursor empleado (APTES o PEGMA), se constata que a medida que aumenta la rugosidad, aumenta el biofilm. Asimismo, en cualquier caso existe una rugosidad específica a partir de la cual el recubrimiento es pro-biofilm.

A continuación, se realizó una caracterización química y de humectabilidad de los recubrimientos pro-biofilm según las realizaciones de la presente invención.

- 35 La caracterización química se realizó mediante análisis espectroscopia de fotoelectrones emitidos por Rayos X (XPS) y la de humectabilidad se realizó mediante

un análisis de la medida del ángulo de contacto con el agua (WCA).

Mediante el análisis XPS es posible identificar y cuantificar la composición química de los 3 a 5 primeros nanómetros del recubrimiento (lugar a partir del cual crece el biofilm). En la figura 7 se muestra el porcentaje atómico de los elementos presentes (C, O, Si y N) en cada uno de los recubrimientos estudiados basados en APTES (sin recubrir, 0p, y recubierto con 2, 4, 12, 24, 48, 72 y 96 pasadas). Estos elementos (C, O, Si y N) proceden de la polimerización por plasma del APTES (en el caso de las muestras recubiertas), de la superficie de PS (en el caso de la placa Petri sin recubrir de control) y del aire circundante durante el procedimiento de recubrimiento.

En el caso de la muestra sin recubrir (0p) es posible identificar los típicos porcentajes presentes en el PS (poliestireno) que son sensiblemente distintos de los de las muestras recubiertas (por ejemplo, porcentaje alto de carbono). Esta muestra sin recubrir (0p) es la única en la que no se detecta silicio pues este elemento procede del APTES.

A partir de esta figura 7 puede concluirse que la composición química de la superficie de TODOS los recubrimientos es muy similar e independiente de su rugosidad (o número de pasadas aplicadas).

Por otro lado, mediante el análisis XPS también es posible identificar y cuantificar los enlaces de cada uno de los elementos identificados con anterioridad (C, O, Si y N). En la figura 8 se muestra la deconvolución (o descomposición) del espectro "total" de alta resolución del carbono (C1s) de las muestras 0p, 2p y 72p.

La deconvolución del carbono (C1s) es una práctica habitual en la caracterización química de superficies. Esta deconvolución permite identificar los espectros parciales que componen el espectro total. Cada espectro parcial corresponde a un enlace específico al que está unido el carbono. El área de cada espectro parcial (asociado a un determinado enlace) permite cuantificar su presencia en la superficie con respecto al total de enlaces.

En la figura 8 se muestra el porcentaje relativo a cada enlace (inscrito en un rectángulo). En el caso de la deconvolución de la muestra 0p (placa Petri de PS sin recubrir) se identifican los enlaces típicos a los que está unido el carbono en una muestra de PS tratada con plasma (sin recubrimiento, sólo plasma). Las placas Petri de PS que se emplearon en este estudio se habían tratado previamente con plasma por el proveedor de las mismas (placas Petri / cultivos celulares Nunc™ de la empresa Thermo Scientific™) para su activación superficial. En esta muestra (0p) es posible identificar los enlaces: [A] C-C y C-H aromáticos, [B] C-C y C-H alifáticos, [C] los grupos C-O/C-N,

[D] O-C=O y [E] π - π^* . Los grupos [A], [B] y [E] proceden de la molécula de PS, mientras que los grupos [C] y [D] se forman durante el tratamiento con plasma (realizado por el proveedor de placas Petri de PS). Cuando se recubren las placas Petri de PS mediante polimerización por plasma basada en APTES (muestras 2p y 72p, representativas de
5 todas las muestras recubiertas a partir de APTES) los enlaces [A], [D] y [E] desaparecen y aparecen los enlaces [F] C-Si y [G] C=O procedentes del APTES polimerizado. Los enlaces [B] y [C] son comunes al PS activado con plasma y al APTES polimerizado.

A partir del análisis de los enlaces y porcentajes que se muestran en la figura 8, puede concluirse que la estructura química de la superficie de las muestras recubiertas
10 (2p y 72p) es muy distinta de la muestra sin recubrir (0p), tanto por los porcentajes de elementos totales (C, O, Si y N en la figura 7) como por los enlaces a los que está asociado el carbono (figura 8).

Además, la estructura química de la superficie de las muestras recubiertas (muestras 2p y 72p, representativas de todas las muestras recubiertas a partir de
15 APTES) es muy similar independientemente de la gran diferencia de rugosidad que existe entre ambas (Ra de 2p = 6,7 nm y Ra de 72p = 55,1 nm).

Finalmente, según todo lo anterior, el aumento de la producción de biofilm (a mayor rugosidad) no está determinado por la naturaleza química de los recubrimientos, pues entre estos no existen diferencias sustanciales que justifiquen el aumento en la
20 producción de biofilm.

A continuación se realizó la caracterización mediante el análisis del WCA, que se refiere al ángulo que forma la superficie de un líquido al entrar en contacto con un sólido. El valor del ángulo de contacto depende principalmente de la relación que existe entre las fuerzas adhesivas entre el líquido y el sólido y las fuerzas cohesivas del líquido.
25 A mayores fuerzas adhesivas, menores WCA.

En la figura 9, se muestra la relación entre la rugosidad y el WCA de los recubrimientos estudiados basados en APTES (sin recubrir, 0p, y recubrimientos con 2, 4, 12, 24, 48, 72 y 96 pasadas). En dicha figura se observa que todas las muestras recubiertas (excepto 96p) presentan un WCA muy similar al de la muestra sin recubrir
30 (0p). Esto quiere decir que la superficie recubierta no presenta una capacidad adhesiva superior a la de la muestra sin recubrir (0p). Por tanto, la cantidad de biofilm producida en dichos recubrimientos no depende del aumento de la adhesión (disminución del WCA) conferida por los mismos.

Por tanto, en resumen y con respecto a los recubrimientos sobre PS empleando
35 APTES, todos los recubrimientos presentan la misma "química" y "humectabilidad", y

todos los recubrimientos presentan “morfología” y “% de biofilm” distintos.

Por tanto, el aumento del % de biofilm no depende de la “química” o “humectabilidad” (adhesión) del recubrimiento, sino que depende de la modificación de la “morfología” del mismo (rugosidad).

5 A continuación, se estudió el crecimiento bacteriano (véase la figura 10) durante 24 horas (0, 3, 6 y 24 horas) de las muestras sin recubrir (0p) y con recubrimientos con 2, 4, 12, 24 y 48 pasadas. El crecimiento bacteriano de cada muestra se determinó empleando un espectrofotómetro Microplate Reader 680XR Bio-Rad y midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 620 nm.

10 En la figura 10 se observa que únicamente en el recubrimiento 12p crecieron más bacterias que en la muestra sin recubrir (0p). Es decir, en la mayoría de las muestras recubiertas crecieron menos bacterias que en el control. Por tanto, la producción de más biofilm por parte de dichas muestras (con respecto a la muestra sin recubrir, 0p), no se debe a un aumento del número de microorganismos adheridos.

15

El mecanismo de “sobre-producción” de biofilm

A continuación, se destallarán los mecanismos de creación de biofilm, según la presente invención.

En las primeras fases de colonización de una superficie por parte de las
20 bacterias, los grupos amina (NH_2) presentes en el recubrimiento (provenientes de la plasma-polimerización del APTES) promueven su adhesión en el mismo, y posteriormente, los grupos carbono-oxígeno (C-O , O-C=O y C=O , también provenientes del APTES y de la atmosfera circundante) producen un estrés oxidativo que promueve la creación de una mayor cantidad de biofilm por parte de las bacterias (como respuesta
25 al mencionado estrés). En la Fig. 11 se muestra un esquema del mecanismo de sobre-producción de biofilm (PRO-Biofilm) que se produce en el recubrimiento de la presente invención. En la Fig. 11a se muestra un esquema de la adhesión inicial de las bacterias al recubrimiento. Esta adhesión se debe a la atracción electrostática generada por las aminas (con carga positiva) sobre las bacterias (normalmente con carga negativa). En
30 la Fig. 11b se muestra un esquema de la sobre-producción de biofilm posterior a la adhesión. Esta sobre-producción se debe al estrés oxidativo que los grupos carbono-oxígeno (C-O , O-C=O y C=O) producen sobre las bacterias. Éstas se sienten amenazadas y responden generando mayor cantidad de biofilm (protección).

Una vez las bacterias se han adherido a la superficie del recubrimiento, el
35 aumento de su rugosidad (que se produce al aumentar las pasadas) promueve la

creación de biofilm (cuanta más rugosidad, más biofilm). El aumento de la rugosidad del recubrimiento se ve promovido por los grupos de óxido de silicio (SiO_x , provenientes de la plasma-polimerización del APTES) pues éstos, cada vez que se aplica una pasada, se van acumulando en el recubrimiento en forma de partículas esféricas y agrupaciones de éstas, de mayor tamaño a medida que aumenta el número de pasadas. El aumento de la rugosidad facilita la creación de colonias de bacterias, la adhesión de las mismas, y finalmente, la generación de mayor cantidad de biofilm. En la Fig. 12 se muestran las imágenes SEM (Microscopia Electrónica de Barrido) de: [a] Substrato sin recubrir (x2000 aumentos), [b] Recubrimiento 72p (x2000 aumentos) y [c] Recubrimiento 72p (x4000 aumentos). En estas imágenes es posible identificar las bacterias (*Pseudomonas aeruginosa*) adheridas a la superficie de cada muestra. En la imagen Fig. 12a se aprecian muchas menos bacterias que en la Fig. 12b. Tanto en la Fig. 12b, como en Fig. 12c se observa cómo las bacterias han formado agrupaciones en los valles de la superficie rugosa del recubrimiento 72p. En estas imágenes no es posible identificar el biofilm, pues éste se destruye durante la preparación de la muestra previa a su introducción en el microscopio (fijación y deshidratación de la muestra).

En la Fig. 13 se muestra un esquema de la producción de biofilm a medida que aumenta la rugosidad del recubrimiento (PRO-Biofilm) con las pasadas. En la Fig. 13a se representa la fase adhesión y creación de biofilm de una bacteria (*Pseudomonas aeruginosa*) sobre el substrato SIN recubrir. En las siguientes imágenes Fig. 13b, c y d se representa la formación de colonias y el aumento de la cantidad de biofilm a medida que aumenta la rugosidad del recubrimiento (desde las 4 pasadas, 4p, hasta las 72, 72p). La Fig. 13a correspondería a la imagen de la Fig. 12a y la Fig. 13d correspondería a la imagen de las Fig. 12b y Fig. 12c.

Y finalmente, en la Fig. 14 se muestra un esquema que representa la “función” de cada “parte” de la molécula de APTES después de que haya sido descompuesta en el proceso de plasma-polimerización a presión atmosférica. Los grupos amino (NH_2) promueven la adhesión de las bacterias, los grupos carbono-oxígeno (C-O , O-C=O y C=O) “estresan” a las bacterias haciendo que, como protección, generan mayor cantidad de biofilm, y finalmente, los grupos de óxido de silicio (SiO_x) se acumulan en distintos aglomerados (cuyo tamaño depende del número de pasadas) que promueve la formación de mayores colonias de bacterias con la consiguiente mayor producción de biofilm.

Por último, se determinó la velocidad de generación de biofilm mediante los

recubrimientos según la presente invención. En la figura 15 se muestra la cantidad de biofilm (medida mediante FDA) generado en las muestras 0p y 48p durante 24 horas (medidas realizadas a 6, 12 y 24 horas). En dicha figura se puede observar que la máxima cantidad de biofilm que se produce en la muestra 48p se alcanza a las 6 horas de la inoculación, siendo ya en ese momento (6h) significativamente mayor que el biofilm producido en la muestra no recubierta (0p). Esta rapidez es de vital importancia cuando se debe determinar con urgencia qué tratamiento es el óptimo para un paciente en una situación determinada (antibiótico más eficaz y dosis del mismo).

Anteriormente se han descrito con detalle realizaciones preferidas de la presente invención. Sin embargo, el experto en la técnica podrá realizar modificaciones y variaciones a las mismas sin por ello apartarse del alcance de protección definido por las siguientes reivindicaciones. Por ejemplo, se han descrito materiales precursores y sustratos específicos en las realizaciones específicas de la invención, sin embargo el experto en la técnica podrá aplicar las enseñanzas dadas a conocer en el presente documento para determinar, mediante experimentación de rutina, otras combinaciones de materiales precursores, sustratos y números de pasadas de plasma para proporcionar recubrimientos pro-biofilm que presenten una rugosidad suficiente como para fomentar la creación de más del 100% de biofilm, en comparación con el biofilm producido sobre el mismo sustrato carente de recubrimiento pro-biofilm, según la presente invención.

REIVINDICACIONES

1. Recubrimiento pro-biofilm aplicado mediante polimerización de un precursor por plasma atmosférico frío sobre un sustrato, presentando el recubrimiento una rugosidad tal que promueve la creación de más del 100% de biofilm sobre el sustrato, siendo el 100% de biofilm el producido sobre el mismo sustrato carente de dicho recubrimiento pro-biofilm.
2. Recubrimiento pro-biofilm según la reivindicación 1, caracterizado por que el material precursor que constituye el recubrimiento se selecciona del grupo constituido por (3-aminopropil)triethoxisilano (APTES) y una mezcla de metacrilato de metil éter de polietilenglicol (PEGMA, MW: 500) e isopropanol (IPA).
3. Recubrimiento pro-biofilm según la reivindicación 2, caracterizado por que el material precursor que constituye el recubrimiento es APTES y el recubrimiento presenta una rugosidad media aritmética (Ra) mínima de más de 10 nm.
4. Recubrimiento pro-biofilm según la reivindicación 2, caracterizado por que el material precursor que constituye el recubrimiento es una mezcla de PEGMA e IPA y el recubrimiento presenta una rugosidad media aritmética (Ra) mínima de más de 160 nm.
5. Recubrimiento pro-biofilm según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, caracterizado por que el sustrato se selecciona del grupo constituido por poliestireno y vidrio.
6. Método de producción de un recubrimiento pro-biofilm según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado por que comprende aplicar un flujo de plasma atmosférico frío y material precursor de recubrimiento sobre una superficie de sustrato a recubrir hasta obtener una rugosidad tal que promueve la creación de más del 100% de biofilm sobre el sustrato, siendo el 100% de biofilm el producido sobre el mismo sustrato carente de dicho recubrimiento pro-biofilm.
7. Método según la reivindicación 6, caracterizado por que comprende además la etapa de realizar, de manera simultánea con la aplicación del flujo de plasma, un desplazamiento relativo entre el sustrato a recubrir y el flujo de plasma para recubrir toda la superficie del sustrato.
8. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 7, caracterizado por que comprende además la etapa previa de activar la superficie del sustrato mediante plasma sin material precursor.

9. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 y 8, caracterizado por que el plasma aplicado es plasma de N₂.
10. Método según la reivindicación 9, caracterizado por que el flujo de plasma consiste en 80 slm de N₂.
- 5 11. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 10, caracterizado por que el material precursor aplicado se selecciona del grupo constituido por APTES y una mezcla de PEGMA e IPA.
12. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 11, caracterizado por que el material precursor se aplica en fase líquida, transportado por un flujo de 1,5
10 slm de N₂.
13. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 12, caracterizado por que el sustrato se selecciona del grupo constituido por poliestireno y vidrio.
14. Método según cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, caracterizado por que la aplicación del recubrimiento se realiza de manera homogénea sobre toda la
15 superficie del sustrato.
15. Sustrato recubierto por un recubrimiento pro-biofilm según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 aplicado sobre al menos una superficie del mismo.

1/9

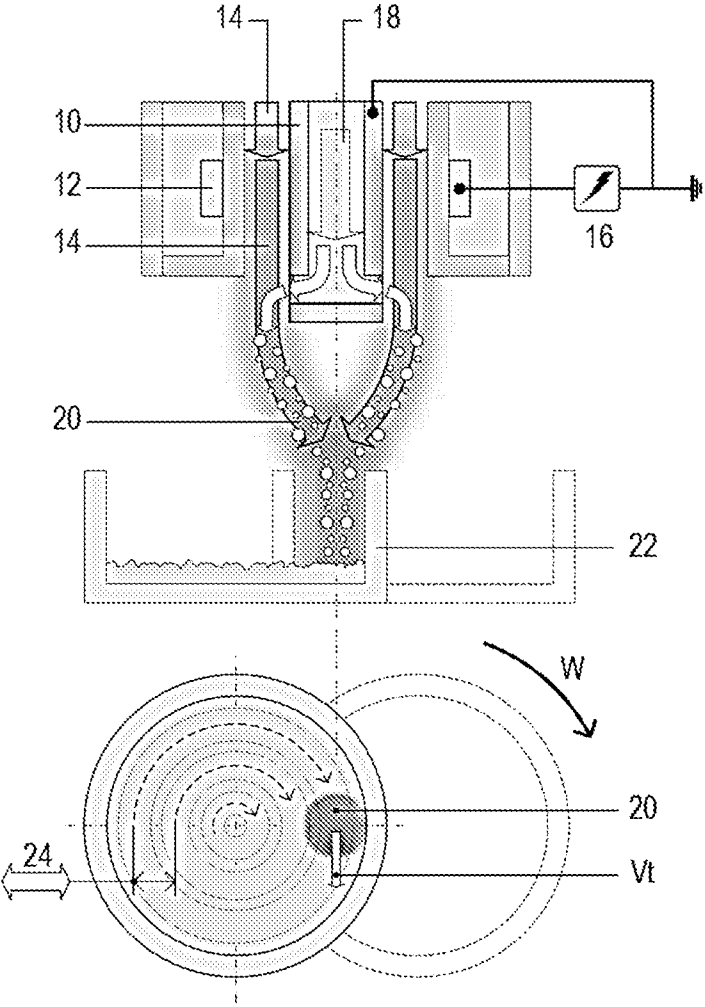


FIG. 1

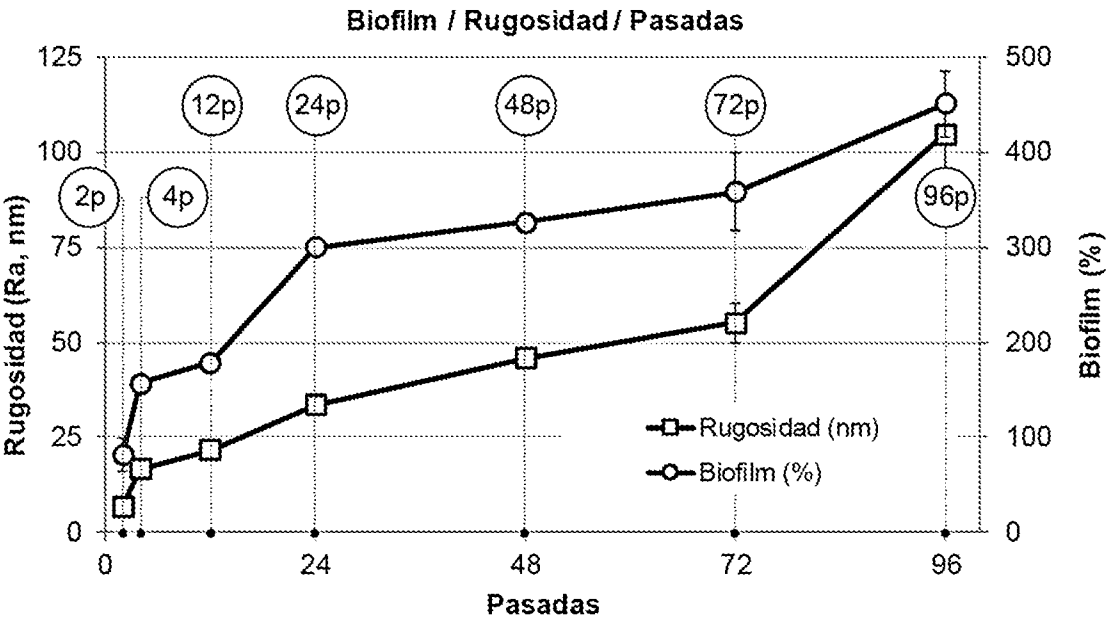


FIG. 2

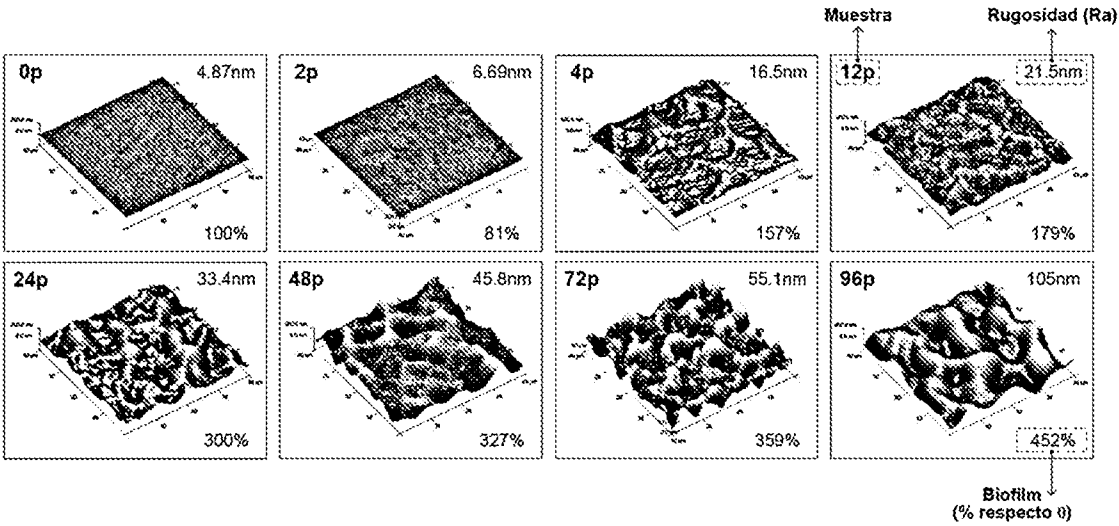


FIG. 3A

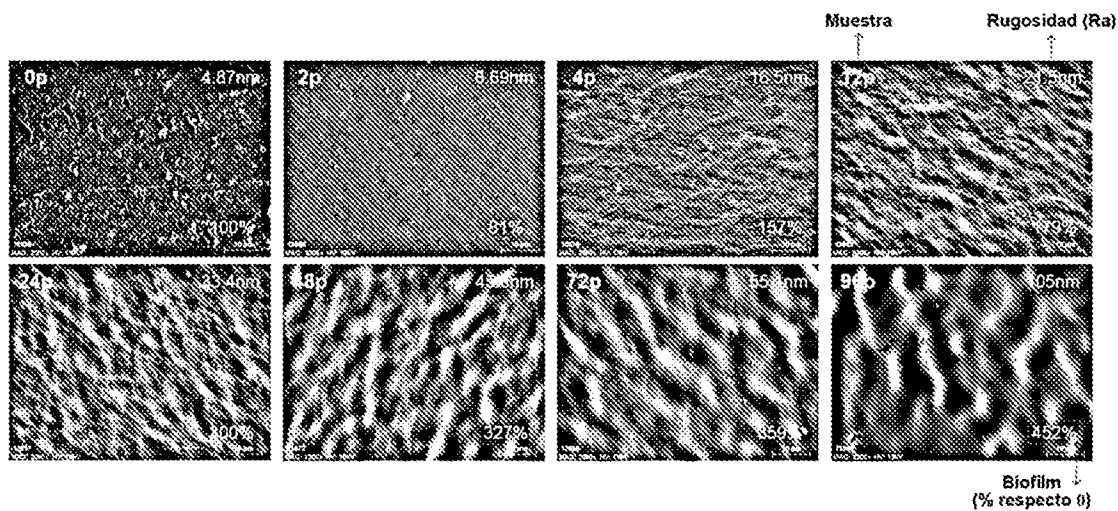


FIG. 3B

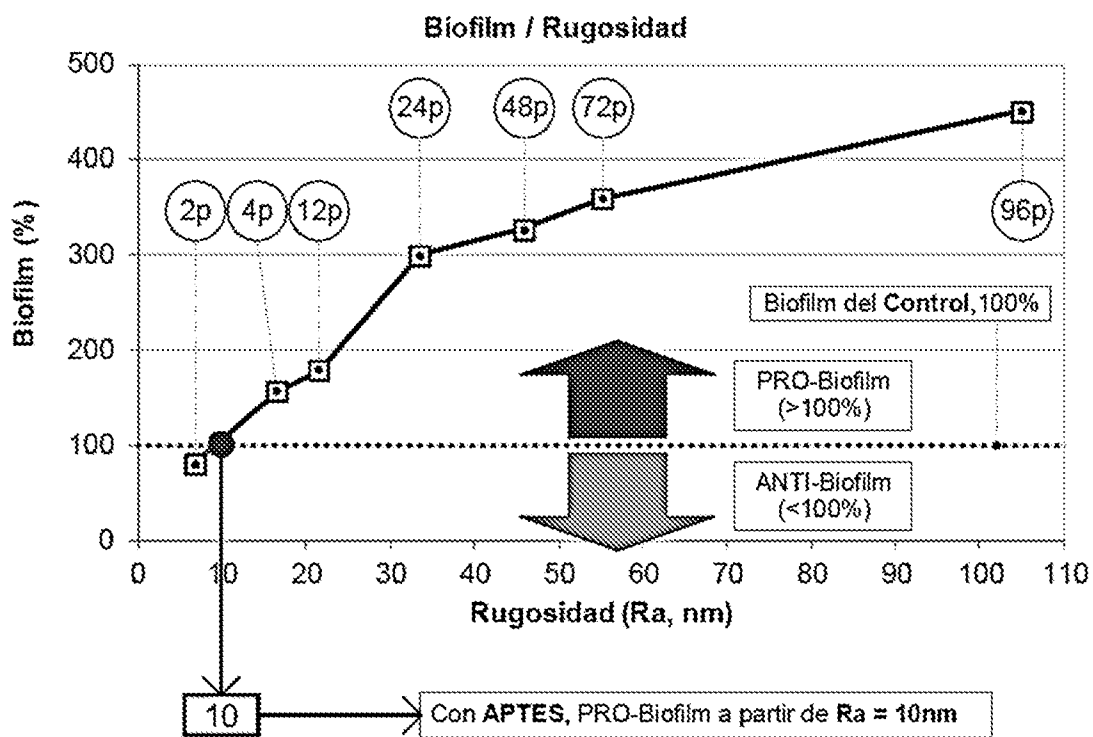


FIG. 4

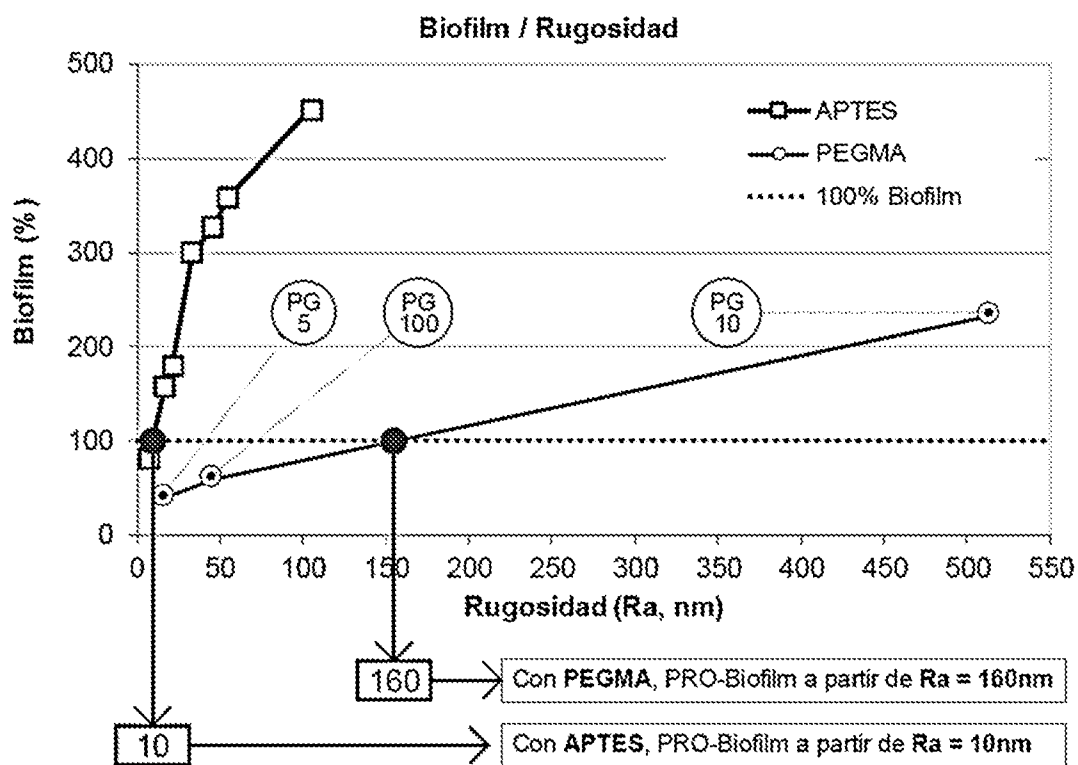


FIG. 5

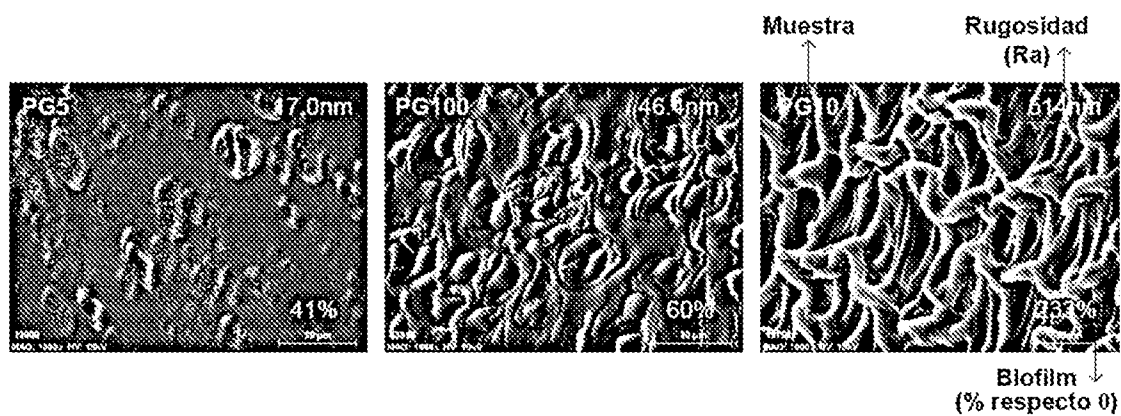


FIG. 6

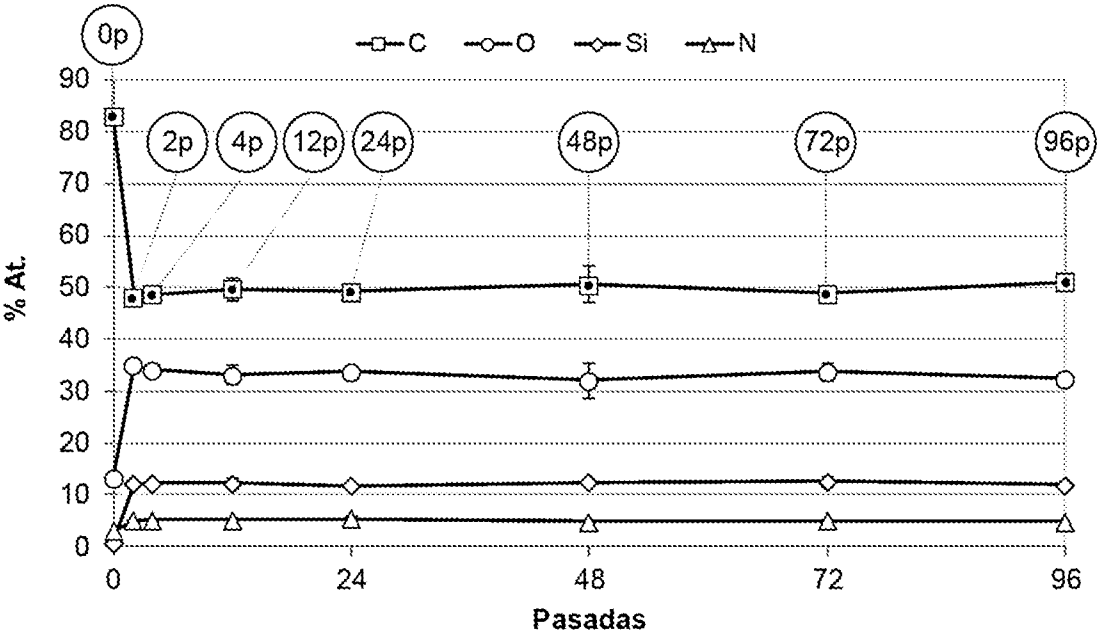


FIG. 7

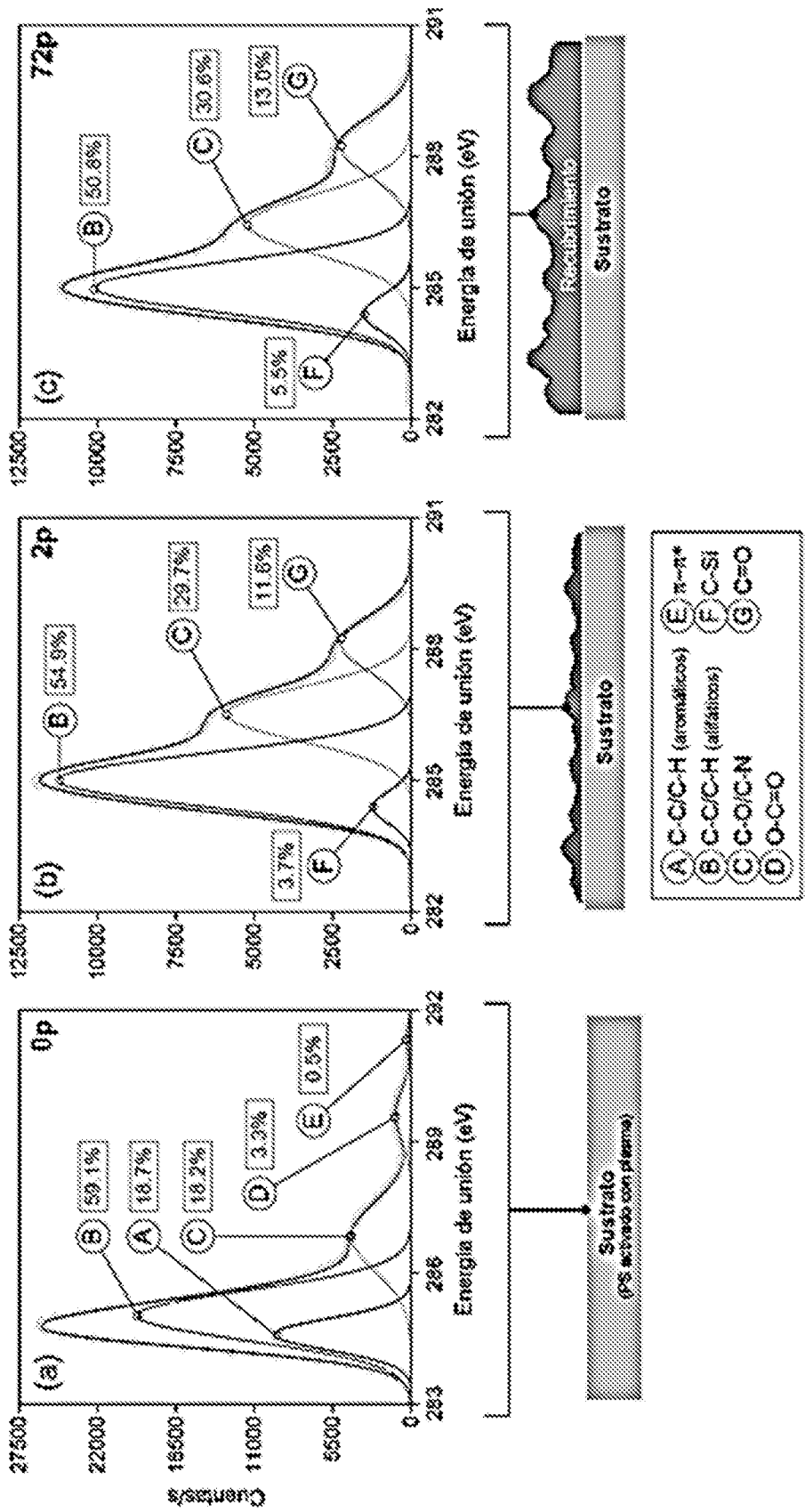


FIG. 8

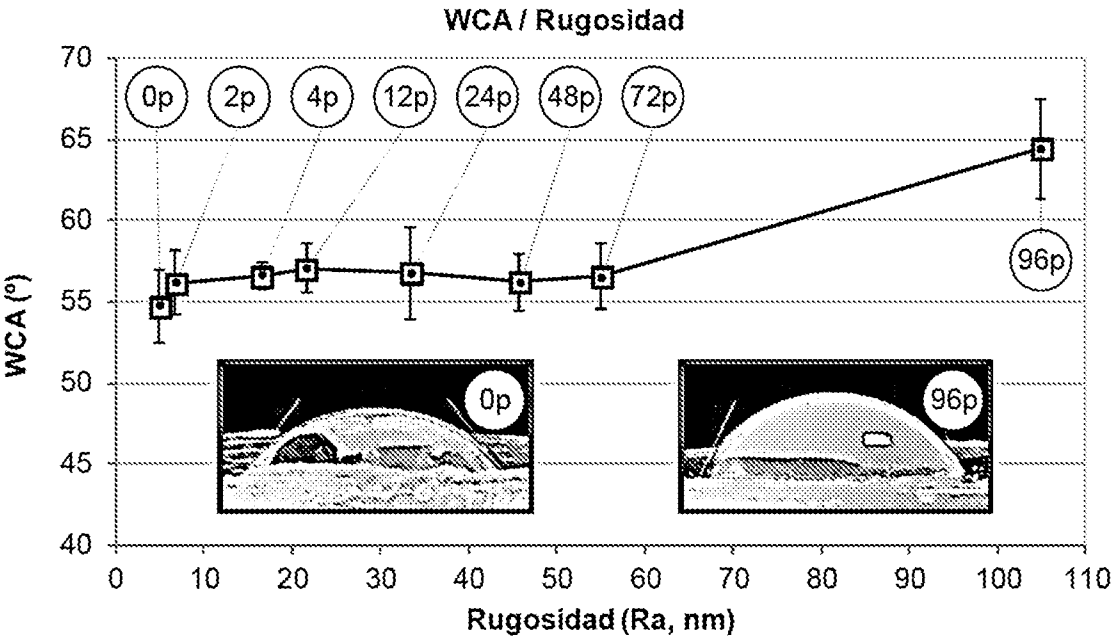


FIG. 9

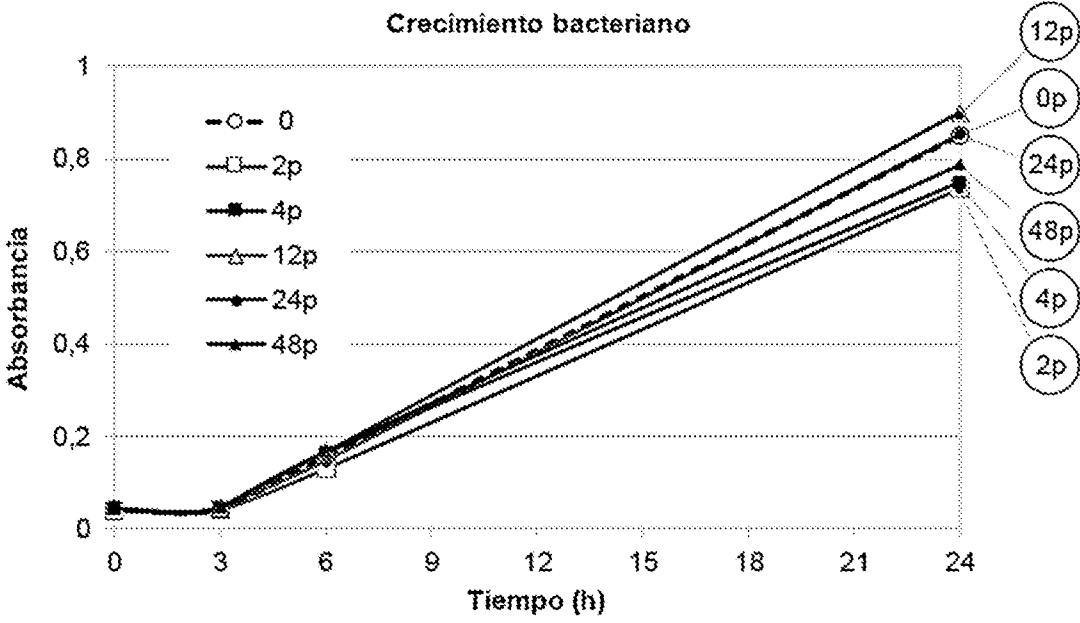


FIG. 10

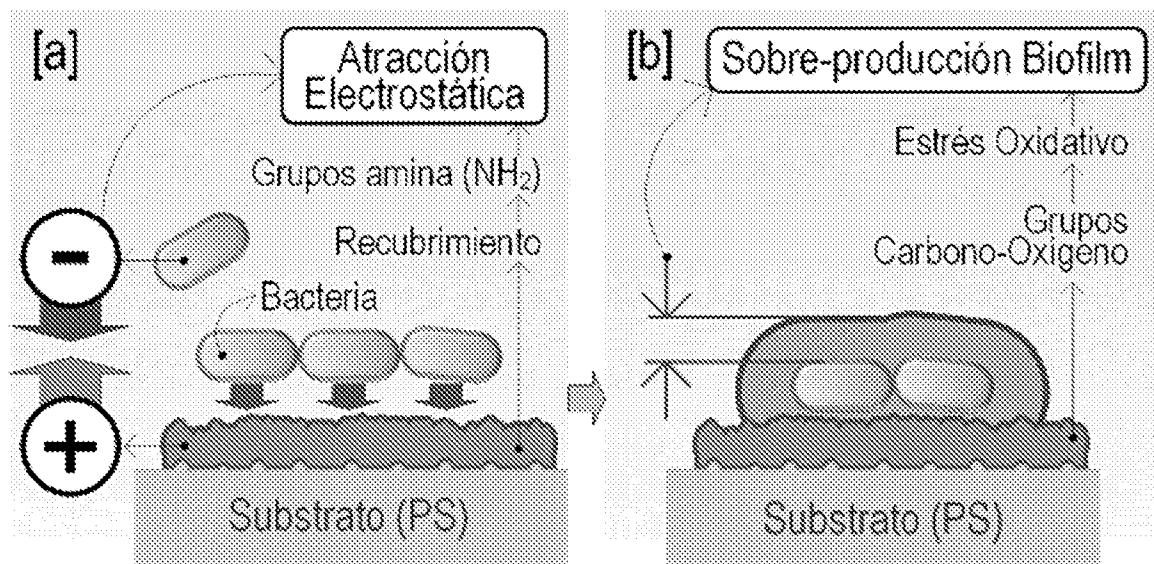


Fig. 11

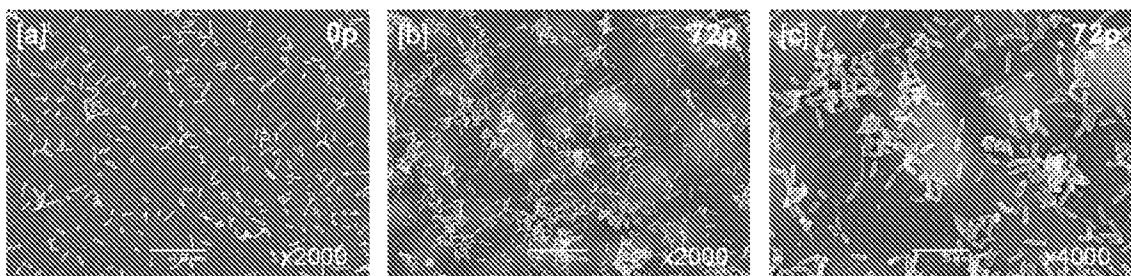


Fig. 12

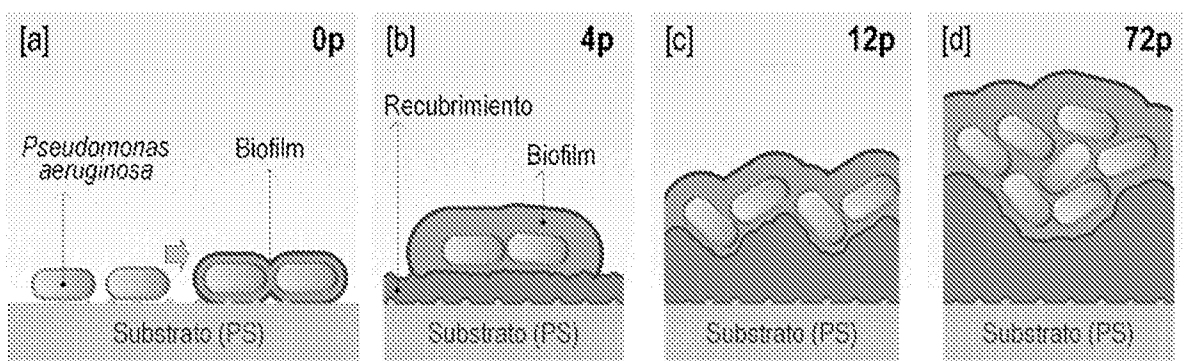


Fig. 13

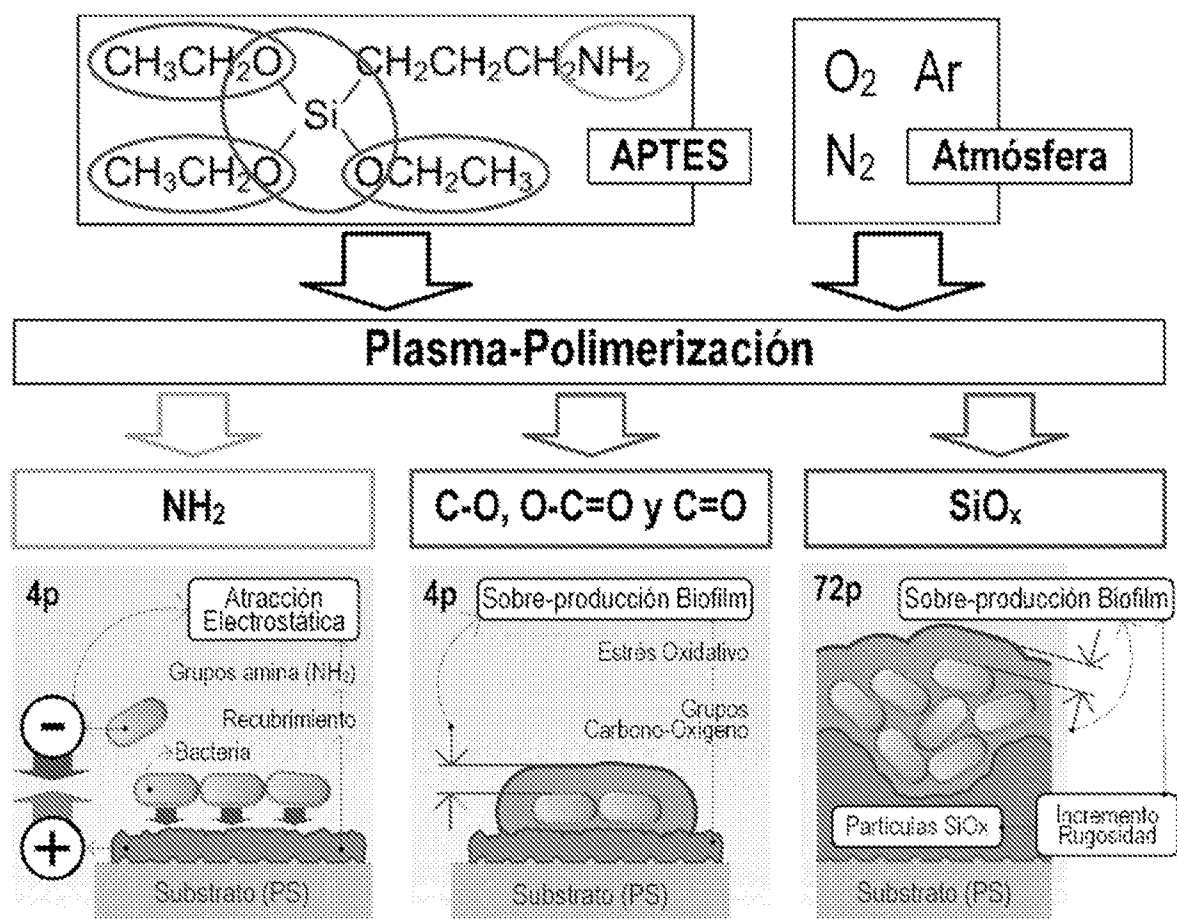


Fig. 14

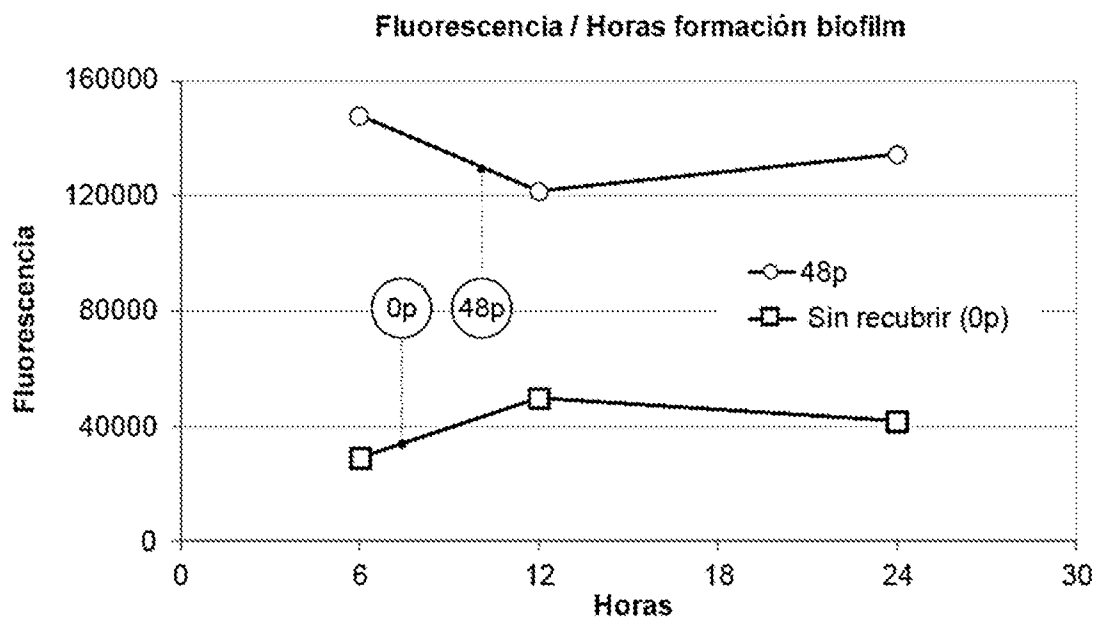


FIG. 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/ES2020/070195

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C23C16/00
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)
C23C C12M

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MÚGICA-VIDAL RODOLFO ET AL: "Reducing friction on glass substrates by atmospheric plasma-polymerization of APTES", SURFACE AND COATINGS TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 309, 12 October 2016 (2016-10-12), - 12 October 2016 (2016-10-12), pages 1062-1071, XP029893128, ISSN: 0257-8972, DOI: 10.1016/J.SURFCOAT.2016.10.030 page 1063 - page 1064; figure 2 ----- -/--	1-15



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

25 June 2020

Date of mailing of the international search report

06/07/2020

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

Martinez Miró, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2020/070195

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>MÚGICA-VIDAL RODOLFO ET AL: "Hydrophobicity attainment and wear resistance enhancement on glass substrates by atmospheric plasma-polymerization of mixtures of an aminosilane and a fluorocarbon", APPLIED SURFACE SCIENCE, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 347, 20 April 2015 (2015-04-20), pages 325-335, XP029160220, ISSN: 0169-4332, DOI: 10.1016/J.APSUSC.2015.04.089 page 327; table 2 page 326</p> <p>-----</p>	1-15
X	<p>MÚGICA-VIDAL RODOLFO ET AL: "Atmospheric plasma-polymerization of hydrophobic and wear-resistant coatings on glass substrates", SURFACE AND COATINGS TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 259, 7 November 2014 (2014-11-07), pages 374-385, XP029096715, ISSN: 0257-8972, DOI: 10.1016/J.SURFCOAT.2014.10.067 page 375</p> <p>-----</p>	1-15
X	<p>MOKTER HOSSAIN MD ET AL: "Improvement of mechanical strength of hydrophobic coating on glass surfaces by an atmospheric pressure plasma jet", SURFACE AND COATINGS TECHNOLOGY, ELSEVIER BV, AMSTERDAM, NL, vol. 357, 2 October 2018 (2018-10-02), pages 12-22, XP085558320, ISSN: 0257-8972, DOI: 10.1016/J.SURFCOAT.2018.09.071 page 13 page 16; table 1</p> <p>-----</p>	1-15
X	<p>RAMKUMAR M C ET AL: "Atmospheric pressure non-thermal plasma assisted polymerization of poly (ethylene glycol) methylether methacrylate (PEGMA) on low density polyethylene (LDPE) films for enhancement of biocompatibility", SURFACE AND COATINGS TECHNOLOGY, vol. 329, 8 September 2017 (2017-09-08), - 8 September 2017 (2017-09-08), pages 55-67, XP085225401, ISSN: 0257-8972, DOI: 10.1016/J.SURFCOAT.2017.09.020 page 56 page 60; figure 7</p> <p>-----</p> <p>-/--</p>	1-4,6-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/ES2020/070195

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>YIN SHIHENG ET AL: "Argon Plasma-Induced Graft Polymerization of PEGMA on Chitosan Membrane Surface for Cell Adhesion Improvement", PLASMA SCIENCE AND TECHNOLOGY, INSTITUTE OF PHYSICS PUBLISHING, BRISTOL, GB, vol. 15, no. 10, 18 October 2013 (2013-10-18), pages 1041-1046, XP020251571, ISSN: 1009-0630, DOI: 10.1088/1009-0630/15/10/15 [retrieved on 2013-10-18] page 1</p> <p>-----</p>	1-4,6-15