(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 627 653**

(51) Int. CI.:

C08F 220/58 (2006.01)
C09J 133/24 (2006.01)
C09D 133/14 (2006.01)
C09D 133/16 (2006.01)
C09D 133/26 (2006.01)
C08F 220/34 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.05.2009 PCT/EP2009/055960**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **10.12.2009 WO09147007**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.05.2009 E 09757390 (1)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.04.2017 EP 2288632**

(54) Título: **Revestimientos multifuncionales**

(30) Prioridad:

06.06.2008 EP 08157810

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.07.2017

(73) Titular/es:

UNIVERSITÉ DE LIÈGE (100.0%)
Interface Entreprises-Université Avenue Pré-Aily 4
4031 Angleur, BE

(72) Inventor/es:

VAN DE WEERDT, CÉCILE;
DETREMBLEUR, CHRISTOPHE;
CHARLOT, AURELIA;
JEROME, ROBERT;
VREULS, CHRISTELLE y
ZOCCHI, GERMAINE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Revestimientos multifuncionales

La presente invención está dirigida al campo de los revestimientos superficiales poliméricos funcionales.

Pueden usarse películas poliméricas, que pueden aplicarse a superficies orgánicas o inorgánicas, para comunicar diversas propiedades al soporte subyacente. Por ejemplo, se usa ampliamente acero inoxidable entre los metales en la vida cotidiana, pero también en el campo médico, especialmente para preparar implantes dedicados a cirugía ortopédica y otros dispositivos médicos, debido a su resistencia a la corrosión y propiedades mecánicas relevantes. Una posible limitación de las prótesis en acero inoxidable para aplicaciones biomédicas es su incapacidad para detener la proliferación de bacterias. La superficie de los dispositivos médicos es un sitio de adhesión bacteriana, propenso a la formación de una biopelícula resistente que conduce con frecuencia a infección crónica. A fin de controlar la formación de biopelículas indeseables en la superficie y de impedir tales complicaciones, se desarrollaron varias modificaciones superficiales para conferir a la superficie propiedades antibacterianas.

El método del ensamblaje capa a capa (LBL, por sus siglas en inglés), que consiste en preparar una película fina multicapas, basado en la deposición alternada de capas de polielectrolito cargadas de manera opuesta, ha atraído interés debido a la simplicidad y versatilidad de la técnica (documentos EP 0 472 990 A2; EP 0 647 477 A1; Decher, G. Science, 1997, 277, 1232; Decher, G.; Schlenoff, J. B.; Eds.; Multilayer thin films: Sequential Assembly of Nanocomposite Materials; Wiley-VCH: Weinheim, Alemania, 2003). Además, es un procedimiento respetuoso con el medio ambiente que permite la elaboración de superficies funcionales, con un control arquitectónico y químico preciso a nanoescala. Este procedimiento puede ser adaptado a casi cualquier tipo de superficie metálica, pero requiere, en la mayoría de los casos, algún nivel de pretratamiento de los sustratos para potenciar la adhesión de la primera capa de polielectrolito sobre la superficie inorgánica. La mayoría de estos tratamientos tienen como objetivo cargar la superficie, permitiendo de esta manera interacciones electrostáticas con la primera capa de polielectrolito depositada. Para este objetivo, se reportaron modificación química de la superficie (Fu, J.; Ji, J.; Yuan, W.; Shen, J. Biomaterials, 2005, 26, 6684), tratamiento de corona (Grunlan, J. C.; Choi, J. K.; Lin, A. Biomacromolecules, 2005, 1149), inmersión en una disolución ácida tensioactiva (Etienne, O.; Picart, C.; Taddei, C.; Haikel, Y.; Dimarcq, J.L.; Schaaf, P.; Voegel, J.C.; Ogier, J.A.; Egles, C. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48, 3662), y el método usado con más frecuencia consiste en sumergir el sustrato en una disolución de polietilenimina (Ma, R.; Sasaki, T.; Bando, Y. J. Am. Chem. Soc., 2004, 126, 10382; Cochin, D.; Laschewsky, A. Macromol. Chem. Phys., 1999, 200, 609; Dai, J.; Bruening, M. L. Nano Letters, 2002, 2, 497; Etienne, O.; Gasnier, C.; Taddei, C.; Voegel, J-C.; Aunis, D.; Schaaf, P.; Metz-Boutigue, M-H.; Bolcato-Bellemin, A-L.; Egles, C. Biomaterials, 2005, 26, 4568), ya que se sabe que este polímero forma quelatos con una amplia variedad de metales de transición. La interacción de esta primera capa con la superficie inorgánica es, por tanto, principalmente electrostática, y la fuerza de esta unión puede no ser suficiente bajo ciertas condiciones. Adicionalmente, las aplicaciones a largo plazo para las películas multicapas requerirían una interacción fuerte y duradera con el sustrato.

A fin de duplicar las características adhesivas de las llamadas "proteínas adhesivas mejillón" (MAPs), sustancias naturales que se sabe que dan lugar a una adhesión estable a diversas superficies, se han dedicado esfuerzos considerables al desarrollo de polímeros adhesivos biomiméticos sintéticos. En muchos de estos polímeros, el DOPA, que se cree que es responsable del efecto adhesivo de las MAPs, ha sido incorporado en las cadenas principales poliméricas, cadenas laterales o grupos terminales, Yu, M.; Hwang, J.; Deming, T. J. J. Am. Chem. Soc., 1999, 121, 5825; Yamamoto, H.; Hayakawa, T. Biopolymers, 2004, 18, 3067; Lee, B. P.; Dalsin, J.L.; Messersmith, P.B. Biomacromolecules, 2002, 3, 1038; Huang, K.; Lee, B.P.; Ingram, D.R.; Messersmith, P.B. Biomacromolecules, 2002, 3, 397; Huang, K.; Lee, B.; Messersmith, P.B. Polymer Preprints, 2001, 42, 147; Yu, M.; Deming, T.J. Macromolecules, 1998, 31, 4739. Tales polímeros sintéticos incluyen hidrogeles para aplicaciones médicas, por ejemplo obtenidos copolimerizando un monómero de DOPA N-metacrilado con diacrilato de PEG usando irradiación ultravioleta (Lee, B.P.; Huang, K.; Nunalee, F. N.; Shull, K.R.; Messersmith, P.B. J. Biomater. Sci. Polymer Edn., 2004, 4, 449).

Además, inducir actividades antimicrobianas duraderas o permanentes a superficies inorgánicas es también de alto interés, y está bajo investigación actual por diferentes grupos de investigación. Los esfuerzos previos se han centrado en usar la técnica de deposición capa a capa para elaborar revestimientos antimicrobianos que contienen agentes bactericidas liberables tales como plata (Grunlan, J. C.; Choi, J. K.; Lin, A. Biomacromolecules, 2005, 1149 ; Dai, J.; Bruening, M.L. Nano Letters, 2002, 2, 497; Shi, Z.; Neoh, K. G.; Zhong, P.; Yung, L. Y. L.; Kang, E. T.; Wang, W. J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2006, 76A, 826; Podsiadlo, P. ; Paternel, S.; Rouilard, J-M.; Zhang, Z.; Lee, J.; Lee, J-W.; Gulari, E.; Kotov, N. A. Langmuir, 2005, 21, 11915; Fu, J.; Ji, J.; Fan, D.; Shen, J. J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2006, 79A, 665; Lee, D.; Cohen, R.E.; Rubner, M.F. Langmuir, 2005, 21, 965), cetrimide and antimicrobial peptides. Rubner and co-workers have prepared antibacterial coatings bearing silver release-killing and contact-killing capabilities (Li, Z.; Lee, D.; Sheng, X.; Cohen, R. E.; Rubner, M. F. Langmuir, 2006, 22, 9820). La mayoría de las películas antimicrobianas que contienen plata consisten en nanopartículas de plata elemental que resultan de la reducción química o fotoquímica de iones Ag^+ (Grunlan, J. C.; Choi, J. K.; Lin, A. Biomacromolecules, 2005, 1149; Dai, J.; Bruening, M.L. Nano Letters, 2002, 2, 497; Fu, J.; Ji, J.; Fan, D.; Shen, J. J. Biomed. Mater. Res. Part A, 2006, 79A, 665; Lee, D.; Cohen, R. E.; Rubner, M.F. Langmuir, 2005, 21, 9651;). La solicitud de patente de EE.UU.

2006/0241281 propone polímeros peptidomiméticos para superficies antiensuciamiento que comprenden grupos dihidroxifenilo colgantes, y preferiblemente grupos L-3,4-dihidroxifenilalanina.

La solicitud de patente internacional WO2008/019352 describe compuestos poliméricos que comprenden derivados de dihidroxifenilo usados como revestimientos y que tienen efectos activos en superficie deseados.

Además, la provisión de revestimientos orgánicos estables, especialmente sobre superficies inorgánicas tales como superficies metálicas, es un campo de interés continuo, también fuera del campo médico. Como funciones ilustrativas de tales revestimientos, pueden mencionarse protección contra la corrosión, superficies autolimpiadoras, superficies estéticas, tales como superficies pintadas, y superficies catalíticas, entre otros.

Un objeto de la presente invención es proporcionar un revestimiento polimérico funcional para una amplia variedad de superficies, tal como un revestimiento con actividad antimicrobiana, un revestimiento que pueda actuar como una capa de anclaje para revestimientos posteriores que comuniquen otras propiedades deseadas a la superficie, o un revestimiento que pueda actuar como un pegamento eficaz entre superficies, revestimiento polimérico que asegure una adhesión estable sobre una escala de tiempo extensa y sea fácil de implementar.

A fin de solucionar este problema, la presente invención proporciona un material compuesto que comprende:

(i) un copolímero de polielectrolito, que comprende:

(a) un primer tipo de unidades (A) idénticas o diferentes que comprenden cada una uno o más grupos dihidroxifenilo, de tal modo que están presentes cadenas laterales a lo largo de la cadena principal del copolímero de polielectrolito que contienen al menos un grupo dihidroxifenilo cada una, en donde una parte o todos los grupos dihidroxifenilo han sido oxidados a su forma quinona; y

(b1) un segundo tipo de unidades (B1) idénticas o diferentes que comprenden cada una un resto catiónico, o

(b2) un segundo tipo de unidades (B2) idénticas o diferentes que comprenden cada una un resto aniónico, y (ii) biomoléculas injertadas al copolímero de polielectrolito por reacción de un grupo dihidroxifenilo oxidado con un grupo amino o tiol presente en la biomolécula.

Los copolímeros de polielectrolito del material compuesto de la invención combinan propiedades adhesivas comunicadas por la presencia de los grupos dihidroxifenilo en las cadenas laterales de los mismos con la posibilidad de incorporar sustancias que interactúan con los grupos iónicos contenidos en los copolímeros o de ensamblar películas de polielectrolito multicapas de las capas de polielectrolito.

En particular, los copolímeros de polielectrolito del material compuesto de la invención poseen una adhesión fuerte y resistente al agua a diversas superficies orgánicas e inorgánicas, y pueden usarse como capa de anclaje para formar películas multicapas de polielectrolito muy estables sobre tales superficies o para proporcionar una base estable para otros tipos de revestimientos orgánicos. Además, los grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención pueden actuar como restos anticorrosivos debido a su potencial redox, y son capaces por tanto de proporcionar revestimientos anticorrosivos para superficies. Finalmente, el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención puede proporcionar grupos de anclaje para sales inorgánicas para comunicar ciertas propiedades deseables a las superficies (p.ej. tetraborato de sodio o de estroncio para propiedades anticorrosivas). También, el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención proporciona grupos reactivos para unir covalentemente moléculas antimicrobianas, más particularmente péptidos y/o proteínas de origen bacteriano, fúngico, vegetal, animal, humano o cualesquiera estructuras químicas análogas obtenidas por diseño y síntesis química nuevos; el acoplamiento de la molécula antimicrobiana puede hacerse en disolución o directamente sobre la superficie una vez revestida con el copolímero de polielectrolito.

En otro aspecto, la invención proporciona un material compuesto que comprende el material de polielectrolito y partículas de un metal y/o una sal metálica. En este contexto, los grupos dihidroxifenilo pueden actuar como agentes reductores para la formación in situ y la estabilización de partículas metálicas y en particular nanopartículas metálicas. Tales materiales compuestos pueden comunicar propiedades funcionales duraderas a cualquier superficie revestida con el material de la invención. En particular, puede incrustarse plata metálica y/o halogenuros de plata en una capa del copolímero de polielectrolito para proporcionar propiedades antibacterianas. Además, la invención proporciona un método conveniente para la producción de tal material compuesto por medio de la reducción in situ de una sal metálica para formar partículas del metal y/o precipitación in situ de una sal metálica.

En aún otro aspecto, la presente invención proporciona un sustrato, tal como un sustrato metálico, que lleva sobre una superficie del mismo un material compuesto según la invención. Un ejemplo de tal sustrato es un dispositivo médico revestido con película que proporciona propiedades antibacterianas/antimicrobianas a la superficie del dispositivo.

Debido a su naturaleza iónica, los materiales compuestos según la invención pueden prepararse y aplicarse a sustratos en disolventes acuosos o en agua. Por tanto, no sólo poseen excelentes características como

revestimientos de superficies, sino que son además respetuosos con el medio ambiente, dado que no se requiere el uso de disolventes orgánicos durante su polimerización o su uso.

La Fig. 1 muestra un esquema para la síntesis de hidrocloruro de éster metílico de *N*-metacriloil-3,4-dihidroxil-L-fenilalanina (5) y su copolimerización para formar el copolímero P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) (7) como un copolímero de polielectrolito según la invención. La estructura del polielectrolito en la Fig. 1 representa una ilustración esquemática del copolímero de polielectrolito.

La Fig. 2 es una representación esquemática de la formación de una película de material compuesto multicapas según la invención que lleva nanopartículas (8) de plata y halogenuro de plata incrustadas**.** La estructura del polielectrolito en la Fig. 2 representa una ilustración esquemática del copolímero de polielectrolito.

La Fig. 3 muestra patrones de difracción de polvos de nanopartículas de plata: (A) de una mezcla (DMAEMA$^+$)/$AgNO_3$ con n DMAEMA$^+$ = n Ag^+ = 1,7 × 10^{-3} mol; (B) de un hidrocloruro de éster metílico de DOPA/$AgNO_3$ con DOPA esterificada = n Ag^+ = 1,4 × 10^{-3} mol.

La Fig. 4 muestra imágenes TEM de la mezcla de copolímero de P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/$AgNO_3$ con n DOPA = n $AgNO_3$ = 2 × 10^{-6} mol (fotos A y B) y de hidrocloruro de éster metílico de DOPA/$AgNO_3$ con DOPA esterificado = n Ag^+ = 2 × 10^{-6} mol (foto C).

La Fig. 5 muestra una comparación de espectros de UV-Vis del copolímero P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) a 0,41 g/l, con los del nanohíbrido que resulta de la mezcla del copolímero P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) (0,41 g/L)/$AgNO_3$ con n DOPA = n $AgNO_3$ = 2 × 10^{-6} mol.

La Fig. 6 muestra espectros de absorción de UV-Vis de ensamblajes capa a capa de P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) (7 g/l) /[PSS (7 g/l) /P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)-plata (7g/l con n Ag = 3 × 10^{-5} mol]n (con n = 1-12) y la evolución de la absorbancia a λ_{max} = 400 nm frente al número de bicapas de [PSS (7 g/l) /P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)-plata] depositadas.

La Fig. 7 muestra la evolución del grosor multicapas en función del número de bicapas de P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) (7 g/l) /PSS (7 g/l) depositadas sin sal y en NaCl 0,15 M.

La Fig. 8 es una representación gráfica logarítmica del número de células viables de E. Coli frente al tiempo de exposición, para un sustrato no revestido, para acero inoxidable revestido con P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/[PSS/P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)], P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/[PSS /P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)-plata]$_{30}$, P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/[PSS /P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)-plata]$_{45}$ y con P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/[PSS /P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)-plata]$_{60}$. Las concentraciones de polímero de cadena son iguales a 7 g/l y la cantidad de plata en disolución es de 5,6 × 10^{-5} mol.

La Fig. 9 es una representación gráfica logarítmica del número de células viables de E. Coli frente al tiempo de exposición, para un sustrato revestido con P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/[PSS /P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)-plata]$_{60}$, con película de P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/[PSS /P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)-plata]$_{60}$ pero ensayado preliminarmente contra E. Coli, y para un sustrato de acero inoxidable revestido con la misma película de P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/[PSS /P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)-plata]$_{60}$, reactivada por inmersión en una disolución de $AgNO_3$ 0,1 M.

La Fig. 10 es, de izquierda a derecha (Figura 10): ensayo antimicrobiano ISO846 método C sobre acero inoxidable sin ningún revestimiento, P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) (1 g/l)-(PAA-nisina)5, P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) (2 g/l)-(PAA-nisina)5, PEI(1 g/l)-(PAA-nisina)5, PEI(2 g/l)-(PAA-nisina)5. Se indica el número de unidades formadoras de colonias por centímetro cuadrado de sustrato de acero inoxidable (CFU/cm2) a fin de cuantificar el ensayo ISO846 C.

La Fig. 11 ilustra las propiedades antibacterianas de diferentes películas multicapas: (A) Ensayo antimicrobiano del péptido nisina incrustado en una multicapa de (PAA-nisina)5. Los ensayos ISO846 C con cepa *B. subtilis* sobre multicapas de (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA-nisina)5. El P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) y PAA se usaron a 2 g/l, mientras que la concentración de nisina varió de 2 a 0,5 g/l. (B) Ensayo antimicrobiano del péptido 4KC_{16} incrustado en una multicapa de (PAA-4KC_{16}/PAH)5 (Izquierda) Ensayo ISO22196 con cepa E. *coli* sobre sustrato de acero inoxidable y sobre multicapa de (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA-4KC_{16}/PAH)5. (Derecha) Ensayo ISO846 método C con cepa *B. subtilis* sobre multicapa de DOPA-(PAA-4KC_{16}/PAH)5. (C) Ensayo antimicrobiano de péptidos Trp11 incrustados en una multicapa de (PAA-Trp11/PAH)5 (Izquierda) Ensayo ISO22196 con cepa *E. coli* sobre sustrato de acero inoxidable y sobre multicapa de DOPA-(PAA-Trp11/PAH)5. (Derecha) Ensayo ISO846 C con cepa *B. subtilis* sobre multicapa de DOPA-(PAA-Trp11/PAH)5.

Fig. 12 (A) Ensayo antimicrobiano de la combinación nisina/Trp11 incrustada en una multicapa de (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA MW 1800-mezcla nisina 0,4g/l/Trp11 4g/l)5 sobre acero inoxidable. (Izquierda) Ensayo ISO22196 con cepa *E. coli* sobre acero inoxidable (Centro) o (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA-mezcla nisina 0,4 g/l/Trp11 4 g/l)5 (Derecha) Ensayo ISO846 método C con cepa *B. subtilis* sobre (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA-mezcla nisina 0,4 g/l/Trp11 4g/l)5. (B) Ensayo antimicrobiano de la combinación nisina/4K incrustada en una multicapa de (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA-mezcla nisina 0,4 g/l/4KC_{16} 4g/l)5 sobre acero inoxidable.

(Izquierda) Ensayo ISO22196 con cepa *E. coli* sobre acero inoxidable (Centro) o (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)) -(PAA-mezcla nisina 0,4 g/l/4KC_{16} 4g/l)5 (Derecha) Ensayo ISO846 método C con cepa *B. subtilis* sobre (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA-mezcla nisina 0,4 g/l/4KC_{16} 4 g/l)5. (C) Efecto de concentraciones respectivas de nisina y 4KC_{16} para el (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA-mezcla nisina/4KC_{16})5. Ensayo ISO846 método C con cepa *B. subtilis* sobre (Izquierda) acero inoxidable (Centro) (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA-mezcla nisina 0,4 g/l/4KC_{16} 4 g/l)5 (Derecha) (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA-mezcla nisina 0,2 g/l/4KC_{16} 2 g/l)5.

Fig. 13: representación gráfica del log(número de supervivientes) frente al tiempo de exposición cuando se expuso la misma cantidad de *E. Coli* (10^5 células/ml de bacterias) a acero inoxidable no revestido (acero inoxidable inicial), acero inoxidable revestido con material de polielectrolito no dializado (Revestimiento A) y acero inoxidable revestido con material de polielectrolito dializado (Revestimiento B).

Copolímero de polielectrolito

Como un primer aspecto de la invención, se discutirá en detalle el copolímero de polielectrolito en lo que sigue. El copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención comprende al menos dos tipos de unidades, a saber, unidades (A) y (B1) o unidades (A) y (B2). Las unidades (A), (B1) o (B2), respectivamente, pueden ser las mismas en todo el copolímero. Alternativamente, pueden estar presentes independientemente más que un tipo de cada una de las unidades (A), (B1) o (B2), tal como dos o tres tipos diferentes. Además, el copolímero de polielectrolito puede comprender tipos adicionales de unidades, tal como unidades (C). Por tanto, el término "copolímero", como se emplea en el presente contexto, no sólo abarca copolímeros binarios, sino también copolímeros ternarios y superiores. El término "unidad" se refiere a unidades que forman la cadena principal del copolímero, y que se derivan de monómeros que son copolimerizados para formar el copolímero de polielectrolito. Cada tipo de unidad está contenida en el copolímero una pluralidad de veces, y puede estar repetida a lo largo de la cadena principal del copolímero en un orden regular o en orden aleatorio.

Las unidades (A) comprenden uno o más grupos dihidroxifenilo, preferiblemente como grupos 3,4-dihidroxifen-1-ilo (denominados también grupos catecol en la presente memoria). Pueden estar presentes otros sustituyentes distintos a los dos grupos hidroxilo sobre el anillo de fenilo de los grupos dihidroxifenilo, siempre y cuando no interfieran sustancialmente con la función de las unidades (A) en el contexto de la presente invención. Sin embargo, se prefiere generalmente que las unidades (A) comprendan grupos dihidroxifenilo de la fórmula -$C_6H_3(OH)_2$, es decir, sin sustituyentes adicionales.

Preferiblemente, estos grupos dihidroxifenilo están unidos a los átomos restantes de la unidad (A) por medio de un grupo alquileno unido al átomo de carbono en la posición 1 del anillo de fenilo. Típicamente, el grupo alquileno es un grupo alquileno C1 a C5, preferiblemente un grupo metileno o etileno. Como entenderá el lector experto, Cn (p.ej. C1 o C5 referidos anteriormente) indica en la presente memoria que un número de n átomos de carbono está/n presente/s en el grupo en consideración.

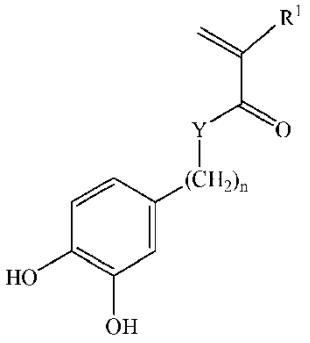
Las unidades (A) pueden comprender uno o más que un grupo dihidroxifenilo, tal como dos o tres, por unidad. Sin embargo, se prefiere que esté presente uno de estos grupos por unidad (A). Los grupos dihidroxifenilo están unidos covalentemente dentro de la unidad (A) de tal modo que están presentes dentro de cadenas laterales formadas a lo largo de la cadena principal del copolímero de polielectrolito.

Preferiblemente, los monómeros que forman las unidades (A) en el copolímero de polielectrolito son monómeros polimerizables por radicales, y en particular monómeros que proporcionan una funcionalidad vinilo polimerizable por radicales además del (de los) grupo(s) dihidroxifenilo.

Entre ellos, pueden mencionarse monómeros preferidos que se representan por la fórmula (1):

$$H_2C=C(R^1)\text{-}C(O)\text{-}Y\text{-}(CH_2)_n\text{-}C_6H_3(OH)_2 \qquad (1),$$

y en particular por la fórmula (1a)



(1a).

Tanto en la fórmula (1) como (1a), R^1 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que puede ser no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter. Y es un grupo enlazante divalente y n es un número entero seleccionado de 0 a 5.

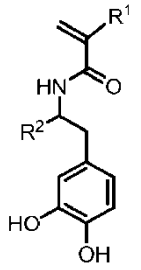
R^1 es preferiblemente hidrógeno o un grupo alquilo C1 a C4 no sustituido. Se prefiere particularmente hidrógeno, un grupo metilo o un grupo etilo.

Y es preferiblemente un grupo hidrocarbonado divalente, generalmente un grupo alquenilo, que puede ser lineal o ramificado y que puede estar interrumpido por uno o más heteroátomos tales como nitrógeno u oxígeno y/o que pueden estar terminados en cualquier extremo por un heteroátomo tal como nitrógeno u oxígeno. El número total de átomos de carbono de Y es preferiblemente 1 a 6. El número de heteroátomos es preferiblemente 0, 1 o 2, particularmente 1. Y puede ser no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes tales como -OH, un átomo de halógeno, un grupo carbonilo, un grupo éster, o un grupo amida.

Se prefiere particularmente como Y un grupo enlazante que forma, junto con la función carbonilo a la que está unido, un enlace amida (en cuyo caso está unido un átomo de nitrógeno al átomo de carbono del carbonilo) o un enlace éster (en cuyo caso está unido un átomo de oxígeno al átomo de carbono del carbonilo). Por ejemplo, Y puede ser un grupo $-N(R^a)-R^b-$ o $-O-R^b-$, en donde R^a es un grupo monovalente unido al átomo de nitrógeno, seleccionado de un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que puede ser no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter. Se prefiere hidrógeno o un grupo alquilo no sustituido. Se prefiere particularmente hidrógeno. R^b es un enlace directo o un grupo alquileno que puede ser no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter. Preferiblemente, R^b es no sustituido. Más preferiblemente, R^b es un grupo metileno o etileno. Un sustituyente opcional preferido es el grupo éster, particularmente un grupo $-C(O)OCH_3$.

Los valores preferidos para n son 0, 1 o 2. Si Y comprende un grupo R^b que es un enlace directo, n es preferiblemente 1 o 2. Si Y comprende un grupo R^b que es un grupo alquileno, n es preferiblemente 0.

Se prefieren particularmente como monómeros que forman las unidades (A) los de la siguiente fórmula (2)



(2)

en donde R^1 es como se definió para la fórmula (1) y R^2 es hidrógeno, un grupo alquilo, éster o amida.

Los más preferidos como monómeros de fórmula (2) son aquellos en donde R^1 es hidrógeno o metilo, y R^2 es un grupo éster, tal como un éster metílico o etílico.

Aunque las fórmulas (1), (1a) y (2) anteriores abarcan todos los estereoisómeros de las moléculas respectivas, puede usarse convenientemente para este fin acrilamida y metacrilamida de 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina, en particular las que tienen la función ácido carboxílico del aminoácido protegida como un grupo éster metílico o etílico. También pueden usarse convenientemente para este fin ésteres de ácido acrílico o metacrílico de 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina.

Los ejemplos particulares de compuestos de fórmula (2) incluyen 2-metacrilamido-3-(3,4-dihidroxifenil)propanoato de metilo, 2-acrilamido-3-(3,4-dihidroxifenil)propanoato de metilo, N-(3,4-dihidroxifenetil)metacrilamida o N-(3,4-dihidroxifenetil)acrilamida.

Las unidades (B1) y (B2) comprenden un grupo catiónico o aniónico, respectivamente. De manera general, los grupos iónicos están unidos covalentemente dentro de la unidad. En otras palabras, una molécula de copolímero de polielectrolito de acuerdo con la invención comprende bien grupos catiónicos dentro de su estructura polimérica o bien grupos aniónicos, pero no debe comprender ambos al mismo tiempo. Por otra parte, la invención abarca realizaciones en donde estructuras poliméricas que contienen grupos catiónicos se usan juntas y se llevan al contacto con estructuras poliméricas que contienen grupos aniónicos, tales como las películas multicapas explicadas en más detalle más adelante.

Los términos grupos "aniónicos" o "catiónicos" se emplean en la presente memoria de acuerdo con su significado común en la técnica para hacer referencia a restos que llevan una carga iónica negativa o positiva, respectivamente. La carga es contrarrestada por un contraión de carga opuesta que no está enlazado por medio de ningún enlace

covalente al grupo aniónico o catiónico contenido en las unidades (B1) y (B2). El contraión puede ser un átomo o molécula cargados, pero también puede ser proporcionado por un polielectrolito que comprende una pluralidad de grupos cargados, o por una combinación de estos.

Además, los términos "grupo aniónico"/"sustituyente aniónico" o "grupo catiónico"/"sustituyente catiónico" abarcan grupos que están presentes en una forma iónica bajo las condiciones en las que se usa el copolímero de polielectrolito de la invención, pero que pueden ser no iónicos bajo condiciones diferentes. En particular, esto incluye grupos que son iónicos dentro de ciertos intervalos de pH determinados fácilmente por el experto en la técnica, tales como grupos ácido carboxílico, que son aniónicos en su forma desprotonada, o grupos amino, que pueden protonarse para formar grupos catiónicos. Por ejemplo, en los casos donde el copolímero de polielectrolito de la invención se usa para revestir un dispositivo médico insertado en el cuerpo, tal como una prótesis, pueden elegirse unidades (B1) o (B2) que contengan grupos iónicos a valores de pH fisiológicos, típicamente entre 6 y 8.

Los grupos catiónicos ilustrativos que pueden usarse en las unidades (B1) son grupos amonio, grupos fosfonio o grupos amino que pueden estar ionizados. Son grupos más preferidos los representados por las siguientes fórmulas (3), (4) y (5). Se prefieren especialmente los restos amonio, en particular los de fórmula (3).

$$-N^{+}(R^{8})(R^{9})(R^{10}) \qquad (3)$$

$$-P^{+}(R^{8})(R^{9})(R^{10}) \qquad (4)$$

$$-N(R^{8})(R^{9}) \qquad (5)$$

En estas fórmulas R^8, R^9 y R^{10} son independientemente hidrógeno, alquilo o cicloalquilo, y R^{10} puede ser además un grupo fenilo o bencilo. En la fórmula (3) o (5), además, los grupos R^8 y R^9 pueden reunirse para formar un anillo heterocíclico aromático o no aromático junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos, tal como piridina, morfolina, piperidina o pirimidina. Cuando R^8, R^9 y R^{10} son grupos alquilo, cicloalquilo, fenilo o bencilo, estos grupos pueden estar sustituidos por uno o más sustituyentes tales como -OH, un grupo éster, amida o éter. Como grupos cicloalquilo, se prefieren grupos C5 a C7. Como anillos heterocíclicos, se prefieren los que tienen 5 a 7 miembros de anillo.

Los contraiones aniónicos ilustrativos que pueden estar presentes en el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención, en solitario o en combinación, en particular siempre y cuando no se combinen con un polielectrolito de carga opuesta para formar una estructura de bicapas o multicapas, son halogenuros tales como cloruro, bromuro, yoduro, fluoruro, borato, tetrafluoroborato, perclorato, nitrato, sulfato, hidrogenosulfato, tosilato, acetato, alquilsulfato, trifluorometilsulfato, bencenosulfato o fosfatos. Se prefieren iones inorgánicos tales como los halogenuros (p.ej. cloruro, bromuro o yoduro), nitrato o sulfato.

Los grupos aniónicos ilustrativos que pueden usarse en las unidades (B2) son grupos carboxilato, sulfonato, fosfato y alquilsulfato, o un grupo ácido carboxílico libre que puede sin embargo ser desprotonado.

Los contraiones catiónicos ilustrativos que pueden estar presentes en el copolímero de polielectrolito según la invención, en solitario o en combinación, en particular siempre y cuando no se combinen con un polielectrolito de carga opuesta para formar una estructura de bicapas o multicapas, son los de los metales alcalinos, tales como sodio o potasio, de los metales alcalinotérreos, tales como calcio o magnesio, iones de metales de transición, tales como iones de Zn, Zr, Cu, Ag o amonio.

De manera general, el grupo catiónico o aniónico forma una cadena lateral o está presente dentro de una cadena lateral del copolímero de polielectrolito. Tal cadena lateral puede comprender uno o más que uno, tal como dos o tres, grupos catiónicos o aniónicos. Se prefiere uno de estos grupos por cadena lateral. El grupo catiónico o aniónico puede estar unido covalentemente de manera directa a la cadena principal polimérica del copolímero de polielectrolito, p.ej. en el caso donde se usa un monómero de ácido (met)acrílico para proporcionar una unidad (B2). También puede estar unido covalentemente a la cadena principal polimérica por medio de un enlazante, p.ej. un grupo hidrocarbonado divalente, tal como un grupo alquenilo, que puede ser lineal o ramificado y que puede estar interrumpido por uno o más heteroátomos tales como nitrógeno u oxígeno y/o que puede estar terminado por un heteroátomo tal como nitrógeno u oxígeno. El número total de átomos de carbono en el enlazante es preferiblemente 1 a 6. El número de heteroátomos es preferiblemente 0, 1 o 2. El enlazante puede ser no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes tales como -OH, un átomo de halógeno, un grupo carbonilo, un grupo éster, o un grupo amida.

Preferiblemente, los monómeros que forman las unidades (B1) y (B2) en el copolímero de polielectrolito son monómeros polimerizables por radicales, y en particular monómeros que proporcionan una funcionalidad vinilo polimerizable por radicales.

Se prefieren particularmente como monómeros que forman las unidades (B1) o (B2) los de la fórmula (6):

(6)

en donde R^3 se selecciona de hidrógeno o alquilo, que puede ser no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter, y R^4 es

(i) un grupo catiónico, o un grupo alquilo, arilo, éster o amida sustituido al menos con un grupo catiónico en el caso de la unidad (B1); o

(ii) un grupo aniónico, o un grupo alquilo, arilo, éster o amida sustituido al menos con un grupo aniónico en el caso de la unidad (B2).

Preferiblemente, R^3 es hidrógeno o un alquilo no sustituido, se prefieren particularmente hidrógeno o metilo.

Los grupos R^4 preferidos para la opción (i) son

los grupos catiónicos de fórmula (3) a (5);

un grupo alquilo que está sustituido por un grupo catiónico, tales como los grupos catiónicos (3) a (5), y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter;

un grupo arilo que está sustituido por un grupo catiónico, tales como los grupos catiónicos (3) a (5), y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter;

un grupo $-C(O)OR^{11a}$ o un grupo $-C(O)NR^{12a}R^{13a}$,

en donde R^{11a} representa un grupo alquilo que está sustituido por un grupo catiónico, tales como los grupos catiónicos (3) a (5), y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter; o un grupo arilo que está sustituido por un grupo catiónico, tales como los grupos catiónicos (3) a (5), y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, alquilo, alcoxi o éter;

y R^{12a} representa un grupo alquilo que está sustituido por un grupo catiónico, tales como los grupos catiónicos (3) a (5), y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter; o un grupo arilo que está sustituido por un grupo catiónico como se define anteriormente y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, alquilo, alcoxi o éter; y R^{13a} representa un grupo alquilo que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter; o un grupo arilo que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, alquilo, alcoxi o éter, o R^{13a} representa un grupo R^{12a}.

En el contexto de la definición de R^4 para la opción (i), se prefieren generalmente grupos alquilo o arilo que no lleven sustituyentes adicionales aparte del grupo catiónico.

Se prefieren particularmente como R^4 para la opción (i) un grupo arilo, tal como un grupo fenilo, que lleva un sustituyente catiónico, y un grupo éster $-C(O)OR^{11a}$, en donde R^{11a} es un grupo alquilo que lleva un sustituyente catiónico.

Los grupos R^4 preferidos para la opción (ii) son

un grupo carboxilato ($-COO^-$), sulfonato, fosfato o alquilsulfato, o

un grupo alquilo que está sustituido por un grupo aniónico como se define anteriormente y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter;

un grupo arilo que está sustituido por un grupo aniónico como se define anteriormente y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, alquilo, alcoxi o éter;

un grupo -C(O)OR^{11b} o un grupo -C(O)NR^{12b}R^{13b},

en donde R^{11b} representa un grupo alquilo que está sustituido por un grupo aniónico como se define anteriormente y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter; o un grupo arilo que está sustituido por un grupo aniónico como se define anteriormente y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, alquilo, alcoxi o éter;

y en donde R^{12b} representa un grupo alquilo que está sustituido por un grupo aniónico como se define anteriormente y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter; o un grupo arilo que está sustituido por un grupo aniónico como se define anteriormente y que puede estar opcionalmente sustituido además por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, alquilo, alcoxi o éter; y R^{13b} representa un grupo alquilo que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter; o un grupo arilo que puede estar opcionalmente sustituido por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, alquilo, alcoxi o éter, o R^{13b} representa un grupo R^{12b}.

En el contexto de la definición de R^4 para la opción (ii), se prefieren generalmente grupos alquilo o arilo que no lleven sustituyentes adicionales aparte del grupo aniónico.

Se prefieren particularmente como R^4 para la opción (ii) un grupo carboxílico; un grupo arilo, tal como un grupo fenilo, que lleva un sustituyente aniónico; o un grupo éster -C(O)OR^{11b}, en donde R^{11b} es un grupo alquilo que lleva un sustituyente aniónico.

Los ejemplos específicos de monómeros de fórmula (6) que forman una unidad (B1) incluyen cloruro de 2-(metacriloxi)etil-trimetilamonio, hidrocloruro de metacrilato de 2-dimetilaminoetilo, hidrocloruro de metacrilato de 2-dietilaminoetilo, hidrocloruro de acrilato de 2-dimetilaminoetilo, hidrocloruro de acrilato de 2-dietilaminoetilo, hidrocloruro de metacrilato de 2-aminoetilo, hidrocloruro de metacrilato de 2-(*terc*-butilamino)etilo, hidrocloruro de acrilato de 3-(dimetilamino)propilo, sal hidrocloruro de 2-vinilpiridina, yoduro (o bromuro o cloruro) de 1-metil-2-vinilpiridinio, sal hidrocloruro de 4-vinilpiridina, yoduro (o bromuro o cloruro) de 1-metil-4-vinilpiridinio, yoduro (o bromuro o cloruro) de N,N,N-trimetil-(4-vinilfenil)metanaminio o hidrocloruro de N,N-dimetil-(4-vinilfenil)metanamina.

Los ejemplos preferidos específicamente del monómero que forma las unidades (B1) son el catión 2-metacriloxietiltrimetilamonio o el 2-acriloxietiltrimetilamonio.

Los ejemplos de monómeros de fórmula (6) que forman una unidad (B2) incluyen estirenosulfonato (p.ej. como sal de sodio o potasio), ácido acrílico (p.ej. como sal de sodio, potasio, cinc o circonio), ácido metacrílico (p.ej. como sal de sodio, potasio, cinc o circonio), 3-sulfopropilmetacrilato (p.ej. sal de potasio), 3-sulfopropilacrilato (p.ej. sal de potasio), ácido 4-vinilbenzoico (p.ej. sal de sodio o potasio), 2-acrilamido-2-metilpropano-1-sulfonato (p.ej. sal de potasio o sodio), 3-acrilamido-3-metilbutanoato (p.ej. sal de potasio o sodio).

Preferiblemente, el monómero que forma las unidades (B2) es ácido acrílico, ácido metacrílico (p.ej. como sal de sodio o potasio) o estirenosulfonato.

Un copolímero de polielectrolito particularmente preferido del material compuesto de la invención es un copolímero de 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metacrilamidopropanoato de metilo y el catión 2-metacriloxietiltrimetilamonio (con un contraión referido anteriormente, tal como cloruro) que se denomina también en la presente memoria P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$). Otro copolímero de polielectrolito particularmente preferido del material compuesto de la invención es un copolímero de ácido metacrílico (p.ej. como sal de sodio o potasio) y 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metacrilamidopropanoato de metilo, que se denomina también en la presente memoria P(DOPA)-*co*-P(MAA).

El copolímero de polielectrolito según el material compuesto de la invención puede comprender un tipo o más tipos de unidades (C) además de unidades (A) y (B1) o (A) y (B2). Las unidades (C) son unidades que tienen una estructura distinta a la de las unidades (A) y (B1) o (A) y (B2), derivadas de cualquier tipo de monómero que sea copolimerizable en el copolímero de polielectrolito de la presente invención. Típicamente, las unidades (C) se derivan de monómeros que tienen un doble enlace C-C polimerizable por radicales.

Por ejemplo, uno o más monómeros de fórmula (7) pueden copolimerizarse para formar unidades (C) en el copolímero de polielectrolito:

(7)

en donde R^5 se selecciona de hidrógeno o alquilo, que puede ser no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes tales como -OH, halógeno, un grupo amino, nitro, éster, amida, arilo, alcoxi o éter, y R^6 se selecciona de un grupo éster; un grupo amida; un grupo amino; un grupo arilo, que puede estar sustituido por un grupo polar, tal como un grupo hidroxilo, éster, éter, epóxido, amida, carbonilo o nitrilo; un grupo alquilo, que puede estar sustituido por un grupo polar, tal como un grupo hidroxilo, carbonilo, éster, éter, nitrilo, epóxido, amida o carbonilo, o por un glicósido; o un grupo heterocíclico, que puede estar sustituido por un grupo polar, tal como un grupo hidroxilo, carbonilo, éster, nitrilo, epóxido, éter o amida.

R^5 representa preferiblemente hidrógeno o alquilo no sustituido, y se da una preferencia particular a hidrógeno o metilo.

La presencia de un grupo polar como sustituyente en R^6 es útil en los casos donde la copolimerización del monómero respectivo es para ser llevada a cabo en agua en condiciones homogéneas, en cuyo caso la introducción de grupos polares facilita la disolución de los monómeros en agua.

Además, en los casos donde el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención se usa como capa de anclaje para otros revestimientos (tales como un revestimiento orgánico, típicamente un polímero, que tiene una estructura diferente del copolímero de polielectrolito según la invención), el monómero que proporciona la unidad (C), p.ej. el monómero de fórmula (7), debe seleccionarse preferiblemente de tal modo que pueda reaccionar con un grupo químico del revestimiento orgánico. Por ejemplo, los comonómeros de fórmula (7) que contienen grupos polares, tales como grupos hidroxilo o grupos amino (primarios o secundarios) son útiles a este respecto. Por ejemplo, cuando un revestimiento de poliuretano es para ser depositado sobre un sustrato dado usando el polielectrolito de la invención como capa ancla, el polielectrolito debe contener grupos químicos que sean capaces de reaccionar con grupos isocianato. Puede formarse entonces un revestimiento de poliuretano estable (p.ej. por medio de policondensación in situ) sobre la capa ancla de polielectrolito. Los comonómeros de fórmula (7) que contienen grupos polares tales como grupos epóxido también son útiles a este respecto.

R^6 representa preferiblemente un grupo amida, particularmente $-C(O)NH_2$ o $-C(O)N(CH_3)_2$; un grupo éster, particularmente ésteres formados con grupos alquilenglicol, poli- u oligoalquilenglicol; o un grupo N-heterocíclico que puede ser aromático o no aromático. El grupo N-heterocíclico puede contener (a) heteroátomo(s) adicionales además del nitrógeno, tal como un átomo de nitrógeno adicional o un átomo de oxígeno. Típicamente contiene 3 a 7 átomos de carbono además del (de los) heteroátomo(s), y puede estar sustituido por un grupo polar, específicamente por un grupo carbonilo. Preferiblemente, el grupo N-heterocíclico está conectado al resto de la molécula en un átomo de N. Los ejemplos del grupo N-heterocíclico como R^6 son pirrolidona, caprolactama o imidazol.

Los ejemplos de compuestos de fórmula (7) incluyen acrilato de 2-hidroxietilo, metacrilato de 2-hidroxietilo, acrilamida, metacrilamida, dimetilacrilamida, N-isopropilacrilamida, N-vinilpirrolidona, N-vinilcaprolactama, N-vinilimidazol, N-(2-hidroxipropil)metacrilamida, N-acriloilpirrolidina, metacrilato de éter metílico (o fenílico) de etilenglicol, acrilato de éter metílico (o fenílico) de etilenglicol, metacrilato de éter metílico (o fenílico) de di(etilenglicol), acrilato de éter metílico (o fenílico) de di(etilenglicol, acrilato de éter metílico (o fenílico) de poli(etilenglicol), metacrilato de éter metílico (o fenílico) de poli(etilenglicol, glicomonómeros (p.ej. 2-metacriloxietilglucósido), acrilonitrilo, metacrilonitrilo, acrilato o metacrilato de glicidilo.

En el contexto de la invención, el término "alquilo" o "grupo alquilo", a menos que se defina por separado, se refiere a un grupo hidrocarbonado saturado, ramificado o lineal de preferiblemente 1 a 10, más preferiblemente 1 a 4 átomos de carbono, tales como metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, t-butilo, isobutilo, pentilo, hexilo, isohexilo, heptilo, 4,4-dimetilpentilo, octilo, 2,2,4-trimetil-pentilo, nonilo, decilo y los diversos isómeros de cadena ramificada de los mismos. Se aplica lo mismo si el término se usa en combinaciones con otros grupos, p.ej. "alcoxi" o "alquilsulfonato".

El término "alquileno" o "grupo alquileno" se refiere a un grupo divalente obtenido por abstracción de un átomo de hidrógeno adicional de un grupo alquilo referido anteriormente.

Los términos "éster" o "grupo éster" denotan preferiblemente un grupo de la fórmula $-C(O)OR^{11}$, en donde R^{11} es alquilo que está opcionalmente sustituido o arilo que está opcionalmente sustituido. Los sustituyentes adecuados para alquilo incluyen un grupo -OH, $-NH_2$, mono- o dimetilamino, mono- o dietilamino, fenilo, haluro, epóxido o éter; los sustituyentes adecuados para arilo incluyen un grupo -OH, $-NH_2$, metilo, etilo, propilo, butilo, haluro, epóxido o éter.

Los términos "amida" o "grupo amida" denotan preferiblemente un grupo de la fórmula $-C(O)NR^{12}R^{13}$, en donde R^{12} y R^{13} son independientemente hidrógeno, alquilo (preferiblemente metilo, etilo o propilo) que está opcionalmente sustituido, o arilo (preferiblemente fenilo) que está opcionalmente sustituido. Alternativamente, R^{12} y R^{13} forman un anillo heterocíclico aromático o no aromático junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos. El anillo tiene preferiblemente 5 a 7 miembros. Los sustituyentes adecuados para alquilo incluyen un grupo -OH,$-NH_2$, mono- o dimetilamino, mono- o dietilamino, fenilo, haluro, epóxido o éter, los sustituyentes adecuados para arilo incluyen un grupo -OH, metilo, etilo, propilo, butilo, haluro, epóxido o éter.

El término "amino" o "grupo amino" abarca grupos amino primarios y secundarios. Denota preferiblemente un grupo de la fórmula $-NR^{14}R^{15}$, en donde R^{14} y R^{15} son independientemente hidrógeno, alquilo (preferiblemente metilo, etilo o propilo) que está opcionalmente sustituido, o arilo (preferiblemente fenilo) que está opcionalmente sustituido. Alternativamente, R^{14} y R^{15} pueden formar un anillo heterocíclico aromático o no aromático junto con el átomo de nitrógeno al que están unidos. El anillo tiene preferiblemente 5 a 7 miembros. Los sustituyentes adecuados para alquilo incluyen un grupo -OH,$-NH_2$, mono- o dimetilamino, mono- o dietilamino, fenilo, haluro, epóxido o éter, los sustituyentes adecuados para arilo incluyen un grupo -OH, metilo, etilo, propilo, butilo, haluro, epóxido o éter.

El término "arilo" o "grupo arilo" se refiere preferiblemente a grupos aromáticos monocíclicos o bicíclicos que contienen 6 a 10 átomos de carbono en la porción del anillo, tales como fenilo y naftilo. Se prefiere fenilo. Se aplica lo mismo si el término se usa en combinaciones con otros grupos, p.ej. ariloxi.

El término "éter" o "grupo éter" en el contexto de la invención puede hacer referencia a grupos éter en solitario, o a grupos poliéter. Se refiere preferiblemente a un grupo -alquileno-$(O\text{-alquileno})_p$-R^c, en donde los grupos alquileno se eligen independientemente de los definidos anteriormente, p es un número entero que varía preferiblemente de 0 a 5, preferiblemente 0, 1 o 2, y R^c es hidrógeno o hidroxilo (si $p \geq 1$); alcoxi o ariloxi.

El término "glicósido" se refiere a derivados de glucosa.

La relación molar de unidades (A) a la suma de unidades distintas a las unidades (A) (p.ej. (B1) y (C) o (B2) y (C)) en el copolímero de polielectrolito según la invención está preferiblemente entre 0.001 y 0,5, y más preferiblemente entre 0,01 y 0,5. Se prefieren particularmente relaciones entre 0,02 y 0,4, e incluso más entre 0,05 y 0,3.

La relación molar de unidades (B1) o (B2) a la suma de unidades distintas a las unidades (B1) o (B2) (p.ej. (A) y (C)) en el copolímero de polielectrolito según la invención está preferiblemente entre 100 y 0,01, y más preferiblemente entre 10 y 0,5. Se prefieren particularmente relaciones entre 10 y 1.

La relación molar de unidades (C), tales como unidades derivadas de monómeros de fórmula (7), a la suma de unidades distintas a (C) (p.ej. (A) y (B1) o (A) y (B2) puede variar ampliamente, dependiendo de la aplicación pretendida para el copolímero de polielectrolito según la invención. Los valores típicos varían de 0 a 100, se prefieren relaciones molares de 0,05 a 10. Se prefiere particularmente 0,08 a 1.

Cuando sólo se copolimerizan monómeros de fórmula (1) (o (1a) o (2), respectivamente) y (6) para proporcionar el copolímero de polielectrolito según la invención, la relación molar de monómeros (1)/(6), (1a)/(6) o (2)/(6) está preferiblemente entre 0,001 y 0,5, y más preferiblemente entre 0,01 y 0,5. Se prefieren particularmente relaciones entre 0,02 y 0,4, e incluso más entre 0,05 y 0,3. Cuando se usan monómeros de fórmula (1) (o (1a) o (2), respectivamente), (6) y (7), la relación molar (1)/[(6)+(7)], (1a)/[(6)+(7)] o (2)/[(6)+(7)] está preferiblemente entre 0,001 y 0,5, y más preferiblemente entre 0,01 y 0,5. Se prefieren particularmente relaciones entre 0,02 y 0,4, e incluso más entre 0,05 y 0,3.

El copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención puede ser un copolímero aleatorio o un copolímero ordenado, tal como un copolímero alternado o de bloques o injerto. A la vista de su producción no problemática, se usan muy frecuentemente copolímeros aleatorios o estructuras intermedias, en donde dos o más cadenas poliméricas que contienen unidades en un orden aleatorio están injertadas unas a otras.

El copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención puede tener una estructura de cadenas lineales. En el contexto de la presente invención, donde las unidades (A), (B1) y (B2) y (C) comprenden típicamente cadenas laterales de una cierta longitud, el término "estructura lineal" o "estructura de cadenas lineales" se usa para hacer referencia a copolímeros en donde las unidades que forman la cadena principal del copolímero están dispuestas de un modo lineal, sin tener en cuenta cadenas laterales que están enlazadas sólo a una única unidad de la cadena principal del copolímero.

Preferiblemente, sin embargo, el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención comprende un copolímero en donde dos o más cadenas de un copolímero de polielectrolito están enlazadas por enlaces intercadena. Se prefiere particularmente como copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención un polielectrolito que comprende moléculas de polielectrolito ramificadas o hiperramificadas, en donde al menos dos cadenas poliméricas de polielectrolito están enlazadas una a otra por un enlace covalente formado por medio de un grupo dihidroxifenilo contenido dentro de la unidad (A) .

El término "polielectrolito ramificado" denota un copolímero de polielectrolito en donde una o más cadena(s) polimérica(s) de polielectrolito que contienen unidades (A) y (B1) o (A) y (B2), y opcionalmente unidades (C), están injertadas sobre una primera cadena polimérica de polielectrolito que también contiene unidades (A) y (B1) o (A) y (B2), y opcionalmente unidades (C). Típicamente, una o más cadenas adicionales están injertadas químicamente cada una por medio de uno o más enlace(s) covalente(s) a la primera cadena. Se prefiere particularmente que el (los) enlace(s) covalente(s) entre las cadenas de polielectrolito en el polielectrolito ramificado esté/estén formadas por medio de un grupo dihidroxifenilo contenido dentro de la unidad (A).

El término "polielectrolito hiperramificado" denota un copolímero de polielectrolito en donde la(s) cadena(s) polimérica(s) de polielectrolito que contienen unidades (A) y (B1) o (A) y (B2), y opcionalmente unidades (C), que están injertadas sobre una primera cadena polimérica de polielectrolito como se describió para el polielectrolito ramificado, están también ramificadas, es decir, llevan una o más cadena(s) copoliméricas de polielectrolito injertadas cada una a ellas por medio de uno o más enlace(s) covalente(s). También en este caso, se prefiere particularmente que el (los) enlace(s) covalente(s) entre las cadenas de polielectrolito en el polielectrolito ramificado esté/estén formadas por medio de un grupo dihidroxifenilo contenido dentro de la unidad (A). Esta ramificación puede continuar en el polielectrolito hiperramificado mediante varios niveles de cadenas copoliméricas injertadas. En este caso, una pluralidad de cadenas de polielectrolito estarán enlazadas unas a otras.

Se ha averiguado que el injerto de una cadena a la otra en una estructura ramificada o hiperramificada puede llevarse a cabo convenientemente por medio de un grupo dihidroxifenilo contenido dentro de la unidad (A) o dentro del monómero de fórmula (1), (1a) o (2), respectivamente. Por ejemplo, dos de estos grupos dihidroxifenilo contenidos en diferentes cadenas poliméricas pueden reaccionar uno con otro para formar un enlace éter que enlaza una cadena a la otra. Alternativamente o al mismo tiempo, un grupo dihidroxifenilo de una cadena puede reaccionar también con un radical existente en otra cadena durante la polimerización por radicales, formando así un enlace C-O intercadena o un enlace C-C intercadena. En un polielectrolito ramificado o hiperramificado, pueden existir uno o más enlaces entre cualesquiera de dos cadenas poliméricas. Para asegurar una buena procesabilidad del copolímero de polielectrolito de la invención, tal como la posibilidad de disolver el polímero en un disolvente para su aplicación a un sustrato, el número de enlaces entre cualesquiera dos cadenas poliméricas debe ser limitado antes de que se aplique el copolímero de polielectrolito a una superficie. Esto puede conseguirse, p.ej., limitando el número de unidades (A) en el copolímero de polielectrolito de acuerdo con las enseñanzas anteriores. Dado que el número de enlaces intercadena formados entre cualesquiera dos cadenas en el copolímero de polielectrolito ramificado o hiperramificado no es por tanto excesivamente alto, y puede ser tan bajo como un enlace intercadena entre dos cadenas, las cadenas en el copolímero de polielectrolito ramificado o hiperramificado se consideran en la presente memoria como que están injertadas unas a otras, en lugar de reticuladas.

Sin embargo, como se describirá más adelante, existe la posibilidad de reticular adicionalmente el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención, p.ej. después de su deposición sobre un sustrato dado, si se codeposita un iniciador de radicales con el polielectrolito cuando se forma una película del polielectrolito sobre el sustrato. Activando posteriormente el iniciador de radicales y dejando que tenga lugar una reacción de reticulación, p.ej. por medio de una reacción de grupos dihidroxifenilo como se describió anteriormente, la durabilidad de la película puede ser aumentada.

Especialmente, cuando se usa una disolución del copolímero de polielectrolito según la invención para aplicar una capa polimérica sobre un sustrato, los polielectrolitos ramificados e hiperramificados son ventajosos. Debido al impedimento estérico entre las cadenas copoliméricas enlazadas en el polielectrolito ramificado o hiperramificado, el grosor de una capa de polielectrolito puede ser así por ejemplo más alto. La viscosidad de la disolución de polielectrolito ramificado es también diferente comparado con un polielectrolito lineal.

El peso molecular del copolímero de polielectrolito varía de 1.000 g/mol a varios millones de g/mol. De manera general, los copolímeros ramificados e hiperramificados según la invención tienen un peso molecular alto, generalmente entre 10.000 g/mol y 10^7 g/mol, preferiblemente entre 20.000 g/mol y 6 x 10^6 g/mol, y lo más preferiblemente entre 30.000 g/mol y 5 x 10^6 g/mol.

Un método para obtener el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención es disolver monómeros que proporcionan las unidades (A) y (B1) o (B2) y opcionalmente (C), tales como monómeros de las fórmulas (1), (1a) o (2), (6) y opcionalmente (7), en un disolvente adecuado, y hacerlos reaccionar en una reacción de polimerización que se inicia preferiblemente mediante un iniciador de radicales libres que está presente también en el disolvente. Un disolvente preferido para esta reacción de polimerización es un disolvente acuoso, es decir, un disolvente que comprende agua. Se prefieren particularmente disolventes que comprenden 50% en volumen o más de agua, y se prefiere particularmente como disolvente agua. Los monómeros pueden hacerse reaccionar simultáneamente en una reacción en un solo recipiente. Ventajosamente, no se necesita protección de los restos dihidroxifenilo antes de la polimerización, y la disolución acuosa del copolímero que resulta de la polimerización puede usarse directamente después de la síntesis sin ninguna etapa de purificación y/o desprotección.

La reacción de polimerización se lleva a cabo generalmente a una temperatura que varía de 0°C a 100°C, preferiblemente entre 0°C y 80°C y más preferiblemente entre 20°C y 70°C.

Los iniciadores de radicales libres adecuados son cualesquiera agentes que produzcan radicales libres, por ejemplo precursores tales como azocompuestos, peróxidos o peroxiésteres, que generan radicales por termólisis. También es posible generar radicales mediante sistemas redox, sistemas fotoquímicos o por radiación de alta energía, tal como radiación de haces o X o γ.

Se prefieren iniciadores de radicales libres solubles en agua (o parcialmente solubles en agua). Los ejemplos de iniciadores de radicales libres adecuados que generan radicales libres por termólisis son 4,4'-azobis(ácido 4-cianopentanoico), 2,2'-azobis[2-metil-N-(1,1-bis-(hidroximetil)-2-hidroxietilpropionamida], dihidrocloruro de 2,2'-

azobis(2-metilpropionamidina), 2,2'-azobis[2-metil-N-(2-hidroxietil)propionamida], 2,2'-azobis(hidrocloruro de isobutiramidina), 2,2'-azobis[2-metil-N-(1,1-bis(hidroximetil)-2-etil)-propionamida], dihidrocloruro de 2,2'-azobis[2-(2-imidazolin-2-il)propano], hidrato de 2,2'-azobis[N-(2-carboxietil)-2-metilpropionamidina], dihidrocloruro de 2,2'-azobis {2-[1-(2-hidroxietil)-2-imidazolin-2-il]propano}, dihidrocloruro de 2,2'-azobis(1-imino-1-pirrolidino-2-etilpropano), 2,2'-azobis{2-metil-N-[1,1-bis(hidroximetil)-2-hidroxietil]propionamida}, 2,2'-azobis[2-metil-N-(2-hidroxietilpropionamida], dihidrato de 2,2'-azobis(isobutilamida), azoiniciadores que tienen unidad polietilenglicol (productos comercializados por Wako Chemicals GmbH, Alemania, bajo la marca registrada VPE 0201, VPE 0401 y VPE 0601). Pueden usarse peroxidisulfato de potasio, peroxidisulfato de amonio, hiponitrito de di-terc-butilo e hiponitrito de dicumilo, pero puede observarse la oxidación de los restos dihidroxifenilo a su forma quinona. El grado de la oxidación dependerá de la relación molar iniciador/grupo dihidroxifenilo.

Los iniciadores que generan radicales por fotólisis son, por ejemplo, derivados de benzoína, benzofenona, óxidos de acilfosfina y sistemas fotorredox.

Los iniciadores que generan radicales como resultado de una reacción redox son en general una combinación de un agente oxidante y uno reductor. Son oxidantes adecuados, por ejemplo, peroxidisulfato de potasio, peroxidisulfato de amonio, peróxido de hidrógeno, hidroperóxido de terc-butilo. Son agentes reductores adecuados, por ejemplo, sales de Fe(II), sales de Ti(III), tiosulfato de potasio, bisulfito de potasio, ácido ascórbico y sales del mismo, ácido oxálico y sales del mismo, dextrosa y Rongalite® (sulfoxilato de formaldehído de sodio, BASF AG, Ludwigshafen, Alemania). El agente reductor debe elegirse cuidadosamente, a fin de limitar la oxidación de los restos dihidroxifenilo por el oxidante.

Los iniciadores por radicales preferidos son compuestos solubles en agua que generan radicales libres por termólisis. Se prefieren particularmente 4'-azobis(ácido 4-cianopentanoico), dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina), y 2,2'-azobis[2-metil-N-(1,1-bis-(hidroximetil)-2-hidroxietilpropionamida]. También puede usarse peroxidisulfato de potasio, peroxidisulfato de amonio y peróxido de hidrógeno como iniciador térmico, a condición de que la relación molar dihidroxifenilo a iniciador sea alta, tal como >2, preferiblemente > 3 y lo más preferiblemente 10.

La concentración final del copolímero en agua está generalmente entre 0,1 y 60% en peso, preferiblemente entre 0,5% en peso y 30% en peso, y más preferiblemente entre 1% en peso y 25% en peso. Pueden añadirse sales inorgánicas y amortiguadores en el medio de polimerización, a fin de ajustar la fuerza iónica y el pH de la disolución.

En el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención, una parte de o todos los grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito está oxidada a su forma quinona. La oxidación de los grupos dihidroxifenilo puede llevarse a cabo según procedimientos de oxidación conocidos en la técnica, que incluyen la reacción in situ de los grupos dihidroxifenilo con iones metálicos oxidantes sobre una superficie funcionalizada con el copolímero de polielectrolito, como se describirá más adelante en más detalle. La relación de grupos dihidroxifenilo en forma oxidada a los grupos dihidroxifenilo en forma no oxidada puede variar ampliamente, dependiendo del uso que se haga de los grupos en forma oxidada. Por tanto, el porcentaje de los grupos dihidroxifenilo del copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención que están presentes en su forma oxidada (en base al número total de grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito en forma oxidada o no oxidada, pero excluyendo grupos dihidroxifenilo que pueden haber reaccionado para formar un enlace covalente entre cadenas de polielectrolito en un electrolito polimérico ramificado o hiperramificado) puede ser más alto que 1%, particularmente más alto que 10% o más alto que 30%.

Material compuesto de polielectrolito

La presente invención proporciona, en un segundo aspecto, un material compuesto de polielectrolito que comprende (i) una forma oxidada del copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención, en donde una parte de o todos los grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito han sido oxidados a su forma quinona; y

(ii) partículas de un metal y/o partículas de una sal metálica.

De manera general, las partículas de metal y/o las partículas de una sal metálica están incrustadas dentro de una matriz formada por la forma oxidada del polímero de polielectrolito según la invención. Debe entenderse que cualquier referencia a una forma oxidada del grupo dihidroxifenilo en la presente memoria significa la forma quinona del grupo dihidroxifenilo, en particular un grupo 3,4-benzoquinon-1-ilo.

De manera general, el porcentaje de los grupos dihidroxifenilo del copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención que están presentes en su forma oxidada (en base al número total de grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito en forma oxidada o no oxidada, pero excluyendo grupos dihidroxifenilo que pueden haber reaccionado para formar un enlace covalente entre cadenas de polielectrolito en un electrolito polimérico ramificado o hiperramificado) puede ser más alto que 1%, particularmente más alto que 10%, y particularmente más alto que 30%. Dependiendo del uso que se haga del material compuesto de polielectrolito, el porcentaje puede aumentar hasta 100%. Sin embargo, es de apuntar que un material compuesto de polielectrolito en donde el 100% o cerca del 100% de todos los grupos dihidroxifenilo están oxidados será menos adecuado para adherirse a una superficie como tal. Tal material compuesto de polielectrolito será adecuado como capa interna de

un material polimérico multicapas según la invención que se discute más adelante. Por otra parte, la cantidad de grupos dihidroxifenilo en su forma no oxidada que es necesaria para dejar que el copolímero de polielectrolito se adhiera a la superficie no es alta. Por tanto, los materiales compuestos de polielectrolito que contienen una relación molar de las unidades (A) con grupos dihidroxifenilo no oxidados a la suma de unidades distintas a estas unidades (A) de más que 0,001, particularmente más que 0,05 proporcionarán aún una excelente adhesión a una superficie por medio de los grupos dihidroxifenilo contenidos en los mismos. Tal material compuesto puede aplicarse directamente a superficies como material de revestimiento.

Preferiblemente, el material compuesto de polielectrolito de la invención contiene el metal y/o la sal metálica en la forma de nanopartículas. El término "nanopartículas", como se emplea en la presente memoria, se refiere a partículas de un tamaño de 1 a 1.000 nm. Sin embargo, se prefiere generalmente que el tamaño de las partículas de metal esté en el intervalo de 1 a 100 nm, mientras que el tamaño de las partículas de la sal metálica está preferiblemente en el intervalo de tamaños de 2 a 1.000 nm. Dependiendo de la aplicación deseada, la cantidad de partículas de metal y/o partículas de sal metálica contenidas en el material compuesto de polielectrolito según la invención puede variar sobre amplios intervalos. De manera general, la relación molar de metal (incluyendo tanto la forma elemental como los cationes metálicos de la sal) a los grupos dihidroxifenilo (incluyendo aquellos en su forma no oxidada o su forma oxidada) contenidos en el material compuesto de polielectrolito es más alta que 0,01, preferiblemente más alta que 0,1. Se usan generalmente relaciones por debajo de 2, y particularmente pueden incorporarse convenientemente relaciones a o por debajo de 1 en el material compuesto.

Pueden usarse diversos metales para proporcionar las partículas de metal o partículas de sal metálica. Se prefieren metales que puedan formar cationes en disolución acuosa susceptibles a reducción por los grupos dihidroxifenilo del copolímero de polielectrolito según la invención, tales como el catión plata. La plata se prefiere particularmente debido a sus propiedades antibacterianas. Puede usarse un único metal o combinaciones de metales diferentes. El contraión del catión metálico en cualesquiera partículas de sal metálica contenidas en el material compuesto debe seleccionarse de tal modo que las partículas de sal metálica no se disuelvan fácilmente bajo las condiciones en las que se prepara y/o se aplica a una superficie el material compuesto. Típicamente, esto significa que las partículas de sal metálica tienen una baja o sustancialmente nula solubilidad en agua. La constante del producto de solubilidad K_{ps} de la sal metálica en agua a 25°C está preferiblemente en el intervalo 10^{-2} a 10^{-40}, más preferiblemente en el intervalo 10^{-3} a 10^{-30}, e incluso más preferiblemente en el intervalo 10^{-5} a 10^{-20}. Por ejemplo, si se usan cationes de plata para formar partículas de sal metálica, los aniones adecuados incluyen haluros, tales como bromuro y cloruro.

El material compuesto de polielectrolito del material compuesto de la invención puede contener sólo partículas de metal o sólo partículas de una sal metálica. Preferiblemente, contiene ambas. Se prefieren particularmente materiales compuestos de polielectrolito que contienen partículas de plata elemental y partículas de un haluro de plata, tal como cloruro de plata o bromuro de plata.

Tales materiales compuestos pueden aplicarse ventajosamente a superficies para dotarlas de propiedades antibacterianas/antimicrobianas. El copolímero de polielectrolito según la invención es una matriz eficaz para la formación y estabilización in situ de partículas de metal y/o nanopartículas de sal metálica. Las funciones quinona, formadas después de la reducción de cationes metálicos por grupos dihidroxifenilo, pueden quelar nanopartículas de metal, tal como nanopartículas de plata, mediante interacciones de coordinación, y por consiguiente, estabilizar las nanopartículas.

Un material compuesto de polielectrolito particularmente preferido del material compuesto de la invención comprende el polielectrolito P(DOPA)-*co*-P($DMAEMA^+$) definido anteriormente, en una forma en donde todos o parte de los grupos dihidroxifenilo están oxidados a su forma quinona, junto con nanopartículas de plata y nanopartículas de cloruro de plata incrustadas en la matriz del polielectrolito.

La actividad antibacteriana del material compuesto de la presente invención que contiene partículas de plata y de sal de plata pueden ser atribuidas a la especie biocida activa Ag^+, que proviene de la sal de plata incrustada, p.ej. AgCl, y nanopartículas de Ag° en el polielectrolito, que se están difundiendo fuera de la película. El mecanismo biocida es debido principalmente al ión Ag^+ lixiviado. Las nanopartículas de AgCl y Ag° actúan como reservorios eficaces para la liberación de iones Ag^+ biocidas. Las nanopartículas de AgCl proporcionan una fuente de iones plata. Los iones Ag^+ pueden ser producidos por medio de una etapa de oxidación en la superficie de las nanopartículas de plata Ag°.

El material compuesto de polielectrolito de la invención que contiene partículas de metal puede prepararse convenientemente poniendo en contacto

(i) un copolímero de polielectrolito según la invención con

(ii) una disolución de una sal metálica

para causar la reducción in situ de los iones metálicos de la sal metálica por los grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito para formar partículas de metal. Como se expuso anteriormente, la sal metálica usada en esta variante de procedimiento es preferiblemente una que contiene cationes metálicos susceptibles a reducción por los grupos dihidroxifenilo del copolímero de polielectrolito según la invención. Por tanto, no se necesita agente reductor independiente para preparar las partículas de metal en el material compuesto de polielectrolito.

El material compuesto de polielectrolito de la invención que contiene partículas de una sal metálica puede prepararse convenientemente poniendo en contacto

(i) un copolímero de polielectrolito según la invención que contiene unidades (B1) con

(ii) una disolución de una sal metálica

para causar la precipitación in situ de una sal metálica por un intercambio iónico con los contraiones del resto catiónico de las unidades (B1). Como se expuso anteriormente, esta variante de procedimiento es factible si se elige un metal para la disolución de sal metálica que forme una sal con el contraión del copolímero de polielectrolito según la invención que tenga una solubilidad suficientemente baja o sea esencialmente no soluble en el medio en donde se ponen en contacto (i) y (ii). El término "solubilidad baja" significa a este respecto una solubilidad que sea suficientemente baja, de tal modo que el producto de solubilidad de la sal que consiste en el catión de la sal metálica y el contraión (anión) de la unidad (B1) sea excedido cuando se ponen en contacto (i) y (ii).

En una realización particularmente preferida del procedimiento para la producción de un material compuesto de polielectrolito según la invención, las dos variantes de procedimiento que incluyen la reducción in situ y la precipitación in situ tienen lugar al mismo tiempo cuando (i) un copolímero de polielectrolito según la invención que contiene unidades (B1) se pone en contacto con (ii) una disolución de una sal metálica. Este puede ser el caso, p.ej., si las unidades catiónicas (B1) en el copolímero de polielectrolito (i) antes de la adición de la disolución de una sal metálica tienen un ión halogenuro, tal como un ión cloruro o bromuro, como contraión, y en donde la disolución de una sal metálica (ii) añadida al copolímero de polielectrolito es una disolución que contiene cationes plata, de tal modo que se forman partículas de plata metálica y/o partículas de un halogenuro de plata en una matriz del polielectrolito.

Las disoluciones preferidas de sales metálicas (ii) son disoluciones acuosas de sales de plata, tales como $AgNO_3$. La relación molar de los grupos dihidroxifenilo a Ag^+, tal como $AgNO_3$, está generalmente entre 100/0,01, preferiblemente entre 10/0,1 y más preferiblemente entre 5/0,5. Convenientemente, ambos pueden ser puestos en contacto a temperatura ambiente, p.ej. bajo agitación.

Ventajosamente, en el procedimiento según la invención, el copolímero de polielectrolito (i) y la disolución de una sal metálica (ii) se ponen en contacto como disoluciones en un medio acuoso. Posteriormente, la disolución puede revestirse sobre una superficie y secarse. Alternativamente, es posible revestir la superficie de un dispositivo con un copolímero de polielectrolito según la invención, y poner en contacto la superficie revestida con la disolución de una sal metálica (ii) a fin de proporcionar un material compuesto de polielectrolito según la invención.

Según un tercer aspecto, la invención proporciona un material compuesto de polielectrolito que comprende (i) una forma oxidada del copolímero de polielectrolito según la invención, en donde una parte de o todos los grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito han sido oxidados a su forma quinona; y (ii) biomoléculas injertadas al copolímero de polielectrolito por medio de la reacción de un grupo dihidroxifenilo oxidado con un grupo amino o tiol presente en la biomolécula.

También en esta realización, el porcentaje de los grupos dihidroxifenilo del copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención que están presentes en su forma oxidada (en base al número total de grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito en forma oxidada o no oxidada) es más alto que 1%, preferiblemente más alto que 10% y particularmente más alto que 30%. Dependiendo del uso que se haga del material compuesto de polielectrolito, el porcentaje puede aumentar hasta 100%. Sin embargo, es de apuntar que un material compuesto de polielectrolito en donde el 100% o cerca del 100% de todos los grupos dihidroxifenilo están oxidados será menos adecuado para adherirse a una superficie como tal. Tal material compuesto de polielectrolito será adecuado como capa interna de un material polimérico multicapas según la invención que se discute más adelante. Por otra parte, los materiales compuestos de polielectrolito que contienen una relación molar de las unidades (A) con tales grupos dihidroxifenilo no oxidados a la suma de unidades distintas a estas unidades (A) de más que 0,001, particularmente más que 0,05 proporcionarán ya una excelente adhesión a una superficie por medio de los grupos dihidroxifenilo contenidos en los mismos. Tal material compuesto puede aplicarse directamente a superficies como material de revestimiento.

El término "biomoléculas" se refiere a cualesquiera péptidos o proteínas naturales o sintéticos. Las biomoléculas, en su forma libre (es decir, antes de que sean injertadas al copolímero de polielectrolito), contienen al menos un grupo amino y/o al menos un grupo tiol. Este grupo funcional permite una reacción conveniente con una forma quinona del grupo dihidroxifenilo oxidado contenido en el copolímero de polielectrolito según la invención. Las biomoléculas pueden ser injertadas después químicamente, generalmente covalentemente, al polielectrolito mediante la reacción de uno o más de sus grupos amino y/o grupos tiol con funciones quinona del polielectrolito.

Las biomoléculas pueden seleccionarse para comunicar funcionalidad adicional al material compuesto. Por ejemplo, cuando se desea actividad antimicrobiana, pueden usarse péptidos y/o proteínas antimicrobianos de origen bacteriano, fúngico, vegetal, animal, humano o cualesquiera estructuras químicas análogas obtenidas por diseño y síntesis química nuevos. De manera similar, pueden usarse sustancias antibacterianas. Los ejemplos son, pero no se limitan a: nisina, β defensina, magainina, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasa, lipopéptidos, endolisina, tripticina

y otros péptidos ricos en Trp. Son ejemplos adicionales de moléculas orgánicas antibacterianas el chitosán u otras moléculas antibacterianas bien conocidas en la técnica, como triclosán, isotiazolinonas, etc.

Otros ejemplos de biomoléculas de interés son los polisacáridos; un ejemplo de polisacárido antimicrobiano es el chitosán.

También pueden usarse mezclas de biomoléculas diferentes para preparar el material compuesto de polielectrolito según la invención.

Si una molécula orgánica de interés no contiene un grupo amino o tiol, puede ser posible funcionalizarla mediante tal grupo usando reacciones orgánicas bien conocidas a fin de promover su injerto covalente al polielectrolito.

Dependiendo de la aplicación deseada, la cantidad de biomoléculas contenidas en el material compuesto de polielectrolito según la invención puede variar sobre amplios intervalos. De manera general, la relación molar de biomoléculas a la forma quinona del grupo dihidroxifenilo depende de la cantidad de grupos amino y/o tiol que contienen. La relación molar grupos amino y/o tiol proporcionada por las biomoléculas a la forma quinona del grupo dihidroxifenilo en el material compuesto de polihidroxifenilo es preferiblemente más baja que 1, más preferiblemente más baja que 0,5. Lo más preferiblemente, esta relación se ajusta para injertar un mínimo de grupos amino y/o tiol de una biomolécula al polielectrolito a fin de evitar la desnaturalización de la biomolécula y/o la reticulación del material compuesto de polielectrolito por biomoléculas multifuncionales. Si, por otra parte, se desea la reticulación del material compuesto de polielectrolito, la relación molar grupos amino y/o tiol a la forma quinona del grupo dihidroxifenilo puede ser optimizada a fin de hacer reaccionar un máximo de grupos amino y/o tiol de la biomolécula con los grupos quinona.

Tales materiales compuestos pueden aplicarse ventajosamente a superficies para dotarlas de propiedades antibacterianas/antimicrobianas y/o otras propiedades, dependiendo de las propiedades de la biomolécula inmovilizada. El copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención es una matriz eficaz para el injerto químico de biomoléculas. La función quinona promueve el injerto químico de biomoléculas mediante los grupos amino y/o tiol de las biomoléculas.

Opcionalmente, sólo una parte de las biomoléculas está injertada químicamente al copolímero de polielectrolito, mientras que otra parte no está injertada químicamente. Las biomoléculas que están injertadas químicamente asegurarán la durabilidad de la función al material de polielectrolito, mientras que las biomoléculas que están presentes en el material compuesto de polielectrolito sin la formación de un enlace químico entre la biomolécula y el polielectrolito se difundirán en la disolución. Para tal fin, la relación molar grupos amino y/o tiol a la forma quinona del grupo dihidroxifenilo en el material compuesto de polielectrolito es preferiblemente más alta que 0,2, preferiblemente más alta que 0,5.

Un material compuesto de polielectrolito particularmente preferido según la invención comprende el polielectrolito P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) definido anteriormente en una forma en donde todos o parte de los grupos dihidroxifenilo están oxidados a su forma quinona y nisina como péptido antimicrobiano.

El material compuesto de polielectrolito de la invención que contiene biomoléculas puede prepararse convenientemente poniendo en contacto

(i) un copolímero de polielectrolito según la invención con

(ii) una disolución de biomolécula que lleva grupos amino y/o tiol.

La reacción puede tener lugar convenientemente a temperatura ambiente en un medio acuoso.

En una variante ventajosa del procedimiento según la invención, el copolímero de polielectrolito (i) y la disolución de la biomolécula (ii) se ponen en contacto como disoluciones en un medio acuoso. Posteriormente, la disolución se reviste sobre una superficie y se seca. Alternativamente, es posible revestir la superficie de un dispositivo con un copolímero de polielectrolito según la invención, y poner en contacto la superficie revestida con la disolución de la biomolécula (iii) a fin de proporcionar un material compuesto de polielectrolito según el tercer aspecto de la invención.

Según un cuarto aspecto de la invención, el segundo y el tercer aspecto discutidos anteriormente pueden ser combinados para proporcionar un material compuesto de polielectrolito que comprende

(i) una forma oxidada del polielectrolito según la invención, en donde una parte de o todos los grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito han sido oxidados a su forma quinona;

(ii) partículas de un metal y/o partículas de una sal metálica y

(iii) biomoléculas injertadas al copolímero de polielectrolito por medio de la reacción de un grupo dihidroxifenilo oxidado con un grupo amino o tiol presente en la biomolécula.

Como se apuntó con respecto a la segunda realización, las partículas de metal y/o las partículas de una sal metálica están generalmente incrustadas dentro de una matriz formada por la forma oxidada del copolímero de polielectrolito según la invención. Debe entenderse que cualquier referencia a una forma oxidada del grupo dihidroxifenilo en la presente memoria significa la forma quinona del grupo dihidroxifenilo, en particular un grupo 3,4-benzoquinon-1-ilo.

Como en la segunda o tercera realización, el porcentaje de los grupos dihidroxifenilo del copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención que están presentes en su forma oxidada (en base al número total de grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito en forma oxidada o no oxidada) es más alto que 1%, preferiblemente más alto que 10% y particularmente más alto que 30%. Dependiendo del uso que se haga del material compuesto de polielectrolito, el porcentaje puede aumentar hasta 100%. Sin embargo, es de apuntar que un material compuesto de polielectrolito en donde el 100% o cerca del 100% de todos los grupos dihidroxifenilo están oxidados será menos adecuado para adherirse a una superficie como tal. Tal material compuesto de polielectrolito será adecuado como capa interna de un material polimérico multicapas según la invención, lo que se discute más adelante. Por otra parte, los materiales compuestos de polielectrolito que contienen una relación molar de las unidades (A) con tales grupos dihidroxifenilo no oxidados a la suma de unidades distintas a estas unidades (A) de más que 0,001, particularmente más que 0,05, proporcionarán ya una excelente adhesión a una superficie por medio de los grupos dihidroxifenilo contenidos en los mismos. Tal material compuesto puede aplicarse directamente a superficies como material de revestimiento.

Preferiblemente, el material compuesto de polielectrolito según la invención contiene el metal y/o la sal metálica en la forma de nanopartículas descrita anteriormente. Dependiendo de la aplicación deseada, la cantidad de partículas de metal y/o partículas de sal metálica contenidas en el material compuesto de polielectrolito según la invención puede variar sobre amplios intervalos. De manera general, la relación molar de metal (incluyendo tanto la forma elemental como los cationes metálicos de la sal) a los grupos dihidroxifenilo (incluyendo aquellos en su forma no oxidada o su forma oxidada) contenidos en el material compuesto de polielectrolito es más alta que 0,01, preferiblemente más alta que 0,1. Se usan generalmente relaciones por debajo de 2, y particularmente pueden incorporarse convenientemente relaciones a o por debajo de 1 en el material compuesto. La formación de partículas de metal y/o partículas de sales metálicas se ha descrito aquí anteriormente.

El material compuesto de polielectrolito según el cuarto aspecto de la invención puede contener uno de partículas de metal o partículas de una sal metálica en combinación con las biomoléculas. Preferiblemente, contiene ambos tipos de partículas en combinación con las biomoléculas. Se prefieren particularmente materiales compuestos de polielectrolito que contienen partículas de plata elemental y partículas de un haluro de plata, tal como cloruro de plata o bromuro de plata, en combinación con biomoléculas.

Las biomoléculas que pueden usarse en el contexto de esta cuarta realización, así como sus formas preferidas, son las mismas que las que se han definido para la tercera realización anterior. Son injertadas también químicamente, generalmente covalentemente, al polielectrolito mediante la reacción de uno o más de sus grupos amino y/o grupos tiol con funciones quinona del polielectrolito. Sin embargo, pueden estar presentes adicionalmente biomoléculas que no están injertadas químicamente al polielectrolito, si se desea. También pueden usarse mezclas de biomoléculas diferentes para preparar el material compuesto de polielectrolito según la invención.

Las cantidades de las biomoléculas usadas para la cuarta realización corresponden a las definidas para la tercera realización, y se seleccionan dependiendo de la aplicación deseada.

Tales materiales compuestos pueden aplicarse ventajosamente a superficies para dotarlas de propiedades antibacterianas y/o antimicrobianas y/o otras propiedades, dependiendo de las propiedades de la biomolécula injertada. El copolímero de polielectrolito según el cuarto aspecto de la invención es una matriz eficaz para la formación y estabilización in situ de partículas de metal y/o nanopartículas de sales metálicas, y para el injerto químico de biomoléculas. Las funciones quinona, formadas después de la reducción de cationes metálicos por grupos dihidroxifenilo, pueden quelar nanopartículas de metal, tal como nanopartículas de plata, mediante interacciones de coordinación, y por consiguiente, estabilizar las nanopartículas. Estas funciones quinona pueden promover también el injerto químico de biomoléculas mediante los grupos amino y/o tiol de las biomoléculas.

Un material compuesto de polielectrolito particularmente preferido según el cuarto aspecto de la invención comprende el polielectrolito P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) definido anteriormente, en una forma en donde todos o parte de los grupos dihidroxifenilo están oxidados a su forma quinona, junto con nanopartículas de plata y nanopartículas de cloruro de plata incrustadas en la matriz del polielectrolito, y nisina como péptido antimicrobiano.

La actividad antibacteriana del material compuesto de la presente invención que contiene partículas de plata y de sal de plata y nisina puede ser atribuida a la especie biocida activa Ag^+, que proviene de partículas de plata incrustadas, p.ej. AgCl y Ag°, que se están difundiendo fuera de la película, y a la actividad antimicrobiana de la nisina injertada químicamente a la película. Debido a que el Ag^+ biocida está difundiéndose fuera de la película, su actividad antimicrobiana es limitada en el tiempo. Por otra parte, debido a que el péptido antimicrobiano está injertado químicamente a la película, su actividad no está limitada en el tiempo, y es responsable de la durabilidad de la función. Las bacterias mueren cuando entran en contacto con el material compuesto de polielectrolito. Opcionalmente, sólo parte de la nisina puede estar injertada químicamente a fin de promover algo de difusión del

péptido antimicrobiano en la disolución, mientras que algo de nisina es mantenida en el material compuesto de polielectrolito para la durabilidad de la función. Para tal fin, la relación molar de grupos amino y tiol a la forma quinona del grupo dihidroxifenilo en el material compuesto de polielectrolito es preferiblemente más alta que 0,2, preferiblemente más alta que 0,5.

El material compuesto de polielectrolito según el cuarto aspecto de la invención que contiene partículas de metal puede prepararse convenientemente poniendo en contacto

(i) un copolímero de polielectrolito con

(ii) una disolución de una sal metálica

para causar la reducción in situ de los iones metálicos de la sal metálica por los grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito para formar partículas de metal y

(iii) una disolución de una biomolécula que lleva grupos amino y/o tiol en cualquier orden de etapas. Como se expuso anteriormente con respecto a la segunda realización, la sal metálica usada en esta variante de procedimiento es preferiblemente una que contiene cationes metálicos susceptibles a reducción por los grupos dihidroxifenilo del copolímero de polielectrolito según la invención. Por tanto, no se necesita agente reductor independiente para preparar las partículas de metal en el material compuesto de polielectrolito.

El material compuesto de polielectrolito de la invención que contiene partículas de una sal metálica puede prepararse convenientemente poniendo en contacto

(i) un copolímero de polielectrolito según la invención que contiene unidades (B1) con

(ii) una disolución de una sal metálica

para causar la precipitación in situ de una sal metálica por un intercambio iónico con los contraiones del resto catiónico de las unidades (B1) y

(iii) una disolución de una biomolécula que lleva grupos amino y/o tiol en cualquier orden de etapas. Como se expuso anteriormente con respecto a la segunda realización, esta variante de procedimiento es factible si se elige un metal para la disolución de sal metálica que forme una sal con el contraión del copolímero de polielectrolito según la invención que tenga una solubilidad suficientemente baja o sea esencialmente no soluble en el medio en donde se ponen en contacto (i) y (ii).

En una realización particularmente preferida del procedimiento para la producción de un material compuesto de polielectrolito según la invención, las dos variantes de procedimiento que incluyen la reducción in situ y la precipitación in situ en combinación con la inmovilización de la biomolécula tienen lugar al mismo tiempo cuando (i) un copolímero de polielectrolito según la invención que contiene unidades (B1) se pone en contacto con (ii) una disolución de una sal metálica. Este puede ser el caso, p.ej., si las unidades catiónicas (B1) en el copolímero de polielectrolito (i) antes de la adición de la disolución de una sal metálica tienen un ión halogenuro como contraión, y en donde la disolución de una sal metálica (ii) añadida al copolímero de polielectrolito es una disolución que contiene cationes plata de tal modo que se forman partículas de plata metálica y/o partículas de un halogenuro de plata en una matriz del polielectrolito.

Las disoluciones preferidas de sales metálicas (ii) son disoluciones acuosas de sales de plata, tales como $AgNO_3$. La relación molar de los grupos dihidroxifenilo a Ag^+, tal como $AgNO_3$, está generalmente entre 100/0,01, preferiblemente entre 10/0,1 y más preferiblemente entre 5/0,5. Convenientemente, ambos pueden ser puestos en contacto a temperatura ambiente, p.ej. bajo agitación.

Ventajosamente, en el procedimiento según la invención, el copolímero de polielectrolito (i), la disolución de una sal metálica (ii) y la disolución de la biomolécula (iii) se ponen en contacto como disoluciones en un medio acuoso. Posteriormente, la disolución puede revestirse sobre una superficie y secarse. Alternativamente, es posible revestir la superficie de un dispositivo con un copolímero de polielectrolito según la invención, y poner en contacto la superficie revestida con la disolución de una sal metálica (ii) a fin de proporcionar un material compuesto de polielectrolito según la invención. La disolución de la sal metálica y la biomolécula puede ser mezclada opcionalmente antes de contactar con la superficie que se reviste con el copolímero de polielectrolito según la invención.

Los materiales compuestos de polielectrolito según el segundo a cuarto aspecto de la invención pueden formarse a partir de polielectrolitos lineales, ramificados o hiperramificados como se definieron anteriormente, en solitario o a partir de mezclas de los mismos. De manera general, contienen polielectrolitos ramificados o hiperramificados.

Película multicapas

Se describe en la presente memoria una película multicapas formada por capas de polielectrolito, se describirá en detalle en lo que sigue. De manera general, en películas de polielectrolito multicapas, las capas de polielectrolito se

colocan unas encima de otras, que llevan el mismo tipo de carga (es decir, catiónica o aniónica) dentro de una capa, pero que alternan en su carga de una capa a la siguiente. Tales películas pueden prepararse convenientemente por medio de una construcción de películas "capa a capa" (LBL).

Se entenderá que cualquier referencia a la carga por un polielectrolito o una capa de polielectrolito en la presente memoria describe la carga de los grupos iónicos (catiónicos o aniónicos) unidos covalentemente en el polielectrolito en consideración.

En la película multicapas descrita en la presente memoria, al menos la primera capa es proporcionada por un copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención definido anteriormente. La primera capa referida en este contexto es una de las dos capas exteriores de la película multicapas, en particular la que contactará y proporcionará adherencia a la superficie revestida finalmente con la película multicapas. Una segunda capa de polielectrolito que se coloca por encima de la primera capa tiene una carga opuesta a la de la primera capa. Una o más capas de polielectrolito adicionales con cargas opuestas a las de sus capas subyacentes respectivas se proporcionan en orden subsiguiente unas por encima de otras. La segunda capa y la(s) capa(s) adicional(es) pueden seleccionarse independientemente de materiales de polielectrolito conocidos en la técnica para la preparación de revestimientos de superficies o de materiales compuestos de polielectrolito según la invención descritos anteriormente.

Otros polielectrolitos catiónicos o aniónicos que pueden usarse junto con el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención para formar las películas multicapa según la invención incluyen todos los polielectrolitos catiónicos o aniónicos conocidos y usados por la técnica para la formación de películas LBL. Son algunos ejemplos poli(4-sulfonato de estireno) (PSS), sal de sodio (o potasio) de poli(ácido acrílico), sal de sodio (o potasio) de poli(ácido metacrílico), poli(ácido glutámico), poli(lisina), poli(sulfonato de etileno), poli(etilenimina), poli(vinil-4-alquilpiridinio), sal, poli(metileno)-N,N-dimetilpiridinio, sal, poli(vinilbenciltrimetilamonio), sal, poli(cloruro de dialildimetilamonio), poli(alilamina), sulfato de dextrano o chitosán. Otros ejemplos de polielectrolitos catiónicos para ser usados en esta invención son péptidos y/o proteínas catiónicos. Cuando se desea actividad antimicrobiana, pueden usarse preferiblemente péptidos y/o proteínas antimicrobianos catiónicos de origen bacteriano, fúngico, vegetal, animal, humano o cualesquiera estructuras químicas análogas obtenidas por diseño y síntesis química nuevos. Los ejemplos son, pero no se limitan a: nisina, β defensina, magainina, lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasa, lipopéptidos, endolisina, tripticidina (Trp) y otros péptidos ricos en Trp. Además, los péptidos y/o proteínas antimicrobianos catiónicos o cualesquiera estructuras químicas análogas obtenidas por diseño y síntesis química nuevos pueden ser injertados sobre o combinados con el copolímero de polielectrolito según la invención o con cualesquiera materiales de polielectrolito adecuados conocidos en la técnica. Los ejemplos de polielectrolitos aniónicos a ser usados en esta invención son péptidos, proteínas, glicoproteínas, polisacáridos aniónicos de origen bacteriano, fúngico, vegetal, animal, humano o cualesquiera estructuras químicas análogas obtenidas por diseño y síntesis química nuevos; Son ejemplos específicos no limitantes la mucina, ácido hialurónico, heparina, Fucogel® [-α - Gal*p* - (1 → 3) - α - Gal*p*A - 4 - *O* - Ac - (1 → 3) - αFuc*p* - (1 →], proteínas de la leche (caseínas), albúmina, poliaspartato, ácido algínico. Además, los péptidos y/o proteínas antimicrobianos aniónicos o cualesquiera estructuras químicas análogas obtenidas por diseño y síntesis química nuevos pueden ser injertados sobre o combinados con el copolímero de polielectrolito según la invención o con cualesquiera materiales de polielectrolito adecuados conocidos en la técnica.

Preferiblemente, la película multicapas comprende capas alternadas de (i) un polielectrolito del material compuesto de la invención y (ii) un polielectrolito que lleva una carga que es opuesta a la del polielectrolito (i), en donde la primera capa es una capa de un copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención y todas las capas posteriores que tienen la misma carga que la primera capa son capas de un copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención y/o capas de un material compuesto de polielectrolito. En este caso, el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención forma la primera capa de la película multicapas y asegura una adhesión estable de la película multicapas a una superficie a ser revestida. Al mismo tiempo, el material compuesto de polielectrolito según la invención forma capas internas adicionales de la película multicapas. Para esta realización, se prefiere que la primera capa y las capas posteriores del copolímero de polielectrolito de la invención sean copolímeros de polielectrolito catiónicos que contengan unidades (B1) o copolímeros de polielectrolito aniónicos que contengan unidades (B2).

Se prefiere particularmente que la primera capa sea proporcionada por un copolímero de polielectrolito catiónico del material compuesto de la invención y todas las capas catiónicas posteriores estén formadas por materiales compuestos de polielectrolito del material compuesto de la invención en materiales compuestos particulares que contengan partículas de plata y partículas de un haluro de plata y/o materiales compuestos que contengan partículas de plata, partículas de un haluro de plata y biomoléculas. Según tales realizaciones, pueden proporcionarse altas cargas de plata con actividad antibacteriana/antimicrobiana en un revestimiento de película multicapas. Las capas de polielectrolito aniónico que forman la película multicapas en orden alternante con las capas catiónicas de estas realizaciones pueden formarse a partir de un copolímero de polielectrolito aniónico según la invención, o a partir de otros polielectrolitos aniónicos conocidos en la técnica, p.ej., a partir de poli(4-sulfonato de estireno) (PSS), sal de sodio (o potasio) de poli(ácido acrílico) o sal de sodio (o potasio) de poli(ácido metacrílico).

Por supuesto, la invención también abarca las realizaciones en donde el polielectrolito (ii) cargado opuestamente en las realizaciones anteriores es también un copolímero de polielectrolito según la invención o un material compuesto de polielectrolito según la invención. Abarca además realizaciones en donde sólo una parte de las capas de polielectrolito que llevan una carga catiónica y/o sólo una parte de las capas de polielectrolito que llevan una carga aniónica está formada a partir del copolímero de polielectrolito según la invención o el material compuesto de polielectrolito según la invención, a condición de que al menos una capa exterior de la película multicapas (es decir, la primera capa) esté formada por un copolímero de polielectrolito según la invención.

En una realización preferida de la película multicapas, la primera capa es un copolímero de polielectrolito de P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) definido anteriormente, y las capas posteriores son bicapas formadas a partir de PSS y un material compuesto de polielectrolito basado en P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) definido anteriormente en las que están incorporadas nanopartículas de plata y nanopartículas de cloruro de plata. Tal película multicapas se denomina también en la presente memoria [P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)]/[(PSS/ P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$))-plata]$_n$, en donde n denota el número de bicapas presentes en la película multicapas. Típicamente, n varía de 2 a 100, preferiblemente de 10 a 60.

El grosor de la película multicapas es típicamente de 1 nm a 50 µm, preferiblemente de 10 nm a 1 µm, y más preferiblemente de 20 nm a 800 nm.

La película multicapas puede prepararse convenientemente por técnicas LBL conocidas en la técnica, p.ej. como se describe en el documento EP 472 990 A2. Por ejemplo, es posible revestir una superficie con disoluciones, en particular disoluciones acuosas, de policationes y polianiones de una manera alternante, y secar cada capa antes de que se aplique la siguiente capa. Este método es aplicable también para el material compuesto de polielectrolito, en donde partículas de metal o partículas de sal metálica están incrustadas en una matriz de polielectrolito. Pueden usarse cualesquiera métodos de revestimiento conocidos, incluyendo disoluciones de inmersión o pulverización, particularmente disoluciones acuosas, de los polielectrolitos, que también pueden contener algunas sales (NaCl por ejemplo), bien conocidas por la técnica, para afectar al modo de deposición de los polielectrolitos. Se prefieren concentraciones de sales en el intervalo de 0,01 a 0,2 M.

El experto apreciará que, mediante el método de deposición capa a capa, es posible ajustar la velocidad de lixiviación de iones metálicos, tales como iones Ag^+, variando el número de las bicapas depositadas que controlan el número total de las partículas de metal y/o sales metálicas incrustadas/dispersadas dentro de la película multicapas.

Las películas multicapas según el quinto aspecto de la invención pueden contener polielectrolitos lineales, ramificados o hiperramificados definidos anteriormente, incluyendo mezclas de los mismos. De manera general, contienen polielectrolitos ramificados o hiperramificados.

Revestimientos de superficies

Como aspecto adicional, la presente invención proporciona un sustrato que lleva cualquier material compuesto de polielectrolito sobre una superficie del mismo como revestimiento de superficies.

La superficie puede ser provista con un material orgánico o inorgánico. Los ejemplos de material orgánico incluyen plásticos. Los ejemplos de sustratos inorgánicos incluyen vidrio, p.ej. vidrio de borosilicato, metales, p.ej. aluminio, cobre, titanio, cinc, oro, hierro, acero, aluminio, manganeso o acero inoxidable y acero revestido. Las superficies adecuadas de sustratos inorgánicos pueden comprender óxidos metálicos tales como TiO_2, Al_2O_3, Fe_2O_3, Fe_3O_4, Gd_2O_3, ZnO, Cr_2O_3, SiO_2 o iones de metales de transición tales como hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio, magnesio y aleaciones metálicas. Preferiblemente, la superficie está formada por un metal o vidrio, y más preferiblemente por acero inoxidable (abreviado como "SS" en la presente memoria) o vidrio.

Pueden revestirse diversos sustratos rígidos o flexibles sin limitaciones particulares, p.ej. dispositivos médicos, elementos decorativos, colectores solares, películas agrícolas, superficies catalíticas, etc.

Convenientemente, el revestimiento de superficies de un material compuesto de polielectrolito según la invención puede producirse revistiendo la superficie con una disolución del material compuesto de polielectrolito, particularmente una disolución acuosa, y secando la disolución para formar una película. Se prefieren particularmente disolventes que comprendan 50% en volumen o más de agua, y se prefiere particularmente agua como disolvente. Tal disolución puede ser revestida sobre una superficie con técnicas de revestimiento bien conocidas, tales como inmersión o pulverización y una etapa de secado posterior para dar una película que se adhiere de manera estable a la superficie. Debe entenderse que cualquier referencia a disoluciones acuosas en la presente memoria está dirigida preferiblemente a disoluciones que usan sólo agua como disolvente. Sin embargo, las disoluciones que contienen una cantidad predominante (es decir, más que 50% en peso) de agua junto con disolventes orgánicos también están abarcadas por este término. Las disoluciones acuosas de los polielectrolitos también pueden contener algunas sales (NaCl por ejemplo), bien conocidas por la técnica, para afectar al modo de deposición de los polielectrolitos. Se prefieren concentraciones de sales en el intervalo de 0,01 a 0,2 M. Las películas multicapas pueden prepararse directamente sobre la superficie a ser revestida de una manera similar, es decir, revistiendo secuencialmente capas unas por encima de otras hasta que se consiga el número deseado de capas.

Típicamente, la concentración de las disoluciones del copolímero de polielectrolito o material compuesto de polielectrolito varía de 0,001% en peso a 40% en peso, preferiblemente de 0,01 a 20% en peso, más preferiblemente de 0,05 a 15% en peso.

Es particularmente ventajoso que los materiales compuestos de polielectrolito y las películas multicapas de acuerdo con la invención se adhieran de manera estable a superficies sobre las que son revestidas sin que se requiera ningún pretratamiento modificador de la superficie. En particular, no se requiere ningún tratamiento que tenga como objetivo la producción de una carga electrostática, ya que se conocen métodos de revestimiento de superficies de la técnica anterior, tales como una modificación química de la superficie, tratamiento de corona, o tratamiento con ácidos. La limpieza de la superficie, p.ej. con un disolvente orgánico tal como acetona, éter o hexano, o con una disolución tensioactiva, no se considera como tratamiento modificador en este contexto. Además, el copolímero de polielectrolito, el material compuesto de polielectrolito y la película multicapas de acuerdo con la invención se adhieren de manera estable a superficies en contacto directo con los mismos, es decir, sin necesidad de una capa de imprimador de un material diferente.

Como se mencionó anteriormente, las películas del material compuesto de polielectrolito o las películas multicapas de acuerdo con la invención pueden ser co-depositadas sobre la superficie de un sustrato junto con un iniciador de radicales para permitir que tenga lugar una reacción de reticulación entre las cadenas del copolímero de polielectrolito según la invención. Como resultado, la durabilidad de las películas depositadas puede ser aumentada incluso más, y/o las películas pueden ser inmovilizadas permanentemente sobre la superficie. Por ejemplo, puede codepositarse un iniciador de radicales libres térmico soluble en agua con el polielectrolito según la invención durante la formación de una película o una película multicapas, respectivamente. La película (multicapas) final puede ser reticulada después calentando el sustrato hasta una temperatura que permita la activación térmica del iniciador de radicales libres. También pueden usarse fotoiniciadores solubles en agua en lugar de los iniciadores térmicos, y codepositarse con los polielectrolitos durante la formación de la película (multicapas). La reticulación de la película (multicapas) puede conseguirse mediante su fotoirradiación a la longitud de onda apropiada, que depende del fotoiniciador usado. Los fotoiniciadores son todos fotoiniciadores bien conocidos. Se preferirían fotoiniciadores solubles en agua. Son algunos ejemplos la sal de sodio del ácido antraquinona-2-sulfónico, sales de hexafluorofosfato de triarilsulfonio, sales de hexafluoroantimoniato de triarilsulfonio o dihidrocloruro de 4,4'-bis(dimetilamino)benzofenona.

Otra estrategia para reticular el copolímero es codepositar el material compuesto de polielectrolito o una película multicapas de acuerdo con la invención que contienen grupos dihidroxifenilo en forma oxidada con moléculas multifuncionales que contienen dos o más grupos amino y/o tiol. Tales moléculas, que pueden funcionar como agentes de reticulación, pueden ser poliaminas, politioles, polímeros que llevan grupos amino y/o tiol, y biomoléculas que llevan grupos amino y/o tiol. Las poliaminas son moléculas orgánicas que llevan más que un grupo amino, preferiblemente grupos amino primarios o secundarios. Los ejemplos de poliaminas son, pero no se limitan a, *N*,*N*,*N*',*N*'-tetraquis(3-aminopropil)-1,4-butanodiamina, bis(hexametilen)triamina, etilendiamina, diaminopropano, diaminobutano, hexametilendiamina, dietilentriamina, trietilentetramina, 4,4'-diaminodifenilmetano, etc. Los politioles son moléculas orgánicas que llevan más que un grupo tiol. Son ejemplos de politioles, pero no se limitan a, tetraquis(2-mercaptoacetato) de pentaeritritol, tetraquis(3-mercaptopropionato) de pentaeritritol, etc. Los polímeros que llevan grupos amino pueden ser polímeros de diversas estructuras (homopolímeros, copolímeros aleatorios, estadísticos, de gradiente, de injerto, de bloques, (hiper)ramificados, dendrímeros) que llevan grupos amino primarios o secundarios en los extremos de cadena de los polímeros y/o a lo largo de la cadena principal del polímero como grupos laterales y que pueden prepararse por cualesquiera métodos de síntesis existentes conocidos. Los ejemplos de poliaminas son poli(etilenimina), poli(alilamina), poli(metacrilato de 2-aminoetilo), chitosán, etc. Los ejemplos de polímeros que llevan grupos tiol son todos los polímeros de diversas estructuras (homopolímeros, copolímeros aleatorios, estadísticos, de gradiente, de injerto, de bloques, (hiper)ramificados, dendrímeros) que llevan grupos tiol en los extremos de cadena de los polímeros y/o a lo largo de la cadena principal del polímero como grupos laterales y que pueden prepararse por cualesquiera métodos de síntesis existentes conocidos. Son ejemplos, pero no se limitan a, policisteína, polietilenglicol de forma de estrella terminado por grupos tiol, etc.

En una realización, el revestimiento de superficies según la invención puede aplicarse a dispositivos médicos, tales como prótesis, como sustrato. En particular, en los casos donde se desean características antibacterianas y antimicrobianas, el material compuesto de polielectrolito de la invención que contiene partículas de plata metálica y/o partículas de sal metálica puede ser aplicado ventajosamente como revestimiento de superficies duradero que proporciona tales características de manera estable durante extensos periodos de tiempo. En otros casos donde se desean características antibacterianas y antimicrobianas, el material compuesto de polielectrolito de la tercera o cuarta realización de la invención que contiene las biomoléculas, opcionalmente junto con partículas de plata metálica y/o partículas de sal de plata, puede aplicarse ventajosamente como revestimiento de superficies duradero que proporciona tales características de manera estable a lo largo de extensos periodos de tiempo.

A fin de mejorar la durabilidad de la función antimicrobiana/antibacteriana, el material compuesto de polielectrolito de la segunda o cuarta realización o la película multicapas que comprende tal material compuesto de polielectrolito puede ser reactivado con un metal activo, tal como plata. La reactivación puede llevarse a cabo de una manera muy conveniente poniendo en contacto simplemente la superficie revestida con iones del metal en consideración, p.ej.

una disolución que contiene el metal en forma catiónica. Por ejemplo, la superficie revestida puede ser sumergida en una disolución de sal metálica, tal como una disolución de cationes de plata, opcionalmente seguido de un lavado con agua o un disolvente. Como se entenderá, este proceso de reactivación funciona particularmente bien si el material compuesto de polielectrolito puesto en contacto con los iones metálicos contiene aniones (p.ej. como contraiones para las unidades (B1)) que precipitan partículas de sal metálica. Como se describe en detalle en el contexto de la segunda realización según la invención, una combinación particularmente adecuada es el uso de unidades (B1) que contienen un anión haluro, tal como cloruro o bromuro, junto con cationes de plata, que precipitan como haluros de plata tras el contacto con los iones haluro en el copolímero de polielectrolito. Este proceso de reactivación puede llevarse a cabo una vez o varias veces.

En otra realización, puede usarse un revestimiento de superficies del copolímero de polielectrolito según la invención como capa de anclaje para un revestimiento orgánico, p.ej. sobre un sustrato orgánico o inorgánico. Tales revestimientos de superficie pueden ser un revestimiento de poliuretano, revestimiento de melamina, resinas epóxido, una pintura. Para esta realización, es ventajoso que se forme una película sobre el sustrato a ser revestido que comprenda un copolímero de polielectrolito que contenga unidades (C), unidades (C) que lleven grupos reactivos con el revestimiento orgánico a ser anclado.

En aún una realización adicional, el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención puede usarse como un pegamento eficaz o como un adhesivo para diversos sustratos. Son ejemplos de sustratos diversos sustratos orgánicos o inorgánicos. Son ejemplos sustratos metálicos, sustratos de óxidos metálicos, vidrio, plásticos, tejidos, madera y otros materiales celulósicos o papel. Son ejemplos de plásticos todos los plásticos orgánicos conocidos, tales como polipropileno, polietileno, policarbonato, poli(cloruro de vinilo), copolímeros de etileno-acetato de vinilo, poliuretanos, poliestireno o poli(metacrilato de metilo).

Para esta aplicación, se deposita una disolución del copolímero de polielectrolito sobre un sustrato y se coloca por encima el segundo sustrato. Ventajosamente, puede usarse una disolución acuosa del copolímero de polielectrolito. Antes de la deposición del segundo sustrato, la disolución del polielectrolito podría ser secada parcialmente o totalmente sobre el primer sustrato. Es de entender que el primer y el segundo sustrato pueden ser materiales idénticos o diferentes.

Según aún una realización adicional, el copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención puede usarse como estabilizador eficaz para nanopartículas inorgánicas en medios líquidos, en particular medios acuosos. Las nanopartículas inorgánicas son todas nanopartículas inorgánicas conocidas, tales como partículas de SiO_2, TiO_2, Fe_2O_3, Fe_3O_4, Gd_2O_3, Au, Ag, AgCl, AgBr, ZnO, Al_2O_3, Pt o Pd. En este contexto, las nanopartículas son partículas que tienen un tamaño dentro del intervalo de 1 a 1.000 nm, preferiblemente 1 a 500 o 1 a 300 nm.

Para esta aplicación, el copolímero de polielectrolito puede añadirse a una disolución (o dispersión) de las nanopartículas inorgánicas, p.ej. una disolución o dispersión acuosa, o puede añadirse durante la síntesis de las nanopartículas a fin de estabilizarlas tan pronto como se formen.

El medio líquido, p.ej. una disolución acuosa, que contiene las nanopartículas estabilizadas según la invención, puede ser depositado sobre diferentes sustratos a fin de funcionalizarlos con las nanopartículas. Pueden usarse métodos convencionales tales como pulverización o inmersión para la deposición de la disolución.

Como se indicó anteriormente, la forma oxidada del copolímero de polielectrolito del material compuesto de la invención en donde una parte de o todos los grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito han sido oxidados a su forma quinona, puede usarse para el injerto de biomoléculas que lleven grupos amino y/o tiol.

Para esta aplicación, puede añadirse una disolución acuosa de las biomoléculas a la disolución acuosa del copolímero de polielectrolito en su forma oxidada (parcial o total) a fin de injertar covalentemente las biomoléculas al copolímero de polielectrolito. El medio líquido, p.ej. una disolución acuosa, que contiene las biomoléculas injertadas al copolímero de polielectrolito según la invención, puede ser depositado sobre diferentes sustratos a fin de funcionalizarlos con las biomoléculas. Pueden usarse métodos convencionales tales como pulverización o inmersión para la deposición de la disolución.

También puede formarse una película de material compuesto de polielectrolito multicapas. De manera general, en películas de polielectrolito multicapas, las capas de polielectrolito se colocan unas encima de otras, que llevan el mismo tipo de carga (es decir, catiónica o aniónica) dentro de una capa, pero que alternan en su carga de una capa a la siguiente. Tales películas pueden prepararse convenientemente por medio de una construcción de películas capa a capa" (LBL).

Se entenderá que cualquier referencia a la carga de un polielectrolito o una capa de polielectrolito en la presente memoria describe la carga de los grupos iónicos (catiónicos o aniónicos) unidos covalentemente en el polielectrolito en consideración. En la película de material compuesto de polielectrolito multicapas según la invención, cada capa puede formarse por deposición sucesiva de disoluciones de polielectrolitos que contienen nanopartículas inorgánicas que alternan en su carga de una capa a la siguiente. También pueden formarse películas de material compuesto de polielectrolito multicapas que contienen diferentes tipos de nanopartículas inorgánicas.

Ejemplos

La presente invención será ilustrada adicionalmente por referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Materiales

Se secaron cloruro de metacriloilo (Aldrich) y trietilamina (Aldrich) sobre hidruro de calcio y se destilaron a presión reducida. Se usaron 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (DOPA) (Aldrich, 99%), cloruro de tionilo (Aldrich, 99 %), disolución de cloruro de [2-(metacriloxi)etil]trimetilamonio ($DMAEMA^+$) (Aldrich, 75% en peso en disolución en agua), poli(4-estirenosulfonato de sodio) (PSS) (Aldrich, Mw = 70.000 g/mol), dihidrocloruro de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) (V-50) (Aldrich, 97%) como se recibieron sin purificación adicional. Se llevó a reflujo cloruro de metileno (CH_2Cl_2) sobre CaH_2 y se destiló. Se secó metanol sobre tamices moleculares (3 Å). Todos los otros disolventes o productos químicos se usaron como se recibieron sin purificación adicional. Se usaron sustratos de acero inoxidable (SS) 304 2 R

Síntesis de monómeros

Hidrocloruro de éster metílico de DOPA.

El hidrocloruro de éster metílico de DOPA se sintetizó por reacción de $SOCl_2$ con DOPA en CH_3OH seco según un procedimiento descrito en la bibliografía (Patel, R. P.; Price, S. J. Org. Chem, 1965, 30, 3575).

Síntesis de éster metílico de N-metacriloil-3,4-dihidroxil-L-fenilalanina o 3-(3,4-dihidroxifenil)-2-metacrilamidopropanoato de metilo.

Se introdujo hidrocloruro de éster metílico de DOPA (9 g, 0,0363 mol), en CH_2Cl_2 seco (350 ml) en un matraz de fondo redondo de dos cuellos equipado con un embudo de goteo y un agitador magnético, y se puso en una atmósfera de nitrógeno. Después se añadió Et_3N (17,7 ml, 0,127 mol), recién destilado. Después de enfriar a 0°C, se añadió lentamente cloruro de metacriloilo (3,51 ml, 0,0363 mol), disuelto en CH_2Cl_2 (70 ml) y colocado en la ampolla bajo agitación vigorosa en atmósfera de nitrógeno. La mezcla resultante se agitó a temperatura ambiente durante 48 horas. Después de la reacción, el cloruro de trietilamonio, formado como subproducto, se eliminó por filtración y el exceso de reactivos se retiró a vacío. El producto se recuperó como un sólido pegajoso con un rendimiento de producto de 90%. ^{1}H NMR (250 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 6,8 (m, 3H, Ph), 5,7 (d, 1H, CH_2=C-), 5,3 (d, 1H, CH_2=C-), 4,75 (q, 1H, CH-NH-), 3,75 (s, 3H, $COOCH_3$), 3,05 (2H, m, CH_2-Ph), 1,95 (s, 3H, CH_3-C-). ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ (ppm) 172 ppm (1C, -NH-C=O), 168 ppm (1C, -O-C=O), 144.5 (1C, Ph-OH); 144 (1C, Ph-OH), 139 (1C, -C=CH_2), 127.5 (1 C, Ph), 121.5 (1 C, Ph), 120 (-C=CH_2-), 117 (1 C, Ph), 116 (1 C, Ph), 53.5 (1C, -CH-NH), 52 (1C, O-CH_3), 37 ppm (1C, CH_2-Ph), 18 (1C, CH_3-C=CH_2).

Métodos analíticos/Evaluación

Se realizaron espectros de ^{1}H y ^{13}C NMR (400 MHz) a 25°C o 50°C con un aparato Bruker AM 400. Se dan los desplazamientos químicos (δ en ppm) en relación a tetrametilsilano externo (TMS = 0 ppm) y se realizó la calibración usando la señal de los protones residuales del disolvente como referencia secundaria.

Las nanopartículas de Ag se observaron usando un Microscopio Electrónico de Transmisión de alta resolución (Phillips/FEI Technai 20) que funcionó a 200 kV. Para los experimentos TEM de las nanopartículas, se revistió por rotación una gota de la suspensión preparada (2.000 rpm) sobre las rejillas de Cu revestidas de carbón cubiertas por una película de formvar.

Las fases en polvo se comprobaron sistemáticamente mediante análisis de difracción de rayos *X* (XRD) usando radiación monocromática Cu Kα (l = 1,5406 Å), llevado a cabo en un difractómetro de rayos X Siemens D5000.

Las medidas de elipsometría espectroscópica (SE) se hicieron usando un elipsómetro GES-SOPRA que funcionaba en el intervalo espectral UV-visible-NIR (250-1.000 nm) con una resolución de longitud de onda de 10 nm a ángulos de incidencia de 75°. Para extraer información de los espectros de SE, tiene que construirse un modelo óptico de la estructura superficial presumida. La interpretación de los datos SE se realiza después ajustando el cos Ψ y tan Δ de la respuesta calculada del modelo óptico a los datos experimentales, usando simulación y análisis de regresión de mínimos cuadrados no lineal. El modelo óptico empleado en este documento es una estructura estratificada de capas con interfaces planas y paralelas, siendo descritas cada una de las capas por su grosor y constantes ópticas. El grosor del sustrato de acero inoxidable se fija a 1 mm para que pueda ser considerado como material masivo, y su comportamiento óptico se expresa en términos de constantes pseudoópticas. Como las constantes ópticas de la capa depositada no se conocen, se describen usando una relación de dispersión de Cauchy a fin de modelar el índice de refracción de la película orgánica. El valor A en el modelo de dispersión de Cauchy que los autores de la invención han empleado para la multicapa es igual a 1,465.

Se realizaron experimentos de absorción UV-vis de dispersiones acuosas de plata coloidal usando un espectrofotómetro Hitachi (U-3300). Los experimentos UV-vis del sustrato de acero inoxidable multicapas se registraron usando un espectrofotómetro Perkinelmer (lambda 650S), y los diferentes espectros se analizaron en

modo reflexión difusa total. La actividad antibacteriana de películas multicapas de nanocompuestos depositadas sobre sustratos de acero inoxidable contra la bacteria Gram-negativa *Escherichia Coli* (DH5α) se evaluó mediante un método de recuento de células viables. Se abrió una ampolla liofilizada de ella y el cultivo se recogió con una micropipeta y se puso en 2 ml de caldo nutriente (composición para un litro de caldo nutriente (Luria Bertani): 10 g de bactotriptona, 5 g d extracto de levadura, cloruro de sodio) que se incubó después (Incubador agitador modelo G25; Nuevo Brunswick; Scientific Co. INC; Edison, Nueva Jersey, EE.UU.) a 37°C durante una noche. Después, se pusieron 200 µl del cultivo en 100 ml de caldo nutriente y el cultivo bacteriano se incubó a 37°C durante 4 h. En esta etapa, el cultivo de *Escherichia coli* contenía aproximadamente 10^8 células/ml (absorbancia a 600 nm igual a 0,6) y se usó para el ensayo. La concentración celular de partida se determinó por el método de extensión en placa. Tras una dilución apropiada con solución salina al 0,9% esterilizada, se preparó un cultivo de aproximadamente 10^5 células/ml, y se usó para el ensayo antibacteriano. Los sustratos de acero inoxidable (SS) funcionalizados se esterilizaron por irradiación UV (1 h para cada cara) y se expusieron a la suspensión celular de *E. Coli* (15 ml, que contenían aproximadamente 10^5 células/ml). En un tiempo especificado, se añadieron 0,1 ml de cultivo bacteriano a 0,9 ml de solución salina esterilizada al 0,9% (la solución se esterilizó a 121°C durante 20 minutos), y se repitieron varias diluciones. Las bacterias supervivientes se contaron por el método de extensión en placa. A diversos tiempos de exposición, se retiraron porciones de 0,1 ml y se extendieron rápidamente sobre el agar nutriente. Después de la inoculación, se incubaron las placas a 37°C durante 24 h, y se contaron las colonias. El recuento se hizo por triplicado para cada experimento.

La actividad antibacteriana contra la *E. Coli* Gram-negativa de acero inoxidable revestido con (P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$))/[(PSS/P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$)-plata)]$_n$ se evaluó también mediante la técnica de Kirby-Bauer modificada, que consiste en medir una zona de inhibición del crecimiento bacteriano alrededor de la película (Traup, W. H.; Leonhard, B. Chemotherapy, 1994, 40, 374). La superficie plana del medio de gel de agar se inoculó con una suspensión de un cultivo de 24 h de *E. Coli* que contenía aproximadamente 10^6 células/ml, después de la dilución con una solución salina estéril. Previamente esterilizados por irradiación UV durante 2 h, se prensaron aceros inoxidables revestidos y no revestidos sobre agar con bacterias superpuestas. Se puso en contacto una placa de acero inoxidable con el medio de cultivo en un plato de Petri, que se incubó a 37°C durante 24 h. Se midió la anchura de la zona de inhibición del crecimiento bacteriano.

Ejemplo 1

Síntesis de P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) (Fig. 1)

Nota: es de entender que la estructura del polielectrolito en las Figs. 1 y 2 sirve como ilustración esquemática. Como se explicó en detalle en la parte general anterior de la memoria descriptiva, el copolímero de polielectrolito según la invención puede comprender sus unidades en orden aleatorio, y puede comprender además enlaces formados entre las cadenas del polímero que conducen a una estructura ramificada o hiperramificada.

Se solubilizó el monómero cloruro de 2-metacriloxietiltrimetilamonio (DMAEMA$^+$, 8,4 ml, 0,038 mol) (6) en agua ultrapura (75 ml) en una atmósfera de nitrógeno, y la disolución se desgasificó por burbujeo de nitrógeno durante 20 min. Al mismo tiempo, se solubilizó el iniciador V50 (91 mg, 0,000335 mol) en agua ultrapura (3 ml) en una atmósfera de nitrógeno, y se desgasificó por burbujeo de nitrógeno durante 10 min. En paralelo, se introdujo éster metílico de N-metacriloil-3,4-dihidroxil-L-fenilalanina (5) (1.8 g, 0,00675 mol), en una atmósfera de nitrógeno en un matraz acondicionado. Después, las disoluciones acuosas del cloruro de 2-metacriloxietiltrimetilamonio y del V50 se transfirieron sucesivamente con un capilar en una atmósfera de nitrógeno en el matraz de vidrio que contenía éster metílico de N-metacriloil-3,4-dihidroxil-L-fenilalanina. El reactor se calentó en un baño de aceite dotado de termostato a 55°C durante 12 horas. La mezcla resultante se dializó (porosidad de membrana 3.500 Da) contra agua durante 12 horas, seguido de liofilización. El copolímero se recuperó con un rendimiento de producto de 78% (7,8 g). La integración digital de las señales de ^{1}H NMR da una relación molar de unidades DOPA a DMAEMA$^+$ de 13% y 87% respectivamente. ^{1}H NMR (250 MHz, D_2O) δ (ppm) 6,9 (m, 3H, Ph), 4,5 (s, 2H, CH_2-OC(O)), 4,5 (s, 1H, CH-NHC(O)), 3,9 (m, 2H, $CH_2N^+(CH_3)_3$), 3,6 (s, 3H, COOC-H_3), 3,3 (s, 9H, $CH_2N^+(CH_3)_3$), 3 (s, 2H, CH_2Ph), 2 y 1 (m, 10H, unidades repetitivas de los dos monómeros).

El espectro UV-visible del copolímero (Fig. 6) muestra sólo la absorbancia característica de la función catecol no oxidada del DOPA a λ_{max} = 290 nm, con ausencia de un pico a 392 nm asociado a la quinona de DOPA.

El peso molecular del copolímero no se determinó por cromatografía de exclusión de tamaños (SEC), debido a la adhesión del copolímero a las columnas de SEC. A fin de determinar su peso molecular y demostrar su estructura (hiper)ramificada, el copolímero se estudió mediante una combinación de dispersión de luz dinámica y estática (DLS y SLS, respectivamente). Primero, se usó DLS para encontrar las condiciones de disolución a las que las macromoléculas se comportan como moléculas individuales. Resultó que 1 g/l era un intervalo de dilución apropiado, y que se necesitaba una concentración de 0,5 mol/l en NaCl para cribar las interacciones entre las cadenas. En estas condiciones, se obtuvo un radio hidrodinámico (R_h) de 48 ± 2 nm, con un índice de polidispersidad de 0,4. La distribución de tamaños fue bastante ancha, pero las medidas fueron altamente reproducibles, como lo atestigua la pequeña desviación estándar en R_h.

Después se realizó dispersión de luz estática para la determinación del radio de giro (Rg) y el peso molecular (M_w). Debido a la amplia distribución de tamaños, el ajuste de los datos tanto por ecuaciones de Zimm como de Berry condujo a valores similares de R_g y M_w: alrededor de 120 nm y 10^6 g/mol, respectivamente. Tal relación R_g/R_h alta (R_g/R_h = 2,5) es característica de arquitecturas macromoleculares ramificadas. Los copolímeros de DOPA y DMAEMA cuaternizado preparados siguiendo el método de los autores de la invención se caracterizan por tanto por un alto peso molecular (~10^6 g/mol) y una arquitectura ramificada.

Ejemplo 2

Preparación del material compuesto P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) / nanopartículas de plata (8) (Fig. 2)

A una disolución de copolímero P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) (7) (7 g/l, 14 ml, n_{DOPA} = 3 × 10^{-5} mol/l), se añadió lentamente nitrato de plata $AgNO_3$ (n = 3 × 10^{-5} mol), disuelto en una pequeña cantidad (1 ml) de agua bajo agitación vigorosa a temperatura ambiente, protegido de la luz.

Cuando se añadió $AgNO_3$ a una disolución acuosa de copolímero P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$), se observó casi instantáneamente una suspensión lechosa amarilla/marrón, correspondiente a la formación de nanopartículas de plata. Se prepararon tres materiales compuestos de plata/polímero que contenían diferentes relaciones molares de ión Ag^+ a restos DOPA, de 1/1, 0,5/1, y 0,1/1 añadiendo diferentes cantidades de nitrato de plata. Las suspensiones de material compuesto de 1/1, 0,5/1 y 0,1/1 son estables, sin precipitación durante dos días. No se observó cambio en el tamaño y en la dispersión de los coloides producidos por microscopía electrónica de transmisión (TEM) con una variación de la relación molar ($AgNO_3$/DOPA). Por ello, en el siguiente estudio, se usó la relación molar de $AgNO_3$/DOPA 1/1.

Se realizaron análisis de XRD para establecer la naturaleza de las nanopartículas de plata sintetizadas in situ y la composición global de las muestras. En primer lugar, se realizaron experimentos de XRD sobre el material compuesto copolímero de P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) / plata comparado con el patrón de difracción del copolímero no cargado con plata (completamente amorfo). La resolución de los espectros de XRD fue baja, debido a (i) la muy baja cantidad de nanopartículas de plata dentro de la matriz orgánica, y a (ii) ensanchamientos de picos, característicos de pequeñas cristalitas, lo que hizo imposible las interpretaciones. A fin de solucionar este problema, se usaron compuestos modelo para la preparación de partículas más grandes. Como los copolímeros contenían amonio cuaternario y restos DOPA (7, Fig. 1), se usaron DMAEMA$^+$ (6, Fig. 1) e hidrocloruro de éster metílico de DOPA (3, Fig. 1) por separado como modelos para la formación de partículas de plata. En primer lugar, se añadió una disolución acuosa de $AgNO_3$ (1,7 M) a una disolución del monómero de sal de amonio cuaternario (DMAEMA$^+$, 0,034 M) (6) en una relación molar 1/1 (n $AgNO_3$ = n DMAEMA$^+$ = 1,7 × 10^{-3} mol), conduciendo a la rápida formación de un precipitado gris, contrariamente a una dispersión estable amarilla-marrón en el caso del copolímero. Un análisis XRD realizado sobre el monómero DMAEMA$^+$ /polvo de $AgNO_3$ exhibió picos de difracción (A) que eran característicos del cristal cúbico del AgCl (Clorargirita, Z = 4, grupo espacial Fm-3m; Figura 3(A)). Se formó AgCl a partir de la precipitación in situ de los contraaniones cloruro de DMAEMA$^+$ por la adición lenta de $AgNO_3$ a la disolución de DMAMEA$^+$. Cuando se añadió la misma disolución acuosa de $AgNO_3$ a hidrocloruro de éster metílico de DOPA (3) (Fig. 3(B)) en una relación molar 1/1, se formó rápidamente un precipitado marrón. El análisis XRD sobre el producto recogido después de una liofilización evidenció claramente la presencia de diferentes especies de plata. De hecho, se observaron los picos característicos del cristal de AgCl en combinación con los picos característicos asociados a partículas de Ag°. Estas partículas de Ag° fueron evidenciadas por los nuevos picos de difracción, a aproximadamente 2θ = 38° y 44°, lo que corresponde a los planos de retículo 111 y 200 de Ag° metálica. Estos dos tipos de partículas de plata (AgCl y Ag°) provenían de dos mecanismos diferentes que se producen al mismo tiempo, *es decir*, la precipitación de los contraaniones cloruro asociados con el hidrocloruro de éster metílico de DOPA (3) y la reducción de $AgNO_3$ por los restos hidroquinona a partículas de Ag° (Fig. 2). A partir de este estudio comparativo, es razonable concluir que el material compuesto copolímero P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/plata contenía nanopartículas tanto de AgCl como de Ag°.

Se usó microscopía electrónica de transmisión para caracterizar el tamaño y morfología de la dispersión coloidal amarilla de plata del material compuesto P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$). Las observaciones TEM (Fig. 4 (A) y (B)) indicaron claramente la presencia de diferentes poblaciones de nanopartículas de plata. Se observaron agregados grandes (100-500 nm; Figura (A)) con una forma irregular en presencia de nanopartículas muy pequeñas y esféricas en el intervalo de 5 nm (Figura 4 (B)). Las diferentes formas y tamaños de las nanopartículas son los resultados de diferentes procesos químicos, que se producen después de la adición de la disolución de nitrato de plata a la disolución del polielectrolito. Las nanopartículas más grandes podrían ser atribuidas a la formación de nanocristalitas de AgCl insolubles, que resultan de la precipitación de contraaniones Cl^- asociados al copolímero. Por otra parte, se esperaba que las nanopartículas esféricas más pequeñas eran nanopartículas metálicas de Ag° formadas por la reducción química de $AgNO_3$ por los restos hidroquinona del DOPA del copolímero. Por comparación del tamaño de las partículas de plata formadas añadiendo $AgNO_3$ al copolímero (Figura 4 (A), (B)) o al hidrocloruro de éster metílico de DOPA 3 (Figura 4 (C)) (n $AgNO_3$ = n DOPA = 2 × 10^{-6} mol), se observaron muchos aglomerados con distribución de tamaños más ancha y más grande (hasta varios µm) en el caso del hidrocloruro de éster metílico de DOPA. A partir de esta observación, es claro que el copolímero es una plantilla eficaz para la formación *y estabilización* in situ de nanorracimos de AgCl y Ag°.

Ejemplo 4

Preparación y caracterización de sustratos de acero inoxidable con partículas de plata incrustadas en polielectrolito multicapas

Preparación de película multicapas

Los sustratos de acero inoxidable se cortaron a un tamaño de 4 cm × 4 cm para experimentos de UV-vis y elipsometría y a un tamaño de 1,5 cm × 2,5 cm para ensayos antimicrobianos. Las láminas de acero inoxidable se limpiaron y desengrasaron con heptano, metanol y acetona sin ningún otro pretratamiento drástico. Las multicapas de polielectrolito fueron construidas sobre el acero inoxidable limpiado usando una técnica de inmersión a temperatura ambiente. En una preparación de revestimiento típica, se sumergió un sustrato en una disolución acuosa del P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) (7 g/l, pH ~ 7) durante 2 min, se aclaró dos veces con agua desionizada en dos lotes diferentes durante 1 min, y después se sumergió en una disolución acuosa (7 g/l) de PSS durante 2 min, seguido de aclarado con agua y secado con una corriente de nitrógeno. Típicamente, las inmersiones se realizaron en agua pura sin ninguna adición de NaCl. Este ciclo podría ser repetido después como fuera necesario para obtener el número deseado de capas. Para plata cargada en películas multicapas, el sustrato se sumergió en una suspensión acuosa de P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) (7 g/l) que contenía nanopartículas de Ag durante 2 min a temperatura ambiente seguido de la inmersión en la disolución de PSS, usando el procedimiento descrito antes. Todas las referencias futuras a las películas finas multicapas en lo sucesivo se denotarán como (P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$))/[(PSS/P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$))]$_n$ o (P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$))/[(PSS/P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)-plata)]$_n$, donde *n* es el número de bicapas depositadas sobre el sustrato de acero inoxidable.

Después, el coloide de plata protegida con el policatión P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) (7 g/l) de funcionalidad dual se depositó sobre acero inoxidable (SS) mediante la tecnología capa a capa, a fin de dotar a la superficie de propiedades antibacterianas. La primera capa de policatión estaba constituida por P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) como promotor adhesivo, seguido de poli(sulfonato de estireno) (PSS) como polianiones. Las siguientes capas de policationes fue el material compuesto de P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) cargado con plata.

La película multicapas de polielectrolito fue construida por el método de inmersión que alterna deposición de polianiones (PSS) y policationes, detallado en la parte experimental. Las películas multicapas de polielectrolito de material compuesto se representan esquemáticamente en la Fig. 2.

Se usó espectroscopía UV-Vis en reflectividad total en lugar de modo absorbancia para monitorizar el proceso de ensamblaje capa a capa de [P(DOPA)-coP(DMAEMA$^+$)]/[(PSS/P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$))-plata]$_n$.

Los datos experimentales se convirtieron a unidades arbitrarias de absorbancia mediante una operación matemática: - log (R/R_0); donde R_0 corresponde al coeficiente de reflexión del sustrato de acero inoxidable no revestido inicial y R representa la reflexión total del sustrato revestido por una bicapa de [(PSS/P(DOPA)-co-P(DMAEMA))-plata]. La Figura 6 muestra el espectro de absorción UV-Vis de multicapas [P(DOPA)-co-P(DMAEMA)]/[(PSS/P(DOPA)-coP(DMAEMA))-plata]$_n$ (con n = 1-12) sobre acero inoxidable. A partir de esta figura, los autores de la invención observaron una absorción adicional a 225 nm que no se detectó en el espectro de absorción UV-visible de nanopartículas de plata incrustadas en P(DOPA)-co-P(DMAEMA) (figura 5). Esta absorción corresponde al anillo aromático del PSS. La absorción a 290 nm es característica de los restos DOPA. Además, a partir de la bicapa 8, la Figura 6 revela bordes de absorción claramente amplios situados a alrededor de 400 nm, que pueden ser atribuidos a nanopartículas de plata (Ag° y AgCl) incrustadas dentro de las películas y al pico de absorción de DOPA oxidado. Estas medidas de espectroscopía UV-vis evidenciaron la inserción de nanopartículas de plata dentro de las películas multicapas de polielectrolito.

También se evidenciaron películas multicapas de material compuesto exitosas porque el sustrato de acero inoxidable cambió gradualmente de transparente a opaco durante el curso de la deposición. A partir del recuadro de la figura 6, puede verse que la absorbancia de la película multicapas P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/[(PSS/P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$))-plata]$_n$ soportada en acero inoxidable a 400 nm aumentó proporcionalmente con el número de bicapas, *n.* Este aumento lineal de absorción indicó que se depositó la misma cantidad de bicapas [(PSS/P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$))-plata] en cada ciclo LbL.

La acumulación de los polielectrolitos de multicapas sobre los sustratos de acero inoxidable fue confirmada adicionalmente por los experimentos elipsométricos. Se estudiaron películas multicapas [P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/PSS]$_n$ no cargadas con plata porque los modelos teóricos usados para determinar el grosor de película son aplicables sólo a película orgánica transparente. La presencia de nanopartículas de plata dentro de la matriz afecta a las constantes ópticas, y por tanto, los modelos no son relevantes para el grosor final. La Figura 7 representa la evolución del grosor de película de una multicapa [P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)/PSS]$_n$ obtenida en agua pura y en NaCl 0,15 M por el método de inmersión alternado. En ambos casos, el procedimiento de deposición capa a capa tiene lugar de una manera lineal y reproducible hasta al menos 15 bicapas. El aumento en grosor con cada bicapa adicional sugiere deposición regular de P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$) y PSS en cada ciclo de inmersión. Se sabe que el grosor de bicapas ensambladas a partir de polielectrolitos fuertes, lo que es el caso para ambos polielectrolitos usados en este estudio, en ausencia de ninguna sal, es muy pequeño (aproximadamente 5 Å). A

partir de la Figura 7, el grosor de bicapas creció al aumentar la concentración de sal. La adición de sal reduce la repulsión electrostática mutua de las cadenas poliméricas e implica cambios en la conformación de cadena y la forma molecular de los polielectrolitos en disoluciones acuosas. Las espirales del polímero se hacen cada vez más densas, y son adsorbidas como espirales en lugar de en una conformación plana. La conformación de cadena es cambiada de una molécula extendida, similar a una barra, a una espiral aleatoria tridimensional. El grosor de capas de polielectrolito individuales es aumentado y por tanto el grosor global también.

Ejemplo 5

Actividad antibacteriana de los sustratos de acero inoxidable con material compuesto de polielectrolito multicapas con plata incrustada

La actividad antibacteriana contra la bacteria Gram-negativa *E. Coli* de películas de [P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$)]/[PSS/(P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA$^+$))-plata]$_n$ (con n = 60) con un grosor de aproximadamente 120 nm sobre una superficie de acero inoxidable (~4 cm^2) se ensayó primero determinando la anchura de la zona de inhibición alrededor de las superficies revestidas mediante el ensayo de difusión de disco (conocido también como método de Kirby-Bauer). Para los sustratos revestidos, los extremos cargados positivamente de la película permiten la interacción con las membranas celulares microbianas cargadas negativamente de la *E. Coli.* Las superficies de acero inoxidable, antes y después de un revestimiento con P(DMAEMA)]/[PSS/(P(DOPA)-co-P(DMAEMA))]$_{60}$, no inhibieron el crecimiento de *E. Coli.* Por el contrario, los [P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA)/(PSS/ P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA)-plata]$_{60}$ revestidos, colocados sobre las placas de agar inoculadas con las bacterias, mataron las bacterias por debajo y alrededor de ellos. Los autores de la invención observaron una zona de inhibición nítida (áreas claras sin crecimiento bacteriano) igual a 2,5 mm alrededor del sustrato de acero inoxidable. La zona de inhibición observada indicó que la especie biocida activa Ag$^+$, que proviene de nanopartículas de AgCl y Ag° incrustadas en la película de polielectrolito multicapas, se estaba difundiendo fuera de la película. El mecanismo biocida es debido principalmente al ión Ag$^+$ lixiviado. Las nanopartículas de AgCl y Ag° actuaron como reservorios eficaces para la liberación de iones Ag$^+$ biocidas. Las nanopartículas de AgCl proporcionan una fuente de iones plata, y para las nanopartículas de Ag°, se supone que los iones Ag$^+$ son producidos por medio de una etapa de oxidación en la superficie de las nanopartículas de plata Ag°.

La cinética de la actividad antibacteriana de sustratos revestidos con diferentes películas multicapas hacia *E. Coli* se investigó después por el método de recuento de células viables. El número de células viables en la suspensión, en contacto con el pequeño sustrato, se contó después de una incubación durante una noche por dilución de las muestras. La Figura 8 muestra una representación gráfica del log(número de supervivientes) frente al tiempo de exposición cuando se expuso la misma cantidad de *E. Coli* (10^5 células/ml de bacterias) a un sustrato no revestido, un sustrato revestido con P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA)/[(PSS/P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA)]$_{60}$ no cargado con plata y a películas que contenían diferentes cantidades de bicapas con plata incrustada: (i) sustratos de acero inoxidable revestidos con 60 bicapas (P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA)/[(PSS/P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA)-plata]$_{60}$), (ii) 45 bicapas (P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA)/[(PSS/P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA)-plata]$_{45}$) y (iii) 30 bicapas (P(DOPA)-co-P(DMAEMA)/[(PSS/P(DOPA)-co-P(DMAEMA)-plata]$_{30}$). A partir de la Figura 8, el sustrato revestido con P(DOPA)-coP(DMAEMA)/[(PSS/P(DOPA)-*co*-P(DMAEMA)]$_{60}$ fue más eficaz que el sustrato inicial no revestido, lo que puede explicarse por la presencia de sales de amonio cuaternario bacteriostáticas de los restos DMAEMA$^+$. Como muestra la Figura 8, los sustratos revestidos con películas multicapas con plata inmovilizada poseían una actividad antibacteriana muy potenciada en comparación con el revestimiento no cargado con plata. Esta actividad antibacteriana potenciada demostró que la liberación de Ag$^+$ fue la responsable de las propiedades antimicrobianas.

Mediante el método de deposición capa a capa, es posible ajustar fácilmente la velocidad de lixiviación del ión Ag$^+$ variando el número de las bicapas depositadas que controlan el número total de las partículas de plata dispersadas dentro del revestimiento nanohíbrido. El sustrato funcionalizado por plata cargada en 60 bicapas fue capaz de matar las células bacterianas en 120 min de contacto. Esta actividad antimicrobiana fue más alta comparado con las películas formadas con 45 y 30 bicapas, lo que podía explicarse fácilmente por las cantidades más bajas de de nanopartículas de plata incrustadas.

Después de un tiempo dado, la totalidad del bactericida dentro del revestimiento será liberado. De hecho, después de un primer uso, la película multicapas fue menos activa que el sustrato funcional inicial (Figura 10). Después del agotamiento total de la plata incrustada, los revestimientos conservarán una actividad antibacteriana residual debido a las sales de amonio cuaternario inmovilizadas dentro del copolímero. A fin de mejorar la durabilidad de la funcionalidad, el sustrato fue reactivado con plata biocida sumergiendo el sustrato en una disolución de nitrato de plata 0,1 M durante una hora, seguido de lavado con agua desionizada a fin de retirar el exceso de Ag$^+$. La Figura 9 muestra claramente que el sustrato reactivado implicó una alta actividad antimicrobiana, comparable a la de la obtenida para el sustrato inicial.

Ejemplo 6

Síntesis de P(DOPA)-co-P(MAA)

Se solubilizó ácido metacrílico (MAA, 2,76 g, 0,032 mol) (6) en agua ultrapura (40 ml) y se ajustó el pH a ~ 8,5 mediante la adición de Na_2CO_3. Después se desgasificó la disolución burbujeando nitrógeno durante 20 min, y después se añadió a un matraz que contenía éster metílico de N-metacriloil-3,4-dihidroxil-L-fenilalanina (5) (2 g, 0,0071 mol) en atmósfera de nitrógeno. Una disolución del iniciador, 4,4'-azobis(ácido 4-cianopentanoico) (V501 (Wako Chemicals), 46,7 mg, 1,66 10^{-4} mol) en disolución en agua a pH ~ 8,5 (ajustado mediante la adición de Na_2CO_3) se desgasificó burbujeando nitrógeno durante 10 min antes de ser añadida a la mezcla de monómeros en atmósfera de nitrógeno. Después se calentó la mezcla a 65°C en atmósfera de nitrógeno y se agitó durante 24 h. Después se dializó la mezcla contra agua y se liofilizó el producto. El copolímero se recuperó con un rendimiento de producto de 63 % (3 g). La integración digital de las señales de ^1H NMR da la composición del copolímero: 13% de unidades DOPA y 83 de unidades MAA.

Ejemplo 7

Beneficio del promotor de adhesión P(DOPA)-co-P($DMAEMA^+$) sobre las propiedades antimicrobianas de la multicapa (PAA-nisina)5 comparado con el promotor de adhesión comercial de polietilenimina (PEI) usado como primera capa.

Se ha realizado el ensayo antimicrobiano ISO846 método C con la cepa *Bacillus subtilis* sobre multicapas de (PAA-nisina)5 construidas con P(DOPA)-co-P($DMAEMA^+$) o PEI (MW~25000, sigma-Aldrich, ref 40827-7) como primera capa. La multicapa está hecha de poli(ácido acrílico) PAA (MW = 1.800 g/mol, Sigma-Aldrich, ref. 323667) y péptido antimicrobiano nisina (Mw = 3,5 kDa, Nisaplin® de Danisco) sintetizado por Lactococcus lactis y activo contra bacterias Gram +. Se sumergieron primero cupones de acero inoxidable durante 10 min a temperatura ambiente en una disolución de P(DOPA)-co-P($DMAEMA^+$) (2 g/l) o en una disolución de PEI (2 g/l) y se aclararon dos veces un minuto con agua. Después se construyeron multicapas alternando la deposición de 5 bicapas de polielectrolitos negativo y positivo. Con ese objetivo, cupones de acero inoxidable cubiertos por una primera capa de pegamento se sumergieron 2 minutos en PAA (2 g/l, NaCl 150 mM), se aclararon dos veces con agua y después se sumergieron 2 minutos en nisina (2 g/l, tampón fosfato, pH 6) y se aclararon dos veces con agua. La Figura 10 indica claramente que el uso de promotor de adhesión basado en P(DOPA)-co-P($DMAEMA^+$) como primera capa de la multicapa (PAA-nisina)5 mejora las propiedades antimicrobianas posteriores del revestimiento lbl.

Ejemplo 8

Actividades antimicrobianas de las biomoléculas nisina, 4K-C_{16} y Trp11 incrustadas en una multicapa construida sobre acero inoxidable.

Se muestran en la figura 11 los ensayos antimicrobianos ISO22196 y ISO846 método C de varias biomoléculas antimicrobianas incrustadas en una multicapa construida sobre superficies de acero inoxidable. Las biomoléculas nisina, 4K-C_{16} (Genescript) y Trp11 (Genescript) se han usado en solitario o en combinación con polialilamina PAH (Mw = 500.000-600.000, Sigma-Aldrich) como polielectrolito positivo y PAA (Mw 1.800) como polielectrolito negativo. Se han depositado cinco bicapas sobre superficies de acero inoxidable limpias. Se ha usado P(DOPA)-co-P($DMAEMA^+$) como primera capa. La nisina es un péptido de 34 AA (Mw = 3,5 kDa) sintetizado por *Lactococcus lactis.* El 4K-C_{16} es un lipopéptido (Mw = 768 Da) constituido por 4 lisinas y una cola hidrófoba C16. La tripticidina (Trp11) (Mw = 1603 Da) es un péptido de once aminoácidos rico en prolina y triptófano (KKFPWWWPFKK).

Se han realizado dos ensayos antimicrobianos ISO para asegurar una caracterización apropiada.

Primero, el ensayo ISO846C (o ensayo de difusión en agar) en el que la superficie a ser caracterizada se cubre con una fina capa de agar LB que contiene bacterias ($5,10^5$ bacterias/ml) y colorante de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio. Después de una incubación durante una noche a 37°C, las bacterias vivas aparecen rosas/púrpuras. Este ensayo puede ser cuantificado contando el número de bacterias vivas por centímetro cuadrado de sustrato.

En segundo lugar, el ensayo ISO22196 (o JISZ2801) en el que una suspensión de bacterias vivas (5.10^6 bacterias/ml LB) se incuba sobre la superficie a ser ensayada en una atmósfera húmeda durante 24 h a 37 °C. Después de 24 h de incubación, se recupera la suspensión de bacterias y se enumeran las bacterias vivas en agar de recuento en placa después de diluciones en serie adecuadas (ensayo cuantitativo).

La Figura 11A muestra que a la concentración de nisina óptima de 2 g/l, sólo son visibles 4 CFU/cm2 sobre la superficie tratada comparado con varios cientos sobre la superficie de acero inoxidable no tratada.

La Figura 11B muestra que la multicapa (P(DOPA)-co-P($DMAEMA^+$))-(PAA-4KC_{16}/PAH)5 es altamente activa contra bacterias *E. coli* gram negativas.

La Figura 11C muestra que la multicapa (P(DOPA)-co-P($DMAEMA^+$))-(PAA-Trp11/PAH)5 es altamente activa contra bacterias *E. coli* gram negativas.

Ejemplo 9

Combinación de varias biomoléculas en la multicapa de polielectrolito para una actividad antimicrobiana amplia de la película

La Fig 12 A muestra que la multicapa (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA-mezcla nisina 0,4 g/l/Trp11 4 g/l)5 es activa contra bacterias gram positivas y gram negativas.

La Fig 12 B muestra que la multicapa (P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$))-(PAA-mezcla nisina 0,4 g/l/4KC_{16} 4 g/l)5 es activa contra bacterias gram positivas y gram negativas.

Ejemplo 10

Actividad antimicrobiana y antiadhesión de multicapas gracias a la combinación de biomoléculas bactericidas y antiadhesión en la misma multicapa.

Multicapa	DO_{572} S.epi	DO_{572} Sin bacterias, sólo medio nutritivo	Absorbancia Delta
$(Mucina\text{-}Nisina)_5$	0,226	0,223	0,003
$(Mucina\text{-}Nisina)_5$-Mucina	0,317	0,209	0,108
$(Mucina\text{-}PAH)_5$	0,588	0,365	0,223
$(Mucina\text{-}PAH)_5$-Mucina	0,503	0,28	0,223
$(PAA\text{-}Nisina)_5$	0,263	0,109	0,154
$(PAA\text{-}Nisina)_5$-PAA	0,362	0,155	0,207
Acero inoxidable	0,245	0,111	0,134
Tampón en solitario DO 572 nm = 0,087			

La primera capa sobre acero inoxidable es P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) (15% en moles de DOPA)

El acero inoxidable se reviste primero con una capa del pegamento positivo: P(DOPA)-co-P(DMAEMA$^+$) (15% en moles de DOPA; véase el ejemplo 1). Después se han construido multicapas antimicrobianas y antiadhesión alternando nisina como polielectrolito positivo y mucina (Mucina de estómago porcino, Tipo III, Sigma-Aldrich, ref M1778) como polielectrolito negativo en la arquitectura multicapas. La cantidad de proteínas unidas a la superficie de las multicapas después de una incubación repetida con bacterias y lavado extensivo se mide usando un kit de ensayo de proteínas que usa ácido bicinconínico (BCA)suministrado por Pierce (ref 23227, sensibilidad 5 µg de proteína/ml si hay 40 minutos de incubación a 60°C). Con ese objetivo, se deposita un inóculo de *S. epidermitis* ATCC12228 sobre la superficie durante 2 días a 37°C, después se aclara la superficie con medio nutritivo diluido y se redeposita un inóculo fresco de *S. epidermitis* sobre la superficie durante 3 días a 37°C. Finalmente las superficies se aclaran abundantemente con agua y se cuantifican las proteínas gracias al kit BCA. La mezcla BCA se pone directamente sobre la superficie y se raspa la superficie con una punta de una manera regular. Se mide la DO572nm del volumen recogido. Se realizan controles sobre cada clase de muestra con medio nutritivo sólo (sin ninguna bacteria *S. epidermitis*) a fin de medir la contribución de la multicapa en sí y del medio nutritivo. La cantidad de proteínas que permanecen sobre la superficie después de un lavado extensivo es dada por la DO572 nm con *S. epidermitis* menos la DO572 nm *sin S. epidermitis.* Este valor, llamado absorbancia delta en esta tabla, da una idea de la propiedad de limpieza fácil de la superficie. Cuanto más bajo es el valor de absorbancia delta, más fácil es la limpieza de la superficie.

En este ejemplo, se han construido varias multicapas: (1) (Mucina + nisina)5 con nisina como última capa, (2) (Mucina + nisina)5 con mucina como última capa, (3) (Mucina + PAH)5 con PAH (MW 50.000-60.000) como última capa, (4) (Mucina + PAH)5 con mucina como última capa y comparado con multicapas con péptidos antimicrobianos sólo (5) (PAA + nisina)5 con nisina como última capa (6) (PAA + nisina)5 con PAA como última capa. Se ha depositado un inóculo de S. *epidermitis* sobre la superficie como se describió anteriormente, y la cantidad de proteínas que permanecen sobre la superficie después de una incubación repetida con *bacterias S. epidermitis* y un lavado extensivo se mide con el kit BCA. Esta tabla resalta claramente que la multicapa (mucina-nisina)5 da el mejor candidato de limpieza fácil.

Ejemplo 11

Preparación de material compuesto P(DOPA)-co-P($DMAEMA^+$)/péptido antibacteriano y actividad antibacteriana

Preparación de disoluciones:

1.- Se disolvieron 120 mg de P(DOPA)-co-P($DMAEMA^+$) (15% en moles de DOPA) en 60 ml de agua milliQ

2.- Se formaron las nanopartículas de plata añadiendo lentamente una disolución acuosa de $AgNO_3$ (11 mg en 500 µl de agua milliQ) en la disolución del copolímero en la oscuridad y con agitación vigorosa a temperatura ambiente. La suspensión final se agitó durante 2 h. Esta disolución se llama "disolución A".

3.- A 30 ml de esta disolución A se añadieron 51 mg de Trp11. El pH de la disolución se ajustó entre 8,5-9 a fin de desprotonar las aminas primarias y promover el injerto covalente del péptido sobre el polielectrolito (por la reacción de la amina primaria del péptido con grupos quinona del polielectrolito). La reacción se realizó durante dos horas a temperatura ambiente bajo agitación. La disolución se llama "disolución B".

Preparación de revestimientos:

A. Revestimiento A: revestimiento con material de polielectrolito no dializado:

1.- Se sumerge primero el acero en una disolución acuosa de P(DOPA)-co-P($DMAEMA^+$) (15% en moles de DOPA; 2 g/l) como capa de anclaje durante 2 minutos.

2.- Después la superficie se sumerge en agua pura para retirar el polímero libre.

3.- La superficie se sumerge en una disolución acuosa de poli(sulfonato de estireno) (Mn = 70.000 g/mol).

4.- La superficie se sumerge en agua para retirar el poli(sulfonato de estireno) libre.

5.- La superficie se sumerge en la disolución B.

6.- Después se repiten las etapas 2, 3, 4 y 5 hasta que se construyen 20 bicapas.

B. Revestimiento B: revestimiento con material de polielectrolito dializado:

1.- Se sumerge primero el acero en una disolución acuosa de P(DOPA)-co-P($DMAEMA^+$) (15% en moles de DOPA; 2 g/l) como capa de anclaje durante 2 minutos.

2.- Después la superficie se sumerge en agua pura para retirar el polímero libre.

3.- La superficie se sumerge en una disolución acuosa de poli(sulfonato de estireno) (Mn = 70.000 g/mol).

4.- La superficie se sumerge en agua para retirar el poli(sulfonato de estireno) libre.

5.- Antes de la deposición, la disolución B se dializa durante 24 h contra agua (membrana de diálisis de Spectra/Por con un corte de 3.500 g/mol) a fin de retirar plata y tripticidina (peso molecular = 1.577 g/mol) que no está unida covalentemente al polielectrolito. Después de la diálisis, la superficie se sumerge en la disolución dializada B.

6.- Después se repiten las etapas 2, 3, 4 y 5 hasta que se construyen 20 bicapas.

Actividad antibacteriana:

Las actividades antibacterianas de estas películas se evaluaron contra E.Coli usando el método de recuento de células viables. El número de células viables en la suspensión, en contacto con el pequeño sustrato, se contó después de una incubación durante una noche por dilución de las muestras. La Figura XX muestra una representación gráfica del log(número de supervivientes) frente al tiempo de exposición cuando se expuso la misma cantidad de *E. Coli* (10^5 células/ml de bacterias) a acero inoxidable no revestido (acero inoxidable inicial), acero inoxidable revestido con material de polielectrolito no dializado (revestimiento A) y acero inoxidable revestido con material de polielectrolito dializado (Revestimiento B).).

La siguiente figura demuestra que los revestimientos A y B son antibacterianos. De manera importante, después de la diálisis, se mantiene algo de actividad antibacteriana (véase el revestimiento B), gracias a la unión covalente de tripticidina al material de polielectrolito que evita la lixiviación del péptido antibacteriano fuera del revestimiento, y por consiguiente, la pérdida de la actividad antibacteriana. Esto es sumamente deseable para la durabilidad de la funcionalidad.

REIVINDICACIONES

1. Un material compuesto que comprende:

(i) un copolímero de polielectrolito, que comprende:

(a) un primer tipo de unidades (A) idénticas o diferentes que comprenden cada una uno o más grupos dihidroxifenilo, de tal modo que están presentes cadenas laterales a lo largo de la cadena principal del copolímero de polielectrolito que contienen al menos un grupo dihidroxifenilo cada una, en donde una parte o todos los grupos dihidroxifenilo han sido oxidados a su forma quinona; y

(b1) un segundo tipo de unidades (B1) idénticas o diferentes que comprenden cada una un resto catiónico, o

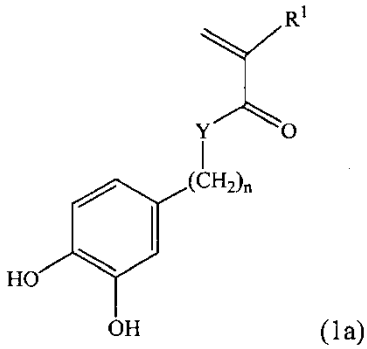
(b2) un segundo tipo de unidades (B2) idénticas o diferentes que comprenden cada una un resto aniónico.

y

y (ii) biomoléculas injertadas al copolímero de polielectrolito por medio de la reacción de un grupo dihidroxifenilo oxidado con un grupo amino o tiol presente en la biomolécula.

2. El material compuesto según la reivindicación 1, en donde

las unidades (A) resultan de la polimerización de uno o más tipos de monómeros de fórmula (1a):



(1a)

en donde R^1 es un átomo de hidrógeno o un grupo alquilo que puede ser no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes, Y es un enlazante divalente y n es un número entero seleccionado de 0 a 5.

3. El material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en donde

las unidades (B1) o (B2) resultan de la polimerización de uno o más tipos de monómeros de fórmula (6):

(6)

en donde R^3 se selecciona de hidrógeno o alquilo que puede ser no sustituido o sustituido por uno o más sustituyentes y R^4 es

(i) un grupo catiónico, o un grupo alquilo, arilo, éster o amida sustituido al menos con un grupo catiónico en el caso de la unidad (B1); o

(ii) un grupo aniónico, o un grupo alquilo, arilo, éster o amida sustituido al menos con un grupo aniónico en el caso de la unidad (B2).

4. El material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde

El copolímero de polielectrolito, que comprende además unidades (C) que resultan de la polimerización de uno o más tipos de monómeros de fórmula (7):

(7)

en donde R^5 se selecciona de hidrógeno o alquilo que puede ser no sustituido o sustituido, y R^6 se selecciona de un grupo éster; un grupo amida; un grupo amino; un grupo arilo que puede estar sustituido por un grupo polar; un grupo alquilo que puede estar sustituido por un grupo polar o por un glicósido; o un grupo heterocíclico que puede estar sustituido por un grupo polar.

5. El material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el copolímero de polielectrolito comprende moléculas de polielectrolito ramificadas o hiperramificadas en donde al menos dos cadenas poliméricas de polielectrolito están enlazadas una a otra por un enlace covalente formado por medio de un grupo dihidroxifenilo contenido dentro de la unidad (A).

6. El material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende:

(i) una forma oxidada del polielectrolito en donde parte de o todos los grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito han sido oxidados a su forma quinona;

(ii) partículas de un metal y/o partículas de una sal metálica y

(iii) biomoléculas injertadas al copolímero de polielectrolito por medio de la reacción de un grupo dihidroxifenilo oxidado con un grupo amino o tiol presente en la biomolécula.

7. Un procedimiento para la producción del material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que comprende las etapas de poner en contacto

(i) un copolímero de polielectrolito con

(iii) una disolución de una biomolécula o una mezcla de diferentes biomoléculas que contiene al menos un grupo amino o tiol para permitir el injerto químico de la(s) biomolécula(s) al copolímero de polielectrolito.

8. Un procedimiento según la reivindicación 7, que comprende la etapa de poner en contacto:

(i) un copolímero de polielectrolito con

(ii) una disolución de una sal metálica para causar la reducción in situ de los iones metálicos de la sal metálica por grupos dihidroxifenilo en el copolímero de polielectrolito para formar partículas metálicas y la precipitación in situ de una sal metálica por un intercambio iónico con los contraiones del copolímero de polielectrolito

(iii) una disolución de una biomolécula o una mezcla de diferentes biomoléculas que contiene al menos un grupo amino y/o tiol para permitir el injerto químico de la(s) biomolécula(s) al copolímero de polielectrolito.

9. Un sustrato que lleva un material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 sobre una superficie del mismo.

10. El sustrato según la reivindicación 9, en donde la superficie es una superficie metálica.

11. El sustrato según las reivindicaciones 9 o 10, que es un dispositivo médico.

12. Uso de un material compuesto según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para comunicar propiedades antimicrobianas y/o antibacterianas a un sustrato.

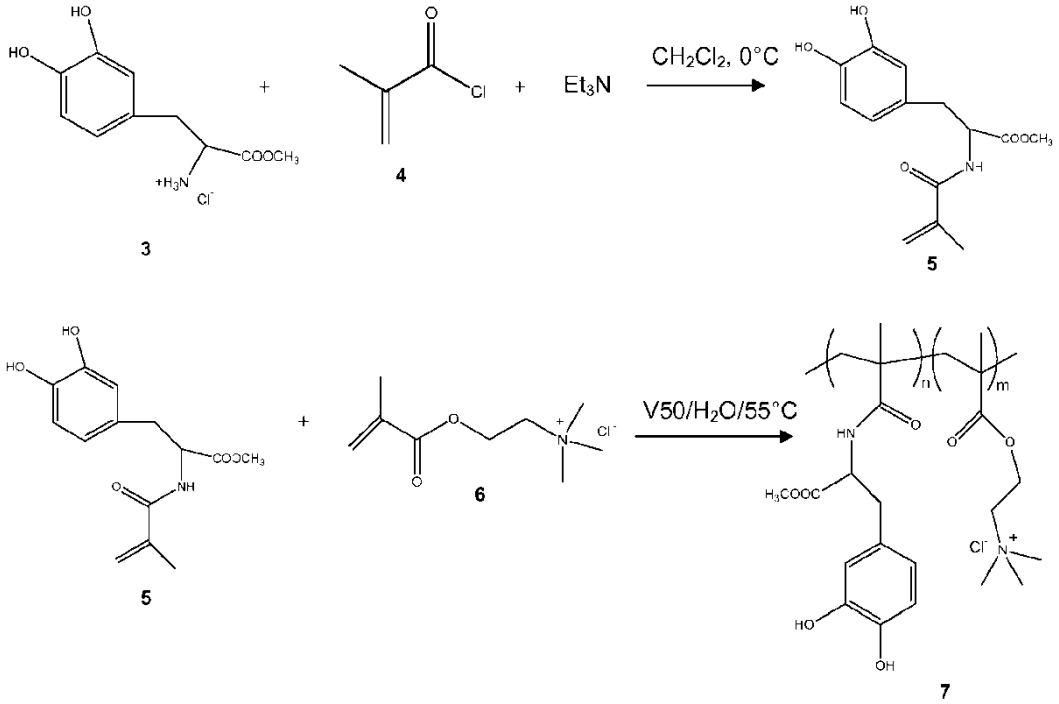

HO
HO
COOCH3
+H3N
Cl-
3
O
Cl
4
Et3N
CH2Cl2, 0°C
HO
HO
COOCH3
NH
O
5
HO
HO
COOCH3
NH
O
5
6
V50/H2O/55°C
n
m
HN
O
O
O
H3COOC
Cl-
N+
HO
OH
7

Fig. 1

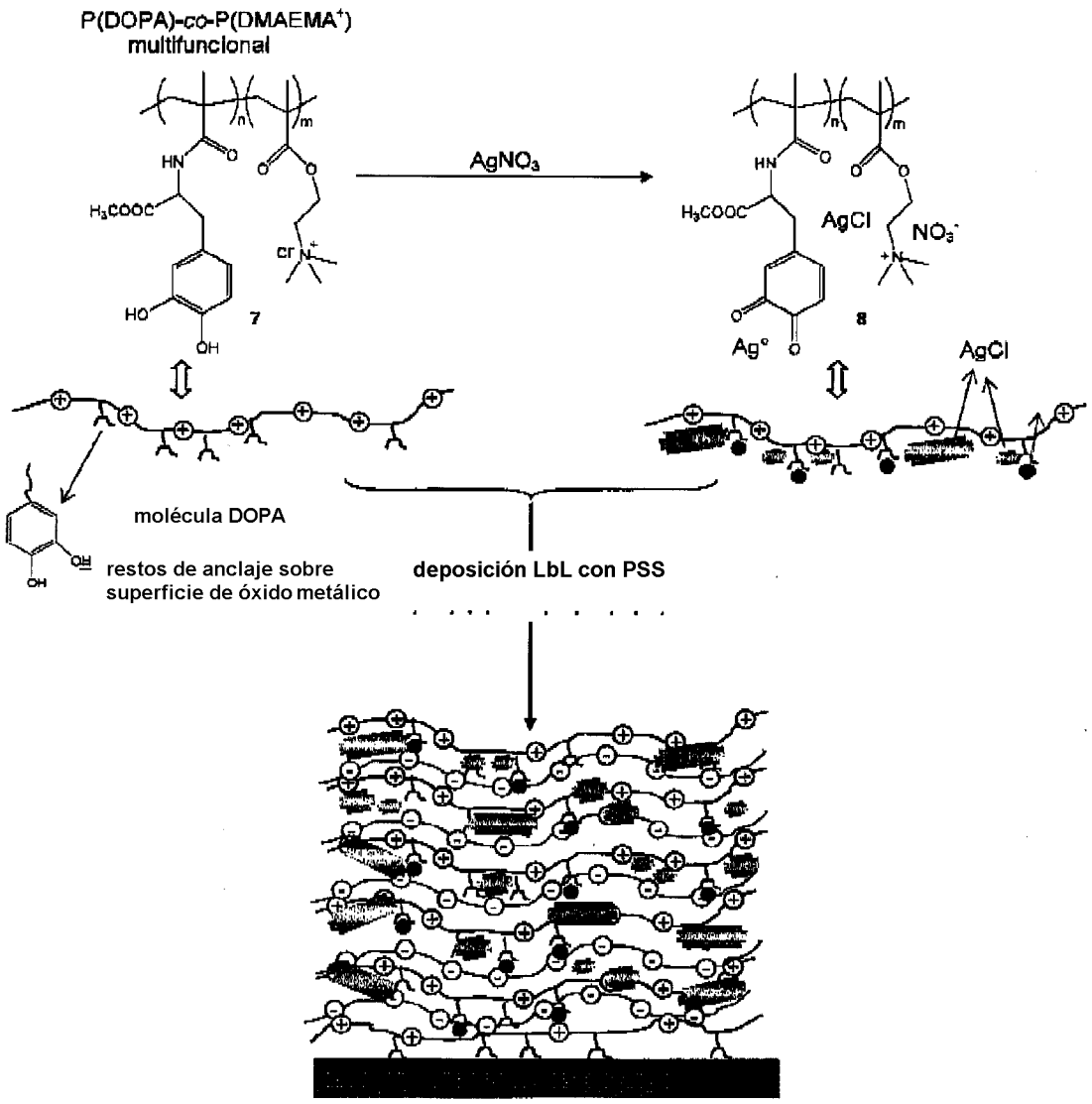

P(DOPA)-co-P(DMAEMA+)
multifuncional
AgNO3
AgCl
NO3-
Ag°
AgCl
molécula DOPA
restos de anclaje sobre
superficie de óxido metálico
deposición LbL con PSS

Fig.2

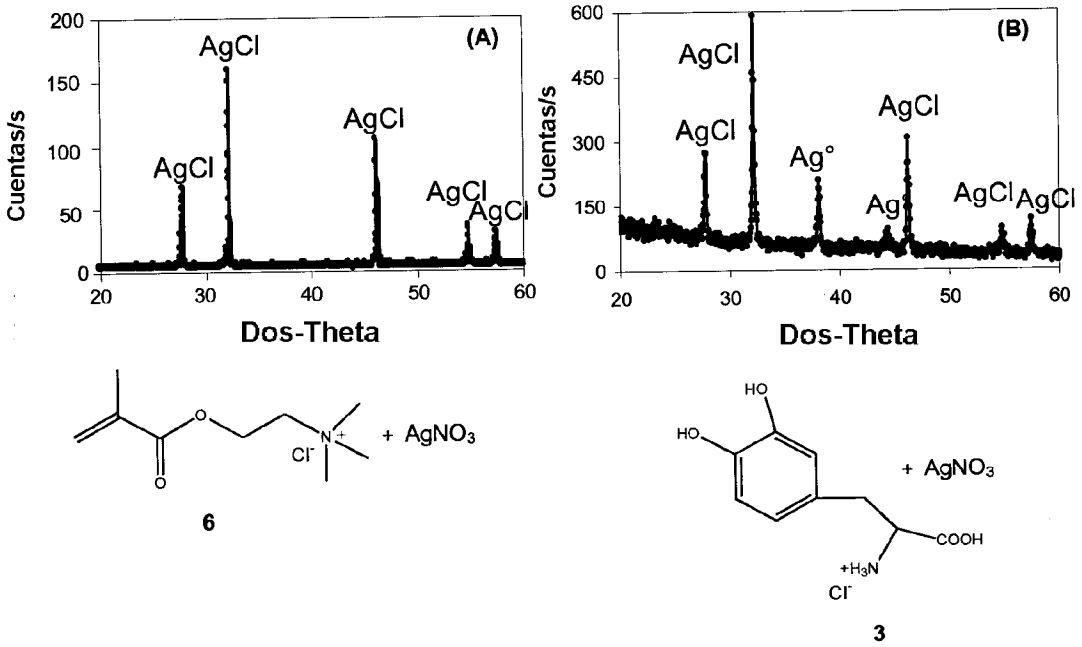

(A)
AgCl
AgCl
AgCl
AgCl
AgCl
Cuentas/s
Dos-Theta
(B)
AgCl
AgCl
Ag°
AgCl
Ag
AgCl
AgCl
Cuentas/s
Dos-Theta
+ AgNO3
6
HO
HO
+ AgNO3
COOH
+H3N
Cl-
3

Figura 3

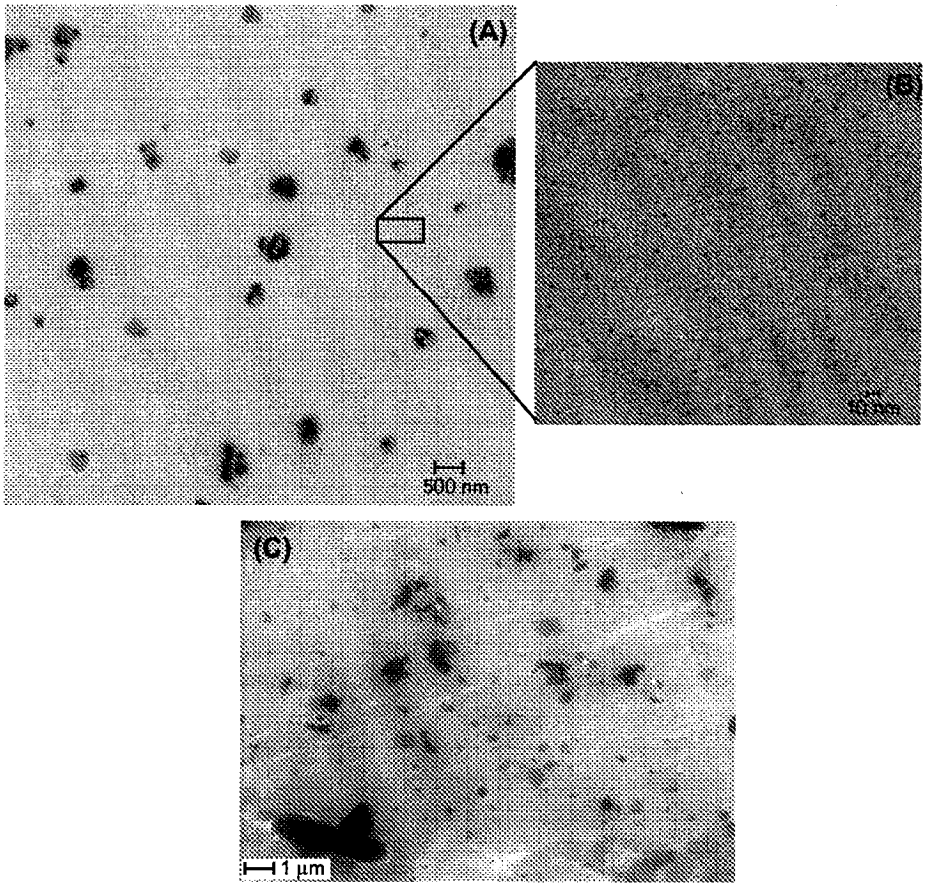


Figura 4

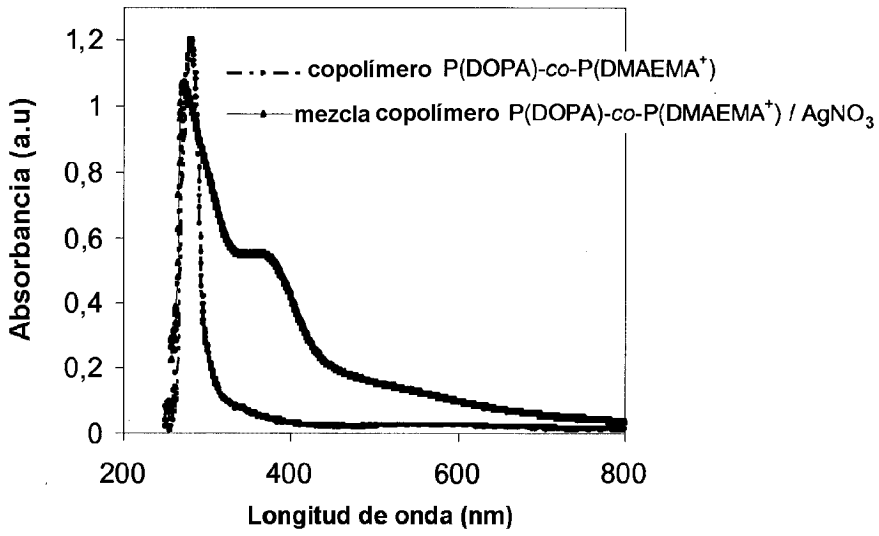


Figura 5

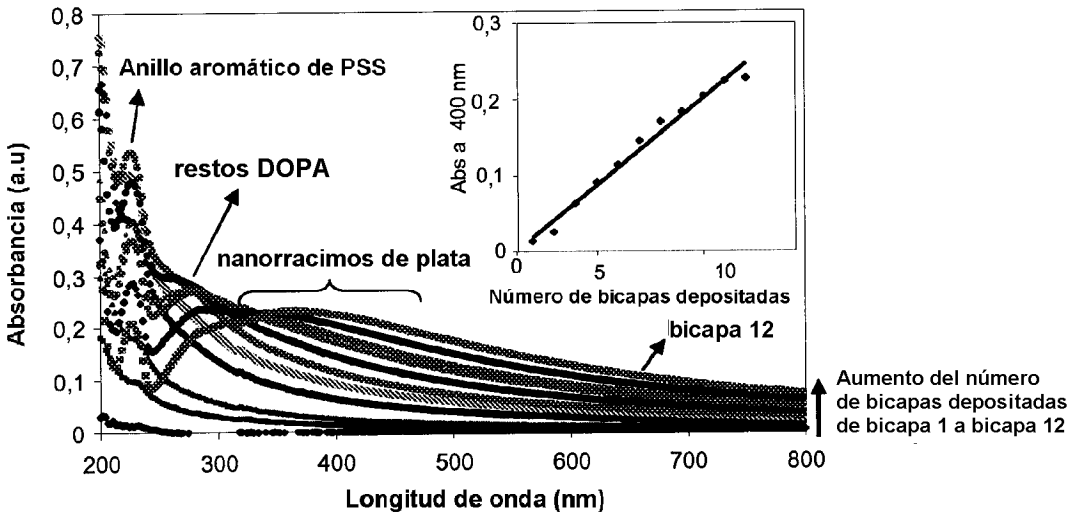


Figura 6

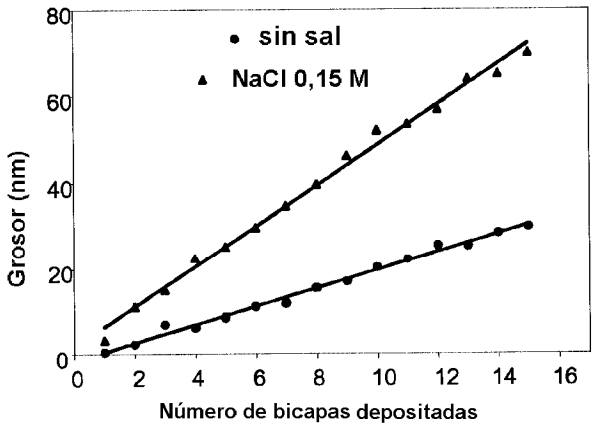


Figura 7

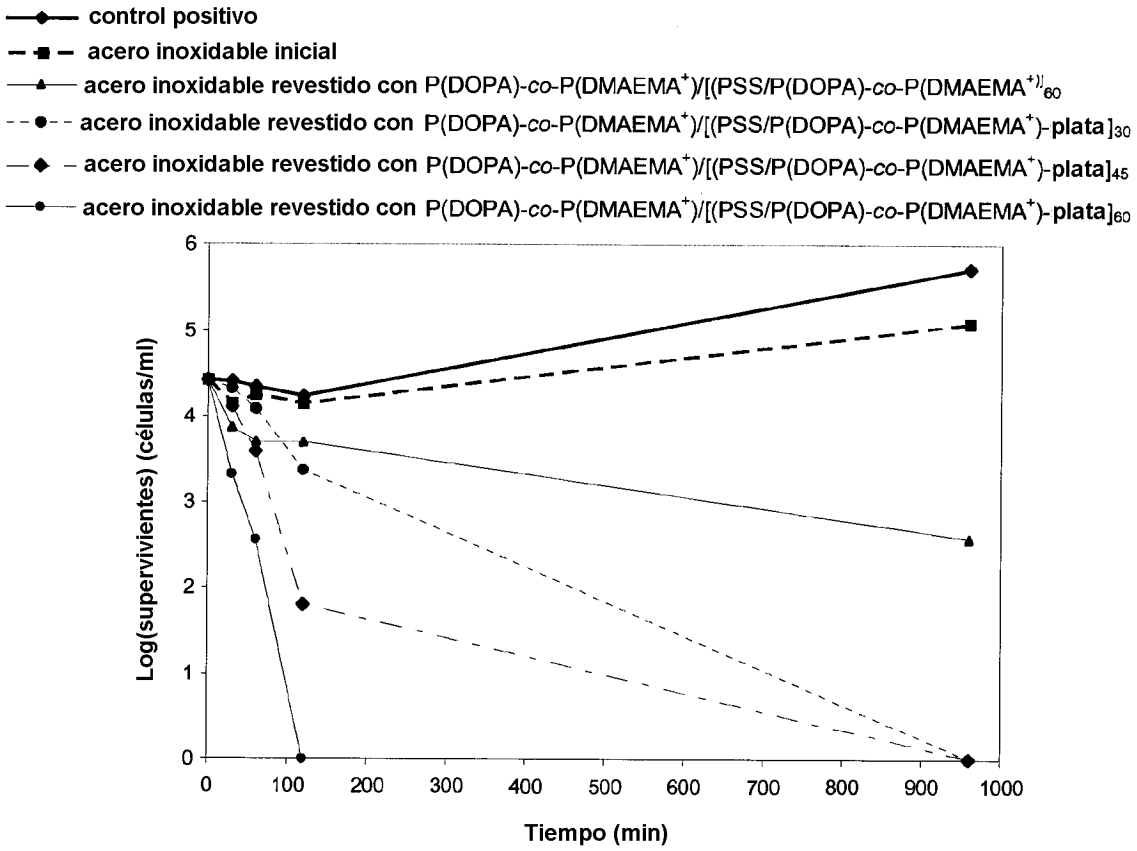

control positivo
acero inoxidable inicial
acero inoxidable revestido con P(DOPA)-co-P(DMAEMA+)/[(PSS/P(DOPA)-co-P(DMAEMA+)]60
acero inoxidable revestido con P(DOPA)-co-P(DMAEMA+)/[(PSS/P(DOPA)-co-P(DMAEMA+)-plata]30
acero inoxidable revestido con P(DOPA)-co-P(DMAEMA+)/[(PSS/P(DOPA)-co-P(DMAEMA+)-plata]45
acero inoxidable revestido con P(DOPA)-co-P(DMAEMA+)/[(PSS/P(DOPA)-co-P(DMAEMA+)-plata]60
Log(supervivientes) (células/ml)
Tiempo (min)
0
1
2
3
4
5
6
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000

Figura 8

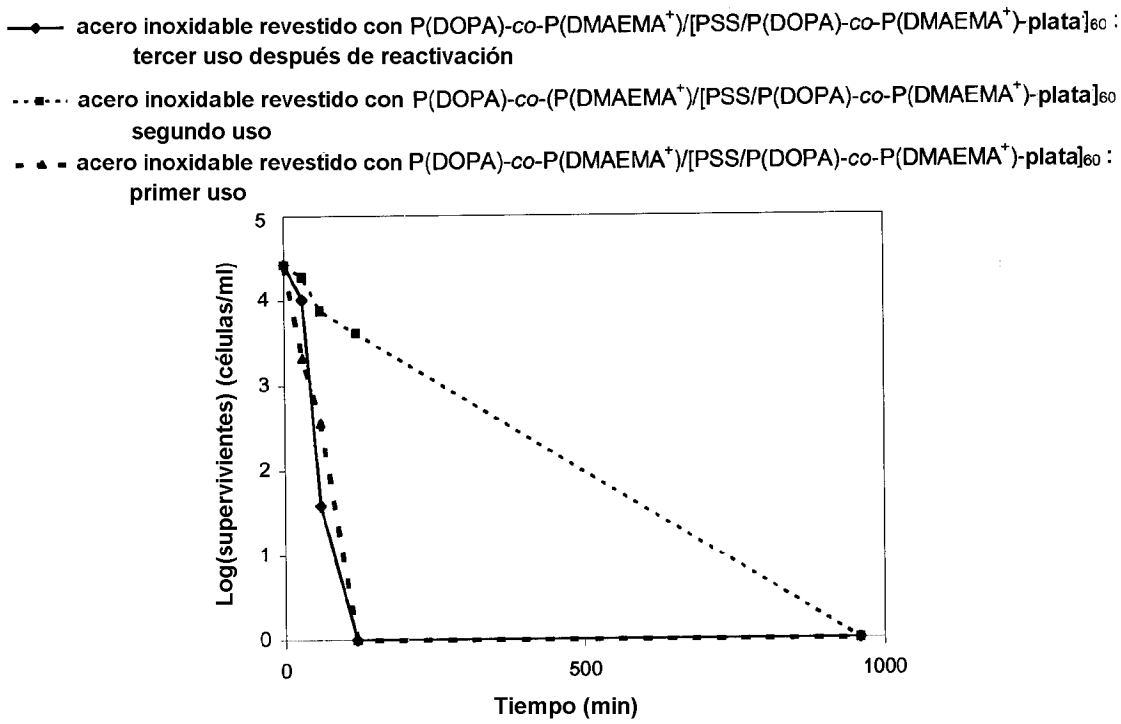


Figura 9

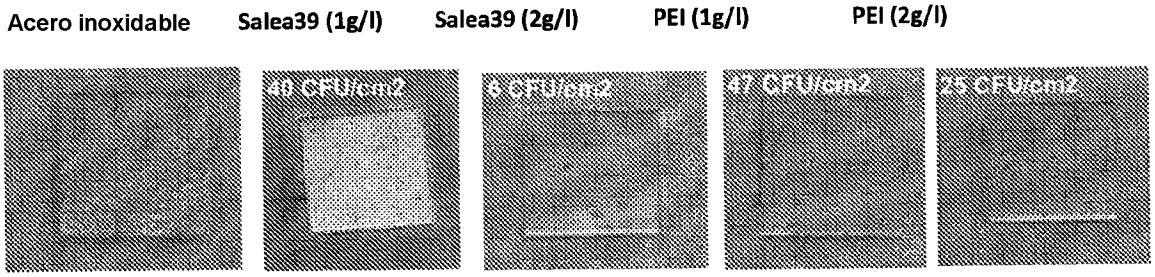


Figura 10

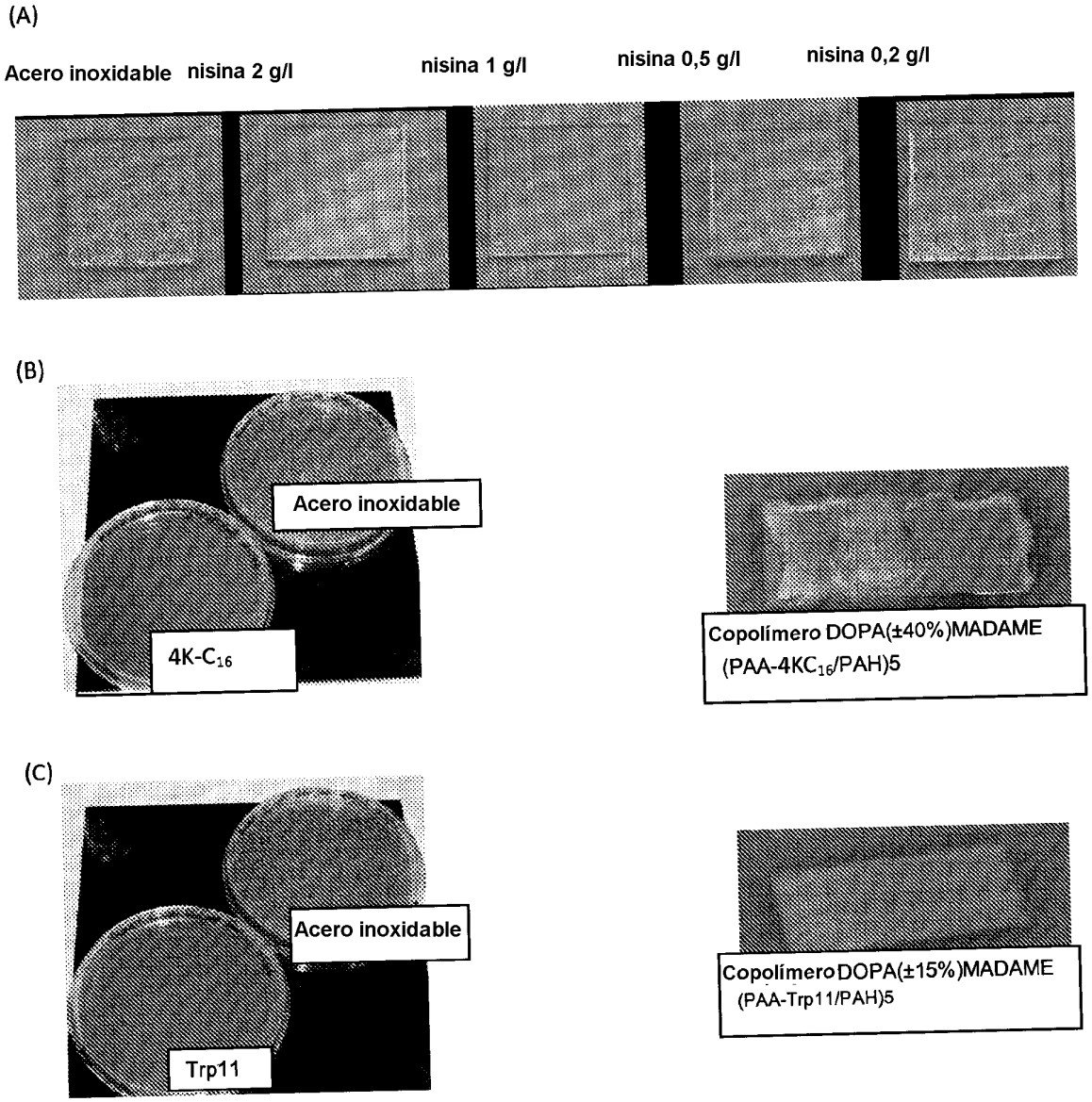
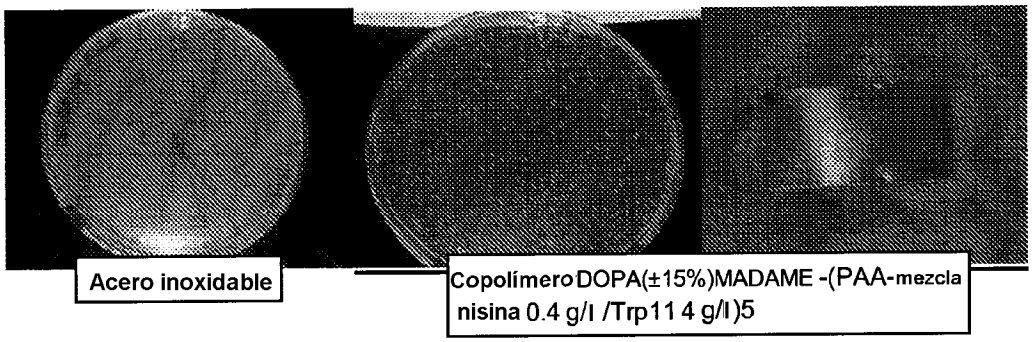
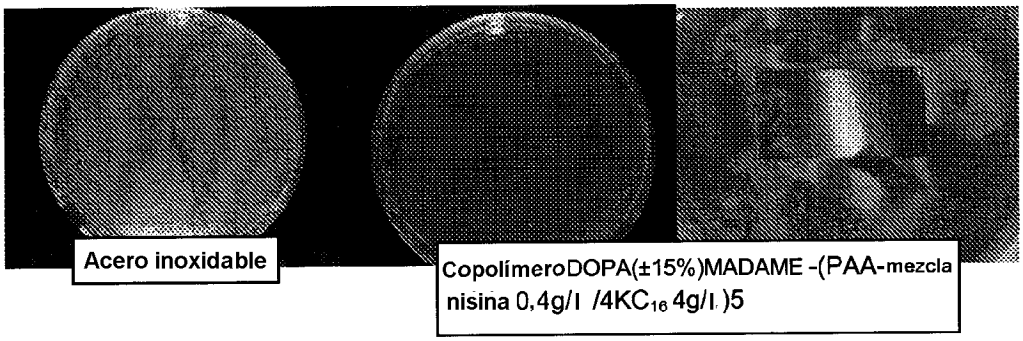

(A)
Acero inoxidable
nisina 2 g/l
nisina 1 g/l
nisina 0,5 g/l
nisina 0,2 g/l
(B)
Acero inoxidable
4K-C16
Copolímero DOPA(±40%)MADAME
(PAA-4KC16/PAH)5
(C)
Acero inoxidable
Trp11
Copolímero DOPA(±15%)MADAME
(PAA-Trp11/PAH)5

Figura 11

(A)



(B)



(C)

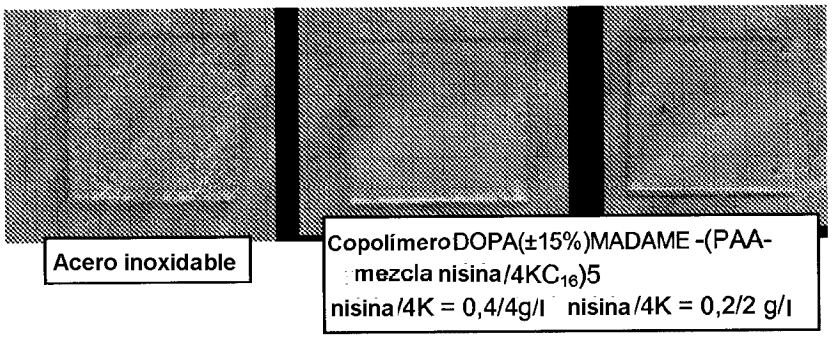


Figura 12

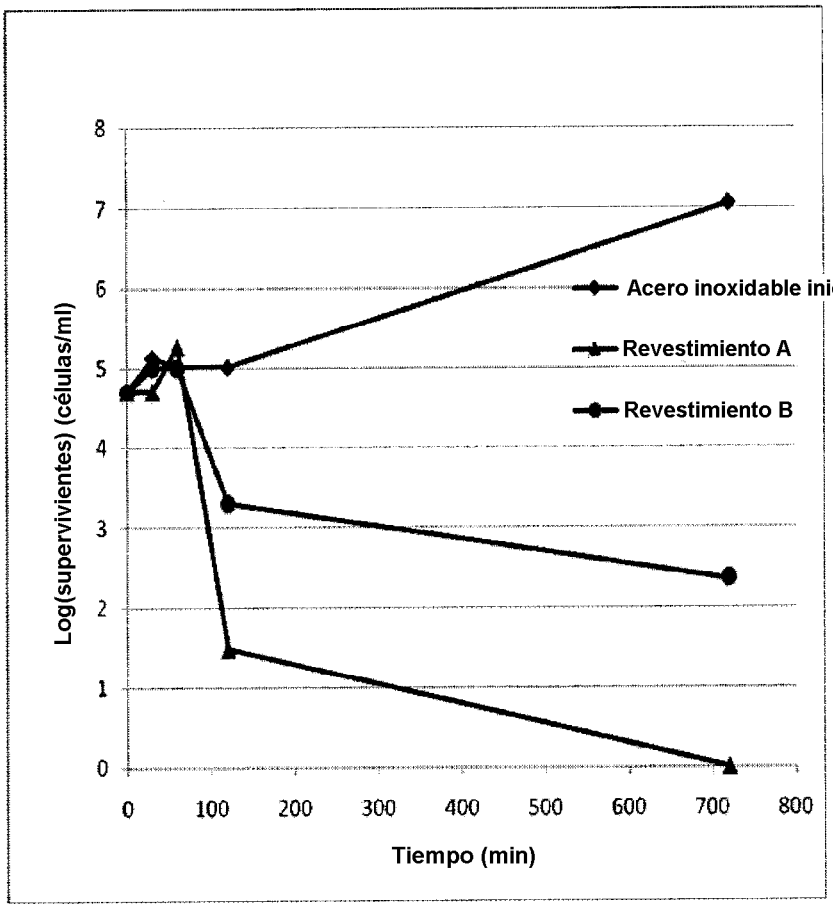

Log(supervivientes) (células/ml)
8
7
6
5
4
3
2
1
0
0
100
200
300
400
500
600
700
800
Tiempo (min)
Acero inoxidable inicial
Revestimiento A
Revestimiento B

Figura 13