

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 729 777**

51 Int. Cl.:

<b>C08J 7/00</b>	(2006.01) <b>D06M 15/03</b>	(2006.01)
<b>D06M 10/02</b>	(2006.01) <b>C07D 311/32</b>	(2006.01)
<b>B32B 27/08</b>	(2006.01) <b>C08J 7/06</b>	(2006.01)
<b>B65D 65/00</b>	(2006.01) <b>A01N 25/10</b>	(2006.01)
<b>D06M 13/10</b>	(2006.01) <b>A01N 43/16</b>	(2006.01)
<b>D06M 13/12</b>	(2006.01) <b>A23B 4/10</b>	(2006.01)
<b>C07D 311/30</b>	(2006.01) <b>C08J 7/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 8/00</b>	(2006.01)	
<b>D06M 16/00</b>	(2006.01)	
<b>C11D 9/04</b>	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.08.2013 PCT/GB2013/052217**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **27.02.2014 WO14030005**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.08.2013 E 13758964 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019 EP 2888317**

54 Título: **Materiales recubiertos con bioflavonoides**

30 Prioridad:

**24.08.2012 GB 201215171**  
**19.10.2012 GB 201218829**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**06.11.2019**

73 Titular/es:

**CITROX BIOSCIENCES LIMITED (100.0%)**  
**6 Nene Road, Bicton Estate, Kimbolton**  
**Cambridgeshire PE28 0LF, GB**

72 Inventor/es:

**THOMAS, HOWARD;**  
**DOWLING, DENIS y**  
**KATSIKOIANNI, MARIE G**

74 Agente/Representante:

**INGENIAS CREACIONES, SIGNOS E**  
**INVENCIONES, SLP**

ES 2 729 777 T3

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

Materiales recubiertos con bioflavonoides

5 La presente invención se refiere a materiales poliméricos, procedimientos de recubrimiento de materiales poliméricos y sus usos. Más particularmente, la invención se refiere a materiales poliméricos con un recubrimiento con bioflavonoides.

10 Los polímeros componen un amplio intervalo de materiales y exhiben una variedad de propiedades diferentes. Los polímeros pueden ser sintéticos, naturales o semisintéticos. Debido a sus propiedades (por ejemplo, estabilidad térmica, resistencia y aislamiento térmico), los materiales poliméricos tienen numerosos usos y son una parte fundamental de la industria y la vida cotidiana.

15 Ciertos productos poliméricos sintéticos se beneficiarían de tener propiedades antimicrobianas. Estos incluyen, por ejemplo, el envasado de alimentos y el envasado de carnes y frutos rojos en particular, dispositivos médicos tales como catéteres, máscaras faciales, tales como máscaras respiratorias, así como el intervalo de productos poliméricos utilizados en hospitales, residencias geriátricas y guarderías.

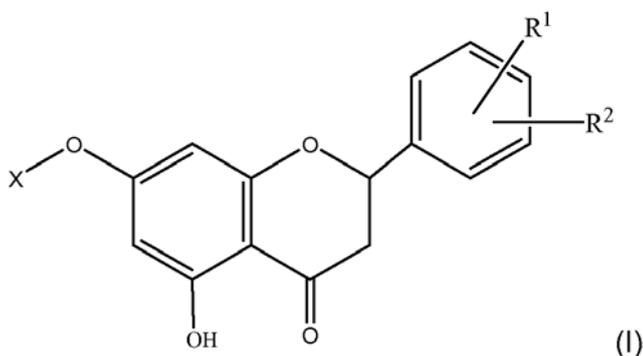
20 El documento WO 2012/017186 describe composiciones farmacéuticas que comprenden oleuropeínas y flavonoides. El documento EP 1360954 describe una loción microemulsión sin agua. El documento GB2468836 desvela composiciones que comprenden compuestos bioflavonoides. Sin embargo, el documento GB2468836 no desvela el uso de la composición de bioflavonoides en materiales poliméricos de recubrimiento. Dichos materiales no parecen atractivos para el experto en la materia para su uso en la provisión de polímeros sintéticos antibacterianos debido a que las composiciones de bioflavonoides no se adhieren con facilidad a tales polímeros. Sin embargo, se han descubierto formas de superar esta dificultad inherente.

## Sumario de la invención

30 La presente invención proporciona materiales poliméricos sintéticos que tienen un recubrimiento de bioflavonoides, comprendiendo el contenido de bioflavonoides del recubrimiento al menos naringina y neohesperidina, en el que el espesor del recubrimiento es al menos de 50 nm, preferentemente entre 700 y 1300 nm, y en el que el recubrimiento presenta actividades antimicrobianas y antioxidantes.

35 Especialmente preferido es cuando la mayor parte del contenido de bioflavonoides del recubrimiento comprende naringina y neohesperidina. Preferentemente, la naringina y la neohesperidina forman en conjunto al menos 50 % p/p, más apropiadamente al menos 70 % p/p, por ejemplo al menos 75 % p/p, por ejemplo 75 %-80 % p/p del contenido de bioflavonoides del recubrimiento (excluyendo otra biomasa).

40 El contenido de bioflavonoides del recubrimiento puede comprender además uno o más compuestos de Fórmula (I):

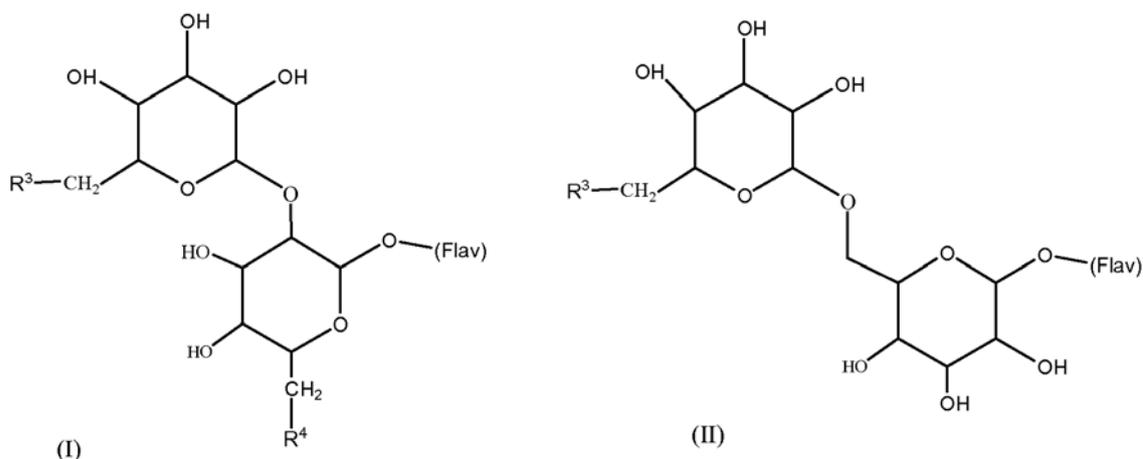


en la que R<sup>1</sup> es un hidroxilo o metoxilo y R<sup>2</sup> es hidrógeno, hidroxilo o metoxilo y X es hidrógeno o un sacárido.

45 Opcionalmente, R<sup>2</sup> es hidrógeno y R<sup>1</sup> se encuentra en la posición 3 o 4. Alternativamente, R<sup>2</sup> es 3-hidroxi y R<sup>1</sup> es 4-metoxilo. Opcionalmente, X es H. Alternativamente, X es un sacárido.

50 Preferentemente X es un disacárido. Los disacáridos adecuados incluyen combinaciones de dos monosacáridos, preferentemente piranosas, vinculadas por un enlace glicosídico, por ejemplo, ramnosa y glucosa, por ejemplo L-ramnosa y D-glucosa.

Los disacáridos adecuados pueden tener la estructura:



en la que uno de  $R^3$  y  $R^4$  es H y el otro OH o ambos son H o ambos son OH. Preferentemente,  $R^3$  es H y  $R^4$  es OH, de modo que el disacárido es rutinosa.

5 Las agliconas preferidas de los bioflavonoides para su uso en la presente invención son los disacáridos 6-O-(alfa-L-ramnopiranosil)-beta-D-glucopiranososa, también conocido como rutinosa, y 2-O-(alfa-L-ramnopiranosil)-beta-D-glucopiranososa.

10 Los compuestos adecuados de Fórmula (I) incluyen neoeriocitrina, isonaringina, hesperidina, neodiosmina, naringenina, poncirina y rufolina, además de naringina y neohesperidina. Uno de estos compuestos puede estar presente además de la naringina y la neohesperidina, aunque se prefiere particularmente una mezcla de dos o más de estos compuestos.

15 Dichas mezclas se pueden obtener por extracción de naranjas amargas y el producto final se denomina extracto de *citrus aurantium amara*. Particularmente preferidas son las mezclas de bioflavonoides obtenidas a partir del extracto de naranjas amargas inmaduras enteras trituradas. Las mezclas también se pueden derivar del material de partida compuesto por la pulpa de naranjas inmaduras, amargas (sanguinas/rojas), tales como las naranjas de Sevilla que se clasifican como "no comestibles" y a partir de las cuales se han eliminado esencialmente las semillas, la carne y la piel grasa o permanecen sin desarrollar.

20 Las mezclas adecuadas pueden incluir 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o más compuestos de Fórmula (I). Es preferible una mezcla que comprenda 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 de los bioflavonoides mencionados anteriormente, por ejemplo, que contenga 3 o que contenga 4, o que contenga 5, o que contenga 6, o que contenga 7, o que contenga 8, o que contenga 9 de dichos bioflavonoides.

30 Actualmente se cree que las mezclas de tales bioflavonoides tienen ventajas sobre el uso de un solo bioflavonoide. Es particularmente ventajoso que el extracto de naranjas amargas se emplee sin la necesidad de aislar bioflavonoides individuales. En un extracto de naranjas amargas, la biomasa puede asociarse con hasta 40-60 % p/p, preferentemente alrededor de 55 % p/p en función del peso del contenido de bioflavonoides del recubrimiento. La biomasa comprende pectinas y otros materiales derivados del azúcar. Si se desea evitar la biomasa, se pueden emplear otros agentes solubilizantes tales como dextrinas, por ejemplo ciclodextrina, si se desea.

35 Una ventaja particular de muchas composiciones descritas en la presente memoria es que pueden emplear compuestos de origen natural. Así, por ejemplo, se prefiere emplear compuestos de Fórmula (I) de naranjas amargas. Sin embargo, los compuestos obtenidos sintéticamente o semisintéticamente pueden emplearse si se desea en lugar de los extraídos directamente de fuentes naturales, aunque esto tiende a ser menos favorable en vista del costo.

40 Las composiciones de recubrimiento pueden comprender además oleuropeína. Esto se obtiene adecuadamente a partir de la extracción de la hoja de la aceituna, por ejemplo, *Olea europaea*. Dichos extractos contienen normalmente de 5 % a 80 % p/p, más adecuadamente 10 a 70 %, por ejemplo 20 % p/p de oleuropeína.

45 La relación p/p de los bioflavonoides a oleuropeína puede ser 5:1 a 1:4, más adecuadamente 2:1 a 1:2, favorablemente 1:2 a 1:1 y preferentemente 3:2. Además del contenido de bioflavonoides de la composición de recubrimiento, la composición de recubrimiento puede comprender además uno o más ácidos de frutas, por ejemplo ácido cítrico, ácido málico y ácido ascórbico. Uno o más de los ácidos están preferentemente neutralizados con una base adecuada, tal como una base de amonio cuaternario, por ejemplo una base de colina, tal como carbonato de colina, bicarbonato o, preferentemente, hidróxido. Más preferentemente, los ácidos cítrico, málico y ascórbico se utilizan en la preparación de la composición de recubrimiento, y se prefieren especialmente cuando se neutralizan

por completo para proporcionar sales de citrato, malato y/o ascorbato. Especialmente preferido es el ascorbato de colina.

5 Se ha descubierto que la composición de recubrimiento descrita en la presente memoria es particularmente eficaz en presencia de uno o más ácidos orgánicos. En una realización, la composición de recubrimiento comprende además uno o más ácidos orgánicos.

10 Un ácido orgánico sorprendentemente eficaz es el ácido salicílico o su sal farmacéuticamente aceptable, opcionalmente junto con un ácido orgánico adicional o una sal farmacéuticamente aceptable.

El ácido salicílico se puede obtener a partir de extracto de corteza de sauce. Alternativamente, los expertos en la materia conocen métodos para sintetizar ácido salicílico.

15 A veces se prefiere que el ácido salicílico esté en forma de ácido en lugar de su sal.

20 De manera similar, un ácido orgánico adicional, si está presente, se encuentra en forma similar al ácido en lugar de su sal. Otros ácidos orgánicos adecuados incluyen ácidos de hasta 8 átomos de carbono que son ácidos monobásicos (es decir, 1 grupo CO<sub>2</sub>H), dibásicos o tribásicos que contienen opcionalmente 1, 2 o 3 grupos hidroxilo. Dicho ácido orgánico adicional puede ser uno o más de ácido cítrico, ácido málico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido fumárico y similares.

Dichas composiciones pueden proporcionar un pH aproximadamente neutro o ácido, cuando se utilizan, por ejemplo, de 3 a 8, más adecuadamente de 3,5 a 7, por ejemplo de 4 a 5.

25 Actualmente, se prefiere emplear ácido salicílico y ácido cítrico en las composiciones de recubrimiento.

30 Dichas composiciones de recubrimiento pueden incluir un agente solubilizante, por ejemplo, ácido salicílico tal como una dextrina, tal como ciclodextrina. Las composiciones desveladas en el documento WO 2012/017186 (incorporadas en la presente memoria como referencia) son las composiciones de recubrimiento preferidas de la presente invención.

35 El polímero sintético puede encontrarse en forma de una película preferentemente con un espesor de al menos 20 µm. Más preferentemente, la película tiene un espesor de entre 50 y 300 µm. La película puede tener una sola capa o múltiples capas.

40 Los ejemplos de polímeros sintéticos incluyen tereftalato de polietileno (PET), poliestireno, polietileno, polipropileno, cloruro de polivinilo, poliamida, policloruro de vinilideno, alcohol polietilenvinílico, polietileno vinilo acetato, neopreno, poliuretano, nylon, látex, caucho nitrilo o silicona, por ejemplo, oblea de silicona. El polímero sintético puede ser un polímero biodegradable. Ejemplos de polímeros biodegradables son ácido poliláctico (PLA) y ácido poliglicólico (PGA). Cuando se utiliza para envasado, el polímero sintético es preferentemente PET ya que este polímero se utiliza ampliamente en el envasado de alimentos.

45 El poliestireno es un polímero aromático fabricado de monómero estireno y tiene un amplio intervalo de aplicaciones. El recubrimiento con bioflavonoides puede estar presente en la superficie de un material de poliestireno rígido o en el caso de un material de poliestireno de celdas abiertas, el recubrimiento de bioflavonoides puede distribuirse en el material de modo que esté presente en las superficies dentro de la estructura espumada o con celdas abiertas.

50 El espesor del recubrimiento con bioflavonoides sobre el material polimérico es de al menos 50 nm, preferentemente de al menos 100 nm, más preferentemente entre 700 y 1300 nm. Estos espesores de recubrimiento óptimos producen superficies que exhiben un rendimiento antimicrobiano y antioxidante durante un periodo de tiempo más prolongado después de la deposición del recubrimiento con bioflavonoides.

55 Preferentemente, el recubrimiento con bioflavonoides tiene una gran rugosidad superficial. La rugosidad superficial es la medida de la textura de una superficie y la mayoría de las veces se mide con el parámetro R<sub>a</sub>, que es el valor medio para un área de muestreo aleatorio. Se cuantifica por las desviaciones verticales de una superficie real a partir de su forma ideal. La rugosidad media de la superficie (R<sub>a</sub>) del recubrimiento con bioflavonoides es de al menos 100 nm, preferentemente entre 600 y 1500 nm, más preferentemente entre 800 y 1400 nm. El aumento de la rugosidad de la superficie produce superficies que exhiben un rendimiento antimicrobiano y antioxidante durante un periodo de tiempo más prolongado después de la aplicación del recubrimiento con bioflavonoides.

60 Se entiende que el término recubrimiento significa un recubrimiento de partículas presentes en la superficie de un material polimérico o, en el caso de un polímero con una estructura espumada o con celdas abiertas, tal como poliestireno, el recubrimiento puede producirse en superficies dentro de la estructura. El experto en la materia entenderá que el recubrimiento no necesariamente ocupará toda el área de la superficie que tiene por objeto cubrir, sino que solo puede cubrir, por ejemplo, el 80 % del área total.

65

Aunque se aprecia que, por ejemplo, solo el 80 % del área total está cubierta por el recubrimiento, se pretende que la composición del recubrimiento se distribuya de manera uniforme en toda el área superficial que se tiene por objeto cubrir para formar un recubrimiento homogéneo. El uso de una técnica de pulverización para aplicar el recubrimiento con bioflavonoides a materiales poliméricos proporciona recubrimientos con la mayor homogeneidad de superficie.

5 En una realización, la cobertura de la superficie del recubrimiento con bioflavonoides en el material polimérico es de al menos 50 %, preferentemente al menos 60 %, más preferentemente entre 70 % y 100 % del área total a cubrir.

10 En algunas realizaciones, solo una parte del área del material polimérico estará recubierta, por ejemplo, solo un componente de un dispositivo médico.

15 En otras realizaciones, solo una parte del área del material polimérico estará recubierta, por ejemplo, solo un lado de una película polimérica. La película polimérica se puede utilizar para envasar productos frescos, tales como carne, y así, en algunos casos, solo se recubrirá el lado de la película que está en contacto con el producto fresco. Otro ejemplo de recubrimiento polimérico parcial es cuando solo se recubre el interior de una bandeja de envasado, por ejemplo, una bandeja de envasado de alimentos utilizada para almacenar y exponer carne o cuando solo se recubre el interior del envasado de frutas.

20 Una variedad de diferentes factores puede hacer que los productos frescos, tales como carne, pescado, frutas y verduras se echen a perder, lo que incluye microorganismos, exposición al aire y un mal embalaje y almacenamiento. Los microorganismos transmitidos por los alimentos pueden clasificarse como microorganismos de deterioro de alimentos o que provocan intoxicación alimentaria.

25 Los microorganismos de deterioro de alimentos incluyen mohos y bacterias. En la carne, estos microorganismos son responsables de los cambios de calidad perjudiciales que pueden incluir decoloración y olores desagradables. Las bacterias de deterioro comunes incluyen *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y *Moraxella*.

30 Los microorganismos que provocan intoxicación alimentaria pueden causar problemas de salud por intoxicación o infección. Los microorganismos intoxicantes incluyen *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) y *Clostridium botulinum*. Estos microorganismos producen una toxina cuando son ingeridos por el huésped, lo que generalmente conduce a la enfermedad. Los microorganismos de infección incluyen *Salmonella*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Campylobacter jejuni* y *Listeria monocytogenes*. Estos microorganismos crecen dentro de un huésped una vez ingeridos y, como los microorganismos intoxicantes, causan enfermedades graves.

35 Las composiciones de recubrimiento de la presente invención muestran actividad contra un amplio intervalo de organismos que incluyen bacterias gram positivas, bacterias gram negativas, hongos, virus, protozoos y parásitos de insectos. Las composiciones de recubrimiento pueden emplearse contra bacterias difíciles tales como *staphylococcus aureus* resistente a la meticilina (MRSA), *clostridium difficile* (*C. diff*), *helicobacter pylori* (*H. py*) y enterobacterias resistentes a la vancomicina. Las composiciones de recubrimiento de la presente invención también pueden utilizarse contra el norovirus y otros patógenos, por lo que la transmisión se realiza por contacto con el aire.

45 En particular, la composición de recubrimiento descrita en la presente invención muestra actividad contra *E. coli*, *S. aureus* y *Salmonella*. Cuando la carne de ave se envasa en los materiales poliméricos de la presente invención, se ha demostrado que la cantidad de estos organismos presentes en la carne de ave se reduce significativamente. Los bajos niveles de organismos presentes en la carne de ave dan como resultado una vida útil prolongada y una mejor calidad de los productos avícolas.

50 Otro factor que afecta la calidad y la vida útil de un producto cárnico es la oxidación. Los antioxidantes se aplican a menudo al producto cárnico para prolongar su vida útil. Se pueden utilizar antioxidantes sintéticos o naturales, aunque se prefieren los antioxidantes naturales. Además de reducir la cantidad de bacterias en la carne, los materiales poliméricos de la presente invención también evitan la oxidación de la carne debido al recubrimiento con bioflavonoides.

55 Asimismo se describe un uso de un compuesto de Fórmula (I), como se describe en la presente memoria, para recubrir los materiales poliméricos descritos en la presente memoria.

60 Dichos materiales poliméricos pueden utilizarse en envasados, por ejemplo, envasado de alimentos y, en particular, envasado de productos frescos. En particular, los materiales poliméricos se pueden utilizar en el envasado de carne, especialmente en el envasado de carne de ave, por ejemplo el envasado de pavo o pollo, para reducir el recuento de bacterias en las superficies poliméricas. Los materiales poliméricos también pueden utilizarse en el envasado de pescado y mariscos, por ejemplo, salmón y langostinos; y también frutas y verduras, por ejemplo, frutos rojos y hojas de ensalada.

65 Ejemplos de carne incluyen carne de res, cordero, cerdo, tocino y pollo. Ejemplos de carnes de aves incluyen pollo, codorniz, pavo, pato, ganso, pichón, paloma, faisán, avestruz, pavo real de la India, pintada y ñandú.

El envasado de carne de ave se divide en dos categorías, fresco y congelado. Los diferentes elementos del envasado de carne de ave incluyen bandejas, películas, envolturas, cajas y servilletas.

5 Cuando está presente en los supermercados, la carne de ave se presentará en un envasado con el fin de exponer la carne de manera atractiva para los consumidores. El envasado también actúa para prolongar la vida útil del producto y facilitar el envío y manejo del producto desde la fuente en la que la carne se envasa hasta el estante en el supermercado o tienda de comestibles.

10 La carne, por ejemplo, la carne de ave, generalmente se asienta en una bandeja que a menudo está fabricada de poliestireno o PET. Luego se formará un ambiente sellado para prolongar la vida útil de la carne de ave al restringir la cantidad de aire en contacto con el producto de carne de ave. Un ejemplo es utilizar una envoltura de película para cubrir el borde abierto de una bandeja con el fin de proporcionar un ambiente contenido para la carne de ave. Alternativamente, se utiliza una película polimérica para revestir tanto la carne de ave como la bandeja para formar un ambiente cerrado. Otro ejemplo consiste en envasar al vacío la carne de ave y la bandeja con una película polimérica. En cada uno de estos ejemplos, el interior de la película que forma el interior del entorno cerrado, está recubierto con el recubrimiento con bioflavonoides descrito en la presente memoria. Además de la película recubierta, el interior de la bandeja también puede recubrirse con la composición con bioflavonoides.

20 Otros ejemplos de envasado incluyen bolsas poliméricas como envolturas de embalaje horizontal (HFFS). Esto implica el envasado horizontal del producto alimenticio utilizando una bobina de película única con tres soldaduras, dos soldaduras cruzadas y una soldadura longitudinal para formar un envase en forma de bolsa. La película única puede recubrirse con el recubrimiento con bioflavonoides descrito en la presente memoria.

25 Cuando la carne se envasa en una bandeja, la bandeja puede comprender además una servilleta, también conocida como almohadilla para alimentos, que se encuentra en la base de la bandeja. La carne se asienta sobre la servilleta que actúa para absorber cualquier jugo de la carne. El jugo de carne puede ser bastante desagradable y el uso de la servilleta hace que el producto de carne se vea más atractivo en los estantes de las tiendas.

30 Estas servilletas, o almohadillas para alimentos, también se conocen como mantas y también son útiles en el envasado de frutas, en particular, frutos rojos. En el envasado de las frutas, la servilleta se asentará en la base de la bandeja y la fruta se asentará sobre la servilleta. La servilleta actúa para amortiguar la fruta y absorber cualquier jugo. Los frutos rojos incluyen higos, uvas y bayas como moras, frambuesas, mora-frambuesa, arándanos, fresas y similares.

35 La servilleta está fabricada a partir de un material absorbente. En general, la servilleta está fabricada a partir de un material polimérico celulósico o sintético, o una combinación de ambos. Por ejemplo, la servilleta puede estar constituida de varias capas, que incluyen, por ejemplo, una capa superior polimérica sintética y una capa inferior con una capa media celulósica para proporcionar máxima absorbencia. Un material polimérico sintético adecuado es, por ejemplo, polietileno. El polímero sintético puede ser un polímero sintético recubierto con bioflavonoides de acuerdo con la invención.

45 La carne también puede envasarse en bolsas resellables o bolsas con un cierre de cremallera o un cierre similar. En este caso, el interior de la bolsa o bolsita polimérica está recubierto con el recubrimiento con bioflavonoides descrito en la presente memoria. Además de la carne envasada en bolsas de este tipo para el transporte o la exposición en supermercados, los suministros de bolsas o bolsitas vacías recubiertas con el recubrimiento con bioflavonoides descrito en la presente memoria también pueden venderse a los consumidores para su uso, en el hogar, para congelar, refrigerar o almacenar carne. Las bolsas y bolsitas resellables recubiertas con bioflavonoides también pueden ser útiles para el envasado de pescado, mariscos, frutas, verduras y otros productos alimenticios frescos. Por ejemplo, los frutos rojos que incluyen bayas y uvas, hojas de ensalada que incluyen espinaca y lechuga, hierbas, cebolletas y similares pueden envasarse en las bolsas y bolsitas. De hecho, cualquier pescado, marisco, fruta o verdura envasados en bolsas o bolsitas poliméricas para su transporte o exposición en supermercados pueden envasarse en los materiales recubiertos con bioflavonoides de la presente invención. También se contemplan bolsas selladas y bolsitas que no son resellables.

55 Además de envasar la carne en el material de envasado recubierto con bioflavonoides, la carne se puede nebulizar o pulverizar primero con el recubrimiento con bioflavonoides para reducir el recuento de bacterias en la carne y evitar la oxidación. La carne puede ser nebulizada o pulverizada antes de ser envasada; alternativamente, la carne se nebuliza o se pulveriza mientras se encuentra en la bandeja de envasado pero antes de aplicar una película para sellar el envase.

60 La carne así tratada puede ser una carne descrita anteriormente, pero es un pollo o pavo muy bien envasado, particularmente pollo.

65 Preferentemente, el recubrimiento con bioflavonoides se aplica al lado de la película o envase que contiene el producto fresco, es decir, el interior del envase. De forma alternativa o adicional, el recubrimiento con bioflavonoides también se puede aplicar al exterior de la película o envase, es decir, el lado del envase que está expuesto al aire y

al contacto humano. La aplicación del recubrimiento con bioflavonoides al exterior del envase reduce el recuento de bacterias en el lado del envase que entra en contacto con los manipuladores en cada etapa del procedimiento de producción y envío y, finalmente, el usuario final. Esto evita que los manipuladores del envase entren en contacto con microorganismos dañinos que pueden estar presentes en la superficie exterior del envase.

5 En otra realización, los materiales poliméricos recubiertos de la presente invención se pueden utilizar para proporcionar dispositivos médicos estériles, por ejemplo, catéteres, cánulas, prótesis orales y componentes de reemplazo de articulaciones tales como implantes de cadera, rodilla y columna vertebral.

10 Los catéteres están fabricados a partir de polímeros tales como caucho silicona, nylon, poliuretano, tereftalato de polietileno (PET), látex y elastómeros termoplásticos. La elección del polímero puede depender de la aplicación del catéter y, por lo tanto, del grado de flexibilidad requerido. Los componentes de reemplazo de articulaciones a menudo están fabricados de polietileno de peso molecular ultraalto (UHMWPE). Crear un ambiente limpio y estéril cuando se manejan catéteres, cánulas, componentes de reemplazo de articulaciones y similares es clave para  
15 prevenir infecciones y tener un dispositivo recubierto con bioflavonoides ayuda enormemente a lograr dicho ambiente estéril.

En una realización adicional, los polímeros sintéticos recubiertos con bioflavonoides se pueden utilizar en el campo de las máscaras faciales protectoras, por ejemplo máscaras respiratorias, ya que proporciona una protección mejorada para el usuario contra la inhalación de bacterias y virus. El poliestireno es particularmente preferido. Las máscaras pueden ser reutilizables o desechables. Los métodos de fabricación de máscaras faciales son bien conocidos en la técnica.

20 El poliestireno recubierto con bioflavonoides en forma de perlas, granos o bolas se puede utilizar en el envasado para brindar una mejor protección a los artículos estériles.

También se proporciona un procedimiento de aplicación de un recubrimiento que comprende un compuesto de Fórmula (I), como se describe en la presente memoria, a un material polimérico.

30 El material polimérico puede recubrirse por inmersión con el recubrimiento con bioflavonoides. El uso de una técnica de inmersión consiste en sumergir el material polimérico en una solución del recubrimiento con bioflavonoides a una velocidad constante. Luego, el material polimérico se extrae de la solución, lo que permite que una película delgada de recubrimiento se deposite sobre la superficie del material mientras se extrae de la solución. La velocidad a la que se extrae el material de la solución permanece constante para producir una deposición uniforme de la solución de recubrimiento. El control de la velocidad también permite controlar el espesor del recubrimiento. Luego, el material polimérico se seca y el disolvente en la solución de recubrimiento se evapora dejando una película de recubrimiento con bioflavonoides sobre el material polimérico. Las variaciones de esta técnica serán conocidas por el experto.  
35

40 Alternativamente, el material polimérico puede recubrirse por pulverización con una neblina en seco o en húmedo del recubrimiento con bioflavonoides. Un método de pulverización consiste en utilizar los nebulizadores incorporados en los sistemas de tratamiento con plasma. El experto en la materia conocerá otros métodos de pulverización.

45 Para las técnicas de inmersión y pulverización, la composición de recubrimiento con bioflavonoides se disuelve preferentemente en un disolvente orgánico antes de la aplicación al material polimérico para crear una solución. Un disolvente orgánico adecuado incluye metanol. El experto en la materia conocerá otros disolventes orgánicos adecuados. La solución puede comprender entre 10 y 15 % (p/p) de la composición de recubrimiento en el disolvente orgánico, preferentemente se utiliza 15 % (p/p) de la composición de recubrimiento.

50 Alternativamente, el material polimérico puede recubrirse por proyección en la superficie con la composición de recubrimiento. Los métodos de proyección superficial incluyen ablación con láser y deposición por pulverización catódica. Los expertos en la materia conocerán otros métodos adecuados.

60 Preferentemente, el material polimérico se somete a un pretratamiento con plasma antes de la aplicación del recubrimiento con bioflavonoides. El tratamiento con plasma puede ser un tratamiento a presión atmosférica o un tratamiento de implantación iónica por inmersión en plasma (PIII). El tratamiento a presión atmosférica podría ser a base de helio, a base de argón, a base de aire, o una mezcla de helio o argón con aire. Ejemplos de sistemas plasmáticos atmosféricos adecuados son LabLine™, PlasmaStream™ y PlasmaTreat. El aumento sustancial en el espesor y la rugosidad logrados para los recubrimientos depositados sobre los polímeros pretratados resulta en una mayor eficacia antibacteriana.

65 Los polímeros tienen generalmente una energía superficial baja que conduce a problemas tales como la humectabilidad, la capacidad de teñido y la adherencia deficientes. Se ha desarrollado una gran variedad de técnicas para superar este problema. Estas incluyen el uso de tratamientos químicos, llama, corona, así como plasmas de baja presión y presión atmosférica. El tratamiento con plasma es un tratamiento superficial que expone los polímeros a gas parcialmente ionizado. El gas ionizado se utiliza a baja presión o a presión atmosférica para aumentar la energía de la superficie del polímero.

Una ventaja particular de los tratamientos con plasma para la activación de polímeros es la uniformidad del tratamiento. La profundidad de la modificación con los tratamientos con plasma es generalmente inferior a 10 nm. Uno de sus efectos es mejorar la reticulación y, como resultado, se pueden eliminar las capas de límite débiles, fortaleciendo así la unión adhesiva. La escisión en cadena de las moléculas largas de polímero también puede

5 ocurrir, generando así sitios químicos que están disponibles para unirse con un adhesivo. Por ejemplo, la incorporación de grupos funcionales que contienen oxígeno y nitrógeno a la superficie se ha demostrado después de la activación del plasma. Se ha demostrado que incluso si solo se crean unos pocos sitios químicos, habrá un gran aumento en la resistencia del adhesivo. La eliminación de contaminantes de la superficie también es una contribución importante del tratamiento con plasma a la adhesión de polímeros.

10 Se ha descubierto que la activación por plasma de polímeros y otros sustratos, tales como obleas de silicona antes de la deposición por pulverización del recubrimiento antibacteriano aumentan tanto el espesor como la rugosidad de la capa de bioflavonoides depositada por pulverización. El uso del pretratamiento con plasma aumenta esencialmente tanto el espesor como la rugosidad de la capa de bioflavonoides depositada. El aumento del espesor de la capa de bioflavonoides depositada parece estar asociado con el aumento de la energía superficial que

15 aumenta la unión de las gotitas nebulizadas a la superficie, sin comprometer la actividad antibacteriana o antioxidante del recubrimiento con bioflavonoides (p. ej., la inmovilización covalente puede bloquear los grupos químicos que son esenciales para la función antibacteriana o antioxidante). Como se ilustra en la Figura 1, se obtuvo un aumento en el espesor del recubrimiento de bioflavonoides ya que el ángulo de contacto del agua del sustrato se redujo sistemáticamente (lo que indica una mayor energía de superficie del sustrato). Este aumento del espesor aumenta la longevidad de las propiedades antioxidantes y antibacterianas del recubrimiento. Para un espesor de recubrimiento dado, una mayor rugosidad de la superficie hace que el material polimérico recubierto muestre niveles mejorados de actividad antioxidante, así como una mayor actividad antibacteriana.

20 Apropiadamente, el material polimérico tratado con plasma o la película de polímero a recubrir tendrá un ángulo de contacto con el agua (ACA) inferior a 95°, más adecuadamente inferior a 75°, favorablemente inferior a 60°, por ejemplo 35°-40°. Un método adecuado para medir ACA en los diferentes sustratos es la técnica de caída sésil, utilizando un instrumento óptico de medición de ángulo de contacto OCA 20 (Dataphysics Instruments GmbH, Filderstadt, Alemania) a temperatura ambiente.

25 También se describe un producto envasado en el que el producto está formado por un material polimérico sintético que tiene un recubrimiento con bioflavonoides de la presente divulgación. El material polimérico y el recubrimiento con bioflavonoides son como se describen en la presente memoria.

30 El producto puede tener forma de una bandeja de envasado, una máscara facial tal como una máscara respiratoria o un medicamento, tal como un catéter o una cánula.

El producto puede ser envasado individualmente. Alternativamente, el producto se puede envasar como parte de un paquete múltiple. Se pueden utilizar métodos y materiales de envasado conocidos para envasar los productos de la presente invención, por ejemplo, agentes filmicos convencionales o cajas de cartón.

35 Una mezcla de bioflavonoides particularmente adecuada para su uso en la presente invención está disponible como polvo de Citrox HX. Este contiene una mezcla de bioflavonoides que comprende al menos 50 % (p/p) de naringina y neohesperidina en conjunto con ácidos de frutas; véase por ejemplo la Tabla 1.

40 Con el fin de que la invención se entienda más completamente, ahora se describirá, solo a modo de ejemplo, y con referencia a la(s) siguiente(s) Figura(s), en la(s) que:

45 Figura 1 - Comparación entre los espesores de recubrimiento de Citrox con el ángulo de contacto con el agua (ACA) obtenidos después del tratamiento con PET con los plasmas de PT PlasmaTreat (aire) y PS de PlasmaStream™ (helio/oxígeno).

50 Figura 2 - Comparación entre la rugosidad del recubrimiento de Citrox con el ángulo de contacto con el agua (ACA) obtenida después del tratamiento con PET con los plasmas de PT PlasmaTreat (aire) y PS de PlasmaStream™ (helio/oxígeno).

55 Figura 3 - Efecto de los recubrimientos de Citrox y vitamina E, sobre bandejas de PET sin pretratamiento con He/O<sub>2</sub>, después de 2 pases de caudal de 100 µl/min, sobre la oxidación del pavo, utilizando el sistema PlasmaStream™.

60 Figura 4- Imagen de perfilometría característica del recubrimiento de Citrox sobre un sustrato de silicio sin tratar previamente con He/O<sub>2</sub>, después de 100 pases con el sistema Labline™, un día después del tratamiento (aumento 2,6 x).

65 Figura 5 - Imagen de perfilometría característica del recubrimiento de Citrox sobre un sustrato de silicio tratado previamente con He/O<sub>2</sub>, después de 100 pases con el sistema Labline™, un día después del tratamiento

(aumento 2,6 x).

Figura 6 - Efecto del tiempo de envejecimiento en la rugosidad promedio de la superficie ( $R_a$ ) de los recubrimientos de Citrox (15 %) sobre los sustratos de silicio no pretratados y tratados con He/O<sub>2</sub> después de 100 pases con el sistema Labline™.

Figura 7 - Efecto del tiempo de envejecimiento en el espesor de los recubrimientos de Citrox (15 %) sobre los sustratos de silicio no pretratados y tratados con He/O<sub>2</sub> después de 100 pases con el sistema Labline™.

Figura 8 - Imagen de perfilometría característica del recubrimiento de Citrox sobre un sustrato de silicio no tratado previamente con He/O<sub>2</sub> después de 100 pases con el sistema Labline™, veintiún días después del tratamiento (aumento 2,6 x).

Figura 9 - Imagen de perfilometría característica del recubrimiento de Citrox sobre un sustrato de silicio tratado previamente con He/O<sub>2</sub> después de 100 pases con el sistema Labline™, veintiún días después del tratamiento (aumento 2,6 x).

Figura 10 - Actividad antibacteriana, contra *S. aureus*, del recubrimiento de Citrox sobre los sustratos de PET no tratados previamente y tratados con He/O<sub>2</sub> después de 100 pases con el sistema Labline™, como una función del tiempo.

Figura 11 - Actividad antibacteriana, contra *E. coli*, del recubrimiento de Citrox sobre los sustratos de PET no tratados previamente y tratados con He/O<sub>2</sub> después de 100 pases con el sistema Labline™, como una función del tiempo.

Figura 12 - Actividad antibacteriana, contra *Salmonella*, del recubrimiento de Citrox sobre los sustratos de PET no tratados previamente y tratados con He/O<sub>2</sub> después de 100 pases con el sistema Labline™, como una función del tiempo.

Figura 13 - Actividad antibacteriana de Citrox contra las bacterias que se encuentran en el pollo, siendo Citrox pulverizado ya sea i) en una bandeja de PET y luego se coloca el pollo en la parte superior o ii) directamente sobre el pollo, en comparación con el control que es un pollo colocado en una bandeja de PET sin ningún tratamiento. El efecto antibacteriano se midió el día 6 después de la pulverización.

Figura 14 - Espectros FTIR ATR en el intervalo de 900 a 1900 cm<sup>-1</sup> que muestran la presencia de Citrox en láminas de poliestireno tratadas y no tratadas con plasma después de la incubación con Citrox y su posterior lavado con agua. La línea azul (o línea negra) representa poliestireno no tratado. La línea roja (o línea gris) representa la implantación iónica por inmersión en plasma (PIII).

Figura 15 - Espectros FTIR ATR en el intervalo de 2400 a 3900 cm<sup>-1</sup> que muestran la presencia de Citrox en láminas de poliestireno tratadas y no tratadas con plasma después de la incubación con Citrox y su posterior lavado con agua. La línea azul (o línea negra) representa poliestireno no tratado. La línea roja (o línea gris) representa la implantación iónica por inmersión en plasma (PIII).

La mezcla de bioflavonoides emplea bioflavonoides en mezcla con residuos de biomasa de extracción de naranjas amargas. Los componentes bioflavonoides comprenden 40-50 %, por ejemplo, aproximadamente 45 % p/p de esta mezcla (HPLC-45). HPLC-45 está disponible en Exquim (la división de alimentos del Grupo Ferrer) como complejo de citrus-bioflavonoides al 45 % HPLC.

El polvo de Citrox HXT comprende en una base en p/p de HPLC 45 al 7,5 %, ácido cítrico al 30 %, extracto de corteza de sauce al 50 % y extracto de *Olea europaea* al 12,5 %. El polvo de Citrox HXT está disponible en Citrox Biosciences, Limited, Huntington, Reino Unido.

El extracto de corteza de sauce contiene 90 % de ácido salicílico.

El extracto de *Olea europaea* contiene 20 % de oleuropeína.

HPLC-45 contiene 45 % en peso de una mezcla de bioflavonoides junto con residuos de extracción de naranjas amargas.

Tabla 1: La mezcla de bioflavonoides en HPLC-45:

Bioflavonoides	% de bioflavonoides en mezcla con biomasa
Neoeriocitrina	1,1
Isonarigina	1,2
Naringina	23,4

(continuación)

Bioflavonoides	% de bioflavonoides en mezcla con biomasa
Hesperidina	1,4
Neohesperidina	12,5
Neodiosmina	1,4
Narengenina	1,5
Poncirina	2,0
Otros (riofolina)	0,5

## Ejemplos

### 5 Ejemplo 1

#### Metodología experimental

10 *Preparación del precursor de Citrox:* el polvo de Citrox HXT se disolvió en metanol. Se utilizó 10 % o 15 % (p/p) de Citrox en metanol para formular el precursor.

*Pretratamiento de las muestras:* las películas de tereftalato de polietileno (PET) y las obleas de silicona se trataron o no inicialmente con plasma de He/O<sub>2</sub>.

15 En el caso de los sistemas de tratamiento de chorro de plasma atmosférico (como PlasmaStream™), los sustratos se activaron mediante dos pases de un plasma formado con 5 % de O<sub>2</sub> en He. La potencia de plasma aplicada fue del 80 %, la velocidad del CNC fue de 7 mm/s y la distancia del sustrato a la distancia del orificio de chorro de plasma fue de 10 mm.

20 En el caso de un plasma atmosférico de bobina a bobina (como el sistema Labline™), los sustratos se activaron pasándolos tres veces a través de la cámara de tratamiento que contiene un 5 % de O<sub>2</sub> en un plasma de He formado entre dos placas dieléctricas. La potencia de plasma aplicada fue de 1000 W y las muestras se pasaron a través de la cámara a una velocidad de 1,5 m/min.

25 *Los recubrimientos de Citrox* se depositaron sobre las películas de PET pretratadas o no pretratadas y las obleas de silicona, utilizando los nebulizadores incorporados en los sistemas PlasmaStream™, Labline™ y PlasmaTreat. El uso de una técnica de inmersión de Citrox también se evaluó como una alternativa a la pulverización, sin embargo, el método de inmersión no dio lugar a un recubrimiento homogéneo. La técnica de pulverización produce recubrimientos con la mayor rugosidad y homogeneidad de la superficie.

30 En el caso del sistema PlasmaStream™, las deposiciones se llevaron a cabo utilizando el 10 % de Citrox en un precursor de metanol con tres caudales: 25, 50 y 100 µl/min y el número de pases varió entre 2 y 16. Los parámetros de deposición, tales como el caudal de He, la velocidad del CNC y la distancia del sustrato al orificio del chorro de plasma se mantuvieron constantes a 5 l/min, 7 mm/s y 2 mm respectivamente.

35 En el caso del sistema Labline™, las deposiciones se llevaron a cabo utilizando el 10 % o el 15 % de Citrox en metanol y el nebulizador aeroneb pro micropumb. El caudal fue constante: 0,2 ml/min. El número de pases varió entre 5 y 150. Los parámetros de deposición, tales como el caudal de N<sub>2</sub> y la velocidad se mantuvieron constantes a 5 l/min y 1,5 m/min, respectivamente.

40 Finalmente, en el caso del sistema PlasmaTreat, los parámetros de tratamiento con plasma se eligieron para replicar el grado de activación alcanzado previamente utilizando el sistema PlasmaStream™. Después de un estudio iterativo, se eligieron los siguientes parámetros de PlasmaTreat para activar las muestras de PET: 90 % de voltaje, 50 % de PCT, 20 kHz, 3000 mbar, 250 mm/s de velocidad de cnc, y la distancia del sustrato a la boquilla del chorro se ajustó a 15,5 mm.

45 **Caracterización de los materiales:** Los recubrimientos se examinaron mediante microscopía óptica, microscopía electrónica de barrido (SEM), perfilometría óptica, mediciones del ángulo de contacto con el agua y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

50 La **actividad** antibacteriana del Citrox depositado en películas de PET, ya sea activadas por plasma o no activadas por plasma, se examinó contra tres especies bacterianas: *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella*.

55 La **actividad antioxidante** del Citrox depositado en PET, ya sea activado por plasma o no activado por plasma, se examinó contra la oxidación del pavo.

## Resultados

## 1. Sistemas de chorro de plasma - influencia del caudal/número de pases en el espesor y morfología de la capa de Citrox

5 A partir de estudios anteriores, se concluyó que la actividad de Citrox depende del espesor de la capa depositada y posiblemente de la rugosidad de la superficie. El objetivo de este estudio fue determinar cómo el caudal de Citrox a través del nebulizador influye en la rugosidad y en el espesor de los recubrimientos de Citrox depositados sobre sustratos de oblea de silicio. En este estudio no se realizó activación previa al plasma. Se concluye que con caudales de 25, 50 y 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ , en el que la cantidad total de Citrox depositada es constante, los valores de  $R_a$  son muy similares. Los resultados del espesor también indican que cuando se deposita la misma concentración total, no importa con respecto al espesor si la capa se deposita, por ejemplo, de 8 x 25  $\mu\text{l}/\text{min}$  o 2 x 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

15 Cuando la preactivación del sustrato se lleva a cabo utilizando un plasma, se obtienen niveles esencialmente mayores de adherencia de recubrimiento de Citrox cuando se fijan todos los demás parámetros de deposición. Como se demuestra en la figura 1, se obtiene un aumento de casi tres veces el nivel de Citrox adherente después de la activación del plasma (ángulo de contacto del sustrato de 15°). Esta figura también ilustra el efecto mínimo de cambio del plasma de helio/oxígeno (sistema PlasmaStream™ (PS)) por un plasma de aire (sistema PlasmaTreat (PT)) para la activación de PET. Se descubrió que el nivel de fijación de Citrox dependía del ángulo de contacto con el agua (ACA). En los ángulos de contacto de agua más bajos (mayor energía superficial), se descubrió que se adhirieron niveles más altos de Citrox. Tal como se esperaba, se descubrió que los resultados de la rugosidad de la superficie (Figura 2) aumentaban con un aumento en el espesor del recubrimiento de Citrox. Tenga en cuenta los valores muy similares de espesor y rugosidad del recubrimiento de Citrox obtenidos para un ángulo de contacto dado con los plasmas de chorro de aire y helio. La ventaja de utilizar el primero es la reducción significativa de los costos de procesamiento en el uso de un plasma de aire.

25 *Mediciones de ángulos de contacto con el agua y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier:*

El ángulo de contacto con el agua y los espectros FTIR se obtuvieron para las capas de Citrox depositadas en caudales diferentes. En todos los casos, el ángulo de contacto con el agua de los recubrimientos de citrox fue altamente hidrófilo con un ángulo de contacto inferior a 5°. FTIR confirmó la presencia de bioflavonoides en las muestras. Las bandas características (aromáticas entre 1480 y 1637  $\text{cm}^{-1}$ , -OH-fenólicas a 1205, 1293, 1439 y 3476  $\text{cm}^{-1}$ , metoxilicas a 1248  $\text{cm}^{-1}$  y carbonílicas a 1657  $\text{cm}^{-1}$ ) estuvieron de acuerdo con los espectros FTIR de naringina y neohesperidina, lo que demuestra que la funcionalidad química se conserva durante el proceso de deposición.

### Actividad antibacteriana

35 Los recubrimientos de Citrox mostraron efectos bactericidas contra *S. aureus*, cuando Citrox se depositó sobre los sustratos no tratados previamente con He/O<sub>2</sub> después de a) 4 pases de caudal de 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  o b) 2 pases de caudal de 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ . Esta prueba depende obviamente de la concentración de bacterias expuestas al polímero recubierto y del efecto del envejecimiento. En este estudio, la concentración fue de 1 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colonias (UFC)/ml y las muestras se analizaron un día después de la deposición. Por lo tanto, se concluyó que el espesor inhibitorio mínimo es de 60 nm (el  $R_a$  asociado es de 500 nm).

45 En el caso del polímero de PET que se había tratado con un plasma de He/O<sub>2</sub>, también se requiere un espesor y una rugosidad similares de Citrox, pero en este caso el efecto bactericida se logró después de 2 pases de caudal de 50  $\mu\text{l}/\text{min}$  o b) 1 pase de caudal de 100  $\mu\text{l}/\text{min}$ .

### Actividad antioxidante

50 El examen del efecto antioxidante de los recubrimientos de Citrox y vitamina E depositados en los sustratos de PET no tratados previamente con He/O<sub>2</sub> después de 2 pases de caudal de 100  $\mu\text{l}/\text{min}$  mostró que Citrox es más eficaz que la vitamina E en reducir la oxidación del pavo con el tiempo (Figura 3). La oxidación de los lípidos se expresa en mg de malonaldehído (MDA)/kg de carne. El malonaldehído es el producto de la degradación de los lípidos poliinsaturados debido a las especies de oxígeno. Cuanto mayor sea el valor mayor será la oxidación.

## 55 2. Aplicación de los recubrimientos de Citrox utilizando el sistema Labline™ - influencia del número de pases/concentración en el espesor y morfología de la capa de Citrox

60 El objetivo de este estudio fue investigar el efecto del uso de nebulizadores montados en un sistema de bobina a bobina (Labline™) o de chorro de plasma atmosférico (PlasmaStream™) para el recubrimiento de Citrox de polímeros de PET preactivados con plasma. En el caso de este sistema de tratamiento de entramado bobina a bobina, se descubrió que se requería un número mucho mayor de pases para obtener el mismo espesor y rugosidad de la capa de Citrox que se obtuvo con el sistema de chorro PlasmaStream™. En este estudio, los nebulizadores utilizaron un caudal precursor de 0,2 ml/min. Una capa de espesor de 60 nm en el caso del sistema Plasma Jet se logró sobre los sustratos no tratados previamente con He/O<sub>2</sub> después de 4 pases de caudal de 50  $\mu\text{l}/\text{min}$ , mientras que en el caso del sistema Labline™, un espesor similar (70 nm) se logró después de 50 pases de caudal de 0,2 ml/min. En lo que respecta a la rugosidad, las muestras producidas por el sistema PlasmaStream™

Jet presentaron una rugosidad superficial promedio más alta ( $R_a$ ) (~500 nm) en comparación con el sistema Labline™ ( $R_a$  ~100 nm), para muestras que tenían un espesor similar (~60-70 nm).

#### Deposición del recubrimiento de Citrox utilizando el sistema Labline™

El estudio inicial se centró en la influencia del número de pases sobre la rugosidad y el espesor del recubrimiento. Hubo un efecto ampliamente lineal con estos dos parámetros con el número de pases. La rugosidad de la superficie fue considerablemente más baja que los recubrimientos con un espesor similar depositado utilizando el sistema PlasmaStream™. Por ejemplo, en el caso del sistema Labline™, un espesor de ~70 nm dio un valor de  $R_a$  de 100 nm, mientras que un espesor similar con el sistema PlasmaStream™ dio una rugosidad de superficie correspondiente de 500 nm.

Estos recubrimientos de Citrox depositados a una concentración de 10 % de Citrox en metanol no presentaron actividad antibacteriana. Los estudios se llevaron a cabo a una concentración del 20 %, pero estas mezclas no pudieron ser nebulizadas. El enfoque de la investigación, por lo tanto, se concentró en un 15 % de Citrox en soluciones de metanol. También se requirió un gran número de pases para que el recubrimiento presentara actividad antibacteriana contra *S. aureus*. Se demostró el efecto de aumentar el número de pases a 150 en el espesor y la rugosidad del recubrimiento. Este estudio se realizó con obleas de silicio activadas por plasma y no activadas por plasma. Se obtuvieron valores de espesores y rugosidad del recubrimiento de varios micrómetros. Una observación interesante es el efecto del pretratamiento del sustrato con plasma de He/O<sub>2</sub> antes de la aplicación de la capa de Citrox. Se observó que la morfología del recubrimiento era muy diferente con las superficies activadas por plasma que exhibían agregados mucho más grandes de partículas de Citrox. La cobertura de la superficie (como se evaluó utilizando el software Image J) fue considerablemente mayor con el silicio activado por plasma, como se detalla en la Tabla 2. Esta Tabla compara los recubrimientos de Citrox (15 %) depositados utilizando el sistema Labline™ después de 100 pases. Hubo un aumento drástico tanto en la rugosidad como en el espesor del recubrimiento con el tratamiento con plasma de He/O<sub>2</sub>. Esto puede estar asociado con el aumento en el ángulo de contacto con el agua. En el caso de las obleas de silicio no tratadas y tratadas con plasma, los valores de ángulo de contacto obtenidos fueron de 68° a 20°, respectivamente. Los ángulos de contacto correspondientes para el polímero de PET fueron de 71° a 55°, respectivamente.

**Tabla 2:** Influencia del pretratamiento con plasma de He/O<sub>2</sub> de sustratos de oblea de silicio antes de la deposición de Citrox con 100 pases utilizando el sistema Labline™.

	Oblea no tratada	Oblea tratada con plasma
Cobertura de la superficie (%)	34 %	55 %
Espesor de la capa de Citrox (nm)	152 ± 17	1179 ± 89
Rugosidad de la capa de Citrox $R_a$ (nm)	619 ± 27	1350 ± 70

#### Actividad antibacteriana

Los recubrimientos de Citrox mostraron efectos bactericidas contra *S. aureus*, cuando se depositó citrox sobre los sustratos tratados o no tratados previamente con He/O<sub>2</sub> después de 100 y 150 pases. Esto significa que el  $R_a$  inhibitorio mínimo es de 500 nm y el espesor inhibitorio mínimo es de aproximadamente 100 nm.

#### 3. Estudio del efecto del envejecimiento de los recubrimientos de Citrox depositados por Laroxine™

El objetivo de este estudio fue investigar si había un efecto de envejecimiento para Citrox depositado sobre sustratos de oblea de silicio. Esta investigación se llevó a cabo midiendo los cambios tanto en la rugosidad como en el espesor con el tiempo después de la deposición de Citrox. Como se ilustra en las Figuras. 6 y 7, ambos parámetros disminuyeron significativamente durante el estudio de 35 días. Además, la cobertura de la superficie de la oblea de Si por Citrox disminuyó del 55 % al 47,6 % en el caso del sustrato pretratado con He/O<sub>2</sub> y del 34,4 % al 23,3 % en el caso del no pretratado con He/O<sub>2</sub>, 35 días después del tratamiento. Esto puede deberse a la pérdida de un componente volátil en la capa de Citrox/metanol.

Se utilizó FTIR para estudiar los cambios en la intensidad relativa de los picos con el tiempo. La intensidad máxima global se observó que disminuía con el tiempo. En particular, se observó una disminución en la intensidad absoluta de la banda fenólica -OH a 1200 cm<sup>-1</sup> de 0,641 a 0,508 35 días después del tratamiento en el caso del sustrato no tratado previamente con He/O<sub>2</sub>, mientras que en el caso del pretratamiento con plasma de He/O<sub>2</sub>, la intensidad absoluta disminuyó de 0,862 a 0,726.

#### Actividad antibacteriana

El objetivo de este estudio fue evaluar la longevidad del efecto antibacteriano de Citrox contra *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella*. Los recubrimientos de Citrox se aplicaron a las muestras de PET y los polímeros recubiertos se almacenaron envolviéndolos en un rodillo de polímero. El objetivo de este estudio fue determinar si un rodillo del polímero recubierto continuaba presentando actividad antibacteriana a lo largo del tiempo. Las muestras de ensayo

se retiraron del rodillo justo antes del estudio antibacteriano. Se intentó correlacionar el nivel de actividad antimicrobiana con la rugosidad y el espesor de Citrox. De las Figuras 10 a 12, que detallan el nivel de actividad antibacteriana con el tiempo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- 5 • Los recubrimientos de Citrox mostraron efectos bactericidas contra *S. aureus* hasta un periodo de 21 días, cuando Citrox se depositó en sustratos tratados previamente con plasma de He/O<sub>2</sub>, (100 pases, utilizando el sistema Labline™). Se observó una cantidad muy pequeña de bacterias en las muestras de ensayo hasta la  
10 completación del periodo de prueba de 35 días, lo que indica un nivel de actividad continuo (Figura 10). En el caso de los recubrimientos de Citrox sobre los sustratos no tratados con plasma, con el mismo número de pases, el efecto bactericida se perdió 21 días después de la deposición de Citrox.
- Como se ilustra en la Figura 11, los recubrimientos de Citrox mostraron un mayor efecto bactericida contra *E. coli*, sin crecimiento observado después de los 35 días de deposición, cuando Citrox se depositó sobre los  
15 sustratos pretratados con plasma de He/O<sub>2</sub> por Labline™, después de 100 pases. Como antes, para los recubrimientos de Citrox sobre los sustratos no tratados previamente con He/O<sub>2</sub>, el efecto bactericida se perdió 21 días después de la deposición de Citrox.
- Los recubrimientos de Citrox mostraron un bajo crecimiento de *Salmonella* después de 21 días de deposición, cuando Citrox se depositó sobre los sustratos pretratados con He/O<sub>2</sub>, después de 100 pases utilizando el sistema  
20 Labline™. Como antes, para los sustratos no tratados, el efecto bactericida se perdió 21 días después del tratamiento. En el caso de la superficie activada por plasma, al contrario, se observó una actividad continua hasta el periodo de prueba de 35 días (Figura 12).
- Las Figuras 10, 11 y 12 demostraron el rendimiento antibacteriano mejorado de los recubrimientos de Citrox depositados sobre polímeros activados por plasma. La explicación para ello es la mejora sustancial en el espesor  
25 y la rugosidad logrados para los recubrimientos depositados sobre los polímeros pretratados. De estas figuras queda claro que muy pocas bacterias se adhieren a los recubrimientos más gruesos y más rugosos de las superficies activadas.
- La Figura 13 demuestra el efecto de pulverizar Citrox, ya sea i) en una bandeja de PET y luego colocar el pollo encima o ii) sobre el pollo, en la viabilidad bacteriana, en comparación con el control que es el pollo que se colocó  
30 en una bandeja de PET sin ningún tratamiento. El efecto antibacteriano se midió el día 6 después de la pulverización.

### 35 Conclusiones

- El uso de pretratamientos con plasma aumenta esencialmente tanto el espesor como la rugosidad de la capa de Citrox depositada por pulverización. Para un conjunto dado de condiciones de procesamiento, se obtuvo un  
40 aumento de hasta 3 veces el espesor de Citrox en sustratos de PET y un aumento de 8 veces en los sustratos de oblea de silicio, que habían sido tratados previamente con plasma. Este aumento puede deberse a las superficies de mayor energía que mejoran la adhesión de las partículas nebulizadas. El espesor mejorado del recubrimiento produjo superficies que presentan un rendimiento antimicrobiano durante periodos más prolongados después de la deposición del recubrimiento con Citrox.
- Al comparar el rendimiento antimicrobiano de los recubrimientos con Citrox depositados con los sistemas Labline™ y PlasmaStream™, queda claro que en el caso del sistema Labline™ se requiere un espesor de capa  
45 de Citrox de ~70 nm, en contraste con el espesor requerido con el sistema por chorros PlasmaStream™ que era de solo ~50 nm. Los valores de rugosidad de la superficie correspondientes son aproximadamente 100 y 500 nm, respectivamente. Este resultado indica que se requiere una mayor rugosidad de la superficie para lograr niveles más altos de actividad antibacteriana con Citrox.
- El uso de una técnica de inmersión para la aplicación de Citrox no dio lugar a un recubrimiento homogéneo. La técnica de pulverización produce recubrimientos con la mayor rugosidad y homogeneidad de la superficie.
- Los recubrimientos de Citrox depositados sobre los sustratos pretratados con plasma de He/O<sub>2</sub> presentaron un efecto bactericida contra *S. aureus*, *E. coli* y *Salmonella* durante un mínimo de 35 días después de la aplicación  
55 de la capa de Citrox (tenga en cuenta los niveles muy bajos de *S. aureus* y *Salmonella* observados después de 21 días).
- Se observó una reducción significativa en el nivel de oxidación de la carne de pavo después de la aplicación de Citrox en bandejas de PET. Los resultados antioxidantes se comparan favorablemente con los recubrimientos con vitamina E, un conocido antioxidante comercial.

### 65 Ejemplo 2

### Impregnación de láminas de poliestireno con Citrox

- 5 Las láminas de poliestireno se trataron utilizando implantación iónica por inmersión en plasma (Pill) con iones nitrógeno de 20 keV de energía durante 800 segundos para crear radicales incrustados en la superficie capaces de unirse de forma covalente a moléculas biológicamente activas (como se describe en Bilek *et al*, PNAS, 108(35):14405-14410, 2011, incorporado en la presente memoria como referencia). Las láminas tratadas con PIII y sin tratar se incubaron en tubos que contenían concentrado de Citrox (HPLC 45) o agua desionizada (para el control) durante 3 horas. En HPLC 45 o "Citrox BC", al 45 % (de la composición total de HPLC 45/Citrox BC) comprende bioflavonoides. Los bioflavonoides están mezclados con residuos de biomasa de extracción de naranjas amargas, 10 tales como pectinas, azúcares y ácidos orgánicos menores, que constituyen el 55 % restante. HPLC 45 está disponible en Exquim (una empresa del Grupo Ferrer) como complejo de Citrus-bioflavonoides al 45 % HPLC. Después de la incubación, las láminas se lavaron intensamente en tubos con agua desionizada (3 veces con agitación durante 20 minutos y cambiando los tubos cada vez). Después del lavado, las láminas se secaron durante la noche.
- 15 Los espectros FTIR ATR se registraron con un espectrómetro Digilab. El cristal de ATR era un trapecio de germanio, ángulo de incidencia de 45 grados, 25 reflexiones. La resolución espectral fue de 4  $\text{cm}^{-1}$  y el número de barridos fue de 500.
- 20 Los espectros fueron analizados con el software Resolution-pro. Los espectros de las muestras de control se restaron del de las muestras recubiertas con Citrox. Los espectros de vapor de agua y los espectros de cola de cristal de germanio también se restaron. Se realizó una corrección de valor basal. Los espectros finales se presentan en las Figuras 14 y 15.
- 25 Los espectros muestran que los componentes de Citrox permanecen en láminas de poliestireno sin tratar y tratadas con Pill. Las líneas claras e intensas en 910, 1040, 1070, 1460, 1510, 1620-1650, 2860-2980  $\text{cm}^{-1}$  se observan en los espectros restados tanto para las láminas sin tratar como para las tratadas. La línea en el intervalo de 1750-1700  $\text{cm}^{-1}$  está presente solo en el espectro de las láminas no tratadas.
- 30 Dado que el cristal de germanio estaba limpio después del contacto con las láminas, los componentes de Citrox se absorben fuertemente en la superficie o se distribuyen en capas a granel de las láminas de poliestireno. Por lo tanto, los componentes de Citrox permanecen en las láminas de poliestireno después de la incubación y el lavado con agua.
- 35 **Conclusiones**
- Las láminas de poliestireno tratadas con plasma contienen niveles más altos de Citrox.

## REIVINDICACIONES

1. Un material polimérico sintético que tiene un recubrimiento con bioflavonoides, comprendiendo el contenido de bioflavonoides del recubrimiento al menos naringina y neohesperidina, en el que el espesor del recubrimiento es al menos de 50 nm, preferentemente entre 700 y 1300 nm, y en el que el recubrimiento presenta actividades antimicrobianas y antioxidantes.
2. El material polimérico de la reivindicación 1, en el que la naringina y la neohesperidina forman en conjunto al menos 50 % del contenido de bioflavonoides del recubrimiento, preferentemente al menos 70 % del contenido de bioflavonoides del recubrimiento, al menos 75 % del contenido de bioflavonoides del recubrimiento o entre 75 % y 80 % del contenido de bioflavonoides del recubrimiento.
3. El material polimérico de cualquier reivindicación precedente, en el que el contenido de bioflavonoides del recubrimiento comprende además uno o más compuestos seleccionados entre el grupo de neoeriocitrina, isonaringina, hesperidina, neodiosmina, naringenina, poncirina y riofolina, en el que opcionalmente el recubrimiento con bioflavonoides comprende además oleuropeína y/o ácido salicílico y/o uno o más ácidos de frutas, preferentemente en el que los ácidos de frutas se seleccionan entre ácido cítrico, ácido láctico, ácido ascórbico y ácido málico.
4. El material polimérico de cualquier reivindicación precedente en forma de una película.
5. El material polimérico de cualquier reivindicación precedente, en el que el polímero es tereftalato de polietileno, poliestireno, polietileno, polipropileno, cloruro de polivinilo, poliamida, policloruro de vinilideno, alcohol polietilenvinílico, polietileno vinilo acetato, neopreno, poliuretano, nylon, látex, caucho nitrilo o silicona, preferentemente en el que el polímero es tereftalato de polietileno o poliestireno.
6. El material polimérico de cualquier reivindicación precedente, en el que el porcentaje de cobertura del recubrimiento de bioflavonoides sobre el material polimérico es de al menos 50 %, preferentemente entre 70-100 % y/o en el que la rugosidad promedio de la superficie del recubrimiento con bioflavonoides es de al menos 100 nm, preferentemente entre 600 y 1500 nm.
7. Uso de un recubrimiento con bioflavonoides como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 para recubrir un material polimérico, preferentemente en el que el material polimérico es como se define en las reivindicaciones 4 o 5.
8. Uso de un material polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 como material de envasado.
9. Uso de un material polimérico de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el material polimérico se encuentra en forma de una película.
10. Uso de un material polimérico de acuerdo con las reivindicaciones 8 o 9, en el que el polímero es tereftalato de polietileno, poliestireno, polietileno, polipropileno, cloruro de polivinilo, poliamida, policloruro de vinilideno, alcohol polietilenvinílico, polietileno vinilo acetato, neopreno, poliuretano, nylon, látex, caucho nitrilo o silicona, preferentemente en el que el polímero es tereftalato de polietileno o poliestireno.
11. Uso de un material polimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 8 a 10, en el que el porcentaje de cobertura del recubrimiento con bioflavonoides en el material polimérico es al menos del 50 %, preferentemente entre 70-100 % y/o en el que la rugosidad promedio de la superficie del recubrimiento con bioflavonoides es de al menos 100 nm, preferentemente entre 600 y 1500 nm.
12. Uso del material polimérico de cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, en el que el envase es para un envasado de alimentos, preferentemente en el que el envasado de alimentos es para carne, tal como carne de ave, por ejemplo pollo o pavo, o en el que el envasado de alimentos es para fruta, tal como frutos rojos.
13. Uso de un material polimérico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, 5, 6, 8, 10 u 11 como dispositivo médico, tal como un catéter o cánula o como una máscara respiratoria.
14. Uso de un material polimérico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8 a 11 para prevenir la oxidación de la carne, preferentemente en el que la carne es de carne de ave, tales como pollo o pavo, o como una servilleta de carne de ave.
15. Un procedimiento de fabricación de un material polimérico como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8 a 11 que comprende:
- i) tratamiento con plasma del material polimérico para crear un material polimérico tratado; preferentemente en el que el tratamiento con plasma es un tratamiento a presión atmosférica tal como a base de helio, a base de

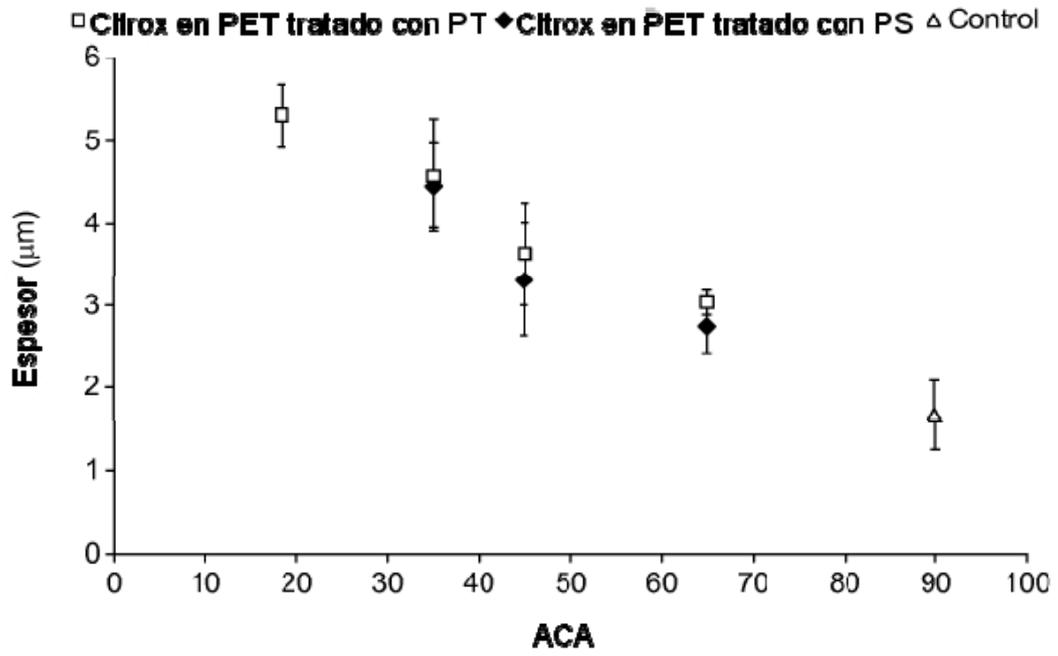
argón, a base de aire o una mezcla de helio o argón con aire; o en el que el tratamiento con plasma es la implantación iónica por inmersión en plasma y

ii) aplicación de un recubrimiento con bioflavonoides como se define por las reivindicaciones 1 a 6 u 8 a 11 al material polimérico tratado,

5  
opcionalmente en el que la etapa ii) comprende: sumergir el material polimérico en una solución del recubrimiento con bioflavonoides, pulverizar el material polimérico con una neblina en seco o en húmedo del recubrimiento con bioflavonoides o proyectar en la superficie el material polimérico con el recubrimiento con bioflavonoides;  
10 o en el que el material polimérico tratado tiene un ángulo de contacto con el agua inferior a 95°, preferentemente en el que el ángulo de contacto con el agua es inferior a 75°, inferior a 60° o inferior a 35°-40°.

16. Un producto envasado que comprende un material polimérico sintético que tiene un recubrimiento con bioflavonoides como se define en cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 u 8 a 11, preferentemente en el que el material polimérico es como se define en cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 o 9 a 11.

15



**FIG. 1**

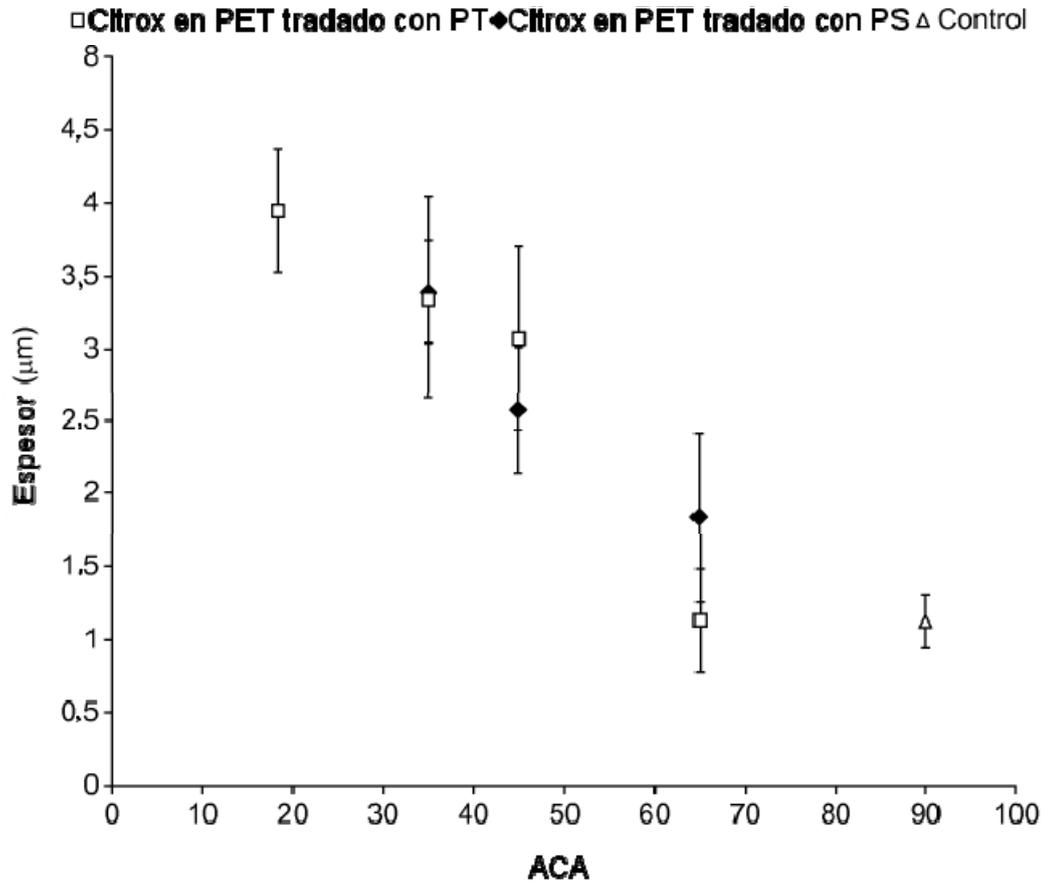


FIG. 2

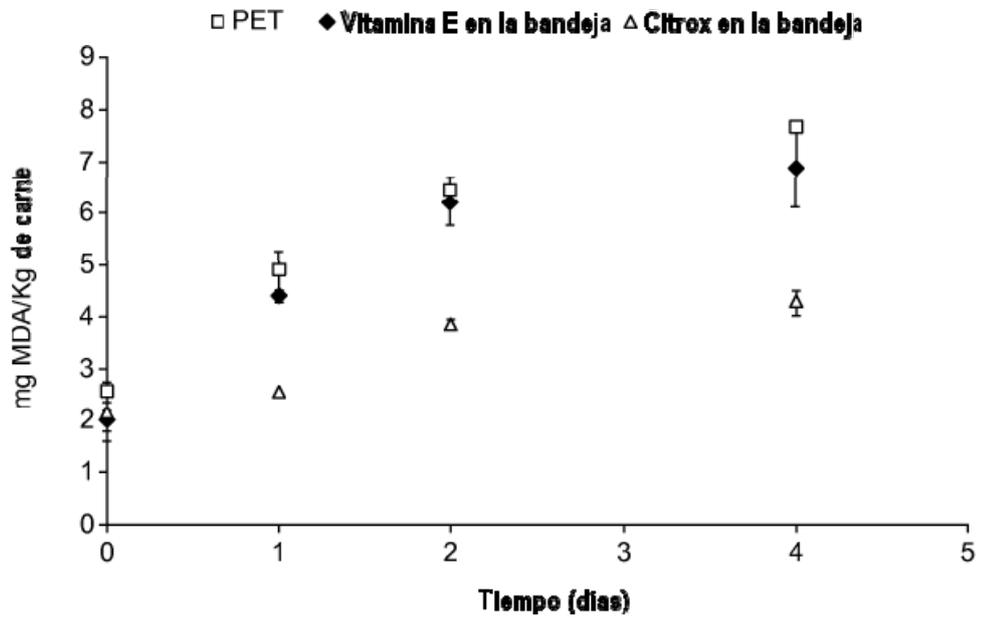
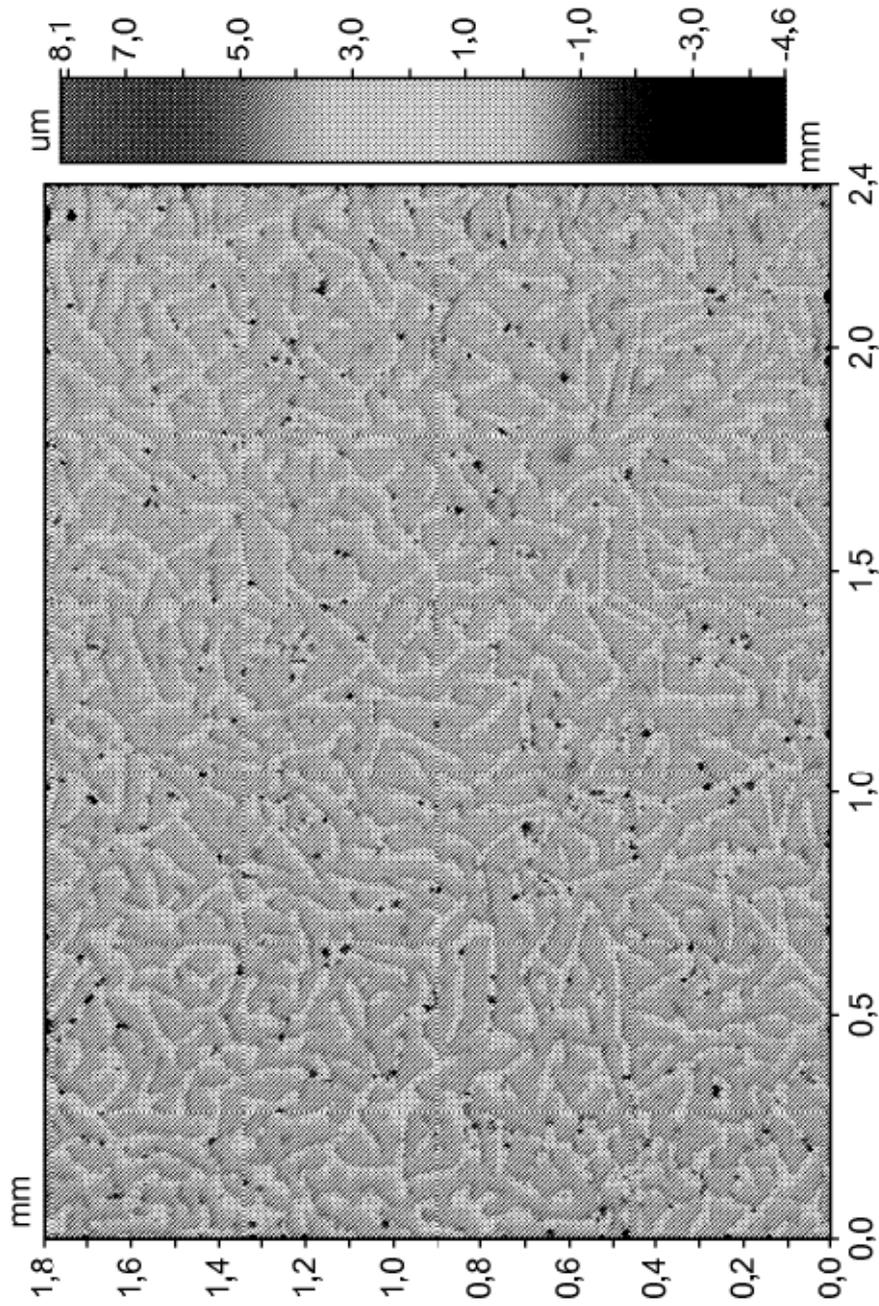


FIG. 3

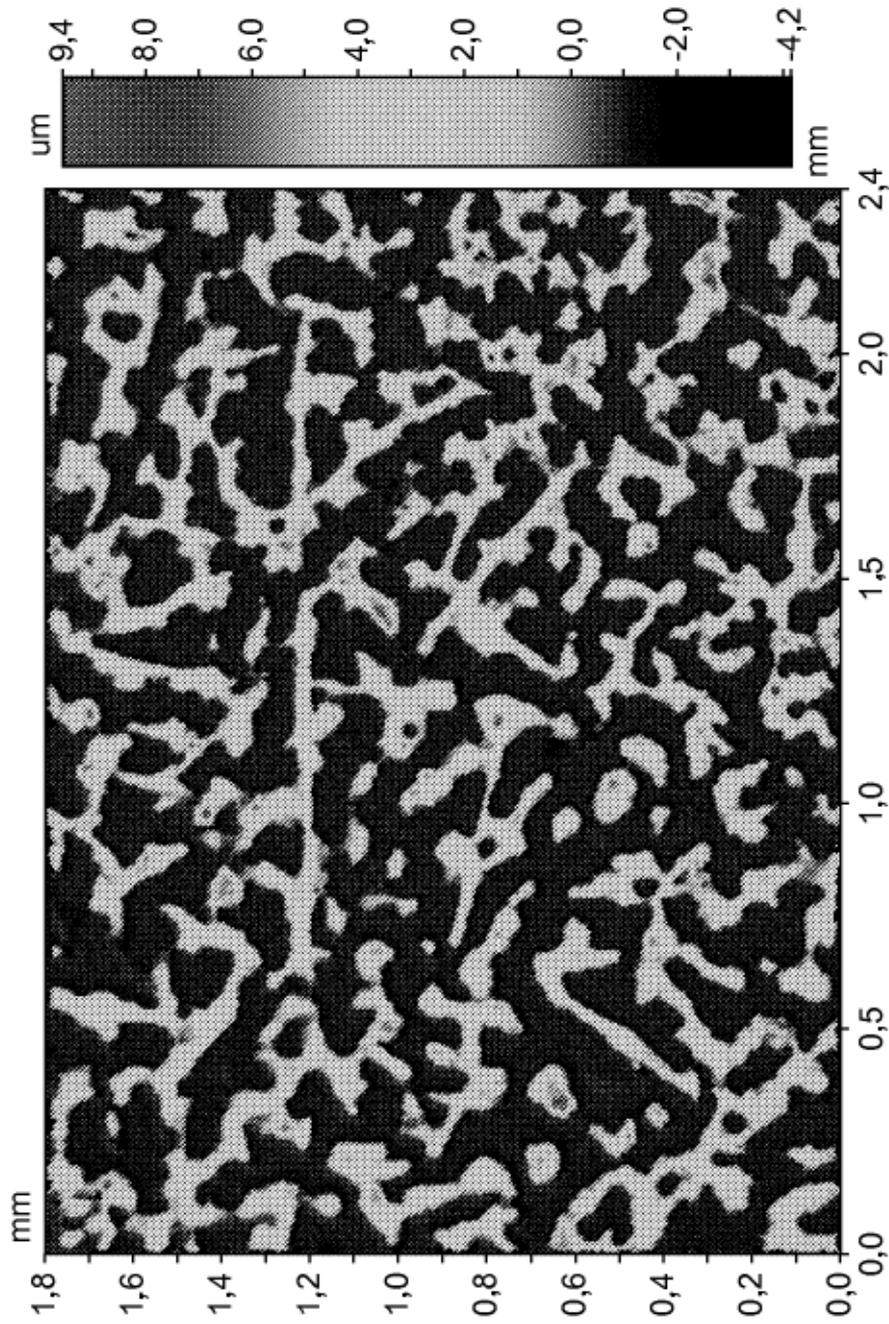


**Estadísticas superficiales**  
Ra: 622,99 nm  
Rq: 890,36 nm  
Rz: 10,52 um  
Rt: 12,76 um

**Parámetros de configuración:**  
Tamaño: 736 x 480  
Muestra: 3,22 um

**Opelones procesados:**  
Términos eliminados:  
Ninguno  
Filtro:  
Ninguno

FIG. 4



**Estadísticas superficiales:**  
 Ra: 1,34  $\mu\text{m}$   
 Rq: 1,58  $\mu\text{m}$   
 Rz: 11,90  $\mu\text{m}$   
 Rt: 13,59  $\mu\text{m}$

**Parámetros de configuración:**  
 Tamaño: 736x480  
 Muestreo: 3,22  $\mu\text{m}$

**Opciones procesadas:**  
 Términos eliminados:  
 Inclinación  
 Filtro:  
 Ninguno

FIG. 5

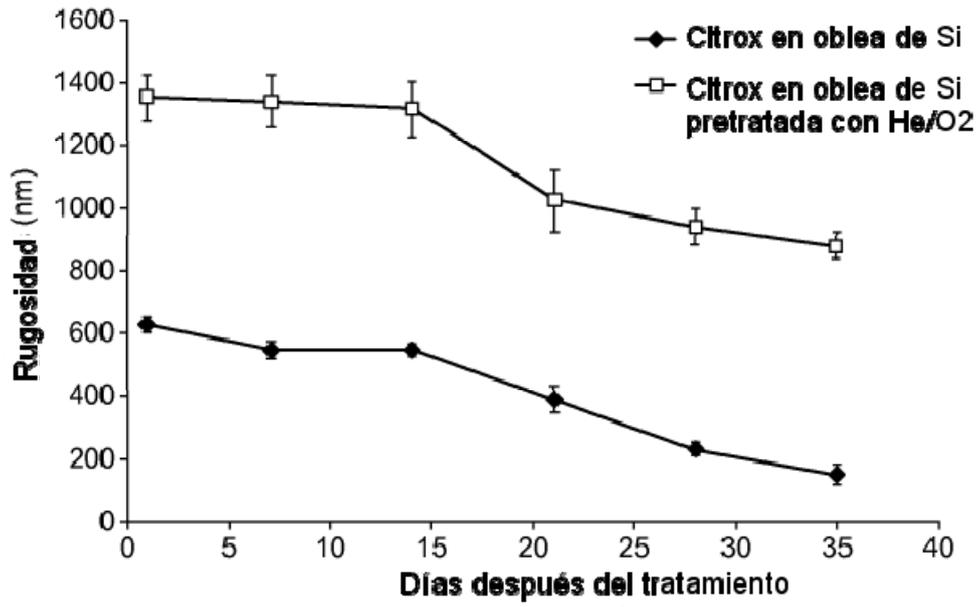


FIG. 6

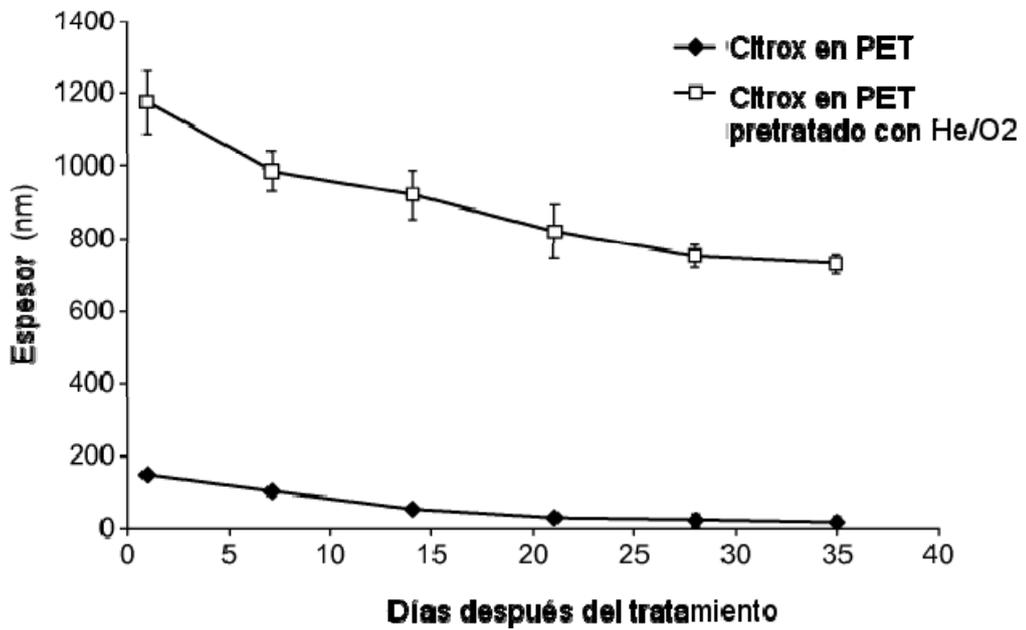
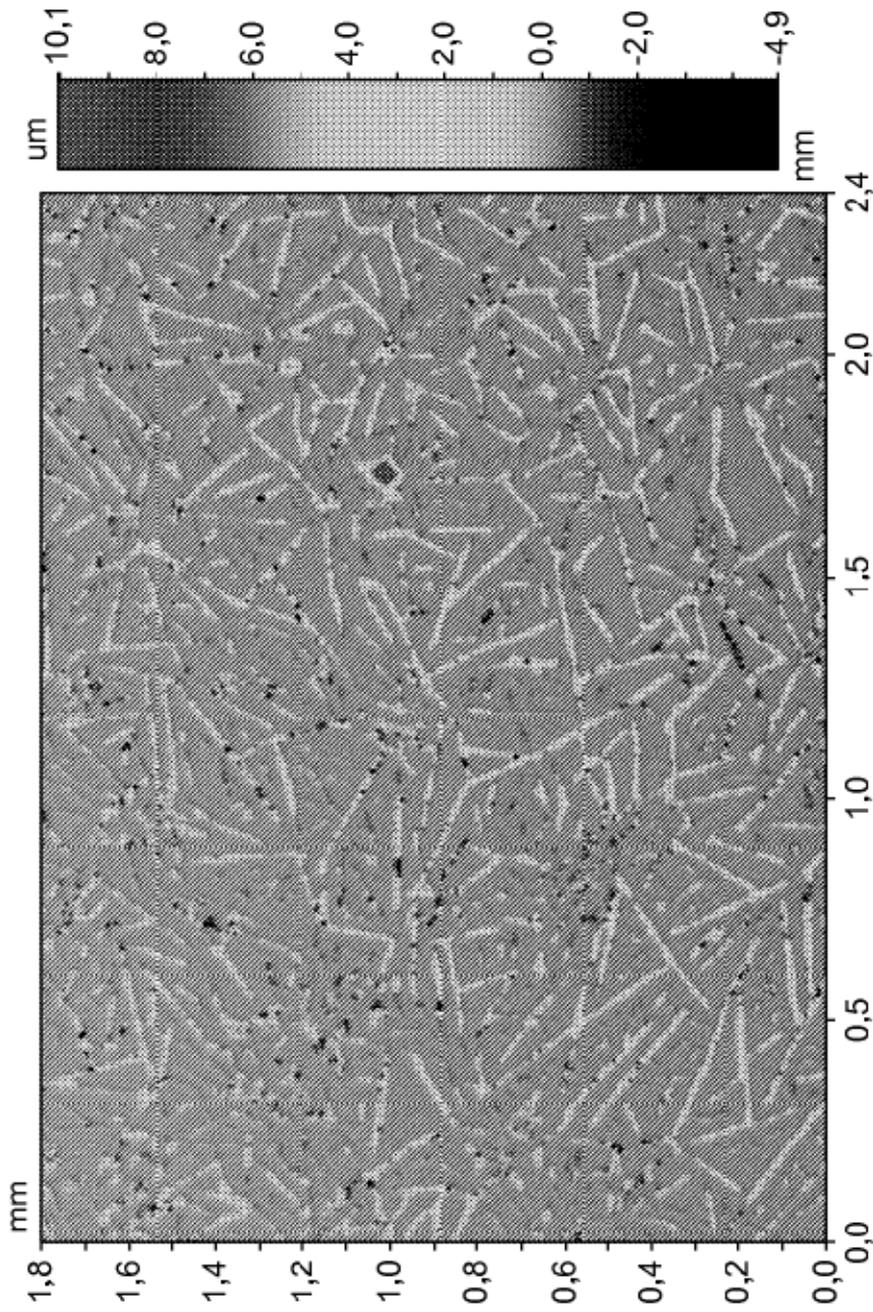


FIG. 7



**Estadísticas superficiales:**

Ra: 384.91 nm  
 Rq: 685.41 um  
 Rz: 11.95 um  
 Rt: 14.92 um

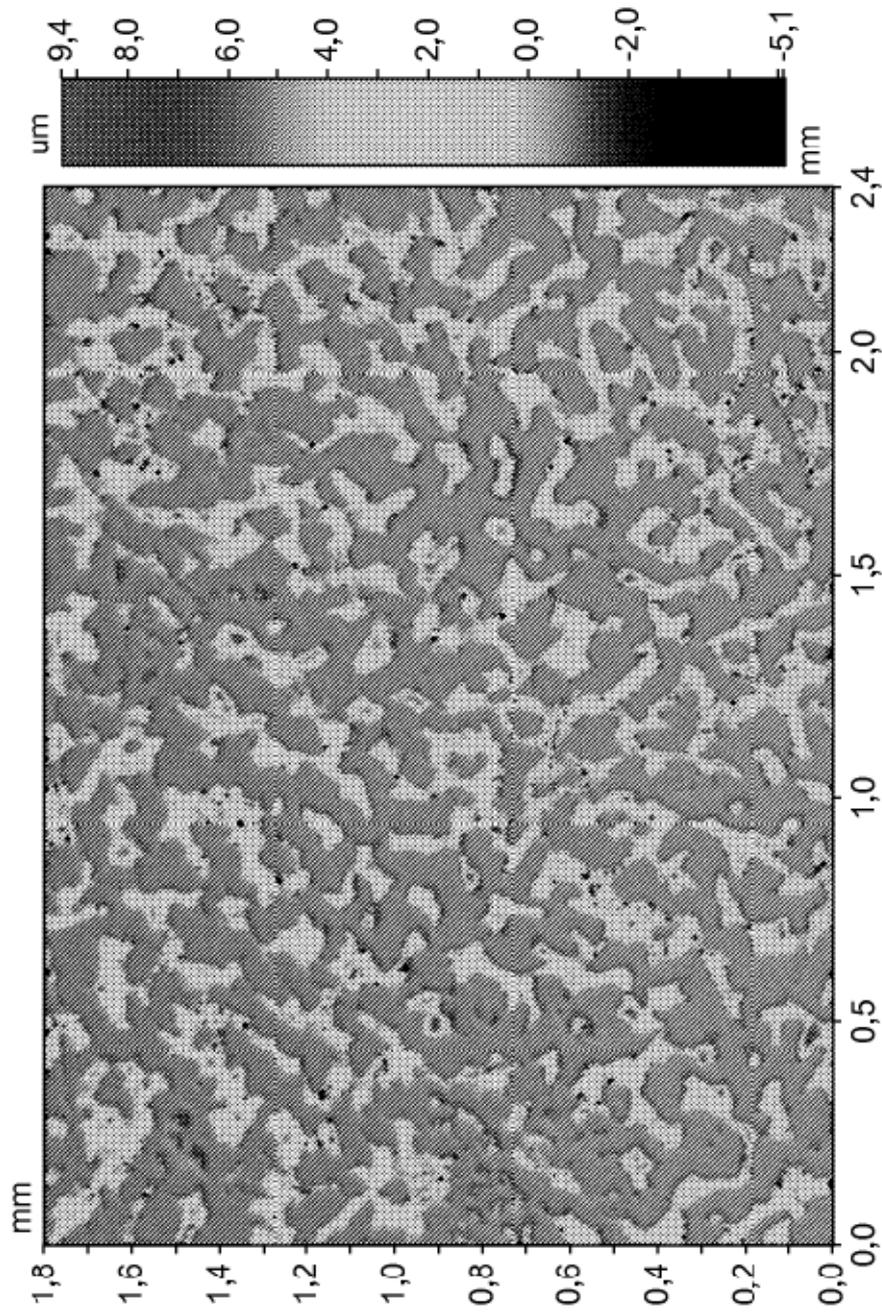
**Parámetros de configuración:**

Tamaño: 730x480  
 Muestreo: 3,22 um

**Opciones procesadas:**

Términos eliminados:  
 Ninguno  
 Filtro:  
 Ninguno

**FIG. 8**



**Estadísticas superficiales:**  
Ra: 1,01  $\mu\text{m}$   
Rq: 1,33  $\mu\text{m}$   
Rz: 13,26  $\mu\text{m}$   
Rt: 14,36  $\mu\text{m}$

**Parámetros de configuración:**  
Tamaño: 796 x 490  
Muestreo: 3,22  $\mu\text{m}$

**Opciones procesadas:**  
Terminos eliminados:  
Inclinación  
Filtro:  
Ninguno

FIG. 9

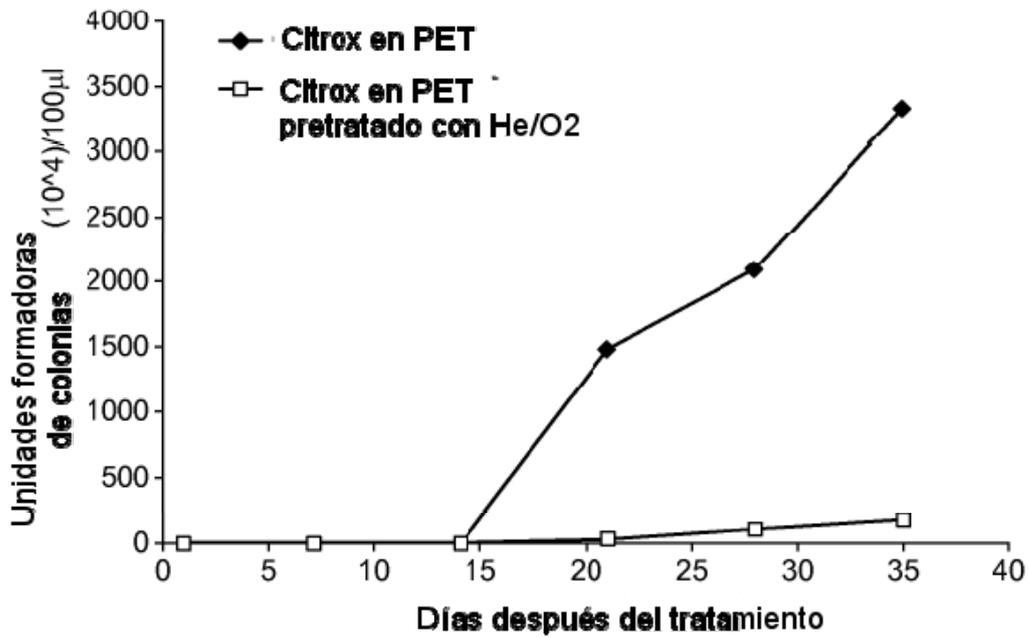


FIG. 10

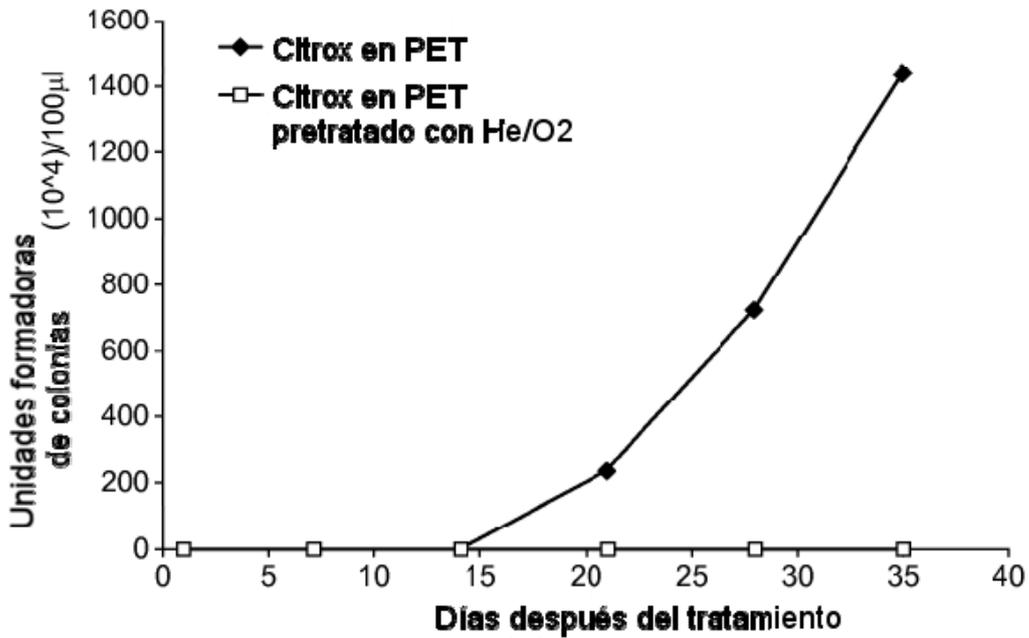


FIG. 11

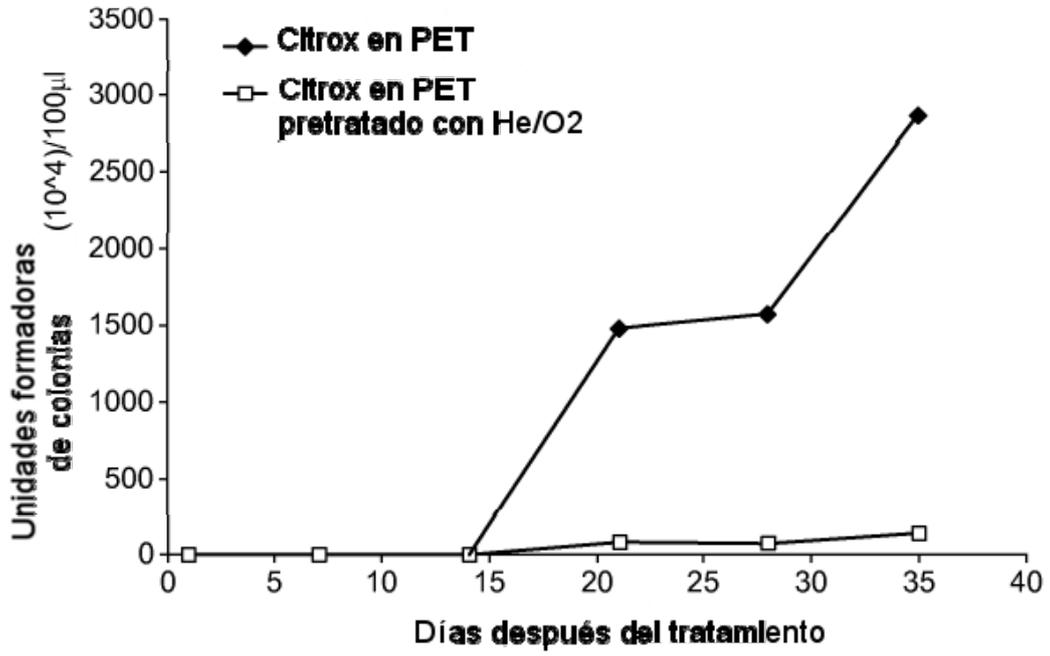


FIG. 12

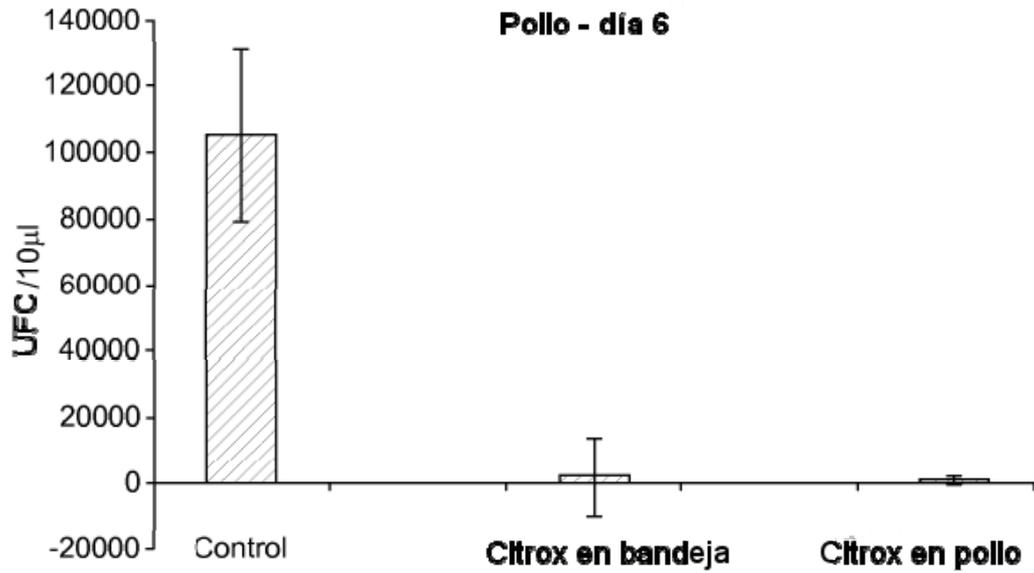
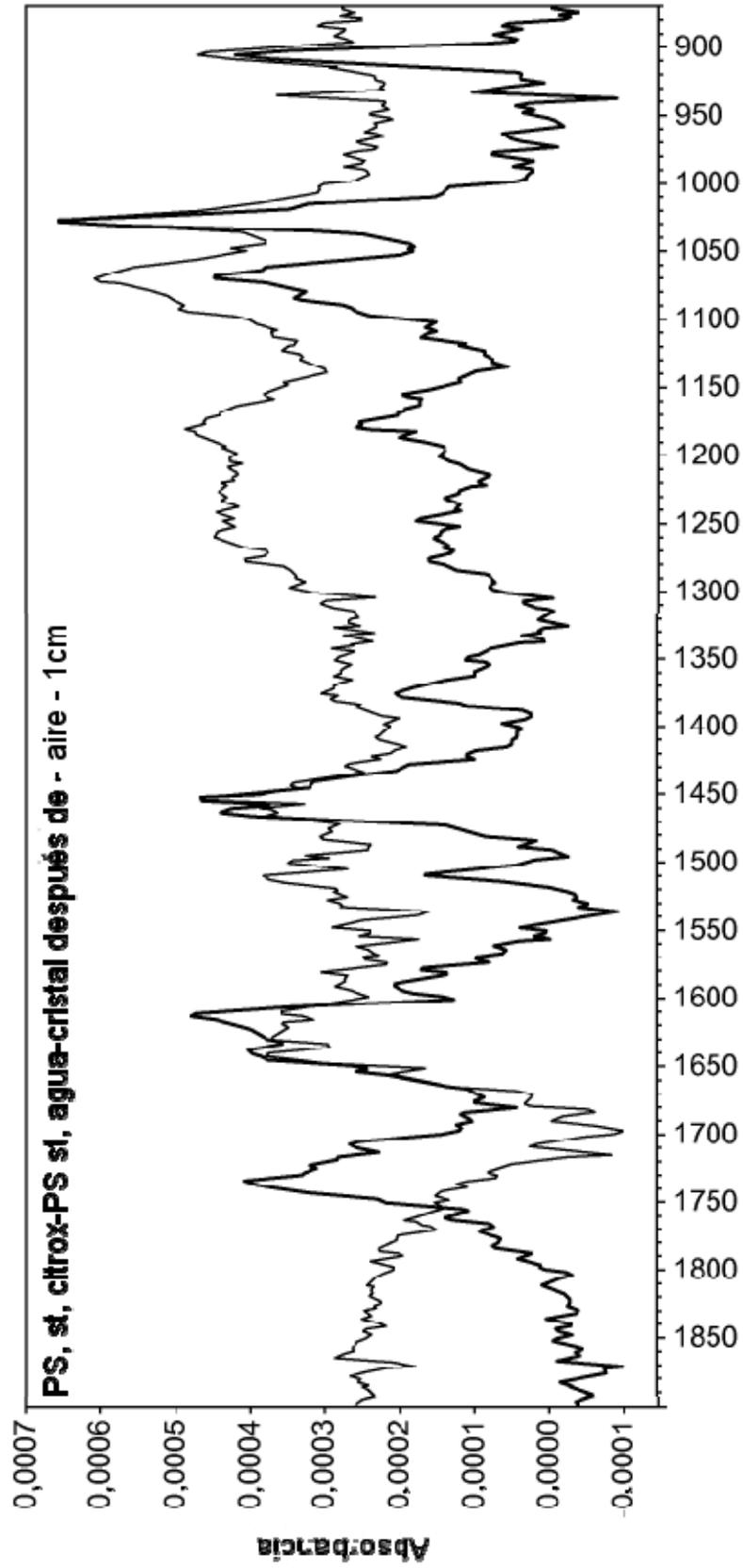
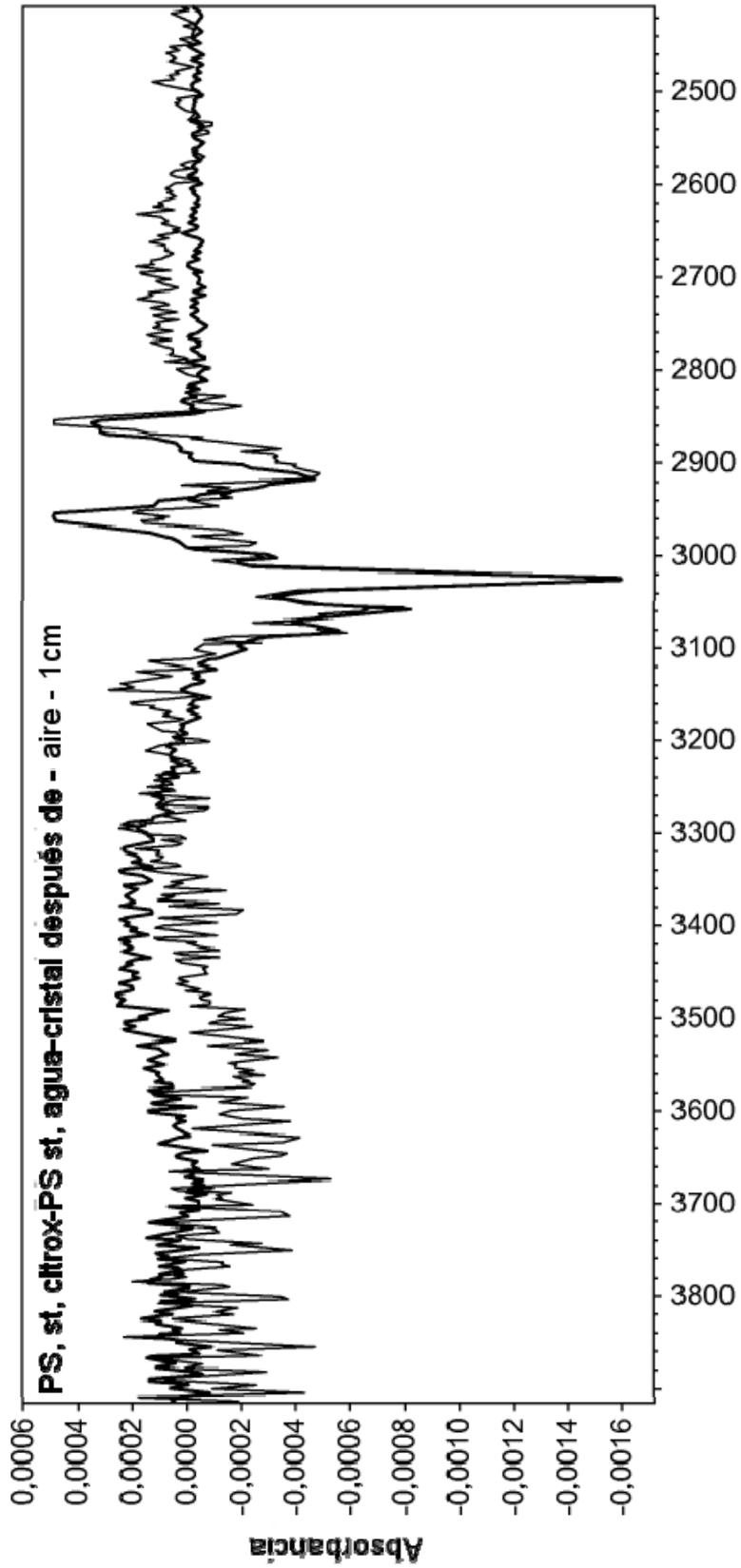


FIG. 13



**Número de onda**  
**FIG. 14**



Número de onda

FIG. 15