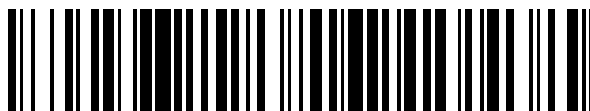


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 778 173**

51 Int. Cl.:

B82Y 30/00 (2011.01)
B82Y 5/00 (2011.01)
B82B 3/00 (2006.01)
C12N 1/06 (2006.01)
H01L 21/3065 (2006.01)
A01N 25/34 (2006.01)
C12Q 1/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.09.2014** **PCT/AU2014/050211**
87 Fecha y número de publicación internacional: **12.03.2015** **WO15031956**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.09.2014** **E 14841944 (3)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.01.2020** **EP 3041787**

54 Título: **Una superficie biocida sintética que comprende un conjunto de nanopuntas**

30 Prioridad:

05.09.2013 AU 2013903399

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.08.2020

73 Titular/es:

**GLOBAL ORTHOPAEDIC TECHNOLOGY PTY
LIMITED (100.0%)
Unit 10, 7 Meridian Place
Bella Vista NSW 2152, NZ**

72 Inventor/es:

**JUODKAZIS, SAULIUS y
IVANOVA, ELENA**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 778 173 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

Una superficie biocida sintética que comprende un conjunto de nanopuntas

5 Resumen de la invención

La presente invención se refiere a materiales que muestran actividad biocida y, en particular, a superficies que muestran una topografía superficial novedosa que es letal para las células en contacto. La invención también se refiere a dispositivos que comprenden tales superficies, a procedimientos para producir las superficies y a procedimientos para eliminar o reducir la supervivencia celular donde las células están expuestas a las superficies.

Antecedentes de la invención

Los materiales nanoestructurados a menudo poseen propiedades superficiales de profundo interés científico. Estas propiedades únicas surgen principalmente de su estructura física. Por ejemplo, muchos nanomateriales muestran características de humectación inusuales, como la superhidrofobia y la humectación anisotrópica. Las superficies superhidrofóbicas comúnmente poseen estructuras jerárquicas de superficie a nanoescala que permiten atrapar cantidades significativas de aire, lo que aumenta el ángulo efectivo de contacto con el agua. A menudo también son autolimpiantes, ya que las gotas de agua en contacto con la superficie experimentan baja adhesión y pueden moverse fácilmente a través de la superficie, barriendo las partículas contaminantes. A veces, esta capacidad de autolimpieza puede extenderse a una adhesión reducida de las células microbianas, lo que se conoce como antiincrustante. Los nanomateriales tienen un alto potencial para realizar una variedad de actividades biológicas, ya que la escala de sus estructuras físicas es de orden similar a muchos tipos celulares, especialmente bacterias.

Las nanoestructuras con propiedades únicas se encuentran con frecuencia en la naturaleza. Por ejemplo, la piel de tiburón, los pies de geco, las hojas de las plantas y las alas de los insectos son varios ejemplos de materiales naturales nanoestructurados. Como algunas de las clases más antiguas de organismos, los insectos han desarrollado estrategias para contrarrestar los efectos perjudiciales asociados con la contaminación de la superficie. A través de procedimientos evolutivos, muchos insectos han desarrollado características de superficie micro y nanotopográficas en sus alas que les permiten permanecer limpios y secos. Al utilizar estrategias similares a las desarrolladas por los insectos a través de la evolución, existe un potencial sustancial para aprovechar estas estructuras para la creación de nanomateriales funcionales novedosos.

El presente grupo de investigación informó recientemente que las alas de la cigarra *Psaltoda claripennis* posee una potente actividad bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa*, un patógeno humano oportunista^{1,2,3}. Las alas de cigarra son un ejemplo de nanomaterial natural; cuyas superficies están cubiertas por un conjunto de estructuras de nanopilares regularmente espaciadas, lo que permite atrapar una cantidad relativamente grande de aire y da como resultado la superhidrofobia de la superficie del ala. Además, se demostró que la naturaleza bactericida del ala surge de un fenómeno físico basado en la nanoestructura de la superficie, independiente de la funcionalidad bioquímica del ala^{23,26}, que implica un estiramiento de la membrana de la célula bacteriana en grietas entre los nanopilares, lo que provoca tensión en las regiones de la membrana y la lisis final y la muerte de la célula. Sobre la base de este principio físico subyacente, otras topologías pueden poseer arquitecturas de superficie que muestran destrucción celular inducida estructuralmente y características antimicrobianas.

La contaminación celular (especialmente microbiana) de las superficies es un problema mundial que enfrentan varios sectores industriales y de salud pública. Por ejemplo, la unión de células bacterianas al interior de tuberías metálicas puede provocar corrosión y picaduras inducidas biológicamente, lo que puede comprometer la integridad de la tubería. La unión de bacterias patógenas a los implantes de titanio puede dar lugar a complicaciones postoperatorias graves y puede provocar infecciones sistémicas. El equipo de procesamiento de alimentos debe mantenerse libre de patógenos transmitidos por alimentos, como *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium* para evitar resultados adversos para la salud. Las consecuencias negativas de la colonización y contaminación de la superficie microbiana pueden ser muy significativas, causando pérdidas financieras sustanciales, impactando severamente en la salud humana y, en algunos casos, causando la muerte.

Los antisépticos y desinfectantes químicos son la modalidad actual para la erradicación de bacterias, que en contextos médicos generalmente toman la forma de antibióticos de amplio espectro. La aparición de resistencia a los antibióticos entre los microbios patógenos es un problema de salud pública mundial que se agrava por la naturaleza altamente adaptable de las bacterias y su evolución acelerada provocada por la prescripción excesiva de antibióticos y por los procedimientos de selección natural. Además, el desarrollo y la producción de nuevos antibióticos se produce a un ritmo mucho más lento que la adquisición de resistencia microbiana. Una serie de esfuerzos recientes en el revestimiento de la superficie o modificaciones de la química de la superficie dieron como resultado la fabricación de un conjunto de superficies antiincrustantes que resisten la unión bacteriana,²²⁻²⁴ sin embargo, la búsqueda de

nuevas superficies antibacterianas como un componente integral de materiales avanzados sigue siendo una alta prioridad de investigación.

El desarrollo de topografías de superficie sintética que son letales para las células o muestran actividad antimicrobiana y particularmente antibacteriana (generalmente denominada en esta memoria descriptiva actividad "biocida") o que reducen el crecimiento y/o la propagación de células es de importancia comercial en una variedad de contextos. Por ejemplo, el uso de superficies biocidas sintéticas tendría una gran utilidad y contribuiría a la eficiencia, mejores resultados de salud, reducción de la transmisión de enfermedades y/o ahorro de costos en áreas tales como la atención médica y la cirugía, salud pública, saneamiento e higiene doméstica, procesamiento, preparación, producción y almacenamiento de alimentos, ambientes marinos y acuáticos, cría de animales, clínicas veterinarias, instalaciones para el cuidado de ancianos, escuelas e instalaciones para el cuidado infantil, accesorios de plomería, tratamiento y reciclaje de desechos, entre muchos otros. Específicamente, se pueden prever ventajas significativas al emplear superficies biocidas en accesorios, dispositivos y aparatos tales como paredes, pisos, techos, pasamanos, perillas y manijas, fundas de asientos, mesas, sillas, interruptores de luz, inodoros, grifos y otras superficies en entornos públicos, comerciales o domésticos, superficies de preparación de alimentos, utensilios y dispositivos para cocinar y preparar alimentos, envases y recipientes de almacenamiento de alimentos y bebidas, envoltorios de alimentos, herramientas, instrumentos y equipos médicos, quirúrgicos y dentales, implantes médicos, dentales y veterinarios, superficies de hospitales tales como pisos, paredes, fregaderos, lavabos, encimeras, camas, fundas de colchones y almohadas, muebles de hospital, guantes quirúrgicos, médicos y de preparación de alimentos, herramientas para el cabello y equipos como peines, cepillos, maquinillas de afeitar y tijeras, superficies en cocinas domésticas y comerciales como pisos, paredes, fregaderos, lavabos y mesas de trabajo, mezcladores de alimentos y bebidas y máquinas o dispositivos de procesamiento/envasado, líneas de procesamiento de alimentos y bebidas, mataderos, ropa protectora, gafas y anteojos, tuberías de agua y alcantarillado, tanques y desagües, cascos de embarcaciones y otras superficies de instalaciones acuáticas y marinas, como pilares de embarcaderos, muelles y pontones, tuberías y cables marítimos y acuáticos e instalaciones de petróleo y gas.

Las superficies sintéticas con propiedades antimicrobianas se han producido previamente mediante la creación de nanoestructuras tridimensionales en la superficie, donde se utilizó un conjunto altamente ordenado de nanopartículas o nanoclusters para crear conjuntos de elevaciones altamente ordenados [WIPO PCT, número de publicación internacional WO2013/007354A1].

Teniendo en cuenta los antecedentes de las utilidades anteriores, los presentes inventores han producido y caracterizado superficies sintéticas nanoestructuradas que muestran actividad biocida.

Otros detalles, ventajas y aplicaciones de la presente invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la misma.

Resumen de la invención

En un aspecto de la presente invención, se proporciona una superficie biocida sintética que comprende un conjunto de nanopuntas desordenadas que son letales para las células de dicha superficie, donde al menos algunas de dichas nanopuntas están ramificadas.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un dispositivo, herramienta, accesorio o aparato que comprende una superficie biocida sintética de la invención.

En otro aspecto de la presente invención, se proporciona un procedimiento no terapéutico para eliminar las células bacterianas o reducir la supervivencia celular bacteriana donde las células bacterianas están expuestas a la superficie biocida sintética de una cualquiera de la invención.

En esta invención se describe una superficie biocida sintética, que comprende un conjunto de nanopuntas que son letales para las células de dicha superficie debido a la perforación de las membranas celulares por dichas nanopuntas.

También se describe en esta invención un dispositivo que comprende una superficie como se describe anteriormente.

Además, se describe en esta invención un procedimiento para producir una superficie biocida sintética que comprende un conjunto de nanopuntas que son letales para las células de dicha superficie debido a la perforación de las membranas celulares por dichas nanopuntas, comprendiendo el procedimiento exponer una superficie de sustrato que comprende silicio a grabado de iones reactivos.

Aún más se describe en esta invención una superficie biocida sintética que comprende un conjunto de nanopuntas que son letales para las células de dicha superficie debido a la perforación de las membranas celulares por dichas

nanopuntas, producida por un procedimiento como se describe anteriormente.

Además, se describe en esta invención un procedimiento para eliminar células o reducir la supervivencia celular donde las células se exponen a una superficie biocida sintética como se describe anteriormente.

5

Breve descripción de las figuras

La invención se describirá adicionalmente con referencia a las siguientes figuras:

- 10 La figura 1 muestra micrografías electrónicas de barrido de la superficie superior de (a) bSi y (b), alas delanteras de libélula con un aumento de 35 000 × (barra de escala = 200 nm) que demuestran los patrones de superficie de las dos muestras. Cuando las superficies se inclinan en un ángulo de 53°, se puede ver que las nanoestructuras de silicio negro son más nítidas, más distintas entre sí y aproximadamente el doble de la altura de las alas de la libélula. Esta diferencia se destacó aún más utilizando perfilometría óptica (c, d). A pesar de algunas diferencias visuales, cuando se ve desde arriba como en (a) y (b), el patrón espacial de los dos es algo similar, y esto se ejemplifica aún más en (e) y (f), donde las micrografías se convierten en modelos tridimensionales mediante la generación de mapas de desplazamiento.

- La figura 2 muestra micrografías SEM representativas de *P. aeruginosa*, *S. aureus*, células vegetativas de *B. subtilis* y esporas de *B. subtilis* que parecen estar significativamente interrumpidas como resultado de las interacciones con el ala de la libélula y el silicio negro (a-d, i-l). Las correspondientes micrografías de barrido láser confocales (e-h, m-p) confirman que esta interrupción era letal para las células. Las células y esporas bacterianas no viables se tiñeron con yoduro de propidio (rojo), mientras que las células vivas se tiñeron con SYTO® 9 (verde). Todas las células aparecieron rojas, lo que indica la alta eficiencia de las superficies para inactivar las bacterias. Barras de escala SEM = 200 nm, barras de escala CLSM = 5 µm.

- La figura 3 muestra un gráfico de (a) eficiencia bactericida de silicio negro y superficies de alas de libélula. La eficiencia bactericida dinámica de bSi y las superficies de las alas de *D. bipunctata* se calcularon como el número de células muertas por centímetro cuadrado de área de superficie proyectada de muestra, por minuto de tiempo de incubación. El número de células muertas se determinó restando el número de células supervivientes del número de células que permanecen en los controles en el intervalo de tiempo correspondiente. Las pequeñas disminuciones en el número de bacterias a lo largo del tiempo observadas en los controles se deben al pequeño grado de muerte celular natural en solución salina tamponada con fosfato pobre en nutrientes. Las barras de error representan la variabilidad natural asociada con los sistemas biológicos, y se generaron sobre la base de las desviaciones estándar en las unidades formadoras de colonias, (b) muestra un gráfico de la relación entre el área de superficie proyectada de bSi y el tiempo requerido para neutralizar la dosis infecciosa mínima de los tipos celulares probados. Este gráfico demuestra que la dosis infecciosa de todos los tipos celulares probados puede neutralizarse con muestras muy pequeñas de bSi en períodos de tiempo muy cortos. Por ejemplo, una muestra de bSi de 0,2 cm² de tamaño es lo suficientemente grande como para matar la dosis infecciosa de células de *Bacillus subtilis* en aproximadamente 5 minutos.

- La figura 4 muestra información espectral XPS con exploraciones de encuestas realizadas en el intervalo de 0 a 1400 eV para encontrar la composición elemental en la capa superior de **a**, alas de libélula y **b**, la superficie bSi. A continuación, se realizaron exploraciones de alta resolución en intervalos de aproximadamente 20 eV a través de los picos O 1s y C 1s. Las mediciones del ángulo de contacto estático en **c**, las alas y **d**, la superficie bSi demuestran que las alas son superhidrofóbicas mientras que las superficies de silicio negro son moderadamente hidrófilas.

- La figura 5 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido que demuestran la actividad bactericida de bSi y las alas de la libélula *D. bipunctata* recubiertas de oro. La eficacia bactericida de bSi (**a**, **b**) y las alas de libélula (**c**, **d**) se probaron después de recubrir las con una fina capa de oro. Ambas superficies mantuvieron su actividad bactericida contra *Pseudomonas aeruginosa* (**a**, **c**) y *Staphylococcus aureus* (**b**, **d**).

- La figura 6 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido que muestran la morfología celular de **a**, *Pseudomonas aeruginosa* **b**, *Staphylococcus aureus* **c**, células vegetativas de *Bacillus subtilis* y **d**, esporas de *B. subtilis* en superficies de control de vidrio. Las barras de escala son de 1 µm.

- La figura 7 muestra imágenes de microscopía electrónica de barrido que muestran la morfología celular de **a**, *Pseudomonas aeruginosa* **b**, *Staphylococcus aureus* **c**, células vegetativas de *Bacillus subtilis* y **d**, esporas de *B. subtilis* en superficies lisas de control de silicio. Las barras de escala son de 1 µm.

- La figura 8 muestra gráficos de barras que demuestran la disminución de la concentración de células bacterianas por las superficies de bSi. El número de todos los tipos celulares en suspensión disminuyó cuando se incubaron en presencia de superficies bSi durante 30 horas. Cuando se incubó durante intervalos de tiempo más largos

(especialmente 24 horas y 30 horas), el número de células tendía a disminuir también en los controles, debido al medio pobre en nutrientes. Los datos de esporas en suspensión después de 24 horas y 30 horas se excluyeron debido a complicaciones derivadas de la germinación de esporas.

- 5 La figura 9 proporciona un análisis cuantitativo de las interacciones de eritrocitos con superficies dispuestas en nanopilares autoorganizadas de silicio negro. (a) imágenes SEM (vista superior) que muestran interacciones de eritrocitos con superficies de bSi durante tres horas de contacto, (b) unión dinámica de eritrocitos en bSi y oblea de silicio comercial; los datos se representaron como el número total promedio de células unidas de 10 áreas diferentes de 3 experimentos independientes, (c) proporción de eritrocitos intactos y rotos en superficies bSi; los eritrocitos que
10 mantuvieron su forma bicóncava en la superficie se consideraron como células intactas y las "impresiones celulares" de las células dañadas en los nanopilares se consideraron como "células rotas".

- La figura 10 muestra las alteraciones morfológicas de los eritrocitos mientras interactúan con las superficies dispuestas en nanopilares bSi. Las micrografías SEM (a) vista superior y (b) lateral que muestran un procedimiento de ruptura
15 paso a paso de un solo eritrocito. Una célula sana y bicóncava se ha deformado una vez en contacto con las superficies y finalmente se ha roto. Algunos fragmentos de la célula y/o membrana rotas se pueden ver y considerar como "impresión celular". El análisis CLSM (c) confirmó la ruptura de los eritrocitos. Las células se tiñeron con perclorato de 1,1'-dioctadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina. Las imágenes CLSM se tomaron a los 5, 15 y 30 minutos después del contacto celular con las superficies bSi.

- 20 La figura 11 proporciona un análisis Raman de RBC unidos y rotos en superficies de silicio negro. (a) pico característico de silicio a 520 cm^{-1} y (c) la integración de la actividad Raman desde 480 cm^{-1} hasta 560 cm^{-1} . (b) picos característicos de las moléculas de hemoglobina de los eritrocitos y (d) la integración de la actividad Raman desde 1209 cm^{-1} hasta 1660 cm^{-1} , (e) CLSM y (f) imágenes SEM de eritrocitos que se rompen en superficies de silicio negro.
25 Los eritrocitos se incubaron con bSi durante 30 minutos en todos los experimentos. Las líneas discontinuas azules y redondas indican células que aún conservan su forma bicóncava. Las líneas discontinuas amarillas y rectangulares ubican la "impresión celular" de los eritrocitos completamente rotos.

- La figura 12 proporciona un análisis de la superficie de silicio autoorganizado dispuesto en nanopilares, (a) imagen
30 SEM de vista superior típica de silicio nanopilar grabado durante 5 minutos (la barra de escala es de 500 nm). (b) % de área y distribución de población de nanopilares que muestran un máximo a 38 nm en la población y 49 nm en el % de área, extendiéndose hasta 100 nm de diámetro. El hombro y la cola de las distribuciones representaban la agregación de puntas de nanopilares. (c) la transformada rápida de Fourier de la imagen SEM de vista superior mostró un anillo intenso extendido a cuatro lóbulos ortogonales anchos; una evidencia de un patrón cuadrado distorsionado.
35 (d) el perfil de intensidad de escala de grises (escala de 0 a 255) en uno de los pares de lóbulos indicaba que la medida de la distancia promedio entre nanopilares adyacentes era de 185 nm, los hombros extendidos representaban nanopilares ordenados a distancias mayores. (e) imagen SEM de vista lateral típica de nanopilares. (f) esquema de un nanopilar con dimensiones calculadas como el promedio $\pm$ varianza de 50 mediciones en cinco imágenes SEM.

40 Descripción detallada de la invención

- A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, se entenderá que la palabra "comprender" y variaciones como "comprende"; y "que comprende" implican la inclusión de un elemento integrante o etapa o grupo de elementos integrantes establecidos o etapas, pero no la exclusión
45 ningún otro elemento integrante o etapa o grupo de elementos integrantes o etapas.

- La referencia a cualquier técnica anterior en esta memoria descriptiva no es, y no debe tomarse como, un reconocimiento o cualquier forma de sugerencia de que esa técnica anterior forme parte del conocimiento general común en Australia.

- 50 Como se mencionó anteriormente, se describe en esta invención una superficie biocida sintética que comprende un conjunto de nanopuntas que son letales para las células que entran en contacto con la superficie debido a la perforación de las membranas celulares por las nanopuntas. Las superficies de la invención se denominan "sintéticas" para dejar claro que las superficies se producen en un procedimiento de producción o síntesis artificial, y para excluir
55 de ese modo del alcance de la invención las superficies que pueden tener una topología de superficie similar que existe en naturaleza.

- Las topografías de superficie sintética según la invención que son letales para las células o muestran actividad antimicrobiana y particularmente antibacteriana se refieren generalmente a lo largo de esta memoria descriptiva como
60 que muestran actividad "biocida". Es decir, al entrar en contacto con las superficies, las células se lisarán y matarán. Sin embargo, se apreciará que, aunque es "biocida", las superficies de la invención no matarán inmediatamente a todas las células expuestas a las superficies. Más bien, se requerirá un período de exposición que permita que una

proporción de células en una población de células expuestas a la superficie entren físicamente en contacto con las nanopuntas de la superficie (también llamadas "nanopilares") y que las membranas celulares se perforan de ese modo. Por lo tanto, dependiendo de la concentración de células expuestas a la superficie, la duración de la exposición y el área superficial de la superficie a la que están expuestas, la superficie puede no ser letal para todas las células. Sin embargo, aunque las superficies serán letales para al menos algunas de las células desde una perspectiva de población celular, se puede observar una reducción en el crecimiento y/o propagación celular. Los ensayos de rutina para determinar el número de colonias celulares y/o la propagación (como el recuento en placas estándar⁹) y la tinción para identificar la lisis celular están disponibles para demostrar la actividad biocida. Las técnicas microscópicas tales como la microscopía de barrido láser confocal y la microscopía electrónica de barrido también se pueden usar para observar el efecto biocida de las superficies según la invención.

Además de las superficies biocidas descritas en esta invención, se describen procedimientos para eliminar células, reducir la supervivencia celular y/o reducir el crecimiento y/o la propagación celular que implican exponer las células a las superficies biocidas. Preferentemente, la exposición será tal que una alta proporción de cualquier población de células que se pretende eliminar tendrá acceso físico a la superficie para permitir la interacción directa entre las células y las nanopuntas. Por supuesto, esta dinámica puede variarse modificando la concentración celular en cualquier medio expuesto a la superficie, modificando el área superficial de la superficie nanoestructurada a la que están expuestas las células y modificando la duración de la exposición. La reducción del crecimiento celular, la propagación y/o la supervivencia se puede determinar fácilmente utilizando las técnicas mencionadas anteriormente, en comparación con poblaciones equivalentes de células expuestas a una superficie inerte, como el silicio liso o el vidrio. Por ejemplo, las superficies de la invención pueden mostrar actividad bactericida cuantificada en términos de tasas de destrucción de ~450 000 células min⁻¹ cm⁻² durante las primeras 3 h. La tabla 1 a continuación proporciona el área de superficie requerida para eliminar las dosis infecciosas¹⁷⁻¹⁹ de varias bacterias patógenas en un intervalo de períodos de tiempo. En este intervalo de desafíos infecciosos bacterianos, estas topologías de superficie requieren áreas del orden de 103-104 μm² para eliminar sus respectivas dosis infecciosas durante los períodos de tiempo probados.

Tabla 1. La tasa de destrucción (a) de las superficies de libélula y silicio negro durante periodos de 3 y 18 horas, junto con el área superficial requerida (b) para eliminar dosis inefectivas durante dichos periodos de tiempo. Las actividades bactericidas de ambas superficies topológicamente relacionadas parecen ampliamente comparables, lo que incluye su actividad hacia las esporas.

(a)

	Tasa de destrucción (×10 ⁴ células min ⁻¹ cm ⁻²)			
	Ala de libélula		bSi	
	3 h	18 h	3 h	18 h
<i>S. aureus</i>	46	3	45	7
<i>P. aeruginosa</i>	30	7	43	9
<i>B. subtilis</i>	14	4	14	4
Esporas	10	3	6	3

(b)

	Dosis inefectiva (células)	Área de eliminación de dosis inefectiva durante los periodos de tiempo (μm ²)			
		Ala de libélula		bSi	
		3 h	18 h	3 h	18 h
<i>S. aureus</i>	100000	1200	3400	1200	1300
<i>P. aeruginosa</i>	1000	19	14	13	10
<i>B. subtilis</i>	100000	4100	2400	3900	2400
Esporas	100000	5400	3800	9100	3600

Las superficies de la invención y los procedimientos descritos en esta invención son efectivos para eliminar células, reducir la supervivencia celular, reducir el crecimiento y/o la propagación celular o una amplia variedad de células que incluyen células procariotas y eucariotas, y específicamente células de bacterias gram positivas y gram negativas (incluyendo esporas), células vegetales (incluidas las algas), células animales, células de organismos marinos y acuáticos, células de hongos (incluidas las levaduras), células protistas, células de helmintos y células de otros microorganismos como protozoos, arqueas, rotíferos y planarias. Las células infectadas por virus también se pueden eliminar según la invención. La presente invención se adoptará particularmente para la eliminación de células u organismos que son antiestéticos (como algas, moho, hongos), malolientes, corrosivos y especialmente que son una amenaza para la salud humana o animal. Los ejemplos específicos de células u organismos patógenos y no patógenos que pueden eliminarse según la presente invención incluyen, pero no se limitan a *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Escherichia coli*, *Branhamella catarrhalis*, *Planococcus maritimus*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*. En particular, se espera que las superficies de la invención sean letales para otros organismos procariotas con estructuras de paredes celulares similares, como han demostrado los inventores en cuanto a que la estructura de la pared celular es de hecho uno de los principales determinantes de la rigidez celular y, por consiguiente, de la susceptibilidad a superficies mecano-sensibles independientemente de la morfología celular o afiliación filogenética ¹².

Las superficies biocidas según la presente invención se caracterizan por la presencia de un conjunto de nanopuntas, que está desordenado, que son letales para las células expuestas a ellas. Por ejemplo, las nanopuntas pueden, en promedio dentro de una superficie dada, tener una altura desde la superficie de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 600 nm, tal como de aproximadamente 150 nm a aproximadamente 550 nm, de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 500 nm, de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 450 nm o de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 400 nm. En un aspecto de la invención, las nanopuntas tienen una altura promedio de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 500 nm. La altura (y otras dimensiones promedio de las nanopuntas) se pueden determinar fácilmente, por ejemplo, mediante microscopía electrónica de barrido. Aunque no necesariamente, las nanopuntas pueden tener un diámetro mayor en o hacia su base (es decir, en la unión de las puntas a la superficie) de modo que se estrechen hacia su extremo libre hasta una punta tan fina como alrededor de 4 nm de diámetro. Por ejemplo, a la mitad de la altura máxima, las nanopuntas pueden tener un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 300 nm, tal como de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 150 nm, de 25 nm a aproximadamente 100 nm, de 30 nm a aproximadamente 60 nm o de aproximadamente 35 nm a aproximadamente 50 nm. En un aspecto, las nanopuntas tienen un diámetro promedio de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 50 nm o de 25 nm a aproximadamente 40 nm a la mitad de su altura máxima.

A medida que los inventores entienden que la actividad biocida de las superficies nanoestructuradas es el resultado de las nanopuntas que perforan las membranas celulares, se entiende que la nitidez de las nanopuntas es un elemento importante en la actividad biocida. Por lo tanto, en un aspecto, la punta o los extremos libres de las nanopuntas tienen, en promedio, un diámetro de aproximadamente 4 nm a aproximadamente 50 nm, tal como de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 40 nm o de aproximadamente 15 nm a aproximadamente 30 nm y deseablemente, el diámetro promedio de la punta es de aproximadamente 10 nm a aproximadamente 25 nm.

En un aspecto, el centro de las nanopuntas, cuando se ve la superficie desde arriba, se puede ubicar, en promedio, a una distancia de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 700 nm, tal como de aproximadamente 250 nm a aproximadamente 600 nm o de aproximadamente 300 nm a aproximadamente 500 nm. En algunas superficies según la invención, al menos algunas de las nanopuntas están ramificadas, a menudo, pero no necesariamente, en o hacia sus extremos libres para tener de este modo dos o más, generalmente dos o tres puntas.

Cualquiera de los diversos diámetros de punta, diámetros de nanopuntas a la mitad de la altura máxima, distancias de separación de nanopuntas y alturas de nanopuntas mencionadas anteriormente se pueden combinar (según sea posible) y se considera que se describen específicamente en esta invención. En una realización de la invención, la relación de aspecto (altura/anchura (anchura total a la mitad de la altura máxima) es de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 3, tal como de aproximadamente 1 a aproximadamente 2,5 o de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2.

Aunque no es esencial, es deseable que las nanopuntas muestren un nivel de flexibilidad para permitir que las puntas de las nanopuntas adyacentes se junten, sin fracturarse. La separación de nanopuntas adyacentes se puede controlar controlando la humedad atmosférica, la humectación de la superficie y el tratamiento de la superficie con disolventes, por ejemplo. En un aspecto, las nanopuntas se caracterizan por un módulo de elasticidad de Young de aproximadamente 10 GPa a aproximadamente 300 GPa, tal como de aproximadamente 50 GPa a aproximadamente 200 GPa o de aproximadamente 100 GPa a aproximadamente 150 GPa.

En general, se entenderá que las superficies de la invención generalmente estarán de alguna manera unidas o adheridas a un material de sustrato o pueden ser integrales con el material de sustrato, tal como formándose

integralmente a partir de un solo material o formándose a través de un procedimiento de deposición graduada, por ejemplo, donde no hay un límite definido entre el sustrato y la superficie, pero donde hay un cambio gradual en el carácter de ser más tipo material de sustrato a ser más tipo material de superficie. Por ejemplo, tales interfaces graduadas entre un material de sustrato y el material de superficie pueden generarse usando una estrategia de producción de deposición de plasma donde el contenido de gas generador de plasma cambia progresivamente de ser más como el material del sustrato a ser más como el material de la superficie. Dependiendo de la naturaleza del sustrato y los materiales de la superficie, los materiales de la superficie pueden fijarse a un material de sustrato por medios conocidos, tales como el uso de adhesivos convencionales o unión por calor. La superficie de la invención también puede tomar la forma de un revestimiento, funda o cubierta que tiene la forma y el tamaño para ajustarse fácilmente al artículo o dispositivo de sustrato, por ejemplo, permitiendo un ajuste removible.

Los sustratos a los que se pueden aplicar superficies según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, metal, semiconductores, polímeros, materiales compuestos y/o materiales cerámicos. Dichos materiales pueden formar, o pueden formar partes o componentes de, otros dispositivos, herramientas, accesorios o aparatos en cuya superficie se desea eliminar o al menos ralentizar el crecimiento o la progresión de las células biológicas, y en particular las células que son infecciosas, patógenas, malolientes y/o antiestéticas, por ejemplo. Los dispositivos, herramientas, accesorios y aparatos según la presente invención incluyen, pero no se limitan a, paredes, pisos, techos, pasamanos, perillas de puertas, manijas, fundas de asientos, mesas, sillas, interruptores de luz, inodoros, grifos, fregaderos, lavabos, mesas de trabajo, camas, fundas de colchones y almohadas, muebles de hospital, superficies de preparación de alimentos, utensilios y dispositivos para cocinar y preparar alimentos, envases y recipientes para almacenamiento de alimentos y bebidas, envoltorios de alimentos, herramientas, instrumentos y equipos médicos, quirúrgicos, veterinarios y dentales, implantes médicos, dentales y veterinarios, guantes, peines, cepillos, maquinillas de afeitar, tijeras, mezcladoras de alimentos y bebidas y dispositivos o máquinas de procesamiento/envasado, líneas de procesamiento de alimentos y bebidas, accesorios y herramientas para mataderos, ropa protectora, gafas y anteojos, tuberías de agua y alcantarillado, tanques y desagües, cascos de embarcaciones e instalaciones acuáticas y marinas; y componentes de los mismos, que incluyen, entre otros, revestimientos y laminados para paredes y suelos para pisos, muebles, paredes, encimeras y otras superficies. También es posible que las superficies nanoestructuradas de la invención se apliquen a materiales en forma de, por ejemplo, hebras, fibras, piezas o partículas (por ejemplo, una nano o micropartícula tal como una nano o microesfera) que pueden incluirse en mezclas de producción de polímeros y en composiciones de revestimiento o impresión, como pinturas, colorantes o tintas (incluidas las tintas de impresión 3D) para formar un sustrato, o que pueden aplicarse a un sustrato, para impartir actividad biocida sobre el sustrato así tratado. Las fibras, hilos o hebras de material al que se han impartido las superficies nanoestructuradas de la invención se pueden incorporar en telas tejidas y materiales que a su vez se pueden incorporar en productos tales como prendas de vestir que incluyen ropa protectora, cortinas, ropa de cama, revestimientos de muebles, telas, toallas, vendajes para heridas, mascarillas faciales, vendajes y toallitas para impartir carácter biocida/desinfectante al producto. Las superficies de la invención también se pueden usar para iniciar la lisis o la ruptura de las células, cuyo contenido puede ser deseable analizar, como puede ser el caso de las células humanas o de otros mamíferos para detectar infecciones, enfermedades, bioquímica celular o predisposición genética. Específicamente, esta técnica puede aplicarse a células sanguíneas y particularmente a los glóbulos rojos, empleándose las superficies de la invención en frascos de muestras, portaobjetos de microscopio, componentes de ensayo o dispositivos microfluídicos.

Las superficies nanoestructuradas de la presente invención pueden formarse a partir de una variedad de materiales tales como metal, semiconductores, polímeros, materiales compuestos y/o materiales cerámicos. Dichos materiales pueden tomar la forma de un bloque, hoja, película, lámina, tubo, hebra, fibra, pieza o partícula (por ejemplo, una nano o micropartícula como una nano o microesfera), polvo, artículo conformado, artículo previsto, moldeado o texturizado o tela tejida o fibra en masa presionada en una hoja (por ejemplo, papel) de metal, semiconductor, polímero, material compuesto y/o cerámica. Dependiendo de la naturaleza del material que se usa para formar la superficie nanoestructurada, el procedimiento de fabricación necesariamente se modificará. Sin embargo, se pueden adoptar técnicas convencionales en la técnica de la nanofabricación, como la litografía y las estrategias de deposición química. Entre los ejemplos de técnicas específicas que se pueden adoptar con los materiales apropiados se incluyen la litografía de rayos X, fotolitografía, litografía ultravioleta extrema (EUV), nanolitografía termoquímica (TCNL), magnetolitografía (ML), litografía de sonda de barrido (SPL), nanolitografía microscópica de fuerza atómica (AFM), litografía de escritura directa con haz de electrones (EBDW), litografía de nanoimpresión (NIL), litografía de microscopio de túnel de barrido (STM) y grabado de iones reactivos (RIE).

Por ejemplo, el grabado con iones reactivos (RIE) se puede llevar a cabo en presencia de SF_6 y O_2 . En una realización, se usa un material de silicio dopado con boro como sustrato expuesto a RIE, aunque se pueden utilizar igualmente otros sustratos tales como polímeros o sustratos de Si de cualquier tipo (incluyendo tipo n y p o semiaislante). En un ejemplo específico, una oblea de Si comercial dopada con boro de tipo p de 100 mm de diámetro con resistividad específica de $10\text{-}20\ \Omega\ \text{cm}^{-1}$, (100) superficie orientada y $525 \pm 25\ \mu\text{m}$ de espesor (Atecom Ltd, Taiwán) pueden usarse como sustrato para RIE, en este caso dando como resultado la formación de bSi. Por ejemplo, se puede adoptar convenientemente una presión de procedimiento de aproximadamente 30 mTorr a aproximadamente 40 mTorr y una

potencia RIE de aproximadamente 80 W a aproximadamente 120 W. En otro lugar se proporcionan más detalles sobre el uso de la estrategia RIE, específicamente en relación con la fabricación de Si negro ^{4/5}.

Los términos "metal" o "metálico", como se usan en esta invención, se refieren a elementos, aleaciones o mezclas que muestran o que muestran al menos en parte enlaces metálicos. Los metales preferidos según la invención incluyen hierro elemental, cobre, zinc, plomo, aluminio, titanio, oro, platino, plata, cobalto, cromo, vanadio, tántalo, níquel, magnesio, manganeso, molibdeno, tungsteno y aleaciones y mezclas de los mismos. Las aleaciones metálicas particularmente preferidas según la invención incluyen cobalto, níquel titanio, titanio vanadio aluminio y acero inoxidable.

El término "cerámica" como se usa en esta invención pretende abarcar materiales que tienen una estructura cristalina o al menos parcialmente cristalina formada esencialmente a partir de compuestos inorgánicos y no metálicos. En general, se forman a partir de una masa fundida que se solidifica al enfriarse o se forman y maduran simultáneamente o posteriormente (sinterizadas) por calentamiento. Los productos de arcilla, vidrio, cemento y porcelana se incluyen en la categoría de cerámica y las clases de cerámica incluyen, por ejemplo, óxidos, silicatos, siliciuros, nitruros, carburos y fosfatos. Los compuestos cerámicos particularmente preferidos incluyen óxido de magnesio, óxido de aluminio, hidroxiapatita, nitruro de titanio, carburo de titanio, nitruro de aluminio, óxido de silicio, óxido de zinc y óxido de indio y estaño.

El término "semiconductor", como se usa en esta invención, se refiere a materiales que tienen una resistividad más alta que un conductor, pero una resistividad más baja que una resistencia; es decir, demuestran una brecha de banda que puede aprovecharse de manera útil en aplicaciones eléctricas y electrónicas, como diodos, transistores y circuitos integrados. Los ejemplos de materiales semiconductores incluyen silicio, dióxido de silicio (sílice), germanio, arseniuro de galio, antimonuro de indio, diamante, carbono amorfo y silicio amorfo. Si se utiliza silicio, el silicio puede ser silicio dopado, tal como silicio dopado con boro.

En un aspecto de la invención, el material a partir del cual se forma la superficie nanoestructurada de la invención es silicio negro (bSi). El silicio negro es un nanomaterial que ha recibido una atención significativa como material fotovoltaico prometedor que puede fabricarse con plasma ²⁰ o tratamiento con láser ²¹. El material se denomina "silicio negro" debido a sus propiedades de dispersión y absorción de luz, que se deben a los pilares en forma de aguja grabados en la superficie. Se puede producir fácilmente mediante una técnica de grabado de iones reactivos relativamente simple ^{4/5}. Al manipular las condiciones de grabado, se puede lograr un grado de control sobre las dimensiones de la característica a nanoescala ^{4/5}. Sin embargo, hasta la fecha, ningún estudio ha informado sobre las propiedades biológicas de bSi, especialmente bSi con las características específicas según la presente invención.

Los materiales "compuestos" comprendidos por la presente invención incluyen aquellos que son combinaciones o mezclas de otros materiales, tales como materiales compuestos metálicos/cerámicos (denominados "cermets") y compuestos de material polimérico que incluyen algún contenido metálico, cerámico o semiconductor, componentes o elementos. Dichos compuestos pueden comprender mezclas íntimas de materiales de diferente tipo o pueden comprender ordenados, conjuntos o capas o elementos definidos de diferentes materiales.

Los "polímeros" en el contexto de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, polímeros convencionales y polímeros producidos por deposición de plasma tales como poliolefinas que incluyen polietileno de baja densidad (LDPE), polipropileno (PP), polietileno de alta densidad (HDPE), ultra polietileno de alto peso molecular (UHMWPE), mezclas de poliolefinas con otros polímeros o cauchos; poliéteres, tales como polioximetileno (acetal); poliamidas, tales como poli(hexametilen adipamida) (Nylon 66); poliimidas; policarbonatos; polímeros halogenados, tales como fluoruro de polivinilideno (PVDF), politetrafluoroetileno (PTFE) (Teflon™), copolímero de etileno-propileno fluorado (FEP) y cloruro de polivinilo (PVC); polímeros aromáticos, tales como poliestireno (PS); polímeros de cetona tales como polieteretercetona (PEEK); polímeros de metacrilato, tales como polimetilmetacrilato (PMMA); poliésteres, tales como tereftalato de polietileno (PET); y copolímeros, tales como ABS y mezcla de etileno propileno dieno (EPDM).

El término "deposición conjunta", como se usa en esta invención, se refiere a un procedimiento de deposición que deposita al menos dos especies en una superficie simultáneamente, lo que puede implicar variar con el tiempo las proporciones de los dos o más componentes para lograr capas graduadas de deposición superficial. Más preferentemente, la deposición de esta capa graduada se inicia con la deposición solo del material de sustrato, observando que las capas depositadas antes de la deposición de especies que contienen carbono se convierten en el sustrato efectivo. Esto puede dar como resultado una interfaz mixta o graduada entre materiales.

Por el término "interfaz mixta o graduada" se pretende denotar una región en el material en la que las proporciones relativas de dos o más componentes constituyentes varían gradualmente según un perfil dado. Un procedimiento por el cual se genera esta interfaz mixta o graduada es mediante implantación iónica. Esto logra una transición del material del sustrato al material de polímero de plasma depositado. Durante el procedimiento, cualquiera de, o cualquier

combinación de, el voltaje, la longitud del pulso, la frecuencia y el ciclo de trabajo de los pulsos de implantación de iones de inmersión en plasma (PIII) aplicados al sustrato pueden variar en el tiempo, variando así el grado en que se implantan las especies que surgen del plasma. Otro procedimiento de ejemplo por el cual se puede lograr una interfaz graduada de metal/polímero de plasma es la deposición conjunta, donde la potencia suministrada al magnetrón o

5 fuente de arco catódico de metal, o la composición de los gases suministrados a la cámara de procedimiento varían de modo que el material depositado e/o implantado cambia progresivamente de más metálico a más polimérico.

El término "plasma" o "plasma gaseoso" se usa generalmente para describir el estado del vapor ionizado. Un plasma consiste en iones cargados, moléculas o fragmentos moleculares (positivos o negativos), electrones cargados

10 negativamente y especies neutras. Como se conoce en la técnica, se puede generar un plasma por combustión, llamas, choque físico, o preferentemente, por descarga eléctrica, tal como una descarga corona o incandescente. En la descarga de radiofrecuencia (RF), un sustrato a tratar se coloca en una cámara de vacío y se purga vapor a baja presión en el sistema. Se utiliza un campo electromagnético generado por un electrodo de RF capacitivo o inductivo para ionizar el vapor. Los electrones libres en el vapor absorben energía del campo electromagnético e ionizan las

15 moléculas de vapor, produciendo a su vez más electrones.

Al realizar el tratamiento con plasma, típicamente se evacua un aparato de tratamiento con plasma (como uno que incorpora una fuente de plasma Helicon, placa paralela o cátodo hueco u otra fuente de plasma acoplada inductivamente o capacitivamente) conectando una boquilla de vacío a una bomba de vacío. Un vapor de formación

20 de plasma adecuado generado a partir de una fuente de vapor, líquido o sólido se purga en el aparato evacuado a través de una entrada de gas hasta que se obtiene la presión de vapor deseada en la cámara y el diferencial a través de la cámara. Se genera un campo electromagnético de RF dentro del aparato aplicando corriente de la frecuencia deseada a los electrodos desde un generador de RF. La ionización del vapor en el aparato es inducida por el campo electromagnético, y el plasma resultante modifica la superficie del sustrato de metal, semiconductor, polímero,

25 compuesto y/o cerámica sometido al procedimiento de tratamiento. Los gases formadores de plasma preferidos que se pueden utilizar son argón, nitrógeno y vapores precursores orgánicos, así como vapores inorgánicos que consisten en la misma especie o especies similares que se encuentran en el sustrato.

Se puede generar una superficie de polímero de plasma a través de la implantación de iones de plasma con especies

30 que contienen carbono, la deposición conjunta bajo condiciones en las que el material del sustrato se deposita con especies que contienen carbono mientras se reduce gradualmente la proporción de material del sustrato y se aumenta la proporción de especies que contienen carbono y/o la deposición de una capa superficial de polímero de plasma con bombardeo energético de iones. En este contexto, las especies que contienen carbono pueden comprender átomos de carbono cargados u otras moléculas simples que contienen carbono, tales como dióxido de carbono, monóxido de

35 carbono, tetrafluoruro de carbono o C de cadena ramificada o lineal opcionalmente sustituida ₁ a C₁₂ compuestos de alcano, alqueno, alquino o arilo, así como compuestos más convencionalmente considerados en la química de polímeros como unidades monoméricas para la generación de compuestos de polímeros, tales como n-hexano, alilamina, acetileno, etileno, metano y etanol. Se pueden obtener compuestos adecuados adicionales de la siguiente lista no exhaustiva: butano, propano, pentano, heptano, octano, ciclohexano, ciclooctano, dicitropentadieno,

40 ciclobutano, tetrametilanelina, metilciclohexano y etilciclohexano, triciclododecano, propeno, aleno, penteno, benceno, hexeno octeno, ciclohexeno, ciclohepteno, butadieno, isobutileno, di-para-xilileno, propileno, metilciclohexano, tolueno, p-xileno, m-xileno, o-xileno, estireno, fenol, clorfenol, clorobenceno, fluorobenceno, bromofenol, etilenglicol, dietilenglicol glicol, dimetil éter, 2,4,6-trimetil m-fenilendiamina, furano, tiofeno, anilina, bencilamina, pirrol, propionitril, acrilonitrilo, pirrolidina, butilamina, morfolina, tetrahidrofurano, dimetilmformamida, dimetilsulfóxido,

45 metacrilato de glicidilo, ácido acrílico, óxido de etileno, óxido de propileno, etanol, propanol, metanol, hexanol, acetona, ácido fórmico, ácido acético, tetrafluorometano, fluoretileno, cloroformo, tetraclorometano, triclorometano, trifluorometano, cloruro de vinilideno, fluoruro de vinilideno, hexametildisiloxano, trietilsiloxano, dioxano, perfluoro-octano, fluorociclobutano, octafluorociclobutano, viniltrietoxisilano, octafluorotolueno, tetrafluorometano, hexametildisiloxano, heptadecafluoro-1-deceno, tetrametildisilazano, decametildiciclopentasiloxano,

50 perfluoro(metilciclohexano), 2-cloro-p-xileno.

Las condiciones típicas de tratamiento con plasma (que se citan aquí con referencia a la potencia que se puede requerir para tratar una superficie de 100 centímetros cuadrados, pero que se puede escalar según el tamaño del sistema) pueden incluir niveles de potencia de aproximadamente 1 vatio a aproximadamente 1000 vatios, preferentemente

55 entre aproximadamente 5 vatios y aproximadamente 500 vatios, lo más preferentemente entre aproximadamente 30 vatios y aproximadamente 300 vatios (un ejemplo de una potencia adecuada es la potencia directa de 100 vatios y la potencia inversa de 12 vatios); frecuencia de aproximadamente 1 kHz a 100 MHz, preferentemente de aproximadamente 15 kHz a aproximadamente 50 MHz, más preferentemente de aproximadamente 1 MHz a aproximadamente 20 MHz (un ejemplo de una frecuencia adecuada es de aproximadamente 13,5 MHz); plasma axial

60 que limita la intensidad del campo magnético de entre aproximadamente 0 G (es decir, no es esencial que se aplique un campo magnético axial) a aproximadamente 100 G, preferentemente entre aproximadamente 20 G a aproximadamente 80 G, lo más preferentemente entre aproximadamente 40 G a aproximadamente 60 G (un ejemplo

de una intensidad de campo magnético axial adecuada es aproximadamente 50 G); tiempos de exposición de aproximadamente 5 segundos a 12 horas, preferentemente de aproximadamente 1 minuto a 2 horas, más preferentemente entre aproximadamente 5 minutos y aproximadamente 20 minutos (un ejemplo de un tiempo de exposición adecuado es de aproximadamente 13 minutos); presiones de gas/vapor de aproximadamente 0,0001 a 5 aproximadamente 10 torr, preferentemente entre aproximadamente 0,0005 torr a aproximadamente 0,1 torr, lo más preferentemente entre aproximadamente 0,001 torr y aproximadamente 0,01 torr (un ejemplo de una presión adecuada es aproximadamente 0,002 torr); y un caudal de gas de aproximadamente 1 a aproximadamente 2000 cm³/min.

Las superficies de la invención, dependiendo del material del que se producen, a menudo, aunque no necesariamente, 10 mostrarán un carácter hidrófilo. Las superficies hidrofílicas son deseables en algunos aspectos de la invención, ya que las células destinadas a ser eliminadas a menudo están presentes en medios acuosos y tener una superficie hidrofílica ayudará a humedecer la superficie con un líquido acuoso que contiene células para ayudar de este modo a lograr la dispersión óptima de las células y el contacto de las células en la superficie biocida. El término "hidrofílico" se refiere a una superficie que puede ser humedecida por líquidos polares como el agua, e incluye superficies que tienen 15 propiedades humectantes tanto fuertemente como ligeramente hidrofílicas. Para una superficie lisa, los investigadores usan el término hidrófilo para referirse a una superficie con ángulos de contacto con el agua en el intervalo de 0 a alrededor de 90 grados. En contraste, una superficie "hidrofóbica" es una superficie que repele líquidos polares como el agua y para una superficie lisa, se caracterizará por ángulos de contacto con el agua por encima de 90 grados y se considera que una superficie caracterizada por un ángulo de contacto con el agua por encima de 150 grados es 20 "superhidrofóbica".

La invención se describirá ahora adicionalmente con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplos

25

Ejemplo 1: actividad bactericida del silicio negro

En este estudio los investigadores evaluaron y compararon el potencial antibacteriano de dos nanomateriales: el bSi sintético y las alas de la libélula *Diplacodes bipunctata*. Las propiedades fisicoquímicas del silicio y las superficies de 30 las alas nativas se caracterizaron química y estructuralmente antes de evaluar su actividad antibacteriana contra tres cepas bacterianas diferentes con una variedad de estructuras de la pared celular: la bacteria gram negativa en forma de barra *Pseudomonas aeruginosa*, el coccus grampositivo *Staphylococcus aureus* y las células vegetativas y las esporas de la barra gram positiva *Bacillus subtilis*.

35 Materiales y procedimientos

Grabado de haz de iones reactivos

El grabado de iones reactivos (RIE) con SF₆ y O₂ se realizó durante 5 minutos para producir las nanopuntas en obleas 40 de silicio utilizando un instrumento Oxford PlasmaLab 100 ICP380. Una oblea de Si comercial dopada con boro de 100 mm de diámetro tipo p con resistividad específica de 10-20 Ω cm⁻¹, (100) superficie orientada y 525 ± 25 μm de espesor (Atecom Ltd, Taiwán) se utilizó como sustrato para la formación de bSi. Se han informado más detalles sobre la fabricación deSi negro en otros lugares ^{4,5}.

45 *Preparación de alas de insectos*

Se recogieron muestras de libélulas (*Diplacodes bipunctata*, orden *Odonata*) de las áreas de zonas verdes de Brisbane (Australia). Las alas se diseccionaron con precisión usando tijeras o un bisturí. A continuación, se unieron a discos 50 circulares mediante cintas adhesivas de doble cara, a continuación, se enjuagaron generosamente con agua MilliQ (resistividad de 18,2 MΩ cm⁻¹, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) seguido de secado con gas de nitrógeno al 99,99 % de pureza.

Caracterización de la nanoarquitectura de superficie

55 Se registraron micrografías electrónicas de alta resolución de bSi y alas de libélula utilizando un SEM de emisión de campo (FESEM; ZEISS SUPRA 40 VP, Oberkochen, BW, Alemania) a 3 kV con un aumento de 35.000 ×, 70.000 ×, 150.000 × y 1.000.000 ×. Antes de la visualización, las muestras de las alas se recubrieron con películas delgadas de oro utilizando un Dynavac CS300 como se informó anteriormente ⁶. Se registraron múltiples campos de visión, incluidas varias secciones de muestras de bSi y múltiples regiones de las alas, para confirmar la consistencia 60 morfológica.

La arquitectura de la superficie se analizó inicialmente usando un sistema de perfilado óptico Bruker AXS Contour GT

3D en modo de interferometría de barrido vertical con luz blanca usando lentes objetivos de 4 × y 230 ×. Se escanearon tres muestras para evaluar la homogeneidad general de la superficie, antes de los perfiles topográficos detallados en cinco ubicaciones diferentes en la superficie, ya que el tamaño de la característica de las nanoestructuras en bSi y las superficies del ala estaba por debajo del límite de resolución óptica, se observó su arquitectura del patrón de ruido de las imágenes ópticas.

Caracterización de composiciones superficiales

La espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS) se realizó utilizando un espectrómetro de fotoelectrones de rayos X Kratos Axis Ultra DLD (Kratos Analytical Ltd., Reino Unido) equipado con una fuente de rayos X monocromática (Al K α , $h\nu = 1486,6$ eV) que opera a 150 W. La escala de energía del espectrómetro se calibró utilizando el pico de fotoelectrones de Au 4f $_{7/2}$ a la energía de unión (BE) de 83,98 eV. Las muestras se inundaron con electrones de baja energía durante el análisis para contrarrestar la carga superficial. El componente de hidrocarburo del pico C 1s (energía de unión 285,0 eV) se usó como referencia para la corrección de carga. Los elementos presentes en las superficies se determinaron a partir de espectros de encuesta en el intervalo de 0-1400 eV a un intervalo y una energía de paso de 1 eV y 160 eV respectivamente. La concentración atómica relativa de los elementos detectados por XPS se cuantificó sobre la base del área del pico en los espectros de la encuesta utilizando factores de sensibilidad para el instrumento Kratos. Se realizaron exploraciones de alta resolución en cada uno de los picos C 1s, O 1s y Si 2p, que a continuación se equiparon con componentes Gaussian-Lorentzian después de la eliminación de una señal de fondo lineal (software Kratos Vision II).

Humectabilidad superficial

Los ángulos de contacto estático con el agua se midieron en bSi y el ala utilizando el procedimiento de caída sésil¹. Las mediciones del ángulo de contacto se llevaron a cabo en aire usando un FTA1000c equipado con un nanodispensador (First Ten Ångströms, Inc., Portsmouth, VA, EE. UU.). Los volúmenes de las gotas fueron de aproximadamente 1,0 μ l. Los ángulos de contacto se midieron registrando 50 imágenes durante 2 s con una cámara Pelco modelo PCHM 575-4 y midiendo los ángulos de contacto después de que la gota había descansado en la superficie durante aproximadamente un segundo.

Cepas bacterianas, condiciones de crecimiento y preparación de muestras.

Se usaron tres cepas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Staphylococcus aureus* CIP 65.8^T y *Bacillus subtilis* NCIMB 3610^T. Las cepas seleccionadas son representantes típicos de tres grandes linajes taxonómicos bacterianos y se obtuvieron de American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.), Culture Collection del Institute Pasteur (CIP, París, Francia) y National Collection of Industrial, Food and Marine Bacteria (NCIMB, Aberdeen, Reino Unido). Antes de cada experimento de unión bacteriana, los cultivos bacterianos se renovaron en agar nutritivo de las reservas (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido). Se cultivaron suspensiones bacterianas frescas durante la noche a 37 °C en 5 ml de caldo nutritivo (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, Reino Unido). Las células bacterianas se recogieron en la etapa logarítmica de crecimiento y las suspensiones se ajustaron a DO₆₀₀ = 0,3 como se describió anteriormente¹. Las alas de los insectos, montadas en discos circulares, se sumergieron en 5 ml de la suspensión bacteriana durante intervalos de incubación de 1 hora, 3 horas o 18 horas.

Para la formación de esporas, una alícuota de la suspensión celular vegetativa de *B. subtilis* MCIMB 3610^T se extendió sobre la placa de agar nutritivo (Oxoid) y se incubó a 37 °C durante 7 días en el agotamiento de oxígeno. La esporulación (> 95 %) se observó microscópicamente en portaobjetos de vidrio al teñir esporas con verde de malaquita y contrarrestar las células sanas con safranina⁷. Las esporas se suspendieron a continuación en solución salina tamponada con fosfato (PBS), se lavaron a 13000 rpm durante 5 minutos y se volvieron a suspender. Antes de la incubación en las alas del insecto, la suspensión de esporas en PBS se ajustó a DO₆₀₀ = 1. Las alas de los insectos fueron incubadas a continuación con suspensión de esporas para experimentos de unión de 1, 3 y 18 horas.

Análisis de viabilidad celular

Se usó microscopía de barrido láser confocal (CLSM) para visualizar las proporciones de células vivas y células muertas usando el kit de viabilidad bacteriana LIVE/DEAD[®] BacLight[™], L7012. Una mezcla de SYTO[®] 9 y colorantes fluorescentes de yoduro de propidio (Molecular Probes[™], Invitrogen, Grand Island, NY, EE. UU.). SYTO[®] 9 impregnaba las membranas intactas y dañadas de las células, uniéndose a los ácidos nucleicos y presentando fluorescencia verde cuando es excitado por un láser de longitud de onda de 485 nm. Por otro lado, el yoduro de propidio solo ingresó únicamente en células con daño significativo en la membrana, que se consideran no viables, y se une con mayor afinidad a los ácidos nucleicos que SYTO[®] 9. Las suspensiones bacterianas se tiñeron según el protocolo del fabricante y se tomaron imágenes usando un microscopio invertido Fluoview FV10i (Olympus, Tokio, Japón).

Para la tinción de esporas, se realizó una modificación menor a este protocolo ⁸. Las esporas se tiñeron con una mezcla de 0,9 mM de yoduro de propidio y 5 mM de SYTO[®] 9 durante 15-20 minutos. Las muestras se visualizaron a continuación bajo el microscopio confocal.

5

Recuento en placas de viabilidad bacteriana

Los ensayos de viabilidad se realizaron mediante recuentos en placas estándar. ⁹. Las células y las esporas de *P. aeruginosa*, *S. aureus* y *B. subtilis* se suspendieron en 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se ajustaron a $DO_{600} = 0,1$. Las células resuspendidas se diluyeron 1:10; a continuación, se incubó en pocillos de 3,5 cm de diámetro por triplicado conteniendo cada pocillo una muestra de sustrato de área de 1 cm² de un ala de *D. bipunctata*, bSi, oblea de silicio lisa o un cubreobjetos de vidrio. A continuación, se tomaron muestras de las suspensiones celulares (100 µl) a intervalos de tiempo discretos (3 horas y 18 horas), se diluyeron en serie 1:10, y cada dilución se extendió en tres placas de agar nutritivo. A continuación, se contaron las colonias resultantes y se calculó el número de unidades formadoras de colonias por ml. Se supuso que el número de unidades formadoras de colonias era equivalente al número de células vivas en suspensión ⁹. La eficacia bactericida máxima se midió como el número de células inactivadas por centímetro cuadrado de muestra por minuto de tiempo de incubación, calculado restando el número de células que permanecen en suspensión de las condiciones de control correspondientes.

20 Resultados y análisis

Caracterización de la superficie

Tanto bSi como las alas de libélula estaban cubiertas con numerosas protuberancias columnares a nanoescala, sin embargo, variaban bastante entre sí (figura 1). Las protuberancias a nanoescala en la superficie del bSi se denominan nanopuntas y tenían aproximadamente 500 nm de altura, distintas entre sí y refinadas en la punta (figura 1a, recuadro). Las protuberancias a nanoescala del ala de libélula se denominan nanopilares y eran más cortas que las nanopuntas de bSi (~240 nm) y parecía formar una red de tipos en la base (figura 1b, recuadro). Algunas nanoprotuberancias en ambas superficies tenían una tendencia a agruparse en la punta, sin embargo, no se formó ninguna red. Esta nanoarquitectura era más frecuente en la superficie natural debido a la menor rigidez a la flexión de los nanopilares, que depende de la forma, la escala, el módulo de Young respectivo y la densidad del material ¹⁰. Aizenberg y sus colegas han demostrado cómo las fuerzas capilares inducen la autoorganización bajo la influencia de la geometría general y las propiedades mecánicas y superficiales ¹¹. La perfilometría óptica confirmó la presencia de esta arquitectura inicial (figura 1c, d). Se puede ver en las micrográficas que, si bien la escala vertical de las protuberancias a nanoescala variaba entre las dos superficies, el patrón espacial era algo similar entre las superficies de bSi y el ala de la libélula, y esto se ejemplifica aún más en los modelos tridimensionales de las micrográficas de vista en superficie, producidas por una técnica de mapa de desplazamiento (figura 1e, f).

Las diferencias en las funcionalidades químicas y la humectabilidad de la superficie del bSi y las alas de la libélula fueron más definitivas. Se ha demostrado previamente que las alas de los insectos muestran composiciones químicas complejas atribuidas principalmente a varios lípidos y ceras hidrófobas. Usando la espectroscopía de fotoelectrones de rayos X (XPS), los investigadores confirmaron que las alas de *D. bipunctata* poseen una composición química similar a la establecida en la bibliografía. Los espectros de la encuesta indicaron la presencia de solo dos elementos detectables: C y O (figura 4a). El análisis de datos elementales basado en los espectros de la encuesta demostró que C comprendía 97,5 en% de la superficie, mientras que O estaba presente a 2,5 en%, consistente con una cobertura de superficie por moléculas lipídicas hidrofóbicas como las que contienen largas cadenas principales de carbono. La presencia de O puede atribuirse a las moléculas de ácido graso asociadas con una porción relativamente pequeña de los lípidos de la superficie. Como se esperaba, los espectros XPS del silicio negro (bSi) revelaron la presencia de dos elementos principalmente, O y Si, el último de los cuales se debió en gran medida a la detección de Si amorfo (figura 4b). Se detectó una pequeña cantidad de carbono, muy probablemente como contaminación atmosférica. Una característica sorprendente de las alas de los insectos es su naturaleza superhidrofóbica, que se evaluó en términos de la humectabilidad de las alas de *D. bipunctata* y el bSi. Las alas de la libélula eran superhidrofóbicas, mostrando valores promedio de ángulo de contacto estático con el agua de $153,5 \pm 3,9^\circ$ (figura 4c), mientras que bSi era significativamente menos hidrofóbico (de hecho, moderadamente hidrofílico); teniendo un ángulo promedio de contacto con el agua de $79,7 \pm 2,4^\circ$ (Fig. 4d), en gran parte debido a la oxidación de la superficie durante el procesamiento.

La morfología de las células bacterianas y las esporas en las superficies estructuradas (figura 5) se puede comparar con las superficies de control planas equivalentes de vidrio y silicio como se muestra en la figura 6 y la figura 7, respectivamente.

Actividad bactericida de superficie

Para cuantificar las propiedades bactericidas del bSi y la superficie del ala de la libélula, se incubaron tres especies de bacterias en cada superficie durante un período de 30 horas, y se controló la viabilidad bacteriana. Las especies bacterianas examinadas representaban los principales taxones procariotas e incluían *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 5 9027 gram negativa, *Staphylococcus aureus* 65.8^T gram positiva, y tanto las células vegetativas como las esporas de *Bacillus subtilis* NCIMB 3610^T. Se descubrió que la apariencia morfológica de todas las células y esporas que se unían a la superficie del bSi y las alas de la libélula eran significativamente diferentes a las que se unían a las superficies planas de vidrio y silicio, que actuaban como superficies de control (figura 2a-d, i-1; controles dados en las figuras 6 y 7) La integridad celular de todas las especies parecía estar significativamente alterada por los nanopilares presentes 10 en ambos sustratos a pesar de la diferencia significativa en la química de la superficie y la hidrofobicidad (figura 2 y figura 4). Se puede observar una deformación y envoltura significativas no solo con los tres tipos de células vegetativas sino también con las esporas de *B. subtilis*. Anteriormente los investigadores observaron deformaciones físicas similares de células de *P. aeruginosa* que se unen a las alas de cigarra ¹, y posteriormente se descubrió que estas se desactivaban después de la unión. El análisis de viabilidad de las células en contacto con el bSi y las alas de la libélula 15 utilizando microscopía de barrido láser confocal confirmó que todas las células y esporas tampoco eran viables en este caso después de la unión (figura 2e-h, m-p). La disrupción celular se evaluó usando el colorante fluorescente yoduro de propidio que penetra en todas las células rotas, causando fluorescencia roja e indicando inactivación. En particular, las superficies del bSi y el ala de la libélula fueron efectivas no solo contra las células gram negativas de *P. aeruginosa* sino también contra las células gram-positivas de *S. aureus* y *B. subtilis*. Los estudios realizados en el ala 20 de la cigarra destacaron previamente que los sustratos del ala de la cigarra solo fueron efectivos contra las células gram negativas ¹. Las células gram positivas son generalmente más rígidas y más resistentes a la lisis mecánica que las células gram negativas debido a que su pared celular de peptidoglucano tiene espesores aproximadamente 4 a 5 veces mayores que los de las bacterias gram negativas. Este mayor espesor de la pared celular requiere un mayor esfuerzo de deformación para romper la pared celular, deformar la membrana interna y causar la muerte celular. 25 Además de ser efectivas contra las células bacterianas vegetativas examinadas, las nanoarquitecturas de la superficie bSi y libélula pudieron alterar claramente la capa de esporas de múltiples capas, que controla la viabilidad de las esporas. El revestimiento de esporas ofrece una gran durabilidad y resistencia contra tensiones externas como la desecación, lo que hace que las esporas sean el medio más efectivo de supervivencia bacteriana en condiciones de estrés. Esto indica que el estrés deformante que tanto bSi como las alas de *D. bipunctata* pueden aplicar a las células 30 bacterianas es sustancial y demuestra el potencial significativo de bSi a usar para contrarrestar las estrategias de supervivencia bacteriana.

La interacción entre las bacterias gram negativas y los nanopilares del ala de la cigarra, que conduce a la actividad bactericida, se demostró anteriormente que dependía de la estructura física de la superficie y la rigidez celular, como 35 lo demostró recientemente la aplicación de irradiación de microondas a las células con estructuras de pared rígida. La irradiación disminuyó la rigidez de la pared celular, haciéndola más susceptible a la acción de estos nanopilares del ala ^{1,2}. Se informó una confirmación adicional de la naturaleza mecánica del efecto bactericida de las alas de cigarra cuando el revestimiento por pulverización catódica del ala con una fina capa de oro no pudo inhibir la actividad antibacteriana. Aquí se realizaron experimentos similares (figura 5 y figura 8), cuyos resultados confirmaron que las 40 acciones bactericidas de bSi y las superficies del ala de la libélula también son nanomecánicas. También se ha demostrado que la estructura de la pared celular es, de hecho, uno de los principales determinantes de la rigidez celular y, por consiguiente, de la susceptibilidad a las superficies mecano-sensibles. En un estudio sistemático, sobre las alas de cigarra que investiga la susceptibilidad de las especies bacterianas filogénicamente diversas con diferentes combinaciones de reacción de gram y morfología celular, se descubrió consistentemente que las bacterias gram 45 negativas eran vulnerables al efecto bactericida de la superficie del ala, independientemente de la morfología celular o la afiliación filogenética ¹².

Ha habido avances recientes tanto en la medición directa de AFM como en el modelado físico de células bacterianas, particularmente con el fin de examinar las propiedades mecánicas de las paredes celulares y sus presiones de 50 turgencia osmótica interna ^{13,14}. Por ejemplo, aplicando tanto el modelado como las mediciones directas de AFM, Yi Deng y col. cuantificó los módulos de Young de la pared celular de *E. coli* viva como 23 MPa y 49 MPa para direcciones axiales y circunferenciales, mientras que la presión de turgencia de la célula era de 29 kPa, mediante el análisis de la tensión de abultamiento de la célula bajo una perturbación impuesta externamente ¹⁵. Como consecuencia de la 55 tensión de la pared provocada por la deformación de la sangría, se observó que el endurecimiento por estrés de la ley de potencia significativa de la red de peptidoglucano de la pared celular tiene un exponente 1,2 Aquí, los investigadores observan que la competencia entre la elasticidad de la membrana celular y la capilaridad de la arquitectura de bSi y el ala de la libélula en comparación con las superficies de las cigarras, favorece una mayor absorción con su mayor deformación y estrés de la pared celular ¹, que aumenta aún más con las nanopuntas más largas y pronunciadas del bSi 60

La alta eficiencia bactericida de bSi y de las alas de libélula con respecto a las alas de cigarra se puede atribuir a la diferencia de patrones en sus superficies. bSi y las alas de libélula tienen puntas largas (100-600 nm) y delgadas (10-

50 nm en la punta) con puntas afiladas (figura 1); en contraste, las alas de cigarra tienen pilares gruesos con puntas redondas (60 nm). Las puntas afiladas a escala nanométrica de bSi son comparables en orden de magnitud con el espesor de la membrana y, por lo tanto, pueden penetrar a través de la membrana. En contraste, los pilares romos y redondos del patrón de alas de cigarra tienen dimensiones mucho más grandes que el espesor de la membrana. La membrana puede adsorberse en la superficie del pilar y puede romperse solo debido al estiramiento de la membrana entre los pilares, lo que puede limitar la eficiencia con respecto a la perforación directa de la membrana. Para cuantificar este mecanismo, los investigadores han utilizado la teoría del campo medio de cadena única (SCMF) de las bicapas lipídicas, que puede describir adecuadamente el equilibrio y las propiedades mecánicas de las bicapas lipídicas y puede proporcionar la información microscópica sobre la interacción y perforación de las bicapas por nanoobjetos. Al construir el objeto que interactúa en forma de cono hidrofóbico con dimensiones de la punta de bSi tomadas de la figura 1 y utilizando un modelo de 3 cuentas para moléculas de lípidos, los investigadores han probado la interacción del cono con la bicapa lipídica (figura 2) en función de la distancia de la punta desde el centro de la bicapa. El número de lípidos en la caja de 30 nm se mantuvo constante a aproximadamente 3000, lo que corresponde a una bicapa lipídica de equilibrio no perturbada con un área por lípido de alrededor de 60 Å². Las condiciones de contorno periódicas modelan el patrón periódico de puntas idénticas en dimensiones horizontales. Las interacciones de las colas con la punta se eligen para que sean -10 kT, y la estructura resultante es consistente con los resultados obtenidos con otras geometrías. En las inserciones pequeñas, el cono hidrofóbico atrae las colas de los lípidos sin cambiar la topología de la bicapa. Sin embargo, en algunas inserciones intermedias hay un cambio brusco de la estructura de la bicapa asociada con la formación del poro alrededor de la punta (figura 2). Las colas de los lípidos son atraídas a la superficie hidrofóbica de la punta, lo que a su vez induce la reorientación de los lípidos con las cabezas apuntando hacia la superficie del cono y, por lo tanto, la formación de un poro toroidal. En el punto de transición, que se muestra en la figura 2, coexisten dos soluciones correspondientes a topologías con y sin poro, lo que indica que la transición es similar a las transiciones de primer orden y el poro se forma espontáneamente. Este mecanismo no requiere inserciones profundas de la membrana en el patrón, como se sugirió para las superficies de las alas de cigarra y, como se puede ver en la figura 2, las células bacterianas se rompen por el patrón bSi en contacto con las puntas de las puntas.

La eficacia bactericida del bSi y las superficies del ala de *D. bipunctata* se evaluaron cuantitativamente durante 30 horas utilizando una técnica de recuento en placa de viabilidad estándar. Este ensayo de recuento en placa se desarrolló sobre la base de los protocolos de la FDA para la evaluación de la esterilización de alimentos, con un ajuste del tamaño del inóculo para acomodar la evaluación del potencial antibacteriano de las superficies en lugar de una técnica de esterilización a granel ¹⁶. Un desglose detallado de la eficiencia bactericida de bSi se da en la figura 3. El número de células asesinadas por el bSi y las alas de la libélula se determinó como la diferencia entre el número de células supervivientes y las que permanecen en el control después del mismo período de incubación, para tener en cuenta los bajos niveles de muerte celular natural en condiciones de bajos nutrientes. Basado en el número de células muertas por cada superficie, la eficiencia de cada una se determinó como el número de células muertas por cm² por minuto (figura 3a). Tanto el bSi como el ala de la libélula fueron generalmente igualmente efectivos contra todos los tipos celulares probados, aunque la superficie del bSi parecía ligeramente más efectiva contra *P. aeruginosa*. Cabe señalar que, debido a la alta variabilidad asociada con los sistemas biológicos, no se puede afirmar de manera concluyente que la superficie bSi es más efectiva que las alas de libélula contra *P. aeruginosa*, ya que los valores de error son demasiado grandes. El bSi fue extremadamente eficiente para matar todos los tipos celulares, y esto se demuestra claramente al comparar estos valores con las dosis infecciosas mínimas de cada tipo celular ¹⁷⁻¹⁹. Dados estos niveles de eficiencia, una superficie bSi con un área proyectada de 1,5 cm² se predice que será suficiente para contrarrestar la dosis infecciosa mínima de todos los tipos celulares probados, en un minuto (figura 3b).

Se descubrió que la superficie bSi tiene una eficacia bactericida significativa contra todas las bacterias evaluadas, disminuyendo el número de células en suspensión de los tres tipos celulares y también en las esporas de *B. subtilis* (figura 8a-d).

50 Conclusiones

La extensa actividad bactericida mostrada por el bSi sintético brinda una oportunidad para una nueva estrategia de la microbiología mecano-sensible, mediante la cual la célula responde a las fuerzas de interacción física de las estructuras superficiales (y sus tensiones acompañantes), lo que lleva a la deformación celular y la muerte. La capacidad de fabricar fácilmente un nanomaterial de este tipo sugiere el potencial para su uso en el desarrollo de una amplia gama de superficies bactericidas para su uso en aplicaciones biomédicas e industriales. Los resultados de los investigadores demuestran que (i) el bSi nanoestructurado y las alas naturales de la libélula *D. bipunctata* son superficies bactericidas altamente efectivas, con la actividad bactericida impulsada por respuestas mecánicas y estructurales a las tensiones de deformación impuestas por la nanoarquitectura de la superficie en la pared celular de peptidoglucano y la membrana interna, (ii) se pueden fabricar fácilmente nanomateriales antibacterianos sintéticos que poseen una efectividad similar para matar células bacterianas a las estructuras de la superficie del ala de la libélula. Estas superficies parecen ser efectivas, independientemente de su funcionalidad química superficial, y (iii) tales

superficies sintéticas pueden mostrar una actividad bactericida mejorada en comparación con sus homólogos naturales. Estos datos proporcionan una demostración clara del impacto que las superficies mecano-sensibles pueden jugar para contrarrestar la contaminación microbiana.

5 Ejemplo 2: actividad del silicio negro contra los glóbulos rojos

Materiales y procedimientos

Recolección de eritrocitos y preparación de muestras

10

Se recogió sangre de ratas sanas en Animal House, Universidad de Monash, de conformidad con las directrices del Comité de Ética Animal (AEC). Se recogió sangre fresca en citrato de sodio al 3,8 % (p/v). Los eritrocitos anticoagulados se centrifugaron a 1400 rpm durante 5 minutos a 25 °C con la eliminación del plasma sanguíneo y la capa esponjosa. Los eritrocitos separados se lavaron dos veces en tampón salino fosfato 10 mM (PBS, pH 7,4). La suspensión celular final se ajustó a la densidad de 4×10^6 células/ml.

15

Los conjuntos de nanopilares bSi esterilizados y las muestras de control (vidrio, vidrio cubierto de gelatina y oblea de Si) se sumergieron en 2 ml de suspensión celular final y se incubaron durante varios intervalos de tiempo discretos (5, 15, 30, 60, 120 y 180 min) a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂ en aire al 100 % de humedad relativa. Antes de la visualización, todas las muestras incubadas se lavaron suavemente con 1 ml de PBS 10 mM (pH = 7,4). Todas las muestras lavadas se fijaron en glutaraldehído al 2,5 % (Sigma), a continuación, se deshidrataron en series de etanol (30, 50, 70, 90 y 100 %) antes de la visualización microscópica electrónica de barrido como se describió anteriormente ^{25, 26}.

20

25' 26

25 *Microscopía electrónica de barrido*

Se tomaron imágenes de microscopía electrónica de barrido de alta resolución (SEM) de las superficies con eritrocitos adheridos utilizando un SEM de emisión de campo (FESEM; ZEISS SUPRA 40 VP, Alemania) a 3 kV con un aumento de 1000 ×, 5000 × y 15000 ×. Antes de observar bajo SEM, las muestras con eritrocitos adheridos fijados con glutaraldehído se recubrieron con películas de oro de 10 nm usando un Dynavac CS300 según el procedimiento desarrollado previamente ^{27, 28, 29}. Las imágenes tomadas a 1000 aumentos se usaron para cuantificar el número de células unidas y/o dañadas. Se tomaron veinte áreas en cada dos muestras diferentes de tres experimentos independientes. La cuantificación se realizó sobre la base de los cambios en la morfología celular de que los eritrocitos bicóncavos se denominaron "células intactas" y los RBC dañados se denominaron "células rotas".

30

35

Para visualizar la interfaz de interacción entre nanopilares y eritrocitos, se fracturaron muestras nanoestructuradas con células adheridas y se tomaron imágenes de sus secciones transversales usando SEM de emisión de campo (FESEM; ZEISS SUPRA 40 VP, Alemania) a 3 kV.

40 *Microscopía de barrido láser confocal*

La visualización de los eritrocitos unidos se realizó mediante microscopía de barrido láser confocal (CLSM). Celdas a la densidad de 4×10^6 se suspendieron con solución de marcaje de membrana premezclada (perclorato de 1,1'-diocetadecil-3,3,3',3'-tetrametilindocarbocianina (DiI), Molecular Probes™, Invitrogen) como se describió anteriormente ^{30,31}. Se usó la suspensión celular previamente teñida para incubar con muestras dispuestas en nanopilares en una placa de cultivo de 12 pocillos durante varios intervalos de tiempo discretos (5, 15 y 30 min). Los sustratos con eritrocitos unidos se lavaron suavemente con 1 ml de PBS y se fijaron posteriormente con paraformaldehído al 4 % como se describió anteriormente ^{30,31}. Las imágenes de eritrocitos unidos a superficies nanoestructuradas y de control y su matriz celular se registraron utilizando un sistema confocal espectroscópico Olympus Fluorview FV10i (Olympus, Japón). El software de imágenes Fluorview FV 7.0 se empleó para procesar las imágenes CSLM y construir imágenes tridimensionales (3D).

45

50

Microspectroscopía Raman

55

Las superficies de silicio dispuestas en nanopilares con eritrocitos adheridos se mapearon usando un microespectrómetro Raman (WiTEC) con una longitud de onda láser de 532 nm ($h\nu = 2,33$ eV). Se usó un objetivo de inmersión en agua de 60 × (apertura numérica = 0,9, Olympus) para mapear la unión de los eritrocitos en silicio negro. Se adquirió una cuadrícula de 100 espectros × 100 espectros para un área de exploración de 10 μm × 10 μm. El tiempo de integración para un solo espectro fue de 0,15 s. La exploración se repitió independientemente dos veces en 5 muestras diferentes. La adquisición de datos fue controlada por el paquete de software WiTEC Control.

60

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron en términos de valores medios y las correspondientes desviaciones estándar de las cantidades medidas siguiendo los protocolos de uso común. El procesamiento de datos estadísticos se realizó utilizando los descansos de dos colas de Student emparejados para evaluar la consistencia de los resultados (con un asterisco si $p < 0,05$ en figuras y tablas).

Resultados

Interacciones dependientes del tiempo de los eritrocitos con superficies de silicio dispuestas en nanopilares

10

Las alteraciones morfológicas de los eritrocitos después de 5, 15 y 30 minutos de interacción con superficies dispuestas en nanopilares se muestran en la figura 9. Las micrografías SEM de la vista superior y lateral revelaron un procedimiento de ruptura paso a paso de un solo eritrocito (figura 10 (a) y (b)). Se puede ver que una célula sana y bicóncava se ha deformado una vez en contacto con las superficies y finalmente se ha roto. Algunos fragmentos de la célula y/o membrana rota también se pueden ver y considerar como "impresión celular". Se observó que el daño continuaba y se hacía más dramático cuando el tiempo de interacción se extendía a 15, 30, 60, 120 y 180 minutos (figura 9 (a)). El número total de células unidas en superficies de silicio dispuestas en nanopilares aumentó proporcionalmente con el mayor tiempo de incubación, comparable con el número de células adherentes en superficies comerciales de silicio (figura 9 (b)). Durante una incubación de 60 minutos, el número de células rotas en el silicio nanoestructurado parecía ser aproximadamente la mitad de los eritrocitos intactos ($p = 0,05$); después de 60 minutos, las células rotas dominaban las superficies dispuestas en nanopilares y después de tres horas, las superficies parecían estar casi saturadas de eritrocitos adheridos y/o sus "impresiones celulares".

Caracterización de la interfaz eritrocitos-superficie

25

Los puntos de contacto de un solo eritrocito y nanopilares se visualizaron utilizando imágenes SEM y CLSM (figuras 11 y 12). Se estimó que el área de contacto ocupaba solo 20-30 nm de puntas de nanopilares. La deformación y la ruptura de los eritrocitos en los nanopilares de silicio se confirmaron mediante el análisis de las imágenes CLSM y la microspectroscopia Raman (RS) (figura 12).

30

Los espectros de la superficie de silicio grabada con RBC unidos se presentan en la figura 12. Los picos Raman de eritrocitos de 690 cm^{-1} hasta 1909 cm^{-1} corresponden a las vibraciones de enlace en el hemo de todas las moléculas de hemoglobina, incluidas la hemoglobina citosólica y submembrana libre que interactúa con la membrana plasmática. Algunos restos de células rotas se ven como grupos en los nanopilares debajo de los restos de la membrana celular donde no se detectó hemoglobina (figura 12 (e)). La hemoglobina se detectó fácilmente en los eritrocitos intactos que no fueron dañados por los nanopilares (figura 12 (e)). Se encontró que estos resultados estaban de acuerdo con el análisis SEM (figura 12 (f)).

35

REIVINDICACIONES

1. Una superficie biocida sintética que comprende un conjunto de nanopuntas desordenadas que son letales para las células de dicha superficie, donde al menos algunas de dichas nanopuntas están ramificadas.
5
2. La superficie de la reivindicación 1, donde dicha superficie es hidrófila.
3. La superficie de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde el diámetro de dichas nanopuntas es mayor en una base de las mismas que en un extremo libre de las mismas.
10
4. La superficie de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde dichas nanopuntas tienen un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 300 nm a la mitad de la altura máxima.
5. La superficie de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde las nanopuntas están separadas una
15 distancia de aproximadamente 200 nm a aproximadamente 700 nm de centro a centro.
6. La superficie de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, donde dichas nanopuntas son capaces de flexionarse hasta el punto de que las puntas de las nanopuntas adyacentes dentro de dicho conjunto pueden unirse.
- 20 7. La superficie de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, donde el módulo de elasticidad de Young de las nanopuntas es de aproximadamente 10 GPa a aproximadamente 300 GPa.
8. La superficie de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde dichas nanopuntas tienen una altura de aproximadamente 100 nm a aproximadamente 600 nm y/o donde las puntas de dichas nanopuntas tienen un diámetro
25 de aproximadamente 4 nm a aproximadamente 50 nm.
9. La superficie de la reivindicación 8, donde la ramificación está en o hacia un extremo libre de dichas nanopuntas.
- 30 10. La superficie de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde un sustrato a partir del cual se forma dicha superficie comprende silicio, preferentemente silicio dopado con boro o silicio negro (b-Si).
11. La superficie de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, donde un sustrato a partir del cual se forma dicha superficie comprende metal.
35
12. La superficie de la reivindicación 11, donde el metal comprende titanio, oro, platino, plata, cobalto, cromo, vanadio, tántalo, níquel, magnesio, manganeso, molibdeno o tungsteno; preferentemente cobalto cromo, níquel titanio, titanio vanadio aluminio o acero inoxidable.
- 40 13. Un dispositivo, herramienta, accesorio o aparato que comprende una superficie de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
14. El dispositivo, herramienta, accesorio o aparato de la reivindicación 13, que se selecciona de entre herramientas, instrumentos y equipos médicos, quirúrgicos, veterinarios y dentales e implantes médicos, dentales y
45 veterinarios.
15. Un procedimiento no terapéutico para eliminar células bacterianas o reducir la supervivencia celular bacteriana, donde las células bacterianas están expuestas a una superficie biocida sintética de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.
50

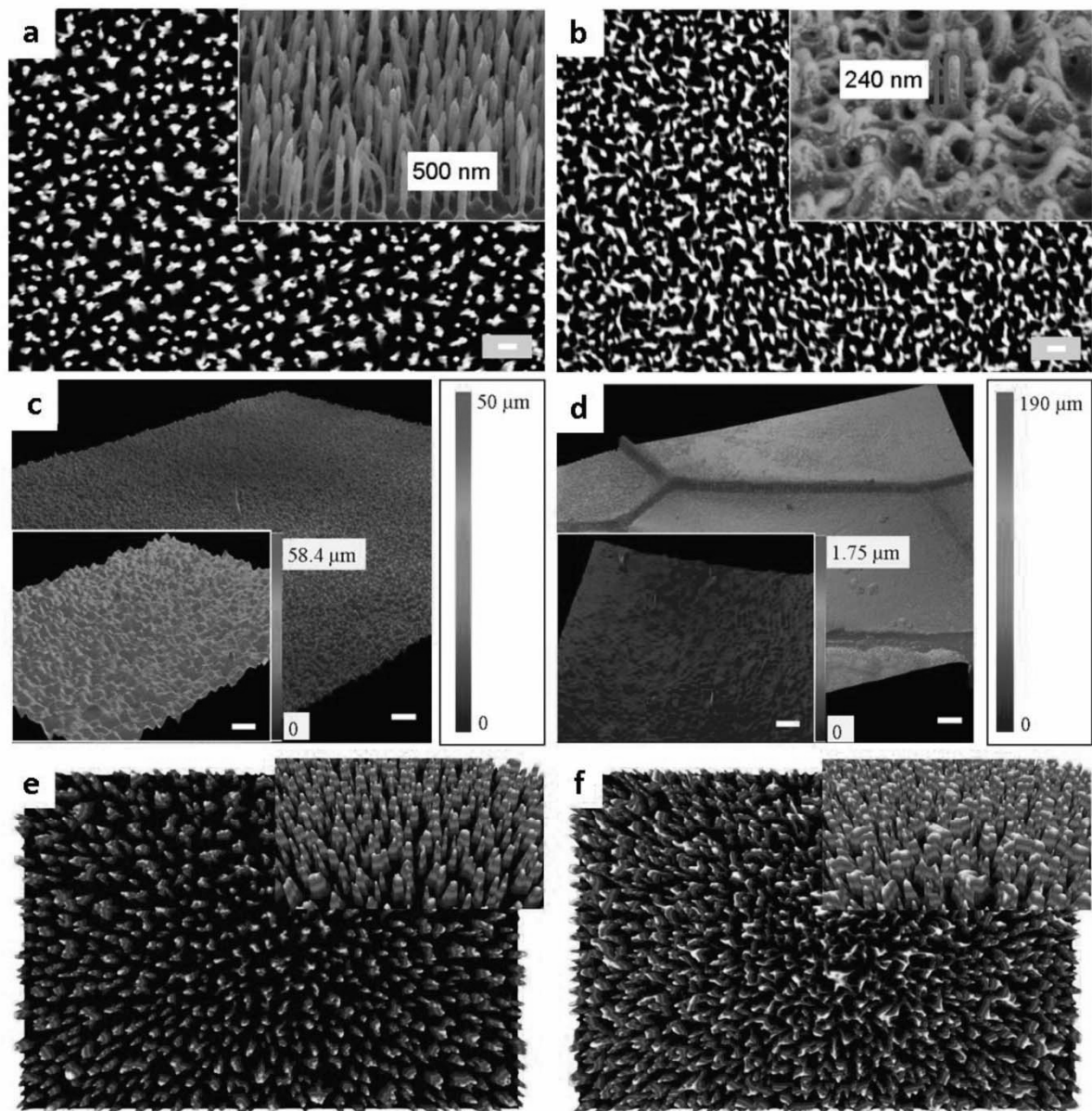


Figura 1

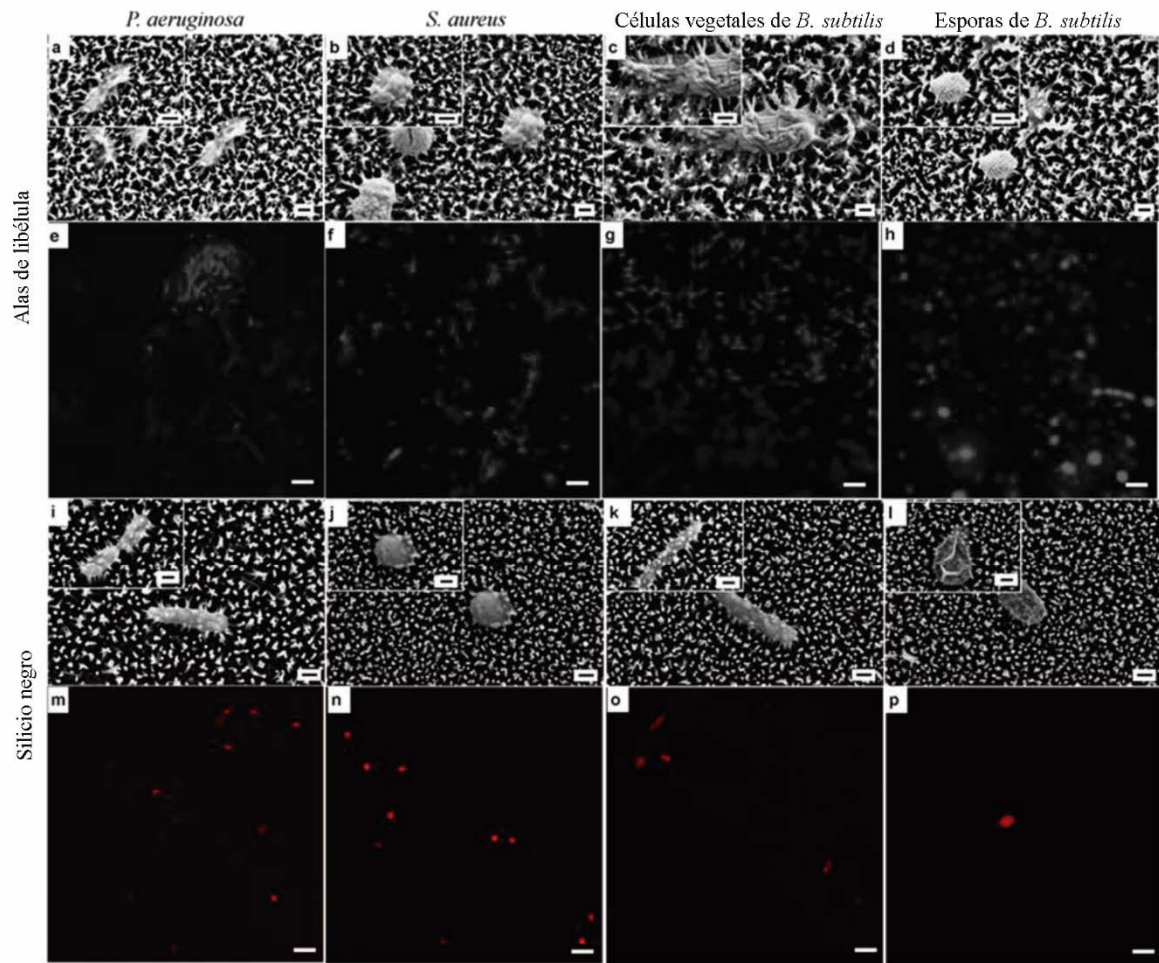


Figura 2

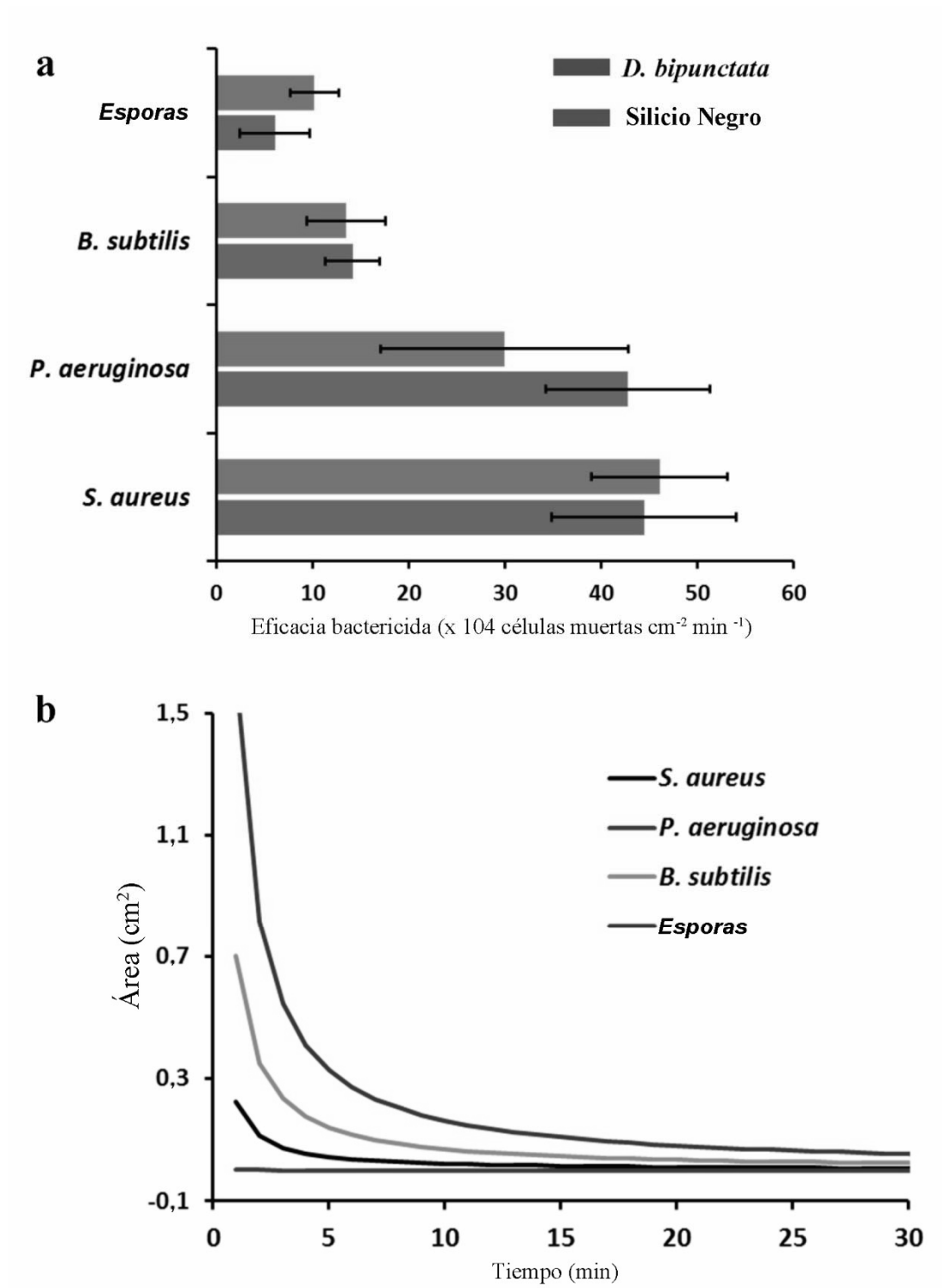


Figura 3

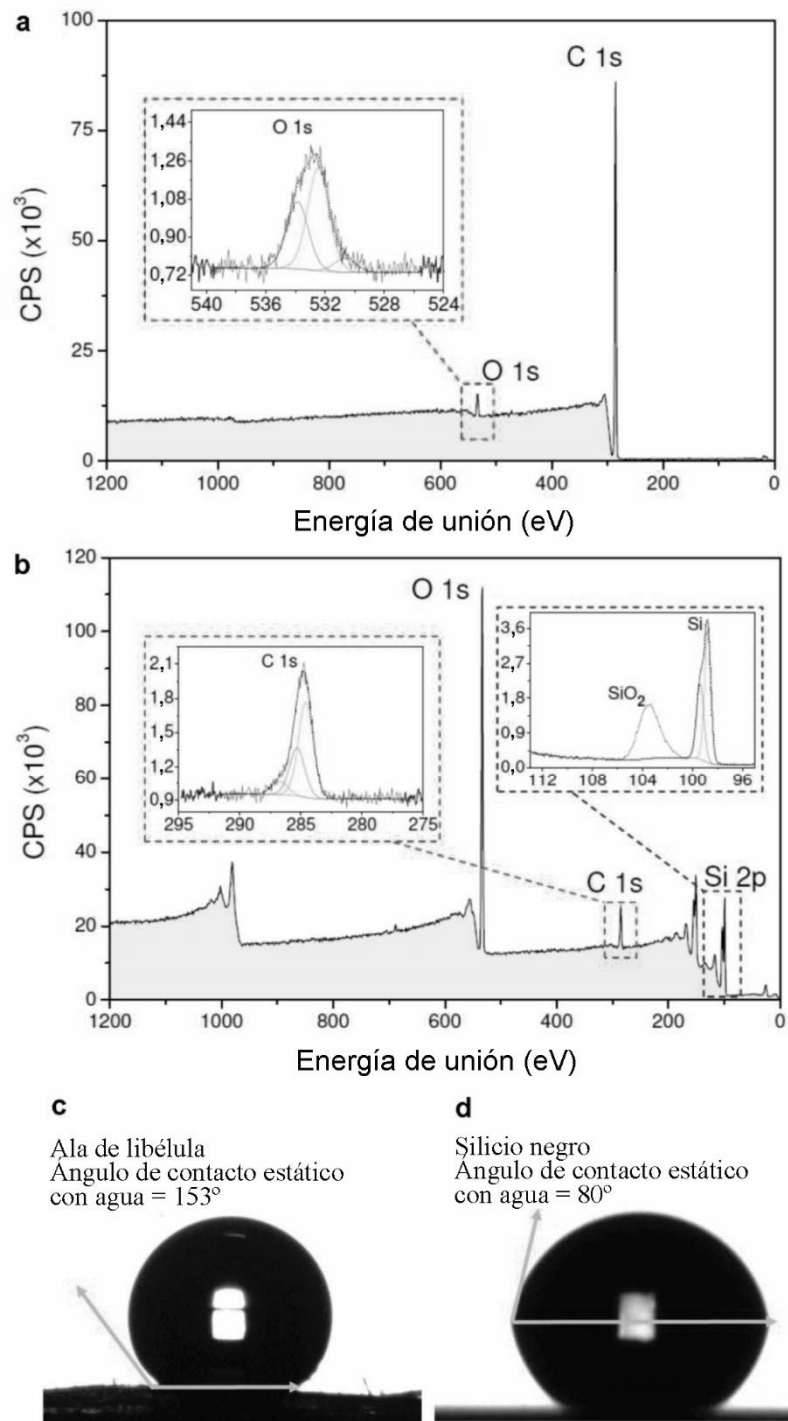


Figura 4

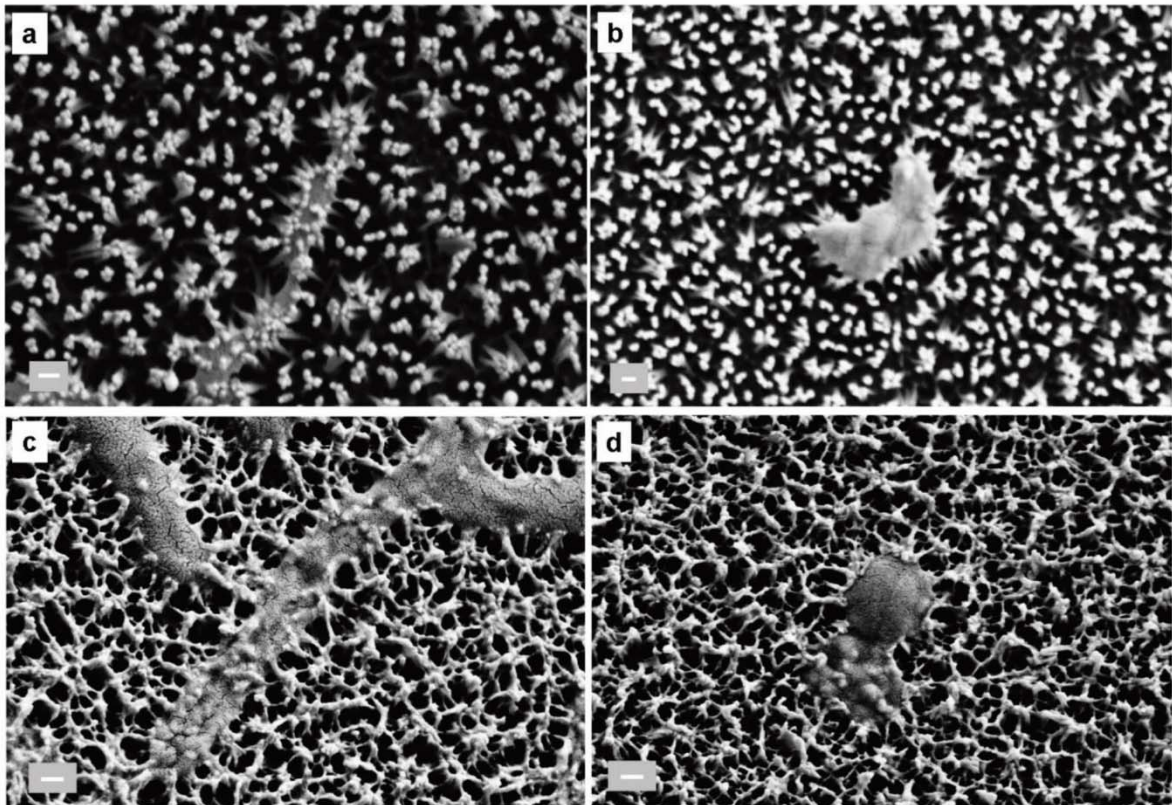


Figura 5

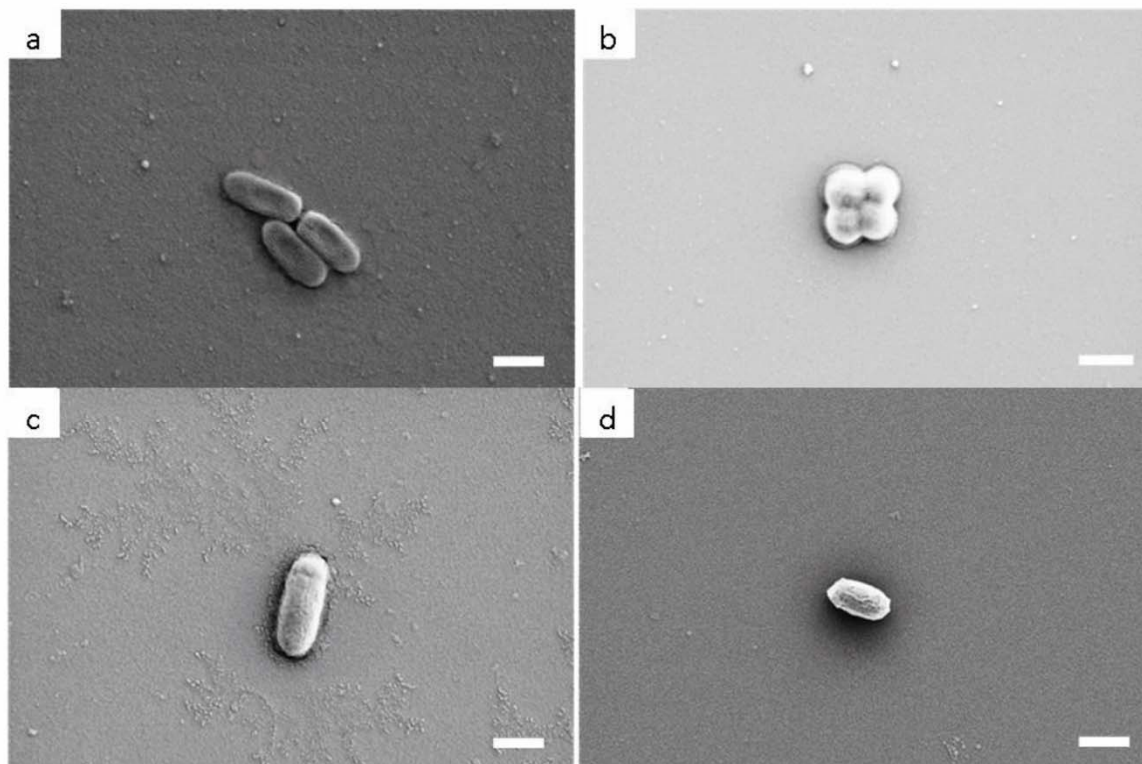


Figura 6

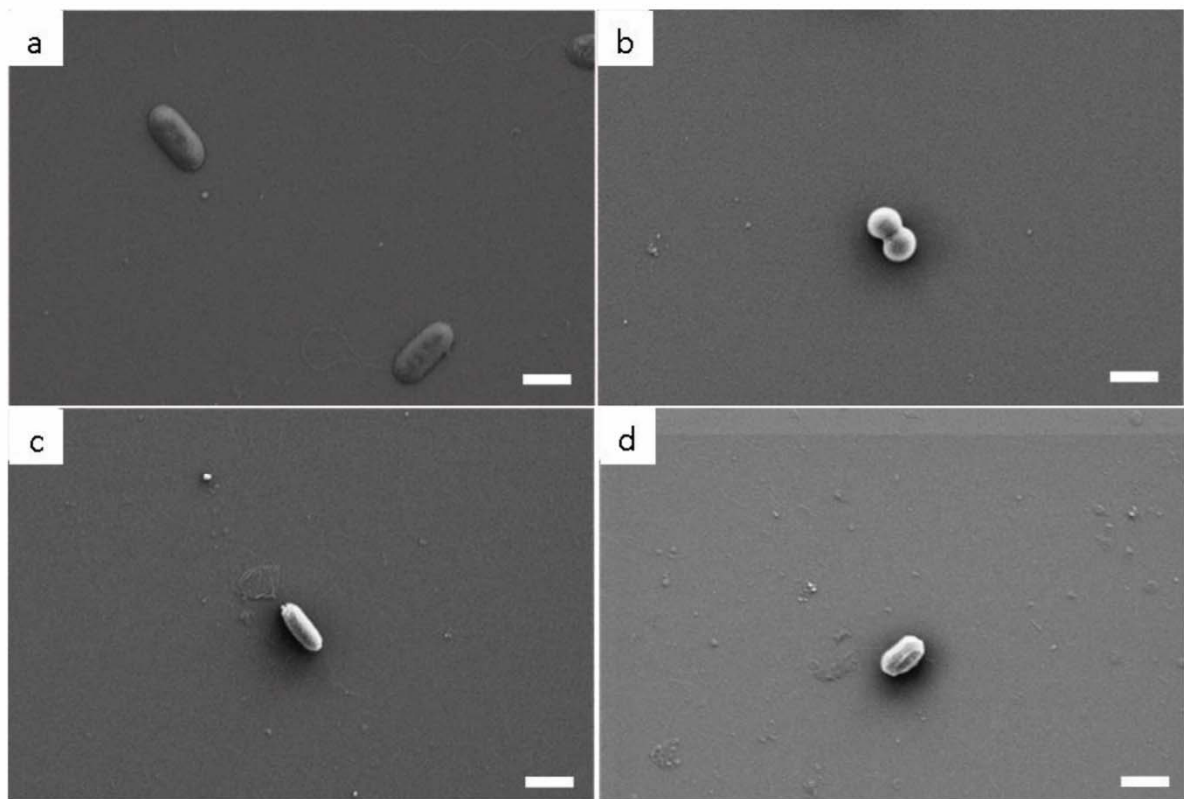


Figura 7

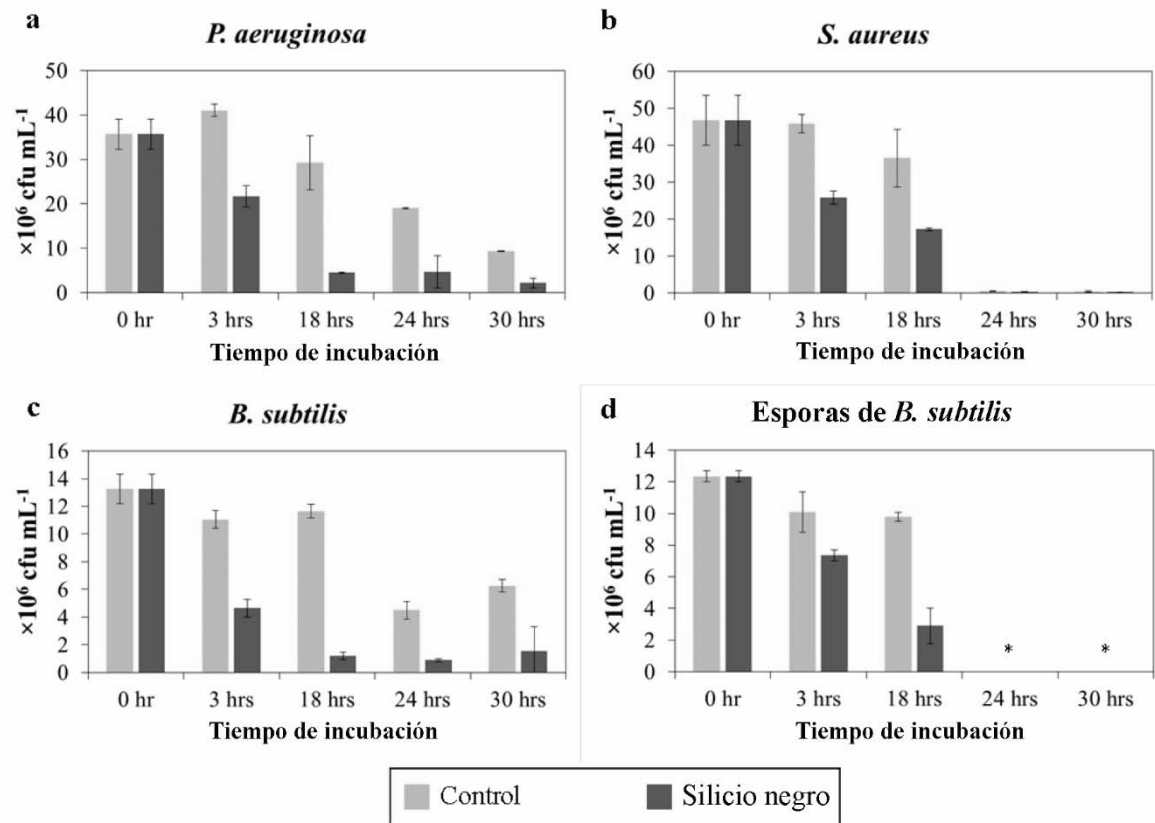


Figura 8

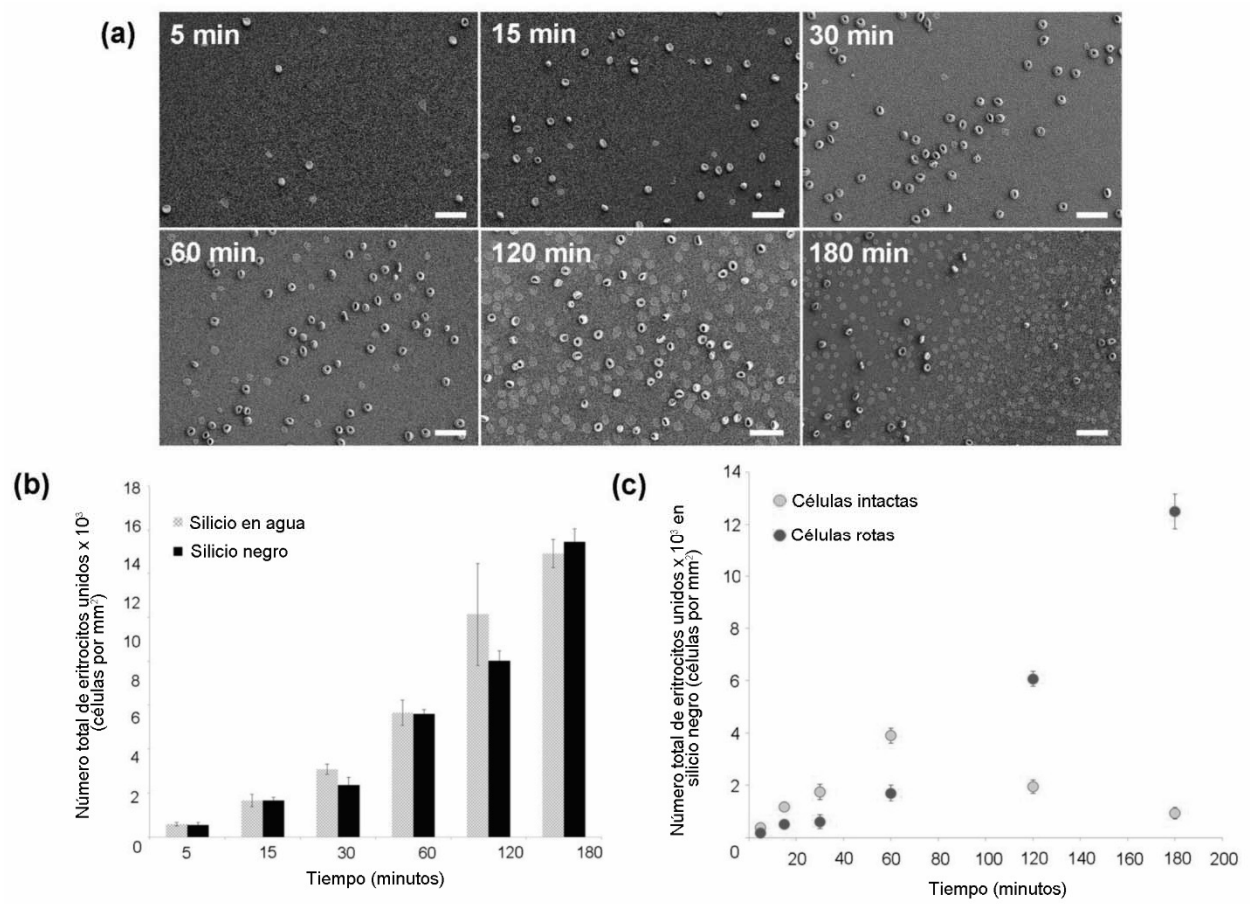


Figura 9

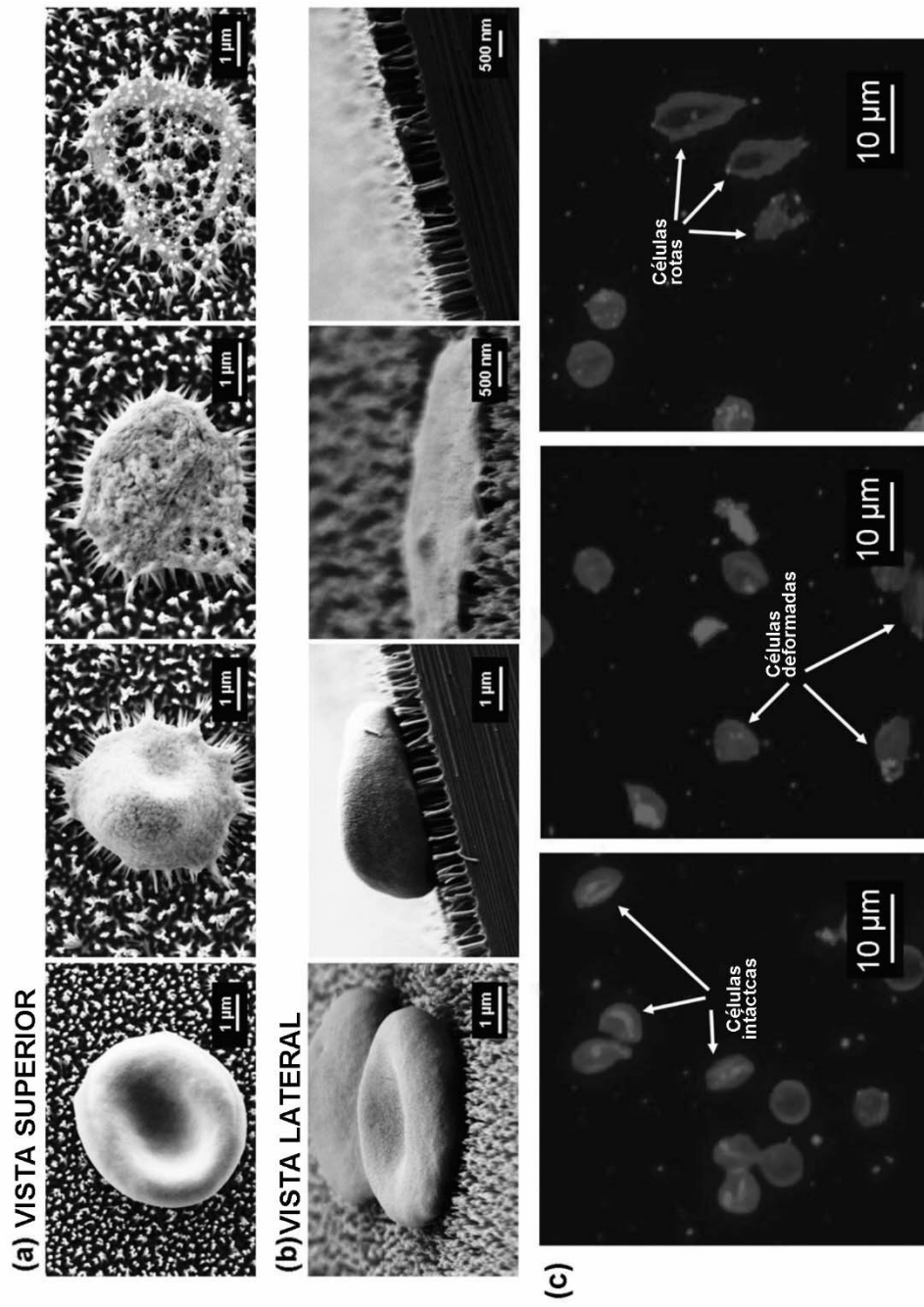


Figura 10

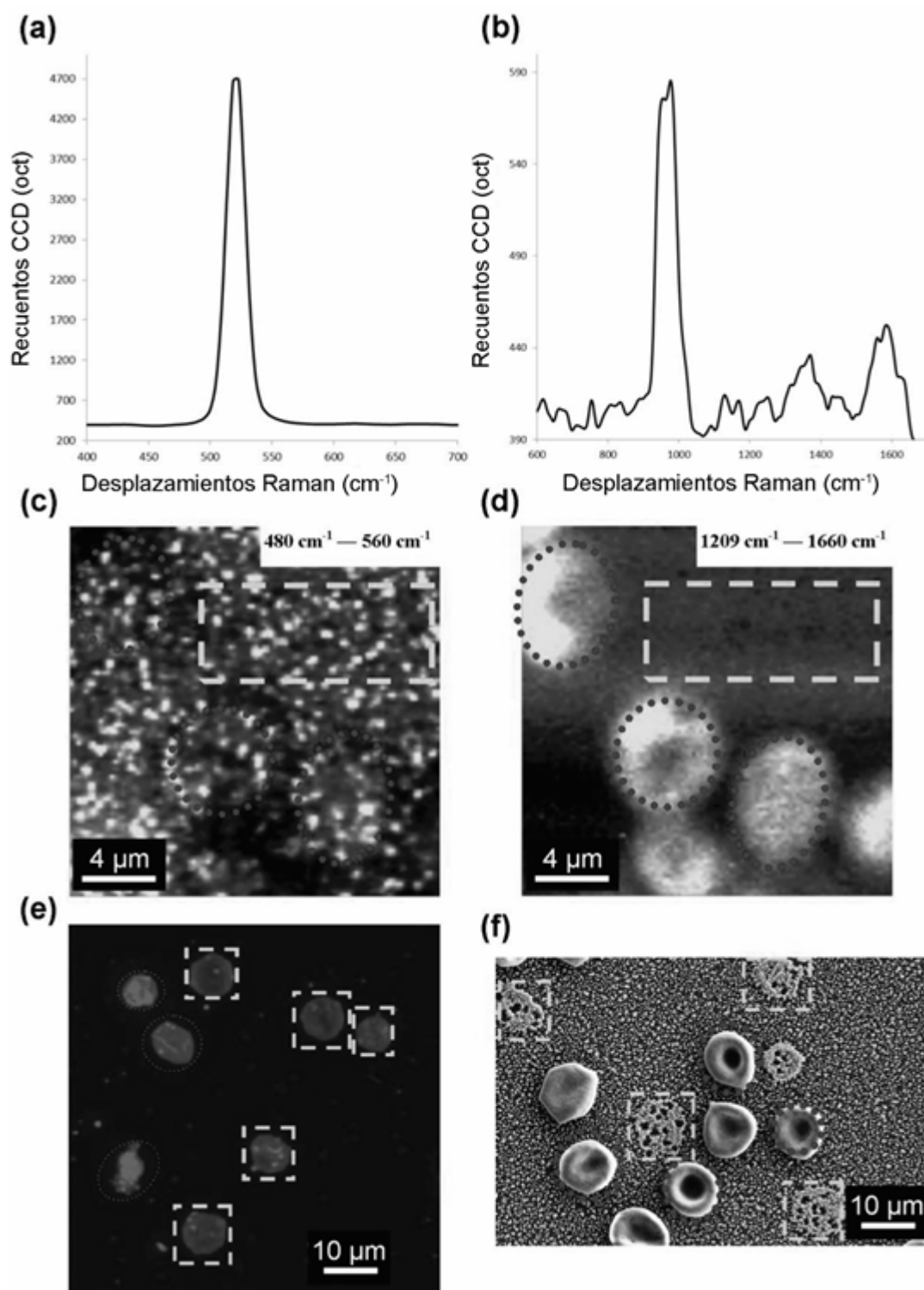


Figura 11

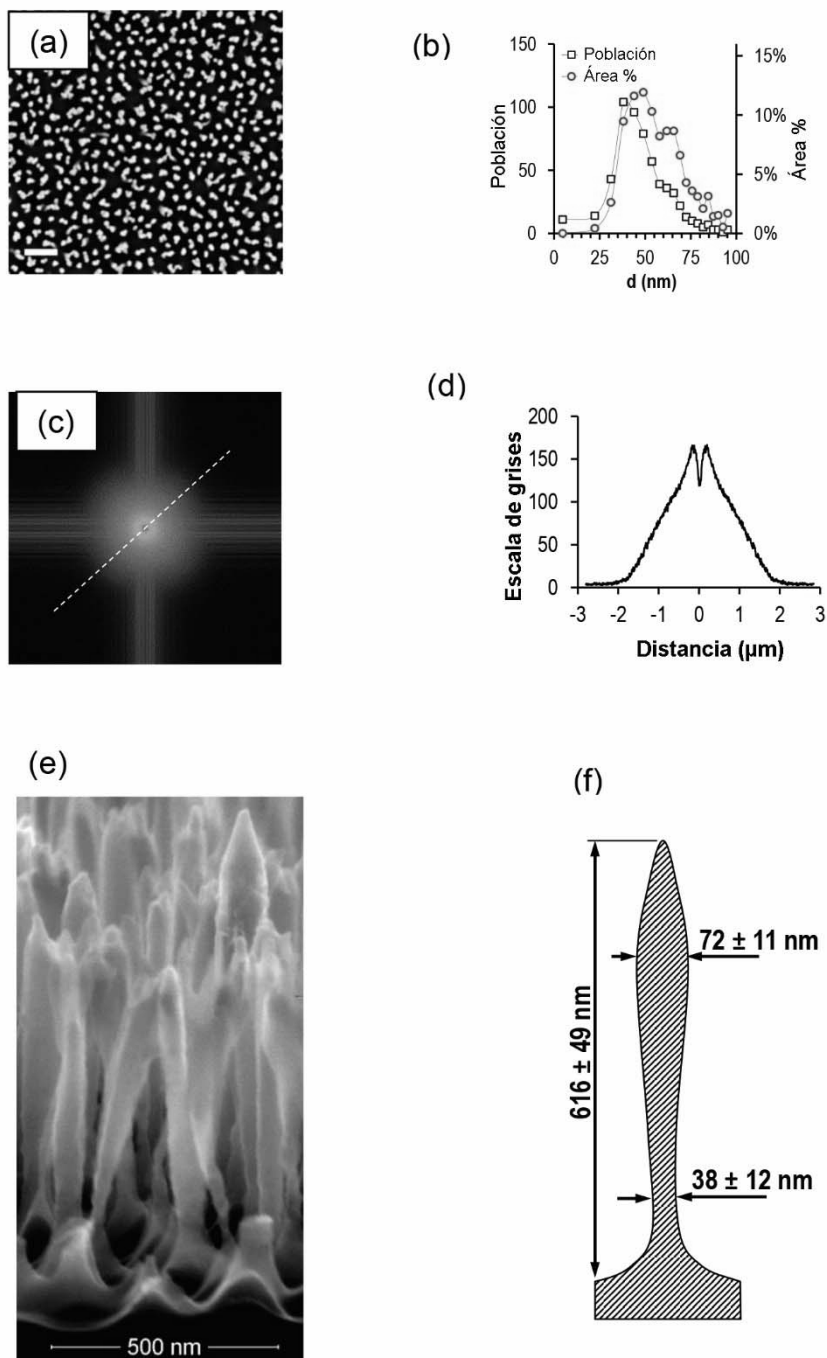


Figura 12