

RECUBRIMIENTO ANTIBACTERIANO

CAMPO DE LA INVENCION

- 5 La invención se enmarca en el campo de la nanobiotecnología, particularmente en productos con actividad antibacteriana que pueden ser utilizados para recubrir superficies e inhibir la colonización y el crecimiento de bacterias formadoras de bio-películas.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

Desde el año 2001 la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha convocado a la búsqueda de nuevas alternativas antimicrobianas, siendo la terapia de bacteriófagos o la experimentación con enzimas derivadas de ellos, una de las alternativas más estudiadas. Los campos con un alto potencial para el uso de bacteriófagos son: la tipificación de fagos; la fagoterapia; la descontaminación de alimentos; la desinfección de instrumentos médicos; la prevención de la formación de biopelículas en superficies; la detección bacteriana; los vehículos para entregar drogas; y la biología molecular.

15

20

La prevención de la formación de biopelículas se ha convertido en un problema de gran importancia en varios sectores tales como la salud, agroindustria, agua, entre otros. Se han identificado varias estrategias para el uso de los bacteriófagos contra las películas bacterianas, entre ellas, la prevención bloqueando el desarrollo de la biopelícula (biofilms) y la eliminación de una biopelícula existente.

25

Himba et al. documentaron el uso de fagos para prevenir el desarrollo de biofilms de *Listeria monocytogenes* sobre una superficie de acero inoxidable usando una solución de fagos con agitación. Luego de 6 horas de tratamiento se observó la disminución de la bioluminiscencia *in vivo* de la película bacteriana formada sobre la lámina de acero por acción de los bacteriófagos. De igual forma, observaron la prevención en el desarrollo de la película de *L.*

30

monocytogenes sobre las láminas de acero en cultivos bacterianos inoculados con el fago

(Hibma AM, Jassim SAA, Griffiths MW. *Infection and removal of L-forms of Listeria monocytogenes with bred bacteriophage*. Int Journal Food Microbiol. 1997 [cited 2017 May 10];34(34):197–207. Available from: <http://pages.cs.wisc.edu/~athula/yohani/Hibma.pdf>]).

- 5 Estudios similares han sido desarrollados para el control de películas bacterianas de diferentes especies, entre las que se destacan *Staphylococcus epidermidis* (Curtin JJ, Donlan RM. *Using bacteriophages to reduce formation of catheter-associated biofilms by Staphylococcus epidermidis*. Antimicrob Agents Chemother [Internet]. 2006 [cited 2017 May 11];50(4):1268–75. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16569839>),
- 10 *Pseudomona aeruginosa* (Ahiwale S, Tamboli N, Thorat K, Kulkarni R, Ackermann H, Kapadnis B. *In Vitro Management of Hospital Pseudomonas aeruginosa Biofilm Using Indigenous T7-Like Lytic Phage*. Curr Microbiol [Internet]. 2011 [cited 2017 May 11];62(2):335–40. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-010-9710-6>) y *Staphylococcus aureus* por ser los causantes más frecuentes de infecciones hospitalarias
- 15 (Parasion S, Kwiatek M, Gryko R, Mizak L, Malm A. *Bacteriophages as an alternative strategy for fighting biofilm development*. Polish J Microbiol. 2014;63(2):137–45).

Un uso potencial de los bacteriófagos es el de prevenir la formación de películas bacterianas en las superficies de los catéteres y dispositivos médicos, aunque surgen algunas variables,

20 tales como la infectividad y estabilidad del fago, la capacidad de un material particular para retener el fago y la estabilidad del fago en presencia de compuestos de los fluidos corporales. Además, la selección cuidadosa de cócteles de fagos, la optimización de la matriz y la validación de métodos *In vitro* y en modelos animales son muy importantes en la evaluación de la utilidad de los bacteriófagos en la lucha contra la formación de las películas

25 bacterianas (González S, Fernández L, Campelo AB, Gutiérrez D, Martínez B, Rodríguez A, et al. *The behavior of Staphylococcus aureus dual-species biofilms treated with bacteriophage phiIPLA-RODI depends on the accompanying microorganism*. Appl Environ Microbiol [Internet]. 2016 AEM.02821-16. Disponible en: <http://aem.asm.org/lookup/doi/10.1128/AEM.02821-16>).

Hajar Maleki et al. describen la síntesis de nanopartículas magnéticas (NPs) de óxido de hierro superparamagnético (SPION). Las nanopartículas pueden ser funcionalizadas con grupos tiocarbamato y acoplarse con péptidos antibacterianos conjugados (AMP-CM) de amplio espectro eficaces contra agentes patógenos intracelulares (v.g. causantes de meningitis y tuberculosis) e infecciones asociadas a los biomateriales (Hajar Malehi et al. *High antimicrobial activity and low human cell cytotoxicity of core-shell magnetic nanoparticles functionalized with an antimicrobial peptide*. ACS Appl. Mater. Interfaces, 2016, 8 (18), pp 11366–11378).

- 10 El documento US 20100291537 describe dispositivos para ser empleados como métodos de tratamiento o métodos de detección *in vivo* o *in vitro* que comprenden ensambles fago-nanopartículas conformados por nanopartículas (tamaño de 2 a 500 nanómetros) de Au, Ag, Pt, Ti, Al, Si, Ge, Cu, Cr, W, Fe, u óxidos de los mismos, unidas con uno o más partículas fágicas (filamentos), plásmidos de *Escherichia coli*, péptidos, pirrol, imidazol, histidina, cisteína o triptófano. El ensamble fago-nanopartícula puede incluir también otros agentes, incluyendo agentes terapéuticos.

- 20 Scibilia et al. revela un enfoque de autoensamblaje para la construcción de redes híbridas nanoestructuradas de diversas aplicaciones en el campo biomédico, consistentes en clones de fagos M13 P9b, específicos para *Pseudomonas aeruginosa*, directamente ensamblados con nanopartículas de plata (AgNPs) obtenidas por ablación láser pulsada. El montaje de las redes está controlado por interacciones electrostáticas entre las proteínas de la cápsida mayor del fago pVIII y las AgNPs. (Scibilia et al. *Self-assembly of silver nanoparticles and bacteriophage*. Sensing and Bio-Sensing Research (2016). Article in Press.)

- 25 Teniendo en cuenta las estrategias de eliminación de películas bacteriana o la prevención de su formación usando soluciones con fagos, existe la necesidad de desarrollar nuevos productos que permitan inhibir el crecimiento bacteriano y evitar la formación de películas bacterianas, reduciendo la posibilidad de que se generen nuevas cepas de bacterias con

resistencia a antibióticos o a desinfectantes., especialmente por la alta prevalencia de bacterias multirresistentes que se encuentran agregadas en estas películas.

Las bacterias en estas películas comparten e intercambian material genético, haciendo muy fácil la aparición de cepas resistentes a antibióticos convencionales. La utilización de bacteriófagos y proteínas derivados de estos permiten conseguir un menor riesgo de desarrollar resistencia y de aumentar la especificidad. Los fagos evolucionan naturalmente a medida que la bacteria cambia, asegurando, dentro de la dinámica de infección, que el fago encuentra la forma de infectar y lisar a su huésped.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención se refiere a un recubrimiento que comprende nanopartículas metálicas y/o magnéticas funcionalizadas y enlazadas con bacteriófagos, proteínas o péptidos con acción antibacteriana derivados de los mismos. El recubrimiento permite inhibir la colonización y el crecimiento de bacterias formadoras de bio-películas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

FIG. 1: Distribución de tamaños de nanopartículas de oro sobre una superficie de silicio por microscopia de fuerza atómica.

FIG. 2: Morfología de nanopartículas de Ag modificadas. a) Espectro UV-VIS de las nanopartículas de Ag b) Imagen TEM de las nanopartículas de Ag c) Análisis de la frecuencia de distribución del tamaño de las nanopartículas de Ag d) Síntesis de nanopartículas de Ag por inducción laser con 50mW, 363,8nm, por 10 segundos.

FIG. 3: Placas de bacteriófagos de *E. coli* utilizando la técnica del doble agar.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

La invención corresponde a un recubrimiento antibacteriano que está formado por nanopartículas metálicas o magnéticas funcionalizadas y enlazadas con bacteriófagos, también llamados fagos, altamente específicos contra bacterias resistentes a antibióticos y formadoras de biopelículas. Además de los fagos, las nanopartículas metálicas o magnéticas se pueden fusionar con proteínas o péptidos con acción antimicrobiana.

El recubrimiento antibacteriano de acuerdo a la invención corresponde a una dispersión o suspensión de nanopartículas metálicas y/o magnéticas funcionalizadas, en un medio acuoso que contiene los bacteriófagos, las proteínas o los péptidos antibacterianos derivados de los fagos. El medio acuoso puede ser agua destilada o una solución buffer (v.g. TRIS, buffer de fosfatos, buffer de citratos) con pH entre 6,0 y 8,0.

Para efectos de la presente invención, las nanopartículas metálicas funcionalizadas se definen como nanopartículas de metales como plata, oro, titanio, cobre, hierro, aluminio, platino, tungsteno, entre otros, con un tamaño de partícula entre 1 y 100 nanómetros, a que tienen unidos mediante enlaces covalentes, grupos hidroxilo, amino, carboxilo y tiol. De igual manera, las nanopartículas magnéticas funcionalizadas se definen como nanopartículas de magnetita, maghemita, níquel, cobalto, entre otros, con un tamaño de partícula entre 1 y 100 nanómetros, que tienen, unidos mediante enlaces covalentes, grupos hidroxilo, amino, carboxilo y tiol.

Las nanopartículas metálicas o magnéticas funcionalizadas se enlazan bien sea con uno o varios tipos de bacteriófagos o con proteínas o péptidos de acción antibacteriana provenientes de los mismos. Si la nanopartícula funcionalizada se enlaza con bacteriófagos, lo hace mediante interacciones electrostáticas, en tanto que, si la nanopartícula funcionalizada se enlaza con proteínas o péptidos derivados de los fagos, lo hace covalentemente. Es importante determinar el potencial Z de los bacteriófagos, proteínas y péptidos de acción antibacteriana para realizar el anclaje de éstos a las nanopartículas y

determinar exactamente con qué ligando se va a funcionalizar la nanopartícula. Para determinar si el ligando se encuentra anclado de forma química con la nanopartícula, es necesaria la caracterización a través de técnicas espectroscópicas como la espectroscopia Raman o Infrarroja.

5

Los bacteriófagos (fagos) son virus altamente específicos que infectan bacterias y las matan. Estos virus se encuentran en cada ambiente donde se encuentre su huésped bacteriano (v.g. en ambientes acuáticos, terrestres, entre otros). Actualmente, se han descrito estructuralmente más de 5500 bacteriófagos diferentes. Desde su descubrimiento, se propuso su uso en el campo clínico para el tratamiento de enfermedades infecciosas, dando así inicio a la fagoterapia, basado en la actividad bactericida de estos virus (Ackermann HW. 2007. 5500 *Phages examined in the electron microscope*. *Arch. Virol.* 152:227–243).

10

Entender la biología de los fagos es esencial para maximizar su uso como inhibidores del crecimiento de biopelículas formadas por bacterias resistentes a antibióticos, dado que no todos los fagos matan a su huésped. Por lo tanto, se debe conocer el proceso de multiplicación de los fagos, que puede ser de dos tipos, lítico o lisogénico. A continuación, se describen las etapas de infección:

15

20

a) Adsorción o fijación a la célula hospedadora: Las bacterias poseen receptores específicos para los virus que las infectan, por ello los fagos tienen especificidad de huésped y son capaces de atacar a un solo tipo de bacteria, incluso, diferenciarlas dentro de la misma especie.

25

b) Penetración, rompimiento de las membranas y paredes bacterianas, e inyección del ácido nucleico en el citoplasma de la célula parasitada: La adsorción y penetración pueden ser de diferentes modalidades según el tipo de virus, siendo el caso más conocido el de los bacteriófagos; tras fijarse a la pared bacteriana con ayuda de las fibras caudales y la placa basal, clavan su eje tubular e inyectan su ADN.

30

En muchos casos el bacteriófago utiliza proteínas (v.g. enzimas) que rompen las membranas bacterianas, teniendo éstas el potencial para ser empleadas en el recubrimiento de la presente invención. Una vez que el material genómico está dentro de la bacteria, dependiendo de la naturaleza del fago, puede ocurrir el ciclo lisogénico y/o el ciclo lítico.

5

El ciclo lisogénico se produce cuando el ácido nucleico viral no expresa sus genes, se integra en el genoma de la bacteria o queda libre a modo de plásmido. Ambos genomas se replican juntos. El fago queda en forma de profago y la célula que lo aloja, queda como célula lisogénica. Este proceso significa una alteración, por enriquecimiento genético, de la célula lisogénica. El profago queda latente en la bacteria y no se activa a menos que la bacteria sufra cambios drásticos que alteren su ADN. Cuando el profago se activa, pasa a un ciclo lítico.

10

En el ciclo lítico el ácido nucleico viral se apodera del metabolismo celular, dirigiéndolo hacia la fabricación de los componentes víricos: copias de ácidos nucleicos víricos, transcripción del mensaje de su genoma a ARNm y traducción de éste a proteínas de la cápside y enzimas virales. Estos componentes se acumulan en distintas partes de la célula infectada.

15

20 c) Ensamblaje: Cuando hay suficiente cantidad de estas moléculas virales, se pliega el ácido nucleico y se introduce dentro de la cápside, formando grandes cantidades de viriones.

25 d) Liberación: Salen de la célula los viriones por diferentes procedimientos, siendo el más frecuente la lisis o desintegración de la membrana de la célula infectada. En esta fase del ciclo lítico se encuentran el otro grupo de enzimas con potencial para el recubrimiento, estas son las endolisinas en conjunto con holinas y spanins.

Los bacteriófagos, sus proteínas, enzimas y péptidos antibacterianos fusionados con las nanopartículas metálicas funcionalizadas del recubrimiento de la invención, inhiben la formación de películas bacterianas de los géneros *Staphylococcus* sp., *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp, *Klebsiella* sp., *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, entre otros. En una
5 modalidad de la invención, los bacteriófagos se seleccionan de bacteriófagos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Staphylococcus aureus* y *Escherichia coli*.

En una modalidad de la invención, la concentración de los bacteriófagos en el recubrimiento está entre 1×10^7 y 1×10^{14} unidades formadoras de placa UFP/mL, preferiblemente entre
10 1×10^{10} y 1×10^{12} , en tanto que la concentración de proteínas y péptidos con acción antibacteriana en el recubrimiento está entre 0,01 µg/mL y 100 µg/mL, preferiblemente entre 0,1 µg/mL y 20 µg/mL.

Las proteínas (enzimas) derivadas de bacteriófagos, que se enlazan con las nanopartículas
15 metálicas o magnéticas en el recubrimiento de la presente invención, se seleccionan de endolisinas y despolimerasas. Las despolimerasas son las proteínas encargadas de los primeros pasos de la infección viral, responsables de la degradación de la envoltura bacteriana, en tanto que las enzimas encargadas de la lisis bacteriana, son las endolisinas, holinas, y spanins (Bacteriophages and Phage-Derived Proteins – Application Approaches,
20 O’Flaherty S, Ross RP, Coffey A. Bacteriophage and Their Lysins for Elimination of Infectious Bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 2009; 33 : 801–819).

Las enzimas de los fagos degradadoras de polisacáridos son proteínas, asociadas a los viriones, utilizadas para degradar enzimáticamente los polisacáridos capsulares (v.g.
25 alginato, hialuronano, ácido polisialico, amilovorano) o estructurales (v.g. lipopolisacaridos y peptidoglicanos) de la bacteria. La habilidad que tienen los fagos para sobrepasar estas estructuras mediante estas enzimas con actividad depolimerizante permite a estos virus infectar bacterias encapsuladas que presentan altos índices de multi-resistencia (<http://www.who.int/mediacentre/news/releases/2017/bacteria-antibiotics-needed/en/>).

30

Los péptidos que se enlazan con las nanopartículas metálicas o magnéticas en el recubrimiento de la presente invención, se seleccionan de péptidos que corresponden a los dominios CHAP de endolisinas. Se ha descrito un dominio catalítico común llamado CHAP, (por su nombre en inglés cysteine-and-histidine-dependent aminohidrolase/peptidase), que presenta actividad hidrolasa de peptidoglicano (PGH). CHAP ha sido caracterizado y probado *in vivo* usando modelos *in vitro* e *in vivo* (Sanz-Gaitero et al. *Crystal structure of the lytic CHAPK domain of the endolysin LysK from Staphylococcus aureus bacteriophage K. Virology Journal* 2014. 11:133).

- 10 Los siguientes Ejemplos ilustran la invención, sin estar el concepto inventivo restringido a los mismos.

EJEMPLO 1. Síntesis de nanopartículas metálicas de Au.

- 15 En un recipiente se burbujearon 50 mL de H[AuCl₄] (0,01% p/v) con nitrógeno gaseoso. En otro recipiente, una solución al 1% (p/v) de citrato de sodio también se burbujegó con nitrógeno gaseoso y rápidamente las dos soluciones se llevaron a la incubadora durante 15 minutos para estabilizarlas.
- 20 Luego se tomó un volumen de 1,0 mL de la solución de citrato, se añadió a la solución de H[AuCl₄]. Seguidamente se dejó en reposo la mezcla durante 12 a 24 horas hasta observar coloración de rojo a violeta. El volumen de citrato agregado se puede variar para obtener diferentes tamaños de nanopartículas. La intensidad de la coloración de la solución puede ser un indicativo del tamaño promedio de las nanopartículas.

25

EJEMPLO 2. Síntesis de nanopartículas metálicas de Ag.

- La solución de crecimiento de nanopartículas de plata se preparó por el método básico descrito en las publicaciones: Y. Sun.; B. Mayers.; Y. Xia. *Transformation of silver nanospheres into nanobelts and triangular nanoplates through a thermal process*. Nano
- 30

Letters, 3(5):675–679, 2003.; y M. Maillard.; H. Pinray.; B. Louis. *Silver nanodisk growth by surface plasmon enhanced photoreduction of adsorbed [Ag⁺]*. Nano Letters, 3(11):1611–1615, 2003., las cuales se incorporan en su totalidad como referencia.

- 5 Se mezclaron con agitación una solución de nitrato de plata (100 mL; 0,1 mM) y citrato trisódico (1 mL, 0,5 mM) y se añadieron gota a gota 0,5 a 0,7 mL de NaBH₄ (10 mM). Se observó un máximo de absorción en el intervalo de 398-401 nm que aumentaba en intensidad con cada gota añadida. La adición de solución de NaBH₄ se detuvo cuando la absorción máxima no aumentó más.

10

EJEMPLO 3. Síntesis de nanopartículas magnéticas de magnetita.

- Las nanopartículas magnéticas de magnetita se obtuvieron siguiendo la metodología de Subbiahdoss et al., 2012, por el método poliol (Subbiahdoss G. *Magnetic targeting of surface-modified superparamagnetic ironoxide nanoparticles yields antibacterial efficacy against biofilms of gentamicin-resistant staphylococci*. Acta biomaterialia 8(6):2047-55). Las
15 soluciones acuosas de FeCl₂*4H₂O y FeCl₃*H₂O se mezclaron en dietilenglicol. La mezcla se calentó hasta 170°C por un periodo de 15 minutos, luego se adicionó NaOH y luego de 1 hora se obtuvieron las nanopartículas de magnetita, las cuales se recogieron empleando un
20 magneto y se enjuagaron con una solución de HNO₃.

EJEMPLO 4. Caracterización de las nanopartículas metálicas

- La caracterización de las nanopartículas metálicas obtenidas según los Ejemplos 1 y 2 se
25 puede realizar con la ayuda de un “*Dynamic Light Scattering*” o formas más convencionales como el espectro UV-Vis para la identificación del tamaño de las nanopartículas a través del plasmón de resonancia. La microscopia de fuerza atómica (AFM), es otra técnica alternativa para verificar el tamaño de las nanopartículas. En la FIG. 1 se muestra la distribución de tamaños de nanopartículas de oro (promedio de 12 ± 2nm) sobre una superficie de silicio.

30

EJEMPLO 5. Modificación de la superficie (funcionalización) de las nanopartículas de metálicas/magnéticas

Las nanopartículas fueron tratadas con 3-aminopropiltietoxysilano (APTES), para anclar el grupo amino a su superficie. Para ello, 90 mL de metanol y 1 mL de APTES se agregaron a la solución de nanopartículas sintetizadas acorde a los Ejemplos 1 a 3. La mezcla fue agitada a 200 rpm a 50°C por 12 horas para generar la unión nanopartícula-APTES. Finalmente, se enjuagó dos veces con agua desionizada.

EJEMPLO 6. Unión de nanopartículas metálicas/magnéticas con proteínas antibacterianas.

Se añadieron 2 mL de glutaraldehído (25%, v/v) a una la solución de nanopartícula-APTES obtenidas de acuerdo al Ejemplo 5 para hacer el puente entre las nanoparticuals funcionalizadas y la proteína. Se incubó a 37°C durante 4 horas para formar nanopartícula-APTES-glutaraldehído, seguido por 8 lavados con agua desinonizada.

El conjunto nanopartícula-APTES-glutaraldehído obtenido se resuspendió en 50 mL de una solución buffer de fosfato 5mM a pH 7,0. A 8,0 mL de esta mezcla se le adicionaron 100 µL de una solución de proteína o de péptido antibacteriano (2,0 mg m/L) aislado del fago, y se agitó a 200 rpm, a 4°C durante 15 horas.

EJEMPLO 7. Preparación de nanopartículas en una lámina de vidrio

Se preparó un recubrimiento sobre una superficie (lámina) de vidrio previamente modificada con agua regia (HCl:HNO₃) en una razón de 3:1 por volumen. La lámina de vidrio se enjuagó con agua ultra-pura cinco veces y tres veces más con etanol por sonicación. La lamina se secó en un horno a 70°C por 2 horas. Una vez limpiada la superficie de la lámina, se sumergió verticalmente en una solucion 1% APTES/etanol anhídrido por 2 horas a 70°C, luego se

enjuagó nuevamente para eliminar el exceso de silano y se dejó secar a 100°C por 2 horas más.

5 Finalmente, la lámina se dispuso en una suspensión de nanopartículas metálicas/magnéticas obtenidas según los Ejemplos 1 a 3, generando así una monocapa de nanopartículas sobre la superficie de vidrio.

EJEMPLO 8. Preparación de un recubrimiento antibacteriano

10 La síntesis del recubrimiento antibacteriano se realizó a partir de una suspensión de nanopartículas metálicas y magnéticas obtenidas según los Ejemplos 1 a 7. Las nanopartículas se mezclaron con una solución a un pH entre 6,5 y 7,5 de bacteriófagos en concentraciones entre 1×10^7 y 1×10^{14} unidades formadoras de placa UFP/mL, para generar así el recubrimiento.

15 La dispersión solución obtenida se dejó en incubación durante 24 horas. Finalmente, el exceso de bacteriófagos se eliminó por centrifugación. De igual manera, a partir de láminas de vidrio con nanopartículas metálicas y/o magnéticas obtenidas según el Ejemplo 7, se obtuvieron láminas con el recubrimiento de la invención.

20

EJEMPLO 9. Ensayo de actividad Antibacteriana del recubrimiento

Un recubrimiento de nanopartículas de Ag funcionalizadas fusionadas con fagos de *E. coli*, obtenido según el Ejemplo 8, se sometió a una prueba de inhibición del crecimiento bacteriano empleando la técnica de doble agar. (Kropinski 2009. Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions. Editors: Clokie, Martha R. J., Kropinski, Andrew. La aparición de placas indica la lisis bacteriana debido al recubrimiento (FIG 3).

EJEMPLO 10. Ensayo de actividad Antibacteriana de una lámina con recubrimiento.

Una lámina con recubrimiento obtenida según el Ejemplo 7, se suspendió en cultivos bacterianos de *E.coli* durante 6, 12 y 24 horas y luego ente fueron lavadas con buffer fosfato
5 PBS. Se realizó una tinción de Gram directamente en la lámina, se observó al microscopio con el objetivo 100x con aceite de inmersión.

Se determinó el número de células adheridas por campo óptico en un área de 0,5 cm cuadrados. Esto fue comparado con la lámina control sin recubrimiento. El procedimiento
10 fue realizado por triplicado y no se observó adherencia de las bacterias en la lámina, lo que demuestra la actividad antibacteriana.

REIVINDICACIONES

1. Un recubrimiento que comprende nanopartículas metálicas y/o magnéticas funcionalizadas y enlazadas con bacteriófagos, con sus proteínas o con sus péptidos de acción antibacteriana.
5
2. El recubrimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, donde las nanopartículas metálicas y/o magnéticas están funcionalizadas con grupos amino, hidroxilo, carboxilo y tiol.
- 10 3. El recubrimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, donde las nanopartículas metálicas tienen un tamaño entre 1 y 100 nanómetros.
4. El recubrimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, donde las nanopartículas metálicas son de plata, oro, titanio, cobre, hierro, aluminio, platino o tungsteno.
15
5. El recubrimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, donde las nanopartículas magnéticas son de magnetita, maghemita, níquel y cobalto.
6. El recubrimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, donde los bacteriófagos sus proteínas y péptidos antibacterianos derivados se seleccionan de *Staphylococcus* sp.,
20 *Streptococcus* sp., *Pseudomonas* sp, *Kelbsiella* sp., *Salmonella* sp. *Eschericia coli*.
7. El recubrimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, donde los bacteriófagos están en una concentración entre 1×10^{10} y 1×10^{12} UFP/mL.
25
8. El recubrimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, donde las proteínas antibacterianas derivadas de los bacteriófagos se seleccionan de endolisinas y despolimerasas.

9. El recubrimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, donde los péptidos antibacterianos derivados de los bacteriófagos corresponden a dominios CHAP de endolisinas.
- 5 10. El recubrimiento de acuerdo con la Reivindicación 1, para inhibir la propagación o colonización de cepas bacterianas productoras de biopelículas.

RESUMEN

La presente invención se refiere a un recubrimiento que comprende nanopartículas metálicas o magnéticas funcionalizadas y enlazadas con bacteriófagos, proteínas o péptidos con acción antibacteriana derivados de los mismos. El recubrimiento antibacteriano permite inhibir la colonización y el crecimiento de bacterias formadoras de bio-películas en superficies y dispositivos médicos.

FIGURAS

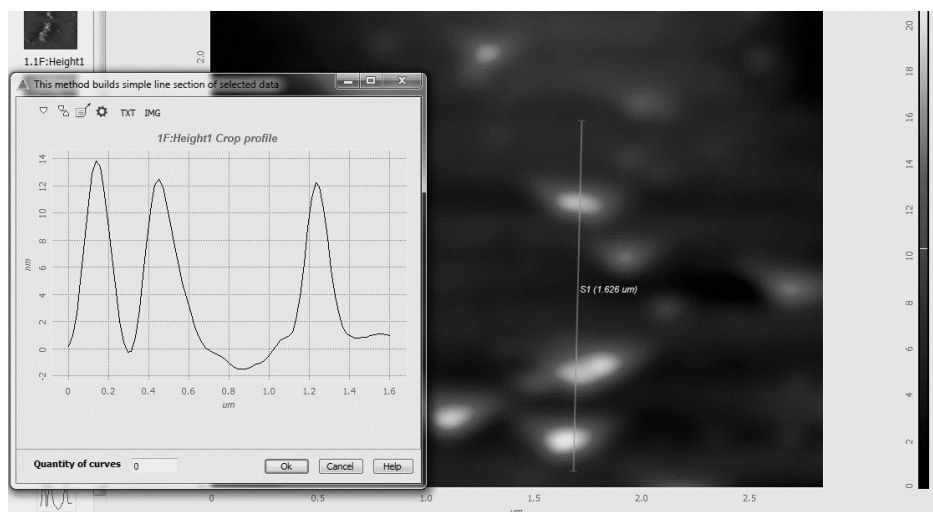


FIG. 1

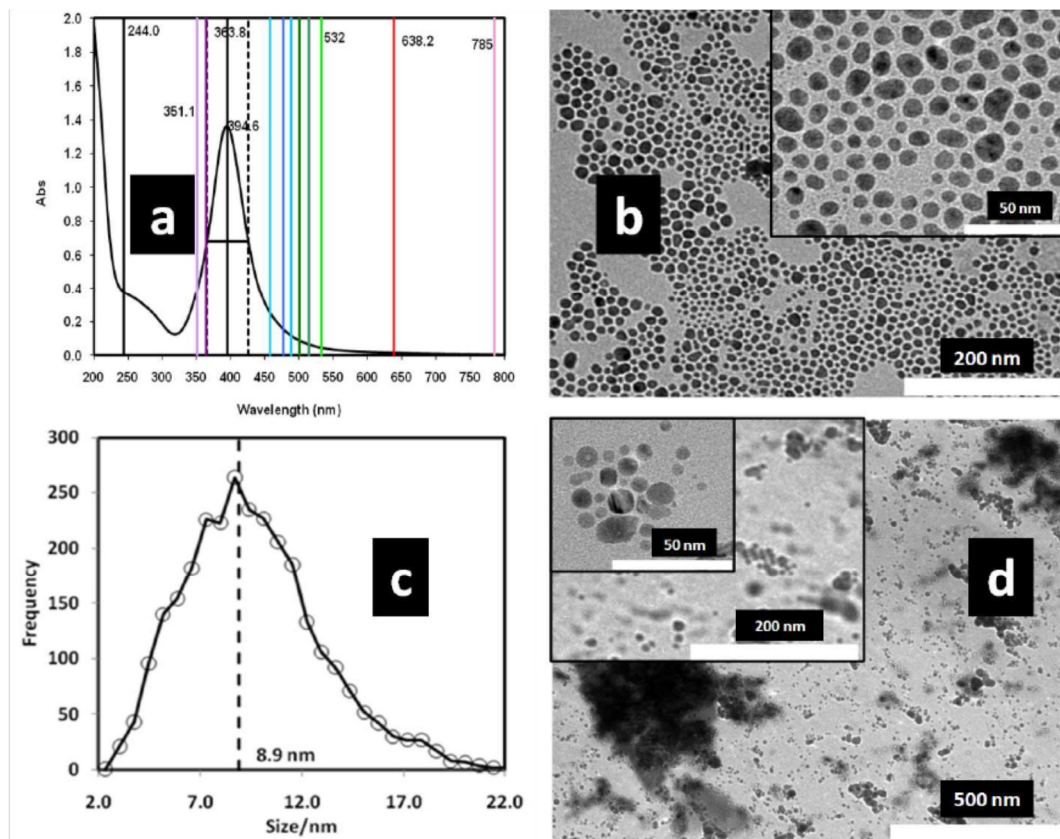


FIG. 2

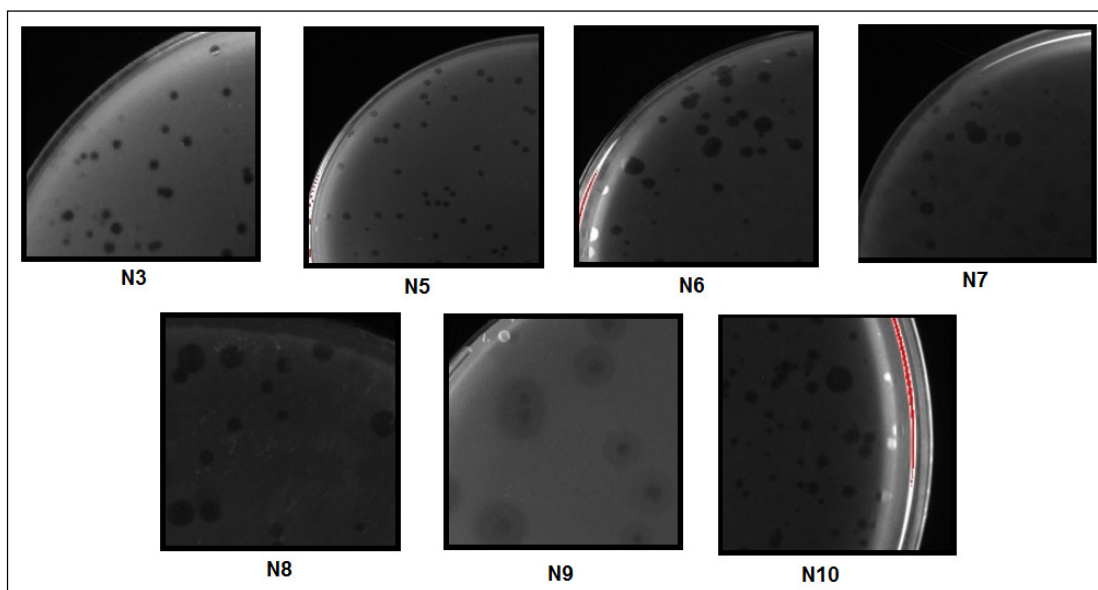


FIG. 3