

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 384 519**

51 Int. Cl.:
A61L 15/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **05713806 .7**
96 Fecha de presentación: **18.02.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1718147**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **08.11.2006**

54 Título: **Agente hemostático para uso tópico e interno**

30 Prioridad:
23.02.2004 US 547257 P
23.02.2004 US 547166 P
22.12.2004 US 638865 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
06.07.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
06.07.2012

73 Titular/es:
**LOMA LINDA UNIVERSITY MEDICAL CENTER
24888 PROSPECT STREET
LOMA LINDA, CA 92350, US**

72 Inventor/es:
**ZHU, Yong Hua;
YANG, Chang Zheng y
KIRSCH, Wolff M.**

74 Agente/Representante:
de Elzaburu Márquez, Alberto

ES 2 384 519 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

Agente hemostático para uso tópico e interno.

Campo del invento

5 Este invento se refiere a materiales hemostáticos desplegados que comprenden fibras de quitosano. Los materiales hemostáticos son adecuados para uso en el sellado o control de sangrías activas de desgarros y punciones arteriales y venosas, y para controlar la supuración de tejidos.

Antecedentes del invento

10 Los procedimientos quirúrgicos y las lesiones traumáticas se caracterizan a menudo por una masiva pérdida de sangre. Los planteamientos convencionales, tales como presión manual, cauterización y suturas, pueden llevar mucho tiempo y no son siempre eficaces en el control de las sangrías.

15 A lo largo de los años se han desarrollado diversos agentes hemostáticos tópicos para controlar las sangrías durante procedimientos quirúrgicos y para controlar la sangría que resulta de una lesión traumática. Ciertos agentes, tales como polvos basados en colágeno, esponjas y telas, son de naturaleza corpuscular. Los agentes hemostáticos corpusculares proporcionan una red para la formación natural de trombos, pero son incapaces de potenciar este proceso en pacientes coagulopáticos. El colágeno microfibrilar, un agente hemostático corpuscular, viene en forma de polvo y estimula la cascada hemostática intrínseca del paciente. Sin embargo, se ha comunicado que este producto produce embolias y provoca una respuesta inflamatoria localizada si se usa durante un baipás cardiopulmonar. Se pueden usar agentes farmacológicamente activos, tal como trombina, en combinación con un vehículo corpuscular, como, por ejemplo, en una esponja de gel absorbente o un polvo empapado en trombina. Se ha utilizado la trombina para controlar la sangría en superficies difusamente sangrantes, pero la falta de una estructura sobre la cual se pueda adherir el coágulo ha limitado su uso. Los pegamentos de fibrinas autólogas y alogénicas pueden causar la formación de coágulos, pero no se adhieren bien al tejido mojado y ejercen un impacto pequeño sobre las heridas activamente sangrantes.

25 En el Documento WO 01/24840 se describe un dispositivo para el cuidado de heridas que comprende fibras de quitosano que han sido modificadas por tratamiento con ácido y/o por tratamiento con calor. El peso molecular del quitosano es inferior a 750 kDa, preferiblemente inferior a 300 kDa.

En los Documentos WO 2005/002510 y WO 2005/041811 (ambos publicados después de la fecha de prioridad de la presente solicitud) se describen materiales hemostáticos desplegados que comprenden fibras de quitosano. En estos documentos no se describe el peso molecular del quitosano usado.

Sumario del invento

35 Es deseable un material hemostático que sea bioabsorbible, que proporcione una hemostasia superior y que pueda ser fabricado en una diversidad de formas adecuadas para uso en el control de sangrías de una diversidad de heridas. Además, es también deseable que el material hemostático sea adecuado para uso tanto en aplicaciones quirúrgicas como en el tratamiento de lesiones traumáticas sobre el terreno. La sangría es particularmente problemática, por ejemplo, en la cirugía vascular. En la cirugía cardiaca, las múltiples anastomosis vasculares y zonas de introducción de cánulas, complicadas por la coagulopatía provocada por un baipás extracorpóreo, pueden dar lugar a una sangría que sólo puede ser controlada mediante hemostáticos tópicos. Una hemostasia rápida y eficaz durante una cirugía espinal, en la que el control de la sangría ósea, epidural y/o subdural o la sangría de la médula espinal no es sensible a suturas ni al cauterio, puede minimizar la posibilidad de daños a las raíces nerviosas y reducir la duración del procedimiento. En la cirugía hepática, por ejemplo, en procedimientos de trasplante de hígado de donante vivo o en la eliminación de tumores cancerosos, existe un riesgo sustancial de una sangría masiva. Un material hemostático eficaz puede mejorar significativamente los resultados de dichos procedimientos en los pacientes. Incluso en aquellas situaciones en que la sangría no es masiva, por ejemplo, en procedimientos dentales tales como extracciones de dientes, así como en el tratamiento de abrasiones, quemaduras y similares, puede ser deseable un material hemostático eficaz. En neurocirugía, las heridas supurantes son comunes y difíciles de tratar.

45 En consecuencia, en un primer aspecto, se proporciona un material hemostático, material que comprende fibras de quitosano, en que el quitosano tiene un peso molecular de 800 kDa o superior y un grado de acetilación de aproximadamente 90% o superior, de acuerdo con la Reivindicación 1.

En una realización preferida del primer aspecto, el material hemostático comprende una borla o un muletón.

50 En una realización preferida del primer aspecto, el material hemostático comprende una tela no tejida en telar o una tela tejida en telar.

En una realización preferida del primer aspecto, el material hemostático comprende una tela no tejida en telar que tiene una cara rugosa y una cara lisa.

En una realización preferida del primer aspecto, el material hemostático comprende una tela no tejida en telar cuyas dos caras son rugosas.

En una realización preferida del primer aspecto, el material hemostático comprende una pluralidad de capas de fibra de quitosano.

- 5 En un segundo aspecto, se proporciona un procedimiento para preparar un material hemostático que comprende fibras de quitosano de acuerdo con la Reivindicación 8, en que el quitosano tiene un peso molecular de 800 kDa o superior y un grado de acetilación de aproximadamente 90% o superior, procedimiento que comprende proporcionar una primera capa de fibra de quitosano, aplicar un ácido débil a la primera capa de fibras de quitosano, y colocar una segunda capa de fibras de quitosano encima de la primera capa de fibras de quitosano, por lo cual se obtiene un material hemostático.

En una realización preferida del segundo aspecto, las operaciones se repiten al menos una vez.

En una realización preferida del segundo aspecto, el procedimiento comprende además la operación de calentar el material hemostático, por lo cual se evapora un líquido del material hemostático.

- 15 En una realización preferida del segundo aspecto, el procedimiento comprende además comprimir el material hemostático entre una primera superficie y una segunda superficie y calentar el material hemostático, por lo cual se obtiene un material hemostático seco.

En una realización preferida del segundo aspecto, el ácido débil comprende una disolución de ácido acético que tiene un pH de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 4,5.

- 20 En un tercer aspecto, se proporciona un tratamiento de una herida, tratamiento que comprende la operación de aplicar un material hemostático a la herida, por lo que se controla la sangría o la supuración, material hemostático que comprende fibras de quitosano, en que el quitosano tiene un peso molecular de 800 kDa o superior y un grado de acetilación de aproximadamente 90% o superior, como se describe en la Reivindicación 17.

En una realización preferida del tercer aspecto, el material hemostático está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una borla, una esponja y una tela.

- 25 En una realización preferida del tercer aspecto, la herida es seleccionada del grupo que consiste en un lecho tumoral, una herida hepática y una herida cerebral.

En una realización preferida del tercer aspecto, la herida es seleccionada del grupo que consiste en una herida por punción arterial, una herida por punción venosa, una herida por desgarro arterial y una herida por desgarro venoso.

Breve descripción de los dibujos

- 30 La Figura 1 proporciona una imagen de un muléton de quitosano por microscopía electrónica de barrido (SEM; del inglés, scanning electron microscopy).

- 35 La Figura 2 representa el sellado de una punción en la arteria femoral, con una borla hemostática. La borla de quitosano, expansible, absorbible y biológicamente compatible, se coloca contra la herida por punción por medio de una incisión en la piel. La borla hemostática se expande y se mantiene en su sitio contra la pared de la arteria, sellando la punción.

La Figura 3 representa un dispositivo para sellar una punción arterial con un muléton hemostático.

La Figura 4 representa esquemáticamente un procedimiento para obtener quitosano a partir de desechos de camarones.

La Figura 5 representa esquemáticamente un aparato para preparar fibras de quitosano.

- 40 La Figura 6 proporciona unl esquema de una cadena de montaje para la producción de muléton de quitosano, que incluye un dispositivo alimentador, una máquina aflojadora, una máquina cardadora, una cinta transportadora y una máquina devanadora.

La Figura 7 proporciona una micrografía electrónica de barrido de un muléton de quitosano cargado con microesferas microporosas de polisacárido al 15%.

- 45 La Figura 8 proporciona una micrografía electrónica de barrido de un muléton de quitosano cargado con microesferas microporosas de polisacárido al 60%.

Las Figuras 9A y 9B proporcionan micrografías electrónicas de barrido de haces de microesferas microporosas de polisacárido fusionados o enlazados a fibras de quitosano.

Las Figuras 10A, 10B y 10C proporcionan imágenes, por SEM, de microesferas microporosas de polisacárido físicamente cargadas sobre un mulétón de quitosano.

Descripción detallada de la realización preferida

La siguiente descripción y los ejemplos ilustran con detalle una realización preferida del presente invento.

5 Hemostasia

La hemostasia es la detención de una sangría, ya sea por vasoconstricción normal, por una obstrucción anormal o por coagulación o medios quirúrgicos. La hemostasia por coagulación depende de una interacción compleja de proteínas de coagulación y fibrinolíticas del plasma, las plaquetas y la vasculatura sanguínea. Hay tres categorías de hemostasia: hemostasia primaria, hemostasia secundaria y hemostasia terciaria.

10 La hemostasia primaria se define como la formación del tapón primario de plaquetas. En ella están implicadas las plaquetas, la pared de los vasos sanguíneos y el factor de von Willebrand. El daño en la pared de los vasos sanguíneos va inicialmente seguido de vasoconstricción. La vasoconstricción no sólo retrasa la pérdida sanguínea extravascular sino también enlentece el flujo sanguíneo local, potenciando la adherencia de las plaquetas a las superficies subendoteliales expuestas y la activación del proceso de coagulación. La formación del tapón primario de plaquetas implica una adhesión de plaquetas seguida de la activación y luego la agregación de las plaquetas para formar un tapón de plaquetas.

15 En la adhesión de las plaquetas, las plaquetas se adhieren al subendotelio expuesto. En zonas de elevado índice de cizallamiento, tal como en la microvasculatura, esto es mediado por el factor de von Willebrand (vWf; del inglés, von Willebrand factor), que se une a la glicoproteína Ib-IX de la membrana plaquetaria. En zonas de bajo índice de cizallamiento, tal como en las arterias, el fibrinógeno media en la unión de las plaquetas al subendotelio al fijarse a un receptor plaquetario. La adhesión de las plaquetas a la pared vascular las activa, lo que causa que las plaquetas cambien de forma, activen el receptor de colágeno de su superficie y liberen componentes de los gránulos alfa y los gránulos densos. Las plaquetas activadas también sintetizan y liberan tromboxano A2 y factor activador de plaquetas, que son potentes vasoconstrictores y agonistas de la agregación plaquetaria.

20 La agregación de las plaquetas implica la activación, el reclutamiento y la unión de plaquetas adicionales, que se unen a las plaquetas adheridas. Este proceso es activado por agonistas plaquetarios tales como tromboxano 2, PAF, ADP y serotonina. Esta activación es potenciada por la generación de trombina, otro agonista plaquetario, a través de la cascada de la coagulación. La agregación de las plaquetas es esencialmente mediada por el fibrinógeno, que se une a la glicoproteína IIb/IIIa de plaquetas adyacentes. Esta agregación conduce a la formación del tapón primario de plaquetas, que es estabilizado por la formación de fibrina.

25 En la hemostasia secundaria, se forma fibrina a través de la cascada de la coagulación, en la que están implicados factores de coagulación circulantes, calcio y plaquetas. La cascada de la coagulación comprende tres vías: la intrínseca, la extrínseca y la común.

30 En la vía extrínseca está implicado el complejo de factor tisular y factor VII, complejo que activa el factor X. En la vía intrínseca están implicados kininógeno de alto peso molecular, precalicreína y los factores XII, XI, IX y VIII. El factor VIII actúa como un cofactor (con calcio y fosfolípido plaquetario) para la activación del factor X mediada por el factor IX. Las vías extrínseca e intrínseca convergen en la activación del factor X. La vía común comprende la generación, mediada por el factor X, de trombina a partir de protrombina (facilitada por el factor V, calcio y fosfolípido plaquetario), con la producción de fibrina a partir de fibrinógeno.

35 La vía principal para el inicio de la coagulación es la vía extrínseca (factor VII y factor tisular), mientras que la vía intrínseca actúa para multiplicar la cascada de la coagulación. La cascada de la coagulación es iniciada por la vía extrínseca con la generación/exposición del factor tisular. El factor tisular es expresado por células endoteliales, tejido subendotelial y monocitos, expresión que es suprarregulada por citocinas. El factor tisular se une luego al factor VII, y este complejo activa el factor X. El factor X, en presencia de factor V, calcio y fosfolípido plaquetario, activa entonces la protrombina hasta trombina. Esta vía es rápidamente inhibida por una molécula asociada a lipoproteínas, llamada inhibidor de la vía del factor tisular. Sin embargo, la pequeña cantidad de trombina generada por esta vía activa el factor XI de la vía intrínseca, el cual multiplica la cascada de la coagulación.

40 La cascada de la coagulación es multiplicada por las pequeñas cantidades de trombina generadas por la vía extrínseca. Esta trombina activa la vía intrínseca por activación de los factores XI y VIII. El factor IX activado, junto con el factor VIII activado, calcio y fosfolípido, a los que se hace referencia como complejo tenasa, multiplican la activación del factor X, lo que genera grandes cantidades de trombina. La trombina, a su vez, escinde el fibrinógeno para formar monómeros solubles de fibrina que luego polimerizan espontáneamente para formar el polímero soluble de fibrina. La trombina también activa el factor XIII, el cual, junto con calcio, sirve para entrecruzar y estabilizar el polímero soluble de fibrina, formándose fibrina entrecruzada.

45 La hemostasia terciaria se define como la formación de plasmina, que es la principal enzima responsable de la fi-

brinólisis. Al mismo tiempo que se activa la cascada de la coagulación, se libera el activador tisular del plasminógeno desde células endoteliales. El activador tisular del plasminógeno se une al plasminógeno dentro del coágulo, convirtiéndolo en plasmina. La plasmina lisa tanto el fibrinógeno como la fibrina del coágulo, liberando productos de degradación de la fibrina y el fibrinógeno.

- 5 Las realizaciones preferidas proporcionan composiciones y materiales que reaccionan con el sistema hemostático para tratar o prevenir una sangría. En particular, las composiciones y materiales de realizaciones preferidas dan lugar a la coagulación de la sangre.

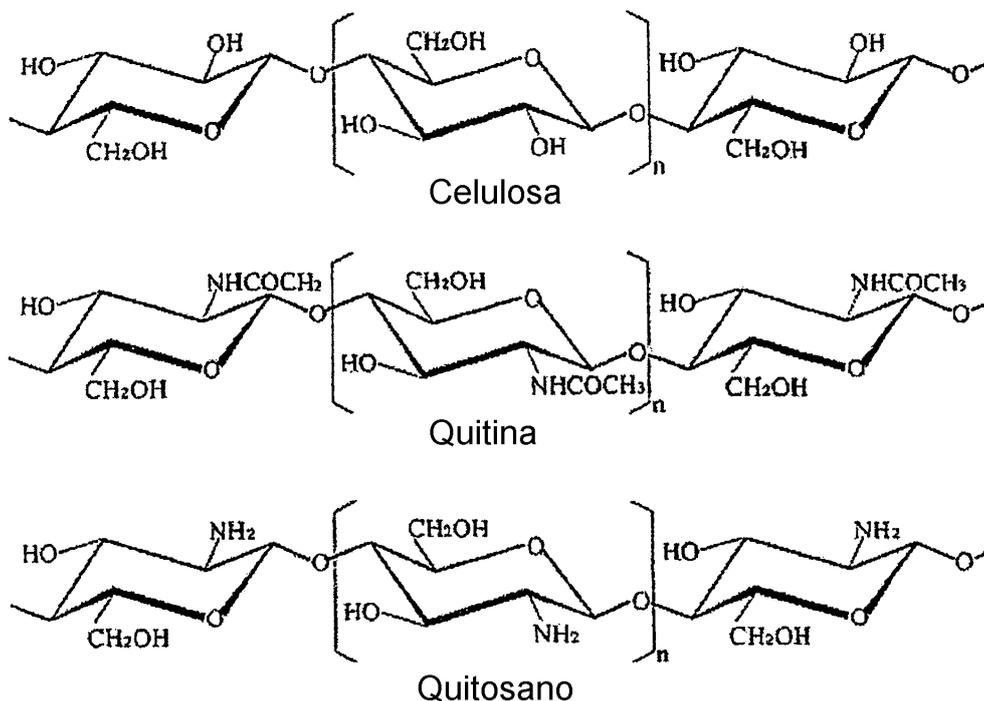
10 El suministro eficaz de agentes hemostáticos a heridas es particularmente deseable en el tratamiento de lesiones caracterizadas por una sangría arterial o venosa, así como en procedimientos quirúrgicos en que el control de la sangría puede llegar a ser problemático, tal como, por ejemplo, en grandes zonas superficiales, una abundante sangría arterial o venosa, heridas supurantes y desgarros/resecciones de órganos. Las composiciones y materiales de realizaciones preferidas pueden poseer diversas ventajas en cuanto al suministro de agentes hemostáticos a heridas, incluyendo, pero sin limitarse a, facilidad de aplicación y separación, posibilidad de bioadsorción, capacidad de suturar, antigenicidad y reactividad tisular.

15 Dependiendo de la naturaleza de la herida y del método de tratamiento empleado, en los dispositivos de realizaciones preferidas se pueden emplear diferentes formas. Por ejemplo, puede ser preferible una forma de borla, muletón o esponja para controlar la sangría activa de una arteria o vena, o para una sangría interna durante procedimientos laparoscópicos. En neurocirugía, donde se encuentran habitualmente heridas cerebrales supurantes, se puede preferir una forma laminar del material hemostático. Asimismo, en cirugía oncológica, especialmente del hígado, se puede preferir emplear una forma laminar o una forma esponjosa del material hemostático, el cual se coloca en o sobre el lecho tumoral para controlar la supuración. En aplicaciones dermatológicas, se puede preferir una forma laminar. Para cerrar punciones en un vaso sanguíneo, se prefiere generalmente una forma de borla. En ciertas aplicaciones se puede preferir una forma de sutura, tal como una microsutura o una macrosutura. A pesar de las diferencias en el suministro y la manipulación características de las diferentes formas, los dispositivos son eficaces para distribuir agentes hemostáticos en una zona afectada e iniciar rápidamente la formación de un tapón hemostático a través de la adhesión de plaquetas, la activación de plaquetas y la coagulación de la sangre.

En realizaciones preferidas, se emplea un agente hemostático que comprende fibras de quitosano. Se puede depositar un agente hemostático auxiliar, tal como microesferas bioabsorbibles y microporosas de polisacárido, sobre las fibras de quitosano. Sin embargo, se puede emplear cualesquier otros agentes hemostáticos auxiliares adecuados.

30 Sustrato hemostático

Como soporte para los agentes hemostáticos de realizaciones preferidas, se puede emplear cualquier sustrato hemostático adecuado. Sin embargo, en una realización particularmente preferida, el sustrato hemostático comprende quitosano. El quitosano se obtiene de la quitina, un biopolímero ampliamente disponible obtenido principalmente de desechos de caparazones de camarones y cangrejos. El quitosano es el principal derivado de la quitina, y es el término colectivo aplicado a quitinas desacetiladas en diversas fases de desacetilación y despolimerización. Las estructuras químicas de la quitina y el quitosano son similares a la de la celulosa. La diferencia es que, en lugar del grupo hidroxilo que está enlazado en C-2 en cada unidad de D-glucosa de la celulosa, hay un grupo amino acetilado (-NHCOCH₃) en C-2 en cada unidad de D-glucosa de la quitina y un grupo amino en C-2 en cada unidad de D-glucosa del quitosano.



Tanto la quitina como el quitosano son atóxicos, pero el quitosano se utiliza mucho más en aplicaciones médicas y farmacéuticas que la quitina a causa de su buena solubilidad en una disolución de ácido. El quitosano presenta buena biocompatibilidad y es biodegradable por quitosanasa, papaína, celulasa y proteasa ácida. El quitosano presenta efectos antiinflamatorios y analgésicos y promueve la hemostasia y la cicatrización de heridas. El quitosano ha sido también utilizado como agente hemostático en el tratamiento quirúrgico y la protección de heridas. El efecto hemostático del quitosano ha sido descrito en la Patente de EE.UU. nº 4.394.373.

Se puede emplear un solo sustrato hemostático o una combinación de sustratos hemostáticos. Se pueden preferir diferentes formas de sustrato, tales como, por ejemplo, borla, muletón, tela o lámina, esponja, sutura o polvo. En esta memoria descriptiva, el término "muletón" se utiliza como un término amplio de acuerdo con su significado ordinario e incluye cualquier material fibroso tratado para que sea flexible, maleable o similar. Se puede proporcionar un muletón, sin limitación, en forma de tela no tejida en telar o tejida en telar o en forma de borla, bola o lámina. Se ha de entender que el muletón fibroso puede ser tratado o revestido de cualquier manera adecuada para potenciar sus propiedades hidrófilas y/o sus propiedades hemostáticas. El término "borla" también se utiliza como un término amplio de acuerdo con su significado ordinario e incluye cualquier material fibroso dispuesto en una bola o almohadilla blanda. Se puede construir una borla usando un muletón. El término "esponja" también se utiliza como un término amplio de acuerdo con su significado ordinario e incluye un material configurado para absorber fluidos tales como la sangre. Se puede construir una esponja usando, sin limitación, un muletón, una borla, una fibra, una tela o similar, solo o en combinación con otro material. Se puede emplear una mezcla homogénea de diferentes materiales formadores de sustrato, o se pueden preparar sustratos compuestos a partir de dos o más sustratos formados diferentes. Un material compuesto preferido comprende quitosano y colágeno.

Una fuente particularmente preferida de quitina para uso en la preparación de un muletón de quitosano es el caparazón de cangrejo. La quitina preparada a partir de caparazón de cangrejo presenta generalmente un peso molecular que es mucho mayor que el peso molecular de la quitina preparada a partir de caparazón de camarón. La quitina de caparazón de cangrejo también presenta generalmente un mayor grado de desacetilación que la quitina de caparazón de camarón. La quitina de caparazón de cangrejo presenta típicamente un peso molecular medio de aproximadamente 600.000 a 1,3 millones de dáltones. El grado de desacetilación es generalmente superior a 90%, lo que puede contribuir al mayor peso molecular observado.

El quitosano preferido para uso en la preparación de fibra de quitosano tiene un peso molecular superior a 800, 850, 900, 950, 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 ó 1500 kDa o más; más preferiblemente de 800, 825, 850, 875, 900, 925, 950, 975, 1000, 1025, 1050 ó 1075 kDa a aproximadamente 1500 kDa; y muy preferiblemente de aproximadamente 1100, 1125, 1150, 1175, 1200, 1225, 1250 ó 1275 kDa a aproximadamente 1300, 1325, 1350, 1375, 1400, 1425, 1450 ó 1475 kDa. El quitosano tiene preferiblemente un grado de acetilación de aproximadamente 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 ó 99% o más, más preferiblemente de aproximadamente 90,0, 90,5, 91,0, 91,5 o 92,0 % a aproximadamente 92,5, 93,0, 93,5, 94,0, 94,5 ó 95,0%.

Aunque se prefiere generalmente el quitosano para uso como sustrato, también se pueden emplear otros sustratos

adecuados. Estos sustratos son preferiblemente materiales hidrófilos bioabsorbibles que se pueden fabricar en una forma deseada (fibra, esponja, matriz, polvo, lámina, sutura y/o borla).

Otros sustratos adecuados incluyen un copolímero absorbible sintético de glicolida y lactida. Este copolímero es comercializado bajo el nombre comercial VICRYL™ (un Polyglactin 910 fabricado por Ethicon, una división de Johnson & Johnson en Somerset, New Jersey, EE.UU.). Se absorbe a través de degradación enzimática por hidrólisis.

La esponja de gelatina es una esponja hemostática absorbible utilizada en procedimientos quirúrgicos con sangría venosa y supurante. La esponja se adhiere al sitio de la sangría y absorbe aproximadamente cuarenta y cinco veces su propio peso. Debido a la porosidad uniforme de la esponja de gelatina, las plaquetas sanguíneas son atrapadas dentro de sus poros, activando una cascada de coagulación. El fibrinógeno soluble se transforma en una red de fibrina insoluble, la cual detiene la sangría. Cuando se implanta en el tejido, la esponja de gelatina es absorbida en un periodo de tres a cinco semanas.

El poli(ácido glicólico) es un polímero absorbible sintético también adecuado para uso como sustrato. El poli(ácido glicólico) es absorbido en un período de pocos meses después de la implantación a causa de su mayor susceptibilidad hidrolítica.

La polilactida se prepara a partir del diéster cíclico del ácido láctico (lactida) mediante polimerización por apertura de anillo. El ácido láctico existe como dos isómeros ópticos o enantiómeros. El enantiómero L se encuentra en la naturaleza, y de la preparación sintética del ácido láctico resulta una mezcla racémica D,L. Las fibras hiladas a partir del polímero derivado del enantiómero L tienen una elevada cristalinidad cuando se estiran, mientras que las fibras derivadas de la mezcla racémica son amorfas. La poli-L-lactida cristalina es generalmente más resistente a la degradación hidrolítica que la forma DL amorfa pero se puede aumentar la degradación por plastificación con citrato de trietilo; sin embargo, el producto resultante es menos cristalino y más flexible. El tiempo requerido para que la poli-L-lactida sea absorbida por el organismo es relativamente largo en comparación con el de otros materiales bioabsorbibles. Se pueden preparar polímeros de poli-L-lactida de alto peso molecular y se pueden obtener fibras con elevada resistencia a la tracción.

Los polímeros de poli(lactida-co-glicolida) son también sustratos adecuados. Estos copolímeros son amorfos cuando la glicolida está en la composición en un intervalo de 25 a 70 por ciento en moles. La poliglicolida pura tiene una cristalinidad de aproximadamente 50%, mientras que la poli-L-lactida pura tiene una cristalinidad de aproximadamente 37%.

Se puede fabricar polidioxanona en fibras para formar un sustrato adecuado. La policaprolactona, sintetizada a partir de ϵ -caprolactona, es un polímero semicristalino que se absorbe muy lentamente *in vivo*. Los copolímeros de ϵ -caprolactona y L-lactida son elastómeros cuando se preparan a partir de ϵ -caprolactona al 25% y L-lactida al 75%, y rígidos cuando se preparan a partir de ϵ -caprolactona al 10% y L-lactida al 90%. El poli- β -hidroxibutirato es un polímero biodegradable que se encuentra en la naturaleza, que puede ser fácilmente sintetizado *in vitro* y que es procesable en estado fundido. Los copolímeros de hidroxibutirato e hidroxivalerato presentan una degradación más rápida que la que se puede alcanzar con poli- β -hidroxibutirato puro.

Los poliésteres absorbibles sintéticos que contienen enlaces de éster glicolato son sustratos adecuados. También se pueden emplear copolímeros similares preparados usando dioxanona en lugar de glicolida, al igual que poli(aminoácidos).

El catgut, el catgut siliconado y el catgut crómico pueden ser adecuados para uso como sustratos en ciertas realizaciones. Sin embargo, se prefieren generalmente los materiales sintéticos a los materiales naturales a causa de su rendimiento generalmente previsible y sus reacciones inflamatorias reducidas.

Agente hemostático

En ciertas realizaciones, puede ser deseable añadir un agente hemostático auxiliar a los agentes hemostáticos de fibra de quitosano de realizaciones preferidas. Sobre los sustratos de realizaciones preferidas se puede depositar cualquier agente hemostático adecuado. Sin embargo, en una realización particularmente preferida, el agente hemostático comprende microesferas microporosas bioabsorbibles de polisacárido (por ejemplo, TRAUMADDEX™, comercializado por Emergency Medical Products, Inc. de Waukesha, Wisconsin, EE.UU.). Las microesferas tienen canales porosos microduplicados. El tamaño de poro de las esferas permite la absorción de agua y la hiperconcentración de albúmina, factores de coagulación y otros componentes proteicos y celulares de la sangre. Las microesferas también influyen en la función plaquetaria y potencian la formulación de fibrina. Además, parece que las microesferas aceleran la velocidad de la reacción enzimática de coagulación. Cuando se aplican directamente, con presión, a una herida activamente sangrante, las partículas actúan como tamices moleculares para extraer fluidos de la sangre. La porosidad controlada de las partículas excluye las plaquetas, los glóbulos rojos, y proteínas séricas de tamaño superior a 25,000 dáltones, que luego se concentran en la superficie de las partículas. Esta propiedad de exclusión molecular crea una elevada concentración de plaquetas, trombina, fibrinógeno y otras proteínas en la superficie de las partículas, produciéndose una acción de gelificación. Los componentes y células compactados y gelificados aceleran la cascada normal de coagulación. La red de fibrina formada dentro de esta densa matriz de proteínas-

células se adhiere fuertemente al tejido circundante. El proceso de gelificación se inicia en segundos y el coágulo resultante, aunque excepcionalmente tenaz, se descompone normalmente junto con las micropartículas.

Otros agentes hemostáticos adecuados que se pueden emplear en realizaciones preferidas incluyen, pero no se limitan a, concentrados de factores de coagulación, factor VIIa recombinante (NOVOSEVEN[®]), concentrado de FVIII Alphanate, concentrado de FVIII Bioclote; concentrado de FVIII Monoclote-P, FVIII Haemate P, concentrado de factor de von Willebrand, concentrado de FVIII Helixate, concentrado de FVIII Hemophil-M, concentrado de FVIII Humate-P, concentrado de FVIII porcino Hyate-C[®], concentrado de FVIII Koate HP, concentrado de FVIII Kogenate, concentrado de FVIII recombinante, concentrado de FIX Mononine, y concentrado de FXIII Fibrogammin P. Dichos agentes hemostáticos pueden ser aplicados al sustrato en cualquier forma adecuada (polvo, líquido, en forma pura, en un excipiente adecuado, sobre un soporte adecuado, o similar).

Se puede emplear un solo agente hemostático o una combinación de agentes hemostáticos. Los niveles de carga preferidos para el agente hemostático sobre el sustrato pueden variar dependiendo de la naturaleza del sustrato y del agente hemostático, la forma del sustrato, y la naturaleza de la herida que se va a tratar. Sin embargo, en general, es deseable maximizar la cantidad de agente hemostático auxiliar en relación con el sustrato. Por ejemplo, en el caso de una borla hemostática, se prefieren generalmente una relación ponderal de agente hemostático a sustrato de aproximadamente 0,001:1 o menor, 0,01:1, 0,05:1, 0,1:1, 0,2:1, 0,3:1, 0,4:1, 0,5:1, 0,6:1, 0,7:1, 0,8:1 ó 0,9:1 a aproximadamente 1:1, 1,1:1, 1,2:1, 1,3:1, 1,4:1, 1,5:1, 1,6:1, 1,7:1, 1,8:1, 1,9:1, 2:1 o mayor, aunque para ciertas realizaciones se pueden preferir relaciones mayores o menores.

Materiales hemostáticos que comprenden un soporte de quitosano

En general, se prefiere depositar un agente hemostático auxiliar (por ejemplo, microesferas microporosas de polisacárido) sobre un soporte hemostático (por ejemplo, fibras de quitosano) para producir un material hemostático que se va a aplicar a una herida sangrante o supurante. Sin embargo, en ciertas realizaciones, se puede emplear fibra de quitosano como material hemostático eficaz sin la adición de otro agente hemostático. Por ejemplo, una borla de quitosano, como la descrita más adelante pero sin microesferas microporosas de polisacárido añadidas, es un material hemostático particularmente eficaz cuando se aplica a heridas sangrantes o supurantes. Las diversas formas de quitosano (tela, esponja, sutura, fibra y similares) que aquí se describen son también materiales hemostáticos eficaces en ciertas realizaciones cuando se emplean sin agentes auxiliares. La forma preferida del soporte hemostático puede depender de la aplicación para la cual se va a emplear.

Borla hemostática

Las borlas o muletones hemostáticos son una forma particularmente preferida en que el sustrato comprende una borla –un material fibroso de tipo algodón que puede ser manipulado en una forma o tamaño adecuado con objeto de que se acomode a una configuración de herida particular. La Figura 1 proporciona una imagen de un muletón de quitosano por microscopía electrónica de barrido. En una realización preferida, se prepara una borla a partir de fibras de quitosano del modo siguiente. Fibras de quitosano preparadas de acuerdo con métodos convencionales fueron desgarradas o cortadas (manualmente o mediante un aparato mecánico) en fragmentos, y los fragmentos fueron aplastados y estratificados. Se pulveriza una disolución de ácido acético, ácido acético glacial u otra disolución ácida (preferiblemente, una disolución con un pH de 3,0-4,5) sobre una primera capa para fijar las fibras de quitosano entre sí, formándose de este modo una estructura reticular. El cubrimiento del muletón o las fibras de quitosano con ácido acético glacial nebulizado da lugar a la formación de la sal amónica de quitosano, soluble en agua. El quitosano en forma de sal amónica presenta una bioadhesión potenciada a tejidos mojados y un efecto hemostático aumentado en comparación con el muletón o las fibras de quitosano no tratadas. El ácido acético de una concentración deseada nebulizado sobre el muletón o la fibra de quitosano puede actuar como un "pegamento" para adherir las fibras entre sí, para adherir las microesferas microporosas de polisacárido a las fibras, o para que el muletón de quitosano se adhiera mejor a tejidos mojados tales como la sangre o un fluido corporal.

Opcionalmente, se pueden pulverizar agentes auxiliares en forma pulverulenta, por ejemplo, microesferas microporosas de polisacárido, sobre la primera capa de fibra de quitosano y luego se pone encima otra capa de fibra de quitosano. Luego se repite el proceso de depósito (disolución ácida seguida del depósito de otra capa de fibra de quitosano) y se apilan las capas hasta un nivel deseado. Se puede añadir el agente en forma pulverulenta a las capas de fibra en una cantidad suficiente para producir una borla que comprenda hasta aproximadamente 50, 60, 70, 80 ó 90% en peso o más del agente auxiliar. Si se añade un agente auxiliar en forma pulverulenta, el nivel de carga óptimo puede depender de la aplicación y del tipo de agente auxiliar empleado. En general, se prefiere no añadir agente auxiliar ni otras sustancias pulverulentas a la capa superior, pero en ciertas realizaciones puede ser deseable hacerlo. Se puede obtener un espesor preferido para la tela seleccionando el número total de capas.

El material hemostático resultante es secado en una estufa bajo vacío para obtener una borla hemostática. Aunque generalmente se prefiere emplear ácido acético glacial o una disolución acuosa de ácido acético, también se pueden emplear otras disoluciones ácidas de pH similar o características similares. Por ejemplo, se pueden emplear adecuadamente ácido láctico, ácido cítrico, ácido glicólico y mezclas de ácidos débiles. Asimismo, también se puede emplear cualquier líquido biológicamente compatible que sea un disolvente para el quitosano, tal como, por ejemplo,

agua pura, disolución etanólica y similares. Dichas disoluciones pueden ser ácidas, básicas o neutras. En ciertas realizaciones, se puede preferir emplear una disolución que no sea ácida. En dichas realizaciones, también se puede emplear otro material en forma adecuada que proporcione adhesión entre las fibras de quitosano, tal como, por ejemplo, gelatina, almidón, carragenano, goma guar, colágeno, pectina o similar. Aunque el quitosano es un sustrato preferido para preparar una borla hemostática, también son adecuados para uso otros sustratos fibrosos, particularmente sustratos fibrosos de polisacárido.

Ajustando el nivel de humedad en las fibras de quitosano, se pueden optimizar la adhesión entre las fibras y la capacidad de carga de cualquier agente auxiliar opcional. El líquido de las fibras ayuda a que las fibras se adhieran entre sí y a agentes auxiliares compatibles. También puede ser posible aumentar la capacidad de carga empleando fibras más finas. Las fibras pueden tener un espesor uniforme o comprender una mezcla de espesores. Las fibras más finas también se pueden adherir más firmemente a una arteria, una vena u otra herida.

En la preparación de una borla hemostática que comprende fibras de quitosano cargadas con microesferas microporosas de polisacárido, se prefiere generalmente que la borla resultante contenga de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 95% en peso de microesferas microporosas de polisacárido, más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90 ó 95% en peso de microesferas microporosas de polisacárido, y muy preferiblemente de aproximadamente 5, 10, 15, 20 ó 25% en peso a aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50 ó 55% en peso de microesferas microporosas de polisacárido. Sin embargo, en ciertas realizaciones, se pueden preferir niveles mayores o menores de microesferas microporosas de polisacárido. Si se emplea un agente hemostático diferente o se van a añadir otros componentes a las fibras de quitosano u otro sustrato, se pueden preferir diferentes niveles de carga.

Para preparar una borla hemostática de quitosano que presente una expansibilidad mejorada, se puede añadir poli(alcohol vinílico) (PVA; del inglés, polyvinylalcohol) a la disolución ácida. Una disolución de ácido acético que contiene PVA al 2% en peso proporciona una borla hemostática con elasticidad potenciada, pero también una borla que es menos hidrófila. En general, se prefiere un grado elevado de hidrofilia para asegurar que la borla hemostática se adhiera firmemente a la herida. Sin embargo, en ciertas realizaciones, la reducción de hidrofilia puede ser relativamente pequeña y, por lo tanto, no afecta significativamente a la capacidad de la borla para adherirse a la herida.

Tela hemostática

Se puede preparar tela hemostática a partir de fibras de quitosano de acuerdo con el método anteriormente descrito para la preparación de borlas hemostáticas, con las modificaciones siguientes. Se aplastan una o más capas de fibra de quitosano, opcionalmente cargadas con un agente auxiliar, y se secan bajo vacío. En general, se prefiere utilizar 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 o más capas de fibra de quitosano en la preparación de la tela. En general, se prefiere que una cara de la tela tenga una superficie lisa y la otra cara de la tela tenga una superficie rugosa (por ejemplo, en el caso del quitosano, una superficie de TEFLON™ aplicada a una superficie de las capas de fibra durante el calentamiento proporciona una cara lisa, mientras que un papel protector aplicado a una superficie de las capas de fibra proporciona una superficie rugosa). Sin embargo, en ciertas realizaciones, se puede preferir una tela que tenga dos caras rugosas, tal como, por ejemplo, para uso en relación con una herida irregular o una herida profunda tal como una lesión letal en la ingle. En realizaciones preferidas, se expone la superficie rugosa a la herida con objeto de maximizar el contacto de las fibras de quitosano con la herida, para dar lugar a un efecto hemostático mejorado y una adherencia superior a la herida. En la preparación de una tela hemostática que comprende fibras de quitosano cargadas con microesferas microporosas de polisacárido, se prefiere generalmente que la tela resultante contenga de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 75% en peso de microesferas microporosas de polisacárido, más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 60% en peso de microesferas microporosas de polisacárido, y muy preferiblemente de aproximadamente 5, 10, 15, 20 ó 25% en peso a aproximadamente 30, 35, 40, 45, 50 ó 55% en peso de microesferas microporosas de polisacárido. Sin embargo, en ciertas realizaciones se pueden preferir niveles mayores o menores de microesferas microporosas de polisacárido, o incluso que no haya microesferas en absoluto. Si se emplea un agente hemostático diferente o se van a añadir otros componentes a las fibras de quitosano u otro sustrato, se pueden preferir niveles de carga diferentes.

La tela hemostática se puede proporcionar en forma de una lámina de tamaño preseleccionado. Alternativamente, se puede cortar, recortar o plegar una lámina mayor de tela hemostática para obtener un tamaño y una forma apropiados para la herida. Aunque la tela hemostática es bioabsorbible, en aplicaciones cutáneas o tópicas puede ser retirada de la herida una vez que se ha alcanzado un grado satisfactorio de hemostasia o puede ser dejada en su sitio hasta que cicatrice la herida. La tela hemostática puede ser útil como piel artificial y/o puede proporcionar propiedades antibióticas. Cuando se emplea la tela hemostática en aplicaciones internas, se deja preferiblemente en su sitio para que sea absorbida por el organismo a lo largo del tiempo. Dichas telas hemostáticas son particularmente bien adecuadas para uso en el tratamiento de heridas supurantes, tal como en lechos tumorales o tejido cerebral.

Esponja hemostática

Se puede preparar una esponja hemostática de acuerdo con métodos conocidos en la técnica para preparar una esponja porosa a partir de un material polímero biocompatible o bioabsorbible, tal como, por ejemplo, quitosano.

Dichos métodos implican típicamente la preparación de una disolución del material polímero, agentes entrecruzantes y agentes espumantes. Se puede cargar la esponja con un agente hemostático en cualquier momento o momentos convenientes del proceso, por ejemplo, durante la formación de la esponja o después de la preparación de la esponja.

5 Suturas hemostáticas

Los sustratos hemostáticos de realizaciones preferidas pueden ser fabricados en suturas. En una realización preferida, se fabrican fibras de quitosano en microsuturas. Los procedimientos para la fabricación de suturas incluyen extrusión, hilado en estado fundido, trenzado y muchos otros procedimientos relacionados. La síntesis de materias primas para suturas se lleva a cabo mediante cualquier número de procedimientos conocidos en la industria textil. Los tamaños de las suturas vienen dados por un número que representa el diámetro, que varía en orden descendente de 10 a 1 y luego de 1-0 a 12-0, siendo 10 el más grande y 12-0 el más pequeño. Las suturas pueden comprender monofilamentos o muchos filamentos enrollados entre sí, hilados entre sí o trenzados. Las suturas de realizaciones preferidas presentan unas propiedades satisfactorias, incluyendo relación de esfuerzo-deformación, resistencia a la tracción, índice de retención, flexibilidad, viscosidad intrínseca, humectabilidad, morfología superficial, degradación, propiedades térmicas, ángulo de contacto de los nudos, y elasticidad. Las suturas hemostáticas se pueden emplear en cualquier aplicación adecuada. Sin embargo, generalmente no se prefieren para una anastomosis de vasos ya que sus propiedades hemostáticas pueden dar lugar a una indeseada formación de coágulos dentro del vaso.

Polvos hemostáticos

Los sustratos hemostáticos de realizaciones preferidas pueden ser formados en un polvo y ser directamente aplicados en dicha forma a una herida. Por ejemplo, se pueden emplear partículas de quitosano, opcionalmente combinadas con otros materiales, como un relleno de cavidad después de una extracción dental.

Matrices hemostáticas

Se pueden preparar matrices porosas tridimensionales a partir de partículas de polímero sinterizadas, tales como, por ejemplo, partículas de quitosano, y se pueden introducir medicamentos o agentes terapéuticos en los poros. Alternativamente, para formar una matriz, se pueden sinterizar microcápsulas que comprendan una envoltura de quitosano que encapsule un medicamento o agente terapéutico.

Apósitos

Aunque generalmente se prefiere aplicar directamente el material hemostático (por ejemplo, una tela, esponja, borla o polvo hemostáticos, preparados del modo anteriormente descrito) a la herida y aunque el material hemostático presenta una adhesión satisfactoria a muchos tipos de heridas, en ciertas realizaciones se puede preferir incorporar el material hemostático a un apósito que incluye otros componentes.

Para asegurar que el material hemostático permanece fijado a la herida, se puede emplear un adhesivo adecuado, por ejemplo, a lo largo de los bordes de una cara de la tela, esponja o borla hemostática. Aunque se puede utilizar cualquier adhesivo adecuado para formar un enlace con la piel, generalmente se prefiere utilizar un adhesivo sensible a la presión. Los adhesivos sensibles a la presión se definen, en general, como adhesivos que se adhieren a un sustrato cuando se aplica una ligera presión pero que no dejan residuo alguno cuando se retiran. Los adhesivos sensibles a la presión incluyen, pero no se limitan a, adhesivos con disolvente en disolución, adhesivos en estado fundido caliente, adhesivos en emulsión acuosa, adhesivos calandrables y adhesivos curables por radiación. Se prefieren los adhesivos en disolución para la mayoría de los usos a causa de su sencillez de aplicación y su versatilidad. Los adhesivos en estado fundido caliente se basan típicamente en copolímeros de bloques con pegajosidad mejorada por resinas. Los adhesivos en emulsión acuosa incluyen los preparados usando copolímeros acrílicos, copolímeros de butadieno y estireno, y látex de caucho natural. Los adhesivos curables por radiación consisten típicamente en oligómeros y monómeros acrílicos, que resultan curados para formar un adhesivo sensible a la presión tras su exposición a luces ultravioletas.

Los elastómeros más comúnmente utilizados en adhesivos sensibles a la presión incluyen cauchos naturales, látices de estireno-butadieno, poliisobutileno, cauchos butílicos, productos acrílicos y siliconas. En realizaciones preferidas, se usan adhesivos sensibles a la presión basados en polímeros acrílicos o en siliconas. Los polímeros acrílicos tienen generalmente un bajo nivel de alergenicidad, son limpiamente retirables de la piel, poseen poco olor y presentan bajos índices de irritaciones mecánica y química. Se prefieren los adhesivos sensibles a la presión de silicona de calidad médica por su biocompatibilidad.

Entre los factores que influyen en la idoneidad de un adhesivo sensible a la presión para uso en apósitos de realizaciones preferidas están la ausencia de componentes irritantes de la piel, suficiente fuerza cohesiva para que el adhesivo pueda ser limpiamente retirado de la piel, capacidad para acomodarse a los movimientos de la piel sin una excesiva irritación mecánica de la piel, y buena resistencia a fluidos corporales.

En realizaciones preferidas, el adhesivo sensible a la presión comprende un acrilato de butilo. Aunque, en general,

se prefieren los adhesivos de acrilato de butilo sensibles a la presión para muchas aplicaciones, se puede utilizar cualquier adhesivo sensible a la presión adecuado para fijarse a la piel. Dichos adhesivos sensibles a la presión son bien conocidos en la técnica.

5 Como se discutió anteriormente, los materiales hemostáticos de realizaciones preferidas presentan generalmente una buena adherencia a heridas, por lo que no es necesario un adhesivo, tal como, por ejemplo, un adhesivo sensible a la presión. Sin embargo, por facilidad de uso y para asegurar que el material hemostático permanece en una posición fija después de su aplicación a la herida, puede ser preferible emplear un adhesivo sensible a la presión.

10 Aunque las telas hemostáticas y otros materiales hemostáticos de realizaciones preferidas presentan generalmente buena resistencia mecánica y buena protección de heridas, en ciertas realizaciones se puede preferir emplear un refuerzo u otro material en una cara del material hemostático. Por ejemplo, se puede preparar un material compuesto que incluya dos o más capas, en que una de las capas sea el material hemostático y la otra capa sea, por ejemplo, una capa elastómera, una gasa, una película permeable al vapor, una película impermeable al agua, una tela tejida en telar o no tejida en telar, una malla, o similar. Las capas pueden ser luego unidas usando cualquier método adecuado, por ejemplo, adhesivos tales como adhesivos sensibles a la presión, adhesivos en estado fundido caliente, adhesivos curables, aplicación de calor o presión tal como en una laminación, fijación física mediante el uso de puntadas, corchetes, otros cierres, o similares.

Interacción entre fibras de quitosano y heridas

20 Las fibras de quitosano de realizaciones preferidas presentan un efecto hemostático cuando se colocan en una herida sangrante o supurante. Se examinaron las características físicas y químicas de la fibra de quitosano para determinar el mecanismo de su acción hemostática y maximizar su efecto hemostático. Aunque sin pretender la vinculación a ninguna teoría concreta, y aunque el mecanismo de la función hemostática del quitosano no ha sido aún definitivamente elucidado, se cree que su contenido de calcio desempeña un papel significativo en la hemostasia. El calcio puede estimular a las plaquetas para que liberen β -TG, factores PF-4 u otras sustancias implicadas en el proceso de la hemostasia.

25 Se midió el contenido de calcio en una muestra de 0,2 g de quitosano (preparado por desacetilación; pureza de 91,8% en peso; peso molecular de 1000 kDa): 0,238% en peso. El contenido de calcio fue obtenido mediante mediciones con un cuantómetro por plasma de acoplamiento inductivo (ICP; del inglés, inductively coupled plasma) realizadas con un instrumento para espectroscopía de electrones Auger (AES; del inglés, Auger electron spectroscopy)-ICP Jarrell-Ash-1100 a una presión de 1,6-105 Pa bajo una atmósfera de argón. La preparación de la muestra implicó, como primera operación, disolver la fibra de quitosano en ácido nítrico concentrado. Se dejó que la disolución reposara durante dos horas, después de lo cual fue sometida a ebullición hasta que se evaporó toda el agua de la disolución. Se disolvió el residuo restante en un volumen de 100 ml de ácido nítrico 1 M y luego se determinó el contenido de calcio.

35 En la bibliografía se sugiere que puede que el efecto hemostático del quitosano no siga las vías de la cascada de coagulación que se describieron anteriormente porque el quitosano aún puede causar la coagulación de una sangre de la que se han separado todas las plaquetas, los glóbulos blancos y el plasma. Más probablemente, el efecto hemostático del quitosano se debe a su capacidad para causar la coalescencia de los eritrocitos entre sí, para formar por ello un coágulo sanguíneo. Cuando las fibras de quitosano entran en contacto con sangre, la sangre penetra en la red formada por las fibras de quitosano. El quitosano es hidrófilo y se puede mojar hasta formar un hidrogel. El hidrogel poroso puede absorber células sanguíneas o proporcionar el suficiente espacio para que las células sanguíneas se difundan en él. Estos factores pueden provocar la hemostasia al causar la coalescencia de los eritrocitos y que estos formen un coágulo sanguíneo. Otra hipótesis es que el quitosano, un polisacárido naturalmente cargado positivamente, puede interactuar con cargas negativas de la superficie de proteínas sanguíneas para causar la coalescencia de los eritrocitos entre sí.

45 El quitosano es hidrófilo y biodegradable y presenta propiedades hemostáticas de biocompatibilidad. Se combina fácil y eficazmente con otros materiales, tales como microesferas microporosas de polisacárido, y presenta una adsorción y una adhesión físicas intensas entre las fibras. El quitosano también se une fuertemente a microesferas microporosas de polisacárido, posiblemente debido a la similitud en las estructuras químicas de sus esqueletos, basándose ambas en unidades de glucosa. El quitosano presenta una intensa afinidad por células, lo que da lugar a un material hemostático eficaz.

Se determinó la eficacia de carga de microesferas microporosas de polisacárido en una borla que comprendía fibras de quitosano. Se pueden alcanzar eficacias de carga de hasta 90% mientras se mantiene la flexibilidad de la borla. Con eficacias de cargas superiores al 90% se puede producir el endurecimiento de la borla, aunque esto puede ser aceptable en ciertas realizaciones.

55 Cuando se cargan o combinan fibras de quitosano con otro material polisacárido, tal como microesferas microporosas de polisacárido, pueden estar implicados diversos mecanismos de adherencia o unión. En un mecanismo, fuerzas electrostáticas mantienen el contacto entre las fibras, entre las microesferas microporosas de polisacárido, o entre las microesferas microporosas de polisacárido y las fibras de quitosano. En otro mecanismo, las partículas son

mantenidas en su lugar por fuerzas físicas, formando la fibra de quitosano un entramado o matriz que soporta las microesferas microporosas de polisacárido. En aún otro mecanismo, una disolución ácida añadida a las fibras de quitosano y las microesferas microporosas de polisacárido causa que los componentes se solubilizan y se unan entre sí.

- 5 Aunque las fibras de quitosano se pueden unir o adherir entre sí (o a microesferas microporosas de polisacárido) mediante cualquiera de los tres métodos anteriormente referidos (fuerzas electrostáticas, físicamente o químicamente), se prefiere generalmente emplear una combinación de dos o más mecanismos diferentes con objeto de producir la carga óptima del mulotón; por ejemplo, estático y físico, estático y químico, físico y químico, o estático y físico y químico.
- 10 Se midió la expansión de las microesferas microporosas de polisacárido y el quitosano después de que entran contacto con agua. Se observó que las microesferas microporosas de polisacárido puras absorben agua y se expanden para generar presión sobre las estructuras circundantes. Sin embargo, tras el contacto con agua, no hubo una expansión clínicamente significativa de las microesferas microporosas de polisacárido depositadas sobre una borla de fibra de quitosano. Las mediciones se llevaron a cabo del modo siguiente: se dispusieron 19 g de microesferas microporosas de polisacárido TRAUMADEx™ en un dispositivo cuyo diámetro era 1,55 cm, para medir la expansión.
- 15 Se añadió agua al TRAUMADEx™, lo que dio lugar a la adsorción de agua. Se añadió peso sobre el dispositivo para evitar que el TRAUMADEx™ se expandiera. El peso añadido corresponde a la presión que produce el TRAUMADEx™ después de que entra en contacto con agua. En el experimento, la diferencia entre el peso aplicado antes del contacto del TRAUMADEx™ con el agua y el peso aplicado después del contacto del TRAUMADEx™ con el agua fue 270 g. En consecuencia, la presión que ejercía el TRAUMADEx™ después de haber entrado en contacto con el agua era 14,265 kPa. Se empleó el mismo método para medir la expansión del TRAUMADEx™ depositado sobre una borla de quitosano, pero el cambio de volumen observado fue demasiado pequeño para ser medido. Se cree que la borla porosa de quitosano proporciona espacio suficiente al TRAUMADEx™ expandido, por lo que no se puede detectar, tras el contacto con agua, un cambio de volumen significativo del TRAUMADEx™ depositado sobre la borla de quitosano.
- 25

Cierre de heridas por punción en la arteria femoral

- Se desarrolló una borla hemostática para uso junto con un dispositivo de cierre para heridas por punción en la arteria femoral, descrito en la Solicitud de Patente de EE.UU. nº 10/463.754, en tramitación conjunta, presentada el 16 de junio de 2003 y titulada "DISPOSITIVO Y MÉTODO PARA EL CIERRE DE HERIDAS VASCULARES". En la Figura 2 se representa el cierre de una punción en la arteria femoral con una borla hemostática. La borla hemostática se puede enrollar alrededor del catéter para indicaciones sanguíneas del dispositivo para cierre de heridas, representado en la Figura 3, con objeto de que sea suministrada eficiente y eficazmente a la parte superior de la herida por punción. El dispositivo 300 para cierre de heridas vasculares representado en la Figura 3 comprende un catéter 310 que tiene un extremo proximal y un extremo distal que definen una luz entre ellos, y puede ser utilizado para poner una borla hemostática 270 encima de una herida por punción. Un elemento 320 de acoplamiento está móvilmente dispuesto en relación con el catéter 310 y está configurado para que se acople mecánicamente al elemento 316 de parada. El dispositivo tiene un asa 340 y un asa 362 y un tubo 350 de suministro. En una realización particularmente preferida, se suministra la borla hemostática, opcionalmente con un adhesivo u otra sustancia que proporcione una adhesión potenciada a la herida, a la herida mediante el dispositivo para cierre de heridas.
- 30
- 35

- 40 En un desgarro venoso, el método convencional para reparar el desgarro implica detener temporalmente la sangría, ocluir la vena, aspirar la sangre y luego suturar o sujetar el desgarro para repararlo. En los métodos convencionales también se puede requerir un parche vascular. Las telas hemostáticas de realizaciones preferidas pueden ser también empleadas para tratar desgarros venosos o arteriales comprimiendo meramente la tela sobre el desgarro y dejándola que quede en su sitio y sea finalmente absorbida por el organismo.

Cierre de heridas usando dispositivos endoscópicos

- El mulotón de quitosano de realizaciones preferidas es particularmente adecuado para uso en relación con dispositivos endoscópicos o lumbinales, especialmente con dispositivos endoscópicos para uso en aplicaciones gastrointestinales, para controlar sangrías. Se puede manipular el mulotón de quitosano hasta una pequeña borla, la cual puede ser insertada a través de la luz del endoscopio para ser dispuesta sobre una herida o para tratar una sangría. Por ejemplo, una borla de mulotón de quitosano de 2 mm de diámetro, o una borla de otro tamaño adecuado en relación al diámetro interno de la luz del dispositivo, puede ser insertada a través del endoscopio y ser utilizada para controlar sangrías gastrointestinales u otras sangrías, por ejemplo, sangrías de úlceras, tumores o lesiones, o sangrías que resulta de procedimientos quirúrgicos tales como una extirpación tumoral.
- 50

Preparación de quitosano

- 55 La quitina está presente en los caparazones de crustáceos como un material compuesto con proteínas y sales de calcio. Se produce quitina al eliminar el carbonato cálcico y la proteína de estos caparazones, y se produce quitosano por desacetilación de la quitina en una disolución de álcali fuerte. En la Patente de EE.UU. nº 3.533.940 se describe un método para la preparación de quitosano.

- Un método preferido para obtener quitosano a partir de caparazones de cangrejo u otro crustáceo es el siguiente. Se elimina el carbonato cálcico sumergiendo el caparazón en ácido clorhídrico diluido a temperatura ambiental durante 24 horas (desmineralización). Luego se extraen las proteínas de los caparazones descalcificados al hervirlos en una disolución acuosa diluida de hidróxido sódico durante seis horas (desproteínización). Las operaciones de desmineralización y desproteínización se repiten preferiblemente al menos dos veces para eliminar sustancialmente todos los materiales inorgánicos y las proteínas de los caparazones de crustáceo. La quitina cruda así obtenida es lavada y luego secada. La quitina es calentada a 140 °C en una disolución de álcali fuerte (50% en peso) durante 3 horas. Luego, lavando intermitentemente el producto intermedio en agua dos o más veces durante el tratamiento con álcali, se obtiene un quitosano muy desacetilado que no presenta degradación significativa alguna de la cadena molecular.
- En la Figura 4 se representa esquemáticamente un procedimiento para obtener quitosano a partir de desechos de camarones.

Preparación de fibra de quitosano

- En una realización preferida, se emplea un método de hilado en estado húmedo para preparar fibra de quitosano. En primer lugar, se disuelve quitosano en un disolvente adecuado para producir una disolución de hilado primaria. Los disolventes preferidos incluyen disoluciones ácidas, tales como, por ejemplo, disoluciones que contienen ácido tricloroacético, ácido acético, ácido láctico y similares; sin embargo, se puede emplear cualquier disolvente adecuado. La disolución de hilado primaria es filtrada y desgasificada, después de lo cual es pulverizada bajo presión en un baño de solidificación a través de los poros de una hilera. Se recuperan fibras de quitosano sólidas del baño de solidificación. Las fibras pueden ser sometidas a otras operaciones de procesamiento, incluyendo, pero sin limitarse a, estirado, lavado, secado, tratamiento posterior, funcionalización y similares. En la Figura 5 se representa esquemáticamente un aparato para preparar fibras de quitosano. El aparato incluye una cuba disolvente 1, un filtro 2, un depósito intermedio 3, un depósito 4 de almacenamiento, una bomba 5 de dosificación, un filtro 6, una hilera 7, un baño 8 de solidificación, un rodillo 9 de recogida, un baño 10 de estirado, un rodillo 11 de estirado, un baño 12 de lavado y un rodillo 13 de devanado.

- Un método preferido para preparar fibra de quitosano adecuada para la fabricación de los materiales hemostáticos de realizaciones preferidas es el siguiente. Se prepara la disolución primaria para hilado de quitosano disolviendo 3 partes de polvo de quitosano en un disolvente mixto, a 5 °C, que contiene 50 partes de ácido tricloroacético (TCA) y 50 partes de dicloruro de metileno. La disolución de hilado primaria resultante es filtrada y es luego desgasificada bajo vacío. Se emplea un primer baño de solidificación que comprende acetona a 14 °C. La abertura de la hilera es 0,08 mm, la cuenta de orificios es cuarenta y ocho y la velocidad de hilado es 10 m/min. La disolución de hilado se mantiene a 20 °C mediante calentamiento con agua caliente reciclada. Las fibras de quitosano del baño de acetona son recuperadas y son transportadas por medio de una cinta transportadora a un segundo baño de solidificación que comprende metanol a 15 °C. Las fibras son mantenidas en el segundo baño de solidificación durante diez minutos. Las fibras son recuperadas y son luego devanadas a una velocidad de 9 m/min. Las fibras devanadas son neutralizadas en una disolución de 0,3 g/l de KOH durante una hora y son luego lavadas con agua desionizada. La fibra de quitosano resultante es luego secada, después de lo cual está lista para la fabricación de los materiales hemostáticos de realizaciones preferidas.

- En una realización particularmente preferida, se emplea ácido acético, glacial o anhidro, como agente para que se adhieran las fibras de quitosano entre sí en realizaciones en que se usan fibras de quitosano, solas o con un medicamento, agente terapéutico u otro agente añadido, para la formación de un agente hemostático. Además de proporcionar una buena adherencia entre las fibras de quitosano, las fibras tratadas con ácido acético glacial también presentan una capacidad excepcional para adherirse a heridas, incluyendo heridas arteriales o femorales.

- Dependiendo de la aplicación, se puede ajustar la concentración de ácido acético en disolución para obtener el grado deseado de adhesión. Por ejemplo, puede ser deseable emplear una concentración reducida de ácido acético si se van a emplear las fibras de quitosano en el tratamiento de una herida supurante u otra herida en que no se desea una fuerte adhesión, o en aplicaciones en que el agente hemostático va a ser retirado de la herida. En dichas realizaciones, se emplea generalmente una concentración de ácido acético de aproximadamente 1% en volumen o menos a aproximadamente 20% en volumen, y más preferiblemente una concentración de aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10% en volumen a aproximadamente 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 ó 19% en volumen. Cuando se desea una fuerte adhesión entre fibras o una fuerte adhesión a la herida, se prefiere una concentración mayor o igual a aproximadamente 20% en volumen, más preferiblemente de aproximadamente 50, 55, 60, 65 ó 70% en volumen a aproximadamente 75, 80, 85, 90, 95 ó 100% en volumen, y muy preferiblemente de aproximadamente 95, 96, 97, 98 ó 99% en volumen a aproximadamente 100% en volumen.

Experimentos

- Preparación de muléton de quitosano

Se puede preparar muléton de quitosano usando un equipo comúnmente empleado en la industria textil para la producción de fibras. En una cadena de montaje típica para producción de muléton de quitosano se puede emplear un dispositivo alimentador, una máquina aflojadora, una máquina cardadora, una cinta transportadora y, finalmente, una

máquina devanadora, como se representa en la Figura 6. En el dispositivo alimentador, se alimenta fibra corta de quitosano a una máquina aflojadora por medio de un dispositivo alimentador, máquina aflojadora donde la fibra corta de quitosano es aflojada por varios desfibradores. En la máquina cardadora, las fibras de quitosano son rasgadas y convertidas en muletón de quitosano mediante el hilado a alta velocidad de un cilindro y un eje de rodillo, y luego el muletón es desprendido por un rodillo descargador en forma de capa separada delgada de red. La cinta transportadora hace avanzar una capa delgada de red de muletón de quitosano separada del rodillo descargador. Se pulveriza una disolución acuosa controlada de ácido acético sobre el muletón de quitosano y luego se distribuye homogéneamente una cantidad especificada de microesferas microporosas de polisacárido mientras la cinta transportadora hace avanzar la red de muletón de quitosano. El muletón de quitosano cargado con microesferas microporosas de polisacárido es luego recogido por una bobina y es luego enviado a una estufa de vacío para su secado.

Caracterización de fibra de quitosano

Determinación del contenido de agua

Se pesaron exactamente 1,0 g de borla de tejido de quitosano (W_1) en un vaso de precipitados limpio y seco y luego se dejó el vaso de precipitados en una estufa a 100 °C durante 12 horas. Se pesó de nuevo la muestra de quitosano secada (W_2) y luego se calculó el contenido de agua mediante la fórmula siguiente:

$$\forall = (W_1 - W_2)/W_2$$

Determinación del peso molecular medio

Se pesaron exactamente 0,3 g de quitosano secado y se disolvieron en una disolución de 0,1 moles/l de CH_3COONa - 0,2 moles/l de CH_3COOH . Se prepararon cinco disoluciones de quitosano con diferentes concentraciones. Se midió la viscosidad relativa a $25 \pm 0,5$ °C con un viscosímetro Ubbelohde en un baño de agua a temperatura constante. La viscosidad intrínseca se define como:

$$[\eta] = C(\theta_{red}) \rightarrow 0$$

y se obtiene extrapolando a concentración cero los datos de viscosidad reducida frente a concentración; véase, por ejemplo, T. Qurashi, H. S. Blair y S. J. Allen, *J. Appl. Polym. Sci.* 46: 255 (1992). La intersección con la ordenada es la viscosidad intrínseca. Se calculó el peso molecular medio por viscosidad basándose en la ecuación de Mark-Houwink siguiente:

$$[\eta] = KM^\nu$$

en que $K = 1,81 \times 10^{-3}$ l/g y $\nu = 0,93$.

Determinación del grado de desacetilación

Se realizaron las mediciones mediante el método modificado presentado por Broussignac, *Chem. Ind. Genie. Chim.* 99: 1241 (1969). Se pesó exactamente una cantidad de 0,3 g de quitosano secado y se disolvió en una disolución de 0,1 moles/l de HCl. La disolución fue titulada con una disolución de 0,1 moles/l de NaOH usando verde de bromocresol como indicador. El grado de desacetilación se calculó del modo siguiente:

$$\% \text{ de } \text{NH}_2 = \frac{(C_1V_1 - C_2V_2) \times 0,016}{G(100 - W)} \times 100$$

en que C_1 es la concentración de HCl (moles/l); C_2 es la concentración de NaOH (moles/l); V_1 es el volumen de HCl (ml); V_2 es el volumen de NaOH (ml); G es el peso de la muestra; W es el porcentaje (%) de agua de la muestra; y 0,016 es el peso (g) de NH_2 igual a 1 ml de la disolución de 0,1 moles/l de HCl.

$$\text{Grado de desacetilación (\%)} = \% \text{ de } \text{NH}_2 / 9,94\% \times 100\%$$

en que 9,94% es el porcentaje teórico de NH_2 cuando se desacetila el 100% de los grupos $\text{CH}_3\text{CONH}-$.

Determinación de los contenidos de metales pesados (Cr, Cu, Zn, Pb, Hg)

Se determinaron los contenidos de Cr, Cu, Zn y Pb mediante un método de espectrometría de emisión atómica por plasma de acoplamiento inductivo (ICP-AES; del inglés, *inductively coupled plasma atomic emission spectrometry*). Antes de la medición, se trató la muestra de quitosano del modo siguiente: se pesaron exactamente 0,1 g de muestra de quitosano y luego se empaparon en un crisol que contenía 2 ml de ácido nítrico al 90% y 0,6 ml de HClO_4 al 50%. La muestra de quitosano se disolvió gradualmente en la disolución ácida mixta y experimentó simultáneamente una degradación oxidativa. Después de reaccionar durante 2 horas, la muestra disuelta se calentó lentamente para que se evaporara lentamente todo el líquido y luego se quemó mediante un mechero hasta que se descompusieron y desaparecieron todos los componentes orgánicos. Se diluyó hasta 10 ml el residuo que contenía sales inorgánicas

mediante una disolución de ácido nítrico al 2% y luego se midieron los contenidos de metales pesados por ICP-AES (ICP-AES Jarrel-Ash 1100+2000).

5 El contenido de mercurio del quitosano se determinó por espectrometría de absorción atómica (AAS; del inglés, atomic absorption spectrometry). Se disolvió en 10 ml de ácido nítrico al 2% una muestra de 0,1 g de quitosano exactamente pesada. Luego se midió por AAS el contenido de mercurio de esta muestra.

El análisis de la Muestra 1 de quitosano produjo los resultados siguientes: contenido de agua: 11,75%; peso molecular: 1326 kDa; grado de desacetilación: 91,2 %; contenido de metales ($\mu\text{g/g}$): Al, 59,1; Ba, 2,95; Ca, 187; Cr, 8,86; Cu, 3,76; Fe, 34,9; Mg, 59,1; Na, 169; Si, 185; Pb, 16,3; Zn, 25,5; Hg, 0,16.

10 El análisis de la Muestra 2 de quitosano produjo los resultados siguientes: contenido de agua: 12,38%; peso molecular: 1407 kDa; grado de desacetilación: 93,6 %; contenido de metales ($\mu\text{g/g}$): Al, 106; Ba, 4,36; Ca, 751; Cr, 12,6; Cu, 40,7; Fe, 116; Mg, 319; Na, 193; Si, 973; Pb, 8,76; Zn, $8,47 \times 10^3$; Hg, 0,16.

15 La calidad de la fibra de quitosano analizada resultó aceptable basándose en los resultados del análisis de las Muestras 1 y 2 de quitosano, cada una de las cuales tenía un peso molecular medio > 1000 kDa (1 millón), un grado de desacetilación > 90%, y un contenido de metales pesados dañinos (Cr, Cu, Pb, Hg) que era muy pequeño (excepto el contenido de Zn en la Muestra 2 de quitosano).

Porcentaje de carga de microesferas microporosas de polisacárido y calidad del muletón de quitosano

20 Se puede alcanzar un porcentaje aumentado de carga de microesferas microporosas de polisacárido utilizando procedimientos de fabricación de dos operaciones. La primera operación es aflojar las fibras de quitosano, y la segunda operación es cardar las fibras de quitosano aflojadas hasta una capa delgada de muletón de quitosano. La calidad del muletón de quitosano puede afectar directamente al porcentaje de carga de un agente hemostático, tal como microesferas microporosas de polisacárido, lo que, a su vez, pueden afectar a la función hemostática del muletón. El porcentaje de carga de microesferas microporosas de polisacárido de las muestras puede ser aumentado de menos de, o igual a, 25% en peso hasta 30-40% cuando se emplea el procedimiento de dos operaciones anteriormente descrito.

25 Preparación de una borla de quitosano

30 Se puede preparar una borla hemostática a partir de fibras de quitosano apilando capas de fibra de quitosano y microesferas microporosas de polisacárido "pegadas" entre sí usando una disolución de ácido acético, las cuales son luego secadas bajo vacío. Se preparó una disolución de "pegamento" que comprendía una disolución de ácido acético con un valor de pH de 3,0 a 4,5. Las fibras de quitosano fueron rasgadas en fragmentos. Después de disponer una primera capa de fragmentos de quitosano, se pulverizó la disolución de ácido acético sobre los fragmentos de quitosano y luego se añadieron las microesferas microporosas de polisacárido. Se formó una segunda capa sobre la primera capa mediante el mismo procedimiento. Se apilaron capas de este modo hasta que se obtuvieron siete capas, salvo que no se añadieron microesferas microporosas de polisacárido a la capa superior. La disolución de ácido acético no sólo actuaba como un pegamento entre las capas de quitosano sino también aumentaba la capacidad del polvo hemostático para adherirse a las fibras de quitosano. Alternativamente, de acuerdo con el método anteriormente descrito pero omitiendo las operaciones de añadir microesferas microporosas de polisacárido a las capas de quitosano, se puede preparar una borla hemostática que sólo comprenda fibras de quitosano. En la Tabla 1 se proporciona la eficacia de carga para microesferas microporosas de polisacárido en borlas hemostáticas preparadas del modo anteriormente descrito.

40 Tabla 1

Eficacia de carga de fármaco de una borla de quitosano (QS)

Peso de QS (g) después del secado/antes del secado	Fármaco (g)	QS + fármaco (después del secado) (g)	Eficacia de carga	Estado de la fibra
1,96/(2,19)	0	1,96	---	suelto/flexible
1,92/(2,15)	0,25	2,15	92,0%	suelto/flexible
1,82/(2,03)	0,51	2,28	90,1%	suelto/flexible
1,98/(2,21)*	1,01	2,96	97,0%	duro

* Se pulverizó sobre las fibras el doble de agua en comparación con el agua usada en los otros ejemplos.

Estas borlas de quitosano hemostáticas así preparadas presentaban una buena función hemostática y una buena capacidad de hinchamiento. Cuando se ponían en o sobre una herida, las borlas absorbían inmediatamente la sangre. La sangre atravesaría las primeras pocas capas de quitosano y luego inmediatamente solidificaría para evitar más sangría. Dichas borlas de quitosano hemostáticas se biodegradan en el organismo hasta materiales atóxicos después de un periodo de tiempo, por lo que no se necesita cirugía para eliminar la borla si ésta se coloca internamente.

Para mejorar la elasticidad de la borla hemostática, se modificaron las fibras de quitosano con PVA CELVOL™ 205 (fabricado por Celanese Ltd. de Dallas, Texas, EE.UU.; polímero parcialmente hidrolizado de éster etenílico de ácido acético con etenol) para disminuir su hidrofiliía. El procedimiento para preparar una borla hemostática modificada con PVA es similar al procedimiento para preparar una borla no modificada, siendo la diferencia primaria que se añade PVA a la disolución de ácido acético aplicada a las capas de quitosano. La concentración de PVA en la disolución acética fue 2% en peso. La borla modificada con PVA presentaba una elasticidad ligeramente mejorada en comparación con la borla no modificada.

Preparación de una esponja de quitosano

Se prepara una esponja hemostática de acuerdo con el procedimiento siguiente. Se disuelven quitosano y PVA en una disolución diluida de ácido acético. Se añade cloruro de paladio como catalizador y se añade toluenodisocianato como agente espumante y agente entrecruzante. El producto crudo es lavado con una disolución de amoníaco y es secado en una estufa. Se carga opcionalmente la esponja con un medicamento o un agente terapéutico al añadir el agente hemostático a la disolución de ácido acético antes de la preparación de la esponja o al cargarlo en la esponja una vez que se ha preparado ésta.

Preparación de una tela de quitosano

Se preparó una tela hemostática de acuerdo con el procedimiento siguiente. En primer lugar, se preparó una disolución acuosa de ácido acético al 1% en peso con un pH de 3,0. La fibra de quitosano fue separada en fragmentos y fue dispuesta homogéneamente sobre una placa de vidrio cubierta con papel protector para formar una capa delgada. Se pulverizó la disolución acuosa de ácido acético sobre la superficie de la fibra de quitosano y se distribuyó una cantidad especificada de polvo hemostático sobre la fibra de quitosano. Se apilaron capas adicionales mediante el mismo procedimiento. Una vez que se hubo pulverizado una pequeña cantidad de disolución acuosa de ácido acético sobre la capa superior de fibra de quitosano, se colocó una placa plana de politetrafluoroetileno (TEFLON™) sobre la capa superior de fibra de quitosano. De este modo se prepararon muestras que comprendían cinco capas.

El sistema entero fue puesto en una estufa de vacío y fue secado bajo vacío durante tres horas a 50 °C. Se retiraron la placa de TEFLON™ y el papel protector y se recuperó la tela hemostática no tejida en telar. La capa superior que estuvo en contacto con la placa de TEFLON™ estaba cubierta con una membrana delgada de quitosano, y la capa inferior que estuvo en contacto con el papel protector estaba compuesta de quitosano fibroso no tejido en telar que tenía una superficie rugosa.

Microscopía de muletón de quitosano cargado con microesferas microporosas de polisacárido

Utilizando microscopía electrónica de barrido se examinaron muletónes de quitosano cargados con diferentes cantidades de microesferas microporosas de polisacárido. Con una carga del 15%, se observó una distribución irregular de las microesferas microporosas de polisacárido sobre el muletón de quitosano (Figura 7). Con una carga del 60%, se observan menos microesferas microporosas de polisacárido (Figura 8). Se cree que las microesferas microporosas de polisacárido se desalojaron del muletón de quitosano cargado, antes o durante el proceso de obtención de la imagen por SEM. En la muestra cargada al 60%, se observaron microesferas microporosas de polisacárido corpusculares en la superficie del recipiente de la muestra. También es posible que las microesferas microporosas de polisacárido fueran separadas por el vacío utilizado en el proceso de revestimiento por pulverización catódica de la SEM para preparar las muestras. Se cree que, cuando se depositan las microesferas microporosas de polisacárido sueltas en los intersticios del muletón de quitosano, tiene lugar cierta unión electrostática débil de las microesferas microporosas de polisacárido neutras o ligeramente ácidas con el quitosano catiónico. Las Figuras 10A, 10B y 10C proporcionan imágenes por SEM de microesferas microporosas de polisacárido físicamente cargadas sobre muletón de quitosano. Se apretó el muletón cargado sobre una cinta adhesiva de carbono. Como se ve en las imágenes, muchas de las esferas fueron desalojadas durante el proceso de transferencia del muletón cargado a la cinta adhesiva, aunque conservan su morfología de poro.

También se observó la fijación de las microesferas microporosas de polisacárido a las hebras del muletón de quitosano. Durante el proceso de fabricación también puede tener lugar cierto grado de combinación o fusión del quitosano y las microesferas microporosas de polisacárido, lo que da lugar a una unión que puede ser visualizada con el microscopio electrónico de barrido. Se observó que las microesferas microporosas de polisacárido se fijan a las

hebras en haces, fusionándose una o más microesferas con la hebra. Estas esferas fusionadas presentan generalmente una superficie lisa y no tienen la detallada estructura de poro de las esferas de los haces no directamente fijados a la hebra. Las Figuras 9A y 9B proporcionan micrografías electrónicas de barrido de haces de microesferas microporosas de polisacárido fusionados o unidos a fibras de quitosano con pérdida de estructura de poro. Una vez que las microesferas microporosas de polisacárido pierden sus poros, como puede ocurrir durante la fusión o combinación, su eficacia como agente procoagulante resulta significativamente deteriorada.

Al cargar las microesferas sobre el muletón de quitosano mediante métodos de las realizaciones preferidas, las microesferas microporosas de polisacárido se pueden combinar con el muletón de quitosano sin una modificación sustancial de los aspectos morfológicos de los componentes individuales. Se puede alcanzar una distribución más uniforme de las microesferas microporosas de polisacárido sobre el muletón de quitosano aplicando el ácido débil más uniformemente, por ejemplo, aplicando el ácido débil con un tamaño de gota más pequeño, tal como mediante un atomizador o una lanza pulverizadora, a la fibra de quitosano en un tambor giratorio, sobre una cinta transportadora, o similar, opcionalmente con una fuente de vacío aplicada a la fibra de quitosano para introducir las gotitas en la masa de la fibra, y/o un compresor de aire para meter las gotitas a la fuerza en la masa de fibra. Mediante un control más ajustado de los niveles de humedad durante el proceso de revestimiento se puede alcanzar también una mejor distribución de las microesferas, mayores niveles de carga o un impacto reducido sobre la morfología del muletón y las microesferas.

En los procedimientos de las realizaciones particularmente preferidas para la preparación de muletón de quitosano cargado con microesferas microporosas de polisacárido, con objeto de evitar la disolución de las microesferas en la disolución acuosa y la alteración de la estructura de las microesferas, se pulveriza sólo una pequeña cantidad de disolución acuosa ácida o ácido acético glacial sobre la superficie del muletón de quitosano para mantener unos niveles de humedad apropiados. En consecuencia, las microesferas microporosas de polisacárido se "pegan" principalmente al muletón de quitosano.

Aunque sin pretender la vinculación a ninguna teoría concreta, se cree que el muletón de quitosano, opcionalmente cargado con microesferas microporosas de polisacárido, puede tener dos mecanismos de acción primarios cuando se emplea en heridas. Uno es detener muy rápidamente la sangría ya que las microesferas microporosas de polisacárido pueden absorber rápidamente el agua de la sangre. Otro es reparar la herida y cualesquier vasos sanguíneos dañados. La primera acción puede hacer que la herida deje de sangrar instantáneamente, mientras que la segunda función puede proteger la herida y evitar una sangría secundaria de vasos sanguíneos dañados o cortados. Se cree que la formación de un gel acuoso de quitosano sostenido por muletón de quitosano húmedo en la herida puede contribuir a la acción.

Procedimientos de fabricación para cargar muletón de quitosano

Como se discutió anteriormente, el tratamiento del quitosano mediante procedimientos de cardado o similares puede crear una capa de muletón que se puede disponer sobre una cinta transportadora para un ulterior procesamiento. Dicho ulterior procesamiento puede incluir cargar el muletón de quitosano con un polisacárido, tal como microesferas microporosas de polisacárido u otros agentes polisacáridos y/o agentes hemostáticos. En una realización, un método para cargar muletón de quitosano con microesferas microporosas de polisacárido comprende el revestimiento del muletón con un ácido, tal como ácido acético glacial, seguido opcionalmente de un procedimiento para aplicación de un polvo de polisacárido u otro agente auxiliar.

En un procedimiento de revestimiento con ácido, un ácido débil es atomizado y luego aplicado al muletón de quitosano. Esto puede ser llevado a cabo mediante cualquier método adecuado que incluye, por ejemplo, una atomización ultrasónica. El ácido atomizado comprende una bruma o neblina de ácido que es hecha pasar a través del muletón de quitosano que descansa en una cinta transportadora. Preferiblemente, la neblina de ácido atomizado es simultáneamente impulsada sobre el muletón por un ventilador y es aspirada a través del muletón y la cinta transportadora por una bomba extractora. De este modo, se puede controlar ajustadamente el volumen de neblina ácida que atraviesa y reviste el muletón y se puede contener la neblina ácida en la zona de procesamiento para revestimiento con ácido.

Una vez que el muletón ha sido revestido con ácido, puede entrar en una zona de procesamiento para aplicación de polvo, donde, si se desea, se cargan microesferas microporosas de polisacárido pulverulentas u otros agentes pulverulentos sobre el muletón. Preferiblemente, las microesferas microporosas de polisacárido pulverulentas se disponen en un tamiz vibrante y son simultáneamente impulsadas sobre, y aspiradas a través de, el muletón y la cinta transportadora por un ventilador y una bomba extractora. De este modo, se puede controlar ajustadamente el volumen de polvo de polisacárido aplicado al muletón y se puede contener sustancialmente el polvo de polisacárido en la zona de procesamiento para aplicación de polvo.

Preferiblemente, la zona de procesamiento para revestimiento con ácido y la zona de procesamiento para aplicación de polvo están sustancialmente protegidas una de otra. Después de la aplicación del polisacárido, el muletón es preferiblemente conducido a un aparato de secado.

El método que se describió anteriormente proporciona una capa de muletón cargado con microesferas microporosas

de polisacárido. Se ha de entender que se puede emplear un procesamiento ulterior para incorporar dicha capa a una tela no tejida en telar en la que están fijadas entre sí varias capas de muletón cargadas, para crear una tela no tejida en telar de muletón de quitosano cargado con polisacárido.

5 De acuerdo con una realización, en un proceso de fabricación de una tela no tejida en telar se utiliza un tambor alrededor del cual se enrolla un papel de sostén. El papel de sostén está preferiblemente revestido con un ácido, tal como ácido acético glacial o una disolución de ácido débil, para que una capa básica de muletón de quitosano cargado se fije a él. Se pulveriza otro revestimiento de ácido sobre la capa básica de muletón y se coloca otra capa de muletón cargado sobre el muletón revestido con ácido. A causa del revestimiento de ácido sobre la capa básica, las capas de muletón se fusionan entre sí. Este proceso de revestimiento con ácido y enrollamiento de muletón puede
10 continuar para que tantas capas de muletón como sean deseables creen la tela no tejida en telar. Una vez que se ha formado un número adecuado de capas, se retira el muletón del cilindro y se transporta a una prensa que ejerce presión sobre el muletón con objeto de unir y compactar más la tela no tejida en telar. En una realización, el muletón es secado dentro de la prensa.

Quitosano con almidón depositado

15 Aunque sin pretender la vinculación a ninguna teoría concreta, se cree que la eficacia hemostática del quitosano cuando se combina con almidón es mucho mayor que la del quitosano o el almidón solos debido a la formación de un nuevo polímero en que el quitosano está intercalado con el almidón. El quitosano y el almidón tienen estructuras similares y una buena compatibilidad mutua. Se cree que tiene lugar la interpenetración y el enmarañamiento de las cadenas macromoleculares de quitosano y almidón cuando los polímeros se combinan entre sí en un estado de
20 fusión o un estado plastificado en presencia de una disolución acuosa ácida. Sin embargo, la interpenetración y el enmarañamiento de dos cadenas polímeras se atribuyen generalmente a un fenómeno físico que puede alterar ciertas propiedades físicas de los polímeros originales mientras deja inalteradas sus estructuras químicas. En consecuencia, los polímeros interpenetrados y enmarañados son considerados una mezcla polímera o un material polímero compuesto, pero no un nuevo polímero. En el quitosano, hay una gran cantidad de grupos amino (-NH₂) que son capaces de formar enlaces de hidrógeno con átomos de oxígeno de un grupo carbonilo [-C(O)-], éster (-COOR) o éter (-O-). Se cree que existe la formación de enlaces de hidrógeno entre las cadenas polímeras de quitosano y de almidón. Sin embargo, la formación de enlaces de hidrógeno es clasificada en general como una interacción física que no cambia la estructura química. Bajo ciertas condiciones (tales como calentamiento, presencia de un catalizador, y similares), un grupo amino puede reaccionar con grupos aldehído o cetona activos para producir un enlace de Schiff, lo que es considerado como una reacción química. En general, no se observa la creación de un enlace de Schiff en la combinación de quitosano y polisacárido ya que generalmente no hay suficientes grupos aldehído y cetona activos en el polisacárido que faciliten dichos enlaces.

La reología y la topología microscópica de líquidos polímeros enmarañados fue presentada por Everaers et al., *Science*, volumen 303, 6 de febrero de 2004, 823-826. Se halló que las propiedades viscoelásticas de los líquidos polímeros de alto peso molecular vienen dominadas por restricciones topológicas a escala molecular. De un modo similar al de las cuerdas enmarañadas, las cadenas de polímero se pueden deslizar pero no una a través de otra. Los modelos de tubo de la dinámica y la reología de polímeros se basan en la idea de que los enmarañamientos confinan a una cadena a pequeñas fluctuaciones alrededor de un camino primitivo que sigue el contorno de cadena de grano grueso. Un fundamento microscópico para estos modelos fenomenológicos es proporcionado por Everaers et al., que analizan el estado topológico de líquidos polímeros en términos de caminos primitivos, para obtener predicciones cuantitativas y exentas de parámetros para el módulo de meseta que se corresponden con los datos experimentales para todas las clases principales de polímeros sintéticos.

Como es discutido por Viyoch et al., *International Journal of Cosmetic Science*, 25 (3), 113 (2003), se pueden usar quitosano con un peso molecular de 100.000 dáltones y un almidón tal como almidón de maíz, patata o tapioca, en la preparación de un parche cosmético que contiene extracto de fruto de tamarindo. Se investigaron las características fisicoquímicas, es decir, flexibilidad, color, transparencia, integridad, brillo, absorción/adsorción de agua, propiedad de bioadhesión y estabilidad del parche sin contenido de tamarindo. Se llevó a cabo un ensayo de estabilidad manteniendo a 4 °C, a temperatura ambiental o a 45 °C, durante dos semanas, los parches preparados. Los resultados mostraron que las formulaciones compuestas de quitosano:almidón de maíz en relación de 4,5:0,5 (QM_{4,5:0,5}) y quitosano:almidón de tapioca en relaciones de 4,5:0,5 (QT_{4,5:0,5}) y 4,0:1,0 (QT_{4,5:1,0}) proporcionan parches con características físicas favorables, elevada absorción/adsorción de agua, buena capacidad de bioadhesión y buena estabilidad. Una vez que el extracto de tamarindo liofilizado, en una cantidad correspondiente a 5% de ácido tartárico, hubo sido incorporado a las formulaciones de QM_{4,5:0,5}, QT_{4,5:0,5} y QT_{4,5:1,0}, la capacidad de los parches para adherirse a la piel resultó mejorada. Sin embargo, una vez mantenidos los parches de ensayo a temperatura ambiental o a 45 °C durante 6 semanas, sus colores se intensificaron mientras sus flexibilidades y sus propiedades de adhesión a la piel disminuyeron. Se llevó a cabo un ensayo de filtración *in vitro* de 12 horas observando la cantidad acumulada de ácido tartárico que permeaba a través de la membrana Silastic® (Dow-Corning, Midland, Michigan, EE.UU.). El parche de QM_{4,5:0,5} tendía a proporcionar la mayor cantidad de ácido tartárico liberado. El patrón de liberación de todas las matrices polímeras combinadas se mostraba en dos fases bien definidas: la fase rápida, en que el flujo promediaba 3,61 µg min⁻¹ mm⁻², y la fase lenta, en que el flujo promediaba 1,89 µg min⁻¹ mm⁻². Los métodos descritos por Viyoch et al. para preparar combinaciones de quitosano y almidón pueden ser adaptados para la preparación

de agentes hemostáticos o sustratos de quitosano adecuados para uso en la preparación de materiales de realizaciones preferidas.

Quitosano con dextrano depositado

5 Se puede alcanzar un revestimiento superior al proporcionar las fibras de quitosano con un revestimiento de dextrano que tenga una superficie microporosa, en lugar de depositar microesferas microporosas de polisacárido. Dicho revestimiento de dextrano se puede preparar de diversas maneras. Por ejemplo, se puede solubilizar dextrano en agua o en una disolución ácida suave para conferir electronegatividad a las moléculas por oxidación suave, mediante lo cual se crean grupos carboxilo. También se puede hacer reaccionar el dextrano bajo condiciones controladas para enmarañar los polímeros. La mezcla de quitosano y dextrano puede ser liofilizada para crear una superficie que presente microporosidad en las fibras de quitosano. Se puede controlar el grado de revestimiento con dextrano, se puede controlar el espesor del revestimiento y se puede controlar el tamaño del poro mediante las diversas contribuciones de una amilosa o amilopectina de cadena lineal o ramificada. Puede tener lugar un enlace químico por la reacción de un dextrano negativamente cargado y el quitosano catiónico. Todos estos procesos pueden ser verificados por microscopías tanto óptica como electrónica, así como por histoquímica de cortes del material, para determinar si se ha alcanzado un enlace satisfactorio.

Una variación de esta tecnología implica preparar capas alternas de quitosano microporoso revestido con dextrano y quitosano no revestido, para preparar un gradiente de un muletón y una tela no tejidos en telar. Los métodos conocidos en la técnica para aplicar un revestimiento de dextrano a diversos sustratos pueden ser modificados para obtener métodos para aplicar revestimientos de dextrano a fibras de quitosano. Las microesferas microporosas de polisacárido también pueden presentar una adhesión superior a las fibras de quitosano revestidas con dextrano. En consecuencia, en ciertas realizaciones puede ser deseable pretratar las fibras de quitosano con dextrano antes del depósito de las microesferas microporosas de polisacárido.

Procedimiento para la producción de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido

25 El término "quitosano" corresponde a una familia de polímeros que varían en cuanto al grado de N-desacetilación (DA). En general, el DA del quitosano varía de aproximadamente 50 a 70% o más, teniendo el quitosano unas propiedades de viscosidad, solubilidad y hemostasia variables. Puesto que el comportamiento de los polímeros de quitosano, es decir, su reactividad, solubilidad y capacidad para unirse a MPH, depende del DA de la quitina y el quitosano, es deseable un ensayo para determinar el DA. Para los ensayos de quitosano, se vinculan la espectroscopía FTIR y la espectroscopía por NMR de ¹³C. La técnica utilizada para determinar el grado de acetilación de la quitina y el quitosano es preferiblemente la espectroscopía FTIR. La espectroscopía FTIR tiene la ventaja de ser no destructiva, rápida, muy sensible, agradable para el usuario, de bajo precio y aplicable tanto a muestras solubles como insolubles.

35 Antes del ensayo, se eliminan todas las proteínas y endotoxinas de la quitina como se produce para aplicaciones clínicas. Se examinan las fibras de quitosano para determinar su sección transversal, su resistencia a la tracción, su resistencia a la rotura, su resistencia a la carga y su aspecto. Este procedimiento de ingeniería industrial se utiliza en la fabricación de muletón de quitosano y esponja de quitosano, así como en la fabricación de tela de quitosano. Se ensaya la cantidad de saturación de microesferas microporosas de polisacárido en sistemas modelo para determinar las características físicas apropiadas para tres tipos principales de sangría.

Caracterización de la estructura y las propiedades de la fibra de quitosano

40 Se emplean métodos establecidos y conectados para medir la estructura cristalina, el tamaño, el DA de la quitina, el peso molecular medio, el contenido de metales pesados y la toxicidad de la fibra de quitosano. El ensayo de caracterización incluye examinar la resistencia de la fibra, el índice de tracción, el hinchamiento medio de la fibra como una relación entre el diámetro de la fibra después de la absorción y el diámetro antes de la absorción de agua destilada, y el pH. Se comparan quitosanos que tienen un DA de 50 a 80% en peso o más. Los materiales que se ensayan incluyen microesferas microporosas de polisacárido, quitosano de DA variable, y materiales de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido. También se llevan a cabo mediciones de la absorción de agua y sangre, velocidades de liberación de agua y sangre, retención local (usando la fuerza de gelificación) y ensayos de exploración para hemostasia. Puesto que la polimerización (aglutinación) de eritrocitos es considerada un factor importante para la coagulación de la sangre provocada por quitosano, se puede utilizar un sencillo ensayo de hemaglutinación para una rápida exploración del producto.

55 En la técnica se conocen sencillos ensayos de hemaglutinación. Se preparan quitosano, quitosano-microesfera microporosa de polisacárido y composiciones de microesferas microporosas de polisacárido, en disoluciones concentradas que contienen 2000 µg/ml del material. Se utiliza una dilución de 10 órdenes de magnitud para alcanzar una concentración final de 1000, 100, 10 ó 0,1 µg/ml en un volumen de 0,2 ml de NaCl al 0,9% (disolución salina normal). Se enjuagan glóbulos rojos humanos (obtenidos de un banco de sangre) dos veces con disolución de Alsever y dos veces con cloruro sódico al 0,9%. Se utiliza cloruro sódico para evitar la incompatibilidad entre la quitina desacetilada y otros iones. Se suspenden en una disolución salina (NaCl al 0,9%) los glóbulos rojos lavados y se ajusta la transmisión de la suspensión a 70% con un colorímetro (Klett-Summerson, filtro nº 64). Se añade un volumen igual

de suspensión de glóbulos rojos (0,2 ml) a las diferentes diluciones de quitosano-microesfera microporosa de polisacárido, quitosano y composiciones de microesferas microporosas de polisacárido. Antes de la lectura, se incuban los tubos durante 2 horas a temperatura ambiental. La quitina desacetilada (quitosano) en una concentración de 1 µg/ml produce normalmente la hemaglutinación de glóbulos rojos humanos.

5 Se puede determinar la capacidad ligante de proteínas usando sensores biomédicos en que se utiliza la espectroscopía de interferencia por reflexión (RIFS; del inglés, reflectometry interference spectroscopy), que permite determinar la cinética de la absorción de proteínas en la superficie del quitosano, el quitosano-microesfera microporosa de polisacárido y las microesferas microporosas de polisacárido solas. Una vez que se alcanza un óptimo quitosano-microesfera microporosa de polisacárido para hemostasia, se pueden evaluar rápidamente lotes en cuanto a su capacidad ligante de proteínas y se puede relacionar este parámetro con la eficacia hemostática en el modelo en rata anteriormente citado.

15 La optimización de la carga de microesferas microporosas de polisacárido en el quitosano puede ser llevada a cabo usando sistemas distintos del tratamiento con ácido acético para disolución y cargando las microesferas microporosas de polisacárido en el quitosano. El ácido láctico puede reducir más la toxicidad que el ácido acético. La unión de microesferas microporosas de polisacárido (almidón), un polisacárido apolar, al quitosano, un polisacárido fuertemente catiónico, puede ser concebiblemente potenciada mediante oxidaciones selectivas del almidón y la generación de un estado aniónico.

20 Se llevan a cabo estudios sobre la cinética de degradación de fibras de quitosano, muletón de quitosano y tela, con y sin microesferas microporosas de polisacárido. Se llevan a cabo estudios sobre el mecanismo hemostático del muletón y la tela de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido usando formación de imágenes y espectroscopía multifotónicas para evaluar la interacción molecular del quitosano, el quitosano-microesfera microporosa de polisacárido y las microesferas microporosas de polisacárido con sangre completa y plaquetas humanas y porcinas. Estos resultados se comparan con las determinaciones presentadas por aplicación de NAG. Se estudian la formación de coágulos *in vitro*, la agregación de glóbulos rojos y la activación de plaquetas.

25 Se llevan a cabo el diseño y la fabricación de una cadena de producción para la producción, a gran escala, de tela no tejida en telar y muletón de quitosano mezclado con microesferas microporosas de polisacárido. Se desarrollan máquinas para que lleven a cabo las funciones siguientes: aflojar la fibra de quitosano; cardar la fibra aflojada hasta una red delgada de muletón; mojar el muletón de fibra de quitosano mediante una disolución diluida de ácido acético (o ácido láctico); cargar homogéneamente microesferas microporosas de polisacárido sobre la pieza delgada de fibra de quitosano mojada; enrollar en una bobina la pieza delgada de fibra de quitosano cargada con microesferas microporosas de polisacárido; y secar la fibra bajo vacío. Se diseña y monta una cadena de producción totalmente automática o semiautomática para producir una cantidad masiva estandarizada de tela no tejida en telar y muletón de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido. Se llevan a cabo ensayos sobre la densidad de las diversas preparaciones de muletón para optimizar el tamaño de los intersticios y la densidad óptima del muletón para hemostasia. Se llevan a cabo ensayos similares sobre muletón de colágeno.

Optimización de formulaciones de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido para satisfacer las necesidades de la diátesis hemorrágica específica

40 Se optimizan formulaciones usando modelos que los militares han definido para el ensayo y la evaluación comparativa de materiales de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido. Estos modelos incluyen la lesión fatal por punción aórtica y las grandes sangrías capilares venosas y difusas en unos modelos (porcinos) de daño hepático. El modelo para el cierre remoto de lesiones arteriales por cateterización se toma de la bibliografía y se puede adaptar fácilmente para cerrar lesiones con quitosano-microesferas microporosas de polisacárido. El modelo de sangría oral en conejos permite el examen en un sistema orgánico vascular de un animal cuyo estatus de coagulación puede ser fácilmente modificado (plaquetas, heparinización). Este modelo ha sido ensayado con quitosano líquido como agente hemostático.

Ensayo hemostático del muletón y la tela de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido en animales

Se han llevado a cabo ensayos hemostáticos sobre vasos grandes dañados (por ejemplo, arteria femoral canina cateterizada) bajo heparinización, y también en el modelo de corte transversal letal en cerdo (arteria femoral, vena femoral) y el modelo de arterias y venas femorales perforadas en rata.

50 Arteria femoral canina cateterizada

El modelo para el control de una intensa sangría después de punción y cateterización arteriales es la punción de la arteria femoral canina en animales heparinizados. Tres animales tuvieron colocado un catéter 11.5 French durante 4-6 horas en la arteria femoral, fueron luego heparinizados con tiempos de coagulación activados (ACT; del inglés, activated clotting times) 2-3 veces el valor normal y fueron mantenidos en niveles normotensos mediante reposición intravenosa (IV) de fluidos. Se retiró el catéter arterial residente y se aplicó inmediatamente un parche de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido (2 x 2 cm) al vaso sangrante con presión mínima durante 10 minutos. Unas videocintas permitieron documentar estos estudios.

- Se llevaron a cabo ensayos en el Perro Tres, que tenía un peso de 25,7 kg, sexo femenino y un tiempo de coagulación ACT de 277 segundos. El catéter de la arteria femoral del perro era un catéter 11.5 F. Se colocó un muletón de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido, de 1-2 cm³, sobre el orificio de la punción en la arteria femoral inmediatamente después de que se retirara el catéter 11.5 F. Se aplicó presión manual sobre el muletón durante 10 minutos y se detuvo completamente la sangría con hemostasia absoluta. Se aplicó un parche de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido a un orificio de la punción en la vena femoral, se retiró otro catéter 11.5 F y se mantuvo una presión manual durante 7 minutos. Se alcanzó una homeostasia completa. Se aumentó la presión venosa por ligación proximal, y el parche de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido se adhirió sin sangría.
- Se llevaron a cabo ensayos en el Perro Cuatro, que tenía un peso de 25,4 kg, sexo femenino y un tiempo de coagulación ACT de 280 segundos. Se colocó un parche de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido, de 1-2 cm³, sobre el orificio de la punción en la arteria femoral inmediatamente después de que se retirara el catéter 11.5 F, y se aplicó presión manual durante 10 minutos. Se advirtió una hemostasia completa con una adherencia acusada del muletón.
- Se llevaron a cabo ensayos en el Perro Cinco, que tenía un peso de 23,1 kg, sexo masculino y un tiempo de coagulación ACT de 340 segundos. Se aplicó un muletón de quitosano tratado con PVA-microesferas microporosas de polisacárido (1 cm³) al orificio de la punción en la arteria femoral después de que se retirara el catéter 11.5 F, y se aplicó presión manual durante 10 minutos. Se detuvo la sangría pero, 30 segundos más tarde, se advirtió una moderada sangría de la herida por punción. Fracasó un segundo intento utilizando el mismo muletón de quitosano tratado con PVA-MPH (con 10 minutos de compresión manual). Luego se utilizó una tela no tejida en telar de quitosano-MPH sin PVA para reemplazar el muletón de quitosano tratado con PVA-MPH relativamente no adherente. Se alcanzó una hemostasia completa después de 15 minutos de compresión manual. Se observó la herida durante 20 minutos y no se advirtió sangría alguna. La tela de quitosano no tratado con PVA-MPH se adhería fuertemente a la arteria y al tejido circundante. Se extrajo arteria con tela para patología.
- Los experimentos con perros demostraron que el muletón de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido (no tratado con PVA) era acusadamente eficaz como agente hemostático en el modelo de cateterización arterial canina heparinizada. Un catéter de gran calibre (11.5 F) dejado en su sitio durante 4-6 horas da lugar a una recámara vascular significativamente moldeada y, ante un tiempo de coagulación significativamente prolongado, representa un sustancial desafío hemostático. El muletón de quitosano-MPH también se ajusta al contorno arterial, no interfiere en el flujo distal y es acusadamente adherente. El muletón de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido resultó igualmente eficaz para alcanzar la hemostasia en la vena femoral cateterizada y también fue acusadamente adherente sin interferir en el flujo. El muletón de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido (tratado con PVA) consiguió una hemostasia de moderada a mínima en un experimento y fue relativamente no adherente. Se obtuvo una hemostasia completa con un parche de tela de quitosano no tratado con PVA-MPH.
- Arteria y vena femorales de rata perforadas
- Se expusieron bilateralmente arterias y venas femorales de tres ratas (diámetro externo de 1,5 a 2 mm) una vez que se hubo alcanzado una anestesia por barbiturato. Se produjeron heridas por punción en cada arteria con una aguja de calibre 30 y se colocó una compresa (3 mm²) de tela de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido en el sitio de la punción durante 10 segundos y se controló la sangría. No se utilizó material tratado con PVA. El control de la sangría del vaso femoral dañado de rata, de pared delgada, durante 100 minutos es un reto hemostático. Después de la exposición de ambas arterias femorales, se utilizó una aguja de calibre 30 para perforar las arterias con objeto de crear un desgarramiento arterial y una intensa sangría.
- Se llevaron a cabo ensayos sobre la Rata nº 1, un macho que pesaba 520 g. La herida por punción de la arteria femoral derecha fue tratada con una compresa de tela de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido. Se aplicó una suave compresión a la compresa durante 30 segundos y, después de su liberación, hubo una sangría muy ligera bajo la tela. Se aplicó de nuevo una suave presión manual durante 10 segundos y se detuvo completamente la sangría. Después de 20 minutos de observación de hemostasia completa, se ligaron ambos extremos de la arteria femoral, el proximal y el distal, y se llevó a cabo un ensayo de resistencia a la rotura por presión. La herida reparada con tela permaneció intacta bajo 120 mm de Hg.
- Se llevaron a cabo ensayos sobre la Rata nº 2, un macho que pesaba 525 g. La herida por punción de la arteria femoral izquierda fue tratada con una compresa de 3 mm² de tela de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido. Se aplicó una compresión manual a la tela durante 10 segundos. Después de la liberación de la presión manual, hubo una ligera sangría bajo el parche de tela. Se aplicó una presión manual adicional de 2 segundos, pero continuó una sangría mínima a velocidad decreciente. No se aplicó presión adicional y la sangría se detuvo completamente después de 56 segundos. Después de 20 minutos de hemostasia completa, se ligaron ambos extremos de la arteria femoral, el proximal y el distal, y se llevó a cabo el ensayo de resistencia a la rotura por presión. La herida reparada con tela de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido resistió una presión arterial de hasta 300 mm de Hg. La herida por punción de la arteria femoral derecha fue tratada mediante la colocación de una almohadilla de grasa sobre la lesión. Se aplicó una compresión manual sobre el tejido adiposo durante 10 segundos. Des-

pués de la liberación de la presión manual, hubo una profusa sangría bajo el tejido adiposo. No se aplicó presión adicional. La sangría se detuvo después de un minuto y 27 segundos y, 20 minutos más tarde, se ligaron ambos extremos de la arteria femoral, el proximal y el distal, y se llevó a cabo un ensayo de resistencia a la rotura por presión. La herida reparada con tejido adiposo falló bajo aproximadamente 60 mm de Hg.

- 5 Se llevaron a cabo ensayos sobre la Rata nº 3, un macho que pesaba 555 g. Una herida por punción de la arteria femoral derecha fue tratada con una tela de quitosano, no tejida en telar, mezclada con una compresa de 3 mm² de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido, utilizada para cubrir la herida. Se aplicó una compresión manual durante 20 segundos y, después de su liberación, se consiguió una hemostasia completa. Después de 20 minutos de observación, se ligaron ambos extremos de la arteria femoral, el proximal y el distal, y se llevó a cabo un ensayo de resistencia a la rotura por presión. El parche de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido resistió una presión arterial de hasta 200 mm de Hg. La herida por punción de la arteria femoral derecha fue cubierta con tejido adiposo. Se aplicó una compresión manual sobre el tejido adiposo durante 20 segundos y, después de la liberación de la presión manual, hubo una profusa sangría. La sangría se detuvo después de un minuto y 21 segundos con presión manual continua. Después de eso, se ligaron ambos extremos de la arteria femoral, el proximal y el distal, y se llevó a cabo un ensayo de resistencia a la rotura por presión. El parche de tejido adiposo falló bajo menos de 120 mm de Hg (aproximadamente 60).

Los ensayos en ratas demostraron que las compresas de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido eran notablemente eficaces en cuanto a conseguir una hemostasia completa ante una intensa sangría de una herida por punción en un vaso frágil. El tiempo requerido para que la tela de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido detuviera la sangría varió de 20 segundos a 56 segundos. Esto podría ser causado por una distribución irregular de las microesferas microporosas de polisacárido sobre el parche de tela de quitosano no tejida en telar. El parche de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido se adhiere muy fuertemente al vaso y puede resistir elevadas presiones arteriales antes de fallar. El modelo de punción en arteria femoral de rata es un excelente sistema de exploración para estudiar los mecanismos de la hemostasia y la adherencia tisular así como para la exploración de diversas formulaciones de quitosano-microesferas microporosas de polisacárido.

Arteria femoral y vena femoral de cerdo

Se llevaron a cabo ensayos en los que una lesión letal de grandes arterias corta transversalmente la arteria femoral y la vena femoral. La borla de quitosano-MPH proporcionó una notable hemostasia en comparación con otros métodos que se utilizaron.

Modelo de lesión aórtica fatal en el cerdo

Se desarrolló este modelo para el ensayo de agentes hemostáticos llevado a cabo en el U.S. Army Institute of Surgical Research, San Antonio, Texas, EE.UU., con el fin de determinar el apósito hemostático óptimo para una sangría arterial de alta presión. La lesión es un orificio por punción calibrado en la aorta distal de cerdos normotensos. Se evaluaron nueve apósitos hemostáticos diferentes para esta lesión por lo demás 100% fatal. Los únicos animales que vivieron 60 minutos recibieron el Apósito de Fibrina (fibrina y trombina) de la American Red Cross (ARC) o tuvieron reparación de la lesión por sutura. Todos los demás agentes hemostáticos incluyendo la NAG fallaron a la hora de controlar la hemorragia aórtica y ningún animal sobrevivió 60 minutos. No se incluyeron quitosano ni microesferas microporosas de polisacárido en estos experimentos.

Se estudian cinco grupos de cinco cerdos (40 kg, machos inmaduros de cerdo Yorkshire cruzado). Un grupo se trata con el Apósito de Fibrina de la American Red Cross y los otros cuatro grupos con tela de quitosano con o sin microesferas microporosas de polisacárido y muléton de quitosano con o sin microesferas microporosas de polisacárido. Las microesferas microporosas de polisacárido solas no controlan generalmente una intensa sangría arterial y no se incluyen. Experimentos previos demostraron la fatalidad de la lesión no tratada y que los animales pueden ser salvados mediante reparación por sutura. El objetivo de este estudio es comparar el Apósito de la American Red Cross con los apósitos basados en quitosano. Se determinan la supervivencia, la pérdida de sangre y la cantidad de fluido IV resucitable para mantener una normotensión.

Se premedican los animales [4-6 mg de Telazol intramuscular (IM)/kg, 0,01 mg de Robinul IM/kg], se mantiene una anestesia endotraqueal con isoflurano al 1-3% y oxígeno, y se mantiene una temperatura central de entre 37 °C y 39 °C. Se colocan tubos arteriales residentes para determinaciones de la presión sanguínea arterial media (MAP; del inglés, mean arterial pressure) tanto proximal (carótida) como distal (femoral) y se inserta un tubo IV femoral para la administración de fluido resucitador. Se someten los cerdos a esplenectomía, se pesan los bazo y se administra fluido de reemplazo (3 x peso esplénico de disolución de Ringer-lactato tibia) para corregir la pérdida de sangre (bazo).

Se consigue una estabilización hemodinámica después de la esplenectomía en un plazo de 10 minutos y se obtienen muestras de sangre arterial (12 ml) antes de la punción aórtica. Se realiza inmediatamente la lesión aórtica después de la oclusión aórtica y se extrae sangre arterial de 30 y 60 minutos después de la lesión. Se determinan el tiempo de protrombina, el tiempo parcial de tromboplastina activada, la concentración de fibrinógeno, un tromboelastograma, un recuento sanguíneo completo, el lactato y gases en sangre arterial.

Después de la esplenectomía y un periodo de estabilización de 10 minutos, se colocan bilateralmente tubos de drenaje para aspiración continua en las cavidades abdominales laterales. Se determina la velocidad de sangría pesando la sangre perdida a lo largo del tiempo, valor que se expresa como gramos acumulados por 10 segundos. Después de pinzar transversalmente la aorta por encima y debajo del sitio de la lesión (3 cm por encima de la bifurcación de la aorta distal; aortotomía realizada con un sacabocados aórtico de 4,4 mm), se retiran las pinzas transversales. La sangría es inicialmente taponada colocando un dedo sobre el orificio sin compresión del vaso. A tiempo 0, el dedo libera el taponamiento y se permite una intensa sangría arterial durante 6 segundos. Se recoge sangre y se determina la velocidad de pérdida de sangre desviando la sangre a la cavidad peritoneal para drenaje.

Se coloca una lámina elástica de polietileno entre el apósito y la mano enguantada y, después de 6 segundos de intensa sangría, se aplica el apósito hemostático de ensayo durante cuatro minutos. La compresión manual consiste en una oclusión aórtica completa, según se manifiesta por una presión sanguínea femoral no pulsátil (MAP a 15 mm de Hg). Después de cuatro minutos, se libera la compresión manual dejando el apósito y la lámina de plástico sobre el lugar de la lesión. Se observa el lugar de la lesión en cuanto a una sangría durante dos minutos. Un punto final esencial es una ausencia completa de sangría después de 2 minutos de observación. Si persiste la sangría, se administran otros cuatro minutos de compresión. En el caso de una sangría activa o falta de hemostasia, se interrumpe la resucitación y se deja que el animal muera. Con objeto de ensayar la adherencia del apósito de ensayo sin evidencia de sangría, se establece una resucitación con disolución de Ringer-lactato a 37 °C con un caudal IV de 300 ml/min. Se mantiene una MAP de línea de base pre-aortotómica, más o menos 5 mm de Hg, durante 60 minutos adicionales. La muerte (un punto final esencial) es una MAP < 10 mm de Hg y una presión de CO₂ inferior a 15 mm de Hg al final de una exhalación. Al final del periodo experimental (eutanasia en 1 hora para los animales supervivientes), se extirpan, abren y evalúan las aortas. Una vez que se ha observado y fotografiado la lesión, se mide el tamaño del orificio para asegurar la uniformidad del tamaño de la lesión y se fija la muestra para examen histológico con el fin de evaluar el proceso hemostático (fibrina, plaquetas, extensión en la abertura).

Aunque el apósito hemostático de la ARC ha proporcionado supervivencia en este modelo, aún presenta desventajas. El apósito hemostático "ideal", además de los parámetros anteriormente citados, controla la sangría arterial, venosa y de tejido blando de los grandes vasos, se adhiere a la lesión vascular pero no al guante ni la mano, es flexible, duradero, barato y estable en un ambiente extremo, tiene un tiempo de conservación prolongado, no requiere mezclamiento, no presenta riesgo de transmisión de enfermedades, no requiere un nuevo aprendizaje y se fabrica a partir de materiales fácilmente disponibles. Ninguno de los apósitos que han sido ensayados o evaluados en el escenario actual satisface todas estas características. El inconveniente del apósito portátil de la American Red Cross (ARC), de fibrina-trombina, es que es frágil en su forma actual. El apósito portátil es rígido y grueso cuando está seco, y algunos de los materiales liofilizados se exfolian cuando se sujeta el apósito portátil. El apósito de fibrina-trombina se pega a los guantes de látex y a la piel cuando está húmedo. Las características de manipulación del mulotón de quitosano con MPH son superiores a las de estos materiales de la técnica anterior.

Modelo de cateterización en arterias femorales caninas

Existe una amplia bibliografía básica para la evaluación de este nuevo dispositivo para selladura vascular. Se estudian arterias femorales mediante la colocación percutánea de vainas vasculares estándares (7 French) con catéteres insertados mediante la técnica de Seldinger. Se utiliza un total de veinte animales, diez anticoagulados con 150 unidades IV de heparina/kg hasta tiempos de coagulación activados (ACT) 3x el valor normal. Se mide el ACT justo antes de la inserción del dispositivo de selladura. Los animales no heparinizados tienen la arteria femoral contralateral usada como testigo, utilizándose sólo compresión manual para alcanzar la hemostasia. Se dejan las vainas y catéteres arteriales en su sitio durante una hora para simular la duración de una intervención. Se usa el dispositivo para selladura vascular con el quitosano-MPH en una arteria femoral y se usa la compresión manual en la otra arteria femoral. Se libera la presión manual aplicada al sitio de la punción y se inspecciona el sitio de la punción cada cinco minutos en cuanto a los siguientes puntos finales esenciales: sangría externa o formación de hematoma, medición de la circunferencia del muslo, integridad de los pulsos distales en los pies y tiempo de compresión manual requerido para alcanzar la hemostasia. Los animales son observados durante noventa minutos adicionales y son luego sometidos a eutanasia con una sobredosis IV de pentobarbital sódico y disolución saturada de cloruro sódico. Antes de la eutanasia, los animales de cada grupo son sometidos a una angiografía femoral.

Sobrevive un subgrupo de animales, con un examen complementario a las 2 semanas. Éste incluye inspección física del acceso arterial, valoración de los pulsos distales, angiografía femoral, y examen histopatológico del sitio de punción de arteria femoral escindido y del tejido circundante. El análisis estadístico se expresa como desviación estándar media. Se usa la prueba t de Student para datos no pareados para comparar los tiempos medios hasta la hemostasia en los diferentes grupos de tratamiento. Antes de proceder a ensayos clínicos con seres humanos se llevan a cabo estudios preliminares en animales. Tanto el mulotón de quitosano con microesferas microporosas de polisacárido como la tela de quitosano con microesferas microporosas de polisacárido presentan una capacidad superior en cuanto a controlar la pérdida de sangre así como en cuanto a los otros parámetros ensayados.

Modelo para la lesión hepática grave y la hemorragia grave en venas grandes (cerdo)

Este modelo ha sido ampliamente ensayado por el U.S. Army Combat Casualty Care Research Program. Hay una

gran base de datos relativos a los grados de lesión y de respuesta a una diversidad de agentes hemostáticos. Estos datos incluyen documentación sobre el grado de lesión en venas de gran diámetro, capacidad para aplicar apósitos hemostáticos ante una sangría masiva, grado de pérdida de sangre, facilidad de instrumentación, letalidad, y reproducibilidad de la lesión hepática experimental. Tanto el Apósito Hemostático de la American Red Cross (ARC) como la esponja experimental de acetato de quitosano demostraron ser agentes hemostáticos eficaces en este modelo. Los investigadores militares concluyeron que tanto el quitosano como el Apósito de la American Red Cross (ARC) justificaban más estudios y desarrollo. Se ensayó la eficacia hemostática del quitosano (muletón, tela, con o sin microesferas microporosas de polisacárido) y el Apósito de la ARC en el modelo de hemorragia porcina grave en venas grandes. La terapia convencional recomendada para tratar lesiones hepáticas de Grado V (extenso daño parenquimatoso combinado con importantes desgarros vasculares) es taponamiento con esponjas de gasa y nueva operación más adelante. El problema de la biodegradabilidad y la cicatrización de heridas no ha sido nunca resuelto con estos agentes hemostáticos. En consecuencia, se sacrifican los animales supervivientes un mes después de la lesión para examinar la cicatrización de las heridas y la degradación del agente hemostático. Se comprueba el control hemostático durante el periodo de un mes mediante barridos CT hepáticos semanales. La evidencia de nuevas hemorragias requiere una intervención por laparotomía y el sacrificio del animal. Se comprueban el estado posterior a la lesión y el curso de la reparación hemostática de los animales.

Se reparten cerdos comerciales híbridos (machos de 40-45 kg) en seis grupos de cinco animales cada uno. Los grupos de ensayo consisten en paño de gasa, apósito de la ARC, muletón de quitosano con o sin microesferas microporosas de polisacárido, y tela de quitosano con o sin microesferas microporosas de polisacárido. La preparación quirúrgica y la anestesia son como para el modelo de lesión por punción aórtica. Se colocan tubos en la arteria carótida y la vena yugular y se completan una esplenectomía y la colocación de un catéter en la vejiga urinaria. Se llevan a cabo tanto una estabilización hemodinámica (MAP estable durante 15 minutos) como una estabilización metabólica (temperatura rectal de 38-40 °C, pH de sangre arterial de 7,39-7,41). Se obtienen muestras de sangre arterial. Cada animal de ensayo debe tener un hematocrito, una concentración de hemoglobina, un recuento de plaquetas, un tiempo de protrombina, un tiempo parcial de tromboplastina activada y una concentración plasmática de fibrinógeno normales para ser incluido en el estudio. Se colocan bilateralmente drenajes (como en la aortotomía) para el cálculo cuantitativo de la pérdida de sangre y la velocidad. Se provoca la lesión hepática exactamente del modo descrito en publicaciones previas. Esencialmente, se utiliza una pinza especialmente diseñada, en forma de "X", que consiste en puntas afiladas de 4,5 cm y una placa base, para hacer dos desgarros hepáticos penetrantes. Las lesiones hepáticas estandarizadas son heridas estrelladas completas que afectan a la vena lobular central izquierda, la vena lobular central derecha, la vena hepática porta y el parénquima hepático. Treinta segundos después de la lesión, se comienza el flujo de una disolución tibía (39 °C) de Ringer-lactato a un caudal de 260 ml/min para restablecer la presión arterial media (MAP) de línea de base. Se aplican los apósitos hemostáticos experimentales al mismo tiempo que se inicia el paso IV de fluidos, con compresión manual por medio de la aplicación estandarizada de presión en dirección dorso-ventral. Después de un minuto, se inspecciona la herida en cuanto a una sangría. Si la hemostasia no es completa, se vuelve a aplicar presión en dirección laterocentral. Se repite la secuencia cuatro veces, con 60 segundos de compresión. Los puntos finales esenciales de la hemostasia se definen como la ausencia de cualquier sangría detectable desde la lesión. Después de la aplicación del tratamiento hemostático, se cierra temporalmente el abdomen de los animales y se observan estos durante 60 minutos. El punto final para la muerte es un pulso de 0. La recogida cuantitativa de sangre antes de la aplicación del tratamiento es denominada "pérdida sanguínea pretratamiento", y a la recogida al final del periodo de estudio se hace referencia como "pérdida sanguínea postratamiento". No se incluye la sangre en los agentes hemostáticos, pero se determinan la reposición IV total de fluidos y el volumen estimado de sangre antes de la lesión.

Se estima la fuerza de adherencia del apósito hemostático utilizando el sistema de calificación subjetiva presentado por el equipo militar que ideó este protocolo. Las calificaciones varían de 1 a 5: 1 = ninguna adherencia, 2 = ligera; 3 = adherencia para causar el estiramiento del tejido en contacto con el agente hemostático pero no para levantar el hígado de la mesa, 4 = adherencia suficiente para levantar parcialmente el hígado de la mesa, y 5 = adherencia suficiente para levantar el hígado de la mesa. Para la fuerza de adherencia, la calificación media para los 3 apósitos de cada animal es tratada como un único valor.

Los puntos finales esenciales son supervivencia, muerte, pérdida sanguínea pretratamiento, pérdida sanguínea postratamiento, tiempo de supervivencia, hemostasia a los 1, 2, 3 ó 4 minutos, volumen de fluido de resucitación en % (sin valores para los datos de adherencia proporcionados). Los parámetros esenciales de la lesión son el número de vasos desgarrados correlacionado con la pérdida sanguínea pretratamiento en ml y ml/kg de peso corporal.

Tanto el muletón de quitosano con microesferas microporosas de polisacárido como la tela de quitosano con microesferas microporosas de polisacárido presentan una capacidad superior en cuanto a controlar la pérdida de sangre así como en cuanto a los otros parámetros ensayados.

Modelo de sangría oral: hemostasia lingual en el conejo

Este modelo proporciona un ensayo hemostático conveniente en un sistema con flujo sanguíneo capilar potenciado (la lengua) y elevada actividad fibrinolítica (mucosa oral). Este modelo puede tener fácilmente suprimida la función plaquetaria y también puede estar heparinizado. El modelo ha sido utilizado para evaluar el efecto hemostático de

quitosano líquido en ácido acético diluido, con los puntos finales esenciales de un tiempo de sangría reducido después de una incisión estándar. Se han publicado descripciones del modelo, que proporcionan datos de partida para que se comparen los resultados.

5 Se compara la eficacia hemostática de la NAG, considerada muy hemostática para hemorragias capilares, con el
muletón de quitosano con y sin microesferas microporosas de polisacárido y con la tela de quitosano con y sin mi-
croesferas microporosas de polisacárido. Los puntos finales esenciales son el tiempo de sangría lingual, medido en
10 minutos desde el momento en que se aplica el agente hemostático hasta que la hemostasia es completa. Se some-
ten los conejos a eutanasia de uno a catorce días después de la cirugía y se evalúan histológicamente las lesiones.
Se estudian conejos con estatus de coagulación sanguínea normal, actividad plaquetaria suprimida y anticoagula-
ción por heparina. Se estudian conejos NZW, de 2,2-2,7 kg de peso, en cuanto a hemostasia lingual después de
15 utilizar el modelo desarrollado por Klokkevold et al., que consiste en un "stent" metálico especial suturado a la lengua
con objeto de estabilizar tejidos blandos y asegurar una lesión consistente. Se realizan incisiones en el borde lateral
de la lengua con una cuchilla 15 protegida. Se realizan mediciones de tiempos de sangría desde la incisión utilizan-
do el procedimiento del papel de filtro de Coles. Se toman manchas cada 15 segundos hasta que no aparece tinción
sanguínea alguna. También se determinan los tiempos de la sangría y la coagulación sistémicas. Se estudia un total
de 30 conejos, en seis grupos de cinco cada uno. Los seis grupos consisten en testigo (ningún tratamiento), NAG,
muletón de quitosano con o sin microesferas microporosas de polisacárido, y tela de quitosano con o sin microesfe-
ras microporosas de polisacárido. Una vez que se han anestesiado los animales (IM, 35 mg de ketamina-HCl/kg y 5
20 mg de xilazina/kg), se inserta un espéculo ocular en la boca para mantenerla abierta y se sutura el stent de acero
inoxidable a la lengua para estabilizar los tejidos. Se realizan incisiones en el borde lateral de la lengua, con una
profundidad de 2 mm y una longitud de 15 mm, con una cuchilla 15 protegida. Se tratan inmediatamente las incisi-
ones con los agentes hemostáticos y se miden los tiempos de sangría. Se utiliza el método de la marcación en la
lengua antes de la incisión para facilitar el posmarcador de seccionamiento histológico. Se lleva a cabo un estudio
25 idéntico al anterior en 30 conejos, en cinco grupos de cinco conejos cada uno, con animales tratados con un antago-
nista de la función plaquetaria, epoprostanol (prostaciclina o PGI₂). Se sigue explícitamente el protocolo de Klokke-
vold. De nuevo, se estudian 30 conejos una vez que el tiempo de coagulación activado ha sido prolongado 3x así
como aumentando en un 40% el tiempo medio de sangría sistólica. El examen histológico va a incluir la SEM. Tanto
el muletón de quitosano con MPH como la tela de quitosano con MPH presentan una capacidad superior en cuanto
a controlar una sangría oral.

30 Ensayos en cerdos – Modelo de lesión letal en la ingle

Se ensayaron 1,5 g de muletón de quitosano cargado con microesferas microporosas de polisacárido en un cerdo
(94 kg), en el modelo de lesión letal en la ingle desarrollado por el Dr. Hasan Alam, un cirujano traumatólogo y espe-
cialista en investigación en el área de víctimas en el campo de batalla, que pertenece al personal del Washington
(DC) Hospital Center y trabaja en la facultad de la Uniformed Services University of the Health Sciences (USUHS).
35 Después de cortar los vasos femorales, se dejó que continuara la sangría hasta que el animal hubo perdido la san-
gre equivalente a aproximadamente de 20 a 25 ml/kg de peso corporal. Al permitir una cantidad fija de pérdida de
sangre con respecto al peso corporal en vez de una sangría durante un tiempo específico, se crea una patología
más consistente. Después de la cantidad fija de pérdida de sangre, se colocó un fragmento de 1,5 g de muletón de
quitosano sobre la herida. El muletón de quitosano resultó exitoso en cuanto a controlar la sangría de los vasos
40 cortados. Después de una resucitación con 500 ml de Hespan, se observó al animal hasta que se hubo estabilizado
la presión arterial media en aproximadamente 45 mm de Hg. No se observó sangría alguna en este período de ob-
servación. En ese momento se administró una resucitación adicional más calcio y dopamina para aumentar la pre-
sión arterial media a 95 mm de Hg, sin indicación alguna de sangría. Se sacrificó el animal y se examinó el muletón.

Se ensayó muletón de quitosano alterado en otro cerdo (87 kg). El muletón de quitosano fue alterado añadiendo
45 microesferas microporosas de polisacárido adicionales al muletón para compensar cualquier pérdida de microesfe-
ras microporosas de polisacárido durante la alteración. La aplicación fue exitosa y, después de aproximadamente
una hora, se aumentó la presión arterial media usando Hespan y dopamina para someter la aplicación a esfuerzo.
No se observó sangría alguna hasta que la presión arterial media fue elevada a aproximadamente 95 mm de Hg,
momento en que se reanudó la sangría. Se retiró el muletón. Se observó que el material era rígido y duro. Se colocó
50 un muletón adicional en la herida. Después de esto, la sangría resultó controlada. El muletón adicional era muletón
de quitosano inalterado que contenía microesferas microporosas de polisacárido.

Estas dos aplicaciones demostraron que, para conseguir un control satisfactorio de una intensa sangría, es necesari-
o colocar el muletón sobre el vaso lesionado. Tiene lugar poca sangría en el fondo de la herida femoral. Si se colo-
ca el material en el fondo de la herida, no se puede controlar la sangría. En consecuencia, preferiblemente, el mate-
55 rial se coloca cuidadosamente en la herida para que entre en contacto con la arteria femoral. En general, las aplica-
ciones fueron muy exitosas y sugirieron que las formulaciones, cuando se aplican apropiadamente, presentan buena
eficacia.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un material hemostático, material que comprende fibras de quitosano, en que el quitosano tiene un peso molecular de 800 kDa o superior, en que el quitosano se obtiene de quitina que tiene un grado de desacetilación superior a 90%, en que la superficie de las fibras de quitosano fue tratada con ácido acético glacial para dar lugar a una modificación de la superficie que mejora las propiedades bioadhesivas de las fibras y en que las fibras de quitosano se adhieron entre sí por tratamiento con ácido acético acuoso.
2. El material hemostático de la Reivindicación 1, en que el material hemostático comprende una borla o un muletón.
- 10 3. El material hemostático de la Reivindicación 1, en que el material hemostático comprende una tela no tejida en telar o una tela tejida en telar.
4. El material hemostático de la Reivindicación 1, en que el material hemostático comprende una tela no tejida en telar que tiene una cara rugosa y una cara lisa.
5. El material hemostático de la Reivindicación 1, en que el material hemostático comprende una tela no tejida en telar en que ambas caras son rugosas.
- 15 6. El material hemostático de la Reivindicación 1, en que el material hemostático comprende una pluralidad de capas de fibra de quitosano.
7. El material hemostático de la Reivindicación 1, en que el quitosano tiene un peso molecular de aproximadamente 1100 kDa.
- 20 8. Un procedimiento para preparar un material hemostático que comprende fibras de quitosano, en que el quitosano tiene un peso molecular de 800 kDa o superior, en que el quitosano se obtiene de quitina que tiene un grado de desacetilación superior a 90%, procedimiento que comprende:
 - a) proporcionar una primera capa de fibras de quitosano;
 - b) aplicar un ácido acético acuoso a la primera capa de fibras de quitosano; y
 - 25 c) colocar una segunda capa de fibras de quitosano encima de la primera capa de fibras de quitosano, en que la primera capa de fibras de quitosano se adhiere a la segunda capa de fibras de quitosano por la acción del ácido acético acuoso, por lo que se obtiene un material hemostático, en que las fibras de quitosano son adicionalmente tratadas con ácido acético glacial para dar lugar a una modificación de la superficie que mejora las propiedades bioadhesivas de las fibras.
9. El procedimiento de la Reivindicación 8, en que se repiten las operaciones a) a c) al menos una vez.
- 30 10. El procedimiento de la Reivindicación 8 ó 9, que comprende además la operación de calentar el material hemostático, por lo que se evapora un líquido del material hemostático.
11. El procedimiento de cualquiera de las Reivindicaciones 8 a 10, que comprende además las operaciones de:
 - d) comprimir el material hemostático entre una primera superficie y una segunda superficie; y
 - e) calentar el material hemostático, por lo que se obtiene un material hemostático seco.
- 35 12. El procedimiento de la Reivindicación 8, en que el quitosano tiene un peso molecular de 1100 kDa.
13. El procedimiento de la Reivindicación 8, en que el ácido acético acuoso se aplica a la primera capa de fibras de quitosano por atomización ultrasónica.
14. El procedimiento de la Reivindicación 8, en que las fibras de quitosano se preparan a partir de una disolución acética para hilado que contiene poli(alcohol vinílico) al 2% en peso.
- 40 15. El procedimiento de la Reivindicación 8, en que las fibras de quitosano se preparan a partir de una disolución de hilado primaria que comprende 3 partes de polvo de quitosano en un disolvente mixto que contiene 50 partes de ácido tricloroacético y 50 partes de ácido acético glacial a 5 °C.
16. El procedimiento de la Reivindicación 8, en que las fibras de quitosano se preparan mediante un método que comprende las operaciones de:
 - 45 – disolver 3 partes de polvo de quitosano en un disolvente mixto, a 5 °C, que contiene 50 partes de ácido tricloroacético y 50 partes de ácido acético glacial, para obtener una disolución de hilado primaria mantenida a 20 °C;

- filtrar y luego desgasificar la disolución de hilado primaria bajo vacío;
 - formar fibras hilando la disolución de hilado primaria utilizando un primer baño de solidificación que comprende acetona a 14 °C, una hilera con una abertura de 0,08 mm, una cuenta de orificios de cuarenta y ocho, y una velocidad de hilado de 10 m/min;
- 5
- recuperar las fibras del baño de acetona y transportarlas por medio de una cinta transportadora a un segundo baño de solidificación que comprende metanol a 15 °C, en el que se mantienen las fibras durante diez minutos;
 - recuperar las fibras y devanarlas a una velocidad de 9 m/min;
 - neutralizar las fibras devanadas, durante una hora, en una disolución de 0,3 g/l de KOH; y
- 10
- lavar con agua desionizada las fibras devanadas y neutralizadas, por lo que se obtienen fibras de quitosano.
- 17.
- 15
17. Uso de un material hemostático en la preparación de un apósito para tratar una herida, material hemostático que comprende fibras de quitosano, en que el quitosano tiene un peso molecular de 800 kDa o superior, en que el quitosano se obtiene de quitina que tiene un grado de desacetilación superior a 90%, en que la superficie de las fibras de quitosano fue tratada con ácido acético glacial para dar lugar a una modificación de la superficie que mejora las propiedades bioadhesivas de las fibras, y en que las fibras de quitosano se adhirieron entre sí por tratamiento con ácido acético acuoso.
- 18.
18. El uso de la Reivindicación 17, en que el material hemostático está en una forma seleccionada del grupo que consiste en una borla, una esponja y una tela.
- 20
- 19.
19. El uso de la Reivindicación 17 ó 18, en que la herida es seleccionada del grupo que consiste en un lecho tumoral, una herida hepática y una herida cerebral.
- 20.
20. El uso de cualquiera de las Reivindicaciones 17 a 19, en que la herida es seleccionada del grupo que consiste en una herida por punción arterial, una herida por punción venosa, una herida por desgarramiento arterial y una herida por desgarramiento venoso.

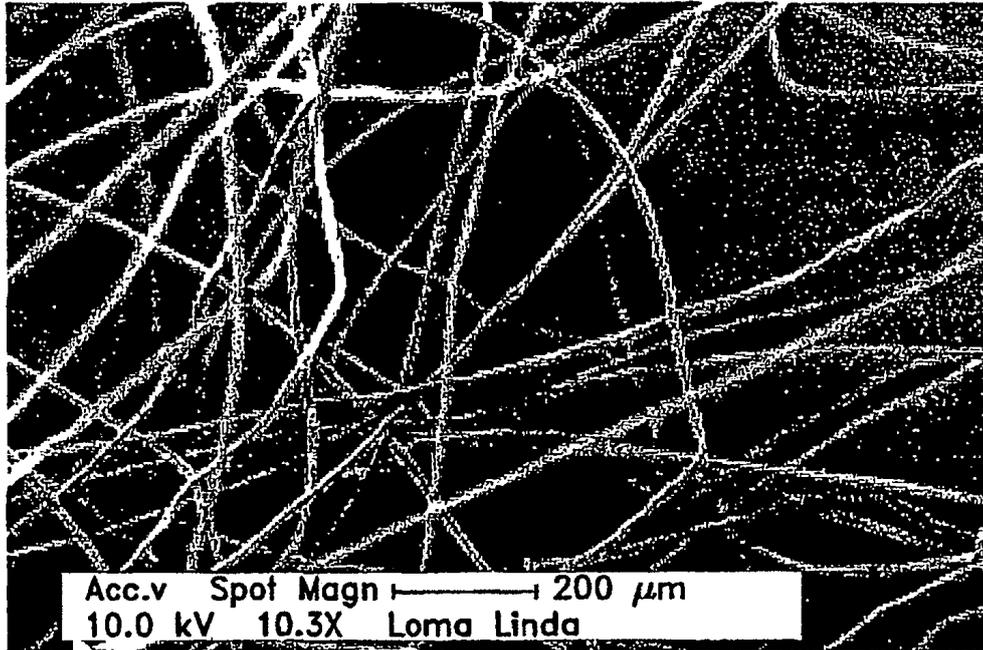


FIG. 1

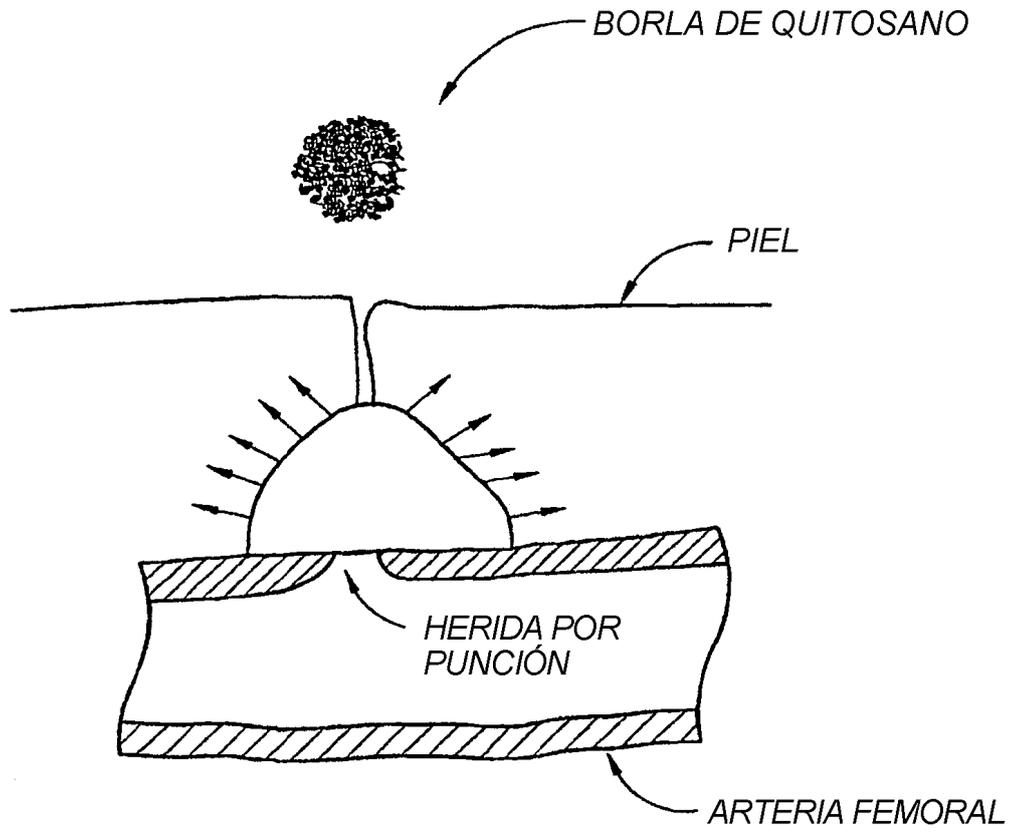


FIG. 2

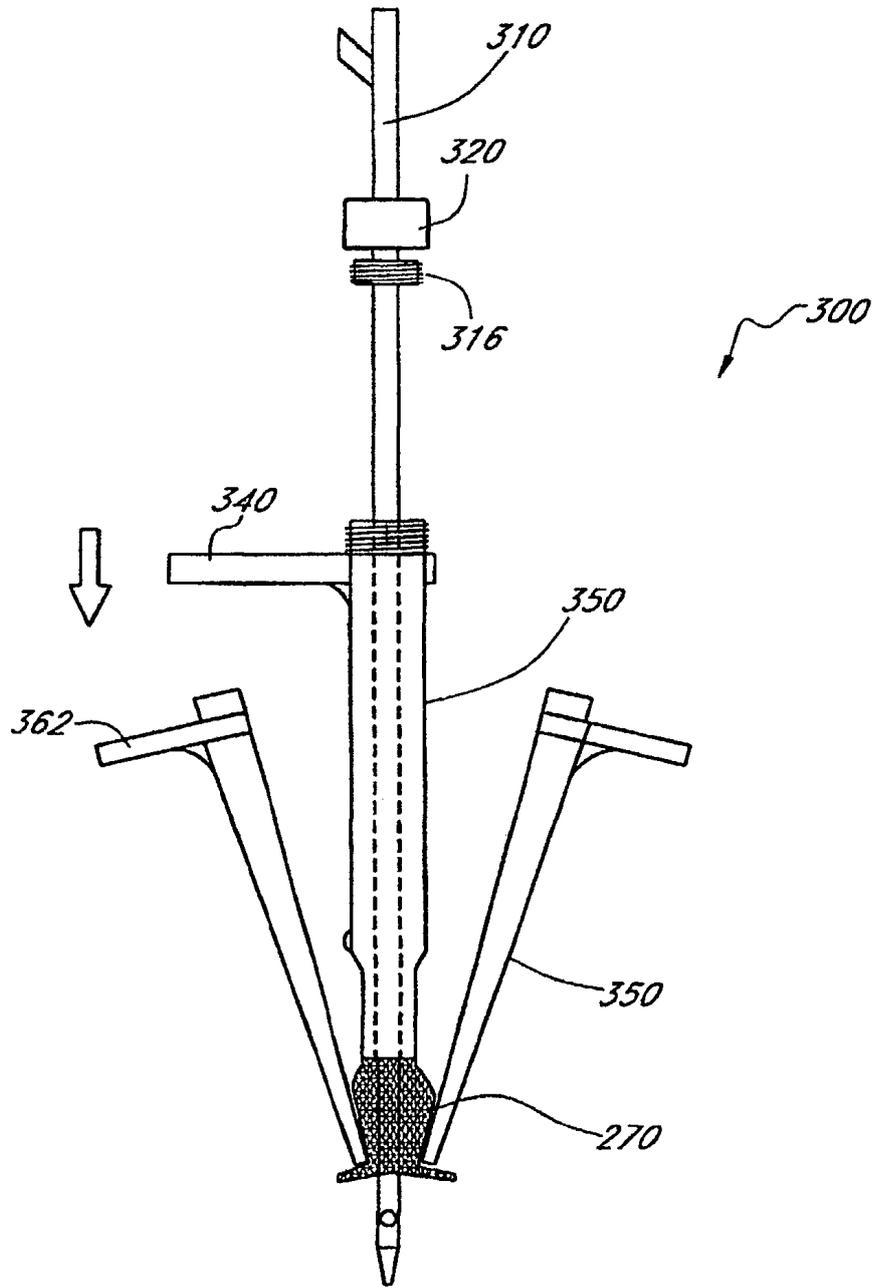


FIG. 3

FIG. 4

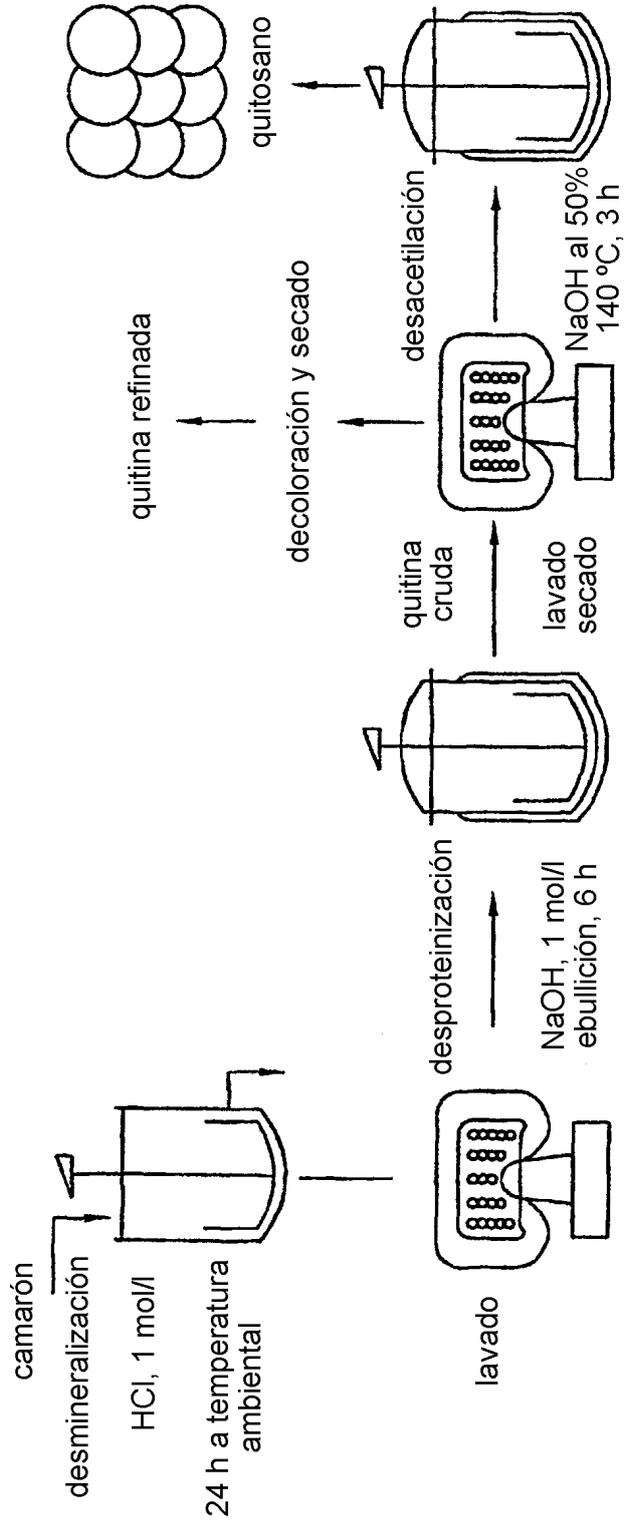


FIG. 5

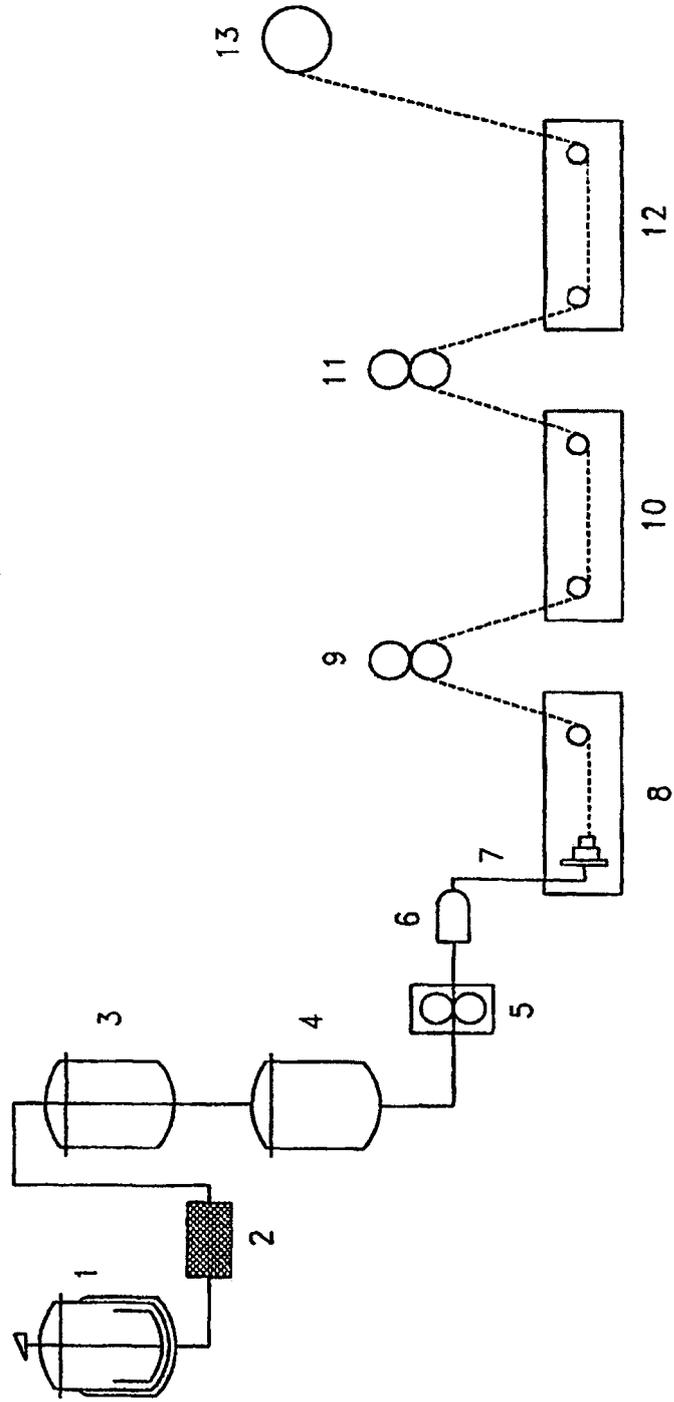
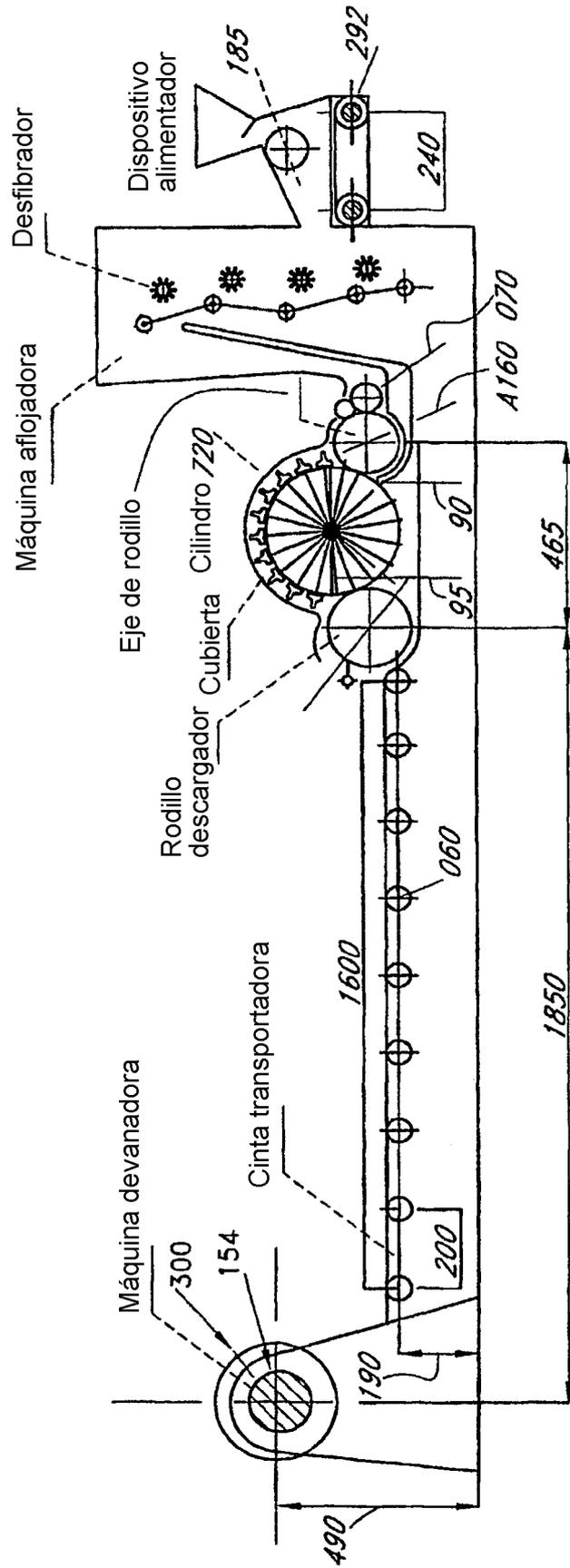


FIG. 6



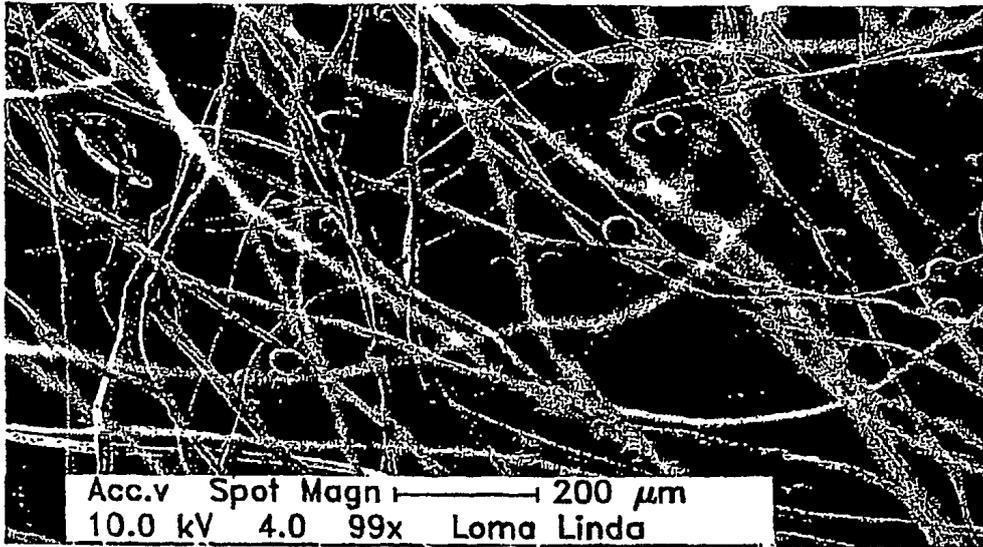


FIG. 7

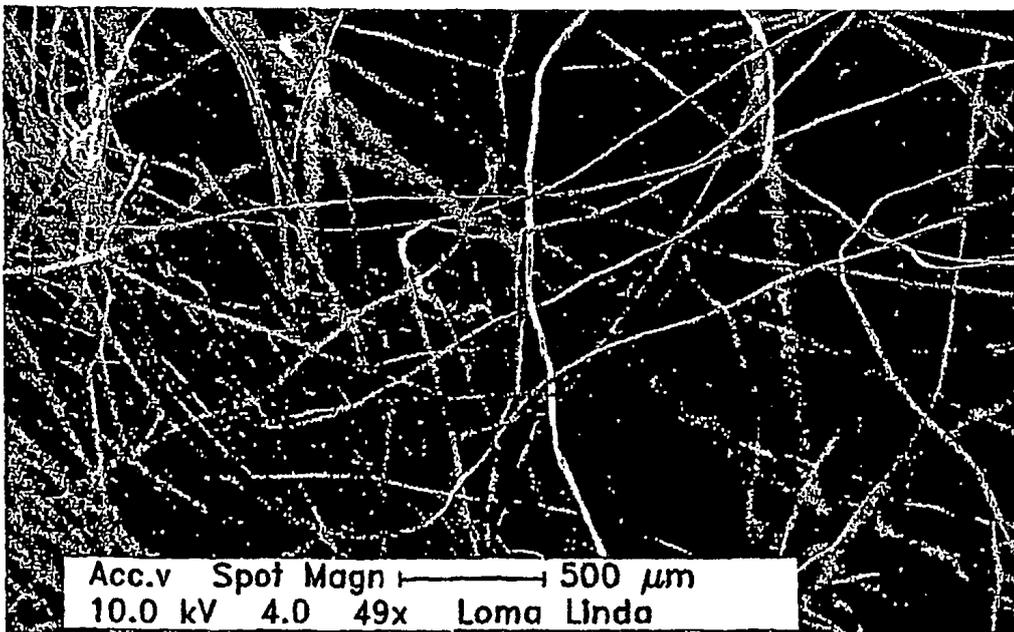


FIG. 8

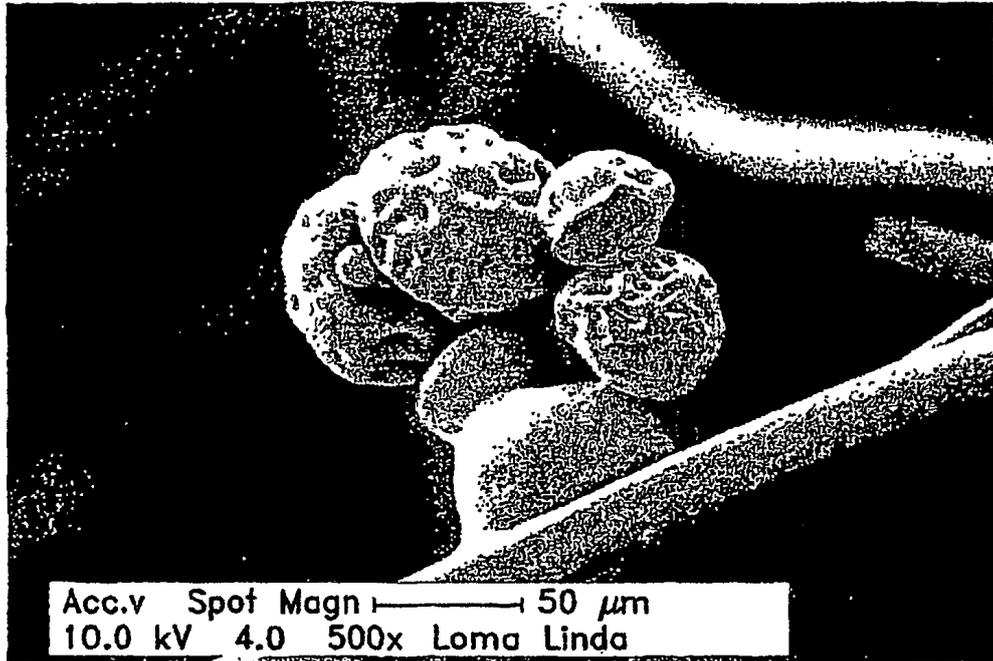


FIG. 9A

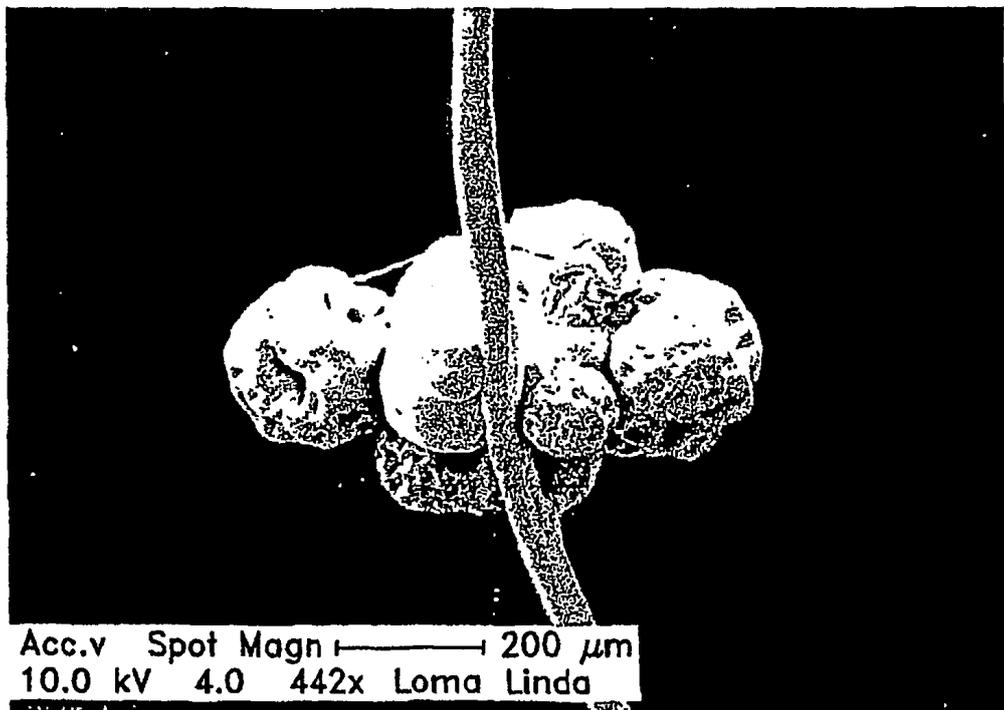


FIG. 9B

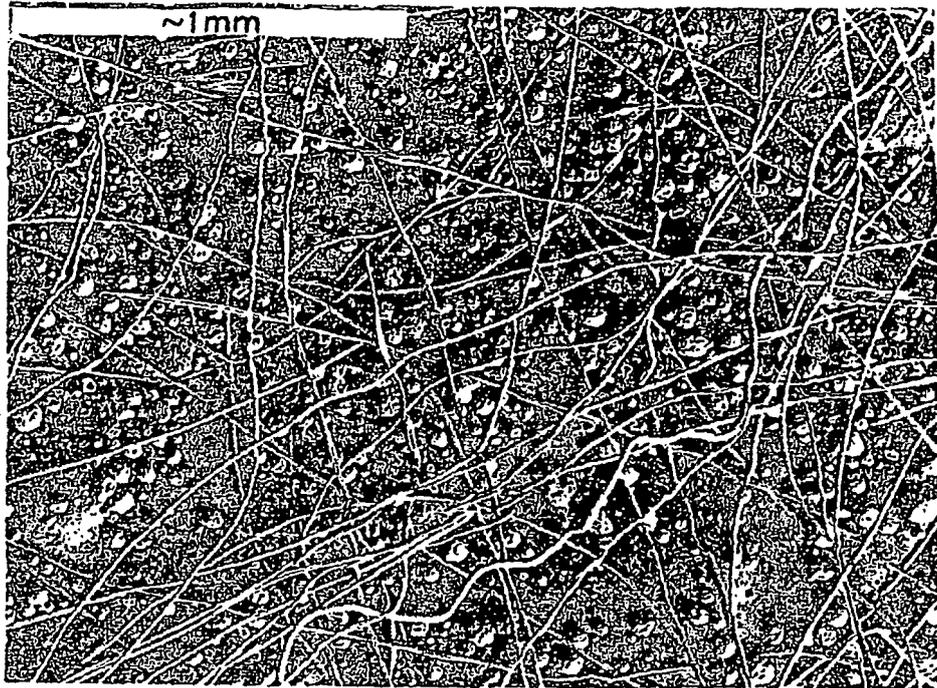


FIG. 10A

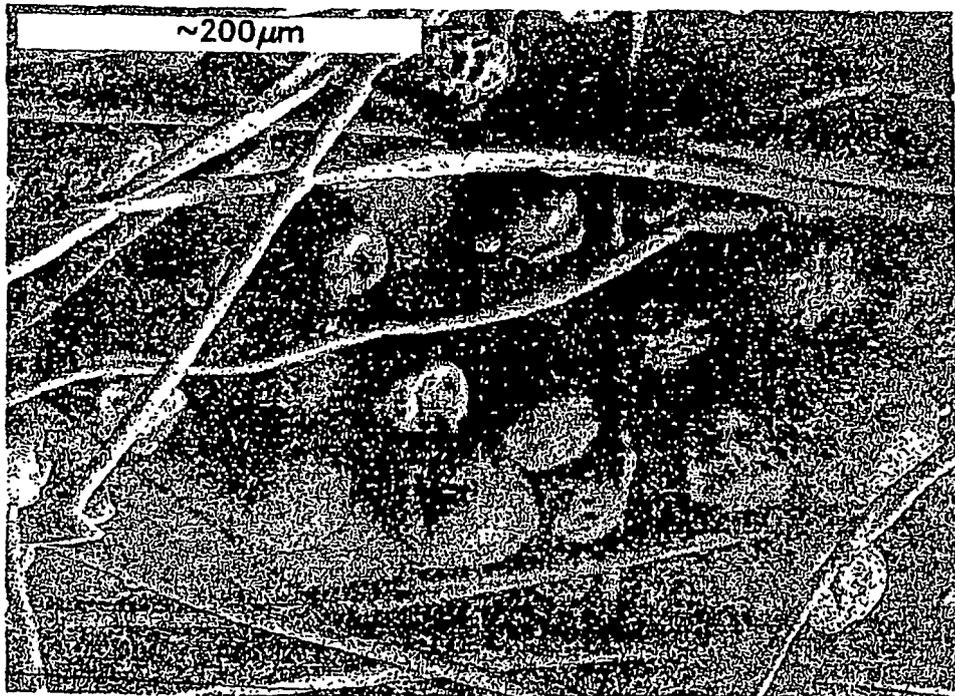


FIG. 10B

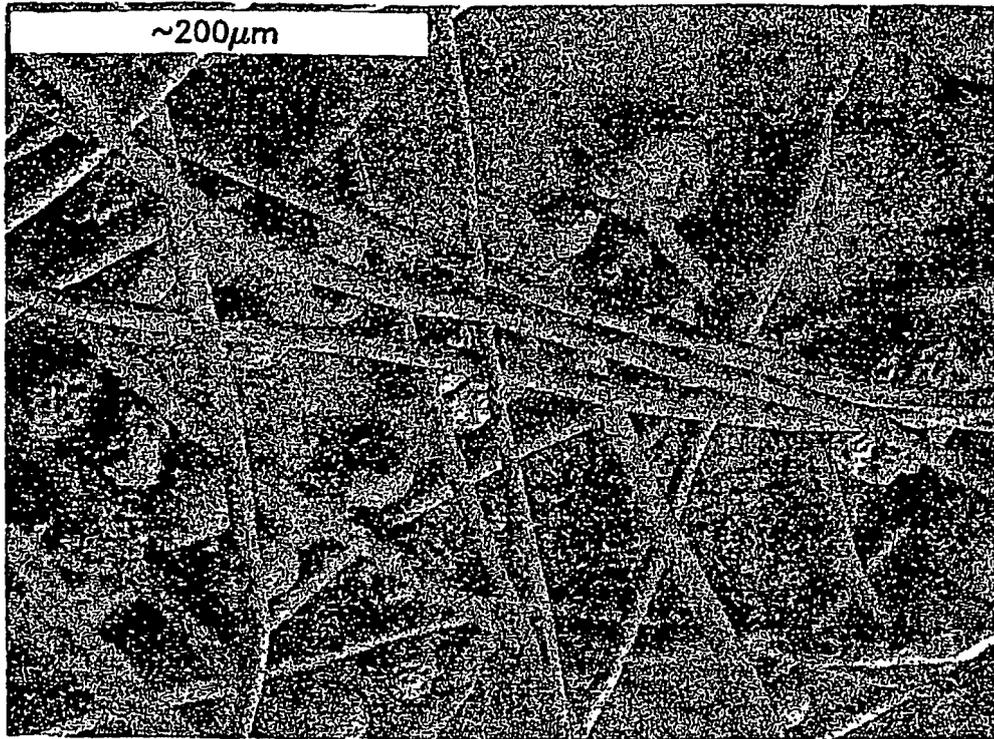


FIG. 10C