

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 426 478**

51 Int. Cl.:

**C08L 89/00** (2006.01)

**C08J 3/075** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.07.2010 E 10757845 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2013 EP 2459650**

54 Título: **Gelificación acelerada de fibroína regenerada**

30 Prioridad:

**31.07.2009 IN DE15782009**

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

**23.10.2013**

73 Titular/es:

**COUNCIL OF SCIENTIFIC & INDUSTRIAL  
RESEARCH (100.0%)**

**Anusandhan Bhawan, 2 Rafi Marg  
New Delhi 110 001, IN**

72 Inventor/es:

**NAGARKAR, SHAILESH PRAKASH y  
LELE, ASHISH KISHORE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 426 478 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

Gelificación acelerada de fibroína regenerada.

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a un proceso para la aceleración de la gelificación de fibroína regenerada. La presente invención se refiere además a un proceso para usar un agente tal como sílice para crear una estructura porosa de fibroína regenerada.

**Antecedentes de la invención**

10 Se sabe que los geles de fibroína de seda regenerada (RSF) tienen microestructuras porosas que se pueden ajustar para obtener propiedades mecánicas controlables. La alta resistencia del gel de fibroína, su porosidad y su biocompatibilidad lo hacen un biomaterial potencialmente interesante para aplicaciones tales como estructuras porosas 3D para la ingeniería de tejidos.

15 El tiempo de gelificación de RSF depende del pH y la concentración de fibroína en disolución. La posible importancia de los geles de fibroína se encuentra en investigación biomédica en los casos en que el pH deseado es 7,2-7,4 para el crecimiento celular. Se observa que RSF de concentraciones en el intervalo de 1 a 10 g/L puede requerir hasta 30 a 60 días a pH 7 para la gelificación mientras que RSF de mayor concentración de proteínas en el intervalo de 10 a 100 g/L requiere de 10 a 20 días a pH 7 para convertirse en un gel (Remitirse a la figura 1). Los geles de RSF preparados a partir de disoluciones de mayor concentración de proteínas no tienen una porosidad adecuada para el acceso y crecimiento celular. Por lo tanto, se desea crear geles microporosos de RSF de menor concentración de proteínas a pH 7. La exposición prolongada a intervalos de temperatura mayores da como resultado la precipitación de proteínas y la pérdida de estructura microporosa, lo que no se desea para la aplicación prevista para RSF. Se necesita un tiempo considerablemente prolongado para la gelificación de tales disoluciones durante el cual se observa crecimiento fúngico en disolución/gel de seda si no se mantiene un ambiente aséptico. En vista de su potencial aplicación en la ingeniería de tejidos, es necesario poder evitar el uso de agente antifúngico para que la línea celular no se someta a un ambiente tóxico. Por lo tanto, existe una necesidad de disminuir el tiempo de gelificación de RSF a pH 7 y temperatura ambiente. A. Lele et al en un póster del International Congress on Rheology, 3-8 de agosto de 2008 y en Phys. Chem. Chem. Phys., 2010, 12, 3834-3844 estudiaron el mecanismo de gelificación de la disolución de fibroína regenerada. También estudiaron la estructura y características de los hidrogeles de seda formados.

20 Se puede hacer referencia a un artículo llamado "Silk Polymer Designs for Improved Expression and Processing" de Dr. David L. Kaplan, que describe el control de la gelificación de seda en donde la gelificación de fibroína de seda depende de la concentración de fibroína de seda, temperatura y pH de la formación de gel y la estructura de proteína que se puede relacionar con rasgos específicos de secuencia principal en la organización molecular de la proteína de fibroína. Además, dicho artículo también describe sistemas de nanocompuestos inorgánicos de seda - sílice en donde se estudió la clonación, expresión y función de fusiones de seda-R5 para la formación de nanocompuestos de sílice.

25 Se puede hacer referencia a un artículo llamado "Novel nanocomposites from spider silk-silica fusion (chimeric) proteins" por Wong et al., 2006, que describe un enfoque novedoso de nanocompuestos biomiméticos para sintetizar los compuestos de sílice usando proteínas de fusión (quiméricas). Las proteínas de fusión han encontrado aplicaciones en un amplio espectro de áreas tales como el campo biomédico [que incluye inmunología, investigación de cáncer y administración de fármacos (17-20)] y ciencia de materiales [materiales automatados (p. ej. geles), bioconjugados de puntos cuánticos, sensores y síntesis de materiales inorgánicos (21-27)].

30 Se puede hacer referencia a un artículo llamado "Composite Material Made of Regenerated Silk Fibroin and Silica Sol" de Cheng Cheng et al. publicado en octubre de 2008 que describe que se mezcló una disolución de fibroína de seda regenerada y sol de sílice para producir los materiales compuestos de fibroína de seda/sílice. Para investigar si existe una interacción entre la proteína de seda y sílice y además, si la interacción puede mejorar las propiedades mecánicas de los materiales compuestos, se estudió la estructura y las propiedades del material compuesto de fibroína de seda/sílice por análisis mecánico dinámico (DMA) junto con microscopía de barrido de electrones (SEM) y espectroscopía Raman. Los resultados de SEM revelaron la buena compatibilidad entre la fibroína de seda y sílice en el compuesto. Las partículas de sílice de nanotamaño se dispersaron uniformemente en las matrices continuas de fibroína de seda. El espectro Raman de los materiales compuestos indicó que la fibroína de seda estaba dominada por una conformación de láminas beta. En comparación con el material de fibroína de seda pura, los compuestos mostraron mejores propiedades mecánicas dinámicas.

35 Se puede hacer referencia a la solicitud de patente WO 200512606, en donde la solicitud reivindica disoluciones de fibroína de seda acuosas y un proceso para prepararlas, un método para producir una fibra, espuma de seda, película e hidrogeles de seda. En la página 30 de dicha solicitud PCT se discute el estudio de la influencia de los iones, pH, temperatura y PEO sobre la gelificación de la disolución de fibroína de seda.

El estudio de la técnica anterior revela que no hay ningún documento que enseñe el proceso de aceleración de la gelificación, disminuyendo así el tiempo de gelificación. Particularmente ningún documento de la técnica anterior enseña el proceso de aceleración del tiempo de gelificación de fibroína de seda que usa un agente de aceleración.

### Objetivo de la invención

5 El objetivo principal de la presente invención es disminuir el tiempo de gelificación de los geles RSF para completar las deficiencias de la técnica.

Otro objetivo de la presente invención es disminuir el tiempo de gelificación de RSF usando un proceso que no provoca crecimiento microbiano en el medio de gel.

10 Aun otro objetivo de la presente invención es disminuir el tiempo de gelificación por un proceso para que no sea tóxico para las líneas celulares.

### Sumario de la invención

Por consiguiente, la presente invención proporciona un proceso para acelerar la gelificación de fibroína de seda regenerada (RSF) con estructura porosa, que comprende las etapas de:

15 a) ajustar el pH de la disolución de fibroína de seda regenerada a pH 5-7,5 y ajustar su concentración en el intervalo de 0,1 a 40%.

b) agregar el agente gelificante que se selecciona del grupo que consiste en sílice,  $TiO_2$ ,  $FeO_2SiN_3$ , hidroxiapatita, preferiblemente sílice, de concentración deseada y mantener la temperatura en el intervalo de 20-70 °C.

20 En otra realización de la presente invención, dicha gelificación se realiza opcionalmente por autosiembra con láminas  $\beta$  de una proteína, en condiciones alcalinas, preferiblemente proteína de fibroína.

En aun otra realización de la presente invención, dicho agente gelificante se usa en el intervalo de concentración de 1 g/l a 25 g/l, preferiblemente 1 a 5 g/l.

En aun otra realización de la presente invención, el tamaño de partículas de dicho agente gelificante se encuentra en el intervalo de 1 nm-1  $\mu$ m, preferiblemente 1 nm a 400 nm.

25 En aun otra realización de la presente invención, el gel de fibroína de seda regenerada tiene estructura porosa, el tamaño de poros de dicho gel se encuentra en el intervalo de 1-10 micrómetros.

En aun otra realización de la presente invención, el gel de fibroína de seda regenerada tiene estructura porosa, dicho gel comprende paredes nanoporosas de una porosidad que varía en el intervalo de 1 a 500 nm.

30 En aun otra realización de la presente invención, el gel de fibroína de seda regenerada tiene estructura porosa, dicho gel está libre de crecimiento microbiano.

### Breve descripción de las figuras

Fig 1: Tiempo de gelificación de RSF a varios pH (D. Kaplan, JPC B, 110, 2006, 21630- 21638) .

Fig 2: Estudio de difracción circular en sol de RSF y gel RSF que contiene varias nanopartículas de sílice de la invención a pH 7 y 25 °C.

35 Fig 3: Mediciones de módulo de compresión en geles RSF de la invención con y sin nanopartículas.

Fig 4: Módulo de compresión y estudio de tiempo de gelificación de 5 g/L de gel RSF en presencia de varias concentraciones de nanopartículas.

Fig 5: Imagen de CSLM de gel RSF a una concentración de 5 g/L, pH 2 y 50 °C (el ancho de la imagen representa 160  $\mu$ m) donde se observa la proteína que forma la estructura porosa.

40 Figura 6: El tubo invertido que muestra la formación del gel. El primer tubo muestra el sol de RSF. El segundo tubo muestra el gel formado, evaluado por el método de inversión de tubo que confirma la formación del gel.

### Descripción detallada de la invención

45 La presente invención describe un proceso que disminuye el tiempo de gelificación de RSF. La composición de RSF y el agente gelificante, se gelifica en 2-24 horas a pH 7-8, lo que da como resultado un gel microporoso con paredes nanoporosas. La composición es un polvo, película, un objeto formado, un objeto moldeado y similares para sembrar células y administrar agentes activos.

Las frases "fibroína de seda regenerada" y "fibroína de proteína regenerada" se usan de manera intercambiable en toda la memoria descriptiva y un experto en la materia lo comprenderá así.

Las frases "seda" y "proteína" se usan de manera intercambiable en toda la memoria descriptiva y un experto en la materia lo comprenderá así.

5 De acuerdo con los objetivos de la invención, se intentaron varios procesos para disminuir el tiempo de gelificación de geles RSF. Los geles RSF se forman a temperatura ambiente a pH 7,0 en aproximadamente dos semanas a tres meses según la concentración de proteína (seda) (Remitirse a la figura 1). Para disminuir el tiempo de gelificación, una alternativa es reducir el pH, pero el pH ácido no permite la propagación de células. En uno de los experimentos, se encontró sorprendentemente que la adición de nanopartículas de sílice redujo el tiempo de gelificación de meses a pocos días o pocas horas, donde el tiempo de gelificación varía con variaciones en la temperatura del proceso, la concentración de proteína y el tamaño de partículas de las nanopartículas de sílice. La composición resultante comprendía el gel de fibroína de seda regenerada, agua y el agente que disminuye el tiempo de gelificación, creándose una estructura porosa de fibroína regenerada.

10 Por consiguiente, una realización de la presente invención describe un proceso para acelerar la gelificación de fibroína de seda regenerada con una estructura porosa, que comprende las etapas de:

- a. ajustar el pH de la disolución de fibroína de seda regenerada a pH 7 y ajustar su concentración;
- b. agregar agente gelificante y mantener las condiciones de temperatura y
- c. verificar si hubo gelificación por el método de inversión de tubo.

La formación de gel se verifica por el método de inversión de tubo, tal como se observa en la figura 6.

20 El agente gelificante no solo reduce el tiempo de gelificación sino que también supera el problema del crecimiento microbiano. En ausencia del agente gelificante, la gelificación requirió más de tres semanas a pH 7-8 para temperatura en el intervalo de 5-70 °C y durante este período se observó crecimiento microbiano. Sin embargo, en presencia de nanopartículas de sílice no se observó crecimiento microbiano antes de la gelificación.

25 Además, tales agentes son biocompatibles y no tóxicos para líneas celulares que se cultivarán en estas redes microporosas de geles RSF.

El agente gelificante usado en la presente invención se selecciona a partir de nanopartículas de sílice, TiO<sub>2</sub>, FeO<sub>2</sub>, SiN<sub>3</sub>, hidroxiapatita y otros compuestos inorgánicos biocompatibles.

30 El tiempo de gelificación se redujo con el aumento de la concentración del agente gelificante, que varía de 1 g/L a 25 g/L o más. El tamaño de partículas del agente varía de 1 nm-400 nm y el tiempo de gelificación se reduce en al menos la mitad del tiempo que requería sin el agente. En algunos casos el tiempo de gelificación se reduce en al menos un orden de magnitud. Además, el proceso de acelerar la gelificación se realiza a una temperatura que varía de 20 °C a 70 °C.

Los resultados de los diversos ensayos con diferentes intervalos de temperatura y concentración de agente gelificante se exponen en forma de tabla a continuación en la presente memoria en las Tablas 1, 2 y 3.

35 Tabla 1: Gráfica de tiempo de gelificación que muestra el efecto de partículas de sílice en el tiempo de gelificación de muestras de RSF

S.N.	Temperatura [°C]	Concentración de proteínas (concentración de seda) [g/L]	Tiempo de gelificación sin usar sílice a diferentes temperaturas	Tiempo de gelificación para diferentes tamaños de nanopartículas de sílice (5 g/L) a pH 7,2		
				40 nm	150 nm	400 nm
1	25	1	> 30 días	6 días	5 días	5 días
2	50	1	> 30 días	12 h	10 h	10 h
3	70	1	> 30 días	12 h	10 h	10 h

Tabla 2: Gráfica de tiempo de gelificación que muestra el efecto de partículas de sílice en el tiempo de gelificación de muestras de RSF

S.N.	Temperatura [°C]	Concentración de proteínas [g/L]	Tiempo de gelificación sin usar sílice	Tiempo de gelificación para diferentes tamaños de nanopartículas de sílice (1 g/L) a pH 7,2		
				40 nm	150 nm	400 nm
1	25	5	> 30 días	2 días	2 días	2 días
2	50	5	Se formó precipitado	4 h	3 h	3 h
3	70	5	Se formó precipitado	4 h	3 h	3 h

Se forma precipitado en 15 días y permanece así durante más de 30 días.

5 Tabla 3: Gráfica de tiempo de gelificación que muestra el efecto de una concentración creciente de partículas de sílice en el tiempo de gelificación de muestras de RSF

S.N.	Temperatura [°C]	Concentración de proteínas [g/L]	Tiempo de gelificación sin usar sílice	Tiempo de gelificación para diferentes concentraciones de nanopartículas de sílice a pH 7,2				
				5 g/L	2,5 g/L	1,25 g/L	0,624 g/L	0,362 g/L
1	25	5	> 30 días	14 h	20 h	20 h	24 h	30 h

10 De los resultados que anteceden cabe destacar que cuando la concentración de proteína fue 1 g/L, el tiempo de gelificación es tan sólo de 5 días para la partícula de sílice de 400 nm a 25 °C y se reduce a 10 horas cuando el proceso se realiza a 70 °C y pH 5-7. A una mayor concentración de proteína de 5 g/L, el tiempo de gelificación es de 3 horas para un tamaño de partículas de 400 nm de sílice y la temperatura es de 70 °C y pH 7,2. Por lo tanto, la aceleración del proceso de gelificación de RSF se logra mediante el aumento de la concentración del agente gelificante pero manteniendo la temperatura y manteniendo el pH mediante el uso de ácido clorhídrico diluido.

En la presente invención, la concentración de proteína varía de 0,1-40%. La composición forma una red de gel microporoso con un tamaño de poros que varía de 1-10 micrómetros que tiene paredes nanoporosas en donde la porosidad de la pared varía de 1-500 nm.

15 En un aspecto más de la invención, la autosiembra con láminas β de una proteína dio como resultado la aceleración del tiempo de gelificación.

En un aspecto preferido, el tiempo de gelificación de RSF se acelera mediante autosiembra de la disolución de RSF con el gel en condiciones alcalinas. No está presente nada de sílice en este RSF.

Tabla 4

20 Gráfica de tiempo de gelificación que muestra el efecto de autosiembra de la disolución de RSF con el gel en condiciones alcalinas frente al tiempo de gelificación de las muestras de RSF

Nº de Muestra	Tiempo de siembra (h)	Estado de vial de muestra en el momento de la siembra	Tiempo de gelificación después de la adición de NaOH 3 M (h)	Tiempo de gelificación del sol a pH 2 (h)
1	0	Disolución	Aun no hay gel (después de 7 días)	27
2	3	Disolución	40~50	24
3	6	Disolución	40~50	24
4	9	Disolución	16~18	24

Nº de Muestra	Tiempo de siembra (h)	Estado de vial de muestra en el momento de la siembra	Tiempo de gelificación después de la adición de NaOH 3 M (h)	Tiempo de gelificación del sol a pH 2 (h)
5	12	Disolución	18	24
6	15	Disolución	18	24
7	18	Disolución translúcida	20	24
8	21	Disolución turbia	21	24
9	24	Gel	Gel	24

La composición se funde como una película, es un polvo o es un objeto formado o moldeado. La composición comprende aditivos para ayudar a fundir la película o moldear como un objeto.

Los geles se caracterizan por sus propiedades mecánicas y porosidad 3D tal como se ejemplifica en la presente memoria.

- 5 Tales composiciones son útiles para sembrar células, como agentes de administración de fármaco y similares.

#### Ejemplos

Los siguientes ejemplos se dan a modo de ilustración solamente y por lo tanto no debería considerarse que limiten el alcance de la presente invención.

##### Ejemplo 1

- 10 Preparación de la composición de rsf

La disolución de RSF se preparó usando el procedimiento descrito en Nagarkar et al (Ind. Eng. Chem. Res. 2009, 0-11). El pH de la disolución de RSF dializada se ajustó a 7 mediante la adición de HCL 0,1 N con agitación constante. La concentración de proteína se ajustó a 1 g/L usando agua desionizada de pH 7. Se agregó un peso conocido de nanopartículas de sílice de 40 nm a la disolución de RSF. Estas disoluciones se mantuvieron a 25 °C, 50 °C y 70 °C en un baño de agua a temperatura constante y el estado de la muestra se monitorizó cada 3 hr. El estado de gel y el tiempo de gelificación se detectaron usando un método de inclinación de vial.

- 15

##### Ejemplo 2

Preparación de la composición de rsf

La disolución de RSF se preparó usando el procedimiento descrito en Nagarkar et al (Ind. Eng. Chem. Res. 2009, 0-11). El pH de la disolución RSF dializada se ajustó a 7 mediante la adición de HCL 0,1 N con agitación constante. La concentración de proteína se ajustó a 1 g/L usando agua desionizada de pH 7. Se agregó un peso conocido de nanopartículas de sílice de 150 nm a la disolución de RSF. Estas disoluciones se mantuvieron a 25 °C, 50 °C y 70 °C en un baño de agua a temperatura constante y el estado de la muestra se monitorizó cada 3 hr. El estado de gel y el tiempo de gelificación se detectaron usando un método de inclinación de vial.

- 20

##### Ejemplo 3

Preparación de la composición de rsf

La disolución de RSF se preparó usando el procedimiento descrito en Nagarkar et al (Ind. Eng. Chem. Res. 2009, 0-11). El pH de la disolución de RSF dializada se ajustó a 7 mediante la adición de HCL 0,1 N con agitación constante. La concentración de proteína se ajustó a 1 g/L usando agua desionizada de pH 7. Se agregó un peso conocido de nanopartículas de sílice de 400 nm a la disolución de RSF. Estas disoluciones se mantuvieron a 25 °C, 50 °C y 70 °C en un baño de agua a temperatura constante y el estado de la muestra se monitorizó cada 3 hr. El estado de gel y el tiempo de gelificación se detectaron usando un método de inclinación de vial.

- 30

##### Ejemplo 4

Preparación de la composición de rsf

La disolución de RSF se preparó usando el procedimiento descrito en Nagarkar et al (Ind. Eng. Chem. Res. 2009, 0-11). El pH de la disolución de RSF dializada se ajustó a 7 mediante la adición de HCL 0,1 N con agitación constante. La concentración de proteína se ajustó a 5 g/L usando agua desionizada de pH 7. Se agregó un peso conocido de

- 35

nanopartículas de sílice de 40 nm a la disolución de RSF. Estas disoluciones se mantuvieron a 25 °C, 50 °C y 70 °C en un baño de agua a temperatura constante y el estado de la muestra se monitorizó cada 3 hr. El estado de gel y el tiempo de gelificación se detectaron usando un método de inclinación de vial.

Ejemplo 5

5 Preparación de la composición de rsf

La disolución de RSF se preparó usando el procedimiento descrito en Nagarkar et al (Ind. Eng. Chem. Res. 2009, 0-11). El pH de la disolución de RSF dializada se ajustó a 7 mediante la adición de HCL 0,1 N con agitación constante. La concentración de proteína se ajustó a 5 g/L usando agua desionizada de pH 7. Se agregó un peso conocido de nanopartículas de sílice de 150 nm a la disolución RSF. Estas disoluciones se mantuvieron a 25 °C, 50 °C y 70 °C en un baño de agua a temperatura constante y el estado de la muestra se monitorizó cada 3 hr. El estado de gel y el tiempo de gelificación se detectaron usando un método de inclinación de vial.

Ejemplo 6

Preparación de la composición de rsf

La disolución de RSF se preparó usando el procedimiento descrito en Nagarkar et al (Ind. Eng. Chem. Res. 2009, 0-11). El pH de la disolución de RSF dializada se ajustó a 7 mediante la adición de HCL 0,1 N con agitación constante. La concentración de proteína se ajustó a 5 g/L usando agua desionizada de pH 7. Se agregó un peso conocido de nanopartículas de sílice de 400 nm a la disolución de RSF. Estas disoluciones se mantuvieron a 25 °C, 50 °C y 70 °C en un baño de agua a temperatura constante y el estado de la muestra se monitorizó cada 3 hr. El estado de gel y el tiempo de gelificación se detectaron usando un método de inclinación de vial.

20 La aceleración resultante en el tiempo de gelificación de RSF para los ejemplos 1-6 para diferentes concentraciones de sílice y disolución RSF se tabula en las tablas 1, 2 y 3 anteriores.

Ejemplo 7

Propiedades mecánicas

El módulo de compresión (E') de los geles RSF de la invención se midió por una estación de prueba Rheometric Series RSA-III (instrumento TA Waters LLC, New Castle DE 1970). Un accesorio casero que comprende una placa superior de 15 mm de diámetro y un cilindro de 27 mm de diámetro interior por 4 mm de alto que sirvió como un portamuestras y la placa inferior se usó para evaluar las muestras. Los geles RSF formados en viales de cultivo de 15 ml se colocaron en un portamuestras. Después de un período de espera de aproximadamente media hora, se aplicó aceite de silicio (SF-1000, GE Bayer Silicones, India) al borde de la muestra para evitar la pérdida de agua de los geles RSF. Se realizó una prueba dinámica de barrido de cepa en todas las muestras a una frecuencia de 1 Hz y la cepa aumentó de 0,01% a 3% por un incremento de 0,01%. Las Tablas 5 y 6 muestran el módulo de compresión medido de geles RSF con y sin nanopartículas.

Tabla 5: Mediciones de módulo de compresión de geles RSF con y sin nanopartículas.

Nº de Sr	Concentración de proteínas de RSF(g/L)	Concentración de sílice (g/L)	Módulo de gel E' (Pa)	
			Con sílice	Sin sílice
1.	5,0	5,0	2825,0	497,0
2.	10,0	10,0	13538,0	4696,0

Tabla 6: Mediciones del módulo de compresión de 5 g/L de gel de RSF en presencia de diversas concentraciones de nanopartículas.

Nº de Sr	Temperatura [°C]	Concentración de proteínas de RSF [g/L]	Concentración de partículas de sílice [g/L]	Módulo de E' [Pa]
1.	25,0	5,0	5	1539,0
2.	25,0	5,0	2,5	663,16
3.	25,0	5,0	1,25	845,0
4.	25,0	5,0	0,64	976,42

Ejemplo 8

Mediciones de porosidad por clsm

5 La porosidad de los geles RSF se calculó cuantitativamente por microscopio de barrido láser confocal (CLSM). Las imágenes microscópicas de geles RSF tal como se muestran en la figura 5 se obtuvieron usando un microscopio confocal Carl Zeiss. La porosidad de geles RSF se calculó de la magnificación conocida del objetivo. La porosidad de geles RSF varía de 100 micrómetros a 10 micrómetros para la concentración de RSF de 1 g/L a 5 g/L. La Fig 5 muestra la imagen de CSLM de gel RSF a una concentración de 5 g/L, pH 2 y 50 °C.

Ejemplo 9

Estudio de gelificación de rsf como función del tiempo de siembra

10 RSF se preparó mediante el uso del siguiente proceso. Se hirieron capullos de seda en 0,5 % en peso de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ) durante una hora para retirar sericina. Las fibras de fibroína hervidas se lavaron cuidadosamente con cantidad en exceso de agua para retirar el  $\text{NaHCO}_3$ . La fibroína de seda así obtenida se disolvió luego en una disolución de LiBr 9,3M para obtener una disolución de 10% en peso. Esta disolución se dializó (bolsa de diálisis de acetato de celulosa de Sigma Aldrich, MWC = 10.000) en comparación con agua desionizada durante 15 48 horas. El primer lote de agua desionizada se cambió después de 3 horas y a partir de entonces cada 9 horas. La disolución de RSF dializada se centrifugó a 15000 RPM durante 20 minutos después de lo cual se determinó la concentración de proteína mediante el uso de espectroscopía visible UV mediante el uso de 11,8 como el coeficiente de extinción molar (Izuka et al, 1968). La disolución dializada se almacenó siempre en un refrigerador a 5-7 °C. El pH de disolución dializada se midió y fue 8,7.

20 El pH de una parte de la disolución dializada se ajustó mediante la adición de una disolución de HCL 0,1 M gota a gota con agitación constante. Durante el ajuste del pH una parte de la proteína se precipitó y esto se separó por centrifugación a 15000 RPM durante 20 min. La disolución de proteína sobrenadante así obtenida, denominada en lo sucesivo "sol", fue transparente y su concentración se determinó por espectroscopía visible UV antes de usarla para estudios adicionales. Se prepararon 9 viales de muestras que contenían 5 ml cada uno del sol. Se agregaron 27 µl 25 de NaOH 3M al vial de muestra N° 1 para aumentar su pH a 8,7 que es igual al pH del RSF dializado. Nos referiremos a esta muestra como una que tiene un tiempo de "siembra" de cero. Las muestras de sol en los otros ocho viales se mantuvieron a bajo pH durante diferentes tiempos de "siembra" entre 0 y 24 horas como se menciona en la Tabla 4 después de lo cual se agregaron 27 µl de NaOH 3M a cada uno de estos. El estado de la muestra al momento de agregar la disolución de NaOH y el tiempo de gelificación después de la adición de NaOH se presentan 30 en la Tabla 4.

Ventajas de la invención

- 1 La condición ambiente de la temperatura así como del pH acelera el proceso de gelificación.
2. La aceleración da como resultado que el tiempo de gelificación se reduce a pocas horas en comparación con varios días.
- 35 3. La reducción en el tiempo de gelificación hace que el gel esté disponible para una amplia variedad de aplicaciones.
4. El gel no es susceptible a crecimiento microbiano.
5. Se obtuvo una red porosa con un amplio intervalo de porosidad.
6. El método alternativo de autosiembra también da como resultado la aceleración del tiempo de gelificación.

**REIVINDICACIONES**

1. Un proceso para la gelificación de fibroína de seda regenerada (RSF) para obtener un gel con estructura porosa, que comprende las etapas de:
  - a) ajustar el pH de la disolución de fibroína de seda regenerada a pH 5-7,5 y ajustar su concentración en el intervalo de 0,1 a 40%;
  - b) agregar el agente gelificante que se selecciona del grupo que consiste en sílice,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{FeO}_2\text{SiN}_3$  e hidroxiapatita, preferiblemente sílice y mantener la temperatura en el intervalo de 20-70 °C para obtener gel RSF.
2. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicha gelificación se realiza opcionalmente por autosiembra con láminas  $\beta$  de una proteína, en condiciones alcalinas, preferiblemente proteína de fibroína.
3. El proceso según la reivindicación 1, en donde dicho agente gelificante se usa en el intervalo de concentración de 1 g/l a 25 g/l, preferiblemente 1 a 5 g/l.
4. El proceso según la reivindicación 1, en donde el tamaño de partículas de dicho agente gelificante se encuentra en el intervalo de 1 nm-1  $\mu\text{m}$ , preferiblemente 1 nm a 400 nm.

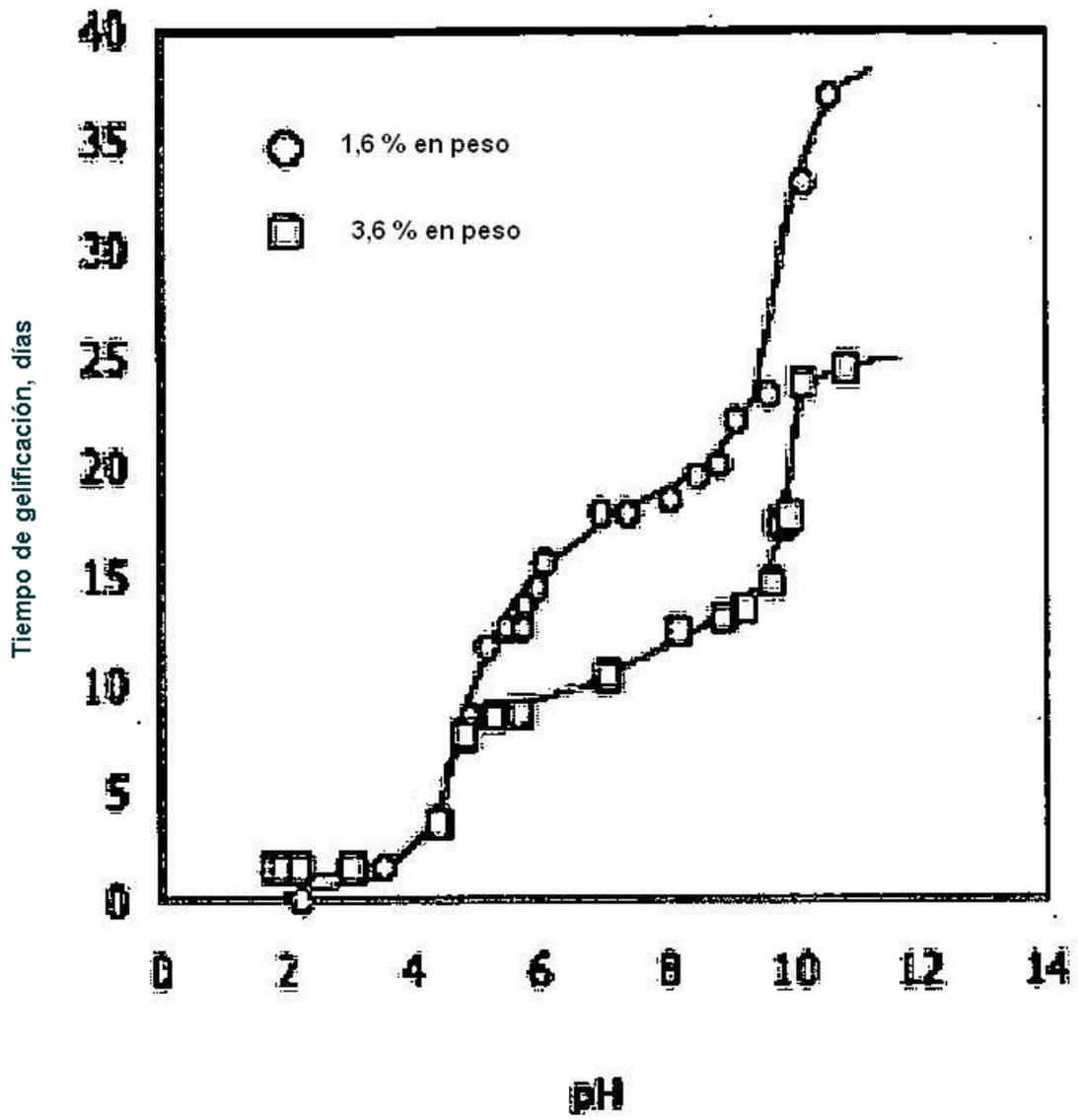


Figura 1

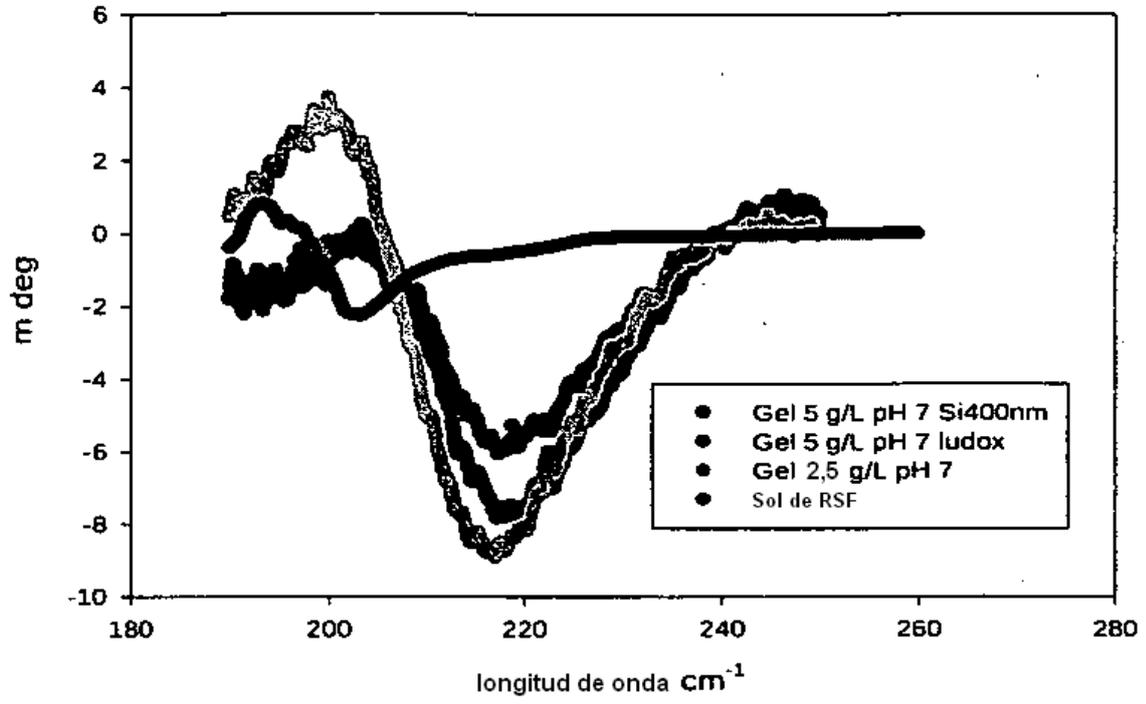


Figura 2

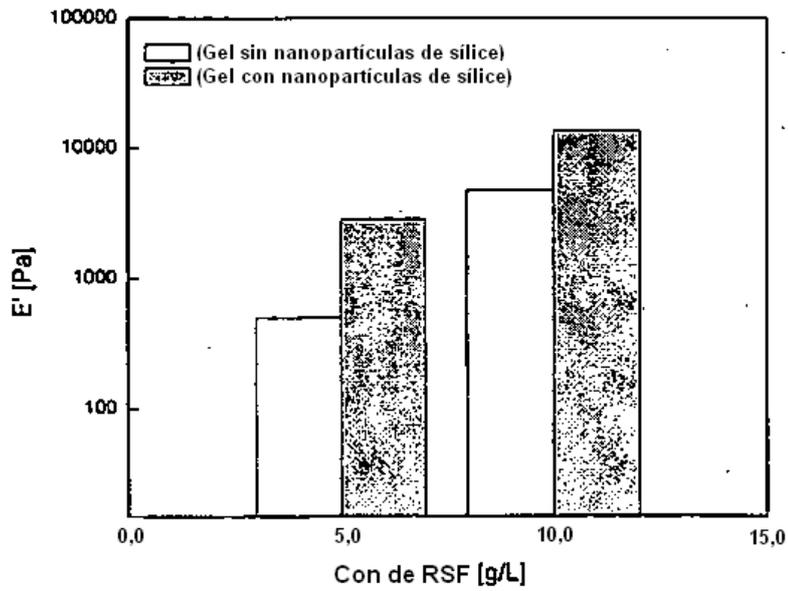


Figura 3

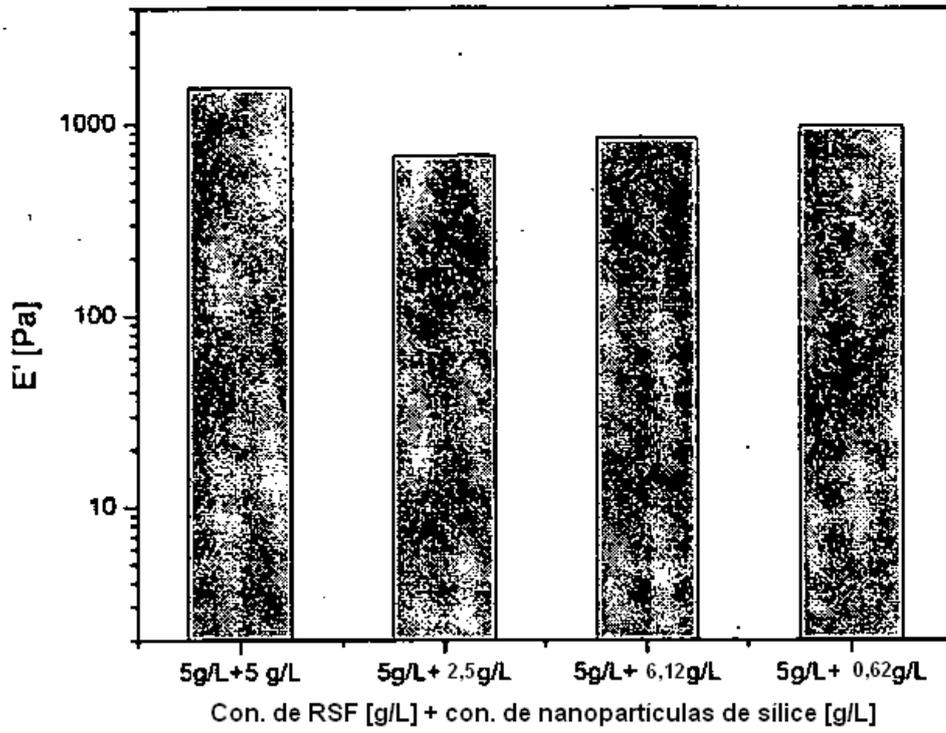


Figura 4

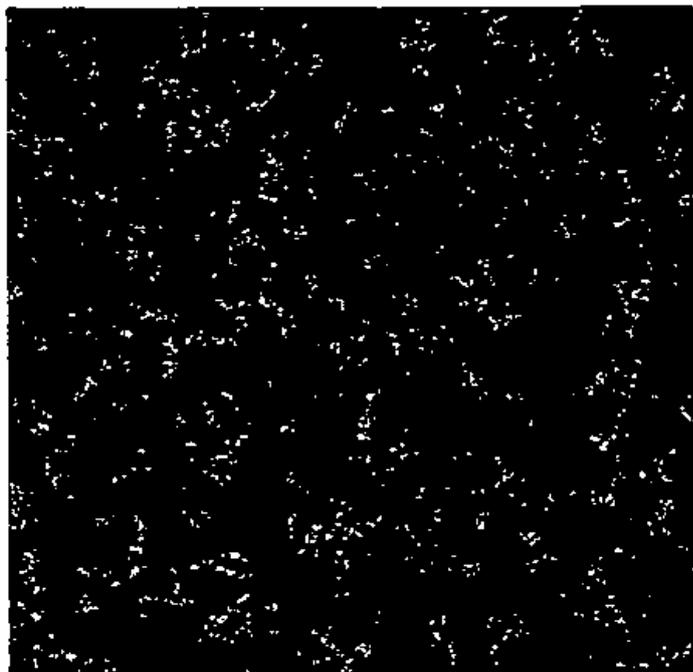


Figura 5



Figura 6