

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 161**

21 Número de solicitud: 201600173

51 Int. Cl.:

B82Y 5/00 (2011.01)

A61L 27/54 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A2

22 Fecha de presentación:

08.03.2016

43 Fecha de publicación de la solicitud:

05.08.2016

71 Solicitantes:

**UNIVERSIDAD DE LAS PALMAS DE GRAN
CANARIA (100.0%)**

**Juan de Quesada, 30
35001 Las Palmas ES**

72 Inventor/es:

**MONZÓN MAYOR, Maximina y
ROMERO ALEMÁN, María del Mar**

54 Título: **Nanofibras híbridas de aloe vera**

57 Resumen:

Abstract.

La presente invención proporciona nanofibras híbridas que comprenden una mezcla de los componentes de un gel de aloe vera y un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA) y polidioxanona (PDS), y donde el diámetro promedio de las nanofibras híbridas está comprendido entre 0,3 y 1,5 micras. Asimismo, la presente invención proporciona un método de fabricación de dichas nanofibras híbridas.

Las nanofibras híbridas de la invención pueden ser usadas en prótesis tubulares de reconexión nerviosa tras axotomía de nervios periféricos, en apósitos y suturas para mejorar la reinervación, y por tanto la recuperación sensitiva, de lesiones en órganos sensoriales como la piel (ej. quemaduras, úlceras, incisiones quirúrgicas, etc.) entre otros.

ES 2 579 161 A2

DESCRIPCIÓN

Nanofibras híbridas de aloe vera.

5 Campo de la invención

La presente invención pertenece al campo de ingeniería tisular. En particular se refiere a la aplicación de nanofibras híbridas de aloe vera para la regeneración nerviosa.

10 Antecedentes de la invención

Tras lesiones traumáticas, el éxito del recrecimiento axonal tanto en el Sistema Nervioso Central (SNC) como en amplios espacios entre cabos nerviosos periféricos, y la reinervación funcional en los tejidos diana consecuencia de lesiones del SNC, nervios periféricos o heridas locales (ej. heridas cutáneas) es actualmente un desafío en el campo de la biomedicina regenerativa. Los nervios periféricos presentan una capacidad de recrecimiento espontánea siempre que se restablezca el contacto entre los cabos nerviosos pues las células de Schwann del cabo nervioso distal ofrecen un microambiente favorable. Sin embargo, la estructura y función de los nervios regenerados difiere de las condiciones normales de salud. Además, la reinervación de los órganos diana suele ser clínicamente decepcionante con importantes y persistentes déficits funcionales.

Hasta ahora el procedimiento estrella para la regeneración de los nervios periféricos consiste en la sustitución de la zona dañada con trasplantes de tejidos autólogos y heterólogos. Sin embargo, éstos presentan importantes limitaciones como la reducida disponibilidad de los primeros y posibilidad de rechazo inmunológico de los últimos. Como alternativa, se ha propuesto el uso de materiales naturales y sintéticos que reproduzcan la organización micrométrica y nanométrica natural de la matriz extracelular de los tejidos sanos y que provean de un microambiente óptimo para la adhesión, crecimiento, proliferación y diferenciación celular.

En la literatura se reconoce la utilidad de polímeros sintéticos tales como poli-3-hidroxi-butarato-co-3-hidroxi-valerato (PHBV) y ácido poli-L-láctico (PLLA) en el recrecimiento axonal [PLLA (Corey *et al.*, J. Biomed. Mater. Res. A 2007, 83(3)636-645; Wang *et al.*, J. Neural Eng. 2009, 6(1), 016001), PHBV (Masaeli *et al.*, 2013, PLoS One 8(2) e57157), Prabhakaran *et al.*, 2013, Biotechnol. Bioeng. 110(10)2775-84)]. Además, I Uslu *et al* (Hacettepe J. Biol. & Chem., 2010, 38(1)) divulga el uso de nanofibras híbridas de aloe vera con polímeros sintéticos de alcohol polivinílico/polivinilpirrolidona/polietilenglicol para vendaje de heridas. Gupta *et al.* (J. Biomater. Tissue Eng., 2013, 3(5) 503-11) divulgan nanofibras híbridas de aloe vera, alcohol polivinilo, óxido de polietileno y carboximetil celulosa. Jithendra *et al.* (ACS Appl. Mater. Interfaces, 2013, 5, 7291-8) divulgan nanofibras de aloe vera, colágeno y quitosano para ingeniería tisular. Shanmugavel *et al.* (J. Biomater. Appl., 2013, 29(1) 46-58) divulgan nanofibras de aloe vera, fibroína de seda y caprolactona para ingeniería de tejido de huesos. Sungaya *et al.*, 2014 divulgan nanofibras de aloe vera, fibroína de seda e hidroxiapatita para osteogénesis. Ninguno de estos documentos menciona estructuras que sean eficientes en el crecimiento y regeneración del tejido nervioso.

Por tanto, existe la necesidad en el estado de la técnica de conseguir nuevas estructuras que sean más eficientes en la regeneración nerviosa, en particular en la reinervación funcional en los tejidos diana, nervios periféricos o heridas locales.

5 Descripción de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar estructuras que permitan la reconexión nerviosa tras axotomía de nervios periféricos y para mejorar la recuperación sensitiva de lesiones en órganos sensoriales como la piel (ej. quemaduras, úlceras, incisiones quirúrgicas, etc.) entre otros, las nanofibras híbridas proporcionadas en la presente invención promueven la regeneración nerviosa sirviendo adicionalmente como soporte estructural para el crecimiento del tejido nervioso. Además, la naturaleza biocompatible de las nanofibras híbridas de la invención evita el rechazo en el organismo.

En un primer aspecto la invención se refiere a nanofibras híbridas que comprenden una mezcla de los componentes de un gel de aloe vera y un polímero sintético, donde el polímero sintético se selecciona de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, y donde el diámetro promedio de las nanofibras híbridas está comprendido entre 0,3 y 1,5 micras.

En un segundo aspecto, la invención se refiere a un procedimiento para la fabricación de las nanofibras híbridas de aloe vera que comprende:

- a) preparar una solución de un gel de aloe vera o de derivados de un gel de aloe vera en un disolvente seleccionado de hexafluoruro-2-propanol, polivinilalcohol (PVA), solución de cloroformo:metanol o mezclas derivadas,
- b) mezclar la solución de gel de aloe vera o de derivados de gel de aloe vera de la etapa a), con un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, para la formación de una solución polimérica híbrida, e
- c) inyectar la mezcla de la etapa b) en un equipo de electrohilado para la fabricación de las nanofibras híbridas de aloe vera por electrohilado.

Asimismo, la invención también se refiere a nanofibras híbridas que comprenden una mezcla de los componentes de un gel de aloe vera y un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, donde las nanofibras híbridas presentan un diámetro promedio comprendido entre 0,3 y 1,5 micras, obtenidas por el procedimiento más arriba mencionado.

En un aspecto, la invención se refiere a las nanofibras híbridas de aloe vera para su uso como medicamento. En otro aspecto adicional, la invención se refiere al uso de las nanofibras híbridas de aloe vera para la fabricación de un medicamento para la regeneración del tejido nervioso de cualquier vertebrado o para promover el crecimiento, proliferación o diferenciación de cualquier tipo celular localizado en cualquier tejido, órgano, o sistema de órganos donde el tejido nervioso este presente. En particular, la regeneración o crecimiento del tejido nervioso en presencia de las nanofibras híbridas de la invención se produce sin requerir la presencia de otros aditivos o factores de crecimiento que promuevan el crecimiento del tejido nervioso.

Además, la invención también se refiere al uso de las nanofibras híbridas para la fabricación de prótesis tubulares, apósitos o suturas, así como a las prótesis tubulares, apósitos o suturas que comprenden las nanofibras híbridas de aloe vera.

5 Descripción de las figuras

Las figuras incluidas en la descripción ilustran realizaciones particulares de la presente invención. Además, en combinación con el texto de la descripción sirven para explicar los principios en los que se basa la invención.

10

Figura 1: Tabla recogiendo las condiciones particulares utilizadas para la formación por electrohilado de nanofibras de polímero sintético, y de nanofibras híbridas de aloe vera en el ejemplo 1 de la invención.

15

Figura 2: Micrografía obtenida por un microscopio electrónico de barrido, de polímeros electrohilados: A. PLLA, B. PLLA + aloe, C. PDS, D. PDS + aloe; E. PHBV; F. PHBV + aloe. Escalas (A-F): 60 μm . Escalas en el recuadro (A-F): 6 μm .

20

Figura 3 Imágenes de inmunofluorescencia de neuronas de explantes del ganglio de raíz dorsal (GRD) de rata cultivadas en presencia de nanofibras alineadas de polímero sintético PHBV (A), y en presencia de las nanofibras alineadas híbridas de PHBV y aloe vera (B) pertenecientes a la invención. La figura 3C es un esquema representativo de las figuras 3A y 3B, que muestra los cuerpos neuronales (estructuras esféricas) y sus prolongaciones nerviosas siguiendo el recorrido de las nanofibras alineadas. Las flechas en las figuras 3A, 3B y 3C indican la ubicación de los conos de crecimiento. Escala (3A y 3B): 200 μm .

25

Exposición detallada de la invención

30

Nanofibras híbridas de aloe vera y polímero sintético

La presente invención se refiere a nanofibras híbridas que comprenden una mezcla de los componentes de un gel de aloe vera y un polímero sintético, donde el polímero sintético se selecciona de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, y donde el diámetro promedio de las nanofibras híbridas está comprendido entre 0,3 y 1,5 micras.

35

En el contexto de la presente invención, las nanofibras híbridas de aloe vera, se refieren a las nanofibras híbridas que comprenden una mezcla de los componentes del gel de aloe vera y un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas.

40

El gel de aloe vera se extrae de la planta del Aloe Vera de la familia de las liliáceas. La planta de Aloe vera es una planta suculenta que contiene más de 75 componentes potencialmente bioactivos tales como vitaminas, enzimas, minerales, azúcares, saponinas, ácidos salicílicos y aminoácidos, entre estos los aminoácidos esenciales usina, treonina, valina, leucina, fenilalanina y metionina. Además, contiene antronas (aloe-emodín, aloína A, aloína B, 8-O-metil-7-hidroxialoína A, 8-O-metil-7-hidroxialoína B y 10-hidroxialoína A), fenil piranas (aloína A y aloína B) y cromonas (aloesin, 8-C-glucosil-7-O-metii-(S)-aloesol, isoaloesin D y aloeresin E). La planta presenta hojas con forma

50

de lanza que contienen el gel de Aloe Vera responsable de proporcionar rigidez a las hojas. La planta de Aloe Vera es una planta de origen tropical o subtropical del género Aloe, que suele requerir para su cultivo temperaturas por encima de los 10°C. En una realización preferida, el gel de aloe vera de las nanofibras híbridas de aloe vera de la invención procede de las plantas de Aloe Vera de las islas Canarias. En otra realización particular, el gel de aloe vera de las nanofibras híbridas de la invención procede de la planta *Aloe Barbadensis Miller*.

El gel de aloe vera suele ser separado de la planta por procedimientos conocidos en el estado de la técnica. Así, por ejemplo US 2016/0015041 divulga un procedimiento que se basa en rebanar las hojas de Aloe Vera y molerlas para la extracción del gel. Otros procedimientos para la extracción del gel se encuentran divulgados en US 3,878,197 o en US4959214.

En el contexto de la invención, el término "los componentes de un gel de aloe vera" se refiere a los componentes presentes en cualquier gel de aloe vera extraído de la planta de Aloe Vera y, en su caso, esterilizado y estabilizado, entre los que se encuentran polisacáridos mucilaginosos ligados a azúcares como glucosa, acemanano, manosa, glucomanosa, ramnosa, xilosa, arabinosa, galactosa, aldopentosa y celulosa; carbohidratos, ácidos, sales orgánicas, enzimas, esteroides, triacilglicéridos, aminoácidos, ARN, trazas de alcaloides, vitaminas y diversos minerales. Algunos documentos del estado de la técnica que divulgan el análisis de la composición de geles de aloe vera son Reynolds *et al.* (Journal of Ethnopharmacology 68 (1999) 3-37) y J. H. Hamman (Molecules, 13(2008)1599-1616).

El gel de aloe vera extraído de la planta se oxida rápidamente al aire, descomponiendo y en muchos casos perdiendo sus propiedades. El gel de aloe vera para poder ser utilizado lejos de su origen debe ser esterilizado y estabilizado una vez separado de la planta. Para la estabilización del gel aloe vera se han descrito diversas tecnologías nuevas como conservación mediante altas presiones hidrostáticas, calentamiento óhmico, pulsos eléctricos, microondas, radiación gamma y ultrasonido. R.N. Domínguez-Fernández (Revista mexicana de Ingeniería Química 11 (2012) 23-43) menciona algunos de los procedimientos conocidos en el estado de la técnica para la estabilización del gel de aloe vera.

Los autores han observado que las nanofibras híbridas de aloe vera de la invención son asimismo biodegradables y biocompatibles. Se cree que estas propiedades se deben a la presencia de los componentes del gel de aloe vera en las nanofibras híbridas.

Las nanofibras híbridas de la invención que comprenden una mezcla de los componentes del gel de aloe vera y un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, presentan un diámetro promedio comprendido entre 0,3 y 1,5 micras, preferiblemente entre 0,5 y 1,5 micras, más preferiblemente entre 0,8 y 1, 5 micras. En una realización preferida, las nanofibras híbridas presentan un diámetro promedio comprendido entre 0,8 y 1,3 micras, preferiblemente entre 0,9 y 1,2 micras, más preferiblemente entre 1 y 1,1 micras. Los inventores han observado que las nanofibras híbridas de aloe vera de la invención presentando los rangos de diámetros indicados sirven como soporte para la adherencia y guía de las células nerviosas en el crecimiento axonal durante un proceso regenerativo, y de cicatrización de cualquier tejido u órgano que presente estructuras nerviosas. En este sentido, las nanofibras híbridas de la

presente invención son particularmente útiles como soporte para la regeneración axonal en el sistema nervioso periférico (SNP) y en el sistema nervioso central (SNC). Además, los inventores de la presente invención han observado que las nanofibras híbridas de aloe vera de la invención consiguen el crecimiento de neuritas regeneradas de mayor longitud que en presencia de las nanofibras sintéticas de polímeros sintéticos, a igualdad de tiempo de acción, y sin necesidad de suplementos de factores de crecimiento.

Por otra parte, los inventores han comprobado que la presencia de los componentes de un gel de aloe vera en las nanofibras híbridas puede en ciertos casos reducir el diámetro de las nanofibras de polímero sintético preparadas en las mismas condiciones. Así, las nanofibras híbridas de aloe vera/PDS presentan menor diámetro que las nanofibras de PDS preparadas en las mismas condiciones, como se muestra en las figuras 2C y 2D. Este mismo efecto también ha sido observado en las nanofibras híbridas de aloe vera/PLLA (figuras 2A y 2B). En contraste, el diámetro de las nanofibras de aloe vera/PHBV apenas varía con respecto al de las nanofibras de PHBV. Wang *et al.* (Acta Biomater., 2010, 6(8) 2970-2978) divulga que el diámetro de las nanofibras sintéticas de PLLA influye en el crecimiento nervioso. Los inventores de la presente invención han observado que las nanofibras híbridas PHBV/aloe vera mejoran el crecimiento nervioso con respecto a las PHBV puras presentando el mismo diámetro. La figura 3 muestra el crecimiento de las terminaciones nerviosas en presencia de nanofibras híbridas alineadas de Aloe Vera/PHBV de la invención (Figura 3A) y en presencia de nanofibras alineadas de polímero sintético de PHBV (Figura 3B). Las imágenes muestran que el crecimiento de las terminaciones nerviosas es sorprendentemente superior en presencia de las nanofibras híbridas de la invención.

En una realización particular, las nanofibras híbridas de la invención contienen entre 3 y 5% de gel de aloe vera y entre 10 y 12% de polímero sintético, donde el polímero sintético se selecciona de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, y presentan un diámetro promedio de las nanofibras híbridas comprendido entre 0,3 y 1,5 micras. Preferiblemente, las nanofibras híbridas contienen 4% en peso de componentes de un gel de aloe vera y 11% en peso de polímero sintético.

En una realización particular, las nanofibras híbridas de la invención contienen entre 3 y 5% en peso de los componentes de un gel de aloe vera y entre 10 y 12% de un polímero sintético, donde el polímero sintético se selecciona de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, y donde las nanofibras híbridas presentan un diámetro promedio comprendido entre 0,8 y 1,5 micras. Preferiblemente, las nanofibras híbridas contienen 4% en peso de componentes de un gel de aloe vera y 11% en peso de polímero sintético.

En una realización particular, la relación en peso de los componentes de un gel de aloe vera y polímero sintético en las nanofibras híbridas de la invención está comprendida entre 17:83 y 33:67. Preferiblemente, la relación en peso de los componentes de un gel de aloe vera/ polímero sintético está comprendida entre 20:80 y 30:70, más preferiblemente entre 23:77 y 27:73. En una realización preferida, la relación en peso de los componentes de un gel de aloe vera/ polímero sintético está comprendida entre 24:76 y 26:74.

En otra realización, las nanofibras híbridas de la invención pueden estar alineadas, es decir orientadas en una misma dirección, o bien desordenadas, es decir orientadas en distinta dirección unas respecto a otras. Preferiblemente, las nanofibras híbridas de la

invención están alineadas. Los autores de la presente invención han observado que cuando las nanofibras híbridas de la invención están alineadas, se produce un mayor crecimiento nervioso.

En una realización particular, las nanofibras híbridas de la invención comprenden una mezcla de los componentes de un gel de aloe vera obtenido de la planta *Aloe Barbadensis Miller*, y poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), donde dichas nanofibras híbridas presentan un diámetro promedio entre 0,8 y 1,5 micras, y donde las nanofibras están alineadas en una determinada dirección.

En otra realización particular, las nanofibras híbridas comprenden una mezcla de los componentes de un gel de aloe vera obtenido de la planta *Aloe Barbadensis Miller*, y ácido poli-L-láctico (PLLA), donde las nanofibras híbridas presentan un diámetro promedio entre 0,8 y 1,5 micras y están alineadas en una determinada dirección.

En otra realización particular, las nanofibras híbridas comprenden una mezcla de los componentes de un gel de aloe vera obtenido de la planta *Aloe Barbadensis Miller*, y polidioxanona (PDS), donde las nanofibras híbridas presentan un diámetro promedio entre 0,8 y 1,5 micras y están alineadas en una determinada dirección.

Procedimiento de fabricación de las nanofibras híbridas de aloe vera y polímero sintético

En un aspecto, la invención se refiere al procedimiento para la fabricación de las nanofibras híbridas que comprende:

- a) preparar una solución de un gel aloe vera o de derivados de un gel de aloe vera en un disolvente seleccionado de hexafluoruro-2-propanol, polivinilalcohol (PVA), solución de cloroformo:metanol o mezclas derivadas.
- b) mezclar la solución de gel de aloe vera o de derivados de gel de aloe vera de la etapa a), con un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, para la formación de una solución polimérica híbrida, e
- c) inyectar la mezcla de la etapa b) en un equipo de electrohilado para la fabricación de las nanofibras híbridas de aloe vera por electrohilado.

Según el procedimiento más arriba descrito, en la etapa a) se prepara una solución de un gel de aloe vera o derivados de un gel de aloe vera, en hexafluoruro-2-propanol (HFIP), polivinilalcohol (PVA), solución de cloroformo:metanol o mezclas derivadas. Dicha solución suele presentar una concentración de 25 a 50 mg/ml de gel de aloe vera. En una realización particular el disolvente de la solución de aloe vera es una solución de cloroformo: metanol con una relación en volumen 3:1.

El gel de aloe vera utilizado en la presente invención puede tener diferentes orígenes. No obstante, se prefiere el uso del gel de aloe vera de las islas Canarias. En una realización particular, el gel de aloe vera de las nanofibras híbridas de la invención procede de la planta *Aloe Barbadensis Miller*.

En el contexto de la presente invención, el término "derivados de gel de aloe vera" se refiere a las distintas formas en las que se puede presentar el gel aloe vera, tales como liofilizado del gel, jugo del gel, extracto de la planta, solución del gel, o en solución sin aloína y/o con alta concentración en acemanano. En una realización particular, los

Los denominados "componentes de un gel de aloe vera" están presentes en todos los derivados de gel de aloe vera.

En la etapa b) del procedimiento descrito más arriba, la solución del gel de aloe vera o de derivados del gel de aloe vera de la etapa a) se mezcla con un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, para la formación de una solución polimérica híbrida.

En una realización particular, la solución polimérica híbrida contiene gel de aloe vera obtenido de la planta *Aloe Barbadensis Miller*, y el polímero sintético es poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV).

En una realización preferida, la relación en peso del gel de aloe vera y polímero sintético en la solución polimérica híbrida de la etapa b) está comprendida entre 17:83 y 33:67. La relación en peso de gel de aloe vera y polímero sintético influye en el diámetro promedio de las nanofibras híbridas. Generalmente, el diámetro de las nanofibras es mayor cuando aumenta la concentración del polímero sintético en la solución. Preferiblemente, la relación en peso de gel de aloe vera/polímero sintético en la solución polimérica híbrida de la etapa b) esta comprendida entre 20:80 y 30:70, más preferiblemente entre 23:77 y 27:73. En una realización preferida, la relación en peso de gel de aloe vera/polímero sintético está comprendida entre 24:76 y 26:74.

En la etapa c) del procedimiento de la invención se inyecta la mezcla de la etapa b) en un equipo de electrohilado para la fabricación de las nanofibras híbridas de aloe vera por electrohilado. En general, el proceso de electrohilado esta afectado por parámetros del sistema tales como peso molecular del polímero, distribución de peso molecular y propiedades de la disolución tales como viscosidad, y tensión superficial. Además, el proceso de electrohilado puede estar afectado por parámetros del proceso tales como la velocidad de flujo, el potencial eléctrico, la distancia entre el capilar y el colector, etc. Estos parámetros son optimizados para controlar las características de las nanofibras obtenidas.

En el equipo de electrohilado la mezcla se carga en una bomba de jeringas conectada a un electrodo. La solución es propulsada a una velocidad de flujo de entre 0,7 y 1,2 ml/h, preferiblemente a una velocidad de flujo entre 0,8 y 1 ml/h, más preferiblemente entre 0,9 y 1 ml/h; y aplicando un potencial de 10 a 15 kV, preferiblemente de 11 a 14 kV, más preferiblemente de 12 a 13 kV, desde la jeringa hacia una rueda colectora en rotación. La rueda colectora de rotación puede girar a una velocidad de entre 2000 y 4000 rpm. En una realización particular, la velocidad de rotación de la rueda colectora esta comprendida entre 3000 y 3500 rpm. En particular, cuando la velocidad de rotación se encuentra comprendida entre 3000 y 3500 rpm, las nanofibras híbridas que se obtienen están alineadas. La rueda colectora de rotación se encuentra situada a una distancia de 8

a 12 cm de la bomba de jeringas, preferiblemente a una distancia de 9 a 11 cm de la bomba de jeringas, más preferiblemente a una distancia de 10 cm de la bomba de jeringas. Las condiciones utilizadas en el electrohilado son condiciones ambientales de 60-70% de humedad y 20-30°C de temperatura. La figura 1 de la presente solicitud muestra a modo de ejemplo las condiciones utilizadas para la fabricación de nanofibras de polímero sintético y para la fabricación de las nanofibras híbridas de la invención por electrohilado según la etapa e) del procedimiento de la invención en condiciones ambientales de $25\pm 1^\circ\text{C}$ y con una humedad constante relativa de $65\pm 5\%$.

En otro aspecto adicional, la invención se refiere a las nanofibras híbridas que comprenden una mezcla de los componentes del gel de aloe vera y un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, donde las nanofibras híbridas presentan un diámetro promedio comprendido entre 0,3 y 1,5 micras, obtenidas por el procedimiento de la invención más arriba descrito. Las figuras 28, 20 y 2F muestran las micrografías SEM de nanofibras híbridas pertenecientes a la invención obtenidas por el procedimiento descrito.

Las nanofibras híbridas de aloe vera de la presente invención pueden ser utilizadas para aplicaciones de ingeniería tisular, en particular para la regeneración del tejido nervioso. Así, un aspecto de la invención se refiere al uso de las nanofibras híbridas para la fabricación de un medicamento para la regeneración del tejido nervioso de cualquier vertebrado o para promover el crecimiento, proliferación o diferenciación de cualquier tipo celular localizado en cualquier tejido, órgano, o sistema de órganos donde el tejido nervioso esté presente.

En un aspecto, la invención se refiere a las nanofibras híbridas de aloe vera de la invención para su uso como medicamento.

En otro aspecto, la invención se refiere al uso de las nanofibras híbridas de aloe vera para la fabricación de un medicamento para la regeneración del tejido nervioso de cualquier vertebrado o para promover el crecimiento, proliferación o diferenciación de cualquier tipo celular localizado en cualquier tejido, órgano, o sistema de órganos donde el tejido nervioso esté presente.

En otro aspecto, la invención se refiere a las nanofibras híbridas de aloe vera de la invención para su uso en el tratamiento de regeneración del tejido nervioso de cualquier vertebrado, o de crecimiento, proliferación o diferenciación de cualquier tipo celular localizado en cualquier tejido, órgano, o sistema de órganos donde el tejido nervioso esté presente.

En una realización particular las nanofibras híbridas de aloe vera de la invención son usadas para la fabricación de un medicamento para la regeneración del tejido nervioso de cualquier vertebrado o para promover el crecimiento, proliferación o diferenciación de cualquier tipo celular localizado en cualquier tejido, órgano, o sistema de órganos donde el tejido nervioso esté presente, en ausencia de cualquier otro aditivo o factor de crecimiento que promueva la regeneración del tejido nervioso.

En particular, las nanofibras híbridas de aloe vera de la invención pueden ser utilizadas para la regeneración de tejido nervioso en prótesis de conexión nerviosa, apósitos y suturas en heridas cutáneas. En este sentido, un aspecto de la invención se refiere a una

prótesis tubular que comprende las nanofibras híbridas de aloe vera de la invención. Otro aspecto de la presente invención se refiere a apósitos que comprenden las nanofibras híbridas de aloe vera de la invención. Otro aspecto adicional, se refiere a las suturas que comprenden las nanofibras híbridas de la invención.

5

Asimismo, las nanofibras híbridas de aloe vera de la invención también pueden ser utilizadas para la regeneración de otros tejidos, tales como tejidos de tendones, ligamentos y huesos.

10 Nanofibras híbridas de miel y polímero sintético

Otras nanofibras híbridas comprenden una mezcla de componentes de una miel de abejas y un polímero sintético, donde el polímero sintético se selecciona de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS), poliuretanos termoplásticos biodegradables de uso médico, policaprolactona (PCL), alcohol polivinilo (PVA), poliactida co-glicólido (PLGA), polihidroxiálcanoatos (PHAs), carbonato de polipropileno (PPC) y mezclas derivadas. En una realización particular, las nanofibras híbridas de miel pueden comprender una mezcla de componentes de miel y poliuretanos termoplásticos biodegradables de uso médico tales como Z3A1 o Z9A1 (Biomer Technology L TD), DegraPol® (poliéster uretano formado por dos poliéster diales unidos por un grupo isocianato) o Desmopan® 9370A (éter de 4 átomos de carbono) de Bayer.

En una realización preferida, las nanofibras híbridas de miel y polímero sintético comprenden una mezcla de los componentes de una miel de abejas y un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas.

La miel es producida por las abejas a partir del néctar de las flores o de secreciones de partes vivas de plantas o de excreciones de insectos chupadores de plantas. La miel de abejas se extrae directamente del panal de abejas y es conservada en un recipiente estéril a 8°C antes de la formación de las nanofibras híbridas.

Para la preparación de las nanofibras híbridas de miel, la miel utilizada puede ser cualquier tipo de miel. En particular, la miel utilizada puede ser miel de flores tal como miel monofloral, multifloral, de sierra, de montaña o del desierto. La miel de las nanofibras híbridas también puede ser miel de mielada, roela de miel, miel de rocío o miel de bosque.

En general, la composición de la miel conocida en el estado de la técnica comprende los siguientes componentes:

- 14-22% en peso de agua,
- 28-44% en peso de fructosa,
- 22-40% en peso de glucosa,
- 0,2-7% en peso de sacarosa,
- 2-16% en peso de maltosa,

- 0,1-8% en peso de otros azúcares,
- 0,2-2% en peso de proteínas y aminoácidos,
- 5 - 0,5-1% en peso de vitaminas, enzimas, hormonas y ácidos orgánicos,
- 0,5-1% en peso de minerales, y
- 0,2-1% en peso de cenizas.

10

En una realización particular la composición de la miel comprende:

- 18% en peso de agua,
- 15 - 38% en peso de fructosa,
- 31% en peso de glucosa,
- 1% en peso de sacarosa,
- 20 - 7,5% en peso de maltosa, y
- 5% en peso de otros azúcares.

25

La miel utilizada por los inventores procede de un apicultor local de Gran Canaria inscrito en el Registro General Sanitario de Empresas Alimentarias y Alimentos (RGSEAA): María del Rosario Cazarla López, N° RGSEAA: 23.03229/GC.

30

En una realización particular, las nanofibras híbridas de miel que comprenden una mezcla de los componentes de una miel y un polímero sintético, contienen entre 5 y 10% en peso de los componentes de una miel y 10% en peso de un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS), policaprolactona (PCL), alcohol polivinilo (PVA), polilactida co-glicólido (PLGA), polihidroxialcanoatos (PHAs), carbonato de polipropileno (PPC) y poliuretanos termoplásticos biodegradables de uso médico tales como Z3A1 o Z9A1 (Biomer Technology LTD), DegraPol® (poliéster uretano formado por dos poliéster diales unidos por un grupo isocianato, Desmopan® 9370A (éter de 4 átomos de carbono) de Bayer o mezclas derivadas. Preferiblemente, las nanofibras híbridas contienen entre 6 y 8% en peso de una miel y 10% en peso de un polímero sintético.

40

En una realización particular la relación en peso de los componentes de miel y polímero sintético en las nanofibras híbridas de la invención está comprendida entre 33:67 y 50:50. Preferiblemente, la relación en peso de los componentes de miel y polímero sintético está comprendida entre 35:65 y 48:52, preferiblemente entre 37:62 y 46:54, más preferiblemente entre 40:80 y 45:55. En una realización preferida, la relación en peso miel/ polímero sintético está comprendida entre 42:58 y 44:58.

45

50

En una realización particular las nanofibras híbridas de miel y polímero sintético de la invención presentan un diámetro aproximado de entre 0,3 y 1,5 micras, preferiblemente entre 0,5 y 1,3, más preferiblemente entre 0,7 y 1,2. En otra realización, las nanofibras híbridas de miel y polímero sintético de la invención presentan un diámetro aproximado

de entre 0,8 y 1,1 micras, preferiblemente entre 0,9 y 1 micra. Las nanofibras híbridas de miel, al igual que las nanofibras híbridas de aloe vera, sirven como soporte para la adherencia y guía de las células nerviosas en el crecimiento axonal en un proceso regenerativo y de cicatrización de cualquier tejido u órgano que presente estructuras nerviosas. En particular, las nanofibras híbridas de miel de la presente invención sirven como soporte para la regeneración axonal en el sistema nervioso periférico (SNP) y sistema nervioso central (SNC).

En otra realización, las nanofibras híbridas de miel de la invención pueden estar alineadas, es decir orientadas en una misma dirección, o bien desordenadas, es decir orientadas en distinta dirección unas respecto a otras. Preferiblemente, las nanofibras híbridas de miel de la invención están alineadas.

En una realización particular, las nanofibras híbridas de miel que comprenden una mezcla de componentes de una miel, y poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), presentan un diámetro promedio entre 0,8 y 1,5 micras y están alineadas en una determinada dirección.

En otra realización particular, las nanofibras híbridas de miel que comprenden una mezcla de componentes de una miel, y ácido poli-L-láctico (PLLA), presentan un diámetro promedio entre 0,8 y 1,5 micras y están alineadas en una determinada dirección.

En otra realización particular, las nanofibras híbridas de miel que comprenden una mezcla de componentes de una miel, y polidioxanona (PDS), presentan un diámetro promedio entre 0,8 y 1,5 micras y están alineadas en una determinada dirección.

Procedimiento de fabricación de las nanofibras híbridas de miel y polímero sintético

Las nanofibras híbridas de miel y polímero sintético de la invención pueden ser obtenidas por un procedimiento de fabricación similar al utilizado para la fabricación de las fibras híbridas de aloe vera y polímero sintético. El procedimiento para la fabricación de las nanofibras híbridas de miel comprende:

- a) preparar una solución de una miel en un disolvente seleccionado de hexafluoruro-2-propanol, polivinilalcohol (PVA), ácido acético 1% y ácido trifluoroacético (TFA).
- b) mezclar la solución de miel de la etapa a), con un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS), poliuretanos termoplásticos biodegradables de uso médico, policaprolactona (PCL), poliactida co-glicólido (PLGA), polihidroxiálcanoatos (PHAs), carbonato de polipropileno (PPC), poliuretanos termoplásticos biodegradables de uso médico tales como Z3A1 o Z9A1, DegraPol® o Desmopan® 9370A y mezclas derivadas, para la formación de una solución polimérica híbrida, e
- c) inyectar la mezcla de la etapa b) en un equipo de electrohilado para la fabricación de las nanofibras híbridas de miel por electrohilado.

Según el procedimiento más arriba descrito, en la etapa a) se prepara una solución de miel, en hexafluoruro-2-propanol (HFIP), polivinilalcohol (PVA), ácido acético 1% y ácido

trifluoroacético (TFA). Dicha solución suele presentar una concentración de 50 a 100 mg/ml de miel.

En la etapa b) del procedimiento descrito más arriba, la solución de miel de la etapa a) se mezcla con un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxisalicyrato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS), policaprolactona (PCL), poliactida co-glicólido (PLGA), polihidroxiálcanoatos (PHAs), carbonato de polipropileno (PPC), poliuretanos termoplásticos biodegradables de uso médico tales como Z3A 1 o Z9A1, DegraPol® o Desmopan® 9370A y mezclas derivadas, para la formación de una solución polimérica híbrida.

En una realización particular, la relación en peso de la miel y el polímero sintético en la solución polimérica híbrida se encuentra comprendida entre 33:67 y 50:50 (miel: polímero sintético). Preferiblemente, la relación en peso miel/polímero sintético en la solución polimérica híbrida está comprendida entre 35:65 y 48:52, preferiblemente entre 37:62 y 46:54, más preferiblemente entre 40:60 y 45:55. En una realización preferida, la relación en peso miel/polímero sintético en la solución polimérica híbrida está comprendida entre 42:58 y 44:56.

En la etapa c) del procedimiento de la invención, la mezcla de la etapa b) se inyecta en un equipo de electrohilado para la fabricación de las nanofibras híbridas de miel por electrohilado. En particular, la mezcla se carga en una bomba de jeringas conectada a un electrodo. La solución es propulsada a una velocidad de flujo de entre 2 y 3 ml/h, preferiblemente a una velocidad de flujo entre 2,5 y 3 ml/h, más preferiblemente entre 2,5 y 2,8 ml/h; y aplicando un potencial de 7 a 11 kV, preferiblemente de 8 a 10 kV, más preferiblemente de 8 a 9 kV, desde la jeringa hacia una rueda colectora en rotación. La rueda colectora de rotación puede girar a una velocidad de entre 2000 y 4000 rpm, preferiblemente de 3000 rpm. La rueda colectora de rotación se encuentra situada a una distancia de 8 a 12 cm de la bomba de jeringas, preferiblemente a una distancia de 9 a 11 cm de la bomba de jeringas, más preferiblemente a una distancia de 10 cm de la bomba de jeringas. Las condiciones utilizadas en el electrohilado son condiciones ambientales de 60-70% de humedad y 20-25°C de temperatura.

Las nanofibras híbridas obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito comprenden una mezcla de componentes de miel y un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxisalicyrato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA) y polidioxanona (PDS), policaprolactona (PCL), poliactida co-glicólido (PLGA), polihidroxiálcanoatos (PHAs), carbonato de polipropileno (PPC), poliuretanos termoplásticos biodegradables de uso médico tales como Z3A1 o Z9A1, DegraPol® o Desmopan® 9370A y mezclas derivadas, donde las nanofibras híbridas presentan un diámetro promedio comprendido entre 0,3 y 1,5 micras. En una realización preferida, las nanofibras híbridas obtenidas por el procedimiento anteriormente descrito comprenden una mezcla de miel y un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxibutirato-co-3-hidroxisalicyrato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas.

Las nanofibras híbridas de miel pueden ser utilizadas para aplicaciones de ingeniería tisular, en particular para la regeneración del tejido nervioso. Asimismo, las fibras híbridas de miel pueden ser utilizadas en vendajes y apósitos para cubrir heridas.

La invención se refiere a las nanofibras híbridas de miel de la invención para su uso como medicamento. Asimismo, la invención se refiere a las nanofibras híbridas de miel para su uso en el tratamiento de regeneración del tejido nervioso de cualquier vertebrado, o de crecimiento, proliferación o diferenciación de cualquier tipo celular localizado en cualquier tejido, órgano, o sistema de órganos donde el tejido nervioso esté presente.

Ejemplos

1. Preparación de fibras híbridas alineadas de aloe vera y polímero sintético

Inicialmente, se preparó una solución de 25-50 mg/ml de aloe vera (Prod. nº 001, laboratorios Luciano Reverón e hijos S.L., Tenerife) en Hexafluoro-2-propanol (HFIP). Para obtener la solución híbridas (AV/PHBV) se añadió 10-12% (w/w) de PHBV (Sigma-Aldrich, Prod. nº 403121) a la solución anterior. Para obtener nanofibras alineadas mediante la técnica de electrospinning, la solución polimérica híbrida se cargó en una bomba de jeringas (Hardvard Apparatus PhO Ultra) con una aguja (G20, 0,9 mm diámetro) cuya punta se conectó a un electrodo (spinnerette). Se aplicó 12-15 Kv con una fuente de alto voltaje (Spellman 60N300) mientras la bomba de jeringas disparaba la solución (velocidad de flujo de 0,9 ml/h) en condiciones ambientales de 60-65% humedad y de 22-25°C de temperatura hacia una rueda diana (90 mm diámetro/12mm grosor) situada a 12 cm del electrodo. En la rueda diana rotando a 3000 rpm se recolectaron los haces de nanofibras alineadas. En la figura 2 se muestra las micrografías SEM de las nanofibras obtenidas.

Además, las figuras 1 A-E muestran las micrografías SEM de las fibras alineadas obtenidas por el procedimiento de la invención de los polímeros sintéticos PLLA (Fig. 2A), PDS (Fig. 2C) y PHBV (Figura 2E); así como de las fibras híbridas de aloe vera de la invención de PLLA + Aloe vera (Fig. 2B); PDS + Aloe Vera (Figura 2D).

2. Ensayos comparativos del crecimiento neurítico

Se realizaron ensayos comparativos a partir del cultivo de explantes del ganglio de la raíz dorsal (GRD) de rata neonatal (Sprague Dawley) en a) medio de cultivo standard [DMEM/F12 (1:1)] para establecer las condiciones control y b) DMEM/F12 (1:1) conteniendo la matriz nanométrica híbrida inventada (AV/PHBV) y otras puras de referencia (PHBV y PLLA) como sustrato experimental del crecimiento neurítico. Los explantes de GRD de rata se incubaron en estufa a 37°C y atmosfera con 5% CO₂ durante 6 días y renovación del medio de cultivo a los 3 días.

Pasado el periodo de incubación, los explantes de GRD de rata se fijaron con una solución de 4% paraformaldehído en tampón fosfato salino y se inmunomarcaron anticuerpos específicas para la identificación de neuronas. Posteriormente se tomaron imágenes digitales en un microscopio de fluorescencia dotado con sistema de captación de imágenes. Las imágenes fueron procesadas para su análisis estadístico.

Se realizó un análisis estadístico en cada uno de los polímeros resumiendo las relaciones de área positivas por medianas y rangos intercuartiles en cada uno de los grupos de tratamiento. Los análisis estadísticos demostraron que la mayor tasa de crecimiento neurítico se produjo con las nanofibras híbridas alineadas AV/PHBV en comparación con la ausencia de aloe en nanofibras alineadas PHBV puras ($p < 0.001$) y PLLA puras ($p = 0.049$).

REIVINDICACIONES

1. Nanofibras híbridas que comprenden una mezcla de los componentes de un gel de aloe vera y un polímero sintético, donde el polímero sintético se selecciona de poli-3-hidroxi-
5 3-hidroxi-
butirato-co-3-hidroxi-
valerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, y donde el diámetro promedio de las nanofibras híbridas está comprendido entre 0,3 y 1,5 micras.
2. Las nanofibras híbridas según la reivindicación 1, donde las nanofibras híbridas
10 presentan un diámetro promedio comprendido entre 0,8 y 1,5 micras.
3. Las nanofibras híbridas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, donde las nanofibras híbridas comprenden entre 3 y 5% en peso de los componentes del aloe vera, y entre 10 y 12% de polímero sintético.
15
4. Las nanofibras híbridas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde el gel de aloe vera se obtiene de la planta *Aloe Barbadensis Miller*.
5. Las nanofibras híbridas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, donde dichas
20 nanofibras se encuentran alineadas en una determinada dirección.
6. Las nanofibras híbridas según la reivindicación 1, donde dichas nanofibras comprenden una mezcla los componentes de un gel de aloe vera obtenido de la planta *Aloe Barbadensis Miller* y poli-3-hidroxi-
25 3-hidroxi-
butirato-co-3-hidroxi-
valerato (PHBV), donde dichas nanofibras híbridas presentan un diámetro promedio entre 0,8 y 1,5 micras y donde las nanofibras están alineadas en una determinada dirección.
7. Procedimiento para la fabricación de las nanofibras híbridas según las reivindicaciones 1 a 6 que comprende:
30
 - a) preparar una solución de un gel de aloe vera o de derivados de un gel de aloe vera en un disolvente seleccionado de hexafluoruro-2-propanol, polivinilalcohol (PVA), solución de cloroformo:metanol o mezclas derivadas,
 - 35 b) mezclar la solución del gel de aloe vera o de derivados del gel de aloe vera de la etapa a), con un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxi-
butirato-co-3-hidroxi-
valerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, para la formación de una solución polimérica híbrida, e
 - 40 c) inyectar la mezcla de la etapa b) en un equipo de electrohilado para la fabricación de las nanofibras híbridas de aloe vera por electrohilado.
8. El procedimiento según la reivindicación 7, donde los derivados del gel de aloe vera en la etapa a) se seleccionan de liofilizado del gel, jugo del gel, extracto de la planta,
45 solución del gel, o en solución sin aloína y/o con alta concentración en acemanano.
9. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 o 8, donde en la etapa b) la relación en peso del gel de aloe vera y del polímero sintético está comprendida entre 17:83 y 33:67.
50

10. El procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 donde el gel de aloe vera se obtiene de la planta *Aloe Barbadensis Miller* y el polímero sintético es poli-3-hidroxi-3-butanato-co-3-hidroxi-3-valerato (P HBV).

- 5 11. Nanofibras híbridas que comprenden una mezcla de los componentes de un gel de aloe vera y un polímero sintético seleccionado de poli-3-hidroxi-3-butanato-co-3-hidroxi-3-valerato (PHBV), ácido poli-L-láctico (PLLA), polidioxanona (PDS) y mezclas derivadas, donde las nanofibras híbridas presentan un diámetro promedio comprendido entre 0,3 y 1,5 micras, obtenidas por el procedimiento según las reivindicaciones 7 a 10.
- 10 12. Nanofibras híbridas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 11 para su uso como medicamento.
- 15 13. Uso de las nanofibras híbridas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 11, para la fabricación de un medicamento para la regeneración del tejido nervioso de cualquier vertebrado o para promover el crecimiento, proliferación o diferenciación de cualquier tipo celular localizado en cualquier tejido, órgano, o sistema de órganos donde el tejido nervioso esté presente.
- 20 14. Uso de las nanofibras híbridas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 11 para la fabricación de prótesis tubulares, apósitos y suturas.
- 25 15. Prótesis tubular que comprende las nanofibras híbridas según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y 11.
16. Apósito que comprende las nanofibras híbridas según las reivindicaciones 1 a 6 y 11.
17. Sutures que comprende las nanofibras híbridas según las reivindicaciones 1 a 6 y 11.

Código	Polímero	Voltaje aplicado (KV)	Distancia a rueda colectora (cm)	Velocidad de flujo (ml/h)	Velocidad rotatoria de rueda colectora (rpm)
A	PLLA	11	11	1.2	3.500
B	PDS	15	11	1.9	3.500
C	PHBV	12	13	0.8	3.000
D	PLLA + Aloe Liofilizado (50mg/ml)	12	12	1.0	3.000
E	PDS + Aloe Liofilizado (50mg/ml)	14	12	0.7	3.000
F	PHBV + Aloe Liofilizado (50mg/ml)	12	12	0.8	3.000

Figura 1

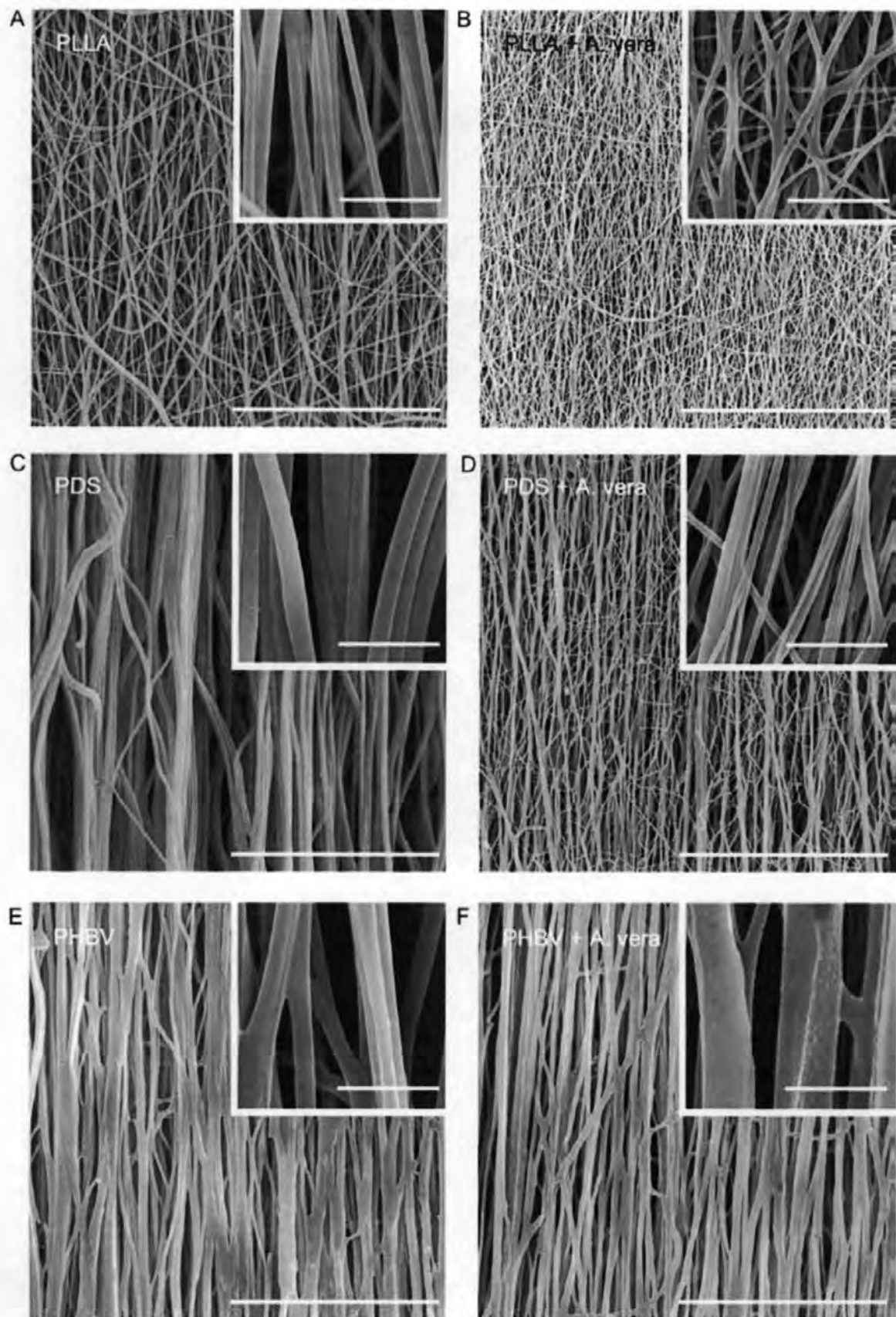


Figura 2

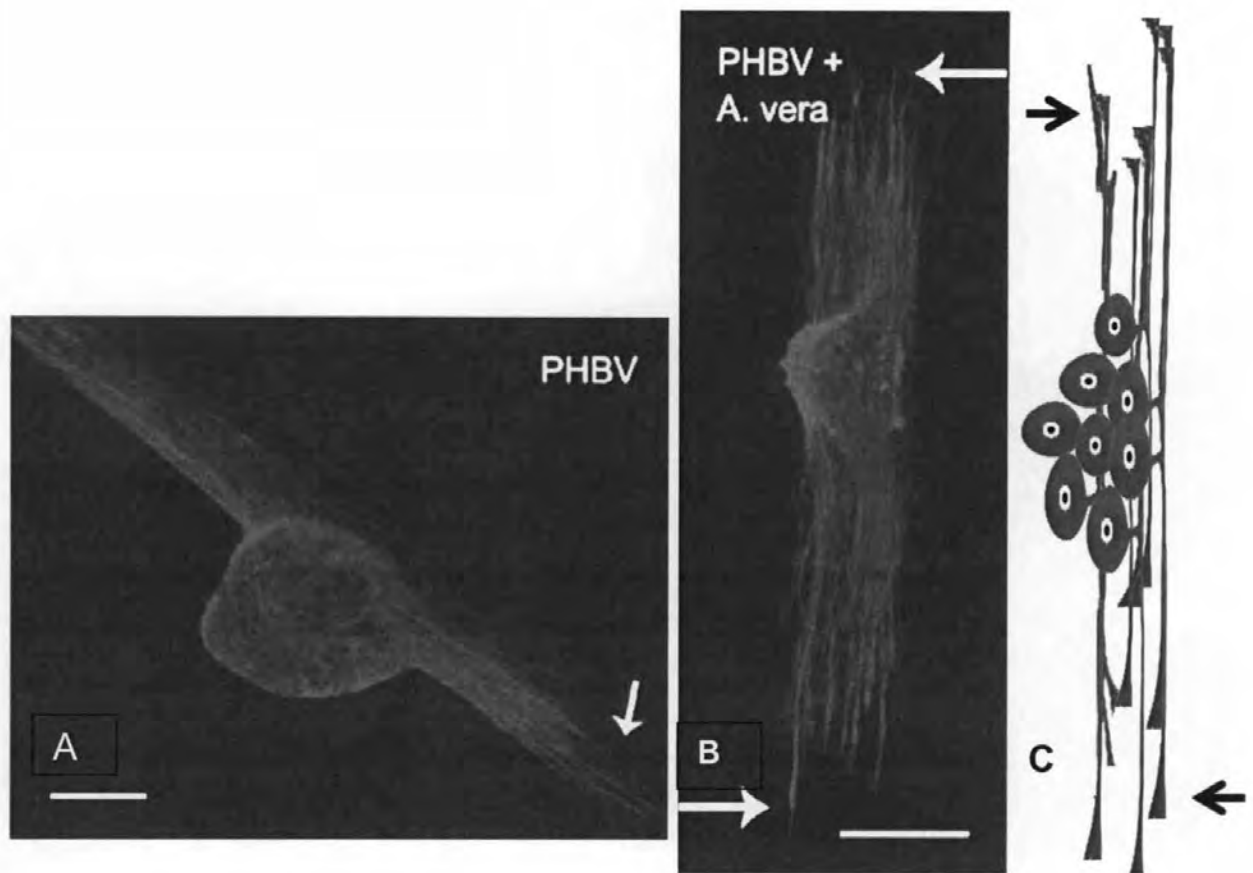


Figura 3