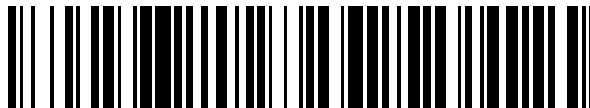


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 639 424**

51 Int. Cl.:

A61F 2/24 (2006.01)

A61L 27/36 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.12.2011 PCT/CN2011/083987**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.05.2013 WO13063842**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.12.2011 E 11875085 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.07.2017 EP 2774630**

54 Título: **Método para preparar válvula biológica artificial rigidizada en el borde**

30 Prioridad:

01.11.2011 CN 201110339534

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

26.10.2017

73 Titular/es:

**SHANGHAI MICROPORT CARDIOFLOW
MEDTECH CO., LTD. (100.0%)
501 Newton Road, Z.J. Hi-Tech Park
Shanghai 201203, CN**

72 Inventor/es:

**CHEN, DAKAI;
LI, YU;
TIAN, CONG;
FANG, YUAN;
DONG, JIAOMING;
CHEN, CHENG;
CHENG, XIULAN;
CHEN, GUOMING;
YUE, CHENGYUN y
LUO, QIYI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 639 424 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

Método para preparar válvula biológica artificial rigidizada en el borde

Campo técnico

5 La presente invención se refiere al campo de dispositivos médicos. En particular, la presente invención se refiere a un método para preparar una válvula (película) biológica artificial rigidizada en el borde.

Antecedentes

10 El desarrollo de una válvula (cardíaca) biológica artificial ha sido uno de los temas de investigación en el campo de la cirugía cardíaca. Una válvula biológica artificial ideal debe cumplir los siguientes criterios: una buena durabilidad y biocompatibilidad, un comportamiento hemodinámico que sea parecido al exhibido por una válvula fisiológica, un daño mínimo a las células sanguíneas, facilidad de implante, resistencia a la infección, no inmunogenicidad, etc.

Una válvula (película) biológica artificial mínimamente invasiva incluye una válvula biológica expandible por balón y una válvula biológica autoexpandible.

15 La válvula biológica expandible por balón es una válvula biológica artificial que se fija sobre un estent plásticamente deformable. La válvula se fija al globo comprimiendo radialmente el estent. Después de haber aplicado la válvula en la válvula aórtica mediante intervención mínimamente invasiva, se expande el estent y se fija aplicando presión al balón. Una válvula biológica expandible por balón de este tipo presenta el siguiente inconveniente y problema: durante el proceso de compresión del estent y expansión del balón, la estructura tisular de la valva de la válvula biológica sufrirá un daño considerable, lo que afecta gravemente a la vida útil de la válvula cardíaca tras su implante. Además, el tamaño del estent para la válvula cardíaca lo determina el diámetro del balón. Si el tamaño seleccionado es demasiado pequeño, cabe el riesgo de laxitud o desplazamiento de la válvula, y por lo tanto se debe realizar una expansión secundaria del balón; y si el tamaño seleccionado es demasiado grande, existe el riesgo de desgarrar el anillo aórtico, lo que origina la aparición de complicaciones adicionales. En cuanto a dicha válvula cardíaca, no se puede reajustar el balón una vez que se ha expandido, y la colocación incorrecta de la válvula pondrá inmediatamente en peligro la vida del paciente; y una vez que se ha implantado la válvula cardíaca, ya no se puede recuperar y tiene que ser reemplazada quirúrgicamente si surge un problema.

20 La válvula cardíaca artificial autoexpandible es una válvula biológica que se fija en un estent autoexpandible de nitinol. Se coloca el estent en un catéter de un soporte y se libera después de haber sido aplicado en la válvula aórtica mediante intervención mínimamente invasiva. El estent se fija después al anillo aórtico en virtud de su propia estructura. Una válvula biológica autoexpandible de este tipo tiene los siguientes inconvenientes y problemas: el estent es demasiado largo y tiene un diseño de abertura no ideal, lo que probablemente afecte a la hemodinámica en los ostios coronarios izquierdo y derecho y origine disfunción cardíaca; la válvula cardíaca que se libera incorrectamente no puede ser reajustada, y pondrá en peligro la vida del paciente; y una vez que se ha implantado la válvula cardíaca, no se puede recuperar y tiene que ser reemplazada quirúrgicamente si surge un problema.

35 La válvula biológica artificial actual no puede conseguir por completo el objetivo de ser liberada libremente. En el proceso de liberación de una válvula biológica artificial, el flujo sanguíneo en el centro impactaría fácilmente en el borde de la válvula biológica artificial y, por tanto, obstaculizaría el subsiguiente proceso de liberación. Además, tal como se observa en el fenómeno de calcificación del material pericárdico y en el fenómeno de deterioro que se produce durante el proceso de envejecimiento, el borde de la válvula biológica artificial es usualmente el sitio más vulnerable a la calcificación y el envejecimiento, que también afectan gravemente al uso de la válvula biológica artificial. El principal problema a solucionar en el proceso de desarrollar una válvula biológica artificial es cómo asegurar que una válvula biológica sea liberada libremente y sea menos propensa a la calcificación del borde y al deterioro durante el uso, y que la válvula biológica sea estructuralmente más parecida a la válvula de un organismo normal.

45 En la Referencia 1 [Hsing-Wen Sung, Yen Chang, Chi-Tung Chiu, Chiun-Nan Chen, Huang-Chien Liang. Mechanical properties of a porcine aortic valve fixed with a naturally occurring crosslinking agent. *Biomaterials*, 1999, 20: 1759-1772], se tratan con genipina las fibras de colágeno de una válvula biológica artificial y se comparan con las tratadas mediante el método tradicional con glutaraldehído. Se encuentra que la genipina tiene un mejor efecto anticalcificación si se compara con el tratamiento tradicional con glutaraldehído. Sin embargo, no se realiza ningún análisis en cuanto a la rotura del borde de la válvula biológica artificial.

50 En la Referencia 2 [Peter Angele, Jochen Abke, Richard Kujat, Hubert Faltermeier, Detlef Schumann, Michael Nerlich, Bernd Kinner, Carsten Englert, Zbigniew Ruszczak, Robert Mehr, Rainer Mueller. Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials*, 2004, 25: 2831-2841], se tratan con carbodiimida las fibras de colágeno de una válvula biológica artificial y se estudian en cuanto a propiedades mecánicas y propiedades de hinchamiento. Sin embargo, no se realiza ningún tratamiento ni investigación acerca de la durabilidad general de la válvula biológica artificial.

55 La solicitud de patente china n.º 200680018417.4 (USA Edwards Lifesciences Corporation) describe el tratamiento

de tejidos bioprotésicos para mitigar la calcificación post-implante. En esta solicitud se utiliza una disolución de glutaraldehído tratada térmicamente o ajustada en su pH para pretratar el tejido bioprotésico y, después, se utilizan en combinación un agente bloqueante y un agente reductor para construir una válvula biológica artificial resistente a la calcificación.

- 5 La solicitud de patente china n.º 92100096.0 (Beijing Fu Wai Hospital) describe un método para modificar químicamente una válvula biológica heterogénea, en donde se utilizan en combinación hidroxí-cromo y glutaraldehído para construir una válvula biológica artificial resistente a la calcificación.

El documento US 2006/217804 describe un método para reducir la trombogenicidad y la calcificación post-implante de un tejido, comprendiendo dicho método calentar tejido en una disolución acuosa de glutaraldehído, ponerlo en contacto con una disolución de un agente bloqueante para bloquear grupos amina libres y tratar el tejido con un agente reductor para reducir grupos aldehído y ácido carboxílico.

Compendio de la invención

El objeto de la presente invención es proporcionar un método para preparar una válvula biológica artificial rigidizada en el borde tal como se define en la reivindicación independiente 1, con el fin de superar los defectos antes mencionados de la técnica anterior.

El método de la presente invención comprende: en primer lugar, como paso de pretratamiento, empapar una válvula biológica artificial en una disolución de glutaraldehído, en donde se puede fijar parcialmente la válvula biológica artificial con glutaraldehído antes, después o durante el contacto con la disolución de glutaraldehído; y bloquear después mediante un agente reductor y extracto de tanino los grupos aldehído, grupos carboxilo, grupos amino, grupos hidroxilo y grupos carbonilo libres formados en la válvula biológica artificial pretratada con glutaraldehído.

Sin restringirse por ninguna teoría existente, la rigidización en el borde de la válvula biológica artificial de la presente invención se acrecienta presumiblemente por el siguiente mecanismo: el glutaraldehído reacciona químicamente con el colágeno de la válvula biológica artificial, principalmente por la reacción de condensación con los grupos ε-amino de lisina del colágeno, para generar una fuerte reticulación, y también por la formación de un acetal con los grupos hidroxilo de hidroxiprolina, para producir una fuerte reticulación. Además de las reacciones mencionadas, también se puede producir una reacción de alcoholización. Por los tres tipos de reacción antes mencionados, el glutaraldehído posibilita la reticulación intramolecular e intermolecular de las moléculas de colágeno, y de este modo permite una resistencia estructural acrecentada. Un agente reductor tal como borohidruro de sodio puede reducir los grupos aldehído libres producidos durante el proceso de tratar y modificar la válvula biológica artificial con la disolución de glutaraldehído, con el fin de reducir el número de grupos aldehído en la superficie de la válvula biológica artificial y mejorar la resistencia de la válvula biológica artificial a la calcificación. El extracto de tanino, como modificador de compuestos naturales, consiste esencialmente en taninos, no taninos, fenoles simples, ácidos orgánicos, etc. En solución salina tamponada con fosfato (SSTF), solución tampón de Hank o D-Hank (en cuanto a su composición, véanse las Tablas 3 a 5 más adelante), los ácidos carboxílicos polifenólicos y polioles de los taninos hidrolizados se unirán a los grupos aldehído, grupos carboxilo, grupos amino, grupos hidroxilo, grupos carbonilo y similares de la superficie de la válvula biológica artificial, a través de un enlace éster o un enlace glucósido, para formar compuestos complejos. Por otra parte, el policondensado de flavanoles de los taninos condensados experimentará policondensación con ácidos por calentamiento y rellenará la superficie de la válvula biológica artificial. La adición de un sulfito puede reducir el contenido de insolubles en la SSTF, solución tampón de Hank o D-Hank que contenga extracto de tanino, favorecer la solubilidad en frío, aumentar la velocidad de penetración y aclarar el color, con el fin de obtener una válvula biológica artificial con buen comportamiento de interfaz. El sulfito incluye uno o más de sulfito de potasio, bisulfito de potasio, sulfito de sodio, bisulfito de sodio, sulfito de cinc y sulfito de amonio en el intervalo de concentración de 0,1-30%.

En particular, la presente invención proporciona un método para preparar una válvula biológica artificial rigidizada en el borde que comprende los pasos siguientes:

después de enjuagar suficientemente un material fresco de válvula biológica artificial con una SSTF, solución tampón de Hank o D-Hank (pH 7,0-7,8), seleccionar la válvula biológica artificial con un grosor uniforme y una orientación de fibra consistente, cortar la válvula biológica artificial seleccionada en parches de un tamaño de 1-60 cm², poner y fijar durante 1 a 25 días los parches en una solución tampón de complejo de glutaraldehído para pretratamiento, y lavar después la válvula biológica artificial con agua bidestilada para eliminar por lavado el glutaraldehído;

poner y modificar durante 1 a 20 horas la válvula biológica artificial pretratada con glutaraldehído, en una SSTF, solución tampón de Hank o D-Hank que contiene un agente reductor; y

poner durante 30 a 60 días la válvula biológica artificial tratada con la disolución que contiene el agente reductor, en una SSTF, solución tampón de Hank o D-Hank que contiene extracto de tanino, seguido de extraer, enjuagar suficientemente con una solución tampón SSTF y lavar con agua bidestilada antes de conservar en agua bidestilada.

En la presente invención, el agente reductor utilizado es una o más especies seleccionadas del grupo consistente en

borohidruro de sodio, hidruro de litio y aluminio, borohidruro de potasio, tioborohidruro de sodio, tri-sec.-butilborohidruro de litio, isopropóxido de aluminio, polvo de zinc y polvo de magnesio.

5 En la presente invención, la solución tampón de complejo de glutaraldehído utilizada es una o más especies seleccionadas del grupo consistente en solución tampón de complejo de glutaraldehído/ácido hidroxietilpiperaziniletanosulfónico, solución tampón de complejo de glutaraldehído/ácido morfolinoetanosulfónico anhidro, solución tampón de complejo de glutaraldehído/ácido Tris-etanosulfónico y solución tampón de complejo de glutaraldehído/tris(hidroximetil)aminometano, en donde el glutaraldehído está a la concentración de 0,1-10%, el ácido hidroxietilpiperaziniletanosulfónico está a la concentración de 0,1-10%, el ácido morfolinoetanosulfónico anhidro está a la concentración de 0,1-10%, el ácido Tris-etanosulfónico está a la concentración de 0,1-10% y el tris(hidroximetil)aminometano está a la concentración de 0,1-10%, y la solución tampón de complejo de glutaraldehído tiene un intervalo de pH de 5,0-7,8.

15 En la presente invención, el extracto de tanino utilizado es una o más especies seleccionadas del grupo consistente en extracto de tanino de *Myrica*, extracto de tanino de acacia, extracto de tanino de nuez de agalla, extracto de tanino de roble, extracto de tanino de alerce, extracto de tanino de *Citrus*, extracto de tanino de *Rhizoma Arisaematis Calcarei*, extracto de tanino de quebracho, extracto de tanino de mangle, extracto de tanino de *Terminalia chebula* Retz., extracto de tanino de castaño, extracto de tanino de madera para postes, extracto de tanino de valonia, extracto de nuez de betel, extracto de tanino de grosella, extracto de tanino de acacia negra, extracto de tanino de valonea, extracto de tanino de *Acacia mangium*, etc.

20 El método de la presente invención proporciona una rigidez de borde acrecentada de la válvula biológica artificial y, por lo tanto, mejora la estabilidad a largo plazo y la durabilidad de la válvula biológica artificial.

Descripción de las figuras

25 Para describir más claramente las soluciones técnicas de la presente invención, a continuación se hace una breve descripción conjuntamente con los dibujos adjuntos. Tal como se ofrecen, estos dibujos son meramente algunas de las realizaciones específicas descritas en la presente solicitud. Las soluciones técnicas de la presente invención incluyen estos dibujos, pero no se limitan a los mismos.

La Figura 1 muestra los contenidos de grupo aldehído y grupo carboxilo en la válvula biológica artificial tratada según el Ejemplo 1, el Ejemplo 2 y el Ejemplo 3.

Realizaciones

30 Para una mayor comprensión de la presente invención, se describirán las realizaciones preferidas de la presente invención conjuntamente con los ejemplos siguientes. La descripción es sólo ilustrativa de las características y ventajas del método de la presente invención, y no se pretende que limite el alcance de protección de la presente invención.

Ejemplo 1

35 Se fija durante 3 días una válvula biológica artificial en solución tampón de complejo de 0,625% de glutaraldehído/0,5% de ácido hidroxietilpiperaziniletanosulfónico (pH 7,4).

Se pone y se modifica durante 5 horas la válvula biológica artificial pretratada con glutaraldehído, en una solución tampón SSTF (pH 6,8) que contiene 0,5% de borohidruro de sodio.

40 Se pone y se trata durante 2 días la válvula biológica artificial pretratada con glutaraldehído y tratada con la disolución que contiene borohidruro de sodio, en una solución SSTF (pH 6,8) que contiene 0,5% de extracto de tanino de *Myrica*.

Ejemplo 2

Se fija durante 15 días una válvula biológica artificial en solución tampón de complejo de 0,625% de glutaraldehído/0,5% de ácido morfolinoetanosulfónico anhidro (pH 7,4).

45 Se pone y se modifica durante 10 horas la válvula biológica artificial pretratada con glutaraldehído, en una solución tampón SSTF (pH 6,8) que contiene 0,5% de borohidruro de sodio.

Se pone y se trata durante 3 días la válvula biológica artificial pretratada con glutaraldehído y tratada con la disolución que contiene borohidruro de sodio, en una solución tampón SSTF (pH 6,8) que contiene 0,5% de extracto de tanino de acacia.

Ejemplo 3

50 Se fija durante 20 días una válvula biológica artificial en solución tampón de complejo de 0,625% de glutaraldehído/0,5% de tris(hidroximetil)aminometano (pH 7,4).

Se pone y se modifica durante 20 horas la válvula biológica artificial pretratada con glutaraldehído, en una solución tampón de Hank (pH 6,8) que contiene 1% de borohidruro de sodio.

- 5 Se pone y se trata durante 7 días la válvula biológica artificial pretratada con glutaraldehído y tratada con la disolución que contiene borohidruro de sodio, en una solución tampón de Hank (pH 6,8) que contiene 1% de extracto de tanino de quebracho.

Ejemplo 4

Los métodos para medir la resistencia a la tracción, la resistencia a la flexión, el peso seco residual y el porcentaje de puntos de desgarro son los siguientes:

Ensayo de tracción

- 10 Instrumento de ensayo: máquina para ensayos de tracción Instron modelo 5543

Condiciones de ensayo: temperatura ambiente, baño de agua con SSTF

- 15 Método de ensayo: Se corta una válvula biológica artificial en una tira de muestra de 5 mm × 50 mm; se sujetan a pinzas los dos extremos de la tira de muestra, estando la pinza superior y la inferior separadas por una distancia de 25 mm; una vez sujeta, se aplica a la tira una carga previa en las siguientes condiciones de carga previa: ritmo de 60 mN/minuto, valor máximo 1 mN, 3 ciclos; una vez terminado el preajuste, se carga la muestra con una tensión a una velocidad de carga de 25 mm/minuto en la dirección de la disposición de la fibra; y se miden los índices correspondientes para calcular la resistencia del material a la tracción.

Ensayo de flexión

Instrumento de ensayo: máquina para ensayos por impacto de fluido pulsante

- 20 Condiciones de ensayo: temperatura ambiente, baño de agua con SSTF

Método de ensayo: Se corta una válvula biológica artificial en una tira de muestra de 15 mm × 60 mm; se sujeta a una pinza un extremo de la tira de muestra, se dispone el centro de la tira de muestra a 50 mm de distancia de la boca de emisión del fluido pulsante, en donde la presión del fluido pulsante es 20 mm Hg, con 3 ciclos; y se miden los índices correspondientes para calcular la resistencia del material a la flexión.

- 25 Prueba de peso seco residual

Instrumento: frigorífico a -80°C, liofilizador

Procedimiento: Se congela previamente a -80°C durante 1 hora la muestra en el frigorífico, se liofiliza durante 24 horas en el liofilizador, se extrae y se pesa para determinar el peso seco.

Ensayo de puntos de desgarro

- 30 Instrumento de ensayo: máquina para ensayos con fluido a alta presión

Condiciones de ensayo: temperatura ambiente, baño de agua con SSTF

- 35 Método de ensayo: Se cose una válvula biológica artificial en un estent de nitinol y se fija el conjunto a una pinza, fijándose la presión del fluido en 300 mm Hg, y siendo el número de ciclos 75 ciclos por minuto, con un número total de 200 millones. Al final, se miden los índices correspondientes para calcular los puntos de desgarro de la válvula biológica artificial en el conjunto.

Los resultados de la medida se presentan en las Tablas 1-2 y la Figura 1.

Tabla 1: Comparación de las propiedades mecánicas de las válvulas biológicas artificiales tratadas según el Ejemplo 1, el Ejemplo 2 y el Ejemplo 3

Ejemplo	Resistencia a la tracción (MPa)	Resistencia a la flexión (mN/mm ²)
Ejemplo 1	10,07	75
Ejemplo 2	11,45	108
Ejemplo 3	14,69	146

Tabla 2: El peso seco residual y el porcentaje de puntos de desgarro de las válvulas biológicas artificiales tratadas según el Ejemplo 1, el Ejemplo 2 y el Ejemplo 3, medidos 35 días después del ensayo de alta presión a 300 mm Hg

Ejemplo	Peso seco inicial (mg)	Peso seco residual (mg)	Porcentaje de puntos de desgarro (%)
Ejemplo 1	830,02	787,56	14,50
Ejemplo 2	832,97	805,89	5,78
Ejemplo 3	831,45	827,23	1,24

5 Se puede deducir claramente de la Figura 1, la Tabla 1 y la Tabla 2 que la válvula biológica artificial preparada según el método de la presente invención presenta una distribución razonable de los grupos en la superficie, unas excelentes propiedades mecánicas y un buen resultado de medida obtenido con fluido a alta presión.

Tabla 3: Los ingredientes de la solución tampón SSTF (g/L)

Ingrediente	SSTF
NaCl	8
KCl	0,2
Na ₂ HPO ₄	1,42
KH ₂ PO ₄	0,27

Tabla 4: Los ingredientes de la solución tampón de Hank (g/L)

Ingrediente	Hank
CaCl ₂ (anhidro)	0,14
KCl	0,4
KH ₂ PO ₄	0,06
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,10
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,10
NaCl	8,0
NaHCO ₃	0,35
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	0,09
D-Glucosa	1,0
Rojo de fenol (al 0,1%)	1 mL

Tabla 5: Los ingredientes de la solución tampón de D-Hank (g/L)

Ingrediente	Hank
KCl	0,4
KH ₂ PO ₄	0,06

ES 2 639 424 T3

Ingrediente	Hank
NaCl	8,0
NaHCO ₃	0,35
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0,132
D-Glucosa	1,0
Rojo de fenol (al 0,1%)	1 mL

El método de la presente invención puede mejorar las propiedades mecánicas y la resistencia a la calcificación de una válvula biológica artificial durante el proceso de modificación química y, por tanto, mejorar la durabilidad global de la válvula biológica artificial.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una válvula biológica artificial rigidizada en el borde, que comprende: en primer lugar empapar una válvula biológica artificial en una solución tampón de complejo de glutaraldehído, para pretratamiento, en donde se puede fijar parcialmente la válvula biológica artificial con glutaraldehído antes, después o durante el contacto con la solución tampón de complejo de glutaraldehído; y bloquear después mediante un agente reductor y extracto de tanino secuencialmente los grupos aldehído, grupos carboxilo, grupos amino, grupos hidroxilo y grupos carbonilo libres formados en la válvula biológica artificial pretratada con glutaraldehído.
- 5
2. El método según la reivindicación 1, que comprende los pasos siguientes:
- después de enjuagar suficientemente un material fresco de válvula biológica artificial con una SSTF, solución tampón de Hank o D-Hank a pH 7,0-7,8, seleccionar la válvula biológica artificial con un grosor uniforme y una orientación de fibra consistente, cortar la válvula biológica artificial seleccionada en parches de un tamaño de 1-60 cm², poner y fijar los parches en una solución tampón de complejo de glutaraldehído para pretratamiento durante 1 a 25 días, y lavar después la válvula biológica artificial con agua bidestilada para eliminar por lavado el glutaraldehído;
- 10
- poner y modificar durante 1 a 20 horas la válvula biológica artificial pretratada con glutaraldehído, en una SSTF, solución tampón de Hank o D-Hank que contiene un agente reductor; y
- 15
- poner durante 30 a 60 días la válvula biológica artificial tratada con la disolución que contiene el agente reductor, en una SSTF, solución tampón de Hank o D-Hank que contiene extracto de tanino, seguido de extraer, enjuagar suficientemente con una solución SSTF y lavar con agua bidestilada antes de conservar en agua bidestilada.
- 20
3. El método según la reivindicación 1 o 2, en donde el agente reductor es una o más especies seleccionadas del grupo consistente en borohidruro de sodio, hidruro de litio y aluminio, borohidruro de potasio, tioborohidruro de sodio, tri-sec.-butilborohidruro de litio, isopropóxido de aluminio, polvo de zinc y polvo de magnesio.
4. El método según la reivindicación 2, en donde la solución tampón de complejo de glutaraldehído es una o más especies seleccionadas del grupo consistente en solución tampón de complejo de glutaraldehído/ácido hidroxietilpiperaziniletanosulfónico, solución tampón de complejo de glutaraldehído/ácido morfolinoetanosulfónico anhidro, solución tampón de complejo de glutaraldehído/ácido Tris-etanosulfónico y solución tampón de complejo de glutaraldehído/tris(hidroximetil)aminometano.
- 25
5. El método según la reivindicación 4, en donde el glutaraldehído está a la concentración de 0,1-10%, el ácido hidroxietilpiperaziniletanosulfónico está a la concentración de 0,1-10%, el ácido morfolinoetanosulfónico anhidro está a la concentración de 0,1-10%, el ácido Tris-etanosulfónico está a la concentración de 0,1-10% y el tris(hidroximetil)aminometano está a la concentración de 0,1-10%, y la solución tampón de complejo de glutaraldehído tiene un intervalo de pH de 5,0-7,8.
- 30
6. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el extracto de tanino es una o más especies seleccionadas del grupo consistente en extracto de tanino de *Myrica*, extracto de tanino de acacia, extracto de tanino de nuez de agalla, extracto de tanino de roble, extracto de tanino de alerce, extracto de tanino de *Citrus*, extracto de tanino de *Rhizoma Arisaematis Calcarei*, extracto de tanino de quebracho, extracto de tanino de mangle, extracto de tanino de *Terminalia chebula* Retz., extracto de tanino de castaño, extracto de tanino de madera para postes, extracto de tanino de valonia, extracto de nuez de betel, extracto de tanino de grosella, extracto de tanino de acacia negra, extracto de tanino de valonea y extracto de tanino de *Acacia mangium*.
- 35
7. El método según la reivindicación 2, en donde se añade un sulfito a la solución tampón SSTF, de Hank o D-Hank que contiene extracto de tanino.
- 40
8. El método según la reivindicación 7, en donde el sulfito es una o más especies seleccionadas del grupo consistente en sulfito de potasio, bisulfito de potasio, sulfito de sodio, bisulfito de sodio, sulfito de zinc y sulfito de amonio.
- 45
9. El método según la reivindicación 7 u 8, en donde el sulfito está a la concentración de 0,1-30%.

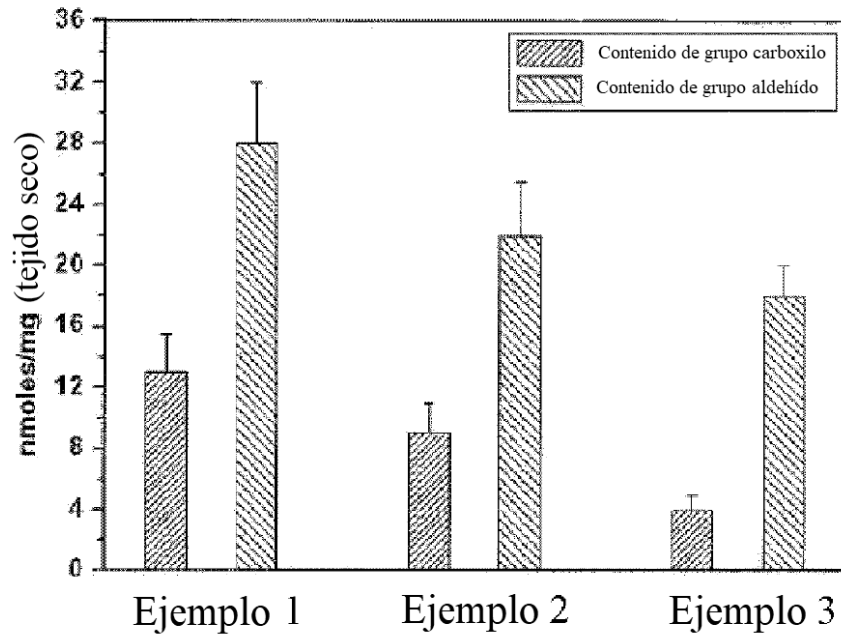


Fig. 1