

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 138**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08	(2006.01)
A61K 31/722	(2006.01)
A61K 47/36	(2006.01)
A61K 8/73	(2006.01)
A61P 17/02	(2006.01)
A61P 3/06	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2012 PCT/CA2012/050399**

87 Fecha y número de publicación internacional: **20.12.2012 WO12171125**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2012 E 12800482 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.08.2017 EP 2718331**

54 Título: **N,N,N-trialquilpolímeros, métodos para su preparación y usos de los mismos**

30 Prioridad:

13.06.2011 US 201161496225 P

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

27.11.2017

73 Titular/es:

**RIVAL S.E.C (100.0%)
550, rue Sherbrooke Ouest Suite 100
Montréal, Québec H3A 1B9, CA**

72 Inventor/es:

GAGNON, JONATHAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 644 138 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

N,N,N-trialquilpolímeros, métodos para su preparación y usos de los mismos

5 Referencia cruzada con solicitudes relacionadas

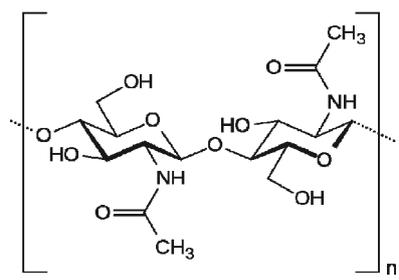
Esta solicitud reivindica prioridad de la solicitud provisional de EE.UU. con nº de serie 61/496.225, depositada el 13 de junio de 2011.

10 Campo de la invención

La presente invención se refiere de forma general a *N,N,N*-trialquilaminopolímeros. Más específicamente, la invención se refiere a *N,N,N*-trialquilaminopolisacáridos. También, la invención también se refiere a *N,N,N*-trialquilquitosano, a los métodos para la preparación del mismo, y a sus diversos usos, por ejemplo, en los campos farmacéutico, nutracéutico y cosmeceútico.

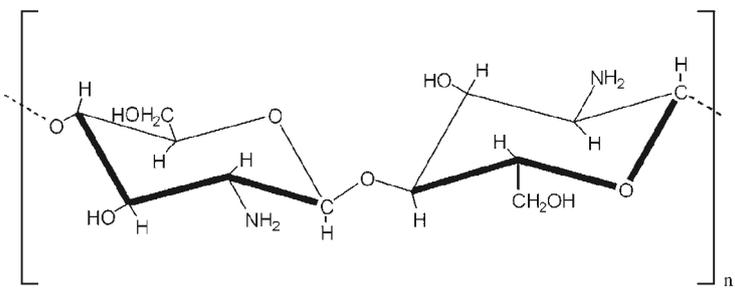
Antecedentes de la invención

20 La quitina es un polisacárido de cadena larga de unidades de *N*-acetil-D-glucosamina unidas por β -(1-4) y se encuentra en muchos lugares en cualquier parte del mundo natural. Es el principal componente de las paredes celulares de los hongos, los exoesqueletos de artrópodos tales como los crustáceos (por ejemplo, cangrejos, langostas y langostinos (incluyendo *Pandalus Borealis*)) y de insectos, las rádulas de moluscos y los picos de los cefalópodos, incluyendo calamares y pulpos. Es el segundo polisacárido natural más común, con una producción mundial anual estimada en $2,3 \times 10^9$ T (véase Biopolímeros, Vol. 6: Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes, Vandamme E. J., De Baets S., Steinbüchel A., Wiley-VCH, Nueva York, 2002, pág. 488.).



QUITINA

30 El quitosano, una poli[β -(1 \rightarrow 4)-2-amino-2-desoxi-D-glucopiranosas], es un aminopolisacárido lineal biodegradable, biocompatible y no tóxico obtenido mediante la desacetilación de la quitina. La desacetilación completa de la quitina produce quitosano con un grado de desacetilación (DD) del 100 % y formado únicamente por D-glucosamina unida por β -(1-4) (unidades desacetiladas):



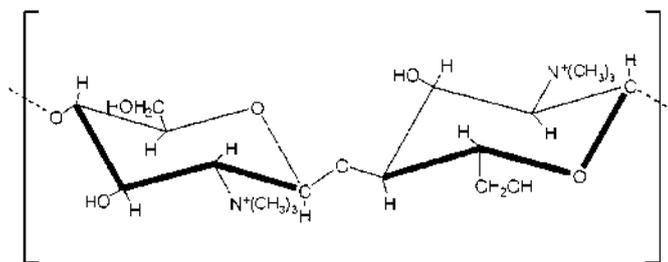
QUITOSANO

35 El quitosano con unos grados de desacetilación (DD) menores del 100 % comprende adicionalmente algunas unidades originales de *N*-acetil-D-glucosamina. El grado de desacetilación del quitosano disponible comercialmente está habitualmente en el intervalo del 50-100 %.

40 El quitosano es uno de los pocos biopolímeros que es catiónico cuando está protonado. Los polímeros catiónicos generalmente pueden adsorberse en las paredes celulares de las bacterias y actuar así como antibacterianos. Por ejemplo, muchos estudios describen la eficacia del quitosano en el tratamiento de heridas. La utilización del

quitosano en otras aplicaciones ha estado, sin embargo, limitada debido a su insolubilidad en agua cuando está en forma neutra. Su solubilidad está limitada a una solución ácida acuosa diluida con un pH < 6,5.

El *N,N,N*-trimetilquitosano (TMC) es un polication que se obtiene generalmente mediante la metilación del quitosano. Tiene la siguiente fórmula química ideal:



N,N,N-trimetilquitosano (TMC)

con un contraión para equilibrar la carga eléctrica.

Sin embargo, dicho TMC "ideal" nunca ha sido producido. De hecho, el TMC notificado en la bibliografía tiene un bajo grado de cuaternización (DQ) del átomo de nitrógeno (30-40 % como mucho), lo que significa que al menos algunas unidades de D-glucosamina únicamente portan cero, uno o dos grupos metilo en su átomo de nitrógeno, en lugar de portar tres de esos grupos.

Normalmente, los métodos para la producción del TMC comprenden llevar a cabo reacciones sucesivas de metilación sobre el quitosano, usando yodometano (yoduro de metilo) o dimetilsulfato en presencia de una base, a menudo hidróxido de sodio, en diversas condiciones experimentales (véase Curti E., Britto D., Campana-Filho S. P., *Macromol. Biosci.*, 2003, 3, 571-576 y Hamman J. H., Kotzé A. F., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2001, 27, 373-380). Sin embargo, la metilación del quitosano en estas condiciones da lugar a la formación de una mezcla de aminas no metiladas, mono, di y trimetiladas.

De hecho, la modificación química de los polisacáridos presenta muchas dificultades, tales como la ausencia de solubilidad de los polisacáridos en otros disolventes orgánicos e inorgánicos (incluyendo el agua), la presencia de otras diversas funciones químicas (por lo tanto, la modificación debe ser regioselectiva) y el elevado número de unidades repetitivas. No obstante, la síntesis de TMC ha sido el sujeto de muchos artículos académicos, ya que proporciona un derivado de quitosano policationico que es soluble en agua. La formación del TMC introduce de hecho cargas positivas, y por lo tanto proporciona un producto soluble en agua en un amplio intervalo de pH, incluso cuando está parcialmente cuaternizado. Es por lo tanto deseable producir un TMC que tenga un elevado grado de cuaternización.

Adicionalmente se han notificado intentos de aumentar el grado de cuaternización hasta más del 30-40 %, dando como resultado la metilación de los átomos de oxígeno de los grupos OH en la posición 3 y/o en la posición 6 hasta un punto que se conoce como grado de O-sustitución (O-DS). Unos elevados grados de O-sustitución dan lugar a una disminución en la solubilidad del TMC en agua, ya que los grupos -OH hidrófilos son sustituidos por grupos -OCH₃ más hidrófobos. Por lo tanto, es deseable producir un TMC tenga un bajo grado de O-sustitución.

El quitosano con un elevado grado de cuaternización (DQ) en el quitosano se ha obtenido (DQ del 90,5 %) en un proceso que implica tres etapas de metilación, usando yodometano e hidróxido de sodio; sin embargo, estas condiciones también dan lugar a unos elevados grados de O-sustitución, particularmente en las posiciones 3 y 6 (metilación 0-3 y 0-6), respectivamente del 82,8 y del 98,5 % (Polnok A., et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 57, 77-83). La formación del metil éter (O-metilación) mediante la sustitución de los grupos alcohol da lugar de forma indeseable a una disminución en la solubilidad de los derivados de quitosano, y posiblemente a un producto insoluble en agua (Curti E., Britto D., Campana-Filho S. P., *Macromol. Biosci.*, 2003, 3, 571-576, Polnok A., et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 57, 77-83, y Snyman D., Hamman J. H., Kotze J. S., Rollings J. E., Kotzé A. F., *Carbohidr. Polym.*, 2002, 50, 145-150).

Además, el uso de hidróxido de sodio o de un entorno fuertemente alcalino disminuye el peso molecular del polímero. Con unas condiciones experimentales que impidan la O-metilación generalmente se ha obtenido un bajo grado de cuaternización (Polnok A., et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 57, 77-83).

Alternativamente, cuando se usó como base *N,N*-dimetilaminopiridina en lugar de hidróxido de sodio para evitar la degradación del quitosano, se obtuvieron unos bajos DQ (del 7,3-9,6 %) (Hamman J. H., Kotzé A. F., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2001, 27, 373-380).

También se ha sintetizado el TMC usando dimetilsulfato como agente metilante (Britto D., Forato L. A., Assis O. B. G., Carbohidr. Polym., 2008, 74, 86-91, Britto D., Assis B. G. O., Carbohidr. Polym., 2007, 69, 305, y Britto D., Assis B. G. O., Intl. J. Biol. Macromol., 2007, 41, 198).

- 5 El quitosano también ha sido *N*-permetilado mediante una reacción con formaldehído, seguida por borhidruro de sodio. El quitosano *N*-permetilado se hizo reaccionar con yodometano para obtener el TMC. El yoduro de TMC resultante tiene un elevado grado de O-sustitución del 60 % y muestra actividad antibiótica, pero es insoluble en agua (Muzzarelli R. A. A., Tanfani F., Carbohidr. Polym., 1985, 5, 297).
- 10 También se ha notificado la preparación de derivados mixtos de *N,N,N*-trialquilquitosano con diferentes yoduros de alquilo (Avadi M. R., Zohuriaan-Mehr M. J., Younessi P., Amini M., Rafiee Tehrani M., Shafiee A., J. Bioact. Compat. Polym., 2003, 18, 469, y Bayat A., Sadeghi A. M. M., Avadi M.R., Amini M., Rafiee-Tehrani M., Shafiee A., Majlesi R., Junginger H. E., J. Bioact. Compat. Polym., 2006, 21,433).
- 15 El TMC ha despertado interés debido a sus múltiples usos. Algunos usos conocidos del TMC incluyen, por ejemplo:
- el aumento de la absorción de moléculas a través de las mucosas (por ejemplo, a través de la pared intestinal),
 - la liberación controlada de diversas sustancias, incluyendo genes y proteínas, y
 - su uso como un agente antimicrobiano.
- 20

El *N,N,N*-trimetilquitosano tiene una densidad creciente de carga positiva (en comparación con el quitosano) y se ha demostrado que abre las uniones estrechas de las células epiteliales. Por lo tanto, ha demostrado ser un potente potenciador de la absorción intestinal para fármacos hidrófilos y macromoleculares al pH fisiológico (Thanou M., Florea B. I. Langemeyer M. W. E., Verhoef J. C., Junginger H. E., Pharm. Res., 2000, 17, 27; Thanou M., Verhoef J. C., Verheijden J. H. M., Junginger H. E., Pharm. Res., 2001, 18, 823; Thanou M., Kotzé A. F., Scharringhausen T., Leuben H. L., De Boer A. G., Verhoef J. C., Junginger H. E., J. Controlled Release, 2000, 64, 15; Thanou M., Verhoef J. C., Junginger H. E., Adv. Drug Delivery Rev., 2001,52, 117; y Florea B.I., Thanou M., Junginger H. E., Borchard G., J. Control. Release, 2006, 110, 353). Se sabe que la densidad de carga positiva tiene un efecto importante sobre las propiedades potenciadoras de la absorción de fármacos (Kotzé A. F., LueßEn H. L., Leeuw B. J., Boer B. G., Verhoef J. C., Junginger H. E., Pharmaceutical Research, 1997, 14, 1197; y Kotzé A. F., Thanou M., Lueben H. L., de Boer A. G., Verhoef J. C., Junginger H. E., Eur. J. Pharm. Biopharm., 1999, 47, 269). Se ha notificado que cuanto mayor sea el grado de cuaternización, mayor es el aumento en la absorción.

25

30

35 Según J. Pharm. Sci., 2008, 97 (5), 1652-1680, los polímeros que aumentan la penetración transepitelial son policationes (quitosano, poli-L-arginina (poli-L-Arg), gelatina aminada), polianiones (N-carboximetilquitosano, ácido poliacrílico) y polímeros tiolados (carboximetil cisteína-celulosa, policarbófilo (PCP)-cisteína, quitosano-tiobutilamidina, quitosano-ácido tioglicólico, conjugado de quitosano-glutatin).

40 El TMC se ha usado en otras determinadas aplicaciones tales como la administración génica, en la administración colónica de fármacos y como antibacteriano (Rúnarsson O. V., et al., Eur. Polym. J., 2007, 43, 2660-2671; Borchard G., Adv. Drug Delivery Rev., 2001, 52, 145; Dodou D., Breedveld P., Wieringa P. A., Euro. J. Pharm. Biopharm., 2005, 60, 1; Kim C. H., Choi J. W., Chun H. J., Choi K. S., Polym. Bull., 1997, 38, 387; Kean T., Roth S., Thanou M., J. Control. Release, 2005, 103, 643; y Jia Z., Shen D., Xu W., Carbohidr. Res., 2001, 333, 1). Un estudio de relación entre la estructura y la actividad revela que la *N*-cuaternización del quitosano y de los quito oligómeros era responsable de la actividad antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* a un pH de 7,2 (Rúnarsson O. V., et al., Eur. Polym. J., 2007, 43, 2660-2671).

45

Se sabe que los polímeros catiónicos, incluyendo el quitosano protonado, poseen propiedades antibacterianas (Lim, S. H. et al. J. Macromol. Sci.-Polym. Rev., 2003, C43, 223.). Los factores que afectan a la actividad anti bacteriana de los polímeros son generalmente la estructura, el peso molecular, la naturaleza de los contraiones y la hidrofobicidad (Kenawy, E. et al. Biomacromolecules, 2007, 8, 1359-1384). El tiempo de eliminación puede ser tan bajo como de 30 min para el quitosano (El-Sharif, A. A. et al. Curr. Microbiol., 2011, 62, 739-745).

50

55 Adicionalmente, se sabe de forma general que los biopolímeros hidrófilos tienen un efecto emoliente.

Consecuentemente, sigue habiendo por lo tanto una necesidad de métodos mejorados para la producción de *N,N,N*-trialquilaminopolímeros, particularmente de *N,N,N*-trialquilaminopolisacáridos que tengan un elevado grado de cuaternización y un bajo grado de otra sustitución con heteroátomos. Particularmente, existe una necesidad de métodos mejorados para la producción de *N,N,N*-trialquilquitosano que tenga un elevado grado de cuaternización y un bajo grado de O-sustitución.

60

Sumario de la invención

65 El presente inventor ha diseñado un método nuevo y mejorado para la preparación de un *N,N,N*-trialquilquitosano. El método da lugar a un *N,N,N*-trialquilquitosano que tiene un elevado grado de cuaternización y un bajo grado de O-

sustitución. El *N,N,N*-trialquilquitosano producido mediante el método según la invención tiene varios usos. El método según la invención puede ser aplicado en la preparación de *N,N,N*-trialquilaminopolímeros que tengan otros heteroátomos diferentes al N. Más específicamente, el método según la invención puede ser aplicado a *N,N,N*-trialquilaminopolisacáridos.

En una realización, el método implica una primera etapa de alquilación de un aminopolímero para producir un *N,N*-dialquilaminopolímero que tiene un elevado grado de *N*-sustitución, sin ninguna formación del *N,N,N*-trialquilaminopolímero. El método también implica una etapa posterior de alquilación del *N,N*-dialquilaminopolímero para producir el *N,N,N*-trialquilaminopolímero. Más específicamente, cuando se obtiene el *N,N*-dialquilaminopolímero mediante una reacción de aminación reductora que implica el uso de un aldehído y de ácido fórmico (reacción de Eschweiler-Clarke). La reacción de alquilación del *N,N*-dialquilaminopolímero en la etapa posterior implica el uso de un agente de alquilación y de una base.

En una realización del método según la invención para la producción del *N,N,N*-trimetilquitosano, se usa un quitosano que tiene un grado de *N*-sustitución (*N-DS*) de 2,0.

La presente invención proporciona por tanto:

1. Un método para la preparación de un *N,N,N*-trialquilaminopolímero, que comprende:

- a) proporcionar un aminopolímero que tiene uno o más heteroátomos no sustituidos diferentes del átomo de nitrógeno;
- b) alquilar el aminopolímero para producir un *N,N*-dialquilaminopolímero, en el que sustancialmente no se produce *N,N,N*-trialquilaminopolímero; y
- c) alquilar el *N,N*-diaminopolímero para producir el *N,N,N*-trialquilaminopolímero, en el que únicamente está alquilado un bajo porcentaje de los heteroátomos no sustituidos.

2. Un método para la preparación de un *N,N,N*-trialquilaminopolisacárido, que comprende:

- a) proporcionar un aminopolisacárido que tiene uno o más heteroátomos no sustituidos diferentes del átomo de nitrógeno;
- b) alquilar el aminopolisacárido para producir un *N,N*-dialquilaminopolisacárido, en el que sustancialmente no se produce *N,N,N*-trialquilaminopolisacárido; y
- c) alquilar el *N,N*-diaminopolisacárido para producir el *N,N,N*-trialquilaminopolisacárido, en el que únicamente está alquilado un bajo porcentaje de los heteroátomos no sustituidos.

3. Un método según el punto 1 o 2, en el que cada grupo alquilo es independientemente un grupo alquilo C₁ a C₆, preferentemente un grupo alquilo C₁ a C₃, que está saturado o insaturado, ramificado o no ramificado, que opcionalmente tiene un heteroátomo, más preferentemente el grupo alquilo es independientemente el grupo metilo o el grupo propilo.

4. Un método según uno cualquiera de los puntos 1 a 3, en el que cada heteroátomo no sustituido es independientemente un átomo de oxígeno o de azufre.

5. Un método según uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que la etapa b) se lleva a cabo usando un aldehído y ácido fórmico.

6. Un método según uno cualquiera de los puntos 1 a 4, en el que la etapa b) es una reacción de aminación reductora.

7. Un método según el punto 5, en el que el aldehído es un aldehído C₁ a C₆, preferentemente un aldehído C₁ a C₃, que está saturado o insaturado, ramificado o no ramificado, que opcionalmente tiene un heteroátomo, más preferentemente el aldehído es formaldehído o propanal.

8. Un método según uno cualquiera de los puntos 1 a 7, en el que la etapa c) se lleva a cabo usando un agente de alquilación tal como un haluro de alquilo o un carbonato de dialquilo y una base, en un disolvente de reacción que comprende un disolvente orgánico, agua y/o un alcohol.

9. Un método según el punto 1, que comprende adicionalmente la etapa de añadir HCl, HBr o HI para producir el *N,N,N*-trialquilaminopolímero con un contraión de cloruro, de bromuro o de yoduro.

10. Un método según el punto 2, que comprende adicionalmente la etapa de añadir HCl, HBr o HI para producir el *N,N,N*-trialquilaminopolisacárido con un contraión de cloruro, de bromuro o de yoduro.

11. Un método para la preparación de un *N,N,N*-trialquilquitosano, que comprende:
- proporcionar quitosano;
 - alquilar el quitosano para producir un *N,N*-dialquilquitosano, en el que sustancialmente no se produce *N,N,N*-trialquilquitosano; y
 - alquilar el *N,N*-dialquilquitosano para producir el *N,N,N*-trialquilquitosano, en el que únicamente está alquilado un bajo porcentaje de los átomos de oxígeno no sustituidos.
12. Un método según el punto 11, en el que cada grupo alquilo es independientemente un grupo alquilo C₁ a C₆, preferentemente un grupo alquilo C₁ a C₃, que está saturado o insaturado, ramificado o no ramificado, que opcionalmente tiene un heteroátomo, más preferentemente el grupo alquilo es independientemente el grupo metilo o el grupo propilo.
13. Un método según el punto 11 o 12, en el que el *N,N*-dialquilquitosano tiene un grado de *N*-sustitución (*N*-DS) de aproximadamente el 2,0.
14. Un método según la reivindicación uno cualquiera de los puntos 11 a 13, en el que quitosano tiene un grado de desacetilación (DD) de aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 95 % o más, de aproximadamente el 90 % o más, de aproximadamente el 85 % o más, de aproximadamente el 80 % o más, de aproximadamente el 75 % o más, de aproximadamente el 70 % o más, de aproximadamente el 65 % o más, o de aproximadamente el 60 % o más.
15. Un método según uno cualquiera de los puntos 11 a 14, en el que la etapa b) se lleva a cabo usando un aldehído y ácido fórmico.
16. Un método según el punto 15, en el que el aldehído es un aldehído C₁ a C₆, preferentemente un aldehído C₁ a C₃, que está saturado o insaturado, ramificado o no ramificado, que opcionalmente tiene un heteroátomo, más preferentemente el aldehído es formaldehído o propanal.
17. Un método según uno cualquiera de los puntos 11 a 14, en el que la etapa b) es una reacción de aminación reductora.
18. Un método según uno cualquiera de los puntos 11 a 17, en el que la etapa c) se lleva a cabo usando un agente de alquilación y una base, en un disolvente de reacción.
19. Un método según el punto 18, en el que el grupo alquilo del agente de alquilación es un grupo alquilo C₁ a C₆, preferentemente un grupo alquilo C₁ a C₃, que está saturado o insaturado, ramificado o no ramificado, opcionalmente que tiene un heteroátomo, más preferentemente el grupo alquilo del agente de alquilación es el grupo metilo grupo o el grupo propilo
20. Un método según el punto 18 o 19, en el que el agente de alquilación es un haloalcano o un carbonato de dialquilo, preferentemente el agente de alquilación es yodometano, yodopropano o carbonato de dimetilo.
21. Un método según uno cualquiera de los puntos 18 a 20, en el que la base es una sal de hidróxido o un carbonato o un bicarbonato alcalino.
22. Un método según uno cualquiera de los puntos 18 a 21, en el que la base es hidróxido de sodio o carbonato de sodio.
23. Un método según el punto 18, en el que el disolvente de reacción es *N,N*-dimetilformamida (DMF), agua, un alcohol, una mezcla de DMF y agua, una mezcla de DMF y un alcohol, o una mezcla de alcoholes.
24. Un método según uno cualquiera de los puntos 11 a 23, en el que al menos uno de la etapa b) y la etapa c) se lleva a cabo usando un microondas.
25. Un método según uno cualquiera de los puntos 11 a 24, que comprende adicionalmente la etapa de añadir HCl, HBr o HI para producir el *N,N,N*-trialquilquitosano con un contraión de cloruro, de bromuro o de yoduro.
26. El *N,N,N*-trimetilquitosano producido según el método de uno cualquiera de los puntos 1 a 25.
27. El *N,N,N*-trimetilquitosano producido según el método de uno cualquiera de los puntos 1 a 25, en asociación con un contraión de carbonato, de haluro, de bromuro, de yoduro o de hidróxido.
28. El *N,N,N*-trimetilquitosano producido según el método de uno cualquiera de los puntos 1 a 25 que tiene un grado de cuaternización de aproximadamente el 30 % o más, y un grado de O-sustitución de aproximadamente el 95 % o menos.

29. El *N,N,N*-trimetilquitosano que tiene un grado de cuaternización de aproximadamente el 30 % o más, y un grado de O-sustitución de aproximadamente el 95 % o menos.
- 5 30. El *N,N,N*-trimetilquitosano producido según el método de uno cualquiera de los puntos 1 a 25, que tiene un grado de cuaternización de aproximadamente el 35 % o más, de aproximadamente el 40 % o más, de aproximadamente el 45 % o más, de aproximadamente el 46 % o más, de aproximadamente el 50 % o más, de aproximadamente el 55 % o más, de aproximadamente el 60 % o más, de aproximadamente el 65 % o más, de aproximadamente el 70 % o más, de aproximadamente el 75 % o más, de aproximadamente el 80 % o más, de aproximadamente el 85 % o más, de aproximadamente el 90 % o más, de aproximadamente el 95 % o más, de aproximadamente el 98 % o más, o de aproximadamente el 100 %.
- 10
- 15 31. El *N,N,N*-trimetilquitosano que tiene un grado de cuaternización de aproximadamente el 35 % o más, de aproximadamente el 40 % o más, de aproximadamente el 45 % o más, de aproximadamente el 46 % o más, de aproximadamente el 50 % o más, de aproximadamente el 55 % o más, de aproximadamente el 60 % o más, de aproximadamente el 65 % o más, de aproximadamente el 70 % o más, de aproximadamente el 75 % o más, de aproximadamente el 80 % o más, de aproximadamente el 85 % o más, de aproximadamente el 90 % o más, de aproximadamente el 95 % o más, de aproximadamente el 98 % o más, o de aproximadamente el 100 %.
- 20 32. El *N,N,N*-trimetilquitosano producido según el método de uno cualquiera de los puntos 1 a 25, que tiene un grado de O-sustitución de aproximadamente el 90 % o menos, de aproximadamente el 85 % o menos, de aproximadamente el 80 % o menos, de aproximadamente el 75 % o menos, de aproximadamente el 70 % o menos, de aproximadamente el 65 % o menos, de aproximadamente el 60 % o menos, de aproximadamente el 55 % o menos, de aproximadamente el 50 % o menos, de aproximadamente el 45 % o menos, de aproximadamente el 40 % o menos, de aproximadamente el 35 % o menos, de aproximadamente el 30 % o menos, de aproximadamente el 25 % o menos, de aproximadamente el 20 % o menos, de aproximadamente el 15 % o menos, de aproximadamente el 10 % o menos, de aproximadamente el 5 % o menos, de aproximadamente el 2 % o menos, o de aproximadamente el 0 %.
- 25 33. El *N,N,N*-trimetilquitosano que tiene un grado de O-sustitución de aproximadamente el 90 % o menos, de aproximadamente el 85 % o menos, de aproximadamente el 80 % o menos, de aproximadamente el 75 % o menos, de aproximadamente el 70 % o menos, de aproximadamente el 65 % o menos, de aproximadamente el 60 % o menos, de aproximadamente el 55 % o menos, de aproximadamente el 50 % o menos, de aproximadamente el 45 % o menos, de aproximadamente el 40 % o menos, de aproximadamente el 35 % o menos, de aproximadamente el 30 % o menos, de aproximadamente el 25 % o menos, de aproximadamente el 20 % o menos, de aproximadamente el 15 % o menos, de aproximadamente el 10 % o menos, de aproximadamente el 5 % o menos, de aproximadamente el 2 % o menos, o de aproximadamente el 0 %.
- 30 34. El *N,N,N*-trimetilquitosano producido según el método de uno cualquiera de los puntos 1 a 25, que tiene un grado de desacetilación de aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 95 % o más, de aproximadamente el 90 % o más, de aproximadamente el 85 % o más, de aproximadamente el 80 % o más, de aproximadamente el 75 % o más, de aproximadamente el 70 % o más, de aproximadamente el 65 % o más, o de aproximadamente el 60 % o más.
- 35 40 35. El *N,N,N*-trimetilquitosano que tiene un grado de desacetilación de aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 95 % o más, de aproximadamente el 90 % o más, de aproximadamente el 85 % o más, de aproximadamente el 80 % o más, de aproximadamente el 75 % o más, de aproximadamente el 70 % o más, de aproximadamente el 65 % o más, o de aproximadamente el 60 % o más.
- 45 36. Una composición farmacéutica que comprende *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 y un portador farmacéuticamente aceptable.
- 50 37. Un método para el tratamiento de la hipercolesterolemia, que comprende la administración de *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 o la composición farmacéutica según el punto 36 a un sujeto en necesidad del mismo.
- 55 38. Un método para favorecer la curación de una herida, comprendiendo el método la aplicación local en la herida de un producto para el cuidado de la piel que comprende *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35.
- 60 39. Un método para aumentar la absorción de una molécula a través de las mucosas, que comprende la administración a un sujeto de la molécula junto con *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 o la composición farmacéutica según el punto 36.
- 65 40. Un método para llevar a cabo la liberación controlada de una molécula, que comprende la administración a un sujeto de la molécula junto con *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 o la composición farmacéutica según el punto 36.

41. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 o de la composición farmacéutica según el punto 36, para el tratamiento de la hipercolesterolemia en un sujeto.
- 5 42. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 o de la composición farmacéutica según el punto 35, para favorecer la curación de una herida en un sujeto.
43. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 o de la composición farmacéutica según el punto 36, para aumentar la absorción de una molécula a través de las mucosas.
- 10 44. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 o de la composición farmacéutica según el punto 36, para la liberación controlada de una molécula.
- 15 45. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 o de la composición farmacéutica según el punto 36 junto con un agente hipocolesterolemizante que es un inhibidor de la reductasa de la HMG-CoA o un inhibidor de la absorción del colesterol.
46. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 como un agente hipocolesterolemizante.
- 20 47. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 como un polyquaternium.
48. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 como un emoliente.
- 25 49. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 como un agente antimicrobiano.
50. El *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 o la composición farmacéutica del punto 36 para el tratamiento de la hipercolesterolemia.
- 30 51. El *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 o la composición farmacéutica del punto 36, para favorecer la curación de heridas.
- 35 52. El *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35 o la composición farmacéutica según el punto 36, para su administración junto con un agente hipocolesterolemizante que es un inhibidor de la reductasa de la HMG-CoA o un inhibidor de la absorción del colesterol.
53. Un producto natural para la salud que comprende el *N,N,N*-trimetilquitosano de uno cualquiera de los puntos 26 a 35.
- 40 54. Un producto nutracéutico que comprende el *N,N,N*-trimetilquitosano de uno cualquiera de los puntos 26 a 35.
55. Un producto para el cuidado personal que comprende el *N,N,N*-trimetilquitosano de uno cualquiera de los puntos 26 a 35.
- 45 56. Un producto para el cuidado personal del punto 55, en el que el producto para el cuidado personal es un producto para el cuidado del cabello o un producto para el cuidado de la piel.
57. El producto para el cuidado personal del punto 55 o 56, para favorecer la curación de heridas.
- 50 58. Un producto oftálmico que comprende el *N,N,N*-trimetilquitosano de uno cualquiera de los puntos 26 a 35.
59. Un producto cosmecéutico que comprende el *N,N,N*-trimetilquitosano de uno cualquiera de los puntos 26 a 35.
- 55 60. El producto cosmecéutico del punto 59, para favorecer la curación de heridas.
61. Un producto cosmético que comprende el *N,N,N*-trimetilquitosano de uno cualquiera de los puntos 26 a 35.
- 60 62. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la hipercolesterolemia en un sujeto.
63. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35, en la preparación de un medicamento para favorecer la curación de heridas en un sujeto.
- 65 64. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35, en la preparación de un medicamento para aumentar la absorción de una molécula a través de las mucosas.

65. Uso del *N,N,N*-trimetilquitosano según uno cualquiera de los puntos 26 a 35, en la preparación de un medicamento para la liberación controlada de una molécula.

66. El *N,N,N*-trialquilaminopolímero producido según el método del punto 1.

67. El *N,N,N*-trialquilaminopolisacárido producido según el método del punto 2.

68. El *N,N,N*-tripropilquitosano producido según el método de uno cualquiera de los puntos 1 a 25.

10 Breve descripción de los dibujos

En los dibujos anexos:

15 la Figura 1 es el espectro de RMN del DMC · HCl en D₂O;

la Figura 2 es el espectro de IR de A) quitosano, B) DMC, y C) TMC;

la Figura 4 muestra los cambios en el peso corporal durante las cuatro semanas de tratamiento con celulosa (cuadrados), TMC (rombos) y colestiramina (triángulos);

20 la Figura 5 muestra el colesterol total (símbolos negros) y no HDL plasmático (VLDL, LDL y MDL - símbolos grises) durante las cuatro semanas de tratamiento con celulosa (cuadrados), TMC (rombos) y colestiramina (triángulos);

25 la Figura 6 muestra los cambios en las HDL durante las cuatro semanas de tratamiento con celulosa (cuadrados), TMC (rombos) y colestiramina (triángulos);

la Figura 7 muestra la proporción de HDL / no HDL durante las cuatro semanas de tratamiento con celulosa (cuadrados), TMC (rombos) y colestiramina (triángulos);

30 la Figura 8 muestra los triglicéridos en las cuatro semanas de tratamiento con celulosa (cuadrados), TMC (rombos) y colestiramina (triángulos);

35 la Figura 9 muestra la evolución del crecimiento y la tasa de crecimiento de las bacterias gramnegativas *E. coli* y *P. aeruginosa* basadas en la concentración de TMC;

la Figura 10 muestra la evolución del crecimiento y la tasa de crecimiento de las bacterias grampositivas *S. aureus* y *E. faecalis* basadas en la concentración de TMC;

40 la Figura 11 muestra la evolución del crecimiento y la tasa de crecimiento de las bacterias grampositivas *M. smegmatis* y *S. beta hemolítico* basadas en la concentración de TMC.

Descripción detallada de la invención

45 La presente invención proporciona, según un aspecto, un método para la preparación de *N,N,N*-trialquilaminopolímeros que tienen otros heteroátomos no sustituidos diferentes del N, particularmente *N,N,N*-trialquilpolisacáridos. En algunas realizaciones, los grupos alquilo son cada uno independientemente un grupo alquilo C₁ a C₆, preferentemente C₁ a C₃, que está saturado o insaturado, ramificado o no ramificado. Más preferentemente, el grupo alquilo es el grupo metilo o el grupo etilo. Los otros heteroátomos presentes pueden ser O o S. Únicamente es alquilado un bajo porcentaje de los demás heteroátomos durante el método de preparación según la invención.

55 En las realizaciones de la invención, el *N,N*-dialquilaminopolímero y el *N,N*-dialquilaminopolisacárido son el *N,N*-dimetilaminopolímero y el *N,N*-dimetilaminopolisacárido, respectivamente. En estas realizaciones, la preparación del *N,N*-dialquilaminopolímero y del *N,N*-dialquilaminopolisacárido se lleva a cabo mediante una aminación reductora que implica el uso de un aldehído tal como formaldehído o propanal, y de ácido fórmico (reacción de Eschweiler-Clarke). En las realizaciones de la invención en las que el grupo alquilo no es metilo, la persona experta comprenderá que se lleva a cabo una reacción de alquilación adecuada, que se detiene en la doble *N*-alquilación.

60 El *N,N*-dimetilaminopolímero y el *N,N*-dimetilaminopolisacárido son sometidos posteriormente a una reacción de alquilación que implica el uso de un agente de alquilación y de una base. La reacción de alquilación se lleva a cabo en un disolvente adecuado que puede incluir o no un disolvente orgánico. Un disolvente de reacción adecuado puede ser dimetilformamida (DMF), agua y/o un alcohol. El agente de alquilación puede ser un haluro de alquilo o un carbonato de dialquilo.

65

La invención proporciona adicionalmente, según otro aspecto, un método para la preparación de *N,N,N*-trimetilquitosano (TMC). La preparación del *N,N*-dimetilquitosano se lleva a cabo mediante una aminación reductora que implica el uso de formaldehído y de ácido fórmico (reacción de Eschweiler-Clarke). El *N,N*-dimetilquitosano es sometido posteriormente a una reacción de alquilación que implica el uso de un agente de alquilación y de una base.

La reacción de alquilación se lleva a cabo en un disolvente de reacción que DMF, agua, un alcohol, una mezcla de DMF y agua, una mezcla de DMF y un alcohol o una mezcla de alcoholes. Una base adecuada usada en la reacción de alquilación es hidróxido de sodio o carbonato de sodio. En las realizaciones de la invención, la reacción de alquilación se lleva a cabo en un microondas. El quitosano usado en el método según la invención tiene un grado de *N*-sustitución (*N*-DS) de aproximadamente 2,0. Únicamente un bajo porcentaje de los átomos de O que no están sustituidos son metilados durante el método de preparación.

En un aspecto, la presente invención proporciona *N,N,N*-trimetilquitosano (TMC) con un grado de cuaternización de aproximadamente el 30 % o más, y un grado de O-sustitución (O-DS) de aproximadamente el 95 % o menos.

En el presente documento, el grado de cuaternización (DQ) del *N,N,N*-trimetilquitosano (TMC) es la proporción entre el número de átomos de nitrógeno del TMC portadores de tres grupos metilo y el número total de átomos de nitrógeno del TMC. El grado de cuaternización puede ser expresado como una proporción o como un porcentaje.

En algunas realizaciones, el TMC tiene un grado de cuaternización de aproximadamente el 35 % o más, de aproximadamente el 40 % o más, de aproximadamente el 45 % o más, de aproximadamente el 46 % o más, de aproximadamente el 50 % o más, de aproximadamente el 55 % o más, de aproximadamente el 60 % o más, de aproximadamente el 65 % o más, de aproximadamente el 70 % o más, de aproximadamente el 75 % o más, de aproximadamente el 80 % o más, de aproximadamente el 85 % o más, de aproximadamente el 90 % o más, de aproximadamente el 95 % o más, de aproximadamente el 98 % o más, o de aproximadamente el 100 %.

En el presente documento, el grado de O-sustitución (O-DS) es la proporción entre el número de átomos de oxígeno en las posiciones 3 y 6 del TMC portadores de un grupo metilo y el número total de átomos de oxígeno en las posiciones 3 y 6 del TMC. El grado de O-sustitución (O-DS) puede ser expresado como una proporción o como un porcentaje. El grado de O-sustitución es bajo. También, en los *N,N,N*-trialquilaminopolímeros y los *N,N,N*-trialquilaminopolisacáridos según la invención en los que los otros heteroátomos diferentes al átomo de nitrógeno no son átomos de oxígeno, el grado de sustitución de dicho heteroátomo es bajo. Según se usa en el presente documento, un "bajo grado de sustitución" de los heteroátomos diferentes al átomo de nitrógeno tales como átomos de oxígeno significa un grado de sustitución de aproximadamente el 90 % o menos, 85 % o menos de aproximadamente el 85 % o menos, de aproximadamente el 80 % o menos, de aproximadamente el 75 % o menos, de aproximadamente el 70 % o menos, de aproximadamente el 65 % o menos, de aproximadamente el 60 % o menos, de aproximadamente el 45 % o menos, de aproximadamente el 40 % o menos, de aproximadamente el 35 % o menos, de aproximadamente el 30 % o menos, de aproximadamente el 25 % o menos, de aproximadamente el 20 % o menos, de aproximadamente el 15 % o menos, de aproximadamente el 10 % o menos, de aproximadamente el 5 % o menos, de aproximadamente el 2 % o menos, o de aproximadamente el 0 %.

En algunas realizaciones, el TMC tiene un grado de O-sustitución de aproximadamente el 90 % o menos, del 85 % o menos de aproximadamente el 85 % o menos, de aproximadamente el 80 % o menos, de aproximadamente el 75 % o menos, de aproximadamente el 70 % o menos, de aproximadamente el 65 % o menos, de aproximadamente el 60 % o menos, de aproximadamente el 45 % o menos, de aproximadamente el 40 % o menos, de aproximadamente el 35 % o menos, de aproximadamente el 30 % o menos, de aproximadamente el 25 % o menos, de aproximadamente el 20 % o menos, de aproximadamente el 15 % o menos, de aproximadamente el 10 % o menos, de aproximadamente el 5 % o menos, de aproximadamente el 2 % o menos, o de aproximadamente el 0 %.

El *N,N,N*-trimetilquitosano de la invención es un policatión, y por lo tanto está en asociación, al menos en su forma sólida, con un contraión. Puede usarse cualquier contraión adecuado. La persona experta seleccionará este contraión dependiendo del uso final del TMC. En algunas realizaciones, el contraión es un ión de carbonato (CO_3^{2-}), un ión de haluro, tal como un ión de cloruro (Cl^-) o de yoduro (I^-), o un ión de hidróxido (OH^-).

El *N,N,N*-trimetilquitosano de la invención también tiene un grado de desacetilación (DD) que depende del DD del quitosano a partir del cual se elabora el *N,N,N*-trimetilquitosano. En el presente documento, el grado de desacetilación del TMC o del quitosano es la proporción entre el número de átomos de nitrógeno del TMC o del quitosano que no portan un grupo acetilo y el número total de átomos de nitrógeno del TMC o del quitosano. El grado de desacetilación puede ser expresado como una proporción o como un porcentaje.

Debe apreciarse que únicamente los átomos de nitrógeno del quitosano que no porten un grupo acetilo pueden portar tres grupos metilo. Por lo tanto, el mayor DQ obtenible para un TMC dado depende directamente del DD del quitosano usado para su elaboración. Por ejemplo, un quitosano con un DD del 85 % únicamente tiene disponibles un 85 % de sus átomos de nitrógeno para ser cuaternizados. Por lo tanto, el mayor DQ para el TMC producido a partir de este quitosano será del 85 %.

En algunas realizaciones, el TMC (y también el quitosano a partir del cual se ha preparado) tiene un DD de aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 95 % o más, de aproximadamente el 90 % o más, de aproximadamente el 85 % o más, de aproximadamente el 80 % o más, de aproximadamente el 75 % o más, de aproximadamente el 70 % o más, de aproximadamente el 65 % o más, o de aproximadamente el 60 % o más.

5 Como será evidente para la persona experta, se espera que el TMC de la invención, al ser un derivado del quitosano, que es biodegradable, sea biodegradable.

10 Dependiendo del contraión, el TMC de la invención puede ser soluble o insoluble en agua. Por ejemplo, el inventor ha observado que el carbonato de TMC es insoluble en agua, mientras que el cloruro de TMC cloruro es soluble en este disolvente. Esto es diferente de la técnica anterior, en la que la insolubilidad generalmente es debida a una excesiva O-metilación o a la presencia de aniones sulfato.

15 Síntesis

Se prevé un método para la preparación de TMC. El inventor intentó en primer lugar la producción del TMC directamente a partir del quitosano (con un DD del 95-96 %) usando un agente de alquilación y una base, según se enseña en los informes previos, pero únicamente se obtuvieron unos TMC con unos bajos DQ. Por ejemplo, en una mezcla de agua:DMF, el DQ puede ser de aproximadamente el 29 %, con un 59 % de unidades dimetiladas, y un 2 % de unidades monometiladas. Los intentos adicionales de usar diversos nuevos agentes de alquilación y bases fueron, de forma similar, infructuosos. Por ejemplo, la metilación mediante el uso de dimetilsulfato da lugar a un producto insoluble.

25 Según los estudios descritos en el presente documento, el inventor ha diseñado y desarrollado un método mejorado para la preparación de TMC.

En el método según la invención, el *N,N*-dimetilquitosano (DMC) tiene esencialmente todos los átomos de nitrógeno sustituidos (grado de *N*-sustitución de aproximadamente 2,0).

30 En primer lugar, el método según la invención implica la preparación de *N,N*-dimetilquitosano. Esta primera parte del método comprende:

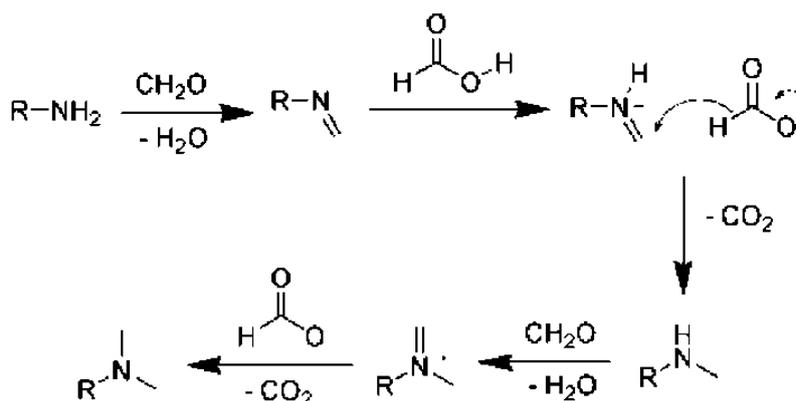
- proporcionar quitosano; y
- 35 ▪ metilar el quitosano a través de una reacción de Eschweiler-Clarke usando ácido fórmico y formaldehído.

El método permite la producción de DMC con esencialmente todos los átomos de nitrógeno doblemente metilados (es decir, un grado de *N*-sustitución de aproximadamente 2,0). El método también permite la producción de DMC con un buen rendimiento y pureza.

40 Ventajosamente, el quitosano usado como material de partida puede tener un DD de aproximadamente el 95-96 % y una viscosidad de 150 cps (ácido acético acuoso al 1 %), que se corresponde con un quitosano de calidad comercial que está disponible a bajo coste. El quitosano está disponible con diversos pesos moleculares que permiten la obtención de DMC (y finalmente de TMC) de los correspondientes diversos pesos moleculares. En algunas realizaciones de la invención, el quitosano tiene un DD de aproximadamente el 100 %, de aproximadamente el 95 % o más, de aproximadamente el 90 % o más, de aproximadamente el 85 % o más, de aproximadamente el 80 % o más, de aproximadamente el 75 % o más, de aproximadamente el 70 % o más, de aproximadamente el 65 % o más, o de aproximadamente el 60 % o más, de aproximadamente el 55 % o más, o de aproximadamente el 50 % o más.

50 Ventajosamente, la reacción de Eschweiler-Clarke puede llevarse a cabo en agua y con unas cantidades reducidas de reactivos, particularmente de ácido fórmico. La reacción de Eschweiler-Clarke o la metilación de Eschweiler-Clarke es una reacción química mediante la cual una amina primaria (o secundaria) es metilada usando un exceso de ácido fórmico y formaldehído. Esta reacción de aminación reductora no produce sales de amonio cuaternario, sino que en su lugar se detiene en la etapa de la amina terciaria.

55 El mecanismo de la reacción de Eschweiler-Clark es:



La primera metilación de la amina comienza con la formación de una imina con formaldehído. El ácido fórmico actúa como una fuente de hidruro y reduce la imina a una amina secundaria. La fuerza directriz es la formación de dióxido de carbono gaseoso. La formación de la amina terciaria es similar. A partir de este mecanismo está claro que nunca se formará una sal de amonio cuaternario, debido a que para una amina terciaria es imposible formar otra imina o un ión iminio.

En segundo lugar, el método según la invención implica la preparación del TMC. Esta segunda parte del método comprende:

- proporcionar el *N,N*-dimetilquitosano que tiene esencialmente todos los átomos de nitrógeno doblemente metilados (es decir, un grado de *N*-sustitución de aproximadamente 2,0), y
- metilar el *N,N*-dimetilquitosano usando un agente de alquilación y una base.

En algunas realizaciones, el agente de alquilación es yodometano.

En algunas realizaciones, la etapa de metilación se lleva a cabo en un disolvente orgánico, tal como DMF.

En algunas realizaciones, la etapa de metilación se lleva a cabo en una mezcla de DMF:H₂O, por ejemplo, una mezcla al 50:50 (v/v). En dicha mezcla el agua puede estar presente en unos porcentajes de aproximadamente el 15 % o más.

En otras realizaciones, la etapa de metilación se lleva a cabo en agua.

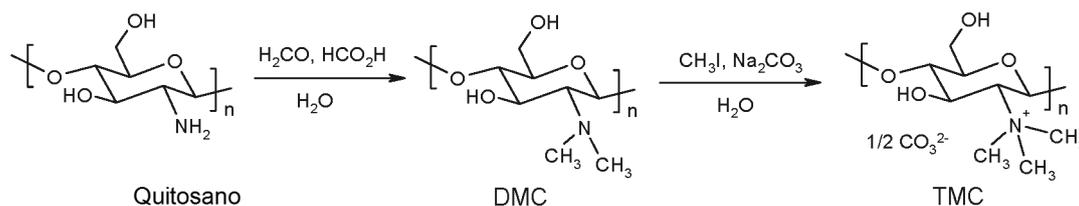
En otras realizaciones, la etapa de metilación se lleva a cabo en agua mezclada con un disolvente orgánico miscible en agua. El propósito de este disolvente orgánico miscible en agua es aumentar la miscibilidad del yodometano en el medio de reacción. Algunos ejemplos no limitantes de disolventes incluyen metanol y etanol. Pueden estar presentes en una cantidad de desde aproximadamente el 0 % hasta aproximadamente el 50 %, y posiblemente más dependiendo de la solubilidad de los reactivos exactos usados en el medio de reacción. En algunas realizaciones, el disolvente es una mezcla de agua-metanol, por ejemplo, una mezcla al 90:10 (v/v).

La evitación de la *N,N*-dimetilformamida (DMF), que es el disolvente habitual para la metilación del quitosano para producir TMC, elimina la producción secundaria de tetrametilamonio, que puede producirse cuando se usa una base fuerte, tal como hidróxido de sodio. En los casos en los que se produzca, el tetrametilamonio debe ser eliminado durante la purificación del TMC, por ejemplo, mediante una ultrafiltración.

En algunas realizaciones, la base es un carbonato o un bicarbonato alcalino, tal como bicarbonato de sodio o carbonato de sodio. El uso de esta base reduce la metilación de los grupos alcohol en las posiciones 3 y 6. Otra ventaja del uso de esta base es que los carbonatos de TMC son insolubles en agua, lo que facilita la purificación del TMC (que por lo tanto puede ser efectuada mediante una simple filtración) cuando se usa agua junto con un disolvente orgánico como disolvente de reacción.

En otras realizaciones, la base es hidróxido de sodio.

En una realización, el agente de alquilación es yodometano, la etapa de metilación se lleva a cabo en agua y la base es bicarbonato de sodio. Esta realización está ilustrada en el siguiente esquema, junto con la producción de DMC.



Esto evita la producción de impurezas y reduce o elimina la O-metilación. Esto también reduce los costes y elimina la necesidad de una ultrafiltración. El carbonato de TMC así producido puede ser transformado en cloruro de TMC mediante la simple adición de HCl. También sería posible la transformación en cloruro de TMC en el estómago, que contiene HCl. Dicho cloruro de TMC es soluble en agua, se obtuvo con una excelente pureza (véanse los siguientes ejemplos), un elevado DQ, y finalmente, no se observó O-alkilación.

En algunas realizaciones, en la metilación del *N,N*-dimetilquitosano se usa adicionalmente una sal tal como NaI o NaCl, usando el agente de alquilación y la base. En algunas realizaciones, esta sal es NaI.

El TMC se ha sintetizado con éxito a una escala de 10 g usando el método anterior.

El método anterior de elaboración del TMC tiene varias ventajas:

- proporciona un buen control del DQ (de entre el 0 % y el 100 %) a través de la variación de la reacción y de la cantidad de reactivos usada,
- proporciona un buen control del peso molecular y del DD del TMC (a través de la selección del quitosano usado como material de partida, ya que no es hidrolizado significativamente durante la reacción),
- el TMC tiene un bajo O-DS (metilación de los átomos de oxígeno de las posiciones 3 y 6),
- el TMC se proporciona con un buen rendimiento y una buena pureza.

También, cuando se compara con la técnica anterior, no es preciso repetir la etapa de metilación varias veces para obtener unos elevados DQ. Cuando la reacción se lleva a cabo en un horno microondas, se usa un exceso de yodometano, pero puede ser reciclado y reutilizado.

En algunas realizaciones, los métodos de la invención para la elaboración de DMC y de TMC usan algunos reactivos Generalmente Reconocidos Como Seguros (GRAS) y ningún disolvente orgánico, excepto los alcoholes.

Para la persona experta será evidente que el método según la invención puede usarse para la cuaternización de poli-L-arginina, así como de otros aminopolímeros.

Usos

Los TMC en general, y el compuesto de la invención en particular, tienen diversos usos. Pueden usarse por aumentar la absorción de moléculas a través de las mucosas, lo que puede ser útil en la elaboración de vacunas y de algunos fármacos. También pueden usarse para la liberación controlada de diversas sustancias, incluyendo genes y proteínas.

Agente hipocolesterolemizante

La hipercolesterolemia afecta a más del 4 % de la población general (en comparación con el 2 % para la diabetes) y en algunos países a un 20-30 % de las personas de más de 45-50 años. La hipercolesterolemia es el principal factor de riesgo de enfermedades cardiovasculares, que son la principal causa de muerte en las sociedades occidentales (un 37 % de todas las muertes en 1997).

La primera línea de tratamiento de la hipercolesterolemia es la administración de inhibidores de la reductasa de HMG-CoA (estatinas, tales como lovastatina (Mevacor, Altoprev), pravastatina (Pravachol), simvastatina (Zocor), fluvastatina (Lescol), atorvastatina (Lipitor), rosuvastatina (Crestor), nivistatina, mevastatina, mevinolin, atorvastatina de calcio et pitavastatina). Sin embargo, se estima que el 27-60 % de los pacientes en una monoterapia con estatinas no alcanza su nivel objetivo de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDL-C). Adicionalmente, las estatinas tienen efectos secundarios tales como una miopatía.

También se usan otros métodos para reducir los niveles de colesterol en sangre. Éstos incluyen el uso de inhibidores de la absorción del colesterol (Ezetimibe) y secuestrantes de ácidos biliares (BAS) tales como colestiramina

(Questran), colestipol (Colestid), sevelamer HCl (Renagel de Genzima Corp.) y Covalesam (Welchol), que son resinas sintéticas. Los BAS están cargados positivamente e interactúan fuertemente con las cargas negativas de las sales biliares. Los BAS eliminan las sales biliares mediante sorción o precipitación, lo que provoca su eliminación con las heces, y por lo tanto impide su absorción en el intestino. Para mantener la cantidad requerida de sales biliares, el hígado usará el colesterol para producir ácidos biliares, reduciendo así los niveles de colesterol.

También existe un BAS natural disponible sin receta: Cholestol™. Es un oligosacárido de quitosano de 40 kDa. Cholestol™ es insoluble en agua a todos los pH.

Los TMC en general, y el compuesto de la invención en particular, también pueden usarse como agentes hipocolesterolemiantes. De hecho, según se muestra en los siguientes Ejemplos, el TMC de la invención es un secuestrante de ácidos biliares. Las interacciones electrostáticas entre el quitosano cuaternizado (cargado positivamente) y las sales biliares (cargadas negativamente) favorece el secuestro de las últimas. Debido a su elevado peso molecular, el compuesto de la invención no es absorbido por el cuerpo. Por lo tanto, mediante su unión a los ácidos biliares, el compuesto de la invención impide su reabsorción enterohepática y provoca su eliminación con las heces. Esto da lugar a un aumento en la producción de ácidos biliares por parte del hígado. El hígado usa el colesterol para producir los ácidos biliares, lo que da como resultado una disminución en los niveles plasmáticos de colesterol.

El compuesto de la invención es por lo tanto útil para el tratamiento de la hipercolesterolemia, especialmente de una hipercolesterolemia entre leve y moderada. En los siguientes Ejemplos, las pruebas han demostrado que el compuesto de la invención es un mejor secuestrante de ácidos biliares (glicocolato de sodio y taurocolato de sodio) que el Cholestol™ y es aproximadamente tan eficaz como la colestiramina. Se cree que la solubilidad del TMC de la invención lo hace más disponible para el atrapamiento de los ácidos biliares en el intestino que los productos insolubles.

Como tal, el compuesto de la invención representa una alternativa natural a los tratamientos existentes. Por lo tanto, podría ser parte de una composición farmacéutica, de un producto para la salud natural, de un producto nutracéutico o de un producto alimenticio.

El compuesto de la invención también puede usarse como se muestra en los siguientes Ejemplos, para aumentar la proporción de colesterol HDL/no HDL.

Tomando como base los resultados presentados en los siguientes ejemplos, en la bibliografía relativa a la técnica anterior sobre TMC y el hecho de que el TMC deriva del quitosano, un producto natural no tóxico, se concibe que el TMC no mostrará una toxicidad significativa. De hecho, el compuesto de la invención es hidrófilo y soluble en agua al pH intestinal, al contrario que la colestiramina y el Cholestol™. Por lo tanto, se concibe que la hidrofilia del TMC reducirá el dolor de estómago, el estreñimiento y/o la diarrea, que pueden estar asociados con la administración de colestiramina y de Cholestol™.

El compuesto de la invención también puede usarse junto con los agentes hipocolesterolemiantes existentes, incluyendo, por ejemplo, inhibidores de la reductasa de HMG-CoA y/o inhibidores de la absorción del colesterol.

Polyquaternium y emoliente

"Polyquaternium" es la denominación de la Nomenclatura Internacional de Ingredientes Cosméticos (INCI) para diversos polímeros policatiónicos que se usan en la industria del cuidado personal. Polyquaternium es un neologismo usado para enfatizar la presencia de centros de amonio cuaternario en el polímero. La INCI ha aprobado al menos 37 polímeros diferentes con la denominación de polyquaternium. Los diferentes polímeros se distinguen por el valor numérico que sigue a la palabra "polyquaternium".

Polyquaternium	Identidad química
Polyquaternium-1	Etanol, 2,2',2"-nitrilotris-, polímero con 1,4-dicloro-2-buteno y N,N,N',N'-tetrametil- 2-buten-1,4-diamina
Polyquaternium-2	Poli[bis(2-cloroetil) éter-alt-1,3-bis[3-(dimetilamino)propil]urea]
Polyquaternium-4	Copolímero de hidroxietil celulosa y cloruro de dimetil dialilamonio; copolímero de cloruro de dialildimetilamonio-hidroxietil celulosa
Polyquaternium-5	Copolímero de acrilamida y metacrilato de dimetilamonioetilo cuaternizado
Polyquaternium-6	Poli(cloruro de dialildimetilamonio)
Polyquaternium-7	Copolímero de acrilamida y cloruro de dialildimetilamonio
Polyquaternium-8	
Polyquaternium-9	

Polyquaternium	Identidad química
Polyquaternium-10	Hidroxietil celulosa cuaternizada
Polyquaternium-11	Copolímero de vinilpirrolidona y metacrilato de dimetilaminoetil cuaternizado
Polyquaternium-12	
Polyquaternium-13	
Polyquaternium-14	
Polyquaternium-15	Copolímero de acrilamida-cloruro de dimetilaminoetil metacrilato de metilo
Polyquaternium-16	Copolímero de vinilpirrolidona y vinilimidazol cuaternizado
Polyquaternium-17	
Polyquaternium-18	
Polyquaternium-19	
Polyquaternium-20	
Polyquaternium-22	Copolímero de ácido acrílico y cloruro de dialildimetilamonio
Polyquaternium-24	
Polyquaternium-27	
Polyquaternium-28	Copolímero de vinilpirrolidona y metacrilamidopropil trimetilamonio
Polyquaternium-29	
Polyquaternium-30	
Polyquaternium-31	
Polyquaternium-32	Poli(cloruro de acrilamida 2-metacriloxietiltrimetil amonio)
Polyquaternium-33	
Polyquaternium-34	
Polyquaternium-35	
Polyquaternium-36	
Polyquaternium-37	Poli(cloruro de 2-metacriloxietiltrimetilamonio)
Polyquaternium-39	Terpolímero de ácido acrílico, acrilamida y cloruro de dialildimetilamonio
Polyquaternium-42	
Polyquaternium-45	
Polyquaternium-46	Terpolímero de vinilcaprolactama, vinilpirrolidona y vinilimidazol cuaternizado
Polyquaternium-47	Terpolímero de ácido acrílico, cloruro de metacrilamidopropil trimetil amonio y acrilato de metilo

5 Los polyquaterniums (PQ) se usan en champús, acondicionadores, espumas para el cabello, lacas, colorantes para el cabello y geles para el cabello, jabones líquidos y lociones, cremas para las manos y el cuerpo y soluciones para lentes de contacto. Debido a que están cargados positivamente, neutralizan las cargas negativas de la mayoría de los champús y de las proteínas del cabello y ayudan al alisado del cabello. Sus cargas positivas también les unen iónicamente al cabello y a la piel. Algunos tienen propiedades antimicrobianas.

10 Los PQ disponibles en el comercio generalmente son polímeros solubles en agua cargados positivamente con múltiples aminas cuaternarias que forman complejos iónicos con tensioactivos (documento EP 1250118 B1). Estas propiedades fisicoquímicas (complejación y viscosidad) son buscadas cuando se formulan productos para el cuidado del cuerpo. Las fichas técnicas de los PQ comerciales muestran diversos derivados de la misma molécula con unos pesos moleculares, unos grados de cuaternización y una hidrofobicidad variables (véanse, por ejemplo, los productos SoftCAT™ de The Dow Chemical Company). Esto permite a los formuladores elegir el derivado específico correspondiente a sus necesidades.

15 Las formulaciones de champús actuales aspiran a hacer bastante más que simplemente limpiar el cabello. A menudo también aspiran a acondicionar el cabello, suavizar la superficie del cabello, facilitar la manipulación del cabello y que tenga un aspecto cremoso. Los PQ juegan un importante papel para conseguir estos objetivos. Los champús ahora son multifuncionales (2 en 1 y 3 en 1) e incorporan una gran diversidad de ingredientes (vitaminas, siliconas, derivados de proteínas...).

20 Teniendo en consideración los grandes volúmenes de productos implicados, así como las preocupaciones relacionadas con el medio ambiente y la salud del consumidor, la industria cosmeceútica se está orientando hacia

productos más naturales y biodegradables. Los actuales PQ son, sin embargo, de origen sintético o incorporan grandes partes sintéticas.

Los PQ se usan en cosmética debido a que se unen a las superficies cargadas negativamente, tales como las membranas celulares y las proteínas. Además, debido a su naturaleza polimérica, los PQ (en unas proporciones de aproximadamente el 0,5 %) aumentan la viscosidad del producto, especialmente en las cremas para la piel. Un estudio sobre la toxicidad de once PQ demostró que la dosis tóxica (CE₅₀) es de entre < 1,0 y 10 mg/l para diez de ellos, excepto para el polyquaternium-10 con bajas unas densidades de carga (Cumming J. L., Hawker D. W., Nugent K. W., Chapman H. F., Journal of Environmental Science and Health Parte A, 2008, 43, 113).

Los polímeros catiónicos tales como los PQ forman complejos (coacervación) con tensioactivos, y por lo tanto actúan como un acondicionador para la deposición de este complejo sobre el cabello y como un agente de estructuración para las composiciones cosméticas acuosas para el cabello o la piel. Cuando la proporción molar del tensioactivo iónico es igual a la proporción molar de la carga positiva del polyquaternium (PQ), la viscosidad de la solución se reduce significativamente y se forma una segunda fase (Gruber J. V., Journal of Cosmetic Science, 2009, 60, 385).

La viscosidad y la turbidez de la solución del PQ se ve afectada por la estructura y por la proporción molar del tensioactivo.

El Polyquaternium-10 está formado por una cadena principal de celulosa en la que se ha injertado un polietilenglicol portador de una amina cuaternaria. Se usa como agente antibacteriano en soluciones para lentes de contacto.

Los TMC en general, y el compuesto de TMC de la invención en particular, puede usarse como un polyquaternium (PQ) y/o como un moliente en productos para el cuidado personal, especialmente en productos para el cabello y la piel, tales como champús, acondicionadores, espumas para el cabello, lacas, colorantes para el cabello, geles para el cabello, jabones líquidos y lociones, cremas para las manos y/o el cuerpo, y similares.

El compuesto de la invención tiene una estructura con aminas cuaternarias que es similar a la de los PQ comerciales. Al igual que ellos, forma complejos iónicos con tensioactivos naturales y sintéticos (por ejemplo, las sales biliares y el dodecilsulfato de sodio), y por lo tanto tiene unas propiedades similares. Además, el grado de cuaternización (DQ) y el peso molecular del compuesto de la invención pueden ser controlados al igual que en los PQ comerciales, y por lo tanto permiten la optimización de sus propiedades dependiendo de las características deseadas de producto final. Por lo tanto, el compuesto de la invención puede sustituir a los PQ comerciales.

El compuesto de la invención (a) es un derivado del quitosano, que se sabe que no es tóxico, y (b) no muestra ninguna toxicidad durante las pruebas *in vivo* descritas en el presente documento. Por lo tanto se concibe que los compuestos de la invención sean aceptables en formulaciones que entren en contacto con la piel y/o el cuero cabelludo.

Agente antimicrobiano o bacteriostático

Los TMC de la invención también pueden usarse como un agente antimicrobiano o bacteriostático en diversos productos, incluyendo productos para el cuidado personal, cosméticos, farmacéuticos o cosmeceúticos, que incluyen, pero no se limitan a, los descritos anteriormente, y en productos para el tratamiento de heridas.

La formulación de cremas y geles requiere normalmente la adición de parabenos sintéticos como agente antimicrobiano, ejemplo, en productos cosméticos y dermatológicos, incluyendo los productos destinados a favorecer la curación de heridas. Esto es especialmente cierto para los productos que son de uso repetido (fuera de un recipiente individual) durante un periodo de tiempo. El compuesto de la invención puede usarse como un agente bacteriostático natural (agente antimicrobiano) en dichos productos.

Además, según se hacen más restrictivas las normativas medioambientales, la industria tiene que usar conservantes antimicrobianos con un menor impacto sobre el medio ambiente. El compuesto de la invención será muy ventajoso en ese contexto.

Además, el compuesto de la invención, al ser un biopolímero hidrófilo, actúa como un emoliente, lo que es una propiedad deseable en muchos productos. Particularmente, esto permitirá el mantenimiento de una herida tratada húmeda, favoreciendo así el proceso de curación.

Las metaloproteinasas de la matriz (MMP) en exceso en heridas crónicas dan como resultado la degradación de las proteínas de la matriz extracelular y la inactivación de los factores de crecimiento relativos a la reconstrucción del tejido. Con una cierta proporción controlada de grupos amino no cuaternizados, el compuesto de la invención regulará la actividad de las MMP que de otro modo desestabilizarían el proceso de curación a través de una coordinación.

Por lo tanto, el compuesto de la invención tiene una acción triple, lo que lo hace muy atractivo como ingrediente antimicrobiano (o antibacteriano) en varios productos, especialmente en los productos para el tratamiento de heridas crónicas.

- 5 Otros objetos, ventajas y características de la presente invención serán más evidentes tras la lectura de las siguientes descripciones no restrictivas de realizaciones específicas de la misma, proporcionadas únicamente a modo de ejemplo con referencia a los dibujos anexos.

Descripción de las realizaciones ilustrativas

10

La presente invención está ilustrada con más detalle por los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1 - Síntesis y caracterización del TMC

- 15 En este ejemplo se describe la preparación de *N,N*-dimetilquitosano (DMC) usando el procedimiento de Eschweiler-Clarke.

Esta es una reacción de metilación con ácido fórmico y formaldehído. Según se muestra a continuación, este procedimiento de metilación posee la ventaja de metilar exclusivamente los grupos amino a través de una reducción *in situ* de un grupo imino. El procedimiento de Eschweiler-Clarke permite la sustitución del yodometano de la técnica anterior por un donante primario y secundario.

Entonces, el DMC ha sido *N*-metilado selectivamente a TMC con un DQ de 0,46 usando yodometano y bicarbonato de sodio en una mezcla de DMF/agua. Según se muestra en el Ejemplo 2, este TMC muestra una eficacia de sorción de las sales biliares comparable a la de la colestiramina, el secuestrante de ácidos biliares usado más ampliamente.

Sección experimental

30 Información general. Se adquirió quitosano de alto peso molecular a partir de conchas de langostinos nórdicos (*Pandalus borealis*) con un grado de desacetilación del 95,9 % y una viscosidad de 157 cps para una solución acuosa de ácido acético al 1 % en Marinard Biotech Inc. (Gaspé, Canadá). El quitosano fue molido mecánicamente hasta 0,6 mm antes de su utilización. El agua se desionizó con un sistema nanopur Diamond (modelo D11931) de Barnstead. El glicocolato de sodio (NaGC), el taurocolato de sodio (NaTC), la colestiramina, el fosfato de potasio monobásico anhidro (de calidad analítica), el cloruro de sodio (de calidad SigmaUltra) y el 4-hidroxibencensulfonato de sodio se obtuvieron en Sigma-Aldrich. Las ultrafiltraciones se llevaron a cabo con membranas de filtración de celulosa regeneradas (Amicon YM) que poseen un corte de 30.000 NMWL en una celda agitada adquirida en Millipore. Los espectros de IR y de RMN se registraron respectivamente con un espectrómetro PerkinElmer modelo 1600 series IR mediante el método del KBr, y con un espectrómetro de RMN Bruker a 700 MHz. Las constantes de acoplamiento se proporcionan en hercios. Los análisis elementales de los derivados de quitosano para determinar el grado de sustitución se llevaron a cabo con un analizador elemental Costech 410. Las capacidades de unión de los derivados del quitosano se llevaron a cabo con un sistema Shimadzu HPLC (modelo 10A DVP).

45 Ejemplo 1a - Preparación de *N,N*-dimetilquitosano (DMC). En un matraz de fondo redondo de 250 ml se preparó una solución de quitosano (2,01 g, 12,5 mmol de unidades de glucopiranosilo) en ácido fórmico al 88 % (100 ml). La solución viscosa de color amarillo se trató con una solución de formaldehído al 37 % (16,6 ml, 0,166 mol) y se calentó a 90 °C durante 23 h. Precauciones: dependiendo de la velocidad de calentamiento puede observarse una vigorosa liberación de dióxido de carbono. La solución resultante se evaporó a sequedad a presión reducida. El sólido se disolvió en agua (100 ml) y el pH de esta solución se ajustó a 8-9 mediante la adición de una solución acuosa de hidróxido de sodio 5 M. El precipitado se filtró y se lavó con agua (50 ml), etanol (50 ml) y éter dietílico (50 ml). El sólido finalmente se secó durante una noche a vacío. Se obtuvo un sólido de color blanquecino con un rendimiento del 73 % (1,71 g). IR (cm⁻¹) 3449 (OH), 2927 y 2881 (CH), 1658, 1481, 1000 - 1200 (C-O), 851. RMN ¹H en D₂O del DMC protonado con HCl, δ 5,06 (d, 1H, ¹J₁₂ = 6,5, H1), 4,20 (t, 1H, J = 8,7, H3), 4,08 (t, 1H, J = ~ 7, H4), 3,92 (d, 1H, J = 10,4, H6), 3,80 (ancho, 1H, H5), 3,73 (d, 1H, J = 8,6, H6), 3,36 (t, J = ~ 7, H2), 3,03 (s, 6H, CH₃) ppm. RMN ¹³C en D₂O del DMC protonado con HCl, δ 95,05 (C1), 75,50 (C4), 74,53 (C5), 68,16 (C3), 67,31 (C6), 60,35 (C2), 41,88 (CH₃) ppm.

60 Ejemplo 1b - Preparación de yoduro de *N,N,N*-trimetilquitosano (TMC) con un DQ del 46 % en forma protonada. Se trató una suspensión de DMC (0,400 g, 2,11 mmol de unidades de glucopiranosilo), bicarbonato de sodio (0,532 g, 6,33 mmol) y yoduro de sodio (0,825 g, 5,50 mmol) en 100 ml de DMF/agua (90/10 v/v) con yodometano (0,80 ml, 12,8 mmol) y se calentó a 75 °C durante 8 h. Se realizaron adiciones sucesivas de yodometano (0,80 ml, 12,8 mmol) y de bicarbonato de sodio (0,532 g, 6,33 mmol) después de 2, 4 y 6 h. La solución se evaporó y el sólido resultante se disolvió en agua (75 ml). La solución se ultrafiltró hasta un volumen de 10 ml y se lavó dos veces con agua (65 ml). La solución polimérica se concentró (2-3 ml) mediante una evaporación antes de ser precipitada con una mezcla de acetona (40 ml) y éter dietílico (25 ml). El sólido se filtró, se lavó con éter dietílico (50 ml) y se secó durante una noche a vacío. Se obtuvo un sólido de color blanquecino con un rendimiento del 100 % (0,442 g). IR (cm⁻¹) 3385

65

(OH), 2936 y 2879 (CH), 1654, 1473, 900 - 1200 (C-O). RMN ¹H en D₂O, δ 5,0 - 5,7 (C1), 3,6 - 4,6 (hidrógenos del glucopiranosilo), 3,3 (CH₃), 3,04 (CH₃), 2,05 (acetilo) ppm.

Ejemplo 1c - Síntesis de *N,N*-dimetilquitosano (DMquitosano). Se disolvió el quitosano (12 g, grado de desacetilación del 90 %) en 600 ml de una solución acuosa que contiene 28 ml de ácido fórmico al 88 %. Se añadió formaldehído (21 ml, 37 %) a la mezcla de reacción y después la solución se calentó a 70 °C con una manta térmica durante 12 horas. La solución se dejó alcanzar la temperatura ambiente y la solución agitada se trató con aproximadamente 300 ml de hidróxido de sodio 5 N hasta alcanzar un pH de 11-12. La suspensión resultante se filtró y se lavó con agua destilada hasta que el filtrado poseía un pH de 7. El sólido se lavó con etanol (25 ml) seguido de etil éter (25 ml). El sólido de color blanco se secó en la atmósfera normal. El *N*-DS del *N,N*-dimetilquitosano es de 2,0.

Ejemplo 1d - Síntesis de DMC usando un horno de microondas. Se disolvió el quitosano (0,19 g, grado de desacetilación del 90 %) en 9,2 ml de agua y 0,45 ml de ácido fórmico al 88 %. Se añadió formaldehído (0,34 ml, 37 %) a la mezcla de reacción. En un sistema de microondas Mars usando recipientes cerrados MarsXpress™ de CEM Corporation, la solución se calentó a 130 °C durante 5 minutos y la temperatura se mantuvo a 130 °C durante 10 minutos con una potencia máxima de 480 W. Después se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente. El pH se ajustó a entre 7-12 con la adición de hidróxido de sodio 5 N. La suspensión resultante se filtró y se lavó con agua. El sólido se lavó con etanol seguido de etil éter. El sólido de color blanco se secó en la atmósfera normal. Rendimiento del 95 %. El *N*-DS del *N,N*-dimetilquitosano es de 2,0.

Ejemplo 1e - Síntesis de TMC usando un horno de microondas (DMCarbonato). Se preparó una suspensión que contiene 0,30 g de *N,N*-dimetilquitosano, 0,59 g de carbonato de sodio y 3,0 ml de carbonato de dimetilo en 7 ml de una mezcla de metanol/agua (1:9). En un sistema de microondas Mars usando recipientes cerrados MarsXpress™ de CEM Corporation, la suspensión se calentó a 140 °C durante 5 minutos y la temperatura se mantuvo a 140 °C durante 10 minutos con una potencia máxima de 1.600 W. Después se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente. Si fue necesario, el pH se ajustó a entre 7-12 con la adición de carbonato de sodio. El sólido se lavó con agua. El sólido de color blanco se secó en la atmósfera normal. Los espectros de IR mostraron una fuerte banda a 1480 cm⁻¹.

Ejemplo 1f - Síntesis de TMC usando un horno de microondas (yodometano). Se preparó una suspensión que contiene 0,30 g de *N,N*-dimetilquitosano, 0,90 g de carbonato de sodio y un agente de alquilación (3,0 ml de yodometano) en 7 ml de una mezcla de metanol/agua (1:9). En un sistema de microondas Mars usando recipientes cerrados MarsXpress™ de CEM Corporation, la suspensión se calentó a 75 °C durante 5 minutos y la temperatura se mantuvo a 75 °C durante 15 minutos con una potencia máxima de 1.600 W. Después se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente. El pH se ajustó a entre 7-12 con la adición de carbonato de sodio. El sólido se filtró y se lavó con agua. El sólido de color blanco se secó en la atmósfera normal. Rendimiento cuantitativo, el DQ de las unidades repetitivas = 83 %, el peso molecular del TMC es mayor usando el procedimiento con microondas. La alquilación del *N,N*-dimetilquitosano con diclorometano como agente de alquilación demuestra que podrían usarse diferentes haluros de alquilo.

Ejemplo 1g - Síntesis de TMC usando un horno de microondas (DMCarbonato). Se preparó una suspensión que contiene 0,30 g de *N,N*-dimetilquitosano y 3,0 ml de carbonato de dimetilo. En un sistema de microondas Mars usando recipientes cerrados MarsXpress™ de CEM Corporation, la suspensión se calentó a 140 °C durante 5 minutos y la temperatura se mantuvo a 140 °C durante 10 minutos con una potencia máxima de 1.600 W. Después se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente. Si fue necesario, el pH se ajustó a entre 7-12 con la adición de carbonato de sodio. El sólido se lavó con agua. El sólido de color blanco se secó en la atmósfera normal. Rendimiento cuantitativo, los espectros de IR mostraron una fuerte banda a 1480 cm⁻¹.

Ejemplo 1h - Síntesis de TMC usando un recipiente a presión. Se preparó una suspensión que contiene 0,30 g de *N,N*-dimetilquitosano, 0,59 g de Na₂CO₃, 0,72 g de NaI, 3,0 ml de carbonato de dimetilo, 30 ml de una mezcla de agua/metanol (9:1) en un recipiente a presión. Se añadió una barra magnética al recipiente antes de cerrarlo. Se añadió una presión de 100 PSI de nitrógeno al recipiente. El recipiente a presión que contiene la suspensión se calentó a 150 °C durante 16 h con agitación. Después se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente. La suspensión resultante se filtró y el sólido se lavó con agua. El sólido se lavó con etanol (25 ml) seguido de etil éter (25 ml). El sólido se secó en la atmósfera normal. Los espectros de IR mostraron una banda a 1480 cm⁻¹.

Ejemplo 1i - Mediciones de la viscosidad. La viscosidad se midió con un viscosímetro Brookfield modelo DV-II+ Pro usando los agitadores LV1 a LV3 a 12 rpm. La viscosidad del cloruro de TMC al 0,50 % (p/v) en agua a 25 °C era de 4,37 cP y con la adición de un 0,1 % de dodecilsulfato de sodio, la viscosidad era de 6,87 cP. Con la adición de dodecilsulfato de sodio a una solución acuosa de TMC se formó una suspensión opaca de color blanco con una textura de loción para manos.

Ejemplo 1j - Síntesis de *N,N*-dipropilquitosano usando un horno de microondas. Se disolvió el quitosano (0,19 g, grado de desacetilación del 90 %) en 9,2 ml de agua y 0,45 ml de ácido fórmico al 88 %. Se añadieron 0,30 ml de propanal (propionaldehído) a la mezcla de reacción. En un sistema de microondas Mars usando recipientes cerrados MarsXpress™ de CEM Corporation, la solución se calentó a 130 °C durante 5 minutos y la temperatura se mantuvo

a 130 °C durante 15 minutos con una potencia máxima de 1.600 W. Después se dejó que la solución alcanzara la temperatura ambiente. El pH se ajustó a entre 7-12 con la adición de hidróxido de sodio 5 N. La suspensión resultante se filtró y se lavó con agua. El sólido se lavó con etanol seguido de etil éter. El sólido de color blanco se secó en la atmósfera normal.

5

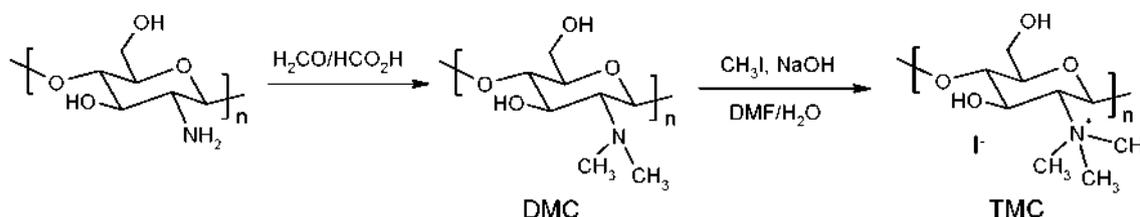
Resultados

Síntesis y caracterización

10 *N,N*-dimetilquitosano (DMC). La alquilación del quitosano con yodometano y una base de la técnica anterior da lugar a la formación de una mezcla de mono-, di- y trimetil aminas no sustituidas. Aquí se ha demostrado que el procedimiento de Eschweiler-Clarke posee puede llevarse a cabo en un medio ácido en el que el quitosano es soluble y no alquila los grupos alcohol. Sin embargo, la reacción de Eschweiler-Clarke se detiene en la amina terciaria. Si se desea el TMC, debe llevarse a cabo otra reacción de alquilación.

15

El DMC se obtuvo rápidamente y con un buen rendimiento y grado de *N*-sustitución (*N*-DS) mediante una reacción con formaldehído en una solución de ácido fórmico.



20

Un singlete a 3,1 ppm, correspondiente a una interacción de seis protones, muestra la presencia de grupos metilo con un excelente DS del 2,0, que también es confirmado en la RMN ¹³C por un pico a 41,88 ppm. En la región del piranosilo (3,3-5,3 ppm) del DMC se observan siete picos en la RMN ¹H según se muestra en la Figura 1. A partir de la integración, cada uno de estos picos se corresponde con un átomo de hidrógeno. Estas observaciones pueden ser explicadas por los diferentes entornos químicos de los dos átomos de hidrógeno en las posiciones C-6, que pueden ser explicados por los enlaces de hidrógeno entre los grupos NH(CH₃)₂ y 6-hidroxilo. El espectro del IR del DMC (Figura 2) muestra una banda más estrecha de hidroxilo a 3300 cm⁻¹ en comparación con el quitosano, y la presencia de bandas a 2801 y a 1481 cm⁻¹ atribuibles a un estiramiento asimétrico del C-H y a una deformación asimétrica del CH₃, respectivamente. El DMC es soluble en una solución acuosa ácida, y es insoluble en DMSO, etanol y agua.

25

Reacción de cuaternización con una base más débil: bicarbonato de sodio

35 La *N*-dialquilación del quitosano aumenta la nucleofilia de los átomos de nitrógeno y facilita la *N*-metilación exhaustiva, que puede conseguirse en unas condiciones de reacción más suaves. La *N*-metilación selectiva del DMC puede llevarse a cabo usando una base débil como bicarbonato de sodio, carbonato de sodio o con hidróxido de sodio en una mezcla disolvente que contiene una gran cantidad de agua, es decir, del 50 %. La utilización de una base fuerte durante la reacción de cuaternización favorece la O-metilación debido a la desprotonación parcial de los grupos hidroxilo.

40

La RMN de protón del TMC protonado sintetizado con bicarbonato de sodio revela dos picos de metilo a 3,3 y 3,0 ppm atribuibles, respectivamente, a los grupos metilo del TMC y del DMC. Se obtuvo un DQ de 0,46 después de 8 h (95 % de DD). El DQ fue determinado a partir de la proporción integral del pico de metilo a 3,3 ppm y de los átomos de hidrógeno del piranosilo. El espectro de IR del TMC (Figura 2) muestra una fuerte banda a 1480 cm⁻¹ correspondiente a una deformación asimétrica del CH₃, que es característica de las sales de quitosano muy *N*-metiladas y de las sales de *N,N,N*-trimetilamonio. Sobre ese punto, véase Kim C. H., Choi J.W., Chun H. J., Choi K. S., Polym. Bull., 1997, 38, 387; Britto D., Forato L. A., Assis O. B. G., Carbohidr. Polym., 2008, 74, 86-91; Britto D., Assis B. G. O., Carbohidr. Polym., 2007, 69, 305; Britto D., Assis B. G. O., Intl. J. Biol. Macromol., 2007, 41, 198; y Britto D., Campana-Filho S. P., Polym. Degrad. Stab., 2004, 84, 353.

45

El yoduro de TMC (DQ del 46 %) es soluble en agua e insoluble en metanol, etanol, acetona y éter dietílico.

Reacción de cuaternización con una base más fuerte: hidróxido de sodio

55 Para evitar la protonación de los grupos amino durante la reacción, el bicarbonato de sodio fue sustituido por hidróxido de sodio, una base más fuerte. El uso de esta base en una mezcla de DMF/agua podría usarse para conseguir una *N*-alquilación más completa. Sin embargo, esta base favorece la reacción de O-metilación, pero la utilización de una mezcla disolvente que contenga un 50 % de agua impidió esta reacción indeseada (sobre ese

punto, véase Polnok A., Borchard G., Verhoef J. C., Sarisuta N., Junginger H. E., Eur. J. Pharm. Biopharm., 2004, 57, 77-83.)

5 Sin embargo, se formó yoduro de tetrametilamonio como subproducto debido a la alquilación de la dimetilamina procedente de la descomposición de la DMF en un medio alcalino. El yoduro de tetrametilamonio, que muestra fuertes bandas de IR a 3012, 1483, 1403, 1396 y 944 cm^{-1} , fue eliminado mediante una ultrafiltración.

10 El espectro de IR del TMC sintetizado en presencia de hidróxido de sodio acuoso muestra una banda más fuerte a 1483 cm^{-1} en comparación con la reacción con bicarbonato de sodio, lo que indica un mayor DQ.

15 Se observó una débil banda de IR a 1658 cm^{-1} superpuesta con la banda de deformación del NH_2 en el quitosano; es atribuible al estiramiento del carbonilo de las unidades de *N*-acetilglucopiranosilo.

15 Conclusión

20 El DMC se obtuvo mediante el procedimiento de Eschweiler-Clarke. El procedimiento de Eschweiler-Clarke permite la formación de la *N,N*-dimetilación del quitosano en una simple etapa con un buen rendimiento. Los espectros de RMN del DMC muestran las constantes de acoplamiento entre los átomos de hidrógeno del glucopiranosilo y la no equivalencia magnética de los átomos de hidrógeno en las posiciones C-6. Hemos demostrado que el DMC es un reactivo útil para la síntesis del TMC. La *N*-alquilación selectiva en presencia de una base débil permitió la cuaternización del 46 % de los grupos dimetilamino. De hecho, se sintetizó un TMC soluble en agua con un DQ de hasta un 46 % mediante una *N*-metilación selectiva con yodometano en una mezcla de DMF/agua.

25 Ejemplo 2 - Unión *in vitro* a ácidos biliares

25 Se usó el TMC del Ejemplo 1.

Sección experimental

30 Los reactivos usados eran los mismos que en el Ejemplo 1 como se ha establecido anteriormente.

35 Unión de las sales biliares. En un Erlenmeyer de 25 ml se incubó una mezcla que contiene una solución acuosa de cloruro de sodio 15 mM filtrada con un filtro de 0,2 μm y el sustrato (10 mg) a 37 °C durante 40 min. Después se añadió una solución acuosa de NaGC (100 mM) o de NaTC (100 mM) y la mezcla de 10 ml se agitó con un agitador orbital (Thermoforma, modelo 420) a 170 rpm durante 1 h a 37 °C. Se filtró una alícuota de 1 ml a través de un filtro de 0,2 μm y el contenido de la solución se analizó mediante una HPLC.

40 Cuantificación mediante HPLC de las sales biliares. Se usó una columna Agilent C-18 Sorbax OSD (de 4,6 x 250 mm, 5 μm) para la cuantificación de las sales biliares mediante una HPLC. La fase móvil era una mezcla de hidrogenofosfato de potasio acuoso 0,04 M filtrado con un filtro de 0,2 μm y acetonitrilo (62/38 v/v) a una temperatura de 25 °C y un caudal de 0,7 ml/min. La longitud de onda de la detección UV-visible se estableció a 200 nm. Se usó 4-hidroxibencensulfonato de sodio como patrón interno. El volumen de inyección era de 20 μl .

Resultados

45 La unión de los ácidos biliares con quitosano modificado fue determinada mediante la variación de la concentración en la HPLC con la adición de los derivados de quitosano. Las condiciones experimentales de unión están adaptadas a partir de los métodos notificados para otros derivados de quitosano. Sobre ese punto, véase Lee J. K., Kim S. U., Kim J. H., Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63, 833 y Lee J. K., Kim S. Y., Kim S. U., Kim J. H., Biotechnol. Appl. Biochem., 2002, 35, 181. La *N,N*-dimetilación del quitosano aumenta ligeramente la cantidad de sales biliares unidas en comparación con el quitosano parental.

50 La sorción de la colestiramina se satura rápidamente (por ejemplo, en 10 min). Véase Lee J. K., Kim S. U., Kim J. H., Biosci. Biotechnol. Biochem., 1999, 63, 833 y Lee J. K., Kim S. Y., Kim S. U., Kim J. H., Biotechnol. Appl. Biochem., 2002, 35, 181.

60 En el caso de yoduro de TMC, aparece un precipitado de color blanco prácticamente instantáneamente cuando se mezclan entre sí las soluciones de NaGC y de TMC. La Figura 3 muestra la isoterma de sorción del TMC. La sorción se satura a 9 mmol y se une a un máximo de 2,89 mmol de colato en comparación con la sorción del Cholestol y de la colestiramina, que saturan respectivamente a 1,41 mmol y a 3,16 mmol (Tabla 1). La cantidad de NaGC unida por miligramo de TMC protonado con un DQ del 46 % se corresponde con 0,91 moléculas de NaGC por unidad de glucopiranosilo.

Tabla 1. Sorción del NaGC y del NaTC por parte de los derivados de quitosano y de los productos comerciales

Compuestos	[NaGC] (mM)	NaGC unido (%)	NaGC unido (mmol/g de sustrato)	[NaTC] (mM)	NaTC unido (%)	NaTC unido (mmol/g de sustrato)
quitosano (DD del 96 %)	6	10	0,58	2	0,1	0,00
Cholestol™	1	0,0	0,00	-	-	-
	6	18,1	1,00	2	10,0	0,19
	9	14,1	1,07	3	9,7	0,34
Colestiramina	1	82,2	0,88	1	89,4	0,66
	6	35,9	1,95	2	53,9	1,21
DMC	6	13,1	0,72	2	1	0,02
TMC (DQ = 46 %)	2	28,0	0,56			
	3	29,0	0,87			
	4	39,2	1,57			
	6	44,1	2,25			
	9	34,6	2,75			
	12	28,4	2,89			
TMC (DQ = 38 %) *	6	38,2	2,18	2	34,1	0,72

* Véase el TMC nº 115 del siguiente Ejemplo 3

Conclusión

5 Se averiguó que el TMC era un rápido y eficaz secuestrante de ácidos biliares debido a las interacciones electrostáticas y a su solubilidad en agua. De hecho, el yoduro de TMC se une al NaGC con una eficacia similar a la de la colestiramina, una resina sintética protonada.

10 Ejemplo 3 - Síntesis de un TMC con unos mayores DQ

El Ejemplo 1 informa, entre otros, de un procedimiento conveniente eficaz para la síntesis de *N,N*-dimetilquitosano (DMC) con un rendimiento excelente. Este procedimiento implica la *N*-alquilación del quitosano usando la reacción de Eschweiler-Clarke en una mezcla de ácido fórmico/agua.

15 El presente ejemplo describe la cuaternización selectiva y eficaz de este DMC en diversas condiciones.

Preparación de yoduro de *N,N,N*-trimetilquitosano (TMC) con un DQ del 75 % (140)

20 Se trató una suspensión de DMC (0,600 g, 3,17 mmol de unidades de glucopiranosilo) y yoduro de sodio (1,23 g, 8,20 mmol) en 100 ml de agua/metanol (90/10 v/v) con yodometano (1,20 ml, 19,3 mmol) y una solución de hidróxido de sodio (0,388 g, 9,7 mmol), y se calentó a 55-60 °C durante 24 h y a 70-75 °C durante 48 h. Se llevaron a cabo adiciones sucesivas de yodometano (1,20 ml, 19,3 mmol) después de 2, 4, 6, 22, 24, 26 y 28 h. La solución se ultrafiltró hasta un volumen de 10 ml y se lavó dos veces con agua (90 ml). La solución polimérica se concentró (2-3 ml) mediante una evaporación antes de ser precipitada con una mezcla de acetona (40 ml) y éter dietílico (25 ml). El sólido se filtró, se lavó con éter dietílico (50 ml) y se secó durante una noche a vacío. Se obtuvo un sólido de color blanquecino (0,442 g). IR (cm⁻¹) 3385 (OH), 2936 y 2879 (CH), 1654, 1473, 900 - 1200 (C-O). RMN ¹H en D₂O, δ 5,0 - 5,7 (C1), 3,6 - 4,6 (hidrógenos del glucopiranosilo), 3,3 (CH₃), 3,04 (CH₃), 2,05 (acetilo) ppm.

30 Preparación de yoduro de *N,N,N*-trimetilquitosano (TMC) con un DQ del 95 % (146)

35 Se trató una suspensión de DMC (0,600 g, 3,17 mmol de unidades de glucopiranosilo) y yoduro de sodio (1,23 g, 8,20 mmol) en 100 ml de agua/metanol (90/10 v/v) con yodometano (1,20 ml, 19,3 mmol) y carbonato de sodio (1,01 g, 9,51 mmol) y se calentó a 70 °C durante 46 h. Se llevaron a cabo adiciones sucesivas de yodometano (1,20 ml, 19,3 mmol) después de 2, 4, 6, 22, 24, 26 y 28 h. La suspensión se filtró y el sólido se lavó con agua (50 ml), se suspendió en agua (90 ml), se ultrafiltró (3 x 75 ml), se acidificó con HCl (1 M) durante 30 min, se llevó hasta un pH de 8-9 con NaOH (10 M), se concentró mediante una evaporación y finalmente se precipitó con etanol (75 ml). El sólido se filtró, se lavó con éter dietílico (50 ml) y se secó durante una noche a vacío. Se obtuvo un sólido de color amarillo claro (0,442 g). IR (cm⁻¹) 3385 (OH), 2936 y 2879 (CH), 1654, 1473, 900 - 1200 (C-O). RMN ¹H en D₂O, δ 5,0 - 5,7 (C1), 3,6 - 4,6 (hidrógenos del glucopiranosilo), 3,3 (CH₃), 3,04 (CH₃), 2,05 (acetilo) ppm.

Preparación de yoduro de *N,N,N*-trimetilquitosano (TMC) con un DQ del 90 % (149 a-f)

Se trató una suspensión de DMC (10,0 g, 52,9 mmol de unidades de glucopiranosilo) y yoduro de sodio (20,5 g, 136,5 mmol) en 1,70 l de agua/metanol (90/10 v/v) con yodometano (19,8 ml, 317 mmol) y carbonato de sodio (16,8 g, 159 mmol) y se calentó a 55 °C durante 46 h. Se llevaron a cabo adiciones sucesivas de yodometano (19,8 ml, 317 mmol) después de 2, 4, 6, 22, 24, 26 y 28 h, y una adición lenta de 2 eq de carbonato de sodio después de 6 h y 1 eq a las 28 h. La suspensión se filtró y el sólido se lavó con agua (200 ml). El sólido se vertió en 1,7 l de HCl 0,5 M, se añadieron 1,4 l de agua y se calentó a 70-80 °C durante 15 min. La solución se concentró mediante una evaporación hasta que se obtuvo un gel. El gel se precipitó con etanol (1,5 l), y el sólido se filtró y se lavó con etanol. El sólido se agitó en éter dietílico (1 l) y se filtró, se secó durante una noche a vacío. Se obtuvo un sólido de color amarillo claro con un rendimiento del 90 % (10,8 g). IR (cm⁻¹) 3385 (OH), 2936 y 2879 (CH), 1654, 1473, 900 - 1200 (C-O). RMN ¹H en D₂O, δ 5,0 - 5,7 (C1), 3,6 - 4,6 (hidrógenos del glucopiranosilo), 3,3 (CH₃), 3,04 (CH₃), 2,05 (acetilo) ppm.

La siguiente tabla resume las condiciones experimentales y la caracterización de éstos y de otros TMC.

Nótese que, salvo que se indique de otro modo, el material de partida era DMC y el reactivo era yodometano. En esta tabla, "DQ" es el grado de cuaternización, "% de DMC" es el porcentaje de unidades dimetiladas, "O-DS-3" es el grado de sustitución en la posición 3, "O-DS-6" es el grado de sustitución en la posición 6 y "DA" es el grado de acetilación. Los valores indicados se determinan a partir de la integración del respectivo pico en comparación con los del hidrógeno del piranosilo en la RMN ¹H.

Debe apreciarse que la suma de DQ + % de DMC + DA debería ser del 100 %. En la mayoría de los casos, no es exactamente del 100 % debido a los inherentes errores experimentales. Por lo tanto, el DQ puede ser estimado usando 100 % - DA - % DMC. Por ejemplo, a partir de 146, se considera que DQ es muy alto porque únicamente 2 + 2,6 = 4,6 % de las unidades están dimetiladas o acetiladas, lo que significa que el 95 % de las unidades están trimetiladas.

Producto nº	Disolvente	CH ₃ I (Eq.)	Base (3 eq.)	Tiempo de reacción	Caracterización				
					DQ	% de DMC	O-DS-3	O-DS-6	DA
55 ¹	MeOH	19,3	NaHCO ₃	entre 7 y 8 días	31,1	74,3	0	0	3,84
105a ²	DMF/H ₂ O (90/10)	6	NaHCO ₃	4 h	35,1	76,2	0	0	2,51
105b ²	DMF/H ₂ O (90/10)	6	NaHCO ₃	8 h	49,98	56,79	0	0	2,51
115 ³	DMF/H ₂ O (95/5)	16	NaHCO ₃	6 h	38				
128 ⁴ qUF	H ₂ O/MeOH (90/10)	6	NaOH	47 h 05	83,3	46,9	73,2	44,6	
140 ⁵	H ₂ O/MeOH (90/10)	6	NaOH	46 h 25	77	10	42	24	3
146a ⁶	H ₂ O/MeOH (90/10)	6	Na ₂ CO ₃	21 h 55	70	14	5,7	6,4	3,4
146 ⁶	H ₂ O/MeOH (90/10)	6	Na ₂ CO ₃	46 h	85	2	8	9	2,6
147 ⁷	DMF/H ₂ O (90/10)	6	Na ₂ CO ₃	46 h30	54,7	40,9	-	-	2,0
147an ⁷	DMF/H ₂ O (90/10)	6	Na ₂ CO ₃	24 h	59,0	42,8	-	-	
148h ⁸	H ₂ O/MeOH (90/10)	6	NaOH	71 h 30	89	1,8	48,4	23	1,3
149a-f ⁹	H ₂ O/MeOH (90/10)	6	Na ₂ CO ₃	~ 45 h 45	85 89	10 4	8 10	6,5 8	2 1

¹ La reacción de cuaternización se ha llevado a cabo con quitosano al 100 % (DD) en lugar de DMC. Se usaron 14,4 eq de NaHCO₃, en lugar de 3. Se han llevado a cabo tres adiciones de CH₃I (10,3 eq) durante la reacción.

² Para 105a, se añadieron 3 eq de NaHCO₃ y 6 eq de CH₃I después de 2 horas de reacción. Para 105b, se añadieron 3 eq de NaHCO₃ y 6 eq de CH₃I después de 2, 4 et 6 horas de reacción.

³ Se añadieron 3 eq de NaHCO₃ y 6 eq de CH₃I después de 2 horas de reacción. Entonces, después de 4 horas de reacción, se añadieron 6 eq de CH₃I.

⁴ Se añadieron 6 eq de CH₃I 2, 4, 6, 23, 25, 27 y 29 horas de reacción. Se añadió NaOH según fue necesario para mantener el pH de la solución por encima de 7,0. "qUF" significa que el producto ha sido purificado mediante una ultrafiltración.

⁵ No se usó NaI. Se añadieron 6 eq de CH₃I después de 2, 4, 6, 23, 25, 27 y 29 horas de reacción. Se añadió

NaOH según fue necesario para mantener el pH de la solución por encima de 7,0.

⁶ Se añadieron 6 eq de CH₃I después de 2, 4, 6, 22 h 30, 24 h 30, 26 h 30 y 28 h 30 horas de reacción. Se añadió NaOH según fue necesario para mantener el pH de la solución por encima de 7,0.

⁷ Para 146a, se añadieron 6 eq de CH₃I después de 2, 4 y 6 horas de reacción. Para 146, se llevaron a cabo adiciones adicionales después de 22, 24, 26 y 28 horas de reacción. El Na₂CO₃ solo ha sido añadido después de 6 horas de reacción para asegurar que el pH no caía por debajo de 7 durante la primera noche. Después de la reacción, los productos (146a y 146) eran insolubles en agua. Sin embargo, cuando se añadió HCl o NaOH al agua, eran solubles. Las muestras enviadas para un análisis por RMN fueron acidificadas para eliminar los CO₃²⁻. Entonces, se añadió NaOH para llevar el pH cerca de 9.

⁸ Se añadieron 6 eq de CH₃I después de 2, 4, 6, 22, 24, 26 y 28 horas de reacción. Se añadió Na₂CO₃ según fue necesario para mantener el pH de la solución por encima de 7,0. "147an" es 147 (sólido) disuelto en agua y agitado durante un fin de semana en presencia de CH₃COONa (10-15 eq).

⁹ No se ha añadido NaOH al comienzo de la reacción. Solo se añadió según fue necesario para mantener el pH de la solución por encima de 7,0. Se añadieron 6 eq de CH₃I después de 2, 4, 6, 22, 24, 26, 28, 46 h 30, 48 h 30, 50 h 30 y 52 h 30 horas de reacción. El producto 148 era insoluble en agua, y se acidificó para dar 148h. Para acidificarlo, el producto 148 se puso en agua y se añadió HCl 12 M hasta que el producto se solubilizó. Después el agua se eliminó mediante una evaporación a vacío y el producto 148h se precipitó usando metanol.

¹⁰ Para 149 a hasta f, hubo 7 adiciones de yodometano de 6 eq cada una. Se añadieron 2 eq de Na₂CO₃ junto con la última adición de yodometano del día, y se añadió 1 eq de Na₂CO₃ con la última adición de yodometano del segundo día. Se usó HCl para eliminar los CO₃²⁻. El pH no se llevó de nuevo hasta aproximadamente 9 usando NaOH para evitar la formación de NaCl, lo que complicaría la purificación.

Las condiciones de partida eran:

55: Quitosano (100 %) (0,300 g, 1,86 mmol) + NaHCO₃ (2,250 g, 26,76 mmol) + CH₃I (5,01 g, 36 mmol).

105a y b: DMC (0,401 g, 2,11 mmol) + NaHCO₃ (0,532 g, 6,33 mmol) + NaI (0,825 g, 5,5 mol) + CH₃I (1,82 g, 12,8 mmol).

115: DMC (0,401 g, 2,11 mmol) + NaHCO₃ (0,532 g, 6,33 mmol) + NaI (0,825 g, 5,5 mol) + CH₃I (4,79 g, 33,7 mmol).

128: DMC (0,301 g, 1,59 mmol) + NaOH (0,193 g, 4,82 mmol) + NaI (0,618 g, 4,12 mol) + CH₃I (1,37 g, 9,63 mmol).

140: DMC (0,600 g, 3,17 mmol) + NaOH (0,388 g, 9,70 mmol) + NaI (1,23 g, 8,20 mol) + CH₃I (2,73 g, 19,3 mmol).

146a y 146: DMC (0,600 g, 3,17 mmol) + Na₂CO₃ (1,01 g, 9,51 mmol) + NaI (1,23 g, 8,20 mol) + CH₃I (2,73 g, 19,3 mmol).

147: DMC (0,600 g, 3,17 mmol) + Na₂CO₃ (1,01 g, 9,51 mmol) + NaI (1,23 g, 8,20 mol) + CH₃I (2,73 g, 19,3 mmol).

147an: DMC (0,600 g, 3,17 mmol) + Na₂CO₃ (1,01 g, 9,51 mmol) + NaI (1,23 g, 8,20 mol) + CH₃I (2,73 g, 19,3 mmol).

Ejemplo 4 - Eficacia *in vivo* del TMC como secuestrante de ácidos biliares (BAS)

Se usó cloruro de TMC totalmente cuaternizado. Este TMC se produjo partiendo de quitosano con un DD del 90 %, que fue dimetilado usando la reacción de Eschweiler-Clarke. Después se llevó a cabo la cuaternización de forma similar a la del anterior producto n° 149. El DQ era de aproximadamente el 89 %, es decir, todas las unidades desacetiladas disponibles estaban trimetiladas.

1. Contexto

El propósito de este estudio era probar el potencial del TMC como un agente hipocolesterolemiante usando un modelo animal de trastorno lipídico. El modelo usado era hámsteres Golden Syrian alimentados con una dieta rica en grasas saturadas y colesterol (0,18 %). En primer lugar se indujo una hipercolesterolemia con esta dieta rica durante un periodo de cuatro semanas. Al final de este periodo, se llevó a cabo un análisis del colesterol plasmático total, de las HDL y de los triglicéridos, así como mediciones del peso corporal. Estas mediciones se usaron para formar tres grupos uniformes de hámsteres. Después de la formación de estos tres grupos, los tratamientos fueron administrados durante un periodo de cuatro semanas. Los tres tratamientos individuales eran: un tratamiento de control negativo (celulosa), un tratamiento inicial reductor del colesterol (colestiramina) y un tratamiento con TMC.

Estos tratamientos fueron administrados a los animales a través de su comida (1 %). Al final del tratamiento de cuatro semanas se llevó a cabo un análisis del colesterol plasmático total, de las HDL y de los triglicéridos para determinar el potencial hipocolesterolemiante del TMC.

5 2 Metodología

2.1 Animales

10 Para este estudio se usaron 24 hámsteres Syrian golden macho de 120-140 g (Charles Rivers, St-Constant, QC). Los animales fueron identificados al llegar. Se llevó a cabo una evaluación corporal completa en cada animal. Se recogió el peso corporal de cada animal al llegar y a lo largo del estudio a intervalos semanales. Los animales fueron aclimatados a su entorno durante 14 días antes del inicio del estudio.

15 2.2 Acomodación

Los hámsteres fueron alojados a dos por jaula durante el periodo de desarrollo de la hipercolesterolemia. A partir de la tercera semana de hipercolesterolemia, todos los hámsteres fueron alojados individualmente. Durante el estudio, cada jaula fue recubierta con un filtro de polisulfona. La distribución de agua *ad libitum* fue proporcionada por un sistema manual. La comida también se proporcionó *ad libitum*, excepto durante los periodos de ayuno previos al análisis de lípidos. Las jaulas fueron claramente identificadas usando una caja con un código de color según los grupos, indicando también el número de estudio, el grupo y el número y el sexo de los animales.

La sala se mantuvo generalmente a una temperatura ambiente de 22 ± 2 °C y una humedad relativa del 40 ± 20 %.

25 La temperatura y la humedad de la sala fueron medidas y registradas diariamente. Se proporcionó un ciclo de luz y oscuridad de 12 horas mediante un sistema de control automático, y se proporcionaron 8-10 cambios de aire por hora mediante un sistema de ventilación.

30 Durante un periodo de cuatro semanas después del inicio del tratamiento, los animales se pesaron a intervalos regulares y se sometieron a un examen físico diario, que aseguraba el bienestar de los animales. No se observaron síntomas adversos. Únicamente se apreció una pérdida de peso en el grupo tratado con el TMC, y se notificó en la siguiente sección de resultados.

35 2.3 Dieta y tratamientos

Se administró un alimento en pienso para animales estándar a los animales durante el período de aclimatación.

40 Posteriormente, la dieta rica en forma granulada fue administrada *ad libitum* a todos los animales durante un periodo total de ocho semanas. Esta dieta se usó para causar una hipercolesterolemia en los hámsteres. En términos de ingesta calórica (kcal/g de la dieta), un 23 % de las calorías procedía de las proteínas, un 36 % de los carbohidratos y un 41 % de las grasas. Las proteínas eran de origen vegetal (soja). Las grasas saturadas procedían principalmente de aceite de palma y de grasas animales, después de aceite de cártamo, mientras que las grasas poliinsaturadas procedían principalmente de aceite de oliva y de aceite de cártamo. Se aumentó el contenido en biotina (2 mg/kg), ácido fólico (10 mg/kg), niacina (37 mg/kg) y ácido pantoténico (40 mg/kg) en la dieta para todos los animales en comparación con las recomendaciones dietéticas para un hámster. Esta medida preventiva se tomó para reducir el riesgo de deficiencias vitamínicas en los animales que recibían el TMC. El TMC tiene una potencial afinidad por estas vitaminas solubles en agua cargadas negativamente, y por lo tanto aumenta el riesgo de malabsorción.

50 Después de cuatro semanas de la dieta rica, después del desarrollo de la hipercolesterolemia, se incorporaron los tratamientos en la dieta. Para hacer esto, la dieta se pulverizó usando un procesador de alimentos, y los diversos tratamientos - celulosa microcristalina (Sigma-Aldrich Canadá Ltd., Oakville, ON), colestiramina (Sigma-Aldrich Canadá Ltd.) y TMC - fueron incorporados en la dieta en una cantidad del 1 %. Teniendo el TMC un cierto contenido en yoduro (0,005 %), la ingesta diaria de yodo para los animales tratados con el TMC era ligeramente superior a los 0,04 mg/kg para un animal que consumía 12 g de alimento al día.

55 2.4 Análisis del colesterol y de los triglicéridos

60 El análisis del colesterol total, de las HDL y de los triglicéridos se llevó a cabo después de un período de aclimatación (semana -4) y cuatro semanas después del inicio de la dieta rica (semana 0). Estas pruebas se llevaron a cabo en primer lugar para establecer si la dieta da como resultado una hipercolesterolemia, en segundo lugar para permitir la formación de tres grupos uniformes al respecto de estos parámetros. Posteriormente, las pruebas se repitieron dos y cuatro semanas después del iniciado el tratamiento. Los animales ayunaron 12 horas antes de la recolección de las muestras sanguíneas necesarias para la medición del colesterol y de los triglicéridos. La recolección de estas muestras sanguíneas se llevó a cabo mediante una punción intravenosa bajo una anestesia general con isoflurano. Después de la preparación del plasma, las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su análisis.

El método usado para el análisis de los lípidos plasmáticos (Lemieux C, Gelinas Y Lalonde J Labrie F, Cianflone K, Deshaies Y. 2005. Hypolipidemic action of the SERM acolbifene is associated with decreased liver MTP and increased SR-BI and LDL receptors. *J Lipid Res* 46: 1285-94) ha sido adaptado para permitir la lectura en microplaca usando una espectrofotometría. La determinación de los triglicéridos y del colesterol se llevó a cabo usando unos kits comerciales de Roche Diagnostics (TG # 11877771216 & CHOL # 1491458). Para cada uno de estos kits, Roche Diagnostics asegura una linealidad en la medición de los triglicéridos plasmáticos para unos valores de entre 0,05 y 11,3 mmol/l, y para la medición del colesterol, para unos valores de entre 0,08 y 20,70 mmol/l. Se creó una curva patrón a partir de suero humano liofilizado (Roche Diagnostics, # 12016630122) para cada análisis lipídico, tanto para los triglicéridos como para el colesterol. Validamos nuestra curva patrón con un "patológico" de referencia (Précipatl®, # 11285874-122) suministrado por Roche Diagnostics, y que contenía unas elevadas concentraciones de triglicéridos (3,80 mmol/l con un intervalo de confianza de entre 3,23 y 4,37) y de colesterol (7,56 mmol/l con un intervalo de confianza de entre 6,42 y 8,70). Este control patológico relativamente alto en los lípidos séricos también confirma la fiabilidad del análisis para las muestras con un elevado contenido en grasa.

2.5 Análisis bioquímico del suero

Al final del proyecto se recogió una muestra sanguínea terminal mediante una punción cardiaca bajo anestesia general con isoflurano, según recomienda el Canadian Council on Animal Care (CCAC). La sangre se transfirió a un tubo de Eppendorf y después se dejó a la temperatura ambiente durante entre 30 y 60 minutos para permitir la coagulación. Los tubos se centrifugaron a una fuerza centrífuga relativa (rcf) de 1.500 a 4 °C durante diez minutos. La porción de suero de cada muestra sanguínea se transfirió a continuación a tubos de Eppendorf para un posterior análisis en el laboratorio. El análisis bioquímico del suero se llevó a cabo en las cuatro horas posteriores a la recolección de las muestras.

2.6 Análisis estadístico

Se usó la prueba de Student con un intervalo de confianza del 95 % para evaluar el efecto de la dieta sobre el colesterol plasmático total, las HDL, las no HDL, la proporción HDL/no HDL y los triglicéridos (programa informático Prism). Se usó un análisis de la varianza (ANOVA) con los criterios (tiempo y tratamiento), con un intervalo del 95 % para comparar los niveles plasmáticos de colesterol total, de HDL, de no HDL, de la proporción HDL/no HDL y de triglicéridos entre los grupos de tratamiento (TMC y colestiramina) y el grupo de control (celulosa). El análisis post-hoc que se usó en este estudio es la comparación múltiple de Bonferroni.

3 Resultados

3.1 Desarrollo de la hipercolesterolemia

La Tabla 1 resume los resultados del análisis de los lípidos obtenidos antes del inicio de la dieta rica y después de cuatro semanas de consumo de la dieta rica.

Tabla 1: desarrollo de un colesterol elevado

	Colesterol total (mmol/l)	HDL (mmol/l)	No HDL (mmol/l)	Proporción	TG (mmol/l)	Peso corporal (g)
Antes de la dieta rica	3,13 ± 0,09	1,73 ± 0,06	1,40 ± 0,06	1,30 ± 0,10	2,57 ± 0,23	141 ± 2
Después de la dieta rica	6,57 ± 0,15 *	3,27 ± 0,07 *	3,30 ± 0,11 *	1,01 ± 0,04 *	6,04 ± 0,31 *	162,3 ± 3 *

Todas las cifras son los promedios ± error estándar
 * P < 0,05: diferencia significativa entre las mediciones tomadas antes (semana -4) y después (semana 0) de la dieta rica según la prueba de Student.

Estos resultados demuestran que los niveles plasmáticos de colesterol total, de HDL, de colesterol no HDL y de triglicéridos se han duplicado después de cuatro semanas de consumo de la dieta rica en grasas saturadas y que contiene un 0,18 % de colesterol. Además, la proporción de colesterol HDL / no HDL aumentó un promedio de entre 1,30 y 1,01, lo que refleja la mayor ingesta de no HDL en comparación con HDL.

A partir de estos resultados de las pruebas plasmáticas realizadas al final de las cuatro semanas de consumo de la dieta rica, se realizó la distribución de los animales con objeto de obtener tres grupos hipercolesterolémicos, con una media y un error estándar comparables para cada uno de estos parámetros (Tabla 2).

Tabla 2: formación de grupos uniformes

Grupo	Colesterol total (mmol/l)	HDL (mmol/l)	No HDL (mmol/l)	Proporción	TG (mmol/l)	Peso corporal (g)
Celulosa	6,58 ± 0,24	3,25 ± 0,14	3,32 ± 0,16	0,99 ± 0,16	6,08 ± 0,48	166,75 ± 5,06
TMC	6,60 ± 0,26	3,26 ± 0,02	3,34 ± 0,19	0,99 ± 0,05	6,17 ± 0,46	162,00 ± 4,36
Colestiramina	6,54 ± 0,29	3,30 ± 0,14	3,24 ± 0,25	1,05 ± 0,25	5,87 ± 0,71	157,50 ± 3,74

Todas las cifras son los promedios ± error estándar

3.2 Efectos del TMC y de la colestiramina

5 A lo largo del estudio se midió el peso corporal cada semana y el consumo de alimento se estimó en la misma frecuencia para cada hámster. Estos resultados se muestran en la Figura 4, que muestra los cambios en el peso corporal durante las cuatro semanas de tratamiento con celulosa (cuadrado), con TMC (rombo) o con colestiramina (triángulo). En esta figura, * significa $P < 0,05$: diferencia significativa entre los grupos tratados y los grupos de control, independientemente del tiempo, según el criterio de clasificación del ANOVA 2.

10 La primera semana del tratamiento con TMC se observó una pérdida de peso corporal de 4,25 g de media en los hámsteres que recibían este tratamiento (Figura 4). Por el contrario, los grupos que recibían celulosa o colestiramina tenían una ganancia de peso de entre 1,50 y 1,75 g, respectivamente, durante el mismo periodo. Se observó una pérdida adicional de peso corporal de 4,75 g de media en los hámsteres que recibían el TMC durante la segunda semana de tratamiento (Figura 4). Sin embargo, el peso corporal de los hámsteres de los otros dos grupos era relativamente estable. Debería mencionarse que la pérdida de peso corporal en los hámsteres que recibían el TMC era muy variable entre un individuo y otro, estando los extremos en 19 g para el hámster que había perdido el mayor peso corporal en las primeras dos semanas, y en 1 g para el hámster con menor pérdida de peso. A lo largo de las siguientes dos semanas, el peso corporal de los hámsteres que recibían el TMC se había estabilizado. La monitorización del consumo de alimento de cada grupo sugiere que no hay ninguna diferencia estadística entre el grupo tratado con TMC y el grupo de control. Una reducción en el consumo de alimento en el grupo tratado con TMC no parece explicar la pérdida de peso asociada con este tratamiento.

15 La diferencia significativa entre el peso corporal del grupo tratado con colestiramina y el grupo de control (Figura 4) procede principalmente de la diferencia inicial de 9,25 g entre estos dos grupos. Esta diferencia no era significativa en la formación de grupos, pero el ANOVA ha alcanzado el nivel de significación, dado que la diferencia permanecía constante a lo largo de las cuatro semanas de tratamiento. Cuando se analiza estadísticamente la ganancia de peso entre los grupos, no hay ninguna diferencia significativa evidente entre el grupo tratado con colestiramina y el grupo de control.

20 Los resultados de la prueba relativos al colesterol plasmático y no HDL y HDL se presentan en las Figuras 5 y 6, respectivamente.

25 El colesterol total (símbolos negros) y el no HDL plasmático (VLDL, LDL y MDL - símbolos grises) durante las cuatro semanas de tratamiento con celulosa (cuadrado), con TMC (rombo) o con colestiramina (triángulo) se muestran en la Figura 5. En esta figura, * significa $P < 0,05$: diferencia significativa entre los grupos tratados y el grupo de control en las semanas indicadas por el análisis post-hoc de Bonferroni. Esta figura muestra que el colesterol total y el no HDL siguen aproximadamente la misma tendencia en todo el tratamiento.

30 Los cambios en las HDL durante las cuatro semanas de tratamiento con celulosa (cuadrado), con TMC (rombo) o con colestiramina (triángulo) se muestran en la Figura 6. En esta figura, * significa $P < 0,05$: diferencia significativa entre el grupo tratado con TMC y el grupo de control en la segunda semana, después entre el grupo tratado con colestiramina y el grupo de control en la cuarta semana de tratamiento, según el análisis post-hoc de Bonferroni.

35 El TMC redujo significativamente el colesterol total en comparación con el grupo de control que recibía la celulosa (Figura 5). Al final de las cuatro semanas de tratamiento, la reducción en el no HDL plasmático por parte del TMC era del 19 % (Figura 5) y la de las HDL era del 7 % (Figura 6). Por lo tanto, aunque no se alcanzó el nivel de significación, el TMC ha mejorado en un 13 % la proporción de HDL / no HDL (Figura 7) después de cuatro semanas de tratamiento.

40 La colestiramina redujo significativamente el colesterol plasmático total, el no HDL (Figura 5) y las HDL (Figura 6). Considerando el efecto de reducir la mayor disminución en el no HDL (38 %, Figura 5) que en las HDL (26 %, Figura 6), la colestiramina ha producido una mejora en la proporción HDL/no HDL (Figura 7) pero de una forma no significativa.

45 La Figura 7 muestra la proporción de HDL / no HDL durante las cuatro semanas de tratamiento con celulosa (cuadrado), con TMC (rombo) o con colestiramina (triángulo).

En la cuarta semana de tratamiento, el TMC había producido una disminución no significativa del 13 % en los triglicéridos plasmáticos en comparación con el grupo de control que recibía la celulosa (Figura 8). En comparación, la colestiramina provocó una reducción significativa del 38 % en los triglicéridos plasmáticos en comparación con el grupo de control (Figura 8).

5 La Figura 8 muestra los triglicéridos en las cuatro semanas de tratamiento con celulosa (cuadrado), con TMC (rombo) y con colestiramina (triángulo). En esta figura, * significa $P < 0,05$ entre el grupo tratado con colestiramina y el grupo de control en la cuarta semana de tratamiento, según el análisis post-hoc de Bonferroni.

10 El propósito de este estudio era probar el potencial del TMC como agente hipocolesterolemiante, usando un modelo animal de trastorno lipídico. El TMC es un secuestrante de ácidos biliares, que provoca su eliminación con las heces.

15 Al unirse a los ácidos biliares, impide su reabsorción enterohepática. El principal precursor de los ácidos biliares es el colesterol, la mayor parte del cual normalmente es recuperado cuando los ácidos biliares son reabsorbidos en el intestino y devueltos al hígado a través de la circulación. Las resinas que se unen a los ácidos biliares, tales como la colestiramina, también inhiben la reabsorción de los ácidos biliares. La excreción de sales biliares aumenta por lo tanto diez veces. Esto da lugar a un aumento en la producción de ácidos biliares por parte del hígado, que da como resultado una pérdida de colesterol. Esto tiene el efecto de aumentar la actividad del receptor de las LDL. El resultado neto es una disminución en las LDL plasmáticas de entre aproximadamente un 10 y un 35 %. Dado que estos agentes de unión a los ácidos biliares no son absorbidos, no se asocia ningún efecto sistémico significativo con ellos.

20 Una de los posibles efectos secundarios del TMC es una deficiencia vitamínica. Esto está asociado con la afinidad del TMC por ciertas vitaminas solubles en agua cargadas negativamente. Para investigar el efecto hipocolesterolemiante del TMC e impedir dichos efectos secundarios, se aumentó el nivel de ciertas vitaminas en la dieta rica (Sección 2.3). Dado que un exceso de estas vitaminas puede tener un efecto sobre la salud y el colesterol plasmático (véase Luria MH. 1988. Effect of low-dosis niacin on high-density lipoprotein cholesterol and total cholesterol/high-density lipoprotein cholesterol ratio. Arch Intern Med 148: 2493-5 y Johansson J, Carlson LA. 1990 The effects of nicotinic acid treatment on high density lipoprotein particle size subclass levels in hiperlipidaemic subjects. Atherosclerosis 83: 207-16), el complemento vitamínico era limitado para evitar efectos secundarios.

Adicionalmente, todos los animales recibieron esta dieta que contenía un mayor nivel de vitaminas, de forma que se evite un sesgo entre los tres grupos.

35 Los nutrientes contenidos en la dieta hipercolesterolemica también fueron sometidos a un riguroso proceso de cribado. Necesitábamos establecer una dieta que aspirase a desarrollar un modelo de trastorno lipídico en hámsteres, teniendo en consideración que el modelo puede reproducir de forma aproximada las condiciones que se encuentran en los seres humanos. El modelo animal de trastorno lipídico desarrollado implicaba inicialmente el consumo de una dieta cuya principal proteína era la caseína. La caseína contribuye a un aumento más importante en el colesterol plasmático en comparación con la proteína de soja, y según algunos autores, el contenido en proteína vegetal en lugar de animal contribuye a reducir la eliminación de esteroides, a alteraciones en la expresión de algunos receptores implicados en el metabolismo de las lipoproteínas, etc. (véase Beynen AC, West CE, Van Raaij JM, Katan MB. 1984. Dietary soybean protein and serum cholesterol. Am J Clin Nutr 39: 840-1; Fernández ML, Wilson TA, Conde K, Vergara-Jiménez M, Nicolosi RJ. 1999. Hamsters and guinea pigs differ in their plasma lipoprotein cholesterol distribution when fed diets varying in animal protein, soluble fiber, o cholesterol content. J Nutr 129: 1323-32; Terpstra AH, Holmes JC, Nicolosi RJ. 1991. The hypocholesterolemic effect of dietary soybean protein vs. casein in hamsters fed cholesterol-free or cholesterol-enriched semipurified diets. J Nutr 121: 944-7; y Beynen AC. 1990. Comparison of the mechanisms proposed to explain the hypocholesterolemic effect of soybean protein versus casein in experimental animals. J Nutr Sci Vitaminol (Tokio) 36 Supl. 2: S87-93).

50 La elevada variación interindividual provocada por la combinación de proteína animal y colesterol en comparación con la observada por la combinación de proteína vegetal y colesterol (Terpstra AH, Holmes JC, Nicolosi RJ. 1991. The hypocholesterolemic effect of dietary soybean protein vs. casein in hamsters fed cholesterol-free or cholesterol-enriched semipurified diets. J Nutr 121: 944-7) nos motivaron a optar por esta segunda alternativa. Además, se llevaron a cabo estudios con hámsteres en los que se usó colestiramina como control positivo con dietas que contienen como fuente de proteína la semilla de soja (véase Wilson TA, Nicolosi RJ, Rogers EJ, Sacchiero R, Goldberg DJ. 1998. Studies of cholesterol and bile acid metabolism, and early atherogenesis in hamsters fed GT16-239, a novel bile acid sequestrant (BAS). Atherosclerosis 140: 315-24, y Daggy BP, O'Connell NC, Jerdack GR, Stinson BA, Setchell KD. 1997. Additive hypocholesterolemic effect of psyllium and cholestyramine in the hamster: influence on fecal sterol and bile acid profiles. J Lipid Res 38: 491-502). Con respecto a la cantidad de colesterol presente en la dieta normal de los seres humanos, el nivel es de aproximadamente 100-300 mg/1.000 kilocalorías consumidas. El nivel de contenido en colesterol en la dieta en la dieta preparada por el proyecto actual era de 406 mg/1.000 kilocalorías consumidas. Con respecto al contenido en grasas de la dieta, era del 20 % en peso (g) o del 41 % en términos de ingesta calórica (Sección 2.3), grasas que tienen una ingesta calórica (kcal/g) mayor que la de los carbohidratos o la de las proteínas. La principal fuente de grasas saturadas contenida en la dieta rica elegida era el aceite de palma y las grasas animales, y después el aceite de cártamo, mientras que las grasas insaturadas

procedían del aceite de oliva y del aceite de cártamo. La combinación de grasas saturadas y colesterol en la dieta hipercolesterolémica reprodujo bastante bien una dieta rica consumida por la población de seres humanos, y aseguraba que los niveles plasmáticos de colesterol aumentarían significativamente en los hámsteres alimentados con esta dieta (Fernández ML, Wilson TA, Conde K, Vergara-Jiménez M, Nicolosi RJ. 1999. Hamsters and guinea pigs differ in their plasma lipoprotein cholesterol distribution when fed diets varying in animal protein, soluble fiber, o cholesterol content. J Nutr 129: 1323-32).

El TMC, administrado en una cantidad del 1 % en la dieta durante cuatro semanas, mostró un efecto hipocolesterolemizante sobre el nivel de colesterol total. Las HDL disminuyeron ligeramente (7 %) por el tratamiento con el TMC, mientras que el colesterol no HDL estaba reducido más significativamente (19 %), lo que tenía el efecto de favorecer una mejor proporción de HDL/no HDL. El efecto más deseado después de la terapia reductora del colesterol era reducir el colesterol no HDL sin afectar a las HDL. Por lo tanto, el hecho de que el TMC produjera una mayor reducción en el no HDL en comparación con el HDL es positivo. No parece que el TMC afecte a los niveles plasmáticos de triglicéridos.

La colestiramina, un fármaco hipocolesterolemizante ya comercializado, sirvió como control positivo en este estudio.

Provocó una reducción significativa en el colesterol plasmático total, en el no HDL y en las HDL. Redujo el nivel del no HDL (38 %) más que los niveles de las HDL (26 %), y por lo tanto mejoró la proporción de HDL / no HDL de una forma comparable a la del TMC. La reducción en el colesterol total era mayor con la colestiramina que con el TMC. Además, el nivel de triglicéridos plasmáticos estaba significativamente reducido con la colestiramina. Los resultados que obtuvimos con la colestiramina en los hámsteres corroboraron los notificados por otros autores (Wilson TA, Nicolosi RJ, Rogers EJ, Sacchiero R, Goldberg DJ. 1998. Studies of cholesterol and bile acid metabolism, and early atherogenesis in hamsters fed GT16-239, a novel bile acid sequestrant (BAS). Atherosclerosis 140: 315-24 y Nicolosi RJ, Wilson TA, Krause BR. 1998. The ACAT inhibitor, CI-1011 is effective in the prevention and regression of aortic fatty streak area in hamsters. Atherosclerosis 137: 77-85).

Al final del experimento *in vivo* se llevaron a cabo pruebas sanguíneas en los hámsteres (los tratados con TMC y el control negativo). Estas pruebas incluyen la concentración de albúmina, ALT (SGPT), ALT (SGOT), bilirrubina total, CK, creatinina, gamma-GT (GGT), glucosa, proteínas totales, proporción A/G, nitrógeno ureico (BUN) y globulina. Los resultados eran similares entre los dos grupos de hámsteres.

Ejemplo 5 - Efecto antimicrobiano del TMC

Se evaluó el efecto antimicrobiano del TMC a seis concentraciones diferentes (0,5 µg, 5 µg, 50 µg, 500 µg, 5 mg et 50 mg/ml) sobre las bacterias gramnegativas *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, y sobre las bacterias grampositivas *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* beta hemolítico y *Mycobacterium smegmatis*. Los experimentos fueron monitorizados mediante una espectrofotometría a una absorbancia de 600 nm. Las Figuras 9-11 resumen los resultados obtenidos.

Condiciones experimentales

Preparación de la solución de TMC: se disolvieron 0,3006 g de TMC en 6 ml de agua fisiológica para obtener una solución madre a 50 mg/ml. Después se diluyó la solución madre en un factor de 10 para obtener una solución a 5 mg/ml (600 µl de solución madre + 5,4 ml de agua fisiológica). La solución de 5 mg/ml se diluyó adicionalmente en un factor de 10. El proceso se repitió hasta que se obtuvo una solución de 0,5 µg/ml.

Preparación de las diferentes cepas bacterianas usadas: cada cepa fue trasplantada a un caldo nutriente Luria Bertani (LB) previamente pasado por el autoclave. El trasplante se llevó a cabo como sigue: 100 µl de cepa en 10 ml de LB, incubación en un horno a 35 °C entre 12 y 24 horas, medición de la densidad óptica (DO) a una absorbancia de 600 nm.

Experimento con micrófagos: cada cepa se trasplanta en primer lugar en LB con objeto de trabajar con cepas recientes en la fase de crecimiento. Se lleva a cabo una medición de la DO a una absorbancia de 600 nm. Tomando como base la DO obtenida, la solución se diluye en un factor de X con objeto de obtener una DO final cercana a 1,0 (solución de trabajo).

Tabla 3

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R1	Ctrl	0,5µg/ml	5µg/ml	50µg/ml	500µg/ml	5mg/ml	50mg/ml					Ctrl-
B	R2												Ctrl-
C	R3												Ctrl-
D													
E													
F													
G											Blanco	Blanco	Blanco
H													

5 Blanco

Volumen total en cada pocillo: V = 200 µl
 Blanco: 180 µl de LB + 20 µl de agua fisiológica
 Control: 160 µl de LB + 20 µl de cepa + 20 µl de agua fisiológica
 [TMC]: para cada concentración: 160 µl de LB + 20 µl de cepa + 20 µl de la solución de TMC
 Control: 200 µl de LB

15 Se llevó a cabo una DO al comienzo del experimento (TO), después se incubó la totalidad del sistema experimental a 35 °C en un horno. La DO se midió cada hora hasta que se alcanzó la fase estacionaria. Antes de cada medición, el medio experimental se homogeneizó (usando una microplaca a 750 rpm). Cada medición se llevó a cabo tres veces.

20 Para cada cepa se presentan los resultados en forma de gráficas que muestran la evolución de la DO frente al tiempo de incubación para cada concentración de TMC: DO = F(t). Posteriormente se calcula la tasa de crecimiento usando la siguiente fórmula: $\mu = (\log N_t - \log N_0) / (0,301 * t)$

Resultados

25 Los resultados se resumen en las Figuras 9-11. Como puede observarse en la Figura 9, el efecto del TMC es similar sobre todas las cepas. Las tasas de crecimiento de *E. coli* y de *P. aeruginosa*, aunque todavía son altas, disminuyen ligeramente según aumenta la concentración de TMC. El crecimiento máximo, alcanzado para las dos mayores concentraciones de TMC (5 y 50 mg/ml), es significativamente menor que para el control. Estos resultados sugieren que el TMC tiene un efecto bacteriostático, es decir, el TMC a unas concentraciones mayores o iguales a 5 mg/ml, limita la multiplicación de las bacterias. Se aprecia una actividad similar para el TMC a una concentración de 500 µg/ml. De hecho, el crecimiento máximo es significativamente menor que para el control. Sin embargo, el efecto bacteriostático del TMC a esta concentración es significativamente menor que para el TMC a unas concentraciones mayores (5 y 50 mg/ml). Se aprecia que para las concentraciones de TMC por debajo de 500 µg/ml, no se observa ningún efecto relevante sobre el crecimiento de las dos cepas.

35 Las Figuras 10 y 11 muestran los resultados obtenidos para las bacterias grampositivas. Los resultados obtenidos para *S. aureus* y *E. faecalis* (Figura 10) sugieren un efecto bactericida del TMC a unas concentraciones mayores.

40 Las tasas de crecimiento son de hecho bajas, y el crecimiento permanece por debajo de 0,1 para unas concentraciones de TMC mayores o iguales a 5 mg/ml para *S. aureus*, y por encima de 50 mg/ml para *E. faecalis*.

45 El efecto del TMC sobre el crecimiento de *M. smegmatis* (Figura 11) es similar al efecto sobre las dos cepas gramnegativas, *E. coli* y *P. aeruginosa*. A pesar de que hay un crecimiento positivo, el crecimiento máximo, alcanzado para las dos concentraciones más altas (5 y 50 mg/ml), es significativamente menor que para el control y para las demás concentraciones, lo que también sugiere un efecto bacteriostático del TMC a estas dos concentraciones.

Con respecto a la cepa *S. hemolytic*, no parece que el TMC tenga ningún efecto sobre el crecimiento de esta cepa a pesar de la ligera diferencia con el control a una concentración de 50 mg/ml.

50 Tomando como base los resultados anteriores, parece que el TMC tiene (i) un efecto bacteriostático (efecto limitante) sobre el crecimiento de la mayoría de las cepas estudiadas, a unas concentraciones mayores o iguales a 5 mg/ml, y (ii) un efecto bactericida sobre ciertas cepas a unas concentraciones mayores o iguales a 5 mg/ml.

55 Aunque la presente invención se ha descrito anteriormente en el presente documento a través de realizaciones específicas de la misma, puede ser modificada.

Referencias

- 5
- Avadi M. R., Zohuriaan-Mehr M. J., Younessi P., Amini M., Rafiee Tehrani M., Shafiee A., J. Bioact. Compat. Polym., 2003, 18, 469.
- 10
- Bayat A., Sadeghi A. M. M., Avadi M. R., Amini M., Rafiee-Tehrani M., Shafiee A., Majlesi R., Junginger H. E., J. Bioact. Compat. Polym., 2006, 21, 433.
 - Beynen AC, West CE, Van Raaij JM, Katan MB. 1984. Dietary soybean protein and serum cholesterol. Am J Clin Nutr 39: 840-1
 - Beynen AC. 1990. Comparison of the mechanisms proposed to explain the hypocholesterolemic effect of soybean protein versus casein in experimental animals. J Nutr Sci Vitaminol (Tokio) 36 Supl. 2: S87-93
- 15
- Biopolymers, Vol. 6: Polysaccharides II: Polysaccharides from Eukaryotes, Vandamme E. J., De Baets S., Steinbüchel A., Wiley-VCH, Nueva York, 2002, pág. 488.
 - Borchard G., Adv. Drug Delivery Rev., 2001, 52, 145.
- 20
- Britto D., Assis B. G. O., Carbohidr. Polym., 2007, 69, 305.
 - Britto D., Assis B. G. O., Intl. J. Biol. Macromol., 2007, 41, 198.
 - Britto D., Campana-Filho S. P., Polym. Degrad. Stab., 2004, 84, 353.
- 25
- Britto D., Forato L. A., Assis O. B. G., Carbohidr. Polym., 2008, 74, 86-91.
 - Cafaggi S., Russo E., Stefani R., Leardi R., Caviglioli G., Parodi B., Bignardi G., Totero D., Aiello C., Viale M., J. Control. Release, 2007, 121, 110-123.
- 30
- Cationic cellulosic polymers with multifunctional and outstanding performance for personal care, www.dow.com, el 19 de mayo de 2010.
 - Clarke J., Robbins C. R., Reich C., Journal of the society of cosmetic chemists, 1991,42, 341.
- 35
- Cumming J. L., Hawker D. W., Nugent K. W., Chapman H. F., Journal of Environmental Science and Health Parte A, 2008, 43, 113.
 - Curti E., Britto D., Campana-Filho S. P., Macromol. Biosci., 2003, 3, 571-576.
- 40
- Daggy BP, O'Connell NC, Jerdack GR, Stinson BA, Setchell KD. 1997. Additive hypocholesterolemic effect of psyllium and cholestyramine in the hamster: influence on fecal sterol and bile acid profiles. J Lipid Res 38: 491-502
- 45
- Di Colo G., Burgalassi S., Zambito Y., Monti D., Chetoni P., J. Pharm. Sci., 2004, 93, 2851-2862.
 - Dodane, V. et al. "Effect of chitosan on epithelial permeability and structure," Int. J. Pharm. 10 de mayo de 1999; 182 (1): 21-32.
- 50
- Dodou D., Breedveld P., Wieringa P. A., Euro. J. Pharm. Biopharm., 2005, 60, 1.
 - Drovetskaya T. V., Kreeger R. L., Amos J. L., Davis C. B., Zhou S., Journal of Cosmetic Science, 2004, 55, S195.
- 55
- Dung P., Milas M., Rinaudo M., Desbrières J., Carbohidr. Polym., 1994, 24, 209-214.
 - El-Sharif, A. A. et al. Curr. Microbiol., 2011,62, 739-745.
- 60
- Fernández ML, Wilson TA, Conde K, Vergara-Jiménez M, Nicolosi RJ. 1999. Hamsters and guinea pigs differ in their plasma lipoprotein cholesterol distribution when fed diets varying in animal protein, soluble fiber, or cholesterol content. J Nutr 129: 1323-32
 - Florea B. I., Thanou M., Junginger H. E., Borchard G., J. Control. Release, 2006, 110, 353.
- 65
- Gruber J. V., Journal of Cosmetic Science, 2009, 60, 385.

- Hamman J. H., Kotzé A. F., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2001, 27, 373-380.
- Hamman J. H., Stander M., Junginger H. E., Kotzé A. F., *S. T. P. Pharma Sci.*, 2000, 10, 35.
- 5 ■ Harding J. R., Jones J. R., Lu S.-Y., Wood R., *Tetrahedron Lett.*, 2002, 43, 9487-9488.
- Illum, L. et al. "Chitosan as a novel nasal delivery system for peptide drugs," *Pharm. Res.* Agosto de 1994; 11 (8): 1186-9.
- 10 ■ Jia Z., Shen D., Xu W., *Carbohydr. Res.*, 2001,333, 1.
- Johansson J, Carlson LA. 1990. The effects of nicotinic acid treatment on high density lipoprotein particle size subclass levels in hiperlipidaemic subjects. *Atherosclerosis* 83: 207-16
- 15 ■ Kean T., Roth S., Thanou M., *J. Control. Release*, 2005, 103, 643.
- Kenawy, E. et al. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 1359-1384.
- 20 ■ Kim C. H., Choi J. W., Chun H. J., Choi K. S., *Polym. Bull.*, 1997, 38, 387.
- Kotzé A. F., LueßEn H. L., Leeuw B. J., Boer B. G., Verhoef J. C., Junginger H. E., *Pharmaceutical Research*, 1997, 14, 1197.
- 25 ■ Kotzé A. F., Thanou M., Lueben H. L., de Boer A. G., Verhoef J. C., Junginger H. E., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 1999, 47, 269.
- Le Berre A., Delacroix A., *Bull. Soc. Chim. Francia*, 1976, 640, 647.
- 30 ■ Lee J. K., Kim S. U., Kim J. H., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 1999, 63, 833.
- Lee J. K., Kim S. Y., Kim S. U., Kim J. H., *Biotechnol. Appl. Biochem.*, 2002, 35, 181.
- Lemieux C, et al. 2005. *J Lipid Res* 46: 1285-94
- 35 ■ Lim, S. H. et al. *J. Macromol. Sci.-Polym. Rev.*, 2003, C43, 223.
- Luria MH. 1988. *Arch Intern Med* 148: 2493-5
- 40 ■ Muzzarelli R. A. A., Tanfani F., *Carbohydr. Polym.*, 1985, 5, 297.
- Nicolosi RJ, Wilson TA, Krause BR. 1998. *Atherosclerosis* 137: 77-85
- Polnok A., et al., *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 2004, 57, 77-83.
- 45 ■ Runarsson O. V., et al., *Eur. Polym. J.*, 2007, 43, 2660-2671.
- Sahni S., Chopra S., Ahmad F. J., Khar R. K., *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2008, 60, 1111.
- 50 ■ Sieval A. B., Thanou M., Kotzé A. F., Verhoef J. C., Brussee J., Junginger H. E., *Carbohydr. Polym.*, 1998, 36, 157-165.
- Snyman D., Hamman J. H., Kotze J. S., Rollings J. E., Kotzé A. F., *Carbohydr. Polym.*, 2002, 50, 145-150.
- 55 ■ Synman D., Hamman J. H., Kotzé A. F., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 2003, 29, 61.
- Terpstra AH, Holmes JC, Nicolosi RJ. 1991. The hypocholesterolemic effect of dietary soybean protein vs. casein in hamsters fed cholesterol-free or cholesterol-enriched semipurified diets. *J Nutr* 121: 944-7
- 60 ■ Thanou M., Florea B. I. Langemeyer M. W. E., Verhoef J. C., Junginger H. E., *Pharm. Res.*, 2000, 17, 27.
- Thanou M., Kotzé A. F., Scharringhausen T., Leuben H. L., De Boer A. G., Verhoef J. C., Junginger H. E., *J. Controlled Release*, 2000, 64, 15.
- 65 ■ Thanou M., Verhoef J. C., Junginger H. E., *Adv. Drug Delivery Rev.*, 2001,52, 117.
- Thanou M., Verhoef J. C., Verheijden J. H. M., Junginger H. E., *Pharm. Res.*, 2001, 18, 823.

- Thanou, M. et al. "Effect of N-trimetil chitosan chloride, a novel absorption enhancer, on caco-2 intestinal epithelia and the ciliary beat frequency of chicken embryo trachea," *Int. J. Pharm.* Aug. 5, 1999; 185 (1): 73-82.
- 5 ▪ Thanou, M. et al. "Intestinal absorption of octreotide: N-trimetil chitosan chloride (TMC) ameliorates the permeability and absorption properties of the somatostatin analogue in vitro and in vivo," *J. Pharm. Sci.* Jul. 2000; 89 (7): 951-7.
- 10 ▪ Ueno, H. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2001, 52, 105-115.
- 10 ▪ Verheul, R. J., *Biomaterials*, 2008, 29, 3642-3649
- 15 ▪ Wilson TA, Nicolosi RJ, Rogers EJ, Sacchiero R, Goldberg DJ. 1998. Studies of cholesterol and bile acid metabolism, and early atherogenesis in hamsters fed GT16-239, a novel bile acid sequestrant (BAS). *Atherosclerosis* 140: 315-24
- 20 ▪ Documento CA 2507846.
- 20 ▪ Documento CA 2507870.
- 20 ▪ Documento CA 2580460.
- 20 ▪ Documento CA 2623475.
- 25 ▪ Documento CA 2631891.
- 25 ▪ Documento EP 1250118 B1.
- 30 ▪ Documento US5744166.
- 30 ▪ Documento US6207197.
- 30 ▪ Documento US6328967.
- 35 ▪ Documento US6410046.
- 35 ▪ Documento US6726920.
- 40 ▪ Documento US7282194.
- 40 ▪ Documento US7291598.
- 40 ▪ Documento US7381716.
- 45 ▪ Documento US7393666.
- 45 ▪ Documento US7407943.
- 50 ▪ Documento US7427470.
- 50 ▪ Documento US7455830.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la preparación de un *N,N,N*-trimetilquitosano, que comprende:

- 5 a) proporcionar quitosano;
b) metilar el quitosano para producir un *N,N*-dimetilquitosano a través de una reacción de aminación reductora usando formaldehído y ácido fórmico, en el que sustancialmente no se produce *N,N,N*-trimetilquitosano; y
c) metilar el *N,N*-dimetilquitosano usando un agente metilante y una base seleccionada entre una sal de hidróxido o un carbonato o un bicarbonato alcalino, preferentemente hidróxido de sodio o carbonato de sodio, en
10 agua o en agua mezclada con un disolvente miscible con el agua, para producir el *N,N,N*-trimetilquitosano,

en el que el *N,N,N*-trimetilquitosano producido tiene un grado de cuaternización del 46 % o más determinado a partir de la proporción integral del pico de metilo a 3,3 ppm y de los átomos de hidrógeno del piranosilo del *N,N,N*-trimetilquitosano protonado mediante una espectroscopia de RMN, y un grado de O-sustitución del 40 % o menos.

15 2. Un método según la reivindicación 1, en el que el *N,N*-dimetilquitosano tiene un grado de *N*-sustitución (*N*-DS) de 2,0.

20 3. Un método según la reivindicación 1 o 2, en el que el agente metilante es un haluro de metilo o un carbonato de dimetilo.

4. Un método según la reivindicación 3, en el que el agente metilante es yodometano.

25 5. Un método según la reivindicación 1, en el que el disolvente de reacción es agua junto con hasta un 50 % de un alcohol.

6. Un método según la reivindicación 5, donde el disolvente de reacción es agua junto con un 10 % de metanol.

30 7. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que al menos uno de la etapa b) y la etapa c) se lleva a cabo usando un microondas.

8. Un método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende adicionalmente una etapa de añadir HCl, HBr o HI para producir el *N,N,N*-trimetilquitosano con un contraión de cloruro, de bromuro o de yoduro.

35 9. Un método según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el *N,N,N*-trimetilquitosano producido tiene un grado de cuaternización del 46 % o más, y un grado de O-sustitución del 0 %.

40 10. El *N,N,N*-trimetilquitosano que tiene un grado de cuaternización del 46 % o más según se determina partir de la proporción integral del pico de metilo a 3,3 ppm y de los átomos de hidrógeno del piranosilo del *N,N,N*-trimetilquitosano protonado mediante una espectroscopia de RMN, y un grado de O-sustitución del 40 % o menos.

45 11. El *N,N,N*-trimetilquitosano según la reivindicación 10, que tiene un grado de cuaternización del 50 % o más, preferentemente del 55 % o más, más preferentemente del 60 % o más, incluso más preferentemente del 65 % o más, aún más preferentemente del 75 % o más, y lo más preferentemente del 95 % o más.

50 12. El *N,N,N*-trimetilquitosano según la reivindicación 10 u 11, que tiene un grado de O-sustitución del 35 % o menos, preferentemente del 25 % o menos, más preferentemente del 15 % o menos, y lo más preferentemente del 10 % o menos.

55 13. El *N,N,N*-trimetilquitosano según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que tiene un grado de O-sustitución del 0 %.

14. El *N,N,N*-trimetilquitosano según una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, para su uso en el tratamiento de la hipercolesterolemia.

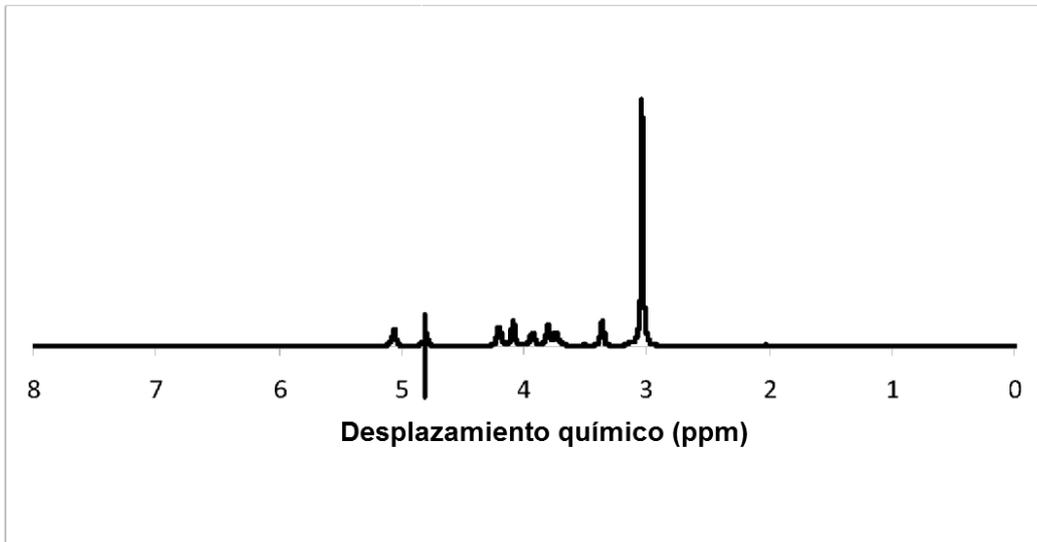


Figura 1

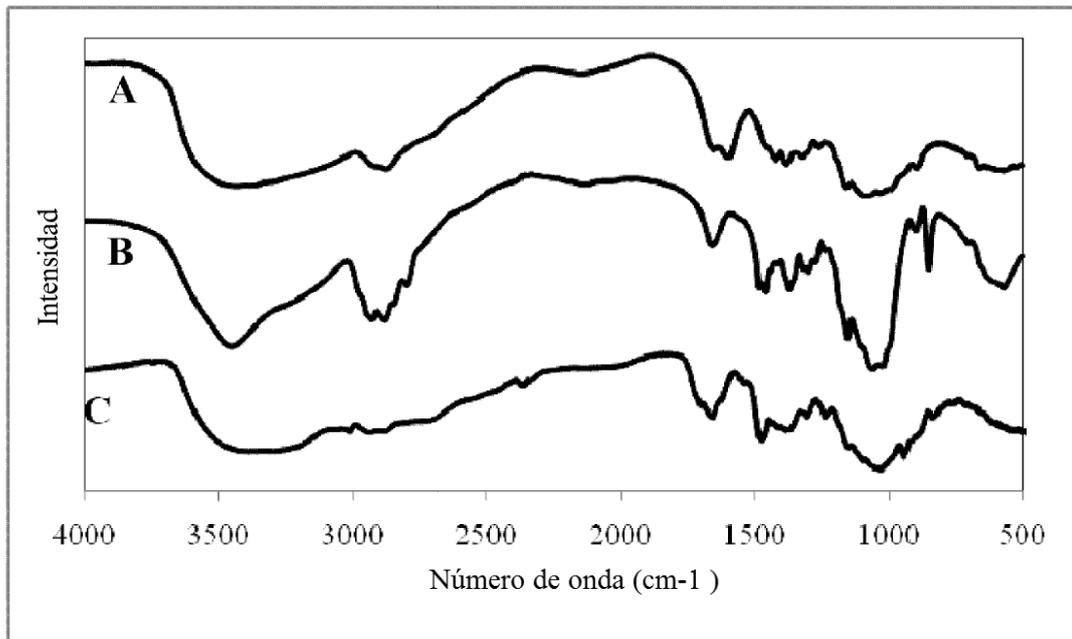


Figura 2

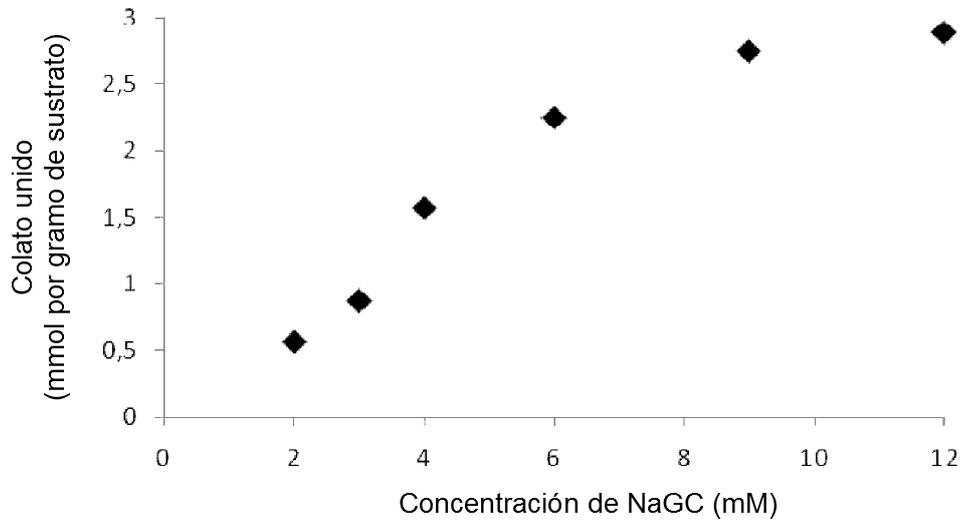


Figura 3

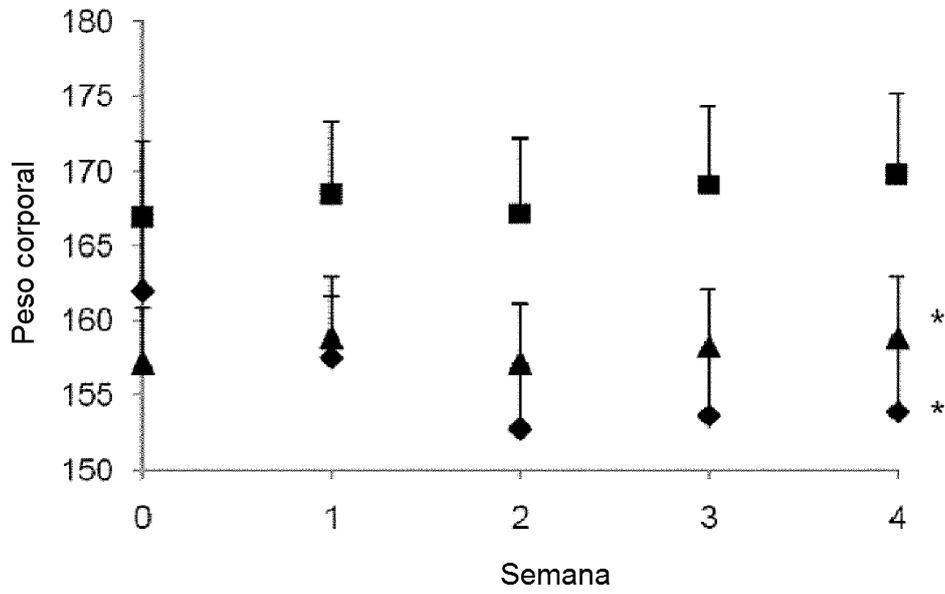


Figura 4

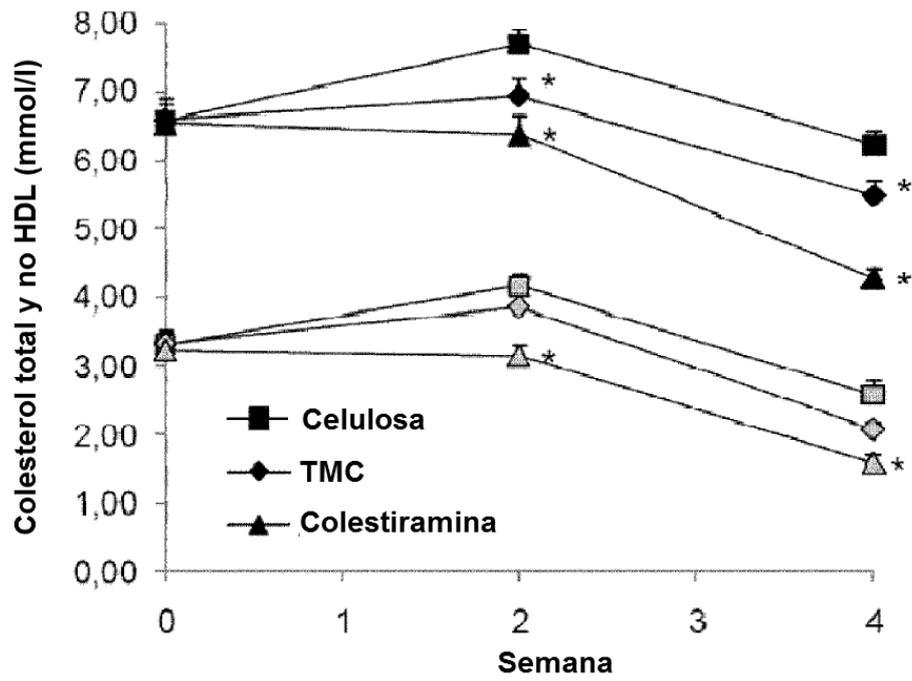


Figura 5

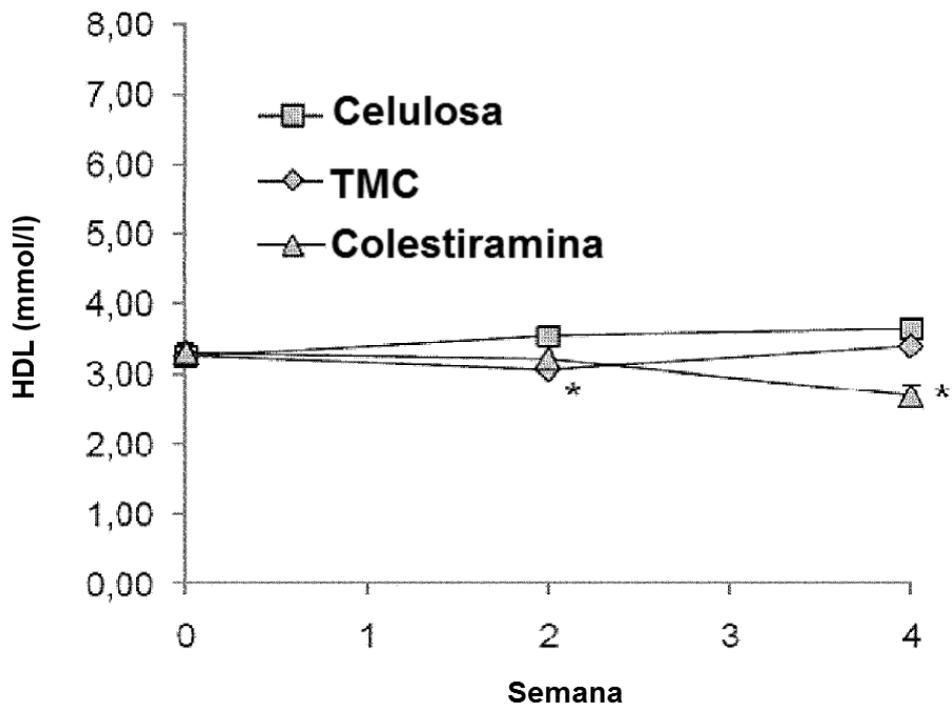


Figura 6

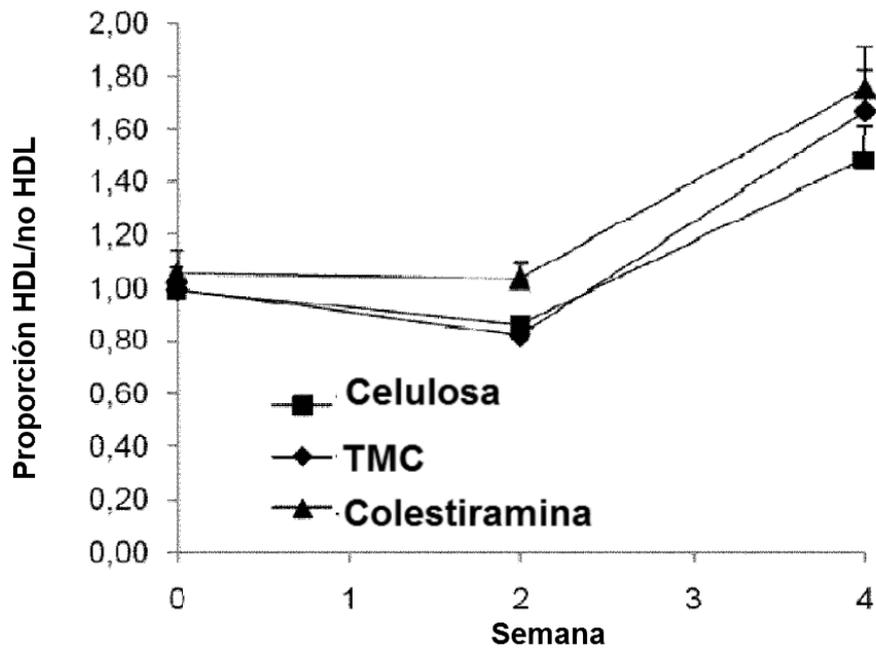


Figura 7

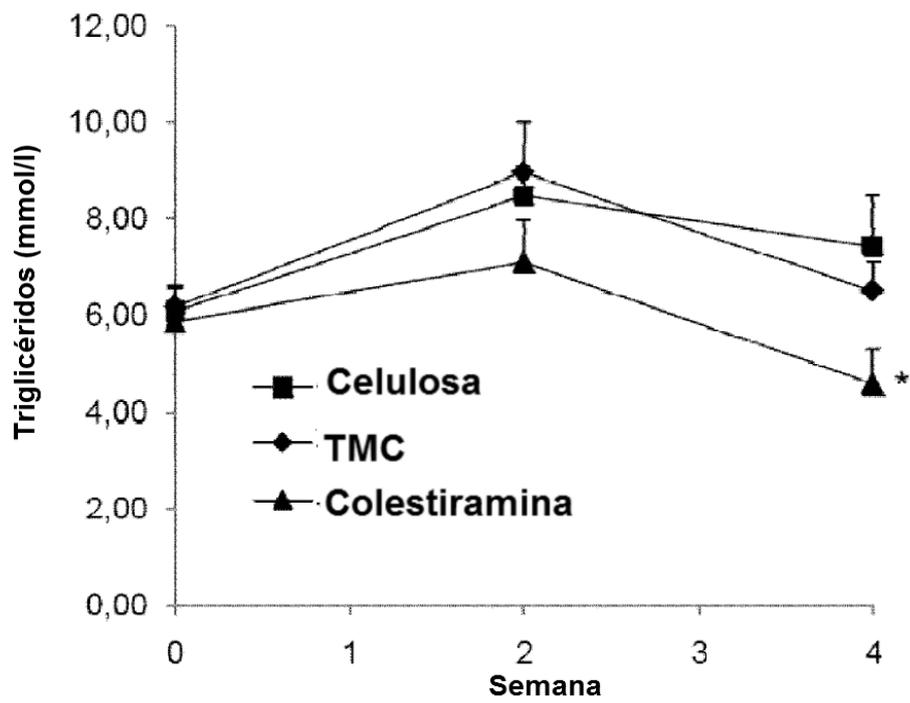


Figura 8

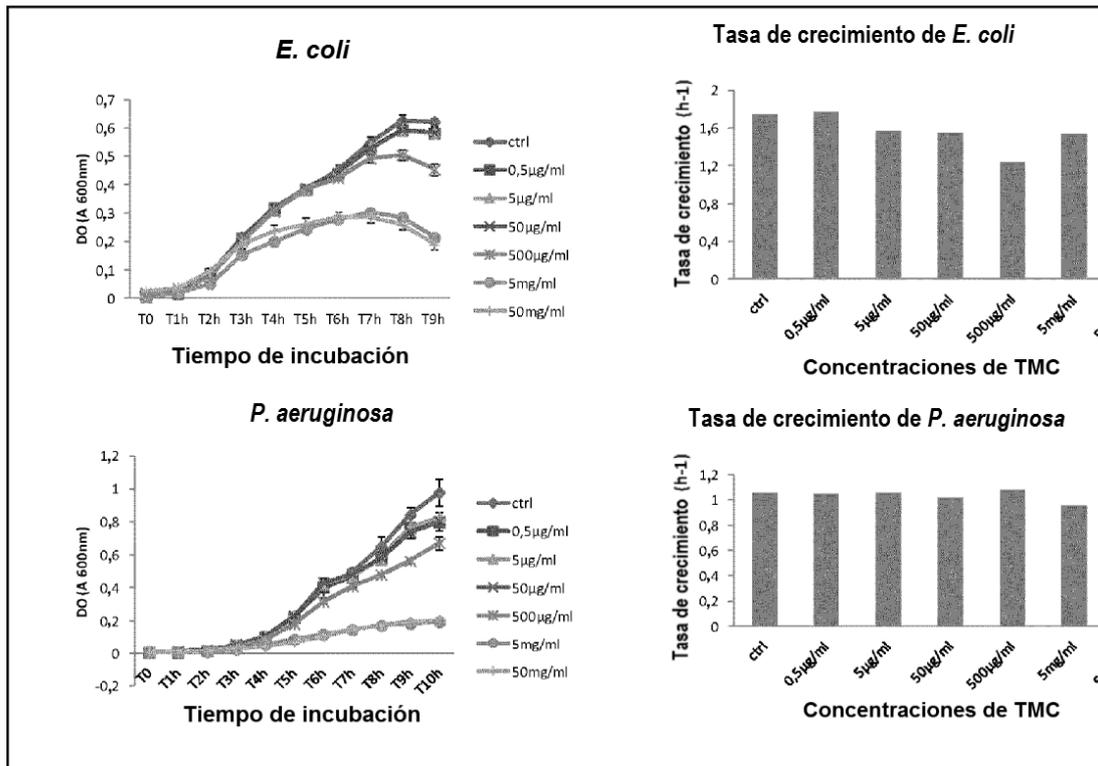


Figura 9

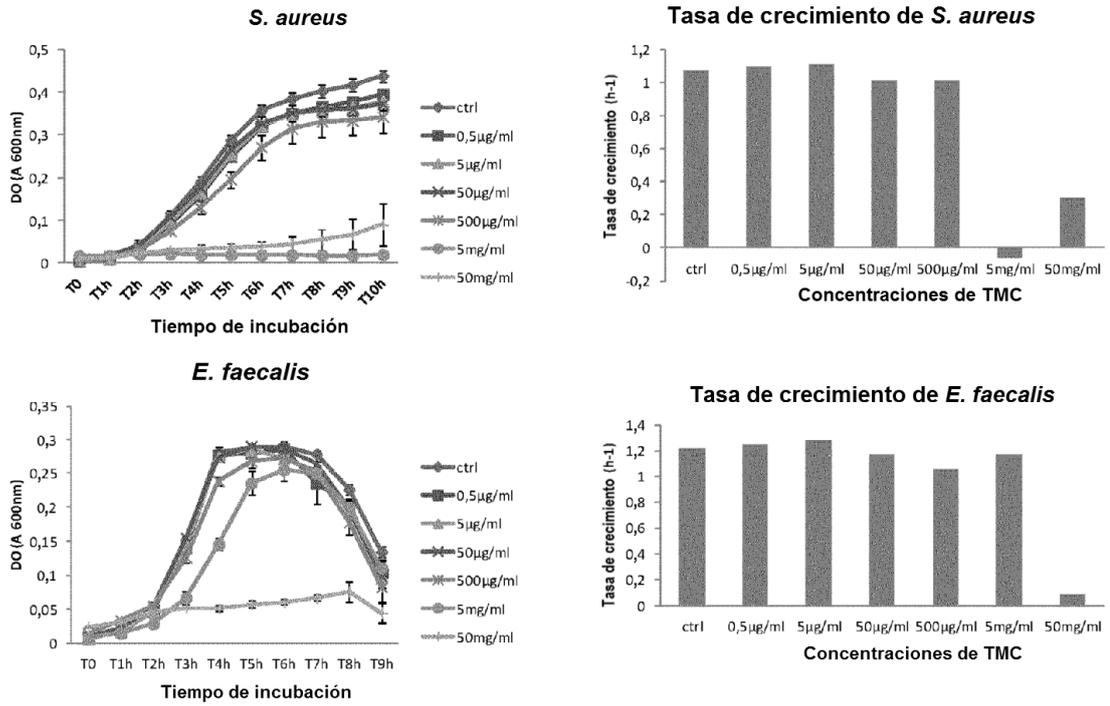


Figura 10

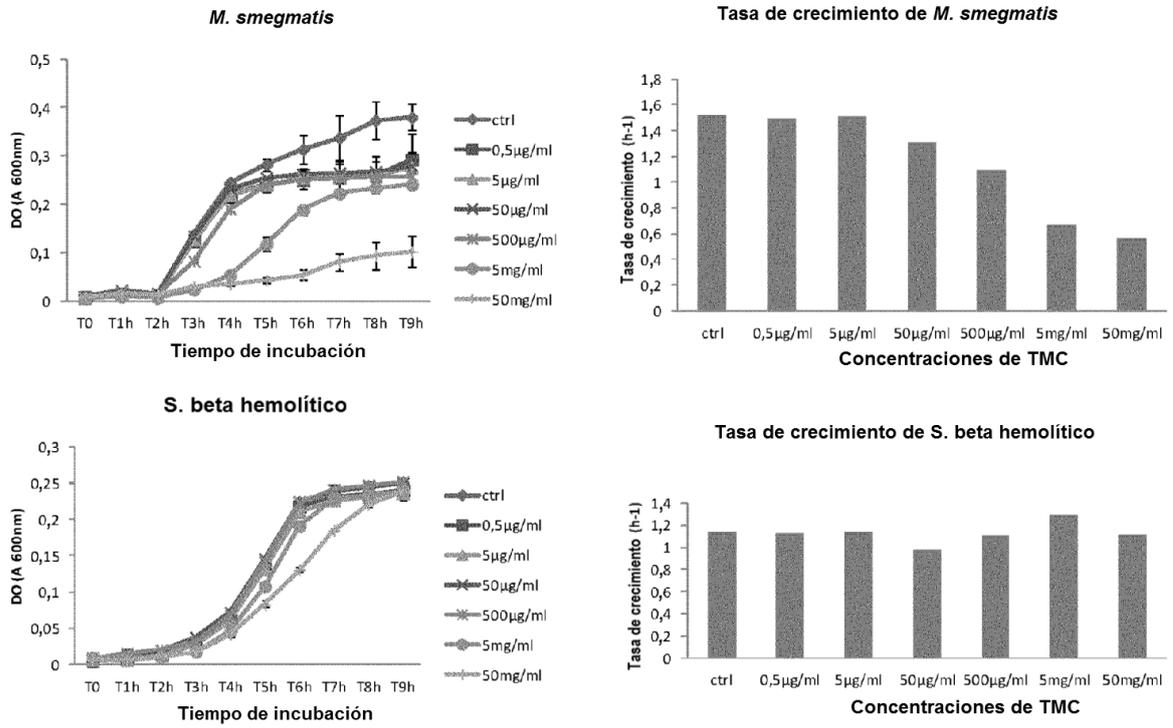


Figura 11