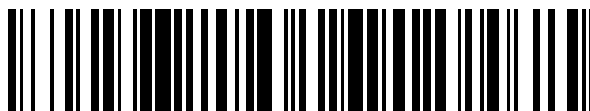


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 662 321**

51 Int. Cl.:

C08B 37/08 (2006.01)

C08L 5/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **22.07.2009 PCT/EP2009/059430**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.01.2010 WO10010122**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.07.2009 E 09800059 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.12.2017 EP 2310422**

54 Título: **Materiales nanocompuestos basados en nanopartículas metálicas estabilizadas con polisacáridos ramificados**

30 Prioridad:

23.07.2008 IT PD20080219

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

06.04.2018

73 Titular/es:

**UNIVERSITA'DEGLI STUDI DI TRIESTE (100.0%)
Piazzale Europa 1
I-34127 Trieste, IT**

72 Inventor/es:

**DONATI, IVAN;
MARSICH, ELEONORA;
TRAVAN, ANDREA y
PAOLETTI, SERGIO**

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 662 321 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

Materiales nanocompuestos basados en nanopartículas metálicas estabilizadas con polisacáridos ramificados

5 **Campo de la invención**

[0001] La presente invención se refiere a materiales nanocompuestos formados por nanopartículas metálicas estabilizadas en una matriz de polisacáridos catiónicos ramificados, a su preparación y uso de los mismos para aplicaciones en el campo biomédico, farmacéutico y alimentario.

10

Estado de la técnica

[0002] La preparación de nanopartículas metálicas es un área de investigación de alto interés nano-tecnológico; de hecho, muchos metales tienen propiedades ópticas, antimicrobianas y catalíticas particulares normalmente asociadas con la escala nanométrica. En particular, la actividad antimicrobiana de amplio espectro de los metales, como por ejemplo la plata, tiene un interés de aplicación notable. Por otro lado, las infecciones bacterianas, fúngicas y virales representan un problema grave en muchas situaciones y, por lo tanto, la implementación de productos con un amplio espectro antimicrobiano es una necesidad particularmente sentida. De hecho, el uso de metales como la plata, el oro, el cobre, el zinc y el níquel en el campo de los materiales antimicrobianos está teniendo una gran influencia en el mercado, especialmente para el tratamiento de lesiones tisulares, de modo que, por ejemplo, compañías como Johnson & Johnson® y Convatec® han comercializado recientemente medicamentos que se basan en las propiedades antibacterianas de las nanopartículas de plata.

15

20

[0003] Las nanopartículas generalmente se obtienen a partir de soluciones de sales metálicas en presencia de un agente reductor y un agente estabilizante, que sirve para evitar que las nanopartículas se agreguen. Para estabilizar las nanopartículas, se usan ampliamente soluciones poliméricas diluidas apropiadas, que permiten obtener sistemas de nanocompuestos en los que las partículas metálicas se dispersan homogéneamente. Para las aplicaciones mencionadas anteriormente, las soluciones de polielectrolitos, tales como polifosfato, poliácido, poli (sulfato de vinilo), poli (alilamina) (Henglein, A., J. Phys. Chem. 1993, 97 (21), 5457-5471), poli (etilenimina) (Kuo, P. L.; Chen, W. F. J. Phys. Chem. B 2003, 107 (41), 11267-11272; Dai et al. (Nano Lett. 2002, 2 (5), 497-501) han sido particularmente eficaces.

25

30

[0004] En general, los componentes requeridos para obtener la formación de nanopartículas metálicas son: una sal metálica adecuada, un agente reductor y un polímero que actúa como estabilizante para la suspensión coloidal.

35

[0005] El documento US 2007/00036031 (Karandikar et al.) describe métodos para la formación de nanopartículas de plata en presencia de un disolvente, un agente estabilizante, un tensioactivo, un agente reductor y calentamiento. Entre los agentes estabilizantes, se mencionan polímeros tales como poliácridamida y polisorbato 20.

40

[0006] En la patente WO2007/147094A2 (Sambhy V. et al.) se describen sistemas de nanocompuestos en matrices poliméricas catiónicas sintéticas, caracterizados por un átomo de nitrógeno ternario o cuaternario, en el que las nanopartículas de estabilización de polímero es un derivado de poli (4-vinil piridina) y se emplea bromuro de plata para formar estas nanopartículas de plata.

45

[0007] La patente WO2007/017901A2 (Omray P. et al.) informa formulaciones de nanopartículas de plata dispersas, por ejemplo, usando polisorbato, propilenglicol y galato de propilo.

[0008] En la patente WO2007/096606A1 (Crowther N. et al.) se describen métodos para liberar nanopartículas metálicas, preparados en presencia de polímeros estabilizantes para aplicaciones antimicrobianas. Entre los polímeros mencionados, se incluyen: poli (ácido metacrílico), poliimidaz, poli (vinilalcohol) y copolímeros de los mismos. La patente WO2007/001453 (Yacaman M. et al.) informa de la síntesis de nanopartículas de plata en presencia de polioles y polímeros mediante el uso de glicerina o etilenglicol, como agente reductor y como nanoestructura disolvente y mediante el uso de poli (vinilpirrolidona) como agente de revestimiento para nanopartículas. Se observa que el mecanismo de reducción química de los iones de plata se basa en la oxidación de los grupos hidroxilo presentes en los polioles y la degradación de los enlaces C-C.

50

55

[0009] Para aplicaciones en el campo biomédico, los sistemas basados en polisacáridos son particularmente interesantes porque estos polímeros generalmente son biocompatibles y por lo tanto adecuados para aplicaciones que implican un contacto directo con tejidos biológicos. Entre los polisacáridos naturales, uno de los más estudiados y empleados a nivel comercial es el quitosano. Este es un polisacárido básico, con un peso molecular de 50 a 1500 kDa, que consiste en una cadena lineal de restos de D-glucosamina (GlcNH₂) unidos por enlaces beta 1 → 4 con las unidades de N-acetil-glucosamina residuales intercaladas de la desacetilación incompleta de la quitina. Este polisacárido generalmente es insoluble en soluciones acuosas neutras o básicas; en soluciones ácidas con un pH igual o inferior a 5, el grupo amino libre está protonado, lo que hace que el polímero sea soluble. Este polímero ya se emplea ampliamente en el campo médico, ya que presenta una respuesta inmunogénica, patológica o infecciosa baja (Suh Francis J.K., Matthew H.W.T. Biomaterials, 2000, 21, 2589-2598; Miyazaki S. et al. Chem. Pharm. Bull.,

60

65

1981, 29, 3067-3069). El quitosano tiene todas las características ideales para ser utilizado como biomaterial debido a sus propiedades físico-químicas, como la alta densidad de carga catiónica en solución ácida, su alta procesabilidad y la capacidad de dar lugar a estructuras porosas donde, por ejemplo, se pueden implantar células. De hecho, se conocen muchos usos del quitosano, tanto en el campo biomédico como en el alimentario. Debido a estas propiedades, tanto el quitosano como sus derivados también se usaron para estabilizar las nanopartículas.

[0010] En la patente WO2007/025917A1 (Schmid H. et al.) se mencionan preparaciones de nanopartículas de plata en presencia de quitosano, así como derivados de quitosano y sales tales como carboximetilquitosano, acetato de quitosano y lactato de quitosano.

[0011] En la patente US 2008/0147019 (Song Xuedong), se añaden nanopartículas de metales preformados disponibles en el mercado a sales de quitosano y derivados de quitosano, pero no a derivados ramificados de naturaleza sacarídica; estas nanopartículas requieren una oxidación adicional para proporcionar una actividad antibacteriana ya que los iones de plata (Ag^+) se apuntan como el único agente antibacteriano.

[0012] En la patente WO2008/076339 (Schauer C et al.), nanopartículas metálicas disponibles en el mercado se incluyen en materiales basados en quitosano reticulados insolubles en agua. Los quitosanos reticulados se usan para preparar películas multicapa para soportar nanopartículas que se usan como agentes colorantes y como sensores para detectar contaminantes en el agua.

[0013] Varias investigaciones recientes se han centrado en mejorar los métodos para potenciar los efectos biológicos del quitosano. En particular, la mayoría de los esfuerzos se han dirigido a aumentar la característica catiónica del polímero o modificar las características químicas y la biodisponibilidad del mismo por medio de modificaciones (bio)químicas.

[0014] En particular, la modificación de quitosano con grupos sacarídicos, por ejemplo insertando unidades de lactosa por medio de una reacción de aminación reductora resultó, como se menciona en el documento US 4.424.346 (Hall, L.D. y Yalpani, M.), en una mayor solubilidad en agua de derivados de quitosano y es de hecho en estas formas derivadas que el quitosano adquiere las propiedades más útiles para su uso como biomaterial altamente biocompatible.

Sumario

[0015] Es un primer objeto de la presente invención obtener un material nanocompuesto, en el que las nanopartículas metálicas se estabilizan y se controlan por tamaño y cuyas propiedades son particularmente adecuadas para aplicaciones en el campo biomédico y óptico (biosensores).

[0016] Es un objeto adicional que dicho nanocompuesto se pueda obtener por medio de un enfoque químico no complejo y económicamente ventajoso, y en particular por soluciones coloidales en las que las nanopartículas metálicas se estabilizan mediante soluciones polisacarídicas apropiadas.

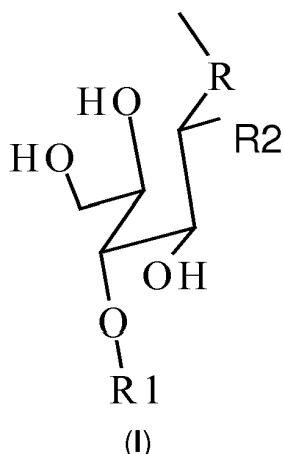
[0017] Es un objeto adicional mejorar estos sistemas empleando polisacáridos fácilmente disponibles en el mercado y evitando que estos polisacáridos sean sometidos a manipulaciones químicas, así como evitando la necesidad de manipulaciones de preparación complejas de estos sistemas.

[0018] Es un objeto adicional obtener sistemas que sean totalmente solubles en sistemas acuosos en condiciones de pH neutro y una fuerza iónica sustancial que se requieren en aplicaciones biomédicas.

[0019] Para lograr los objetos mencionados anteriormente, los inventores desarrollaron sistemas polisacarídicos solubles adecuados basados en polisacáridos catiónicos ramificados que permiten obtener nanopartículas metálicas estables de tamaño controlado. Los procedimientos se basan en mezclar soluciones poliméricas acuosas y soluciones acuosas de sales metálicas en presencia o ausencia de agentes reductores exógenos. Los procedimientos de mezcla se pueden llevar a cabo convenientemente en sistemas acuosos a pH neutro y no requieren calentamiento, ya que pueden llevarse a cabo fácilmente a temperatura ambiente.

[0020] Por lo tanto, en un primer aspecto, un objeto de la presente invención viene dado por materiales nanocompuestos de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizados por que comprenden una matriz polimérica que consiste en polisacáridos catiónicos ramificados y nanopartículas metálicas dispersas en dicha matriz polimérica.

[0021] Los polisacáridos catiónicos preferidos son derivados ramificados del quitosano, en el que las unidades de D-glucosamina que forman la cadena del quitosano lineal se unen, por medio del grupo funcional -NH- en el átomo de carbono C2, a los restos de polioles aldólicos o aldónicos iguales o diferentes entre sí representados por la fórmula general (I):



en la que:

- 5
- R es $-\text{CH}_2-$ o $-\text{CO}-$;
 - R_1 es hidrógeno, un monosacárido, un oligosacárido;
 - R_2 es $-\text{OH}$ o $-\text{NHCOCH}_3$.

10 **[0022]** Por otra parte, los metales de las nanopartículas son preferentemente plata, oro, platino, paladio, cobre, zinc o níquel y mezclas de los mismos.

15 **[0023]** Los materiales nanocompuestos de acuerdo con la invención se pueden preparar en condiciones apropiadas con soluciones acuosas de estos polisacáridos y sales metálicas en presencia o ausencia de agentes reductores exógenos.

20 **[0024]** Por lo tanto, de acuerdo con otro aspecto, es un objeto de la invención un método para preparar estos materiales nanocompuestos que comprende las etapas de:

- 25
- a) preparar soluciones acuosas de polisacáridos catiónicos ramificados a una concentración de hasta el 2 % en p/v;
 - b) preparar soluciones acuosas de sales metálicas a una concentración entre 0,1 mM y 14 mM;
 - c) añadir estas soluciones salinas a soluciones de polisacáridos y mezclar hasta la reducción de los iones metálicos y la formación de soluciones coloidales de nanopartículas metálicas en las que dichas nanopartículas metálicas reducidas con polisacáridos están homogéneamente dispersas.

30 **[0025]** Opcionalmente se añade un agente reductor a las soluciones coloidales obtenidas.

35 **[0026]** De acuerdo con un aspecto adicional, el uso de estos materiales nanocompuestos en el campo biomédico, farmacéutico y alimenticio, por ejemplo como agentes antimicrobianos, o en biosensores moleculares, es otro objeto de la invención.

Breve descripción de las figuras

40 **[0027]**

45 **Figura 1.** La figura muestra la estabilización de nanopartículas de plata en derivados de quitosano con lactosa (en lo sucesivo también denominado Chitlac, número de registro CAS 85941-43-1): las cadenas poliméricas de Chitlac permiten la coordinación y estabilización de nanopartículas metálicas. Las imágenes de TEM, obtenidas mediante un microscopio electrónico de transmisión Philips EM 208, demuestran que las nanopartículas de plata (partículas negras) están ubicadas exactamente en las cadenas poliméricas (estructuras ramificadas grises). Muestra preparada usando chitlac (0,2 % en p/v) y AgNO_3 1 mM (Ejemplo 7).

Figura 2. La figura muestra: **(A)** espectros UV-Vis de nanopartículas de plata formadas en presencia de quitosano (línea discontinua, Ejemplo 22) y Chitlac (línea continua, Ejemplo 7) en las mismas condiciones (polímero al 0,2 % en p/v; AgNO_3 1 mM; ácido ascórbico 0,5 mM ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)); **(B)** Efecto de las concentraciones de Chitlac y AgNO_3 en espectros UV-Vis: Chitlac al 0,4 % en p/v/ AgNO_3 1 mM (línea continua Ejemplo 9); Chitlac al 0,2 % en p/v/ AgNO_3 1 mM (línea discontinua del Ejemplo 7); Chitlac al 0,1 % en p/v/ AgNO_3 1 mM (línea de puntos espaciados... Ejemplo 5); Chitlac al 0,1 % en p/v/ AgNO_3 0,5 mM (línea de puntos cerrados... Ejemplo 4); 0,2 % en p/v de Chitlac/ AgNO_3 0,5 mM (línea de puntos de trazos -.-.- Ejemplo 6); 0,4 % en p/v de Chitlac/ AgNO_3 0,5 mM (línea de trazo, punto y punto -.-.- Ejemplo 8). De acuerdo con la estequiometría de la reacción, en cada

muestra, la relación $\text{AgNO}_3/\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ es 2. La medición se llevó a cabo por medio de un espectrofotómetro CaryE4 UV-visible a una temperatura de 25 °C.

Figura 3. La figura muestra el espectro UV-Vis de nanopartículas de oro formadas en Chitlac en ausencia de agentes reductores exógenos (polímero al 0,2 % en p/v, HAuCl_4 1 mM, Ejemplo 18). La medición se llevó a cabo como se ha descrito previamente en la Figura 2.

Figura 4. La figura muestra los espectros UV-Vis de muestras de Chitlac/ Ag_n al 0,2 % en p/v (con nanopartículas de plata) a diferentes concentraciones de plata en presencia y ausencia de ácido ascórbico. Las muestras se prepararon de acuerdo con los procedimientos descritos en los ejemplos: 7 (AgNO_3 1 mM/ $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,5 mM, línea continua), 10 (AgNO_3 5 mM, línea - · - · -), 11 (AgNO_3 10 mM, línea - · - · - · - · -), 25 (0,2 % en p/v de Chitlac, AgNO_3 1 mM, línea ---). Las mediciones se llevaron a cabo como se ha descrito previamente en la Figura 2.

Figura 5. Imagen de TEM de nanopartículas de plata formadas en Chitlac en ausencia de agentes reductores exógenos (Chitlac al 0,4 % en p/v, AgNO_3 14 mM, Ejemplo 15).

Figura 6. La figura muestra la imagen de TEM de nanopartículas de oro dispersas en Chitlac (Chitlac al 0,2 % en p/v, HAuCl_4 1 mM, Ejemplo 18) en ausencia de agentes reductores exógenos. La medición se llevó a cabo como se ha descrito previamente en la Figura 1.

Figura 7. La figura muestra la distribución de tamaños de nanopartículas de oro dispersas en Chitlac (Chitlac al 0,2 % en p/v, HAuCl_4 1 mM, Ejemplo 18). La medición se llevó a cabo utilizando un sistema Nanosight LM20. El tamaño de partícula está en el intervalo de 10 a 150 nm y la mayoría de las partículas tienen unas dimensiones en torno a 50 nm.

Figura 8. La figura muestra la imagen de TEM de nanopartículas de cobre dispersas en Chitlac (Chitlac al 0,2 % en p/v, CuSO_4 1 mM, NaBH_4 0,2 mM, Ejemplo 19). La medición se llevó a cabo como se ha descrito previamente en la Figura 1.

Figura 9. La figura muestra imágenes de TEM (**A, B**) y distribución de tamaños (**C**) de nanopartículas de plata dispersas en Chitlac (Chitlac al 0,2 % en p/v, AgNO_3 1 mM, $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,5 mM, Ejemplo 7). La medición se llevó a cabo como se ha descrito previamente en la Figura 1.

Figura 10. La figura muestra: (**A**) cinética del crecimiento bacteriano de *E. coli* ATCC 25922 en medio de cultivo Mueller-Hinton al 20 % (Mueller-Hinton al 20 %; control, triángulos) o en presencia de Chitlac al 0,2 % en p/v (círculos, Ejemplo 1) o en Chitlac al 0,2 % en p/v + AgNO_3 1 mM; + $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,5 mM (cuadrados, Ejemplo 7), respectivamente. Los datos informados se refieren a tres experimentos independientes con resultados comparables; (**B**) Recuento de colonias de *E. coli* ATCC 25922 en Chitlac al 0,2 % en p/v + AgNO_3 1 mM; + $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ 0,5 mM (línea continua, Ejemplo 7). La línea discontinua indica controles en ausencia de Chitlac-nAg. Los resultados son el promedio (\pm SD) de al menos 4 experimentos independientes.

Figura 11. La figura muestra la cinética del crecimiento bacteriano de *E. coli* ATCC 25922 en medio de cultivo Mueller-Hinton (Mueller-Hinton al 20 %; control, círculos) o en el 0,2 % en p/v de Chitlac + HAuCl_4 1 mM (Chitlac-nAu, cuadrados, Ejemplo 18).

Figura 12. La figura muestra el recuento de colonias de *E. coli* ATCC 25922 en Mueller-Hinton al 20 % (control, círculos) o en presencia de nanopartículas de oro dispersas en Chitlac (Chitlac al 0,2 % en p/v, HAuCl_4 1 mM, Ejemplo 18) (cuadrados). Las UFC son las Unidades Formadoras de Colonias bacterianas.

Figura 13. La figura muestra el espectro Raman de Chitlac (Ejemplo 1) a una concentración del 5 % en p/v (línea discontinua) en comparación con el espectro SERS de Chitlac con nanopartículas de plata (Chitlac al 0,4 % en p/v, AgNO_3 14 mM, Ejemplo 15) (continua línea).

Figura 14. La figura muestra el efecto de muestras metacrílicas recubiertas sobre la fuga de LDH de líneas celulares de osteosarcoma humano (MG63). La prueba de citotoxicidad se realizó por contacto directo de células tanto con el material en sí (MAcr nAg C) como con el medio de cultivo líquido mantenido en contacto con el material durante un tiempo determinado (24 y 72 horas) ("extracto") (MAcr nAg E). Las células de control cultivadas en adhesión (Ad) en medio DMEM completo y las células tratadas con discos de poliestireno (PS, control negativo) y discos de poliuretano con ZnDBC (PU, control positivo según la norma ISO 10993-5) se corrieron en paralelo con los grupos correspondientes de materiales metacrílicos sin nanopartículas (MAcr C, MAcr E). Se usó TritonX-100 al 0,1 % en medio de cultivo como control positivo para los extractos. El porcentaje de LDH liberada se calculó dividiendo la cantidad de actividad en el medio por la actividad total (medio y lisado celular) después de restar el control. Los datos se expresan como la media (con el intervalo SD) de cuatro experimentos independientes.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

[0028] Solución coloidal (o coloide): significa un sistema en el que las partículas con un intervalo de tamaño de 1 a 1000 nm se dispersan en un medio disolvente continuo.

[0029] Nanocompuesto: significa un sistema que consiste en partículas con tamaños nanométricos (cargas) dentro de un material macroscópico (matriz). En la presente descripción de la invención, el término "nanocompuesto" pretende significar un material en el que las nanopartículas metálicas se dispersan en una matriz polisacáridica. En particular, significa un material en el que las nanopartículas metálicas se forman sustancialmente en la matriz polisacáridica por reducción de las sales correspondientes, y por tanto, en su mayoría tienen una carga cero, pero sin excluir la presencia de agrupaciones de pocos átomos con un carácter iónico (por ejemplo, Ag_4^+). De este modo,

en lo sucesivo, el nanocompuesto de acuerdo con la invención también puede indicarse como "nanocompuesto basado en metal" además de simplemente como "nanocompuesto".

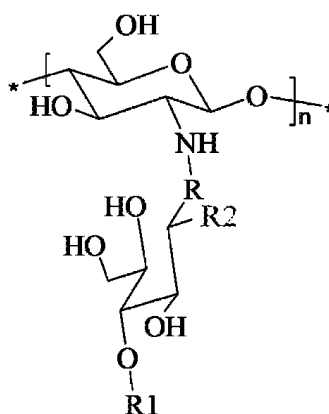
[0030] Los objetos y ventajas de los materiales nanocompuestos que comprenden nanopartículas metálicas interdispersas en una matriz de polisacáridos básicos ramificados objeto de la presente invención se comprenderán mejor a través de la siguiente descripción detallada en la que, a modo de ejemplo no limitativo, se describirán algunos ejemplos de preparación de nanocompuestos de acuerdo con la invención y la caracterización físico-química de los mismos, además de los ensayos biológicos para evaluar su actividad antibacteriana.

Descripción

[0031] En una matriz polimérica que consiste en polisacáridos catiónicos ramificados debido a la presencia de átomos de nitrógeno primarios y secundarios, los materiales nanocompuestos objeto de la presente invención comprenden nanopartículas metálicas homogéneas y establemente dispersas en dicha matriz polimérica.

[0032] Para los fines de la presente invención, los polisacáridos catiónicos preferidos son derivados de quitosano ramificados aldólicos o aldónicos, en los que las unidades de D-glucosamina que forman la cadena de quitosano lineal se unen, por medio del grupo funcional -NH- en el átomo de carbono C2, a restos de polioles mono- u oligosacáridos aldólicos o aldónicos, iguales o diferentes entre sí, y representados por la fórmula general (I) descrita anteriormente, en la que R puede ser -CH₂- o -CO- y R₁ puede ser hidrógeno o un monosacárido, preferiblemente seleccionado del grupo que consiste en galactosa, glucosa, manosa, N-acetil glucosamina, y N-acetil galactosamina, o un oligosacárido, que comprende preferiblemente 2 unidades glicosídicas, y R₂ puede ser -OH o -NHCOCH₃. En lo sucesivo, estos derivados también se denominan para abreviar derivados mono- u oligosacáridos aldólicos o aldónicos de quitosano o, para abreviar, derivados mono- u oligosacáridos de quitosano.

[0033] A modo de representación, las unidades de D-glucosamina sustituidas con restos mono- u oligosacáridicos en los derivados de quitosano objeto de la invención pueden representarse mediante la fórmula general (II), en la que "n" se refiere al número total de unidades de D-glucosamina que constituyen una cadena lineal de quitosano:



(II)

[0034] En la patente WO2007/025917A1 (Schmid H. et al.) citada anteriormente, se mencionan las preparaciones de nanopartículas de plata en presencia de derivados de quitosano y sales tales como carboximetilquitosano, acetato de quitosano y lactato de quitosano.

[0035] A diferencia de la patente citada anteriormente, en este caso la derivación se lleva a cabo mediante estructuras mono- u oligosacáridicas que, a través de una reacción de aminación reductora, dan lugar a la inserción de ramificaciones laterales unidas a la cadena principal polimérica por medio de grupos amino secundarios. Esto permite que i) los grupos amino todavía estén disponibles para la coordinación del metal y ii) que la carga global de los polisacáridos no se altere sustancialmente.

[0036] De hecho, la matriz polimérica consiste en derivados ramificados de quitosano que se unen, por medio del grupo amino, a los derivados aldónicos o aldólicos de mono- u oligosacáridos de fórmula general (I). Estos mono- u oligosacáridos de fórmula general (I) comprenden preferiblemente de 1 a 3 unidades glicosídicas y, de acuerdo con un aspecto más preferido, estos son restos de oligosacáridos que comprenden de 2 a 3 unidades glicosídicas y aún más preferiblemente, con referencia a los diferentes significados de R, R₁ y R₂, los mismos se seleccionan del grupo que consiste en restos de lactosa, celobiosa, celotriosa, maltosa, maltotriosa, quitobiosa, quitotriosa, mannobiosa así como los correspondientes ácidos aldónicos de los mismos. Para los fines de la presente invención, el derivado de

oligosacárido más preferido de quitosano es el derivado con lactosa (en lo sucesivo también denominado Chitlac, número de registro CAS 85941-43-1).

5 **[0037]** Además, para los fines de la presente invención, el grado de sustitución química de los grupos amino de quitosano con estos mono- u oligosacáridos es al menos del 20 %. Preferiblemente, el grado de sustitución de los grupos amino de quitosano con mono- u oligosacáridos está en el intervalo del 50 % al 80 %, y más preferiblemente es del 70 %.

10 **[0038]** El peso molecular medio (en lo sucesivo denominado MW) del quitosano utilizable para obtener los derivados de oligosacáridos mencionados puede ser de hasta 1500 kDa y preferiblemente estar en el intervalo de 400 kDa a 700 kDa.

15 **[0039]** Las nanopartículas metálicas incorporadas en la matriz polimérica que consiste en estos derivados de polisacáridos catiónicos ramificados están compuestas de metales seleccionados preferentemente entre plata, oro, platino, paladio, cobre, zinc, níquel y mezclas de los mismos. Las nanopartículas incluidas en la matriz polimérica que consiste en derivados oligosacáridicos de quitosano tienen un tamaño en el intervalo de 5 nm a 150 nm, y en particular un tamaño de nanopartícula metálica promedio controlado entre 30 y 50 nm. Las características esenciales de estas nanopartículas, como será evidente a partir de la descripción detallada de la invención a continuación, son que estas nanopartículas son principalmente metales en su forma reducida, sin excluir además la presencia residual de agrupaciones formadas por pocos átomos con carácter iónico, y que, en su dispersión/estabilización en la matriz polisacáridica, están implicadas las cadenas laterales oligosacáridicas próximas a los grupos amino del propio quitosano.

25 **[0040]** Sin estar ligados a esto último, las proporciones preferidas entre los polisacáridos de la matriz y los metales se refieren a nanocompuestos en forma de soluciones coloidales, aunque estos materiales nanocompuestos basados en metales también pueden estar en forma de películas o polvo deshidratados e incluso dializados para eliminar los contraiones residuales de la preparación de los propios materiales. En los nanocompuestos según la invención en forma de soluciones coloidales acuosas, la relación de la concentración de polisacáridos (expresada como % en p/v) sobre la concentración de la sal metálica de partida (expresada como molaridad) es de 0,0025 a 20
30 y preferiblemente es de 0,2.

[0041] Por lo tanto, la masa de plata, expresada en mg, que se puede incorporar por gramo de polisacárido, puede ser de 3000 mg/g a 0,3 mg/g y preferentemente es de 50 mg de plata incorporada por gramo de polisacárido.

35 **[0042]** Para los objetos perseguidos, el inventor abordó el aspecto relacionado con la preparación y caracterización de un sistema basado en polisacáridos en el que se explotan propiedades relacionadas con el tamaño del metal nanométrico (propiedades antimicrobianas, ópticas, catalíticas y otras propiedades peculiares de los propios metales) de nanopartículas metálicas contenidos en los nanocompuestos objeto de la invención. Estos aspectos se informan en detalle a continuación.

40

Preparación de derivados oligosacáridicos de quitosano

45 **[0043]** El proceso de preparación de estos derivados oligosacáridicos de quitosano es el conocido y descrito en el documento US 4.424.346 (Hall, L.D. y Yalpani, M.) e incluye tratar una solución de quitosano con ácido acético (pH 4,5) en metanol con el mono- u oligosacárido seleccionado en presencia de cianoborohidruro de sodio. La interacción entre los grupos amino de quitosano y el grupo aldehídico del mono- u oligosacárido da lugar a la formación de un compuesto intermedio inestable denominado base de Schiff. En presencia de borohidruro, la base de Schiff se reduce, lo que da lugar a la formación de una amina secundaria estable. El polisacárido ramificado resultante es el derivado oligosacárido del quitosano y es el Chitlac mencionado anteriormente, por ejemplo, cuando
50 el oligosacárido es lactosa. En el caso de derivados con ácidos aldónicos de mono- u oligosacáridos, la reacción se lleva a cabo en presencia de un activador adecuado, como carbo-di-imida, y da lugar a la formación de una amida.

Preparación de nanopartículas

55 **[0044]** Las nanopartículas que se incorporarán a la matriz polimérica se pueden preparar en presencia o ausencia de agentes reductores.

60 **[0045]** En el primer caso, las nanopartículas se obtienen tras la reducción de iones metálicos con agentes reductores adecuados en soluciones acuosas de polisacáridos ramificados que consisten en los derivados ramificados aldólicos o aldónicos de mono- u oligosacáridos del quitosano mencionados anteriormente de acuerdo con el siguiente procedimiento: las soluciones acuosas de estos derivados del quitosano se preparan a diferentes concentraciones hasta el 2 % (p/v), preferiblemente en el intervalo del 0,05 % (p/v) al 1 % (p/v) y más preferiblemente son del 0,2 % (p/v). Las soluciones polisacáridicas a continuación se mezclan con soluciones de sales metálicas seleccionadas entre plata, oro, platino, paladio, cobre, zinc, níquel, preferiblemente seleccionadas entre cloruros, percloratos y nitratos (por ejemplo, AgNO₃, H₂AuCl₄, CuSO₄, ZnCl₂, NiCl₂), de modo que se obtengan
65 concentraciones finales en el intervalo de 0,1 mM a 20 mM, más preferiblemente en el intervalo de 1 mM a 14 mM y

aún más preferiblemente de 1 mM. Los agentes reductores conocidos adecuados, preferiblemente seleccionados entre ácido ascórbico, citrato de sodio, borohidruro de sodio y cianoborohidruro de sodio, se pueden añadir opcionalmente a las soluciones para obtener nanopartículas en estado metálico. El agente reductor se añade a concentraciones de 0,05 mM a 10 mM y preferiblemente la concentración es de 0,5 mM.

5 **[0046]** Sin embargo, se encontró que a diferencia de otros sistemas poliméricos, los nanocompuestos según la invención también se pueden preparar en ausencia de agentes reductores, ya que las cadenas laterales mono- u oligosacáridicas de acuerdo con la fórmula general (I) actúan como agente reductor de los iones metálicos per se, y permite la formación de nanopartículas dispersas en la matriz polimérica. En este caso, las nanopartículas metálicas se obtienen simplemente mezclando las soluciones de derivados de quitosano con soluciones salinas del metal seleccionado a concentraciones apropiadas. También en este caso, las concentraciones de los polisacáridos y de sal metálica son como se ha informado anteriormente.

15 **[0047]** Como será fácilmente evidente a partir de los resultados obtenidos por las caracterizaciones de los materiales nanocompuestos basados en metales objeto de la invención, presentado s a continuación, siendo todas las condiciones iguales, los derivados mono- u oligosacáridicos de quitosano, y en particular Chitlac, sorprendentemente demuestran estar más adaptados para formar nanopartículas metálicas en comparación con otros polisacáridos, como por ejemplo el quitosano, como lo demuestra la intensidad y la forma de los espectros de absorción UV-Vis y el estudio espectrofotométrico asistido por las investigaciones de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Estos estudios permiten demostrar que, en presencia de los derivados mono- u oligosacáridos de quitosano y, en particular, Chitlac, las nanopartículas metálicas son de un tamaño más uniforme y se dispersan mejor debido a las interacciones con las cadenas poliméricas que evitan la agregación de las mismas en comparación con las preparadas con quitosano sin sustituir. Las microfotografías de TEM permitieron llevar a cabo un análisis de la distribución dimensional de las nanopartículas, que es muy uniforme con un tamaño promedio inferior a 50 nm.

30 **[0048]** Sorprendentemente, también se descubrió que es posible obtener nanopartículas metálicas incluso en ausencia de un agente reductor exógeno. Se ha descubierto un sistema en el que se obtienen nanopartículas metálicas, que se dispersan homogéneamente en la matriz polimérica, usando la capacidad reductora típica de los sustituyentes laterales del polisacárido, y por tanto en ausencia de cualquier agente reductor exógeno. Este segundo método de preparación también se caracterizó por medio de espectroscopia UV-Vis y microscopía TEM. Los picos plasmónicos y las imágenes de TEM confirman la formación con éxito de nanopartículas metálicas de forma redondeada y con un tamaño promedio inferior a 10 nm.

35 **[0049]** Este enfoque metodológico es particularmente ventajoso porque un solo componente del sistema ofrece simultáneamente capacidades de reducción, dispersión y estabilización de nanopartículas.

40 **[0050]** Además, las caracterizaciones biológicas adicionales del nanocompuesto basado en metal de acuerdo con la invención han demostrado que el nanocompuesto de la invención todavía exhibe la actividad antimicrobiana del metal incorporado y este efecto es muy valioso para aplicaciones en el campo biomédico y farmacéutico. De hecho, el uso de metales como la plata, el oro, el cobre, el zinc y el níquel en el campo de los materiales antimicrobianos es valioso, especialmente para el tratamiento de heridas tisulares tóxicas tanto para seres humanos como para animales. El nanocompuesto objeto de la presente invención se podría emplear como tal o en combinación con otros diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables. En particular, estos materiales se pueden mezclar con otros polisacáridos neutros o aniónicos no gelificantes seleccionados del grupo que consiste en dextrano, ácido hialurónico, carboximetilcelulosa, galactomananos en solución acuosa diluida o concentrada obteniendo características viscoelásticas particulares, para preparar en combinación con composiciones excipientes y/o diluyentes adecuadas con actividad antimicrobiana utilizables para tratar infecciones de piel, membranas mucosas y tejidos epiteliales intactos o lesionados de diferentes localizaciones anatómicas. Estos materiales, incluso en combinación con otros polisacáridos no gelificantes, neutros o aniónicos, como se ha mencionado anteriormente, también se pueden aplicar en el desarrollo de dispositivos medicados tales como gasas, vendas, parches con actividad antimicrobiana de amplio espectro para su uso en el mismo campo terapéutico mencionado anteriormente.

55 **[0051]** Además, los nanocompuestos según la invención se pueden usar como injertos polisacáridicos (o injertos poliméricos) -nanopartículas metálicas quelantes con actividad antimicrobiana- sobre superficies activadas compuestas de material polimérico para envases en usos en campos farmacéuticos y alimentarios. La ventaja esperada podría consistir en sustituir los procedimientos actuales de esterilización (por ejemplo, calentamiento en seco) que a veces producen carencias de homogeneidad incluso considerables en el grado de esterilidad final del recipiente vacío antes del llenado. Además, recubrir los materiales poliméricos puede dar lugar a obtener sistemas provistos de actividad antimicrobiana para aplicaciones en el campo biomédico.

60 **[0052]** De nuevo, los materiales nanocompuestos basados en metales de acuerdo con la invención se pueden usar en mezclas de polímeros con otros polisacáridos (por ejemplo, pululano) para obtener películas para paquetes "antimicrobianos", en particular en el campo alimentario.

65

[0053] También se encontró un fuerte aumento en la señal espectroscópica Raman del polisacárido, atribuible a la presencia de nanopartículas metálicas, que por lo tanto tienen dimensiones y distribución óptimas para explotar el efecto SERS (espectroscopía Raman mejorada en superficie) sobre el que se basa la operación de varios biosensores moleculares. De hecho, el espectro Raman de una solución de polisacáridos no muestra ningún pico detectable experimentalmente, mientras que una solución de polisacáridos (aún más diluida) en presencia de nanopartículas metálicas proporciona un espectro Raman intenso y definido, lo que demuestra el aumento de la señal causada por nanopartículas (efecto SERS). En estas aplicaciones, el nanocompuesto basado en metales según la invención puede usarse como sondas/marcadores provistos de funcionalidad molecular y, por lo tanto, se consideran adecuados para aplicaciones de "bioimagen" óptica, con las nanopartículas atrapadas en la matriz polimérica formada por los polisacáridos catiónicos ramificados que son derivados aldólicos o aldónicos del quitosano, detectables mediante microscopía TEM, técnicas confocales y Raman. Por lo tanto, los nanocompuestos basados en metales de acuerdo con la invención se pueden emplear en el desarrollo de nuevos sensores para el análisis de biomoléculas y células explotando la presencia de señales bioquímicas específicas reconocidas por diferentes tipos celulares en los derivados oligosacáridicos del quitosano (Donati, I. et al., Biomaterials 26, 2005, 987-998).

[0054] El uso de polisacáridos ramificados para formar nanopartículas metálicas de acuerdo con la presente invención introduce las siguientes ventajas:

- la presencia de grupos amino en la cadena polimérica permite una coordinación efectiva de iones y, entonces, de nanopartículas metálicas;
- las cadenas laterales mono- u oligosacáridicas establecen un impedimento estérico tal que impiden que las nanopartículas metálicas se agreguen y aseguran una dispersión homogénea y estable de las mismas a lo largo del tiempo;
- si todas las condiciones son iguales, los derivados ramificados del quitosano con mono- u oligosacáridos aldónicos o aldólicos -como por ejemplo Chitlac- eran mucho más efectivos para la formación de nanopartículas en comparación con el quitosano en términos de homogeneidad dimensional y dispersión de partículas (como se demuestra por la intensidad y la forma de la banda de resonancia de plasmón en los espectros de absorción UV-Vis en los dos casos);
- en ausencia de agentes reductores adicionales, los derivados aldónicos o aldólicos de las cadenas laterales mono- u oligosacáridicas de acuerdo con la fórmula general (I) actúan como agente reductor para iones metálicos y permiten formar nanopartículas dispersas en la matriz polimérica;
- la capacidad de "autorreducción" del derivado de oligosacárido ramificado de quitosano-complejo de nanopartículas metálicas permite reducir el número de componentes químicos que forman el sistema;
- la simplicidad de preparación y reproducibilidad de los resultados;
- amplias aplicaciones de nanocompuestos tanto para su actividad antimicrobiana de amplio espectro como para las propiedades ópticas peculiares en aplicaciones de espectroscopía Raman (SERS);
- posible uso en mezclas de polímeros con otros polisacáridos (por ejemplo, pululano) para obtener películas para paquetes "antimicrobianos", en particular en el campo alimentario.

[0055] A continuación se describen a título ilustrativo algunos ejemplos no limitantes de preparación de los nanocompuestos de acuerdo con la invención, en los que se realizaron caracterizaciones físico-químicas y ensayos biológicos para evaluar su actividad antibacteriana.

Ejemplo 1: Síntesis del derivado de quitosano con lactosa (Chitlac) (1a) y derivado de quitosano con celobiosa (Chitcell) (1b)

[0056]

Se disuelve quitosano (1,5 g, grado de acetilación del 11 %) en 110 ml de una solución de metanol (55 ml) y tampón de ácido acético al 1 % en p/v, pH 4,5 (55 ml). Se añaden 60 ml de una solución de metanol (30 ml) y tampón de ácido acético al 1 % en p/v, pH 4,5 (30 ml) que contiene lactosa (2,2 g) y cianoborohidruro sódico (900 mg). La mezcla se deja en agitación durante 24 horas, se transfiere a tubos de diálisis (límite a 12.000 Da) y se dializa frente a NaCl 0,1 M (2 cambios) y frente a agua desionizada hasta que se alcanza una conductividad de 4 mS a 4 °C. Finalmente, la solución se filtra en filtros Millipore de 0,45 µm y se liofiliza.

1b) Se disuelve quitosano (1,5 g, grado de acetilación del 11 %) en 110 ml de una solución de metanol (55 ml) y tampón de ácido acético al 1 % en p/v, pH 4,5 (55 ml). Se añaden 60 ml de una solución de metanol (30 ml) y tampón de ácido acético al 1 % en p/v, pH 4,5 (30 ml) que contiene celobiosa (2,2 g) y cianoborohidruro sódico (900 mg). La mezcla se deja en agitación durante 24 horas, se transfiere a tubos de diálisis (límite a 12.000 Da) y se dializa frente a NaCl 0,1 M (2 cambios) y frente a agua desionizada hasta que se alcanza una conductividad de 4 mS a 4 °C. Finalmente, la solución se filtra en filtros Millipore de 0,45 µm y se liofiliza.

Ejemplo 2: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en presencia de agentes reductores

[0057] Las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con ácido ascórbico en la solución

de Chitlac según el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,05 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con soluciones de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 0,5 mM. A continuación, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,25 mM.

5

Ejemplo 3: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en presencia de agentes reductores

[0058] Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con ácido ascórbico en las soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,05 % (p/v). Las soluciones de Chitlac a continuación se mezclaron con soluciones de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 1 mM. A continuación, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,5 mM.

10

Ejemplo 4: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en presencia de agentes reductores

[0059] Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con ácido ascórbico en las soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,1 % (p/v) para así obtener una concentración final de AgNO_3 de 0,5 mM. A continuación, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,25 mM.

15

20

Ejemplo 5: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en presencia de agentes reductores

[0060] Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con ácido ascórbico en las soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,1 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con soluciones de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 1 mM. A continuación, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,5 mM.

25

Ejemplo 6: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en presencia de agentes reductores

[0061] Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con ácido ascórbico en las soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,2 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con soluciones de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 0,5 mM. A continuación, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,25 mM.

30

35

Ejemplo 7: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en presencia de agentes reductores

[0062] Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con ácido ascórbico en las soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,2 % (p/v). Las soluciones de Chitlac a continuación se mezclan con soluciones de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 1 mM. A continuación, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,5 mM.

40

Ejemplo 8: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en presencia de agentes reductores

[0063] Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con ácido ascórbico en las soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,4 % (p/v). Las soluciones de Chitlac a continuación se mezclan con soluciones de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 0,5 mM. A continuación, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,25 mM.

50

Ejemplo 9: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en presencia de agentes reductores

[0064] Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con ácido ascórbico en las soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,4 % (p/v). Las soluciones de Chitlac a continuación se mezclan con soluciones de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 1 mM. A continuación, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,5 mM.

55

60

Ejemplo 10: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en ausencia de agentes reductores

[0065] Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos por el polisacárido Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,2 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con una solución de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 5 mM.

65

Ejemplo 11: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en ausencia de agentes reductores

5 **[0066]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos por el polisacárido Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,2 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con una solución de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 10 mM.

Ejemplo 12: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en ausencia de agentes reductores

10 **[0067]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos por el polisacárido Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,2 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con una solución de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 14 mM.

Ejemplo 13: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en ausencia de agentes reductores

15 **[0068]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos por el polisacárido Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,4 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con una solución de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 5 mM.

Ejemplo 14: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en ausencia de agentes reductores

20 **[0069]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos por el polisacárido Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,4 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con una solución de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 10 mM.

Ejemplo 15: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en ausencia de agentes reductores

25 **[0070]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos por el polisacárido Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,4 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con una solución de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 14 mM.

Ejemplo 16: Preparación de nanopartículas de oro en Chitlac en presencia de agentes reductores

30 **[0071]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con borohidruro de sodio en soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,2 % (p/v). Las soluciones de Chitlac a continuación se mezclan con soluciones de ácido tetracloroáurico para obtener una concentración final de HAuCl_4 de 1 mM. A continuación, se añade una solución de borohidruro de sodio para obtener una concentración final de 0,3 mM.

Ejemplo 17: Preparación de nanopartículas de oro en Chitlac en presencia de agentes reductores

35 **[0072]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con borohidruro de sodio en soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,4 % (p/v). Las soluciones de Chitlac a continuación se mezclan con soluciones de ácido tetracloroáurico para obtener una concentración final de HAuCl_4 de 1 mM. A continuación, se añade una solución de borohidruro de sodio para obtener una concentración final de 0,3 mM.

Ejemplo 18: Preparación de nanopartículas de oro en Chitlac en ausencia de agentes reductores

40 **[0073]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos por el polisacárido Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,2 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con una solución de ácido tetracloroáurico para obtener una concentración final de HAuCl_4 de 1 mM.

Ejemplo 19: Preparación de nanopartículas de cobre en Chitlac en presencia de agentes reductores

45 **[0074]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con borohidruro de sodio en soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,2 % (p/v). Las soluciones de Chitlac a continuación se mezclan con soluciones de sulfato de cobre para obtener una concentración final de CuSO_4 de 1 mM. A continuación, se añade una solución de borohidruro sódico para obtener una concentración final de 0,2 mM.

Ejemplo 20: Preparación de nanopartículas de plata en Chitcell (derivado de celobiosa de quitosano) en ausencia de agentes reductores

5 **[0075]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos por el polisacárido Chitcell de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitcell a una concentración del 0,4 % (p/v). La solución de Chitcell a continuación se mezcla con una solución de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 14 mM.

10 *Ejemplo 21: Preparación de nanopartículas de plata en Chitgluc (derivado de glucosa de quitosano) en ausencia de agentes reductores*

15 **[0076]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos por el polisacárido Chitgluc de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitgluc a una concentración del 0,4 % (p/v). La solución de Chitgluc a continuación se mezcla con una solución de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 14 mM.

Ejemplo 22: Preparación de nanopartículas de plata en quitosano en presencia de agentes reductores

20 **[0077]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de iones metálicos con ácido ascórbico en soluciones de quitosano de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de quitosano a una concentración del 0,2 % (p/v). Las soluciones de quitosano a continuación se mezclan con soluciones de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 1 mM. A continuación, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,5 mM.

25 *Ejemplo 23: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en presencia de agentes reductores*

30 **[0078]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos con ácido ascórbico en las soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 1 % (p/v). Las soluciones de Chitlac a continuación se mezclan con soluciones de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 1 mM. A continuación, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,5 mM.

35 *Ejemplo 24: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en presencia de agentes reductores*

40 **[0079]** Las nanopartículas se obtienen tras la reducción de iones metálicos con ácido ascórbico en soluciones de Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 2 % (p/v). Las soluciones de Chitlac a continuación se mezclan con soluciones de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 1 mM. A continuación, se añade una solución de ácido ascórbico para obtener una concentración final de 0,5 mM.

Ejemplo 25: Preparación de nanopartículas de plata en Chitlac en ausencia de agentes reductores

45 **[0080]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos por el polisacárido Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,2 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con una solución de nitrato de plata para obtener una concentración final de AgNO_3 de 1 mM.

50 *Ejemplo 26: Preparación de nanopartículas de oro en Chitlac en ausencia de agentes reductores*

55 **[0081]** Los nanocompuestos que comprenden las nanopartículas se obtienen tras la reducción de los iones metálicos por el polisacárido Chitlac de acuerdo con el siguiente procedimiento: Se prepara una solución acuosa de Chitlac a una concentración del 0,4 % (p/v). La solución de Chitlac a continuación se mezcla con una solución de ácido tetracloroáurico para obtener una concentración final de HAuCl_4 de 1 mM.

60 **[0082]** A continuación se describen las caracterizaciones físico-químicas y biológicas de los nanocompuestos basados en metales de acuerdo con la invención obtenidos con el derivado de quitosano con lactosa, Chitlac, con nanopartículas de diferentes metales, y en particular Ag y Au. Se obtuvieron resultados similares con todos los derivados de oligosacáridos objeto de la presente invención.

Estabilización de nanopartículas

65 **[0083]** Para comprobar la formación de nanopartículas y su estabilización en la matriz polimérica según los objetos de la invención, el nanocompuesto del ejemplo 7 se sometió a microscopía electrónica de transmisión. Como se subraya en la figura 1, la presencia de varios grupos funcionales (grupos amino, grupos hidroxilo) promueve la coordinación de interacciones con iones metálicos, mientras que la presencia de cadenas laterales de mono- u

oligosacáridos, como por ejemplo lactosa, ofrece un impedimento estérico eficaz para obstaculizar la tendencia natural de las nanopartículas a agregarse. De hecho, cuando se añade una solución de AgNO_3 a una solución de Chitlac, se establecen interacciones de coordinación entre los iones de Ag^+ y los grupos amino; tras la reducción, las cadenas laterales de lactosa cerca de los grupos amino están implicadas en la estabilización de nanopartículas metálicas.

Caracterización UV-Vis

[0084] La formación de nanopartículas se pone en evidencia por la aparición de bandas de absorción a longitudes de onda que varían dependiendo del metal considerado, en los espectros de absorción UV-Vis; estas bandas se conocen bajo el nombre de bandas de resonancia de plasmón superficial y son causadas por una oscilación colectiva de electrones libres en la superficie de las nanopartículas. En el caso de la plata, por ejemplo, se observa una banda intensa centrada a aproximadamente 400 nm (Figura 2A); la banda de plasmón es simétrica y muy estrecha, lo que sugiere que están presentes nanopartículas bien dispersas y predominantemente en forma de esfera. La comparación de los espectros de absorción de las nanopartículas formadas en Chitlac y en el quitosano, si todas las condiciones son iguales, subraya el comportamiento diferente de los dos polisacáridos. De hecho, en el caso del Chitlac, la banda de plasmón es mucho más intensa, simétrica, estrecha y desplazada hacia longitudes de onda más bajas, lo que sugiere la presencia de partículas más pequeñas y mejor dispersas (Figura 2A). Las mejores propiedades de Chitlac en comparación con el quitosano se pueden atribuir a las propiedades físico-químicas de las cadenas laterales de lactosa colocadas en la cadena polimérica. El sistema es ajustable en función de las concentraciones utilizadas, como lo demuestran las caracterizaciones espectrofotométricas realizadas (Figura 2B).

[0085] La banda de resonancia plasmónica es particularmente significativa y diagnóstica.

[0086] Los espectros confirman además que las partículas metálicas incluidas en la matriz polimérica tienen en su mayoría una carga cero; sin embargo, pueden estar presentes grupos de pocos átomos con un carácter iónico (por ejemplo, Ag_4^+), como indica el hombro a aproximadamente 260 nm en el espectro de absorción UV de los sistemas (Figura 2, A y B).

[0087] El estudio de las variaciones del espectro UV-Vis según las concentraciones y los tiempos de reacción permitieron mejorar un método óptimo de preparación en términos de rendimiento, reproducibilidad y estabilidad a lo largo del tiempo.

[0088] De manera similar, en el caso del oro, se detecta una banda plasmónica intensa alrededor de 530 nm, que demuestra la formación con éxito de nanopartículas de oro dispersas en Chitlac (Figura 3).

Propiedades reductoras de Chitlac

[0089] Sorprendentemente, se encontró que, en condiciones apropiadas, se pueden formar nanopartículas metálicas incluso en ausencia de agentes reductores añadidos; por ejemplo, en el caso de la plata, Chitlac puede reducir los iones Ag^+ sin la ayuda del ácido ascórbico, por ejemplo. Los espectros UV-Vis (Figura 4) y las imágenes de TEM (Figura 5) confirman la formación con éxito de nanopartículas metálicas estables y bien dispersas. Debe señalarse además que, bajo condiciones apropiadas, el sistema basado en nanopartículas de Chitlac y plata, libre de agentes reductores, es capaz de formar hidrogeles sin agregar otros agentes químicos. Además, estos geles se vuelven más flexibles y eventualmente se funden con el tiempo (alrededor de 1 semana).

[0090] Incluso en el caso del oro, Chitlac libre de agentes reductores añadidos permite la reducción de los iones Au_3^+ al estado metálico, como demuestran los espectros UV-Vis en la Figura 3, donde se observa el pico plasmónico del oro, y por imágenes de TEM en la Figura 6 donde se observan nanopartículas con un tamaño promedio de alrededor de 50 nm.

Caracterización de TEM y análisis dimensional:

[0091] La forma, distribución y dimensiones de las nanopartículas formadas en presencia y ausencia de agentes reductores se evaluaron mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), análisis de seguimiento de nanopartículas (Nanosight®) y técnicas de análisis de imágenes. Las imágenes relacionadas con las nanopartículas de oro (Figuras 6 y 7) muestran la presencia de nanopartículas con un tamaño promedio de alrededor de 50 nm.

[0092] Incluso en el caso del cobre, se observa claramente la formación con éxito de nanopartículas metálicas (Figura 8). En la Figura 9, se muestran imágenes de TEM de nanopartículas de plata de forma redondeada y con dimensiones promedio de alrededor de 30 nm.

[0093] Este método de preparación sin agentes reductores también se caracterizó por medio de espectroscopía UV-Vis y microscopía TEM. Los picos plasmónicos en la Figura 4 y las imágenes de TEM en la Figura 5 confirman la formación con éxito de nanopartículas metálicas de forma redondeada y con un tamaño promedio inferior a 10 nm.

[0094] Para evaluar la actividad antimicrobiana, los sistemas de nanocompuestos se probaron con diferentes cepas bacterianas Gram+ y Gram-; las pruebas cinéticas de crecimiento y las pruebas de recuento en colonias bacterianas han demostrado un efecto bactericida fuerte y rápido.

5 Actividad antibacteriana:

[0095] Se realizaron pruebas de inhibición del crecimiento en diferentes cepas bacterianas (Gram negativas: Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa y Gram positivas: Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis) en presencia de soluciones de Chitlac con y sin nanopartículas metálicas. Se encontró que el crecimiento bacteriano en soluciones de Chitlac libres de nanopartículas es comparable al crecimiento en el control (caldo Mueller-Hinton); por el contrario, en presencia de Chitlac con nanopartículas metálicas se produce una inhibición considerable del crecimiento bacteriano, como se informa, por ejemplo, en el caso de la plata y el oro (Figuras 10, 11 y 12) en las que se puede observar la disminución del número de colonias bacterianas según el tiempo de incubación. Este proceso es muy rápido: incluso después de unas pocas horas, efectivamente se encuentra una inhibición efectiva de las células bacterianas.

Caracterización espectroscópica Raman

[0096] Los espectros de Raman en soluciones que contienen nanopartículas estabilizadas con polímero se recogieron usando un sistema Raman In Via (Renishaw plc, Wotton-under-Edge, R.U.). El láser (láser de ion de argón de 514,5 nm, LaserPhysics, West Jordan UT, EE.UU.) Se centró en la muestra mediante un objetivo 20x (0,4 NA). La potencia del láser en la muestra fue de 3 mW; para minimizar la fotodegradación de la muestra inducida por el láser, la densidad de potencia del láser se redujo desenfocando el haz en un 10 %. El tiempo de exposición fue de 5 acumulaciones de 10 s para cada espectro, para un tiempo de exposición total de 50 s por espectro.

[0097] Se encontró un fuerte aumento en la señal espectroscópica Raman del polisacárido, que se puede atribuir a la presencia de nanopartículas metálicas. Por lo tanto, estos últimos tienen dimensiones y distribución de tamaño óptimas para explotar el efecto de SERS (espectroscopía Raman mejorada en superficie) en el que se basa la operación de varios biosensores moleculares. De hecho, como se deduce de la figura 13, el espectro Raman de una solución de polisacárido no muestra picos detectables, mientras que una solución aún más diluida del mismo polisacárido en presencia de nanopartículas metálicas proporciona un espectro Raman intenso y definido, lo que demuestra el aumento de la señal causado por nanopartículas (efecto SERS).

Aplicación del nanocompuesto a base de metal para el recubrimiento de resinas metacrílicas

[0098] Las muestras cilíndricas de resinas metacrílicas ($\varnothing = 1,4$ mm; $h = 2$ mm) se sumergieron en HCl 12 M durante 7 horas a 80 °C; a continuación, las muestras se enjuagaron con agua desionizada (2 X 50 ml), NaOH 0,1 M (50 ml) y nuevamente con agua (50 ml). Las muestras de resina metacrílica tratada con ácido se sumergieron en las soluciones coloidales del nanocompuesto basado en metal preparado según el ejemplo 9 durante 24 horas. Finalmente las muestras se enjuagaron en agua desionizada y se secaron en una campana.

[0099] A continuación se describen algunas caracterizaciones biológicas de las resinas metacrílicas revestidas.

Ensayo de eficacia antimicrobiana

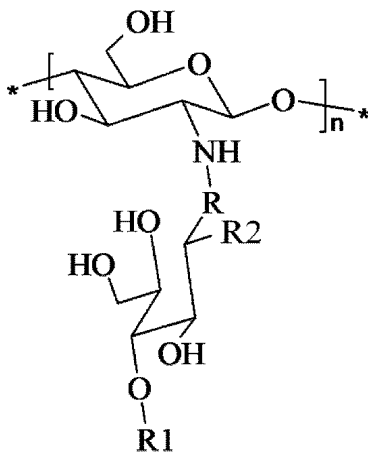
[0100] Las muestras cilíndricas ($\varnothing = 1,4$ mm, $h = 2$ mm) de resinas metacrílicas revestidas se pusieron en contacto directo con la bacteria S. aureus. En cada muestra, se cultivaron en placa 10 μ l de suspensión bacteriana a una concentración de 10^6 UFC/ml (UFC = unidades formadoras de colonias) y se incubaron en un ambiente húmedo a 37 °C durante 3 horas. A continuación, cada muestra se sumergió en 2 ml de PBS en agitación para permitir el desprendimiento de las bacterias de la superficie. Estas soluciones de lavado se diluyeron en serie y se cultivaron en placa en gel de agar para permitir el recuento de colonias después de la incubación durante la noche a 37 °C. Los números de recuento de colonias demuestran que, en el caso de las resinas metacrílicas recubiertas con Chitlac-Ag, el número de bacterias en la superficie se reduce en un 98 %.

Ensayo de citotoxicidad LDH

[0101] Después de los ensayos antibacterianos, se llevaron a cabo investigaciones adicionales, destinadas a evaluar la toxicidad del recubrimiento de nanocompuestos hacia células eucariotas. Para este fin, los ensayos de citotoxicidad de LDH se realizaron por contacto directo de células similares a osteoblastos (MG63) tanto con el propio material como con el medio de cultivo líquido mantenido en contacto con el material durante un tiempo dado (24 horas) ("extracto"). Los materiales probados (por cuadruplicado) se depositaron directamente sobre la capa celular. Después de 24 y 72 h, el medio se recogió y el ensayo de LDH se realizó de acuerdo con el protocolo del fabricante. Los resultados informados en la Figura 14 muestran que después de 72 horas no hay evidencia de citotoxicidad asociada con el material.

REIVINDICACIONES

1. Materiales nanocompuestos que comprenden una matriz polimérica que consiste en polisacáridos catiónicos seleccionados entre derivados ramificados de quitosano, en el que las unidades de D-glucosamina que forman la cadena lineal de quitosano se unen, por medio del grupo funcional -NH- sobre el átomo de carbono C2, a los restos de polioles aldólicos o aldónicos, iguales o diferentes entre sí, representados por la fórmula general (II):



(II)

en la que:

- 10
- R es -CH₂- o -CO-;
 - R₁ es hidrógeno, un monosacárido, un oligosacárido;
 - R₂ es -OH o -NHCOCH₃
- 15 y nanopartículas metálicas formadas en la matriz de polisacáridos por reducción de las sales correspondientes de dichos metales y dispersas homogéneamente y estabilizadas en dicha matriz polimérica.
- 20
2. Materiales nanocompuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que dichas nanopartículas son nanopartículas de metales seleccionados del grupo que consiste en plata, oro, platino, cobre, zinc, níquel y mezclas de los mismos.
- 25
3. Materiales nanocompuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que los restos de polioles aldólicos o aldónicos son restos de mono- u oligosacáridos que comprenden de 1 a 3 unidades glicosídicas.
- 30
4. Materiales nanocompuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que, cuando R₁ es un monosacárido, dicho monosacárido se selecciona del grupo que consiste en galactosa, glucosa, manosa, N-acetil glucosamina y N-acetil galactosamina.
5. Materiales nanocompuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que los restos de polioles aldólicos o aldónicos se seleccionan del grupo que consiste en restos de lactosa, celobiosa, celotriosa, maltosa, maltotriosa, quitobiosa, quitotriosa, mannobiosa y sus ácidos aldónicos.
- 35
6. Materiales nanocompuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que los derivados ramificados del quitosano tienen un grado de sustitución del grupo amino de la unidad D-glucosamina superior al 20 % y de hasta el 80 %.
7. Materiales nanocompuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que las nanopartículas tienen un tamaño medio comprendido entre 5 y 150 nm.
- 40
8. Materiales nanocompuestos de acuerdo con la reivindicación 1, en los que la masa de metal en mg incluida en la matriz polisacáridica en g de polisacárido está comprendida entre 3000 mg/g y 0,3 mg/g.
- 45
9. Materiales nanocompuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8 para su uso como agentes antimicrobianos.

- 5 **10.** Materiales nanocompuestos de acuerdo con la reivindicación 9, en los que dichos materiales nanocompuestos se usan en combinación con excipientes y/o diluyentes farmacéuticamente aceptables, para el tratamiento de infecciones de la piel, membranas mucosas y tejidos epiteliales, intactas o lesionadas de diferentes sitios anatómicos.
- 10 **11.** Materiales nanocompuestos de acuerdo con la reivindicación 10, en los que dichos materiales nanocompuestos se encuentran en una mezcla con polisacáridos aniónicos neutros o aniónicos no gelificantes seleccionados del grupo que consiste en dextrano, ácido hialurónico, carboximetilcelulosa y galactomananos.
- 15 **12.** Materiales nanocompuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8 para su uso en aplicaciones de SERS (espectroscopía Raman mejorada en superficie).
- 15 **13.** Materiales nanocompuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8 para su uso en biosensores moleculares.
- 20 **14.** Materiales nanocompuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8 para su uso como revestimientos polisacáridicos sobre superficies activadas de materiales poliméricos.
- 20 **15.** Materiales nanocompuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8 para su uso en mezclas con otros polisacáridos para preparar películas de envasado.
- 25 **16.** Método de preparación de materiales nanocompuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-8 que comprende al menos las etapas de:
- 30 a) preparar soluciones acuosas de polisacáridos catiónicos ramificados en una concentración de hasta el 2 % (p/v);
b) preparar soluciones acuosas de sales metálicas en una concentración comprendida entre 0,1 mM y 14 mM;
c) añadir dichas soluciones de sales metálicas a las soluciones de polisacáridos y mezclar hasta la reducción de los iones metálicos y la formación de soluciones coloidales de nanopartículas metálicas en las que dichas nanopartículas metálicas reducidas en polisacáridos están homogéneamente dispersas.
- 35 **17.** Método de preparación de acuerdo con la reivindicación 16, que además comprende la adición de una solución acuosa de un agente reductor exógeno en una concentración comprendida entre 0,05 mM y 10 mM.
- 40 **18.** Método de preparación de acuerdo con la reivindicación 16, en el que las concentraciones de polisacáridos están comprendidas entre 0,05 (p/v) y 1 % (p/v) y las concentraciones de sal están comprendidas entre 1 mM y 14 mM.
- 19.** Dispositivos que comprenden materiales nanocompuestos de acuerdo con una de las reivindicaciones 1 a 8 para su uso en el tratamiento de infecciones de la piel, membranas mucosas y tejidos epiteliales, intactos o lesionados, de diferentes sitios anatómicos.

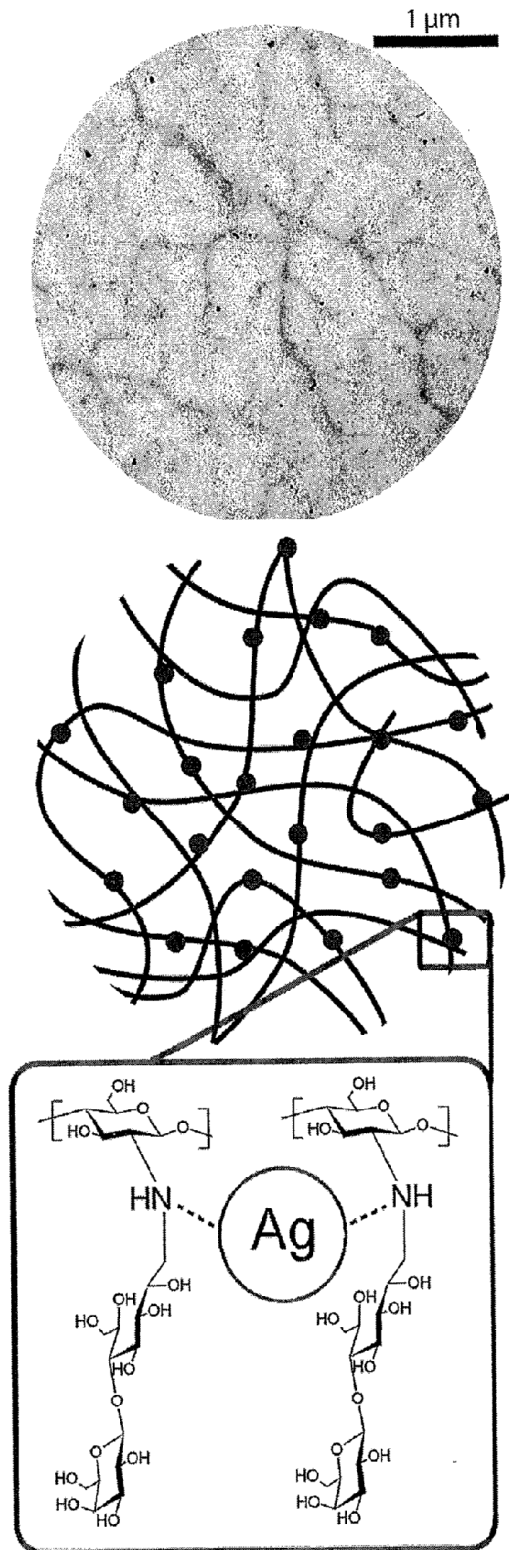


FIG. 1

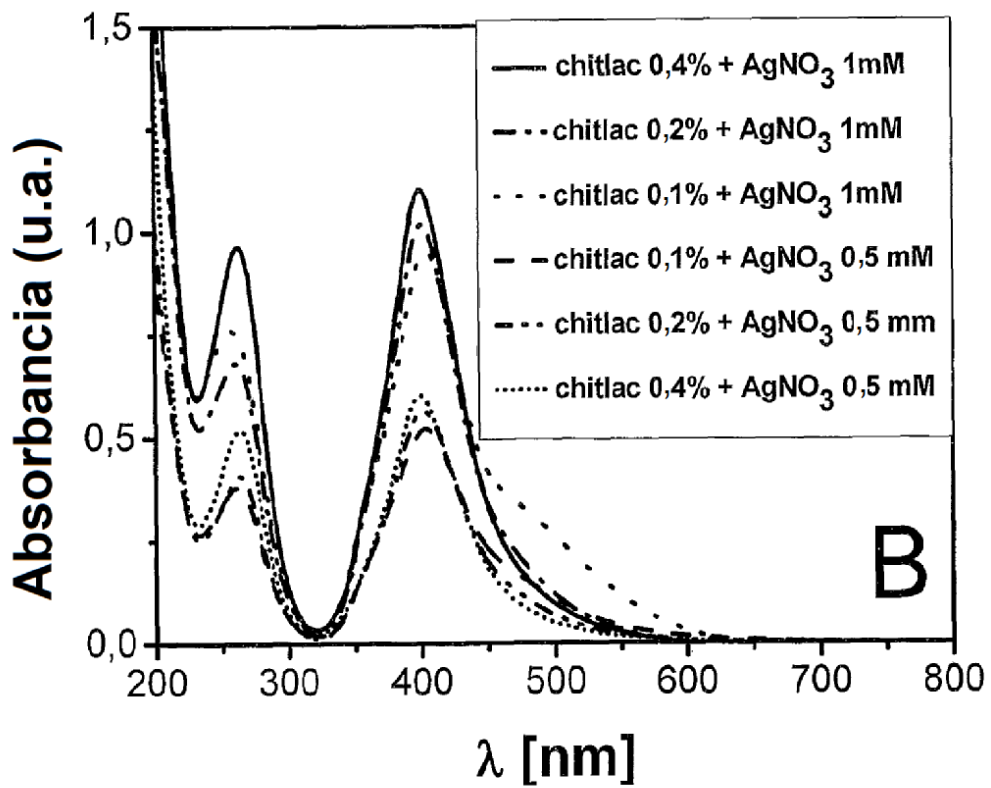
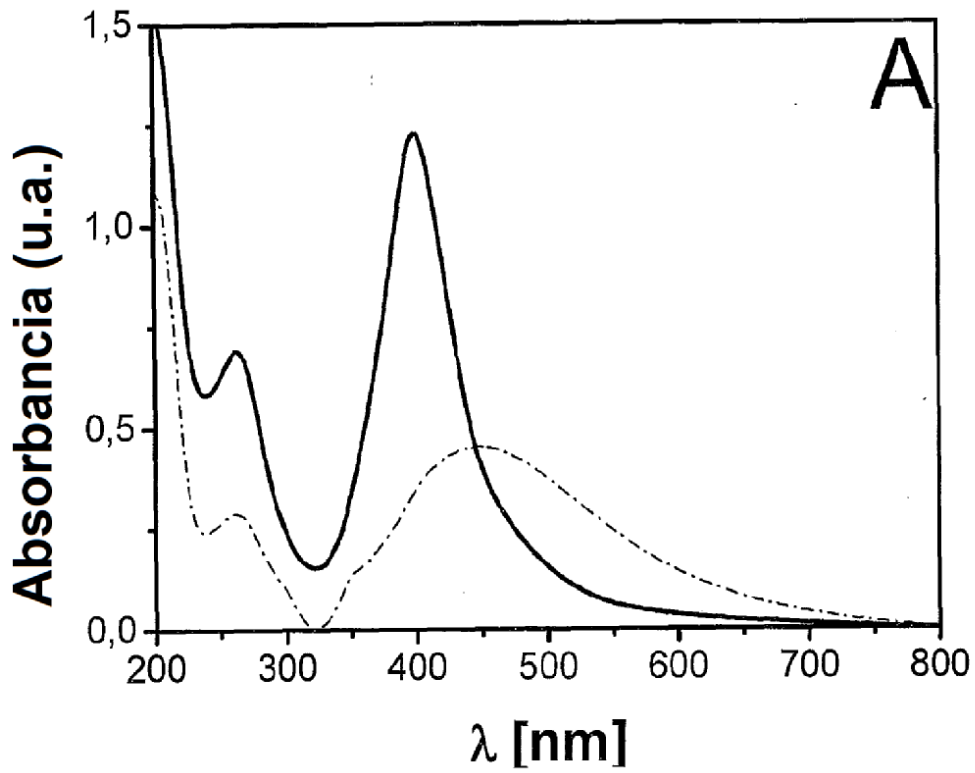


FIG. 2

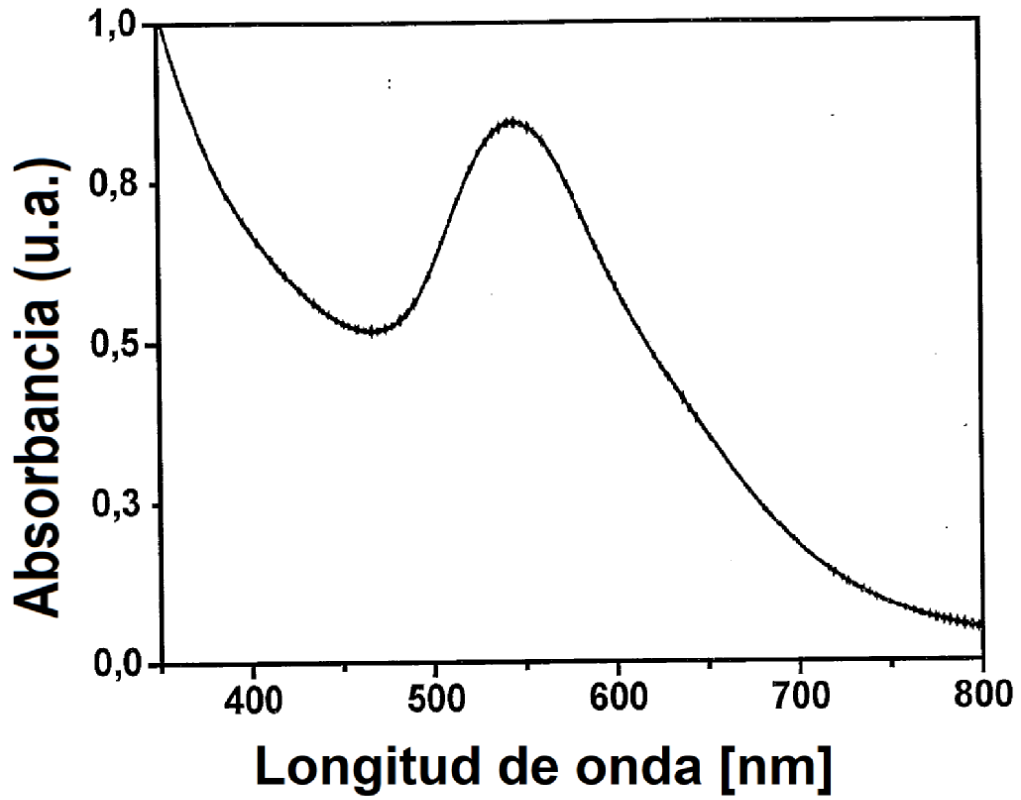


FIG. 3

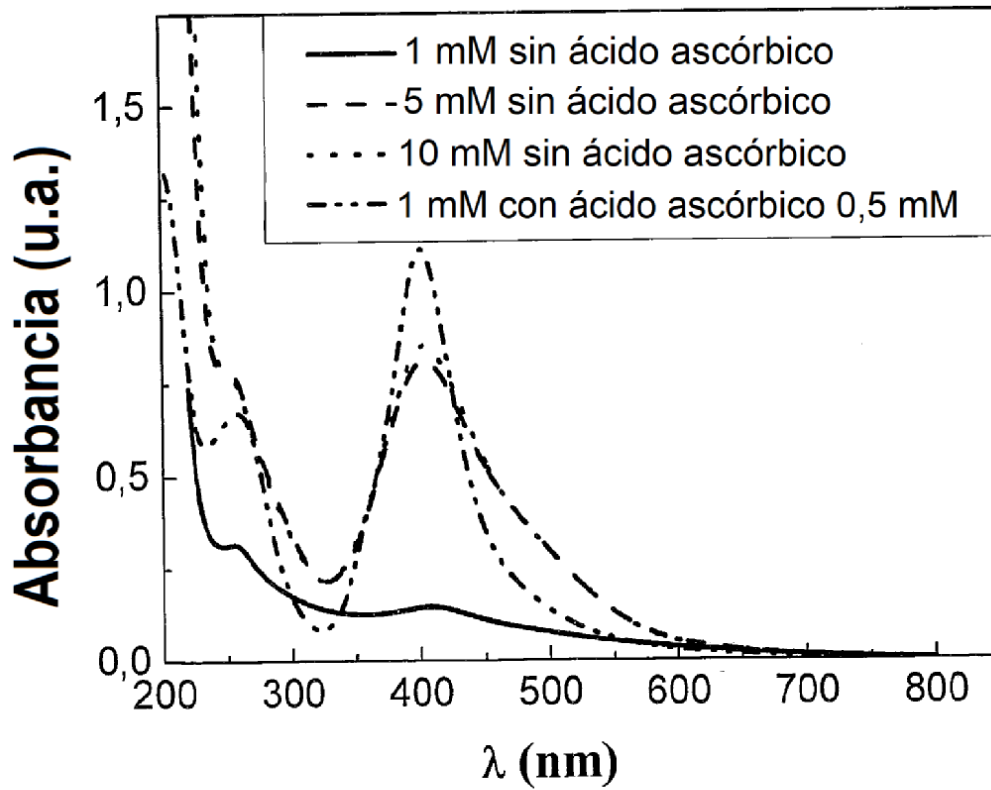


FIG. 4

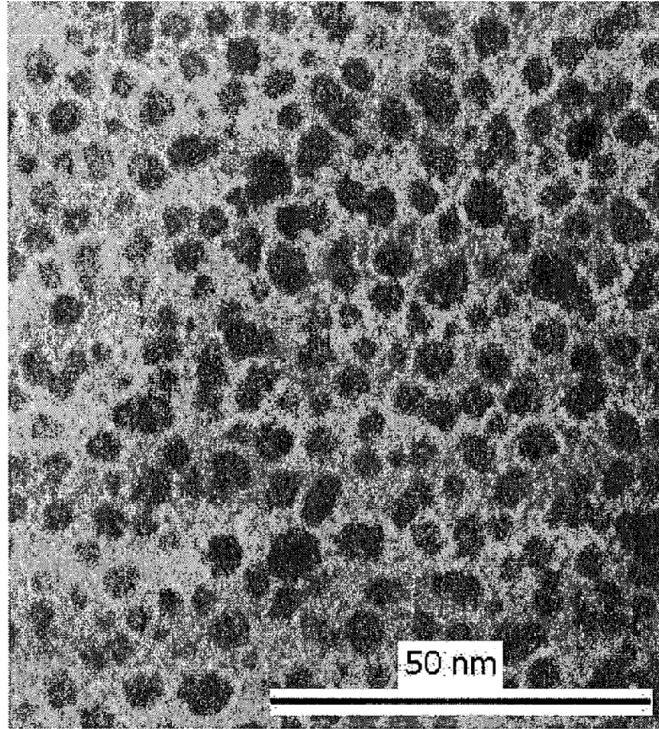


FIG. 5

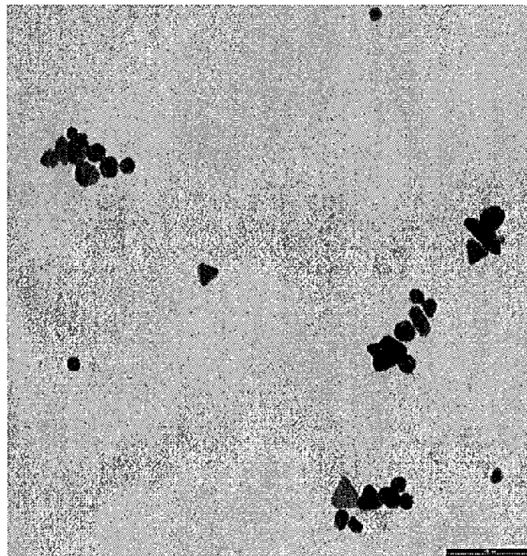


FIG. 6

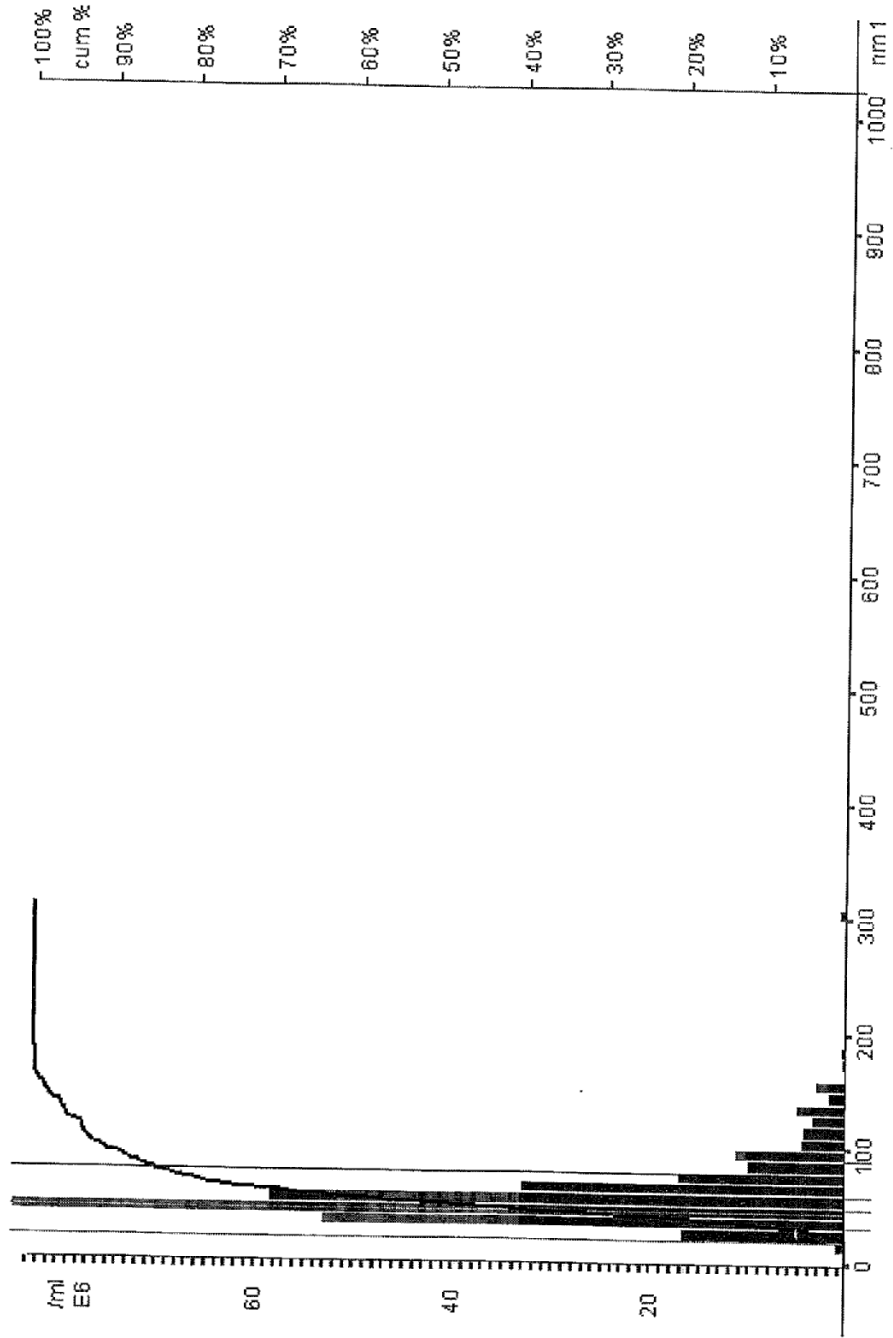


FIG. 7

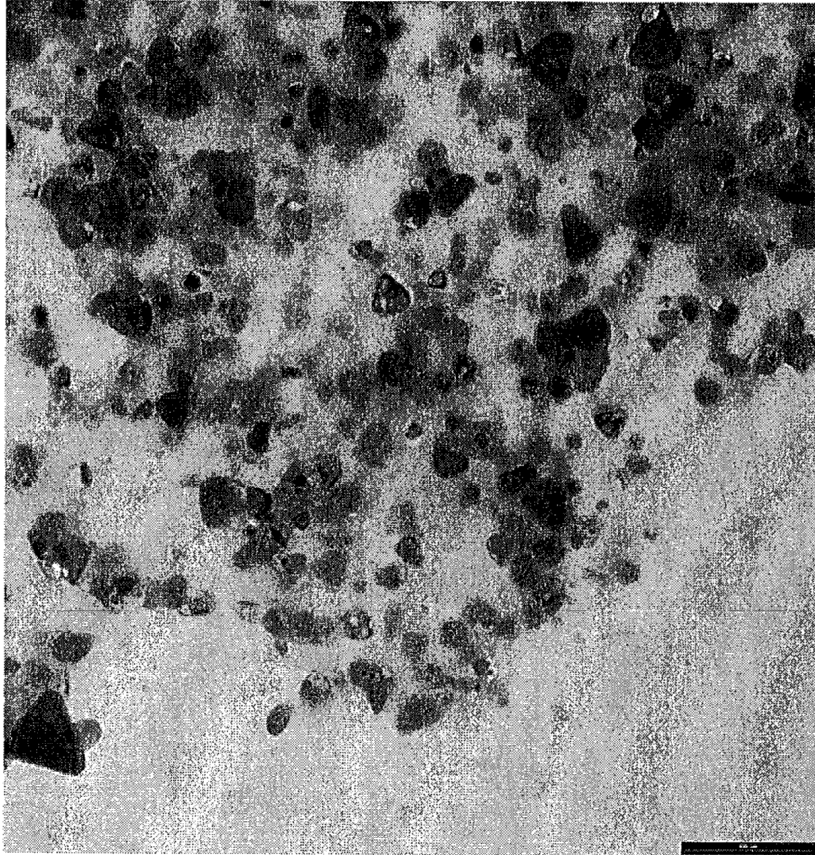


FIG. 8

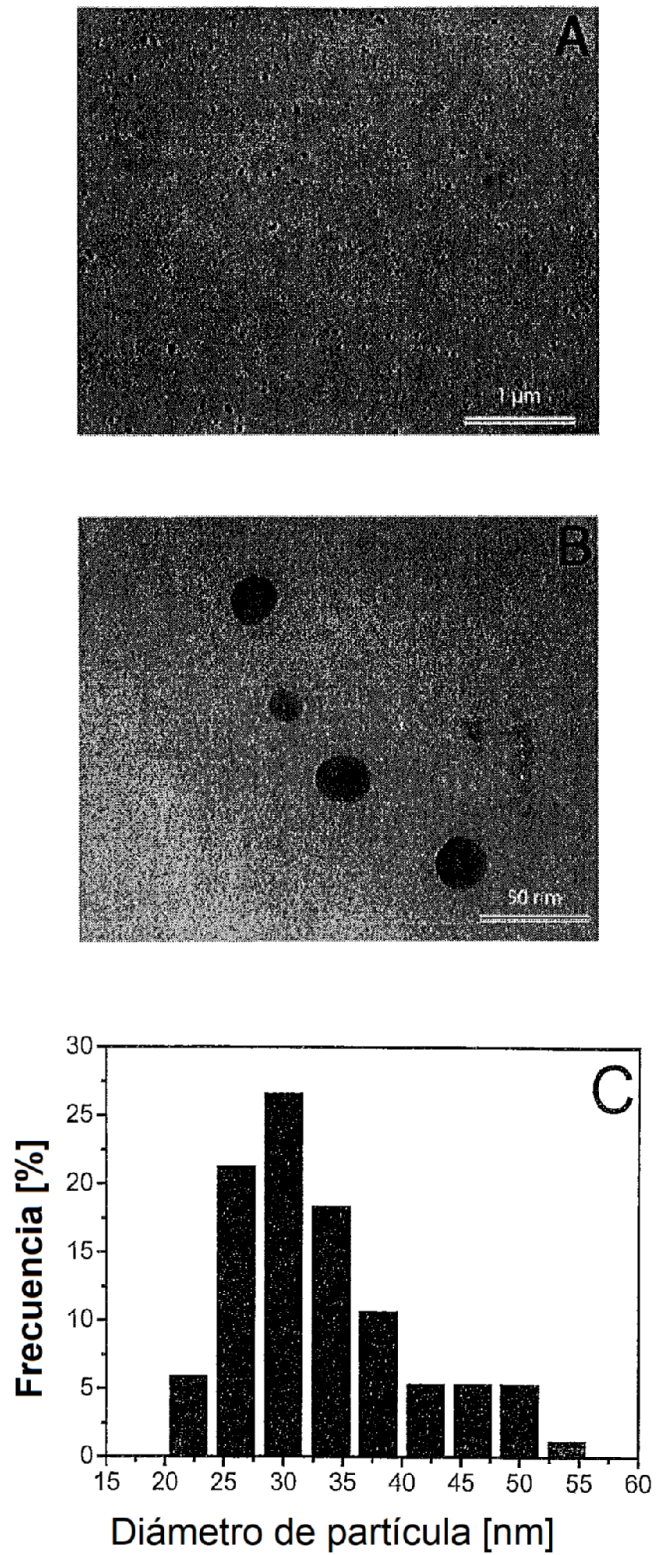


FIG. 9

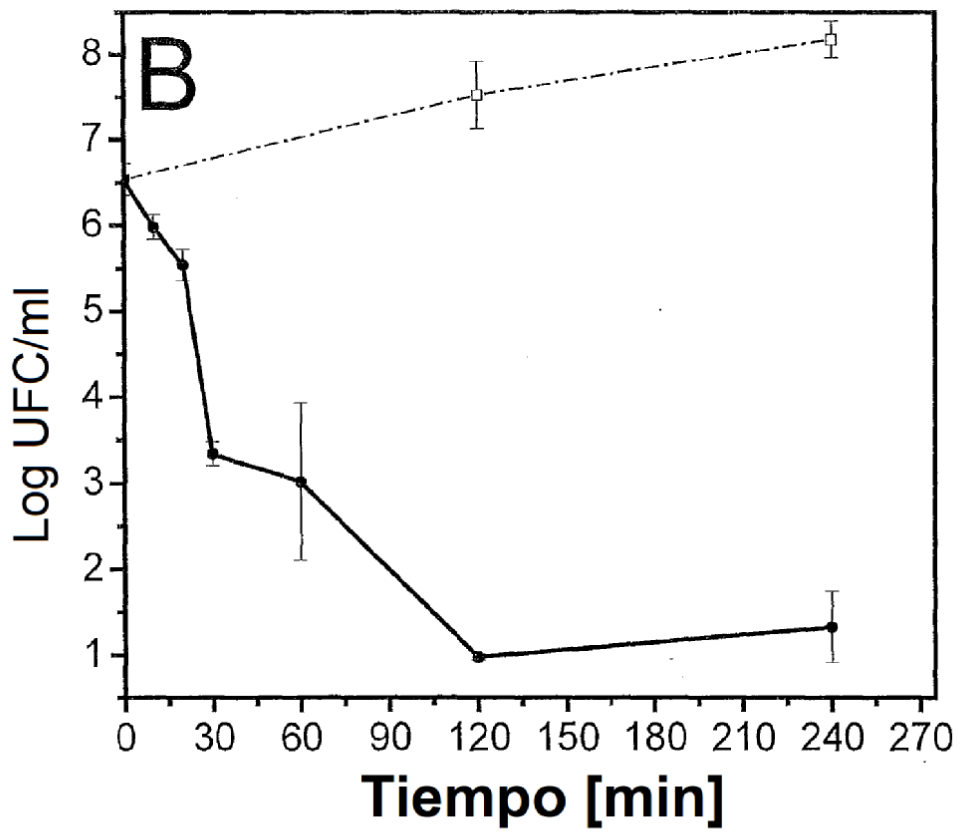
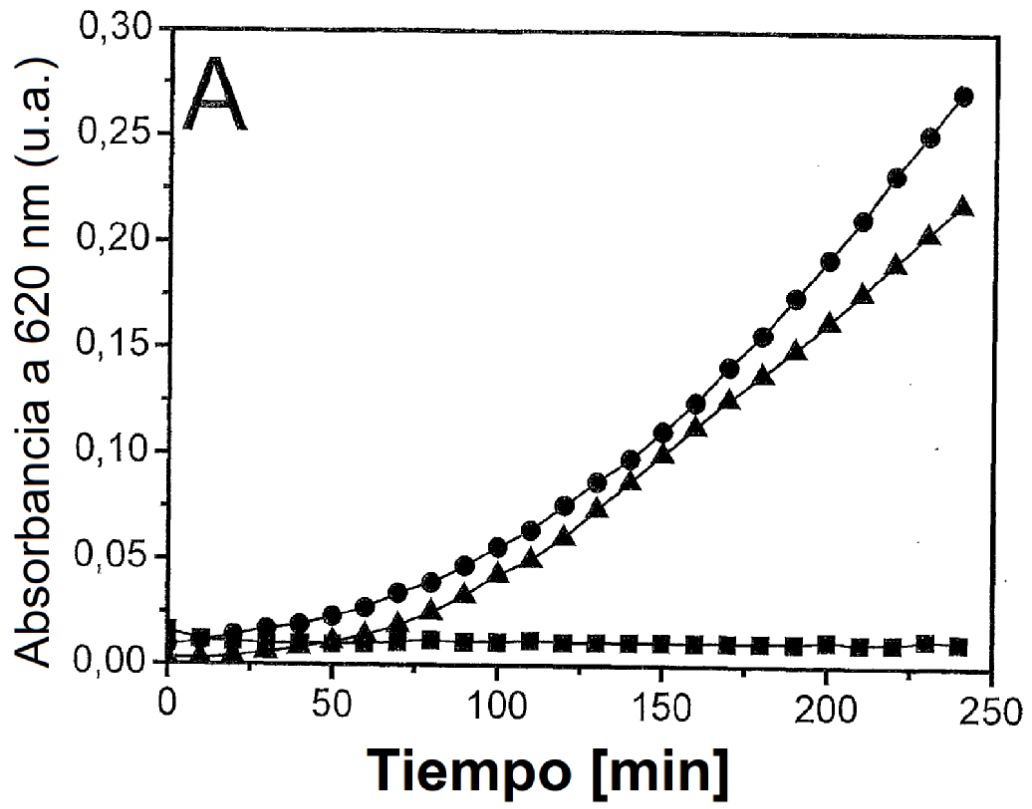


FIG. 10

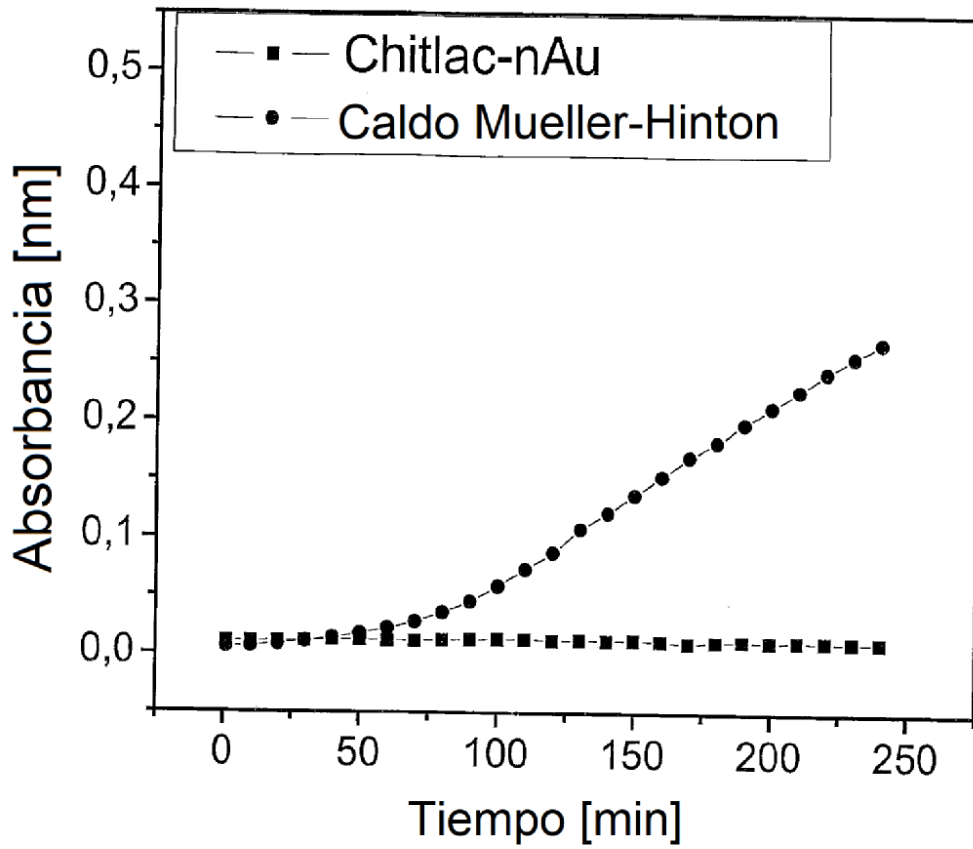


FIG. 11

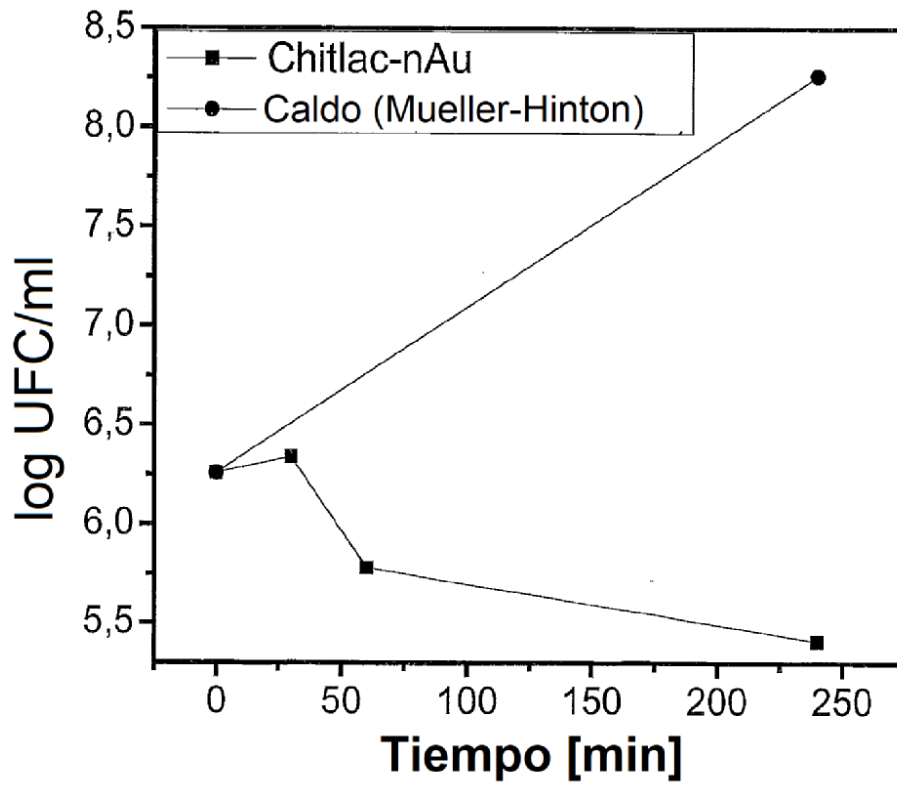


FIG. 12

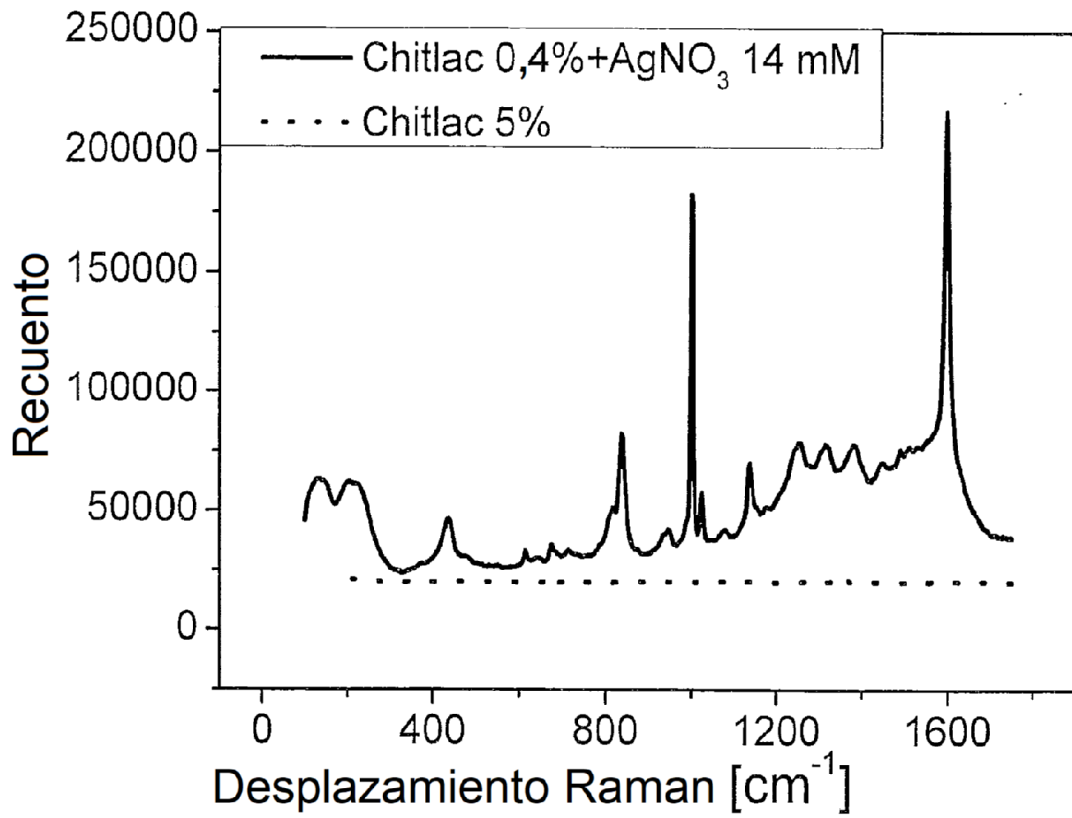


FIG. 13

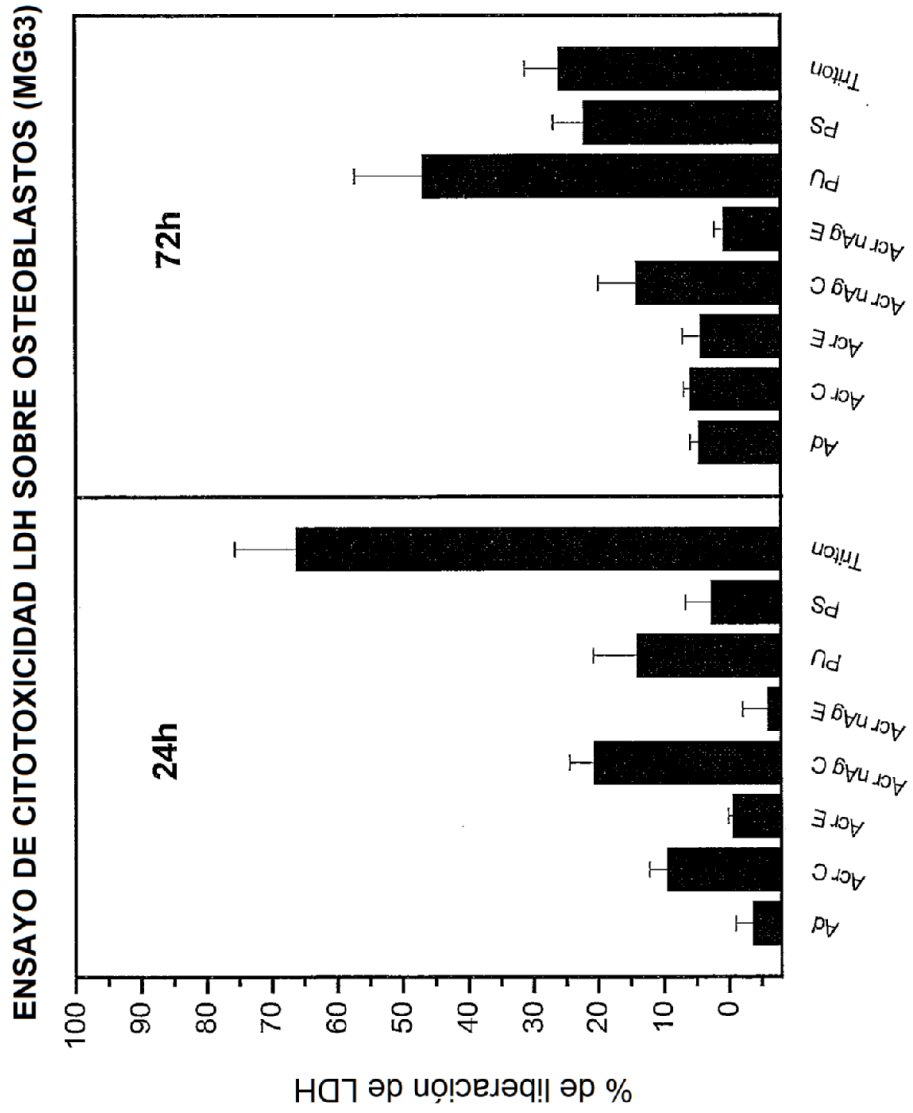


FIG. 14