

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 667 271**

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: **25.03.2013** **PCT/GB2013/050775**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.09.2013** **WO13140190**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.03.2013** **E 13719131 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **31.01.2018** **EP 2828300**

54 Título: **Proceso para producir un quitosano bajo en endotoxinas**

30 Prioridad:

23.03.2012 GB 201205174

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

10.05.2018

73 Titular/es:

MEDTRADE PRODUCTS LIMITED (100.0%)
Electra House Electra Way Crewe Business Park
Crewe
Cheshire CW1 6GL, GB

72 Inventor/es:

GLADMAN, JUNE;
HARDY, CRAIG y
HOGGARTH, ANDREW

74 Agente/Representante:

AZNÁREZ URBIETA, Pablo

ES 2 667 271 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

Proceso para producir un quitosano bajo en endotoxinas

5 La presente invención se refiere a un proceso para producir un quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas y también a un proceso para producir un quitosano neutro, una sal de quitosano y derivados de quitosano con baja concentración de endotoxinas, así como a los productos de dichos procesos.

El quitosano es particularmente útil en la preparación de materiales hemostáticos para su uso en el control de hemorragias.

10 El quitosano es un derivado de los residuos sólidos procedentes del procesamiento de mariscos y puede ser extraído a partir de cultivos de hongos. El quitosano es un material polimérico catiónico insoluble en agua. Antes de utilizar el quitosano en materiales hemostáticos, con frecuencia primero se convierte en una sal soluble en agua. De este modo, la sal de quitosano es soluble en la sangre y forma un gel que restaña el flujo sanguíneo.

15 Las sales de quitosano son idealmente adecuadas para las aplicaciones aquí descritas, ya que el quitosano se descompone fácilmente en el cuerpo. El quitosano se convierte en glucosamina por la enzima lisozima y, por tanto, es excretado por el cuerpo de forma natural. No es necesario eliminar el quitosano del cuerpo. Además, las sales de quitosano tienen propiedades antibacterianas moderadas y por ello su uso reduce el riesgo de infección.

20 Para utilizar quitosano en la preparación de materiales hemostáticos adecuados para el uso en el control de hemorragias es necesario asegurar que el quitosano tiene una concentración suficientemente baja de endotoxinas.

25 Las endotoxinas son lipopolisacáridos que están presentes en la superficie de la membrana exterior de las bacterias gram-negativas. Las endotoxinas son altamente tóxicas para los mamíferos, en particular para los humanos, y son manifiestamente difíciles de eliminar de los materiales. Las endotoxinas se pueden volver pirógenas cuando se liberan en la corriente sanguínea u otros tejidos en los que no normalmente no se encuentran. Por tanto, las endotoxinas deben ser eliminadas de los productos farmacéuticamente aceptables.

30 Los tratamientos para eliminar o destruir pirógenos, en particular endotoxinas, se denominan métodos de "despirogenización". Las técnicas de despirogenización de materiales que contienen endotoxina incluyen cromatografía de intercambio iónico, ultrafiltración, destilación y diversos procesos químicos destinados a la destrucción de las endotoxinas.

La WO2008063503 se refiere a un método para eliminar endotoxinas de quitosano que incluye las siguientes etapas:

- a) utilizar equipos y materiales estériles, libres de pirógenos, en un entorno estéril;
- b) hinchar quitosano que contiene endotoxinas durante hasta 24 horas;
- 35 c) disolver de 1 kg/25 l a 1,5 kg/25 l del quitosano en una base hidróxido de 0,01M a 4,0M;
- d) agitar continuamente la solución básica de quitosano resultante;
- e) calentar la solución a una temperatura entre 60 y 100°C durante un tiempo de 45 minutos a 4 horas con agitación;
- f) enjuagar la solución con hasta 10x volumen de agua ultrapura libre de endotoxinas;
- 40 g) neutralizar la solución a un pH entre 6,8 y 7,5;
- h) formar una suspensión ultrapura de quitosano con baja concentración de endotoxinas y transferirla a un sistema cerrado libre de endotoxinas;
- i) eliminar el exceso de agua de la suspensión espesa.

45 Este es un proceso complicado y costoso, especialmente debido a la necesidad de equipos estériles y de enjuagar la solución con 10x volumen de agua libre de endotoxinas.

La US2006293509 se refiere a un método para preparar un quitosano soluble en agua que tiene una baja concentración de endotoxinas mediante:

- a) poner en contacto el quitosano insoluble en agua con una solución básica durante un primer período de tiempo superior a 1 hora;

50

- b) enjuagar el quitosano insoluble en agua para eliminar la solución básica residual, idealmente con agua libre de endotoxinas;
- c) acetilar parcialmente el quitosano insoluble en agua en una solución de reacción que contiene un agente de transferencia de fase;
- 5 d) disolver el quitosano soluble en agua parcialmente acetilado en una solución acuosa que contiene un agente tensioactivo y con un pH entre aproximadamente 7,0 y aproximadamente 7,4;
- e) añadir un disolvente miscible en agua a la solución acuosa y ajustar además el pH de la solución acuosa a un pH de al menos 8,0 para provocar la precipitación del quitosano soluble en agua con un bajo contenido de endotoxinas a partir de la mezcla solución acuosa/disolvente miscible con agua; y
- 10 f) opcionalmente lavarlo en un no disolvente tal como isopropanol.

Sin embargo, este proceso es complicado y caro e idealmente incluye el uso de grandes cantidades de agua libre de endotoxinas u otros líquidos. El proceso también requiere el uso de agentes de transferencia de fase y se prolonga unas pocas horas.

La TW593342 se refiere a un método para reducir endotoxinas en quitosano mediante:

- 15 a) disolver el quitosano que contiene endotoxinas en una solución acuosa;
- b) poner en contacto la solución acuosa con un agente tensioactivo para formar un sólido insoluble y una solución acuosa con un contenido reducido en endotoxinas;
- c) utilizar un medio de separación sólido/líquido para separar el sólido de la solución acuosa.

- 20 Sin embargo, este proceso requiere un tensioactivo para que reaccione con el quitosano disuelto con el fin de producir un sólido insoluble. El sólido resultante consistirá en una mezcla de quitosano y tensioactivo o en un producto de reacción entre el quitosano y el tensioactivo.

La presente invención tiene el objetivo de eliminar las dificultades arriba mencionadas.

- 25 De acuerdo con un primer aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para producir un quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas según la reivindicación 1. El proceso de la presente invención proporciona una forma eficaz para obtener un quitosano alcalino con una baja concentración de endotoxinas. Ventajosamente, el proceso no requiere una etapa de lavado, una etapa de enjuague, el uso de un tensioactivo o de agentes transferencia de fase, equipos estériles ni/o el uso de agua libre de endotoxinas. Además, tampoco se requieren filtración de aire especializada o condiciones estériles. Preferiblemente, el proceso de la presente invención no comprende ninguna etapa de acetilación del quitosano.

- 30 El concepto "solución alcalina" se utiliza aquí en referencia a una solución que tiene un valor pH superior a pH 7,5.

- 35 Dado que el peso molecular de las endotoxinas puede variar considerablemente, la concentración de endotoxinas se mide en unidades de endotoxina (UE) por gramo de material. La medida de la concentración de endotoxinas es una cuantificación de los niveles de endotoxinas en relación con una cantidad específica de endotoxinas de referencia.

Por ejemplo, en la presente invención, la concentración de endotoxinas se mide en unidades de endotoxina (UE) por gramo de quitosano. El concepto "con baja concentración de endotoxinas" se utiliza aquí en referencia a una concentración de endotoxinas inferior a 100 unidades de endotoxinas (UE) por gramo de quitosano.

- 40 Así, el proceso de la presente invención es adecuado para preparar un quitosano alcalino que tiene una concentración de endotoxinas inferior a 100 UE/g.

Preferiblemente, el quitosano alcalino resultante tiene una concentración de endotoxinas inferior a 50 UE/g, de forma más preferible inferior a 20 UE/g, de forma incluso más preferible inferior a 15 UE/g y de forma totalmente preferible inferior a 10 UE/g.

- 45 Se ha encontrado que en el presente proceso son preferentes bajas concentraciones de solución alcalina. La concentración de la solución alcalina utilizada en el proceso es de 0,01M a 0,2M y preferiblemente la concentración de la solución alcalina es de aproximadamente 0,04M a 0,06M, normalmente 0,05M. Las concentraciones de la solución alcalina pueden ser de alrededor de 0,01M, 0,05M, 0,10M, 0,15M, 0,20M. Con una concentración 0,1M de solución alcalina se han observado buenos resultados.

- 50 En algunas realizaciones, la cantidad de solución alcalina con respecto al quitosano puede estar dentro del intervalo de aproximadamente 1 parte de quitosano por aproximadamente 10 partes de solución alcalina hasta aproximadamente 10 partes de quitosano por aproximadamente 1 parte de solución alcalina. Preferiblemente,

la cantidad de solución alcalina con respecto al quitosano es de aproximadamente 1 parte de solución alcalina por aproximadamente 2 partes de quitosano, más preferiblemente de aproximadamente 1 parte de solución alcalina por aproximadamente 1 parte de quitosano.

- 5 La solución alcalina puede comprender un componente alcalino o alcalinotérreo seleccionado entre los siguientes, solo o en combinación: hidróxidos metálicos, carbonatos metálicos, bisulfitos metálicos, persulfatos metálicos, bases conjugadas e hidróxido de amonio.

Los metales adecuados incluyen sodio, potasio, calcio o magnesio.

Preferentemente, el componente alcalino es hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o carbonato de sodio. Normalmente se utiliza hidróxido de sodio.

- 10 La solución alcalina se puede poner en contacto con el quitosano por cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, la solución alcalina se puede pulverizar sobre el quitosano o el quitosano se puede mezclar con la solución alcalina. Preferiblemente se produce una distribución uniforme del quitosano en contacto con la base.

- 15 Preferiblemente, el quitosano se mezcla con la solución alcalina. A bajos pesos moleculares, el quitosano se puede disolver total o parcialmente en la solución alcalina. El quitosano se puede mezclar con la solución alcalina durante aproximadamente 30 minutos, más preferiblemente durante aproximadamente 10 minutos. En algunas realizaciones, el quitosano se puede mezclar con la solución alcalina durante más de 30 minutos. En algunas realizaciones, la mezcla de quitosano y solución alcalina se puede agitar intermitentemente durante la duración de la etapa (b).

- 20 La mezcla del quitosano y la solución alcalina se deja reposar durante un período de tiempo en el que la endotoxina es destruida por la base. La mezcla de quitosano y solución alcalina se deja reposar durante al menos aproximadamente 12 horas. Se ha descubierto que cuanto más largo es el período de tiempo durante el cual se deja reposar la mezcla de quitosano y solución alcalina, menores son las concentraciones de endotoxina en el quitosano alcalino resultante. Se han observado concentraciones adecuadamente bajas de endotoxina cuando la mezcla se deja reposar durante aproximadamente 12 horas. Otra ventaja del proceso de la presente invención es que la mezcla se puede dejar reposar sin necesidad de seguir mezclando el quitosano con la solución alcalina.

- 30 En algunas realizaciones, la mezcla se puede dejar reposar durante un tiempo de al menos aproximadamente 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72 horas.

Preferiblemente, la mezcla se deja reposar durante al menos 48 horas.

- 35 En algunas realizaciones, la mezcla se puede dejar reposar durante un tiempo de al menos aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70 o más días.

En algunas realizaciones, la mezcla se deja reposar durante aproximadamente dos a cuatro semanas (o 14 a 30 días) o más. Preferiblemente, la mezcla se deja reposar entre 24 horas y 70 días, más preferiblemente entre 7 días y 35 días y de forma totalmente preferible entre 14 días y 21 días.

- 40 Se han observado buenos resultados poniendo el quitosano en contacto con una solución 0,1M de hidróxido de sodio y dejando reposar la mezcla durante aproximadamente 12 a 16 días, preferiblemente alrededor de 14 días.

- 45 La mezcla se puede dejar reposar a temperatura y presión ambiente. La expresión "temperatura y presión ambiente" quiere decir una temperatura de aproximadamente 20-25°C y una presión de aproximadamente 1 atmósfera (atm). Ventajosamente no es necesario dejar reposar la mezcla en un entorno estéril.

La mezcla preferentemente se guarda en un recipiente limpio. La mezcla se puede almacenar bajo atmósfera inerte.

- 50 La mezcla puede comprender además un conservante. Ventajosamente, el conservante puede eliminar el riesgo de un posible crecimiento microbiano, por ejemplo cuando la mezcla se deja reposar durante un tiempo prolongado. El conservante puede ser cualquier conservante biocompatible y adecuado para su uso en un

entorno alcalino. Conservantes adecuados incluyen iones de plata, iones de zinc, clorhexadina o combinaciones de los mismos.

- 5 El proceso de la presente invención puede comprender o no una etapa de secado. La etapa de secado se puede llevar a cabo mediante cualquier medio de secado convencional conocido en la técnica. Preferiblemente, la etapa de secado se lleva a cabo en un horno o por filtración a través de un secador de aire. De nuevo, para la etapa de secado no se requiere ningún equipo estéril especializado.

Se ha descubierto que, una vez que la mezcla se ha secado en la etapa de secado, el nivel de endotoxinas de la mezcla no aumenta notablemente. Esto es beneficioso para el procesamiento posterior de la mezcla.

- 10 Así, se proporciona un quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas, que tiene una concentración de endotoxinas inferior a 100 UE/g. El quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas puede ser insoluble en agua. Con bajos pesos moleculares, el quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas puede presentar cierta solubilidad en agua.

- 15 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas que se puede obtener mediante el proceso aquí descrito. También se describe aquí un quitosano alcalino que comprende una concentración de endotoxinas inferior a 100 UE/g.

El quitosano alcalino preferentemente tiene una concentración de endotoxinas inferior a 50 UE/g, más preferiblemente inferior a 20 UE/g, de forma incluso más preferible inferior a 15 UE/g y de forma totalmente preferente inferior a 10 UE/g.

- 20 El quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas se puede utilizar en la fabricación de otros productos de quitosano, por ejemplo derivados o copolímeros, o en la fabricación de quitosano de bajo peso molecular u oligosacáridos de quitosano. El quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas también puede ser útil como materia prima para la fabricación de otras formas de quitosano o derivados o copolímeros, tales como fibras, tejidos, revestimientos, películas, geles, soluciones, láminas o espumas basadas en quitosano.

- 25 En particular, el quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas se puede utilizar en la preparación de otros productos de quitosano útiles que tienen baja concentración de endotoxinas, incluyendo quitosano neutro y sales de quitosano y otros derivados de quitosano, por ejemplo carboximetilquitosano, hidroxietilquitosano, acilquitosano, alquilquitosano, sulfonilquitosano, quitosano fosforilado, alquilidenquitosano, quelatos metálicos, cloruro de quitosano, lactato de quitosano, acetato de quitosano, malato de quitosano, gluconato de quitosano.

Por consiguiente, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un proceso para producir un quitosano neutro, una sal de quitosano o un derivado de quitosano con baja concentración de endotoxinas que comprende la etapa de poner en contacto un quitosano alcalino preparado mediante el proceso aquí descrito con un ácido.

- 35 El proceso puede proporcionar un quitosano neutro, una sal de quitosano u otro derivado de quitosano médicamente útiles con baja concentración de endotoxinas.

La etapa de poner en contacto el quitosano alcalino con el ácido se puede llevar a cabo antes de la etapa de secado en el proceso de acuerdo con el primer aspecto de la presente invención.

- 40 El ácido se puede poner en contacto con el quitosano alcalino por cualquier medio adecuado conocido en la técnica. Por ejemplo, el ácido se puede pulverizar sobre el quitosano alcalino o el quitosano alcalino se puede mezclar con el ácido.

Preferentemente, el quitosano alcalino se mezcla con el ácido.

Aquí la referencia a un quitosano neutro se entiende un quitosano que tiene un pH entre aproximadamente 6,5 y aproximadamente 7,5, y preferiblemente un pH de aproximadamente 7.

- 45 Por lo tanto, con el fin de preparar un quitosano neutro, el quitosano alcalino se puede mezclar con un volumen y una concentración adecuados de un ácido para obtener una solución neutra, con un pH entre 6,5 y 7,5. El volumen y/o la concentración del ácido necesarios para neutralizar el quitosano alcalino dependerá del pH del quitosano alcalino.

Alternativamente, para preparar una sal de quitosano o un derivado de quitosano, el quitosano alcalino se puede mezclar con un volumen y una concentración de ácido en exceso con respecto a lo necesario para proporcionar un quitosano neutro.

- 5 Ácidos adecuados para su uso en la presente invención se puede seleccionar entre los siguientes, solos o en combinación: ácidos orgánicos, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, aminoácidos, ácidos de Lewis, ácidos monopróticos, ácidos dipróticos, ácidos polipróticos, ácidos nucleicos y ácidos inorgánicos.

Ácidos orgánicos adecuados se pueden seleccionar entre los siguientes, solos o en combinación: ácido acético, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico, ácido glucónico y ácido láctico.

- 10 Ácidos grasos adecuados se pueden seleccionar entre los siguientes, solos o en combinación: ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido elaidico, ácido vaccénico, ácido linoleico, ácido linoeláidico, ácido α -linoleico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúxico, ácido docosahexaenoico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerótico.

- 15 Aminoácidos adecuados se pueden seleccionar entre los siguientes, solos o en combinación: histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, taurina.

Ácidos inorgánicos adecuados se puede seleccionar entre los siguientes, solos o en combinación: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico. Preferiblemente, el ácido seleccionado para la neutralización es ácido clorhídrico.

- 20 El ácido puede tener una concentración entre aproximadamente 0,001M de ácido hasta la concentración máxima posible de ácido. Por ejemplo, la concentración máxima típica del ácido sulfúrico es de aproximadamente un 98% de ácido sulfúrico. El ácido puede tener una concentración de aproximadamente 0,01M a 5M, de 0,01M a 3M o de 0,1M a 2M. Preferiblemente, el ácido tiene una concentración de aproximadamente 1M. Concentraciones de ácido pueden ser de aproximadamente 0,01M, 0,05M, 0,10M, 0,15M, 0,20M, 0,25M, 0,30M, 0,35M, 0,40M, 0,45M, 0,50M, 0,55M, 0,60M, 0,65M, 0,70M, 0,75M, 0,80M, 0,85M, 0,90M, 0,95M o 1,0M.

- 30 El ácido puede estar presente como un licor ácido que comprende el ácido y un no disolvente. El no disolvente puede ser cualquier disolvente en el que el quitosano es insoluble. No disolventes típicos incluyen lactato de etilo, acetato de etilo, acetato de metilo, etanol, acetona o mezclas de los mismos. Preferiblemente, el no disolvente comprende acetato de etilo o etanol. Más preferiblemente, el no disolvente comprende etanol 80:20 en agua. Ventajosamente, se ha observado que la reacción avanza a mayor velocidad utilizando un no disolvente que comprende una mezcla etanol:agua 80:20.

La relación entre el quitosano y el licor ácido puede oscilar entre aproximadamente 5 a 1 y aproximadamente 1 a 5. Preferiblemente, la relación entre el quitosano y el licor ácido es de aproximadamente 2 a 1.

- 35 En algunas realizaciones, el quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas se puede mezclar con el ácido durante aproximadamente cinco minutos. Después se puede dejar que la reacción proceda a medida que la mezcla se seca.

- 40 La solución resultante de la mezcla del quitosano alcalino con el ácido puede contener una sal de ácido. Preferiblemente, la solución alcalina y el ácido se seleccionan de modo que se asegure que la sal de ácido formada sea biocompatible. Por ejemplo, la solución alcalina puede comprender hidróxido de sodio y el ácido puede comprender ácido clorhídrico. En este ejemplo, la sal de ácido puede ser la sal biocompatible cloruro de sodio.

La sal de ácido se forma como un subproducto de la reacción entre el quitosano alcalino básico y el ácido.

- 45 La presencia de una sal de ácido en el producto puede afectar a la utilidad del producto de quitosano resultante. Por ejemplo, el quitosano se gelifica en menor medida en una solución salina que en agua y todavía menos en una solución salina a doble concentración. Se considera que la solución salina en concentración doble a la que aquí se hace referencia tiene una cantidad de cloruro de sodio de un 1,8%. Por consiguiente, es deseable que el producto de quitosano resultante tenga la menor cantidad posible de sal de ácido, e idealmente un nivel de sal de ácido que produzca muy poca o ninguna diferencia en la eficacia del producto de quitosano.

- 50 Sorprendentemente se ha descubierto que utilizando una solución alcalina con una concentración entre aproximadamente 0,01M y aproximadamente 0,1M se produce la baja concentración deseada de endotoxinas y al mismo tiempo se produce menos subproducto de sal de ácido en el proceso posterior para producir un quitosano neutro, una sal de quitosano o un derivado de quitosano. Ventajosamente, una menor cantidad de

5 subproducto de sal de ácido significa que el producto de quitosano resultante presentará una mejor gelificación en el uso que productos que contienen una mayor cantidad de sal de ácido. El proceso de la presente invención puede proporcionar un producto de quitosano con una cantidad adecuadamente baja de sal de ácido sin necesidad de lavar o enjuagar el producto de quitosano. Esto tiene además la ventaja añadida de no requerir el uso de agua libre de endotoxinas en una etapa de lavado o enjuague.

10 También se ha encontrado que la utilización de bajas concentraciones de solución alcalina como se describen aquí provoca una menor reducción de la viscosidad del quitosano cuando se produce un quitosano neutro, una sal de quitosano o un derivado de quitosano. La expresión "bajas concentraciones" de base significa de aproximadamente 0,01M a aproximadamente 1M, preferiblemente menos de 1M de forma más preferible de aproximadamente 0,02M a aproximadamente 0,2 M. En algunas realizaciones, la concentración de base puede ser tal como se menciona más arriba. Por consiguiente, ventajosamente, la utilización de bajas concentraciones de solución alcalina en el proceso es menos dañina para el quitosano. Así, es posible eliminar endotoxinas del quitosano provocando únicamente un cambio mínimo en la viscosidad. Es deseable que la viscosidad del quitosano se reduzca menos de aproximadamente un 25% en el proceso, preferiblemente menos de aproximadamente un 15% y de forma más preferible menos de aproximadamente un 10%.

15 Cuando el proceso proporciona un quitosano neutro con baja concentración de endotoxinas, el producto es adecuado para su uso como materia prima en la producción de otros productos basados en quitosano. Un uso particular es en la producción de sales de quitosano, cuyas propiedades absorbentes las hacen deseables para su uso en preparaciones hemostáticas de control hemorrágico. Es preferible que las sales de quitosano sean solubles en agua.

Así, en otra realización de la presente invención, se puede preparar una sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas poniendo en contacto con un ácido un quitosano neutro con baja concentración de endotoxinas producido mediante el proceso aquí descrito.

25 El ácido puede ser cualquier ácido apropiado para proporcionar la sal de quitosano deseada. Por ejemplo, si se desea un acetato de quitosano se puede utilizar ácido acético; si se desea un succinato de quitosano se puede utilizar ácido succínico, etc. Cualquiera de los ácidos aquí descritos puede emplearse en el presente proceso para producir una sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas.

30 El proceso para producir una sal de quitosano o un derivado de quitosano con baja concentración de endotoxinas puede comprender además la etapa de secar la mezcla de quitosano neutro con baja concentración de endotoxinas y ácido. La etapa de secado se puede realizar por cualquier medio de secado convencional conocido en la técnica. Preferiblemente, la etapa de secado se realiza en un horno o por filtración del producto a través de un secador de aire.

Por tanto se proporciona un quitosano neutro, una sal de quitosano o un derivado de quitosano con baja concentración de endotoxinas, que tienen una concentración de endotoxinas inferior a 100 UE/g.

35 El quitosano neutro con baja concentración de endotoxinas puede ser insoluble en agua.

La sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas puede ser soluble en agua.

40 De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un quitosano neutro, una sal de quitosano o un derivado de quitosano con baja concentración de endotoxinas que se pueden obtener mediante cualquiera de los procesos aquí descritos. También se describe un quitosano neutro, una sal de quitosano o un derivado de quitosano que comprende una concentración de endotoxinas inferior a 100 UE/g.

El quitosano neutro, la sal de quitosano o el derivado de quitosano preferentemente tienen una concentración de endotoxinas inferior a 50 UE/g, más preferiblemente inferior a 20 UE/g, de forma incluso más preferible inferior a 15 UE/g y de forma totalmente preferente inferior a 10 UE/g.

45 La sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas de la presente invención es adecuada para su uso como hemostático para restañar el flujo sanguíneo.

Así, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas tal como se describe aquí para su uso como hemostático para restañar el flujo sanguíneo.

50 La sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas de la presente invención se puede incorporar en un apósito para hemorragias superficiales sin peligro para la vida o hemorragias con peligro para la vida.

Por tanto, de acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona una sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas tal como se describe aquí para su uso en un apósito para hemorragias superficiales sin peligro para la vida o hemorragias con peligro para la vida.

- 5 La sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas de la presente invención es adecuada para su uso en la preparación de un apósito hemostático para restañar el flujo sanguíneo. De acuerdo con otro aspecto de la presente invención, se proporciona un apósito hemostático que comprende una sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas tal como se describe aquí.

De acuerdo con otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un material hemostático que comprende una sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas tal como se describe aquí.

- 10 El material hemostático y/o la sal de quitosano pueden estar en cualquier forma adecuada, por ejemplo en forma de partículas, polvo, gránulos, copos, fibras, gel, espuma, lámina, película o líquido. Aquí también se describe un método para restañar el flujo sanguíneo que comprende las etapas de: opcionalmente limpiar un área de una herida cuando sea posible; aplicar a dicha área de la herida un apósito hemostático que comprende una sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas tal como se describe aquí; y aplicar una presión constante al área de la herida hasta que se forma un coágulo de gel.
- 15

Preferiblemente se aplica una presión constante al área de la herida durante aproximadamente tres minutos o más.

A continuación se describirán además realizaciones de la presente invención en los siguientes ejemplos no limitativos en referencia a las figuras adjuntas, en las que:

- 20 Fig. 1: gráfico que muestra el efecto de diferentes concentraciones de subproducto de sal de ácido en la viscosidad de un producto de quitosano en diferentes medios;
 Fig. 2: gráfico que muestra el efecto del tratamiento con ácido en la viscosidad del polímero de quitosano;
 Fig. 3: gráfico que muestra la penetración de la solución salina en dos materiales hemostáticos diferentes de acuerdo con la presente invención;
 25 Fig. 4: gráfico que muestra el tiempo de coagulación de la sangre de dos materiales hemostáticos diferentes de acuerdo con la presente invención;
 Fig. 5: gráfico que muestra el porcentaje de hemostasia en pruebas de corte epigástrico de dos materiales hemostáticos diferentes de acuerdo con la presente invención.

Test de endotoxinas

- 30 1. Preparar solución de extracción USP (United States Pharmacopia) tal como se detalla en USP para análisis de endotoxina de quitosano (4,6 ml de HCl 1M y 45,4 ml de agua libre de endotoxina);
 2. extraer mediante adición de 0,1 g del producto de quitosano de análisis a 9,9 ml de solución de extracción USP y dejar reposar durante 48 horas a 37°C;
 3. después de 48 horas, diluir 100 µl del extracto en 0,9 ml de agua libre de endotoxina; y
 35 4. mezclar 100 µl del producto arriba obtenido en 100 µl de tampón Endotoxin Specific (ES) (específico para endotoxina) suministrado por Charles River.

El extracto resultante se analiza utilizando un espectrofotómetro portátil Endosafe®-PTS™ que utiliza cartuchos desechables aprobados por la FDA. El proceso del extracto utiliza una dilución 2000x y una detección límite de análisis mínima de 10 UE/g.

- 40 Los Ejemplos 1, 2, 11, 19 y 20 no entran dentro del alcance de la invención.

Ejemplo 1:

50 g de quitosano (Primex Islandia) se mezclaron con 50 g de NaOH 1M durante 30 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 48 horas. Después se secó en un horno sobre una bandeja a 40°C.

- 45 Endotoxina inicial del quitosano bruto: 383 UE/g
 Quitosano alcalino tratado seco: 10,6 UE/g
 Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g

Ejemplo 2:

50 g de quitosano (Primex Islandia) se mezclaron con 50 g de NaOH 0,5M durante 10 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 72 horas. Después se secó en un horno sobre una bandeja a 40°C.

- 5 Endotoxina inicial del quitosano bruto: 383 UE/g
Quitosano alcalino tratado seco: 38,3 UE/g

Ejemplo 3:

50 g de quitosano (Primex Islandia) se mezclaron con 50 g de NaOH 0,2M durante 10 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante siete días. Después se secó en un horno sobre una bandeja a 40°C.

- 10 Endotoxina inicial del quitosano bruto: 383 UE/g
Quitosano alcalino tratado seco: 27,9 UE/g

Ejemplo 4:

50 g de quitosano (Primex Islandia) se mezclaron con 50 g de NaOH 0,1M durante 10 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 14 días. Después se secó en un horno sobre una bandeja a 40°C.

- 15

Endotoxina inicial del quitosano bruto: 383 UE/g
Quitosano alcalino tratado seco: 12,7 UE/g

Ejemplo 5:

50 g de quitosano (Primex Islandia) se mezclaron con 100 g de NaOH 0,2M durante 10 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante dos días. Después se secó en un horno sobre una bandeja a 40°C.

- 20

Endotoxina inicial del quitosano bruto: 383 UE/g
Quitosano alcalino tratado seco: 35,7 UE/g

Ejemplo 6:

50 g de quitosano (Primex Islandia) se mezclaron con 100 g de NaOH 1M durante 10 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante dos días. Después se secó en un horno sobre una bandeja a 40°C.

- 25

Endotoxina inicial del quitosano bruto: 383 UE/g
Quitosano alcalino tratado seco: 49,3 UE/g

Ejemplo 7:

50 g de polvo de quitosano (Cognis, Alemania) se mezclaron con 50 g de NaOH 0,1M durante 10 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante siete días. Después se secó en un horno sobre una bandeja a 40°C.

- 30

Endotoxina inicial del quitosano bruto: 45,3 UE/g
Quitosano alcalino tratado seco: < 10 UE/g
Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g

- 35

Ejemplo 8:

50 g de polvo de quitosano (Cognis, Alemania) se mezclaron con 50 g de NaOH 0,05M durante 10 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante siete días. Después se secó en un horno sobre una bandeja a 40°C.

- 40

Endotoxina inicial del quitosano bruto: 45,3 UE/g
Quitosano alcalino tratado seco: < 10 UE/g
Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g

- 45

Ejemplo 9:

50 g de polvo de quitosano (Cognis, Alemania) se mezclaron con 50 g de NaOH 0,025M durante 10 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante siete días. Después se secó en un horno sobre una bandeja a 40°C.

- 5 Endotoxina inicial del quitosano bruto: 45,3 UE/g
 Quitosano alcalino tratado seco: < 13,5 UE/g
 Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g

- 10 El proceso también se puede escalar y utilizar para producir tamaños de lote más grandes. Los Ejemplos 10 y 11 se prepararon en una sala limpia de clase 100.000 (normas de sala limpia US FED STD 209E) utilizada habitualmente en la fabricación de dispositivos médicos.

Ejemplo 10:

- 15 3,5 kg de polvo de quitosano (Primex Islandia) se mezclaron con 3,5 kg de NaOH 0,1M durante 30 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 14 días. Después se secó mediante filtración a través de un secador de aire a 40°C.

Endotoxina inicial del quitosano bruto: 288 UE/g
 Quitosano alcalino tratado seco: 10,2 UE/g
 Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g

20 **Ejemplo 11:**

3,5 kg de polvo de quitosano (Primex Islandia) se mezclaron con 3,5 kg de NaOH 1M durante 30 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 horas. Después se secó mediante filtración a través de un secador de aire a 40°C.

- 25 Endotoxina inicial del quitosano bruto: 288 UE/g
 Quitosano alcalino tratado seco: 15,3 UE/g
 Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g

El proceso se puede utilizar sobre quitosano en diferentes formas físicas, tales como fibra de quitosano o tejido de quitosano.

30 **Ejemplo 12:**

10 g de fibra de quitosano (1,8 dtex x 28 mm) se mezclaron con 10 g de NaOH 0,1M durante 10 minutos. La fibra de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante dos días. Después se secó en un horno de laboratorio sobre una bandeja a 40°C.

- 35 Endotoxina inicial de la fibra de quitosano bruto: 88 UE/g
 Fibra de quitosano alcalino tratado seco: < 10 UE/g
 Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g

Ejemplo 13:

- 40 5 g de tela no tejida quitosano (60 gsm) se mezclaron con 5 g de NaOH 0,1M durante 10 minutos. La tela de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante dos días. Después se secó en un horno de laboratorio sobre una bandeja a 40°C.

- 45 Endotoxina inicial de la tela de quitosano bruto: 401 UE/g
 Tela de quitosano alcalino tratado seco: < 78 UE/g
 Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g

Los siguientes Ejemplos 14 y 15 utilizan una base diferente al hidróxido de sodio.

Ejemplo 14:

50 g de quitosano (Primex Islandia) se mezclaron con 50 g de KOH 0,2M (hidróxido de potasio) durante 30 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante siete días. Después se secó en un horno de laboratorio sobre una bandeja a 40°C.

- Endotoxina inicial del quitosano bruto: 383 UE/g
 5 Quitosano alcalino tratado seco: 14,4 UE/g
 Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g

Ejemplo 15:

- 10 50 g de quitosano (Primex Islandia) se mezclaron con 50 g de carbonato de sodio 0,5M durante 30 minutos. La estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo resultante se dejó reposar a temperatura ambiente durante siete días. Después se secó en un horno de laboratorio sobre una bandeja a 40°C.

- Endotoxina inicial del quitosano bruto: 383 UE/g
 Quitosano alcalino tratado seco: 25,8 UE/g
 15 Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g

- 20 Todos los Ejemplos 1-15 se refieren a la producción de quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas. Este quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas se puede utilizar posteriormente como materia prima para fabricar otros productos basados en quitosano. Por ejemplo, el quitosano alcalino se puede neutralizar a pH 7 para obtener un quitosano neutro por adición de un nivel bajo de un ácido apropiado que reaccione con la base para producir una sal biocompatible. Por ejemplo, si se utiliza hidróxido de sodio en la solución básica, éste se puede neutralizar por adición de ácido clorhídrico. El producto contendría una baja cantidad de cloruro de sodio residual.

Ejemplo 16:

- 25 En un vaso de precipitados se pesaron 20 g de la estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo del Ejemplo 4. Ésta contenía 10 g de quitosano y 10 g de NaOH 0,1M. Para neutralizar el NaOH se requirió 1 g de HCl 1M. Éste se mezcló con 9 g de etanol en otro vaso de precipitados. Después, el líquido ácido se mezcló con la estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo y se agitó durante 5 minutos. La mezcla resultante se secó después en un horno de laboratorio a 40°C. Ésta contenía un 0,29% de cloruro de sodio.

Ejemplo 17:

- 30 En un vaso de precipitados se pesaron 20 g de la estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo del Ejemplo 4. Ésta contenía 10 g de quitosano y 10 g de NaOH 0,1M. Para neutralizar el NaOH se requirió 1 g de ácido acético 1M. Éste se mezcló con 9 g de etanol en otro vaso de precipitados. Después, el líquido ácido se mezcló con la estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo y se agitó durante 5 minutos. La mezcla resultante se secó después en un horno de laboratorio a 40°C. Ésta contenía un 0,5% de acetato de sodio.
- 35 El quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas formado en los Ejemplos 1-15 también puede emplearse para producir una sal de quitosano soluble en agua con baja concentración de endotoxinas u otros derivados de quitosano. Ventajosamente, esto se puede lograr sin necesidad de un entorno estéril, sin utilizar grandes cantidades de costosa agua libre de endotoxinas y sin necesidad de enjuague o lavado. Por ejemplo,
- 40 un quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas se puede someter a reacción con un mayor nivel de un ácido apropiado. Una pequeña parte del ácido reaccionará con la base produciendo una sal biocompatible.

Ejemplo 18:

- 45 En una mezcladora de acero inoxidable se pesaron 3,1 kg de quitosano alcalino seco con baja concentración de endotoxinas del Ejemplo 10 en una sala limpia de clase 100.000. Previamente se mezclaron 3,6 kg de ácido láctico con 0,9 kg de agua libre de endotoxinas. Esta mezcla se pulverizó sobre el quitosano mientras la mezcladora estaba en funcionamiento. El material resultante se secó a 40°C por filtración a través de un secador de aire.

Se comprobó que el material era completamente soluble en agua.

- Endotoxina inicial del quitosano bruto: 288 UE/g
 50 Quitosano alcalino tratado seco: 10,2 UE/g (Ejemplo 10)
 Quitosano seco soluble en agua: 13,8 UE/g

Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g

Ejemplo 19:

- 5 En una mezcladora de acero inoxidable se pesaron 3,1 kg de quitosano alcalino seco con baja concentración de endotoxinas del Ejemplo 11 en una sala limpia de clase 100.000. Previamente se mezclaron 3,9 kg de ácido láctico con 0,9 kg de agua libre de endotoxina. Esta mezcla se pulverizó sobre el quitosano mientras la mezcladora estaba en funcionamiento. El material resultante se secó a 40°C por filtración a través de un secador de aire.

Se comprobó que el material era completamente soluble en agua.

- 10 Endotoxina inicial del quitosano bruto: 288 UE/g
 Quitosano alcalino tratado seco: 15,3 UE/g (Ejemplo 4)
 Quitosano seco soluble en agua: 14,6 UE/g
 Control (0,1 g de agua libre de endotoxinas utilizada en el proceso de extracción en lugar de quitosano): < 10 UE/g
- 15 En otro ejemplo, el quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas también puede emplearse como materia prima para la producción de derivados de quitosano con baja concentración de endotoxinas, tal como carboximetilquitosano.

Ejemplo 20:

- 20 En un vaso de precipitados se pesaron 20 g de la estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo del Ejemplo 1. Ésta contenía 10 g de quitosano y 10 g de NaOH 1M. En otro vaso de precipitados se preparó una mezcla de 5 g de cloroacetato de sodio, 5 g de agua y 10 g de etanol. Después, el líquido mixto se mezcló por agitación con la estructura granulosa de quitosano alcalino húmedo. Luego se aumentó su temperatura a 60°C durante 4 horas. La mezcla resultante se lavó tres veces con 10 g de etanol para eliminar todo el cloroacetato de sodio residual antes de secarla en un horno de laboratorio a 40°C.

- 25 Efecto de la sal de ácido en la viscosidad

La reacción del quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas con ácido para producir un quitosano con pH neutro o una sal de quitosano produce un subproducto de sal de ácido. La presencia de este subproducto puede afectar al rendimiento del producto de quitosano. Por ejemplo, el nivel de subproducto puede influir en la viscosidad de un producto de quitosano en solución salina.

- 30 Con referencia a la Figura 1, se muestran los resultados de la adición de lactato de sodio a la solución salina en diferentes concentraciones y el efecto resultante de ello en la viscosidad de una muestra de 2 g del producto de quitosano actual disponible en el mercado CELOX®, en una solución de 20 g de los diferentes medios después de tres minutos.

- 35 Los medios base eran una solución salina de fluidos corporales a la que se habían añadido diferentes niveles de lactato de sodio. El lactato de sodio representaba el subproducto de la reacción entre el hidróxido de sodio y el ácido láctico.

Los resultados se muestran en la Tabla 1 y en la Figura 1.

Tabla 1

Concentración	Viscosidad			
	Análisis 1	Análisis 2	Análisis 3	Promedio
Solución salina	55000	62000	59000	58667
1,5%	54000	52000	61000	55667
2,5%	50000	43000	39000	44000
5,0%	35000	51000	31000	39000
7,5%	35000	34000	38000	35667
10,0%	37000	32000	36000	35000

- 40 La Figura 1 muestra claramente que cuando el nivel de sal añadida aumenta, la viscosidad del CELOX® en el medio disminuye. Por tanto, resulta ventajoso que los productos de quitosano de la presente invención solo tengan un bajo nivel de subproducto de sal residual.

Efecto de la solución alcalina de baja concentración en la viscosidad

El quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas producido en el Ejemplo 10 se analizó para demostrar el efecto del tratamiento con ácido en la viscosidad del polímero de quitosano, considerada como una indicación del peso molecular. En el análisis se siguieron las siguientes etapas de método:

- 5 a) pesar 5 g de gránulos de quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas producido en el Ejemplo 10;
- b) pesar 4,95 g de ácido acético en un vaso de precipitados de 600 ml;
- c) añadir 490,05 g de agua desionizada al vaso de precipitados para obtener 495 g de una solución de ácido acético al 1%;
- 10 d) colocar el vaso de precipitados sobre una placa agitadora y encender la agitación (aumentar a medida que aumenta la viscosidad de la solución);
- e) añadir los gránulos de quitosano a la solución de ácido acético;
- f) comprobar la solución regularmente hasta que todos los granos se hayan disuelto y aumentar el nivel de agitación a medida que aumenta la viscosidad de la solución, en caso necesario;
- 15 g) dejar reposar la solución durante un total de 24 horas, medidas a partir del momento en que los gránulos de quitosano se introdujeron en la solución de ácido acético;
- h) unir un husillo 64 a un viscosímetro Brookfield;
- i) ajustar el husillo a 10 rpm;
- j) insertar el husillo en la solución hasta la marca, encender el viscosímetro y dejar que se estabilice;
- 20 k) registrar la viscosidad (cPs) a intervalos de tiempo seleccionados.

Los resultados del ensayo de viscosidad arriba descrito se muestran más abajo en la Tabla 2 y en la Figura 2. En cada lote se sacó el promedio de tres lecturas para cada intervalo de tiempo.

Tabla 2

Semanas	Viscosidad (cPs)					
	Lote 1 (lavado)		Lote 2 (lavado)		Lote 3 (lavado)	
	Promedio	STD	Promedio	STD	Promedio	STD
0	419,9	0,0	399,9	34,6	419,9	34,6
1	379,9	34,6	379,9	34,6	419,9	0,0
2	399,9	34,6	419,9	0,0	359,9	0,0
4	239,9	0,0	239,9	0,0	239,9	0,0
8	180,0	0,0	180,0	0,0	219,9	34,6
12	166,7	5,8	110,0	0,0	170,0	0,0
16	110,0	0,0	96,7	5,8	123,3	5,8
24	120,0	0,0	100,0	34,6	190,0	34,6

- 25 A partir de las medidas de viscosidad mostradas en la Figura 2 se puede deducir que el peso molecular del polímero de quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas preparado utilizando una solución de hidróxido de sodio 0,1M es estable durante semanas.

Efecto de la reducción de la concentración de solución alcalina

- 30 El efecto del uso de una concentración más baja de solución alcalina en el proceso de la presente invención se analizó en tres experimentos enfocados a (1) el porcentaje de penetrabilidad de la solución salina en las muestras de análisis, (2) el tiempo de coagulación de la sangre, y (3) el porcentaje de hemostasia en modelos de corte epigástrico *in vivo*.

En referencia a la Figura 3, se muestran los resultados del ensayo de penetrabilidad.

- 35 El método de ensayo general fue el siguiente: en un tubo de ensayo se introdujeron 5 ml de agua destilada. Después se añadió al agua una gota de colorante alimentario rojo. Sobre la superficie del agua se vertieron con cuidado 3 g de polvo hemostático de muestra, de modo que se formó una capa. Un minuto después se midió la distancia recorrida por el agua dentro del polvo hemostático y se registró como porcentaje de penetración.

- 40 Como se puede ver en la Figura 3, el polvo hemostático preparado utilizando hidróxido de sodio 1,0M es menos estable con el tiempo en comparación con el polvo hemostático preparado utilizando hidróxido de sodio 0,1M y la penetración creciente de la solución salina en los gránulos indica una mayor oportunidad para que la sangre pase a través de los gránulos y no forme un tapón de gel.

Con referencia a la Figura 4, se muestran los resultados del ensayo de coagulación de la sangre. El método de ensayo general fue el siguiente: en un tubo de ensayo se introdujeron 0,75 g de polvo hemostático de muestra, a los que se le añadieron 5 ml de sangre de conejo heparinizada. Después se invirtió el tubo y se registró el tiempo necesario para que la sangre se coagulara por completo formando una masa de gel.

- 5 Como se puede ver en la Figura 4, el polvo hemostático preparado utilizando hidróxido de sodio 1,0M tarda más en coagular la sangre que el polvo hemostático preparado utilizando hidróxido de sodio 0,1M. El período de tiempo es aproximadamente tres veces más largo, lo que está relacionado con unas menores propiedades hemostáticas (los datos demuestran que períodos de tiempo superiores a 180 segundos no resultan en un 100% de hemostasia en un modelo de hemorragia *in vivo* de baja presión y volumen medio).

- 10 Con referencia a la Figura 5, se muestran los resultados de los ensayos de hemostasia.

El método de ensayo general fue el siguiente: en la arteria epigástrica de un modelo porcino (no heparinizado) se realizó un corte de 3-5 cm. Después se aplicó el material hemostático en forma granular y se aplicó una compresión durante 1 minuto. Si se volvía a producir hemorragia, se aplicaba otra compresión durante 1 minuto.

- 15 Como se puede ver en la Figura 5, los gránulos hemostáticos preparados utilizando hidróxido de sodio 1,0M produjeron hemostasia en un 60% de las pruebas, en comparación con el 100% logrado con los gránulos hemostáticos preparados utilizando hidróxido de sodio 0,1M.

Los resultados del ensayo que, cuanto menor es la concentración de la solución alcalina utilizada en la preparación del material hemostático de la presente invención, mejor es el rendimiento del material en la penetrabilidad, la coagulación de la sangre y la hemostasia.

- 20 Evidentemente, se ha de entender que la presente invención no está limitada a los anteriores ejemplos, que se describen únicamente a modo ilustrativo.

Reivindicaciones

1. Proceso para producir un quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas, que comprende las etapas de:
 - a) poner en contacto un quitosano con una solución alcalina que tiene una concentración de 0,01M a 0,2M para formar una mezcla; y
 - b) dejar reposar la mezcla durante al menos 12 horas.
2. Proceso según la reivindicación 1, donde el proceso comprende además una etapa (c) de secado de la mezcla, realizándose la etapa de secado opcionalmente en un horno.
3. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la solución alcalina comprende un componente alcalino o alcalinotérreo seleccionado entre los siguientes, solo o en combinación: hidróxidos metálicos, carbonatos metálicos, bisulfitos metálicos, persulfatos metálicos, bases conjugadas e hidróxido de amonio, seleccionándose el metal opcionalmente entre sodio, potasio, calcio o magnesio y seleccionándose el componente alcalino opcionalmente entre hidróxido de sodio, hidróxido de potasio o carbonato de sodio; y/o donde la solución alcalina se pulveriza sobre el quitosano o se mezcla el quitosano con la solución alcalina.
4. Un proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la mezcla se deja reposar durante al menos 48 horas en la etapa (b) y opcionalmente durante aproximadamente dos a cuatro semanas; y/o donde la mezcla se deja reposar en un recipiente limpio y/o bajo atmósfera inerte.
5. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde la mezcla comprende además un conservante seleccionado opcionalmente entre iones de plata, iones de zinc, clorhexadina o combinaciones de los mismos.
6. Quitosano alcalino con baja concentración de endotoxinas que se obtiene mediante el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5; o quitosano neutro, sal de quitosano o derivado de quitosano con baja concentración de endotoxinas que se obtienen mediante el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 7 a 11.
7. Proceso para producir un quitosano neutro, una sal de quitosano o un derivado de quitosano con baja concentración de endotoxinas, que comprende la etapa de poner en contacto un quitosano alcalino preparado mediante el proceso de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 con un ácido.
8. Proceso según la reivindicación 7, donde la etapa de puesta en contacto del quitosano alcalino con un ácido se lleva a cabo antes del paso de secado (c) de cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5; y donde el ácido opcionalmente se pulveriza sobre el quitosano alcalino o el quitosano alcalino se mezcla con el ácido.
9. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 8, donde el ácido se selecciona entre los siguientes, solo o en combinación: ácidos orgánicos opcionalmente seleccionados entre los siguientes, solos o en combinación: ácido acético, ácido tartárico, ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido acetilsalicílico, ácido glucónico y ácido láctico; ácidos carboxílicos; ácidos grasos opcionalmente seleccionados entre los siguientes, solos o en combinación: ácido miristoleico, ácido palmitoleico, ácido sapiénico, ácido oleico, ácido elaídico, ácido vaccénico, ácido linoleico, ácido linoelaídico, ácido α -linoleico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido erúcico, ácido docosahexaenoico, ácido caprílico, ácido cáprico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido araquídico, ácido behénico, ácido lignocérico, ácido cerótico; aminoácidos opcionalmente seleccionados entre los siguientes, solos o en combinación: histidina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, taurina; ácidos de Lewis; ácidos monopróticos; ácidos dipróticos; ácidos polipróticos; ácidos nucleicos; y ácidos inorgánicos opcionalmente seleccionados entre los siguientes, solos o en combinación: ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico, y/o donde el ácido tiene una concentración 1M.
10. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, donde el ácido está presente como un licor ácido que comprende el ácido y un no disolvente opcionalmente seleccionado entre lactato de etilo, acetato de etilo, acetato de metilo, etanol, acetona, una mezcla de etanol:agua 80:20, o mezclas de los mismos; y/o donde la relación entre el quitosano y el licor ácido es opcionalmente de 5:1 a 1:5; y/o donde el quitosano alcalino se mezcla con el ácido durante 5 minutos.

- 5
- 11. Proceso según cualquiera de las reivindicaciones 7 a 10, que además comprende la etapa de secar el producto de reacción, realizándose el paso de secado opcionalmente en un horno o por filtración del producto a través de un secador de aire.
 - 12. Sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas según la reivindicación 6, para su uso como hemostático para restañar el flujo sanguíneo o para su uso en un apósito para hemorragias superficiales sin peligro para la vida o hemorragias con peligro para la vida.
 - 13. Apósito hemostático que comprende una sal de quitosano con baja concentración de endotoxinas según la reivindicación 6.

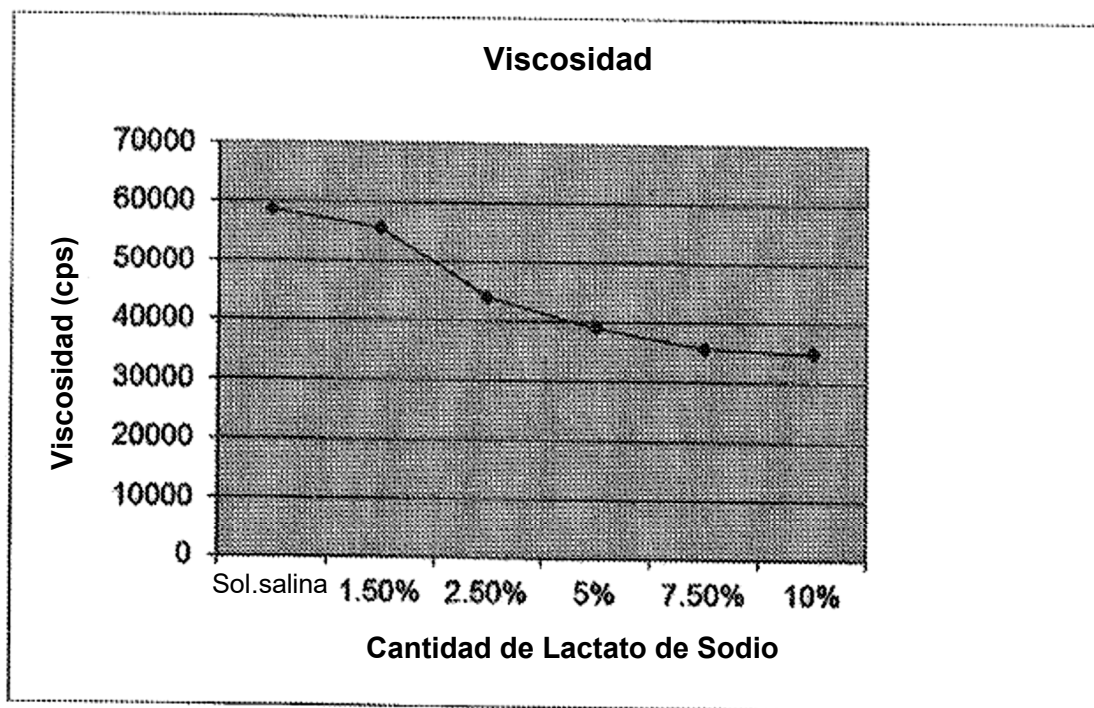


FIGURA 1

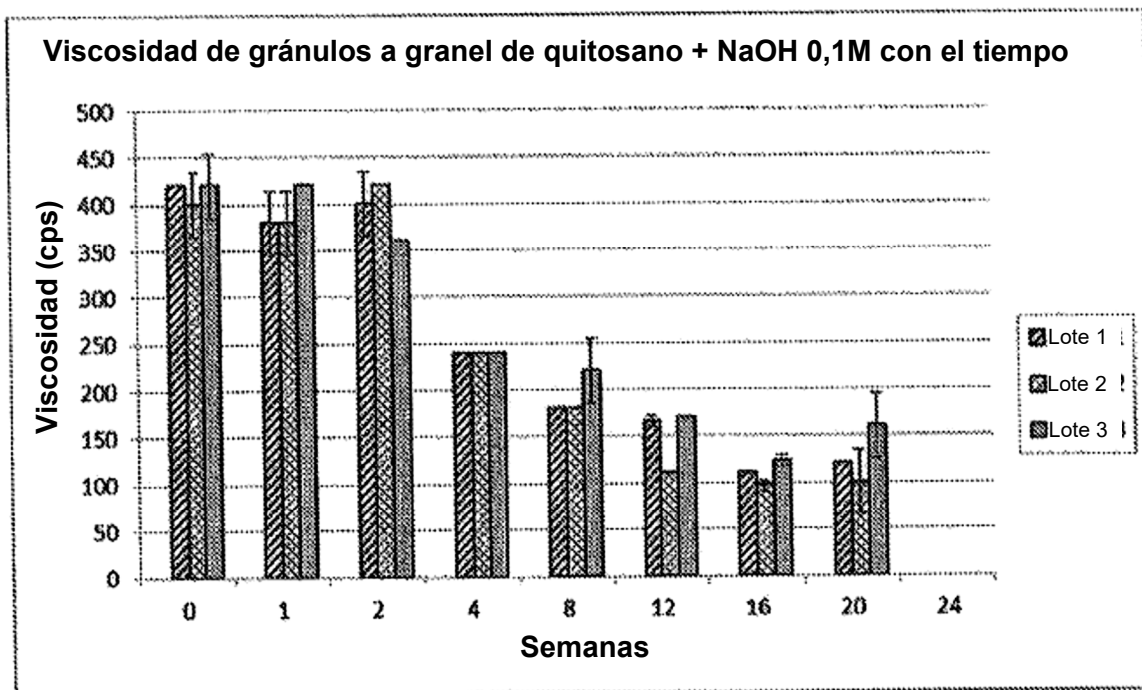


FIGURA 2

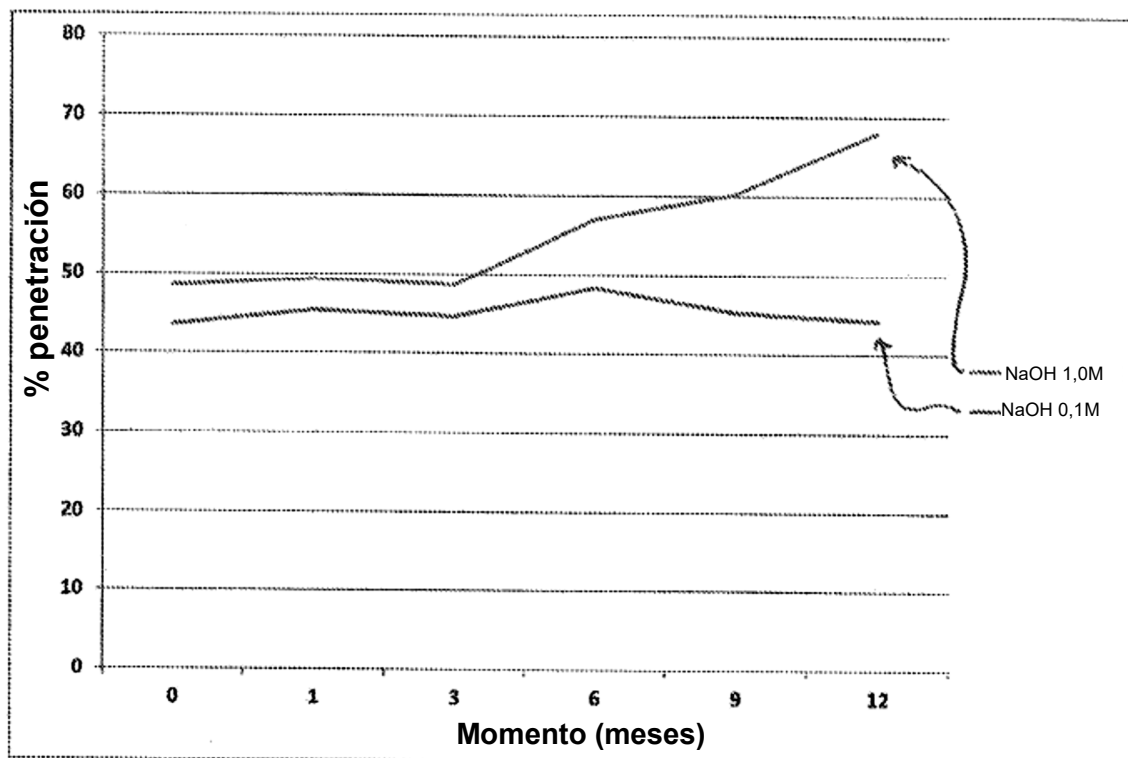


FIGURA 3

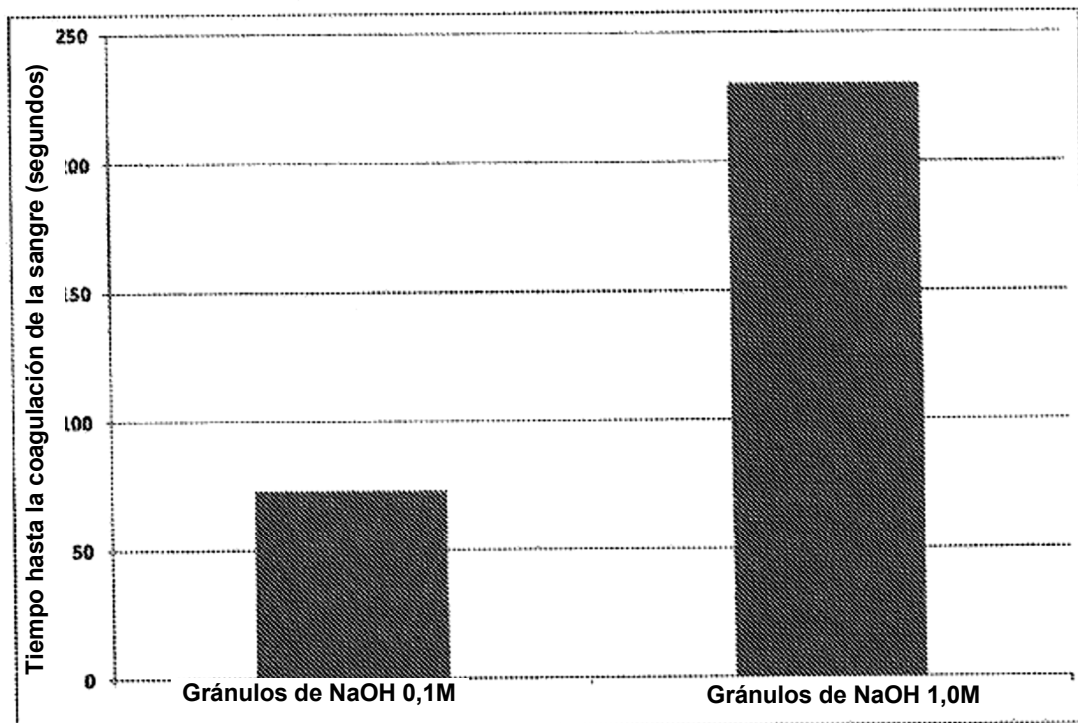


FIGURA 4

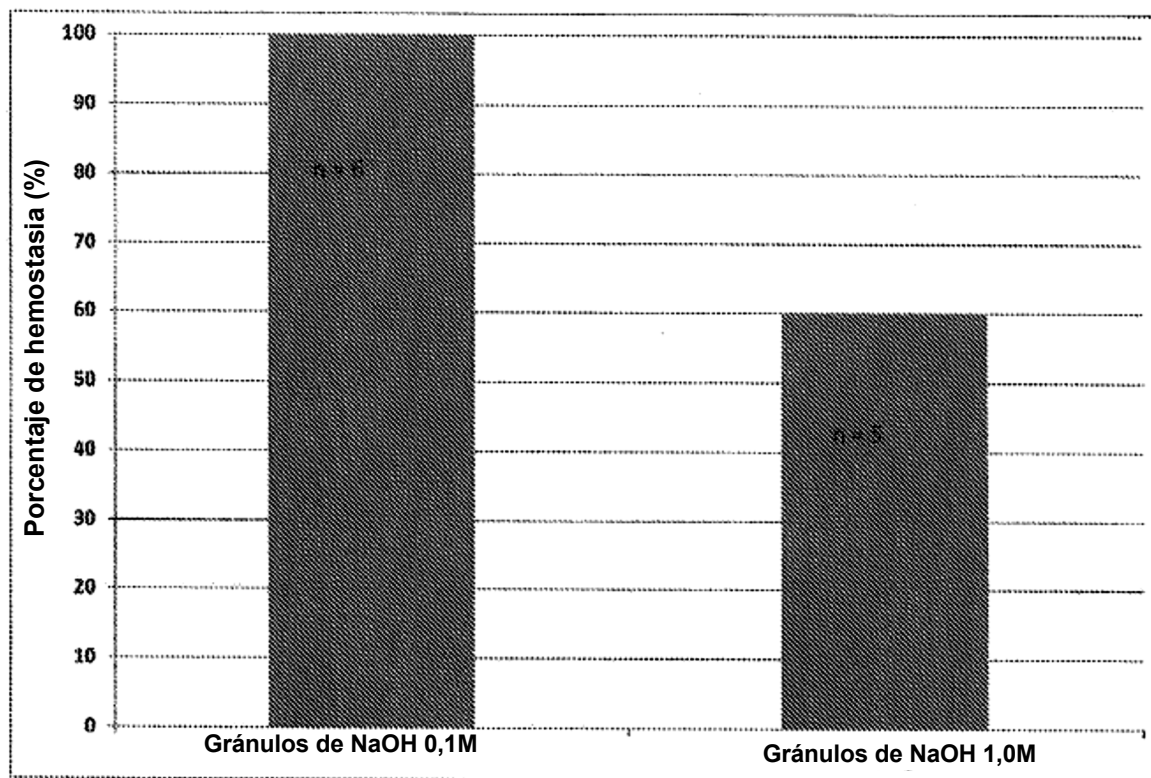


FIGURA 5