

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 693 919**

21 Número de solicitud: 201730794

51 Int. Cl.:

C07F 9/117 (2006.01)

A61L 24/08 (2006.01)

A61L 24/10 (2006.01)

A61L 27/44 (2006.01)

A61L 27/50 (2006.01)

12

SOLICITUD DE PATENTE

A1

22 Fecha de presentación:

13.06.2017

43 Fecha de publicación de la solicitud:

14.12.2018

71 Solicitantes:

**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS (CSIC) (80.0%)
C/ Serrano, 117
28006 Madrid ES y
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA -
PORTO (20.0%)**

72 Inventor/es:

**SAN ROMÁN DEL BARRIO, Julio;
VÁZQUEZ LASA, M^a Blanca;
FERNÁNDEZ GARCÍA, Luis;
MORA BOZA, Ana;
LEITE OLIVEIRA, Ana y
MONTEIRO BARBOSA, Filipe Alexandre**

74 Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

54 Título: **NOVEDOSOS AGENTES RETICULANTES DE ÁCIDO FÍTICO**

57 Resumen:

Novedosos agentes reticulantes de ácido fítico. La presente invención describe membranas novedosas, estables y biodegradables de proteínas y/o polisacáridos, particularmente de quitosano y quitosano/ácido hialurónico, útiles como armazones para la ingeniería de tejido óseo. Estas membranas fueron fabricadas por mezclas de polisacáridos y proteínas de interés y novedosos agentes de reticulación que consisten en derivados de ácido fítico (PA) obtenidos por una reacción de condensación entre ácido fítico (PA) con un compuesto hidroxílico.

ES 2 693 919 A1

DESCRIPCIÓN

NOVEDOSOS AGENTES RETICULANTES DE ÁCIDO FÍTICO

5 La invención se refiere a la síntesis de novedosos agentes de reticulación basados en derivados de ácido fítico (PA) de condensados de PA con compuestos hidroxílicos y su procedimiento de obtención.

10 Este tipo de agente de reticulación natural demostró ser útil en la preparación de geles reticulados biodegradables estables de proteínas y/o polisacáridos, útiles en biotecnología y biomedicina.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 El hexafosfato de mioinositol o ácido fítico (PA) es un antioxidante natural y ubicuo que constituye el 1-5 % en peso de la mayoría de los cereales, frutos secos, legumbres y semillas de aceite. El PA tiene la capacidad de unirse a minerales, proteínas y polisacáridos. Sin embargo, a pesar de la posible energía inherente en los seis enlaces de éster fosfórico, el ácido fítico es muy estable a pH neutros y alcalinos. La liberación del 50 % de fósforo requiere hidrólisis con ácido. El potencial de quelación de PA se muestra en su alta afinidad con cationes polivalentes. Los complejos con cinc son uno de los más estables, seguido de aquellos con hierro, calcio y magnesio, entre otros. Como antioxidante, el PA es extraordinariamente estable y su actividad antioxidante está estrechamente relacionada con su alta afinidad de unión por el

20

25 hierro. Formando un quelato de hierro único, suprime las reacciones oxidativas catalizadas por el hierro en materiales biológicos. Además de esto, otras ventajas clínicas de PA son sus efectos contra el cáncer y su capacidad para reducir el colesterol y los lípidos en sangre.

30 Muchas áreas de utilización de PA incluyen aplicaciones industriales y médicas. En el campo biomédico, se ha usado PA como agente de reticulación natural de proteínas y polisacáridos. Los cationes del polímero natural son capaces de unirse directamente con aniones de PA mediante cargas electrostáticas. Los polisacáridos también pueden unirse a PA mediante la formación de enlaces de hidrógeno. Las ventajas del PA

35 frente a otros polianiones no tóxicos multivalentes, como el tripolifosfato (TPP), son que el número de aniones capaces de reaccionar con los cationes es dos veces superior a TPP. El quitosano (Ch) ha sido reticulado con PA mediante gelificación

iónica para la encapsulación de insulina en una matriz de quitosano para la administración oral de insulina. Se han desarrollado armazones de nanofibras de hemoglobina/gelatina/fibrinógeno reticulados con PA para la regeneración del miocardio isquémico.

5

Se ha intentado la preparación de quitosano con combinaciones de sales de fosfato de poliol o azúcar (sales de poliol que llevan una única cabeza aniónica, tales como sales de fosfato de glicerol (G), sorbitol, fructosa o glucosa) como un enfoque novedoso para producir soluciones neutras inyectables de Ch que producen *in situ* geles después de la implantación *in vivo*. Particularmente, las soluciones ácidas de Ch pueden neutralizarse con fosfato de glicerol (GP) y alcanzar un pH próximo a 7 sin precipitación del polímero. La solución resultante adquiere propiedades termosensibles de manera que las soluciones de quitosano/GP siguen en un estado líquido a baja temperatura y forman un gel a 37 °C. El proceso de gelificación de Ch con GP puede implicar diferentes tipos de interacciones: (1) atracción electrostática entre grupos amino de Ch y grupos fosfato de GP (reticulación iónica); (2) enlace de hidrógeno entre las cadenas de Ch como consecuencia de repulsión electrostática reducida después de la neutralización de la solución de Ch con GP; y (3) a temperatura fisiológica, la liberación de protones de los grupos amino protonados restantes puede conducir a la aparición de fuerzas de atracción Ch-Ch (es decir, van der Waals, enlace de hidrógeno e interacciones hidrófobas) que refuerzan la estructura física del hidrogel.

Diferentes artículos se han dedicado a estudiar la esterilización, caracterización y citotoxicidad de sistemas termosensibles de Ch/GP. Se aplicaron partículas de hidrogel esféricas de Ch/GP preparadas usando dos etapas de gelificación secuenciales para la encapsulación de células y agentes bioactivos. Se prepararon nanogeles inyectables termo-gelificantes por una simple vía combinando nanocápsulas auto-ensambladas de Ch anfífilicamente modificado con GP y G para encapsular un fármaco antiepiléptico.

Se ha comercializado una formulación de Ch/GP por Piramal Life Sciences (Bio-Orthopaedics Division) y usado para estabilizar el coágulo de sangre basado en microfractura dispersando la solución de Ch soluble a través de sangre completa e implantando la mezcla mediante orificios de acceso de la médula ósea en una lesión de cartílago.

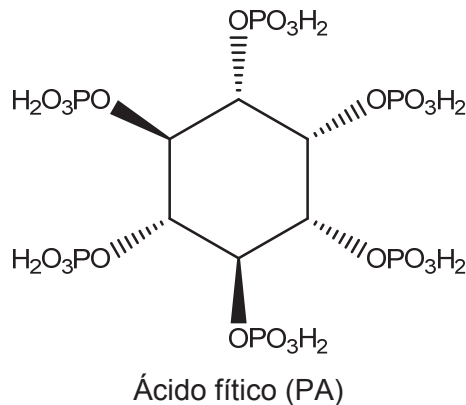
Por otra parte, se han preparado sistemas de Ch/GP termosensibles en presencia de proteínas. Tal es el caso de las formulaciones de hidrogel de Ch/GP/colágeno preparadas para encapsular células madre derivadas de médula ósea humana adulta, que demuestran excelente compatibilidad celular, representando una nueva alternativa
 5 como armazón para la ingeniería de tejido óseo. En otros trabajos, se preparó un hidrogel de Ch/GP/colágeno sensible a la temperatura inyectable para el cultivo de células madre derivadas de tejido adiposo que muestran gran biocompatibilidad y posibilidades de aplicaciones de ingeniería de tejido.

10 Uniendo las propiedades del ácido fítico (PA) y los beneficios del fosfato de glicerol (GP) mencionadas anteriormente, este trabajo se ha dedicado a la síntesis de novedosos agentes de reticulación naturales basados en derivados de ácido fítico (PA) de condensados de PA con compuestos hidroxílicos, preferentemente glicerol; y su
 15 uso en la preparación de geles reticulados biodegradables estables de proteínas y/o polisacáridos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

20 La presente invención describe novedosas membranas estables y biodegradables de proteínas y/o polisacáridos, particularmente de quitosano y quitosano/ácido hialurónico, útiles como armazones para la ingeniería de tejido óseo.

Estas membranas fueron fabricadas por mezclas de polisacáridos y proteínas de interés y novedosos agentes de reticulación que consisten en derivados de ácido fítico
 25 (PA) obtenidos por una reacción de condensación entre ácido fítico (PA) con un compuesto hidroxílico.



30 Las ventajas de uso de estos novedosos reticulantes respecto al ácido fítico radican en

su citotoxicidad más baja y su compatibilidad más alta con polímeros naturales. Además, las formulaciones reticuladas proporcionan propiedades antioxidantes y capacidad para formar complejos con cationes polivalentes, de gran importancia en los procesos de regeneración de tejidos.

5

Por tanto, un primer aspecto de la presente invención se refiere a un compuesto obtenido por una reacción de condensación entre ácido fítico y con un compuesto hidroxílico en relaciones molares que oscilan de 1:10 a 10:1, y dicho compuesto que tiene un peso molecular inferior a 5.000 g/mol.

10

El término "ácido fítico" en la presente invención se refiere a hexafosfato de inositol, y cualquier isómero que incluye las configuraciones cis, epi, alo, mucó, neo, D-quiró, L-quiró y escilo.

15

El término "compuesto hidroxílico" en la presente invención se refiere a un alquilo sustituido con al menos un grupo hidroxilo. En realizaciones preferidas, el compuesto hidroxílico tiene más de dos grupos hidroxilo, y más preferentemente al menos uno de los grupos hidroxilo es un α -OH.

20

El término "alquilo" en la presente invención se refiere al radical de grupos alifáticos saturados, que incluye grupos alquilo de cadena lineal, grupos alquilo de cadena ramificada, grupos cicloalquilo (alíclicos), grupos cicloalquilo sustituidos con alquilo y grupos alquilo sustituidos con cicloalquilo. En realizaciones preferidas, un alquilo de cadena lineal o cadena ramificada tiene de 2 a 10 en su esqueleto, y más preferentemente de 3 a 6.

25

En una realización preferida, el compuesto hidroxílico es un polialcohol alifático que tiene de tres a seis átomos de carbono, y de dos a seis grupos hidroxilo, tales como glicoles alifáticos, glicerol, sorbitol, glucidol, y similares. Más preferentemente, el compuesto hidroxílico es glicerol.

30

En otra realización preferida, el compuesto se obtiene por una reacción de condensación entre ácido fítico (PA) y glicerol (G) en relaciones molares que oscilan de 1:10 a 10:1. Más preferentemente, las relaciones molares están seleccionadas de entre una lista que consiste en 1:7, 4:1, 5:1 y 6:1. Incluso más preferentemente, la relación molar es PA:G es 1:7.

35

Una realización adicional de la presente invención se refiere al uso del compuesto de la invención como se ha definido anteriormente como un agente de reticulación.

Una tercera realización de la presente invención proporciona un proceso de obtención del compuesto de la invención, en el que el proceso comprende al menos las siguientes etapas:

- 5 (a) Hacer reaccionar ácido fólico (PA) con el compuesto hidroxílico correspondiente en relaciones molares que oscilan de 1:10 a 10:1 a una temperatura que oscila de 100 °C a 140 °C;
- 10 (b) Disolver el producto de reacción obtenido de (a) en agua;
- (c) Precipitado de la solución de (b) en un disolvente orgánico de alcohol seleccionado de entre 2-propanol, *iso*-butanol y *n*-butanol; y
- (d) Liofilización del precipitado obtenido de (c).

15 En una realización preferida, la etapa (a) se lleva a cabo a una temperatura que oscila de 110 °C a 120 °C. Incluso más preferentemente, la reacción se lleva a cabo a 120 °C.

En otra realización preferida, el compuesto hidroxílico en la etapa (a) es un polialcohol alifático que tiene de tres a seis átomos de carbono, y de dos a seis grupos hidroxilo, tal como glicoles alifáticos, glicerol, sorbitol, glucidol, y similares. Más preferentemente, el compuesto hidroxílico es glicerol.

En otra realización preferida, el compuesto se obtiene por una reacción de condensación entre ácido fólico (PA) y glicerol (G) en relaciones molares que oscilan de 1:10 a 10:1. Más preferentemente, las relaciones molares están seleccionadas de una lista que consiste en 1:7, 4:1, 5:1 y 6:1. Incluso más preferentemente, la relación molar es PA:G es 1:7.

30 En una realización incluso más preferida, la síntesis del compuesto de la invención se llevó a cabo a 120 °C haciendo reaccionar ácido fólico con glicerol, en una relación molar PA:G de 1:7.

Otro aspecto de la invención se refiere al compuesto obtenido del proceso anteriormente referenciado.

35 Una realización adicional de la invención se refiere a una membrana de polímero que

comprende una mezcla del compuesto de la invención y al menos una proteína, un polisacárido, o una combinación de los mismos, en la que dichas membranas contienen una cantidad del agente de reticulación de la invención que oscila del 2,5 al 50 % en peso.

5

En una realización preferida, la proteína está seleccionada de entre una lista que consiste en albúmina, colágeno, colágeno/gelatina, fibrina, fibrinógeno y fibroína. Más preferentemente, la proteína es colágeno/gelatina.

10

En otra realización preferida, el polisacárido está seleccionado de una lista que consiste en quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina y heparina. Más preferentemente, el polisacárido está seleccionado de entre quitosano y ácido hialurónico. Incluso más preferentemente, la membrana comprende quitosano y ácido hialurónico.

15

En otra realización preferida, la membrana de polímero comprende un compuesto obtenido por una reacción de condensación entre ácido fítico y glicerol en la relación molar PA:G 1:7, y quitosano.

20

En otra realización preferida, la membrana de polímero comprende un agente de reticulación obtenido por una reacción de condensación entre ácido fítico y glicerol en la relación molar PA:G 1:7, y quitosano y ácido hialurónico.

La presente invención proporciona además un proceso de obtención de la membrana de polímero de la invención, en la que el proceso comprende al menos las siguientes etapas:

25

(a) Formar una película de una solución acuosa que contiene al menos una proteína y/o polisacárido en una solución de ácido,

30

(b) Lavar el producto de la etapa (a) con una solución básica y agua para la neutralización del disolvente residual ácido;

(c) Hacer reaccionar la película de la etapa (c) con una solución acuosa del compuesto de la invención en una cantidad que oscila del 2,5-50 % en peso; y

(d) Lavar y secar la membrana de polímero resultante de (c).

35

El término "solución de ácido" en la presente invención se refiere a una solución ácida, normalmente una que tiene un pH inferior a 7 y es capaz de reaccionar con una solución básica. Preferentemente, el ácido en la solución de ácido está seleccionado

de entre, pero no se limita a, el grupo que consiste en ácido clorhídrico, ácido sulfúrico, ácido fórmico, ácido láctico, ácido málico, ácido succínico, ácido acético, ácido metanosulfónico, ácido bencenosulfónico, ácido fosfórico, y similares, y combinaciones adecuadas de dos o más de los mismos. Más preferentemente, el ácido en la solución
5 de ácido es ácido acético.

El término "solución básica" en la presente invención se refiere a, pero no se limita a, diversas soluciones de una base (por ejemplo, hidróxido sódico, hidróxido de calcio, amoníaco, carbonato sódico, carbonato cálcico) disuelta en agua. La concentración de
10 una solución básica es preferentemente 0,001 N o más alta, más preferentemente 0,01 N o más alta, y todavía más preferentemente de 0,1 N a 3,0 N.

En una realización preferida, la proteína en la etapa (a) se selecciona de entre una lista que consiste en albúmina, colágeno, colágeno/gelatina, fibrina, fibrinógeno y
15 fibroína. Más preferentemente, la proteína es colágeno/gelatina.

En otra realización preferida, el polisacárido en la etapa (a) se selecciona de entre una lista que consiste en quitosano, ácido hialurónico, sulfato de condroitina y heparina. Más preferentemente, el polisacárido se selecciona de entre quitosano y ácido
20 hialurónico. Incluso más preferentemente, la membrana comprende quitosano y ácido hialurónico.

En otra realización preferida, el agente de reticulación en la etapa (c) se obtiene por una reacción de condensación entre ácido fítico y glicerol en la relación molar PA:G
25 1:7.

En otra realización preferida, los polisacáridos en la etapa (a) es quitosano y ácido hialurónico y el agente de reticulación en la etapa (c) es un agente de reticulación obtenido por una reacción de condensación entre ácido fítico y glicerol en relación
30 molar PA:G 1:7.

Otro aspecto de la invención se refiere a las membranas obtenidas del proceso anteriormente referenciado.

35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia a la que pertenece la presente invención. Pueden

usarse métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en el presente documento en la práctica de la presente invención. En toda la descripción y reivindicaciones, la palabra “comprender” y sus variaciones no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o etapas. Objetos, ventajas y características adicionales de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras el examen de la descripción o pueden ser aprendidos por la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración y no pretenden ser limitantes de la presente invención.

10 BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

FIG. 1. Espectros de RMN ^1H de ácido fítico, glicerol, GPhy1:7 y GPhy5:1 en D_2O a 25 °C.

15 FIG. 2. Espectros de RMN ^{13}C de glicerol, ácido fítico, GPh1:7 y GPhy5:1 en D_2O a 25 °C.

FIG. 3. Espectros de RMN ^{31}P de PA inicial y GPhy1:7 en D_2O a 25 °C.

FIG. 4. Viabilidad celular de la respuesta de fibroblastos humanos a diferentes concentraciones de GPhy1:7, GPhy4:1, GPhy5:1 y GPhy6:1.

FIG. 5. Espectros de ATR-FTIR de membranas de ChGPhy1:7 y Ch inicial.

20 FIG. 6. Captación de agua de membranas de ChGPhy1:7 en PBS (pH 7,4, 37 °C). Los resultados se dan como media \pm de (n=5). El análisis estadístico (ANOVA) de cada muestra se realizó en los tiempos 2 y 7 días con respecto a 1 día (*p<0,05).

FIG. 7. Espectros de ATR-FTIR de membranas de Ch/HAGPhy1:7.

25 FIG. 8. Imágenes de SEM de membranas de Ch/HAGPhy1:7 de diferente conc. de reticulante:
a) Ch/HA2,5 % (1:7), b) Ch/HA5 % (1:7), c) Ch/HA10 % (1:7).

30 FIG. 9. Captación de agua de membranas de Ch/HAGPhy1:7 en PBS (pH 7,4, 37 °C). Los resultados se dan como media \pm de (n=5). El análisis estadístico (ANOVA) de cada muestra se realizó en los tiempos 7 y 10 días con respecto a 1 día (*p<0,05) y con respecto a 2 días (#p<0,05).

FIG. 10. Fotografías de SEM de la membrana de Ch10 % (1:7) a los 4 días (a, b), 7 días (c, d) y 14 días (e, f) de inmersión en SBF1,5.

35 FIG. 11. Resultados de viabilidad celular de fibroblastos humanos en presencia de extractos de membranas de ChGPh1:7. Los resultados se muestran como media \pm de (n=8). Se indican en el gráfico diferencias significativas (*p<0,05 y ***p<0,001) de resultados de membranas con respecto al control.

FIG. 12. Resultados de azul de Alamar para membranas de ChGPh1:7. Todos los resultados se muestran como media \pm de (n=8). El asterisco representa una diferencia significativa entre las muestras con respecto al control (**p< 0,005 y ***p<0,001).

5 FIG. 13. Imágenes de SEM de membranas de ChGPh1:7 a 24 h (a-d), 4 (e-h), 7 (i-l) y 14 (m-p) días después de la siembra de fibroblastos humanos para membranas de Ch (a-d), Ch2,5 % (1:7) (e-h), Ch5 % (1:7) (i-l), Ch10 % (1:7) (m-p) respectivamente.

10 FIG. 14. Imágenes de microscopía óptica de célula teñida con Crystal unido a membranas de ChGPhy (1:7) después de 14 días de la siembra de fibroblastos humanos. a) Ch2,5 % (1:7), b) Ch5 % (1:7), c) Ch10 % (1:7).

FIG. 15. Resultados de la viabilidad celular de fibroblastos humanos en presencia de extractos de membranas de ChGPh4:1, ChGPh5:1 y ChGPh6:1. Los resultados se muestran como media \pm de (n=8).

15 FIG. 16. Resultados de azul de Alamar para membranas de ChGPh (5:1), (6:1), (4:1). Todos los resultados se muestran como media \pm de (n=8). El asterisco (*) representa una diferencia significativa entre las muestras con respecto al control (*p<0,05, **p<0,005, ***p<0,001).

20 EJEMPLOS

EJEMPLO 1. Síntesis de agentes reticulantes (GPhy)

Se llevó a cabo la síntesis de GPhy a 120 °C a granel haciendo reaccionar ácido fítico (PA) y glicerol (G), en relaciones molares de PA:G en el intervalo 1:10 a 10:1. Se dejó
25 que la reacción de condensación avanzara durante 12 h con agitación mecánica. Después, el producto de reacción se disolvió en agua y se precipitó en 2-propanol.

El producto aislado se disolvió en una cantidad mínima de agua, y se liofilizó. Los reticulantes de GPhy (GPhy1:7, GPhy4:1, GPhy5:1 y GPhy6:1) se almacenaron a
30 temperatura ambiente.

EJEMPLO 2. Caracterización de reticulantes GPhy

Se caracterizaron los reticulantes purificados por **espectroscopía de ATR-FTIR** junto con sus precursores, G y PA. Los espectros de ATR-FTIR de los diferentes
35 reticulantes fueron bastante similares y mostraron las principales bandas representativas presentes en los espectros de ambos precursores. Particularmente para GPhy1:7, una banda ancha a 3248 cm⁻¹ debida a vibraciones de tensión de

enlaces asociados a O-H y N-H; bandas a 2943 y 2888 cm^{-1} debidas a vibraciones asimétricas y simétricas de enlaces C-H del anillo de inositol. A número de onda más bajo, una banda a 1460 cm^{-1} debido a enlaces δ C-H del anillo de inositol y residuos G, la banda que en particular aumentó y estaba desplazada con respecto a PA (1399 cm^{-1}); una banda a 1176 cm^{-1} atribuida a ν P=O, también desplazada con respecto a PA (1186 cm^{-1}); un pico intenso a 1035 cm^{-1} (pico secundario a 1004 cm^{-1}) atribuido a ν C-O de alcoholes, enlaces glucosídicos ν P-O y P-O-C y ν C-O; finalmente, picos a 918, 815 (débiles) y 715 (débil) cm^{-1} debidos a enlaces ν P-O y P-O-C, picos que también cambiaron con respecto a PA.

10

Los reticulantes se caracterizaron posteriormente por **espectroscopía de RMN**. La Fig. 1 muestra espectros de RMN ^1H de dos reticulantes y precursores. El espectro del glicerol mostró un multiplete entre 3,5 y 3,8 ppm que puede asignarse a protones $^1\text{CH}_2$, $^2\text{CH}_2$ y CH. El espectro de GPhy1:7 mostró señales modificadas en el intervalo de las del glicerol inicial y nuevas señales en el intervalo 3,82-3,98 ppm, atribuidas a $\text{CH}_2\text{-O-P}$, y en el intervalo 3,9-4,10 ppm, debido a CH-O-P en los restos de glicerol reaccionados, respectivamente. Finalmente, entre 4,1 y 4,6 ppm, tres señales de intensidad muy baja para el reticulante GPhy1:7, asignadas a protones, los protones $\text{H}_1\text{-H}_5$ en PA sin modificar. No se apreció la resonancia del protón H_6 en el residuo de PA. Los espectros de los reticulantes GPhy4:1, GPhy5:1 y GPhy6:1 fueron bastantes similares entre ellos mismos, pero se diferencian algo con respecto a GPh1:7, como se muestra en la Fig. 1 en la que el espectro de GPhy5:1 se muestra para fines de comparación. La principal diferencia radica en que el nuevo multiplete en el intervalo 3,82-3,98 ppm desaparece y aumentan nuevas señales en el intervalo 3,98-4,10 ppm atribuidas a la resonancia de CH-O-P . Además, aumentaron las señales debidas a la resonancia de protones fíticos sin modificar. El análisis de RMN de protones de diferentes reticulantes parece indicar que la reducción en el contenido de G en la reacción de condensación favorece la reactividad de los grupos β -hidroxílicos mientras que el aumento en G potencia la reactividad de los grupos α -hidroxílicos.

25
30

Los espectros de RMN ^{13}C de reticulantes GPhy1:7 y GPhy5:1 y precursores se muestran en la Fig. 2. El espectro de RMN ^{13}C de PA mostró cuatro picos a 75,3, 78,0, 78,5 y 79,3 ppm que se asignaron a C_4 y C_6 ; C_2 ; C_1 y C_3 ; y C_5 . El espectro de RMN ^{13}C de G inicial mostró un pico a 62,5 ppm que se asignó a carbonos de CH_2 y un pico a 72,0 ppm asignado a los carbonos de CH. El espectro de RMN ^{13}C del reticulante GPhy1:7 mostró picos a 62,1, 62,5, 65,8, 70,8, 71,1, 72,0, 72,2, 72,4 y 74,3, de los que, las cuatro últimas señales pueden ser provisionalmente atribuidas a carbonos de

35

CH-O-PO₃H. El espectro de RMN ¹³C del reticulante GPhy5:1, por otra parte, fue bastante complejo y debe analizarse en profundidad usando nuevos experimentos. Sin embargo, indica que la modificación de grupos fosfato se lleva a cabo para la relación molar PA:G de 5:1. Por consiguiente, los espectros correspondientes de GPhy6:1 y GPhy4:1 se parecieron a los de GPhy5:1.

El espectro de RMN ³¹P de PA es ampliamente tratado en la bibliografía y la mayoría de los autores informaron de la resonancia de cuatro picos. El espectro de RMN ³¹P de PA comercial analizado en este trabajo (Fig. 3) mostró picos en el intervalo -2 a 2 ppm que se asignaron a P₅ (δ 0,4), P₁ y P₃ (δ 0,04), P₄ y P₆ (δ 0,53) y P₂ (δ 0,94). El espectro de RMN ³¹P de GPhy1:7 (Fig. 3) mostró picos en el intervalo -3 a 3 ppm, que indica que el entorno químico de los núcleos de P cambió después de la reacción de condensación.

Se determinaron los pesos moleculares de los reticulantes GPh1:7 y GPhy5:1 por espectrometría de masas de alta resolución (HR-MS) y se calcularon el peso molecular promedio en número (M_n), el peso molecular promedio en peso (M_w) y la polidispersidad (PDI). Para GPhy5:1, los valores de M_w y PDI fueron 869 g/mol, 1226 g/mol y 1,41 respectivamente, y para GPhy1:7 fueron 841 g/mol, 1262 g/mol y 1,50 respectivamente.

Se analizaron las **propiedades térmicas** de reticulantes GPhy por técnicas de DSC y TGA. El termograma de DSC de GPhy1:7 mostró una transición vítrea con una temperatura de transición vítrea (T_g) de 47 °C que indica un carácter amorfo de este reticulante como consecuencia de la presencia de restos de glicerol en su estructura. Sin embargo, GPhy4:1, GPhy5:1 y GPhy6:1 no mostraron transiciones vítreas que se atribuyeran a contenidos más altos de PA en estos reticulantes.

Los datos de termogravimétricos (TGA) y termogravimétricos diferenciales (DTGA) de reticulantes GPhy y precursores se muestran en la Tabla 1. Se experimentó pérdida de peso de GPhy1:7 en tres etapas. La primera con una T_{máx} de aproximadamente 125 °C puede atribuirse a la pérdida de agua contenida en la muestra. La segunda etapa de degradación con velocidad máxima a 215 °C implicaría la degradación del resto de G (T_{máx} = 228 °C) y parte de los residuos de fitato (T_{máx} = 215 °C) y la última etapa con velocidad máxima a 337 °C se correspondería con la degradación del resto de fitato. El residuo de GPhy1:7 fue del 52 %. Este valor fue en particular reducido con respecto al de PA, que indica el contenido de G, que no da residuo en absoluto. A partir de estos

valores de residuos de tanto GPh1:7 como PA, los presentes inventores estimaron la cantidad de G incorporada en este reticulante después de la reacción de condensación, que fue del 3 % en moles. En caso de GPhy4:1, GPhy5:1 y GPhy6:1, los presentes inventores estimaron que este valor era del 2 % en moles.

- 5 Tabla 1. Resultados de degradación térmica de GPhy1:7 y precursores bajo una atmósfera de nitrógeno.

Muestra	T _{máx} (°C)				Residuo (%)
	1ª etapa	2ª etapa	3ª etapa	4ª etapa	
G	228				0
PA	117	215	332	394	75
GPhy1:7	125	215	337	-	52
GPhy4:1	141	223	346	466	69
GPhy5:1	137	242	356	451	69
GPhy6:1	144	244	354		70

EJEMPLO 3. Citotoxicidad de reticulantes GPhy

- Se evaluó la toxicidad celular usando fibroblasto de piel embrionaria humana (HFB, Innoprot). Las células se cultivaron en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) complementado con HEPES (para células HFB) y 10 % de suero bovino fetal (FBS), 100 unidades ml⁻¹ de penicilina, 100 µg ml⁻¹ de estreptomycin y L-glutamina 200 mM. Se usó una atmósfera humidificada a 37 °C con 5 % de CO₂ y 95 % de aire para el crecimiento de cultivos celulares. Para los experimentos de células, se recogieron células usando 0,25 % de tripsina y EDTA 1 mM en tampón Hanks.

- La evaluación de citotoxicidad de PA, GPhy y β-GP comercial se determinó por ensayo de MTT. Se preparó una solución madre de la muestra correspondiente en DMEM y se probaron diluciones sucesivas. Las células se sembraron a una densidad de 9 x 10⁵ células/ml en medio completo y se incubaron a confluencia. Después de 24 h de incubación, el medio se sustituyó con la dilución correspondiente y se incubó a 37 °C en aire humidificado con 5 % de CO₂ durante 24 h. Se preparó una solución de MTT en PBS caliente (0,5 mg/ml) y las placas se incubaron a 37 °C durante 3 h. Se eliminaron el exceso de medio y MTT y se añadieron 100 µl de DMSO a todos los pocillos. Esto se mezcló durante 10 min y se midió la absorbancia con un lector de placas SYNERGY HT de Biotek usando una longitud de onda de prueba de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. El porcentaje de viabilidad celular relativa (CV) se calculó a partir de la Ec (2):

$$CV (\%) = 100 \times (DO_S - DO_B) / (DO_C - DO_B) \quad Ec (2)$$

donde DO_S , DO_B y DO_C son la densidad óptica de la producción de formazano para la muestra, blanco y control, respectivamente. Se representó una curva de dosis-respuesta de viabilidad celular relativa para delinear las concentraciones de la muestra probada que redujeron la producción de MTT-formazano el 50 % (valor de CI_{50}).

5

Para el reticulante GPhy1:7, la viabilidad celular fue aproximadamente del 70 % en un intervalo de concentración de 5 - 80 mg/ml, que indica la ausencia de citotoxicidad según la evaluación de la norma ISO 10993-5:2009. Sin embargo, la viabilidad celular presentó un comportamiento de dosis-respuesta para los otros reticulantes (Fig. 4). A partir de las porciones lineales de las curvas correspondientes se determinó CI_{50} como la concentración que redujo la producción de MTT-formazano el 50 %. Valores de CI_{50} de GPhy4:1, GPhy5:1 y GPhy6:1 fueron 17,5 mg/ml, 25 mg/ml y 19 mg/ml, respectivamente. Para fines de comparación, se analizaron la citotoxicidad de PA y β -GP comercial bajo las mismas condiciones experimentales y los valores de CI_{50} fueron 8 y 9 mg/ml, respectivamente. Los resultados de los presentes inventores demostraron que la biocompatibilidad de reticulantes GPhy aumentó con respecto a los de los reticulantes de PA y GP actualmente usados en la bibliografía y formulaciones comerciales.

10

15

20 **EJEMPLO 4. Preparación de membranas de quitosano (Ch)**

Se prepararon membranas de Ch antes de la reticulación del siguiente modo: se disolvió Ch (2 % en peso) en solución de ácido acético (1 % v/v), se dispuso en un molde de vidrio, se transfirió a una estufa a 37 °C y se mantuvo allí hasta la evaporación completa del disolvente. Entonces, la membrana de Ch obtenida se lavó con solución 1 N de NaOH y agua hasta pH neutro. Se sumergió la membrana de Ch purificada en 40 ml de una solución acuosa de GPhy (2,5, 5, 10 o 50 % en peso en diferentes experimentos) y se mantuvo durante la noche a 37 °C. Entonces, se lavó la membrana reticulada correspondiente con agua destilada y se secó.

25

30

Se obtuvieron membranas por reticulación de Ch con GPhy1:7 en diferentes proporciones (en lo sucesivo, membranas de ChGPhy1:7). Los nombres y la composición de las membranas de Ch preparadas con este reticulante GPhy se informan en la Tabla 2. El mecanismo más probable de la reacción de reticulación sería debido a interacciones iónicas entre aniones fosfato del reticulante y grupos NH_3^+ de Ch. Además, las interacciones de enlace de hidrógeno entre el reticulante GPhy1:7 y el polisacárido pueden contribuir a la estabilidad de la membrana.

35

Tabla 2. Nombres y composición de las membranas de ChGPhy1:7.

Nombre de muestra	GPhy1:7 (% en peso respecto a Ch)
Ch2,5 % (1:7)	2,5
Ch5 % (1:7)	5
Ch10 % (1:7)	10

EJEMPLO 5. Caracterización de reticulantes GPhy de membranas de ChGPhy1:7

Se analizaron membranas de ChGPhy1:7 por **espectroscopía de ATR-FTIR**. Las principales bandas de absorción en los espectros de las membranas de ChGPhy1:7 y los cambios respecto al espectro de Ch se muestran en la Fig. 5 y pueden resumirse del siguiente modo: la banda entre 3600 y 3000 cm^{-1} asignada a ν O-H y N-H asociados se hizo más ancha, que puede indicar la presencia de interacciones entre grupos amino de Ch y grupos fosfato de GPhy1:7, pero también entre grupos hidroxilo de Ch y moléculas de G de GPhy1:7; aparece un nuevo pico a 2972 cm^{-1} y aumenta con el contenido de reticulante GPhy1:7; las bandas en el intervalo 1700 -1500 cm^{-1} se hicieron más anchas, la banda a 1647 cm^{-1} debido a que se redujo la amida I, la banda a 1582 cm^{-1} debido a que δ N-H se desplazó a número de onda más bajo con respecto a Ch (1588 cm^{-1}) que indica interacciones iónicas entre los grupos amino y grupos fosfato de GPhy y aparece un pico secundario a 1540 cm^{-1} y aumenta con el contenido de reticulante; en el intervalo 1100 y 1000 cm^{-1} el pico a 1066 cm^{-1} aumenta y el pico a 992 cm^{-1} disminuye y se desplazó a 998 cm^{-1} con el contenido de GPhy1:7 en la membrana. Los resultados de FTIR de los presentes inventores están de acuerdo con aquellos informados para Ch y proteínas reticuladas con PA.

20

Se aplicaron análisis de SEM y EDX para evaluar la **morfología superficial y composición elemental** de membranas. La morfología superficial de las membranas fue predominantemente suave independientemente del contenido de GPhy1:7. Los espectros de EDX de las membranas de ChGPhy1:7 mostraron los picos de los principales elementos C, O, N a los niveles de energía característicos de 0,27, 0,52, 0,39 keV, respectivamente. Además, se observó un pico al nivel de energía de P (2,01 keV) que pertenece a los polianiones de GPhy1:7, confirmando la reacción de reticulación. Los datos de EDX de membranas se dan en la Tabla 5.

25

Tabla 5. Resultados de EDX de membranas de ChGPhy1:7.

Membrana	C/N	C/O	C/P	N/P
Ch2,5 % (1:7)	4,6	1,1	361,5	78,5
Ch5 % (1:7)	4,2	1,1	126,7	30,0
Ch10 % (1:7)	4,0	3,5	104,8	25,8

La relación C/O aumentó ligeramente con la concentración de reticulante, que indica la presencia de un contenido más alto de O que procede de GPhy1:7, mientras que disminuyeron las relaciones de C/P y N/P en particular. Se informó de resultados
5 similares para nanofibras de proteína electrohiladas reticuladas con PA.

Se analizó la **degradación térmica** de membranas de ChGPhy1:7 por TGA bajo atmósfera de aire y los resultados se muestran en la Tabla 6. La degradación de membranas se produjo en dos etapas principales, la primera con velocidad máxima a
10 aproximadamente 300 °C y la segunda a aproximadamente 600 °C. La degradación térmica de membranas de ChGPhy1:7 puede estar principalmente asociada a la deshidratación de los anillos de sacárido, despolimerización y descomposición de unidades moleculares en las cadenas de Ch. Todas las muestras de membranas de ChGPhy1:7 presentaron residuos que muestran la presencia de fosfatos en las
15 muestras que proceden del reticulante GPhy1:7.

Tabla 6. Resultados de TGA y DTGA de membranas de ChGPhy1:7 bajo atmósfera de aire.

Muestra	T _{máx}		Residuo (%)
	1ª etapa	2ª etapa	
Ch	306	582	0
Ch2,5 % (1:7)	296	599	2,0
Ch5 % (1:7)	290	598	1,4
Ch10 % (1:7)	287	582	1,55

20 Se estudió el **comportamiento de hinchamiento** de membranas reticuladas en PBS de pH 7,4 a 37 °C. La evolución del hinchamiento con el tiempo se presenta en la Fig. 6. La captación de agua fue muy rápida, alcanzando un máximo en 1 día para todas las muestras. En este momento, la membrana reticulada con 5 % de GPhy1:7 alcanzó un valor de aproximadamente el 100 %, mientras que las membranas reticuladas con
25 2,5 y 10 % de GPhy1:7 de aproximadamente el 85 %, que indica que el 5 % puede ser una concentración de reticulante óptima. A los 2 días, la captación de agua disminuyó ligeramente, aunque no significativamente. Este resultado está normalmente asociado al comportamiento elástico de polímeros en los que la relajación de las macromoléculas se produce como consecuencia de la inmersión en un medio de
30 hidratación. A los 7 días, se estabilizó la captación de agua para las membranas Ch5 % (1:7) y Ch10 % (1:7), mientras que disminuyó significativamente para aquellas

fabricadas con 2,5 % de reticulante. Esta disminución del hinchamiento puede ser debida a la rotura de algunas reticulaciones iónicas que es más evidente en las muestras menos reticuladas. El hinchamiento de las muestras de Ch sin reticular también disminuyó significativamente, que puede atribuirse a disgregación en el medio. Entonces, la concentración de 2,5 % de GPhy1:7 parece no ser suficiente para dar estabilidad de la membrana a corto plazo. Por el contrario, los presentes inventores pueden decir que las concentraciones de tanto el 5 como el 10 % de GPhy1:7 proporcionaron membranas con comportamiento de hinchamiento adecuado y estabilidad para ser usadas en aplicaciones biomédicas.

10

EJEMPLO 6. Preparación de membranas de polisacárido reticuladas con GPhy que contienen más de un polisacárido

Se fabricaron membranas reticuladas que contenían más de un polisacárido con mezclas de quitosano (Ch) y ácido hialurónico (HA) en una relación másica Ch:HA de 60:40 usando GPhy1:7 como reticulante (en lo sucesivo, membranas de Ch/HAGPhy1:7), usando el mismo protocolo descrito para membranas de Ch (Ejemplo 4).

Brevemente, se disolvió Ch (2 % en peso) en solución de ácido acético (1 % v/v) y, por separado, se disolvió HA (2 % en peso) en solución acuosa. Se mezclaron alícuotas de ambas soluciones con agitación y se acidificaron ligeramente (HCl 1 N) para obtener la disolución completa de ambos polisacáridos, que se dispuso en un molde de vidrio, se transfirió a una estufa a 37 °C y se mantuvo allí hasta la evaporación completa del disolvente. La membrana purificada se reticuló por inmersión en solución de GPhy (2,5, 5 o 10 % en peso respecto a Ch, en diferentes experimentos) durante 12 h a 37 °C. Se sacó la membrana de hidrogel correspondiente del molde, se lavó con NaOH 1 N y agua destilada hasta pH neutro. La membrana se secó entonces a 37 °C.

Al igual que para las membranas de ChGPhy1:7, la reacción de reticulación será debida a interacciones iónicas entre los aniones fosfato de GPhy1:7 y los grupos amino protonados de Ch. Sin embargo, en este caso, el material resultante será una red de polímero semi-interpenetrada (semi-IPN) formada por una red de Ch reticulado en la que macromoléculas de HA lineales están enmarañadas con las de Ch. Además, lo más probable es que puedan ocurrir interacciones intermoleculares tales como enlace de hidrógeno, que intervienen en los grupos carboxílico, hidroxilo y grupos amino que pertenecen a diferentes polisacáridos, que contribuyen a la estabilidad

dimensional de la estructura de hidrogel semi-IPN.

Nombres y composición de las membranas tal y como se produjeron se dan en la Tabla 7.

5 Tabla 7. Nombres y composición de las membranas de Ch/HAGPhy1:7.

Nombre de muestra	Ch/HA (p/p)	GPhy1:7 (% en peso respecto a Ch)
Ch/HA2,5 % (1:7)	60:40	2,5
Ch/HA5 % (1:7)	60:40	5
Ch/HA10 % (1:7)	60:40	10

EJEMPLO 6. Caracterización de membranas de Ch/HA reticuladas con GPhy1:7

Los **espectros de ATR-FTIR** de membranas de Ch/HAGPhy1:7 mostraron las bandas características de tanto polisacáridos como reticulante GPhy1:7 (Fig. 7).

10

Las principales bandas aparecieron: entre 3600 y 3200 cm^{-1} (ν O-H y N-H asociados); a 2924 y 2854 cm^{-1} (ν C-H); a 1720 cm^{-1} (ν C=O en grupos carboxílicos); a 1643/1634 cm^{-1} (ν C=O de amida, amida I); a 1579 cm^{-1} (δ N-H); a 1420 cm^{-1} (ν COO⁻ y δ C-H); a 1373 cm^{-1} (δ -CH₃ simétrico); a 1333 cm^{-1} (ν C-N, amida III); a 1258/1262 cm^{-1} (ν P=O); a 1150 cm^{-1} (ν C-O-C asimétrico); a 1066, 1029, 995 y 984 cm^{-1} (ν C-O de alcoholes, enlaces glucosídicos ν P-O y P-O-C, ν C-O y vibración de estructura de piranosa); a 893 y 721 cm^{-1} (ν P-O y P-O-C).

15

Las principales diferencias entre los espectros de las membranas de Ch/HAGPhy1:7 y los de la membrana de Ch/HA son los siguientes: desaparición de un pico secundario con picos a 2909-2862 cm^{-1} , que son más pronunciados en la membrana Ch/HA sin reticular; en el intervalo 1700-1500 cm^{-1} , un aumento y desplazamiento en la banda de amida I hacia número de onda más bajo (1643 a 1634 cm^{-1}) respecto a membrana sin reticular (1646 cm^{-1}); la banda a 1579 cm^{-1} se desplazó con respecto a la membrana de Ch/HA (1586 cm^{-1}) como consecuencia de interacciones iónicas entre los grupos NH₃⁺ de la membrana Ch/HAGPhy1:7 y los grupos fosfato de GPh1:7; un cambio en las intensidades de las bandas en el intervalo 1150 y 950 cm^{-1} .

20

25

Se examinaron la **morfología superficial y composición elemental** de membranas de Ch/HAGPhy1:7 por SEM y EDX, respectivamente. La Fig. 6 muestra las imágenes de SEM de membranas de Ch/HAGPhy1:7. Se observó una morfología bien estructurada altamente porosa en todas las muestras. La porosidad tiende a reducirse con el contenido de reticulante, proporcionando una red de tamaño de malla reducido.

30

Esta morfología superficial parece ser muy adecuada para la colonización y proliferación de células en aplicaciones de ingeniería de tejido.

Los espectros de EDX de membranas de Ch/HAGPhy1:7 mostraron los picos de los principales elementos C, O, N y P. Los resultados de EDX se muestran en la Tabla 8. Puede ser claramente observada una disminución en la relación de C/P con el contenido de GPhy1:7 en la membrana, además de una disminución en la relación de N/P, que confirma la reacción de reticulación.

Tabla 8. Resultados de EDX de membranas de Ch/HAGPhy1:7.

Membrana	C/N	C/O	C/P	N/P
Ch/HA2,5 % (1:7)	-	-	-	-
Ch/HA5 % (1:7)	4,8	1,1	188	39
Ch/HA10 % (1:7)	4,6	1,1	90	20

10

Se analizó la **degradación térmica** de membranas de Ch/HAGPhy1:7 por termogravimetría. Se muestran curvas de TGA y DTGA en la Tabla 9. Los patrones de degradación de todas las membranas de Ch/HAGPhy1:7 son bastante similares, pero mostraron diferencias respecto a la membrana de Ch/HA sin reticular.

15

Independientemente de la concentración de GPhy1:7, la degradación de membranas de Ch/HAGPhy1:7 tuvo lugar en dos etapas de degradación principales, mientras que la de las membranas de Ch/HA en tres etapas. Esta diferencia deja claro que ambos polisacáridos están básicamente mezclados en las membranas sin reticular, mientras que están bien enmarañados formando redes semi-IPN en las membranas de

20

Ch/HAGPhy1:7. Además, los valores de $T_{m\acute{a}x}$ de las muestras semi-IPN son más altos en comparación con la muestra de Ch/HA, manifestando la reacción reticulada y formación de enmarañamientos entre ambos polisacáridos que, además, pueden estabilizarse con interacciones hidrófilas. Considerando las concentraciones de GPhy1:7, el 5 % proporcionaron membranas que tienen la estabilidad más alta, mientras que el 10 % dieron lugar a membranas con la estabilidad térmica más baja.

25

Tabla 9. Resultados de la degradación térmica de membranas de Ch/HAGPhy1:7 bajo atmósfera de aire.

Muestra	$T_{m\acute{a}x}$ (°C)		
	1ª etapa	2ª etapa	3ª etapa
Ch/HA	271	497	560
Ch/HA2,5 % (1:7)	292	586	
Ch/HA5 % (1:7)	286	602	

Ch/HA10 % (1:7)	293	512	
-----------------	-----	-----	--

Se estudió el **comportamiento de hinchamiento** de membranas reticuladas en PBS de pH 7,4 a 37 °C. La evolución del hinchamiento con el tiempo se presenta en la Fig. 9. Las membranas de Ch/HAGph1:7 mostraron perfiles de hinchamiento bastante similares a aquellos observados para las membranas de ChGPhy1:7. La captación de agua fue muy rápida, alcanzando el máximo entre 1 y 2 días para todas las muestras y dando valores que oscilaban entre el 90 y el 115 %. Se observó el hinchamiento más alto para la membrana reticulada con 5 % de GPhy1:7, y el más bajo para aquella con el 10 % de reticulante, que indica otra vez que el 5 % de GPhy1:7 podría ser una concentración óptima. Después, la captación de agua disminuyó significativamente a valores de aproximadamente el 80-90 % para las membranas de Ch/HA5 % (1:7) y Ch/HA10 % (1:7) respectivamente, y aproximadamente del 70 % para Ch/HA2,5 % (1:7). La disminución del hinchamiento puede atribuirse a cierta liberación de cadenas de HA no reticuladas, pero también a alguna rotura de enlaces iónicos, más pronunciada para las muestras fabricadas con el contenido de reticulante más bajo.

A partir de los resultados de experimentos de hinchamiento, los presentes inventores pueden decir que las concentraciones de tanto el 5 como el 10 % de GPhy1:7 proporcionan membranas con comportamiento de hinchamiento adecuado y buena estabilidad para aplicaciones biomédicas.

EJEMPLO 7. Formación de capa similar a apatita sobre membranas de Ch reticuladas con GPhy.

Se usaron las membranas de Ch reticuladas con 10 % de GPhy1:7 reticuladas llamadas membranas de Ch10 % (1:7) para ensayos de mineralización. Se estudió la formación de una capa similar a apatita sobre la superficie de las membranas con el tiempo impregnando la muestra en SBF1,5 a 37 °C. El crecimiento de una capa similar a apatita se confirmó por técnicas experimentales tales como SEM, EDX y ATR-FTIR.

La Fig. 10 muestra las fotografías de SEM de la superficie de membranas de Ch10 % (1:7) después de 4, 7 y 14 días de impregnación en SBF1,5. A los 4 días, la superficie de las membranas mostró precipitación de agregados que se concentraron en zonas localizadas, indicativo de depósitos de Ca-P. A los 7 días, los precipitados aparecieron más diseminados sobre la superficie y a los 14 días, los agregados prácticamente colonizaron la superficie completa. A aumento más alto (2000x), pudo apreciarse que los precipitados estaban formados por partículas esféricas que presentaron la

morfología de coliflor típica atribuida a la capa similar a apatita. Los espectros de EDX de los precipitados obtenidos a diferentes periodos de tiempo mostraron las bandas típicas de Ca y P dando relaciones de Ca/P de 1,92, 1,45 y 1,66 en el plazo de 4, 7 y 14 días, respectivamente, valores que se aproximan a los de la relación Ca/P de la apatita biológica (1,66). Estos resultados sugieren que las membranas de Ch preparadas con reticulantes GPhy pueden tener aplicación en procesos de regeneración de tejidos que implican al hueso, tal como la reparación de cartílago subcondral.

10 **EJEMPLO 8. Comportamiento biológico de membranas reticuladas de polisacárido**

En este ejemplo, se evaluaron el comportamiento biológico de membranas de Ch y Ch/HA fabricadas con diferentes reticulantes GPhy por ensayos de MTT respectivos.

15 La muestra correspondiente se dispuso en DMEM libre de FBS. Entonces, se extrajeron extractos del medio en diferentes periodos de tiempo (1, 2, 7 y 14 días) y se sustituyeron con medio fresco. Los extractos se filtraron y se usaron para ensayos de citotoxicidad. Se usaron discos Thermanox® (TMX) como control negativo. Por separado, se sembraron células a una densidad de 9×10^4 células/ml en medio completo, y se incubaron hasta la confluencia. Después de 24 h de incubación, el medio se sustituyó con el extracto correspondiente y se incubó a 37 °C en aire humidificado con 5 % de CO₂ durante 24 h. El resto de la prueba se llevó a cabo como se ha explicado anteriormente.

25 Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de los resultados para materiales probados con respecto al control al nivel de significancia de *p<0,05.

Los nombres y composición de las membranas estudiadas se resumen en la Tabla 10.

30 Tabla 10. Nombres y composición de membranas de Ch y Ch/HA preparadas con reticulantes GPhy

Nombre de la familia de membranas	Nombre de la muestra	Ch/HA (p/p)	Contenido de GPhy (% en peso respecto a Ch)	Tipo de reticulante
ChGPhy1:7	Ch2,5 % (1:7)	100:0	2,5	GPhy1:7

ChGPhy1:7	Ch5 % (1:7)	100:0	5	GPhy1:7
ChGPhy1:7	Ch10 % (1:7)	100:0	10	GPhy1:7
Ch/HAGPhy1:7	Ch/HA2,5 % (1:7)	60:40	2,5	GPhy1:7
Ch/HAGPhy1:7	Ch/HA5 % (1:7)	60:40	5	GPhy1:7
Ch/HAGPhy1:7	Ch/HA10 % (1:7)	60:40	10	GPhy1:7
ChGPhy4:1	Ch50 % (4:1)	100:1	50	GPhy4:1
ChGPhy5:1	Ch50 % (5:1)	100:1	50	GPhy5:1
ChGPhy6:1	Ch50 % (6:1)	100:1	50	GPhy6:1

Respecto a las membranas **fabricadas con solo Ch**, los resultados de citotoxicidad de **membranas de ChGPhy1:7** sobre fibroblastos humanos se muestran en la Fig. 11. Puede observarse que la viabilidad celular en presencia de extractos tomados entre 4 h y 7 d fue aproximadamente del 100 % o superior, lo que indica la ausencia de citotoxicidad. De forma interesante, la viabilidad celular aumenta estadísticamente en presencia de extractos de la muestra de Ch10 % (1:7) tomados después de 14 d.

Se analizó cuantitativamente la proliferación celular en las membranas de ChGPhy1:7 después de diferentes tiempos después de la siembra y los resultados se presentan en la Fig. 12. Para las membranas de Ch10 % (1:7), la proliferación celular aumentó en particular con respecto a Ch después de 14 días después de la siembra, lo que indica que la presencia más alta del derivado de fitato en esta composición hace más evidente que este compuesto puede tener una actividad de estimulación sobre la proliferación de fibroblastos.

Morfología celular

Los materiales se dispusieron en una placa de 24 pocillos (por duplicado), se sembraron con células a una densidad de 5×10^4 células/ml y se incubaron a 37 °C. Después de periodos de incubación de 24 h, 4 y 8 días, las células se fijaron con 2,5 % de glutaraldehído tamponado en PBS 0,1 M. Las muestras secadas se examinaron bajo una microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un aparato Philips XL 30 a un voltaje de aceleración de 25 keV.

También se analizó la morfología de células unidas por microscopía óptica. Se dispusieron muestras en una placa de 24 pocillos (por duplicado), se sembraron con células a una densidad de 2×10^4 células/ml y se incubaron durante 14 días a 37 °C. Después, se eliminó el medio, las muestras se lavaron con PBS, las células se dejaron con una solución de 2,5 % de glutaraldehído en agua destilada durante 15 min a

temperatura ambiente y finalmente se lavaron dos veces con agua destilada. Las células se tiñeron con una solución de Crystal Violet (1 mg/ml en PBS) y se incubaron durante 15 min a temperatura ambiente. Entonces, las muestras se lavaron con agua destilada y se secaron a temperatura ambiente. Todas las muestras se examinaron por microscopía óptica usando un microscopio NIKON ECLIPSE TE2000-S.

Se examinó la morfología de células adheridas a membranas de Ch ChGPh1:7 por SEM en diferentes periodos de tiempo después de la siembra (Fig. 13).

10 A las 24 h, las células adoptan morfología esférica en cada membrana. Sin embargo, después de 4 días, se observaron células más alargadas en membranas de ChGPhy1:7 en comparación con aquellas de Ch simple, y, después de 7 y 14 días, la colonización celular fue muy buena para membranas de ChGPhy1:7, y cualitativamente más alta en comparación con la de Ch, formando la monocapa típica, particularmente más evidente para la composición de Ch10 % (1:7).

Adicionalmente, se analizó la morfología de célula unida a membranas de ChGPhy1:7 por microscopía óptica y los resultados se muestran en la Fig. 14. Después de 14 días de siembra, las imágenes de microscopía de epifluorescencia revelaron morfología alargada de células cultivadas en todas las membranas, pero se observó una malla más densa en las membranas de composición de Ch10 % (1:7).

Los resultados de citotoxicidad de membranas de Ch50 % preparadas con GPhy4:1, GPhy5:1 y GPhy6:1 nombradas como las membranas de ChGPhy4:1, ChGPhy5:1 y ChGPhy6:1 se muestran en la Fig. 15. Para esta familia de membranas, se midió nuevamente la ausencia de citotoxicidad en fibroblastos humanos para extractos tomados en el plazo de 9 días, que muestra valores de viabilidad celular de aproximadamente el 100 % en todos los casos y no estadísticamente diferentes con respecto al control de Ch.

30 Se determinó la proliferación celular usando la prueba de azul de Alamar y los resultados se muestran en la Fig. 15. Era evidente que en el plazo de 48 h desde la proliferación celular era considerablemente y estadísticamente más alta en membranas de ChGPhy4:1, ChGPhy5:1 y ChGPhy6:1 en comparación con las de Ch, confirmando nuevamente la actividad de estimulación con respecto al crecimiento de fibroblastos debido al compuesto de GPhy, que en estas membranas reticuladas está presente en una concentración más alta (50 %). La disminución de células

cuantificadas después de 4, 7 y 14 días en las muestras reticuladas puede estar directamente relacionada con la densidad celular más alta obtenida en las primeras 48 h, que interrumpió que las células continuaran proliferando debido a la falta de espacio.

5

Por lo que respecta a las muestras fabricadas tanto con Ch y HA como con GPhy1:7, llamadas membranas de Ch/HAGPy1:7, esta familia de membranas también fue biocompatible en la prueba de MTT. Los resultados de la Fig. 17 muestran que la viabilidad celular en presencia de extractos de todas las composiciones de membrana
10 tomadas hasta 14 días fue aproximadamente del 100 %.

REIVINDICACIONES

1. Compuesto obtenido por una reacción de condensación entre ácido fólico y con un compuesto hidroxílico en relaciones molares que oscilan de 1:10 a 10:1, y dicho
5 compuesto que tiene un peso molecular inferior a 5.000 g/mol.
2. Compuesto según la reivindicación 1, en el que el compuesto hidroxílico es un alquilo C₂-C₁₀ sustituido con al menos un grupo hidroxilo.
- 10 3. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el compuesto hidroxílico es un polialcohol alifático que tiene de tres a seis átomos de carbono, y de dos a seis grupos hidroxilo.
4. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el compuesto
15 hidroxílico está seleccionado de entre la lista que consiste en glicoles alifáticos, glicerol, sorbitol y glucidol.
5. Compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el compuesto hidroxílico es glicerol.
20
6. Compuesto según la reivindicación 5, en el que las relaciones molares están seleccionadas de entre una lista que consiste en 1:7, 4:1, 5:1 y 6:1.
7. Uso del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 como agente de
25 reticulación.
8. Un proceso de obtención del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el proceso comprende al menos las siguientes etapas:
- 30 (a) Hacer reaccionar ácido fólico (PA) con el compuesto hidroxílico correspondiente en relaciones molares que oscilan de 1:10 a 10:1 a una temperatura que oscilan de 100 °C a 140 °C;
- (b) Disolver el producto de reacción obtenido de (a) en agua;
- (c) Precipitado de la solución de (b) en un disolvente orgánico de alcohol seleccionado de entre 2-propanol, *iso*-butanol y *n*-butanol; y
- 35 (d) Liofilización del precipitado obtenido de (c).
9. El proceso según la reivindicación 8, en el que la etapa a) se lleva a cabo a una

temperatura que oscila de 110 °C a 120 °C, preferentemente a 120 °C.

10. Membrana de polímero que comprende una mezcla del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 y al menos una proteína, un polisacárido, o
5 una combinación de los mismos, en la que dicha membrana contiene una cantidad del agente de reticulación que oscila del 2,5 al 50 % en peso.

11. Membrana de polímero según la reivindicación 10, en la que el polisacárido está seleccionado de entre una lista que consiste en quitosano, ácido hialurónico, sulfato de
10 condroitina y heparina.

12. Membrana de polímero según la reivindicación 11, en la que el polisacárido está seleccionado de entre quitosano y ácido hialurónico.

13. Membrana de polímero según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende quitosano y ácido hialurónico.
15

14. Membrana de polímero según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12, que comprende un compuesto obtenido por una reacción de condensación entre ácido
20 fítico y glicerol en la relación molar PA:G 1:7, y quitosano.

15. Membrana de polímero según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, que comprende un compuesto obtenido por una reacción de condensación entre ácido
25 fítico y glicerol en la relación molar PA:G 1:7, y quitosano y ácido hialurónico.

16. Un proceso de obtención de la membrana de polímero según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 15, en el que el proceso comprende al menos las siguientes etapas:

(a) Formar una película de una solución acuosa que contiene al menos una
30 proteína y/o polisacárido en una solución de ácido,

(b) Lavar el producto de la etapa (a) con una solución básica y agua para la neutralización del disolvente residual ácido;

(c) Hacer reaccionar la película de la etapa (c) con una solución acuosa del compuesto según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en una
35 cantidad que oscila del 2,5-50 % en peso; y

(d) Lavar y secar la membrana de polímero resultante de (c).

17. Uso de la membrana de polímero según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 15 como armazones para la ingeniería de tejido óseo.

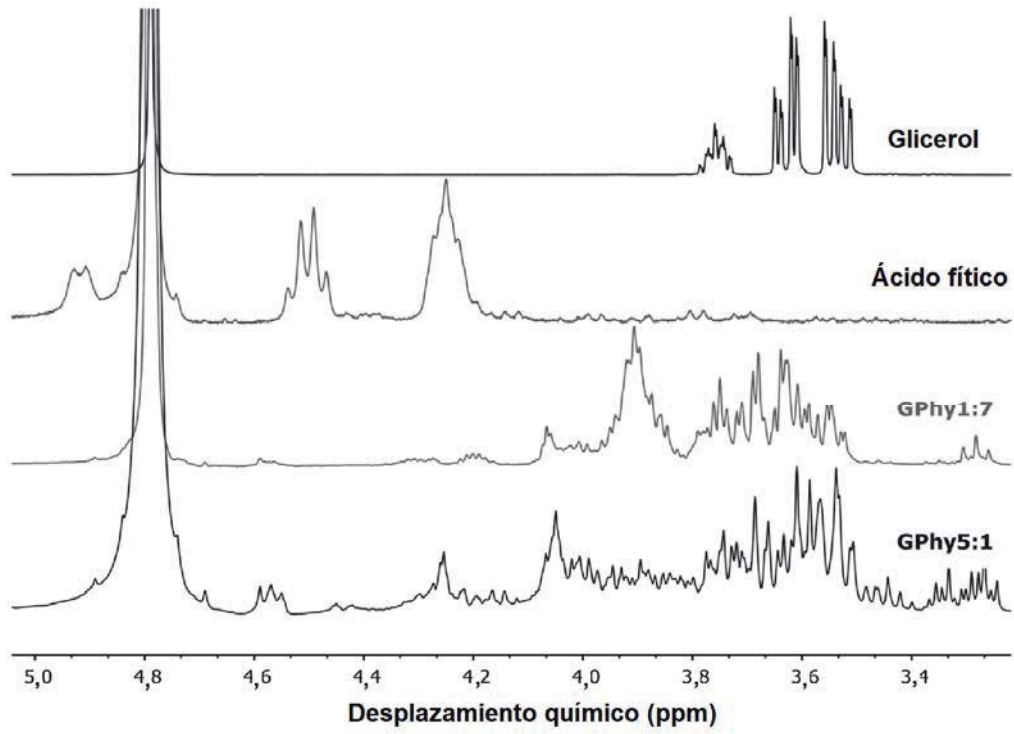


FIG. 1

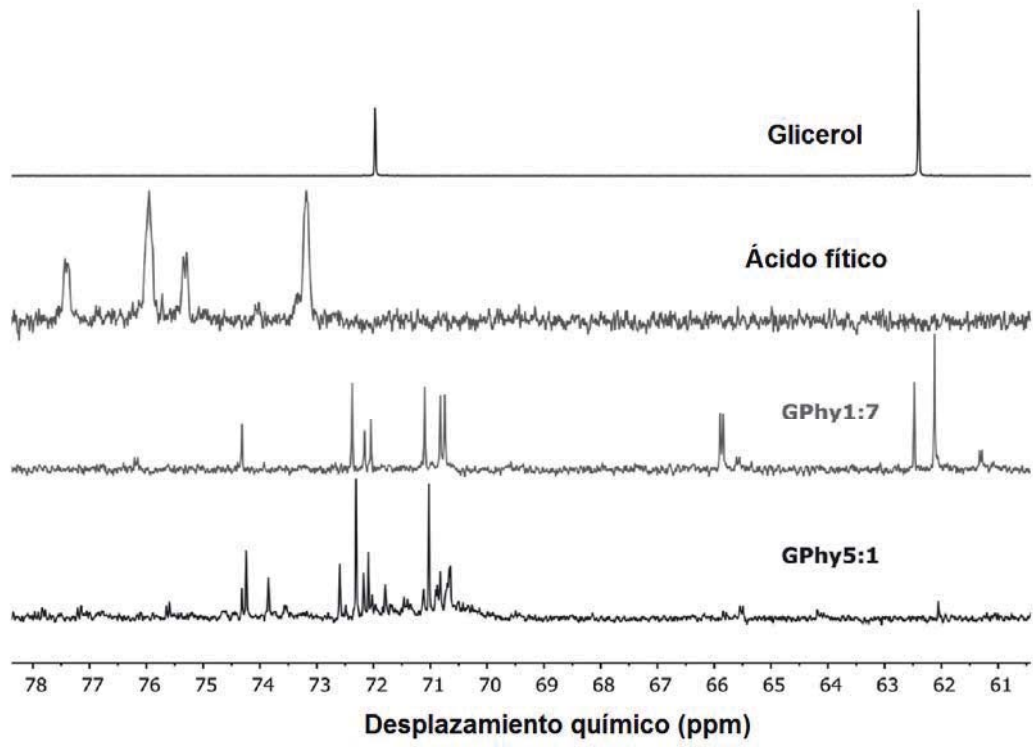


FIG. 2

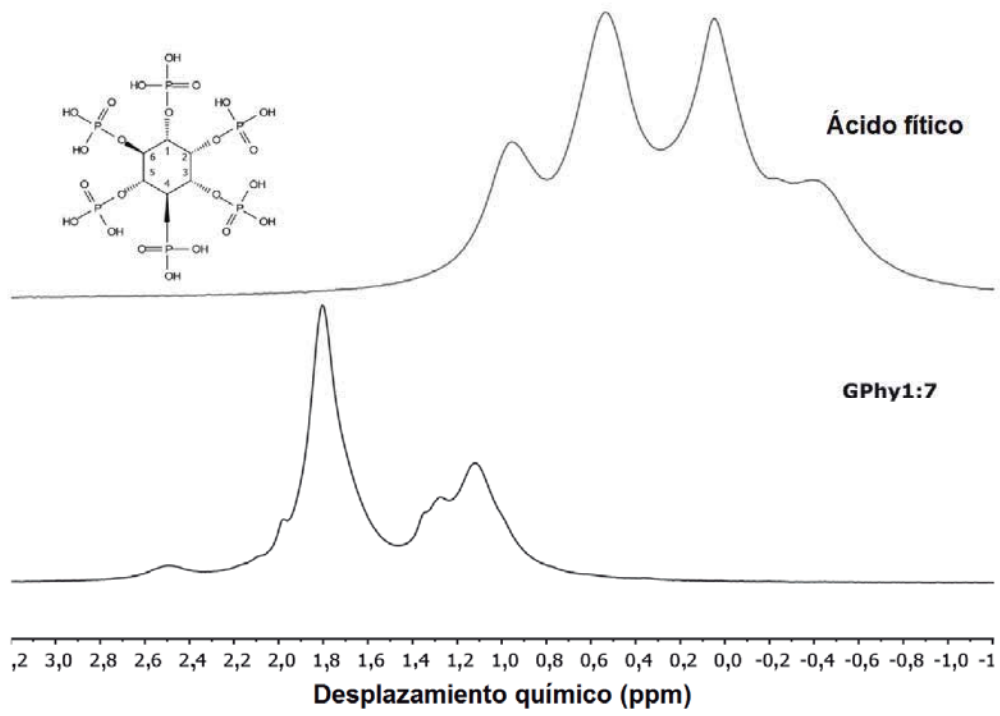


FIG. 3

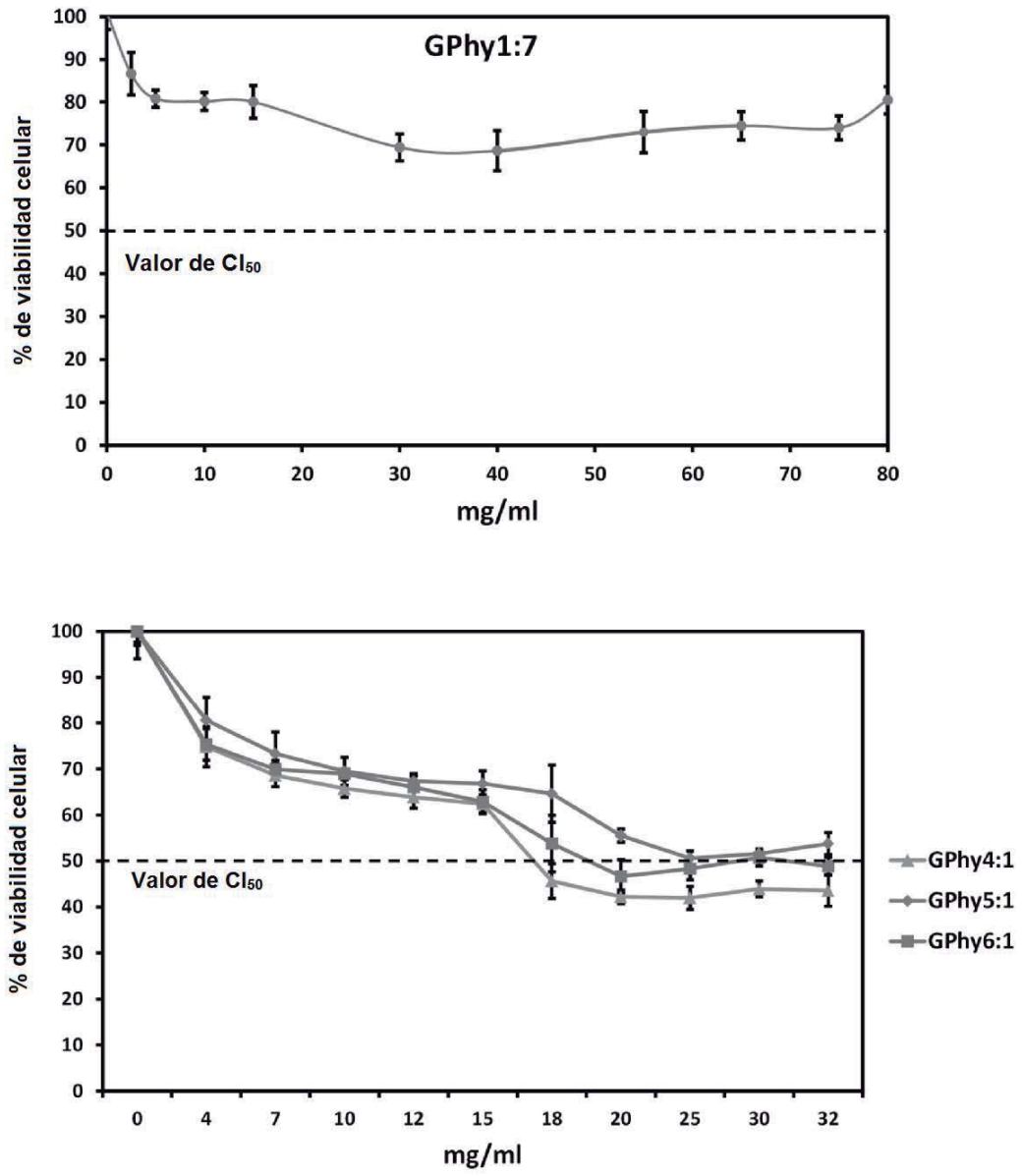


FIG. 4

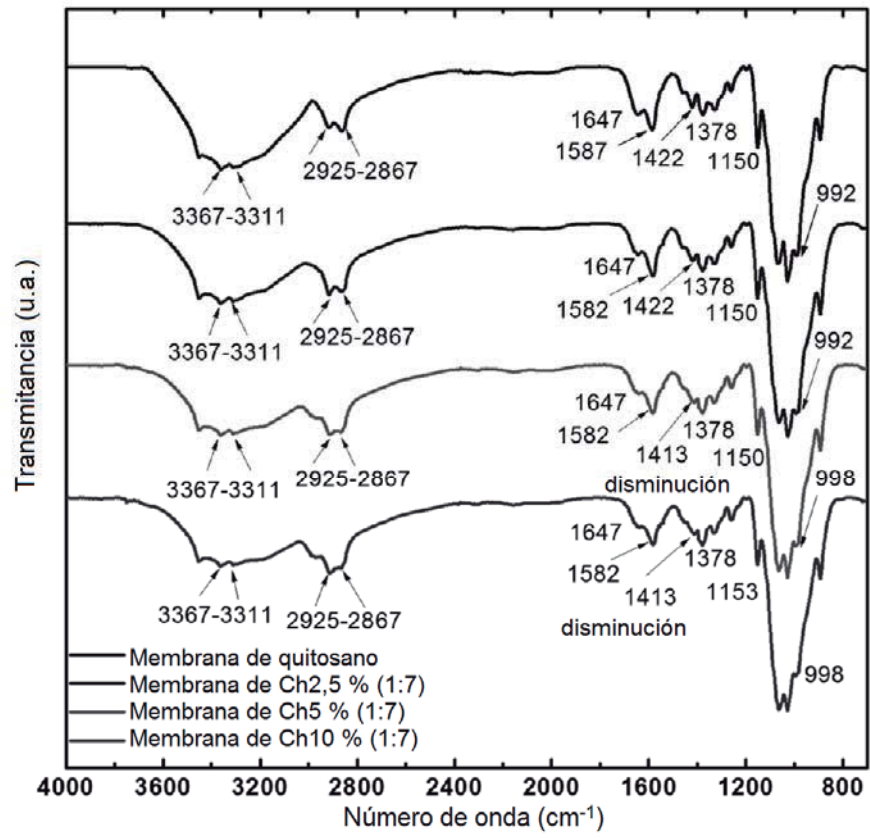


FIG. 5

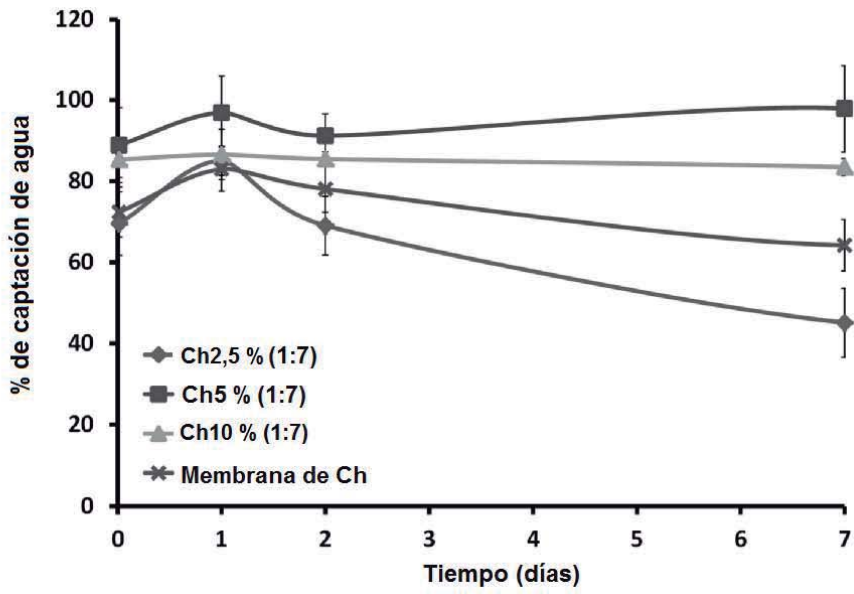


FIG. 6

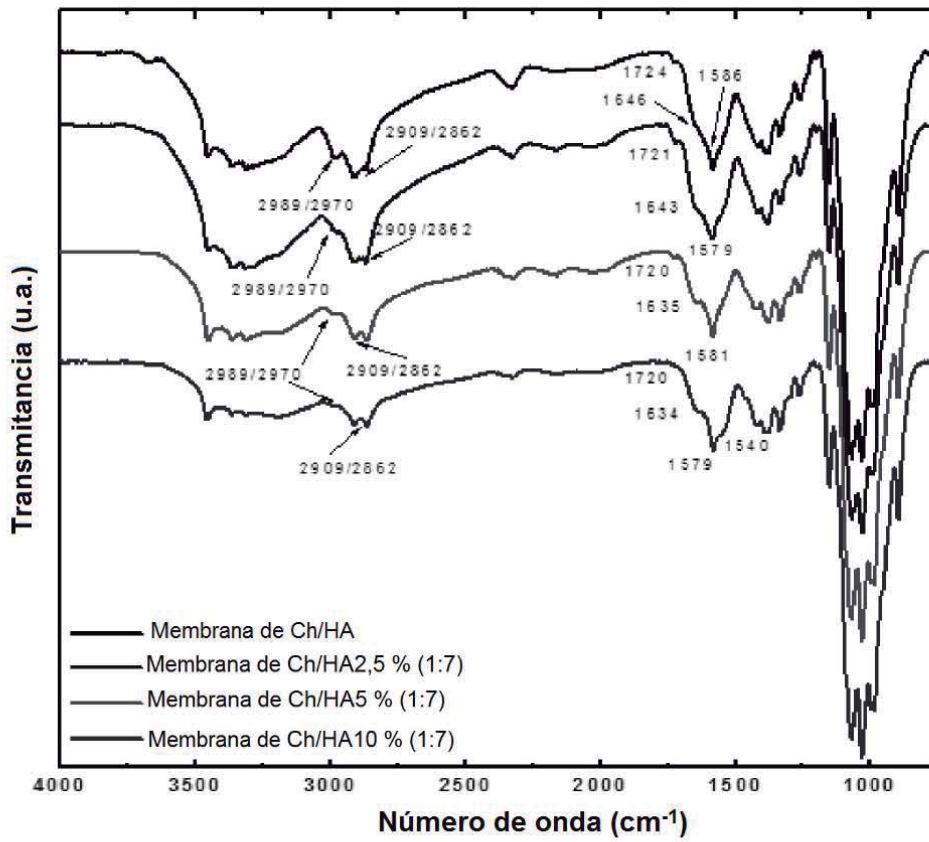


FIG. 7

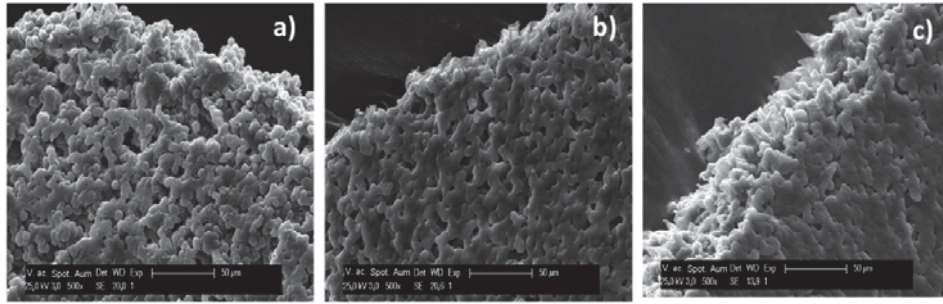


FIG. 8

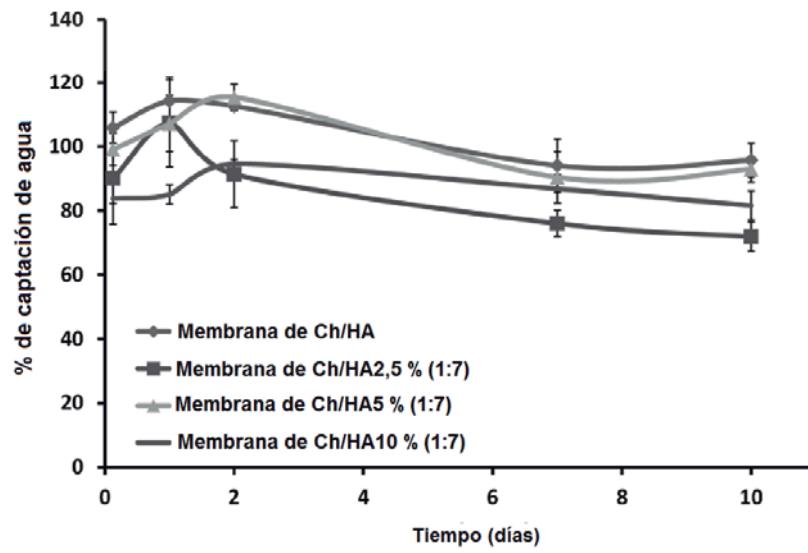


FIG. 9

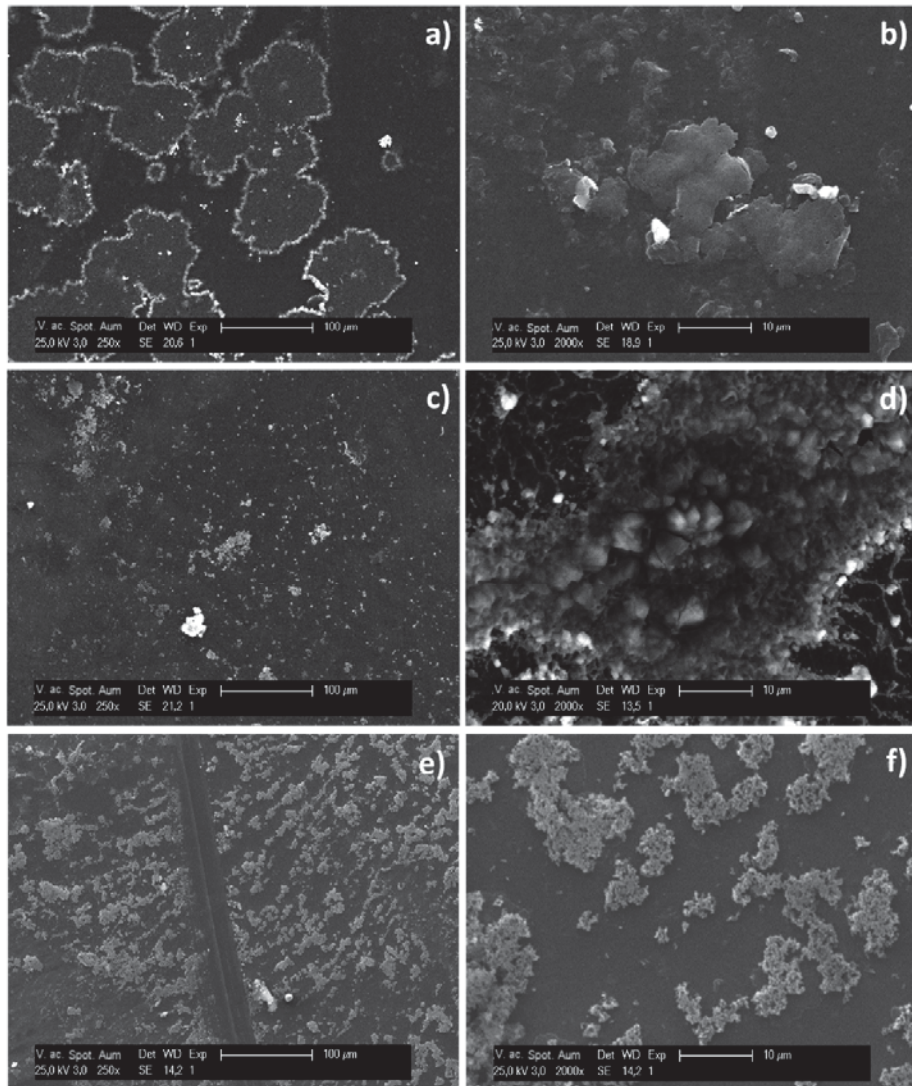


FIG. 10

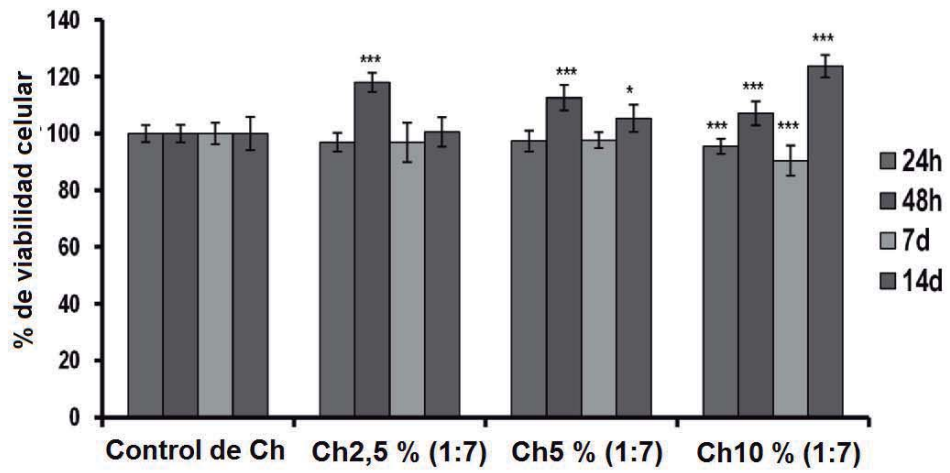


FIG. 11

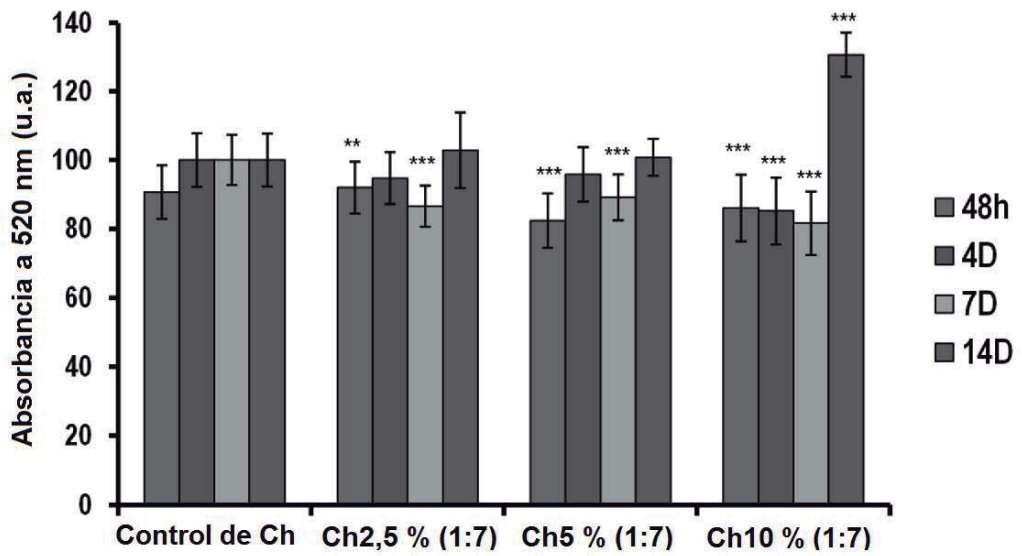


FIG. 12

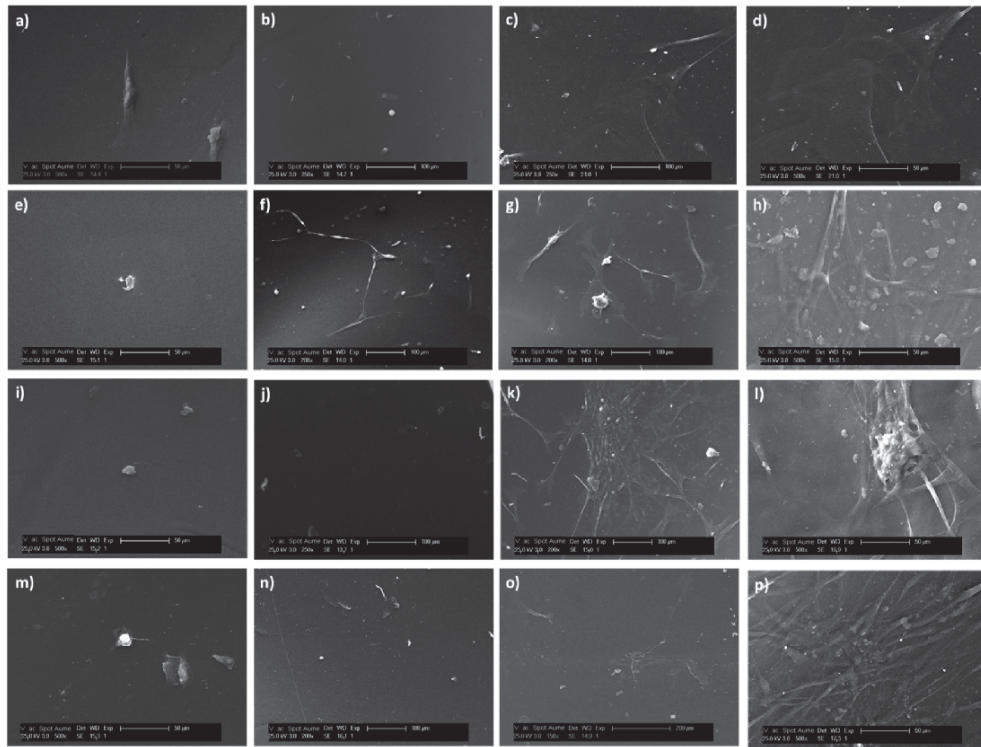


FIG. 13

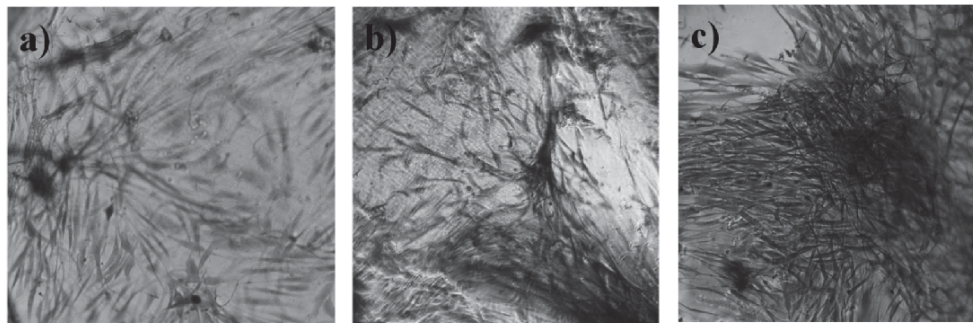


FIG. 14

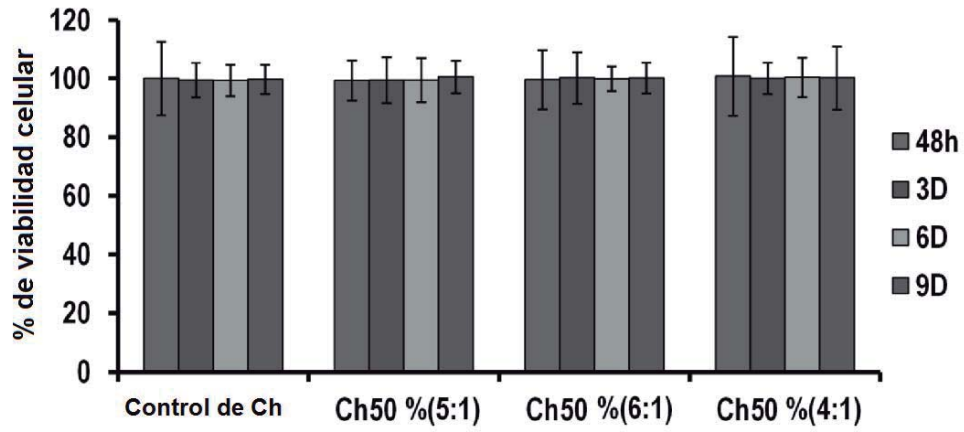


FIG. 15

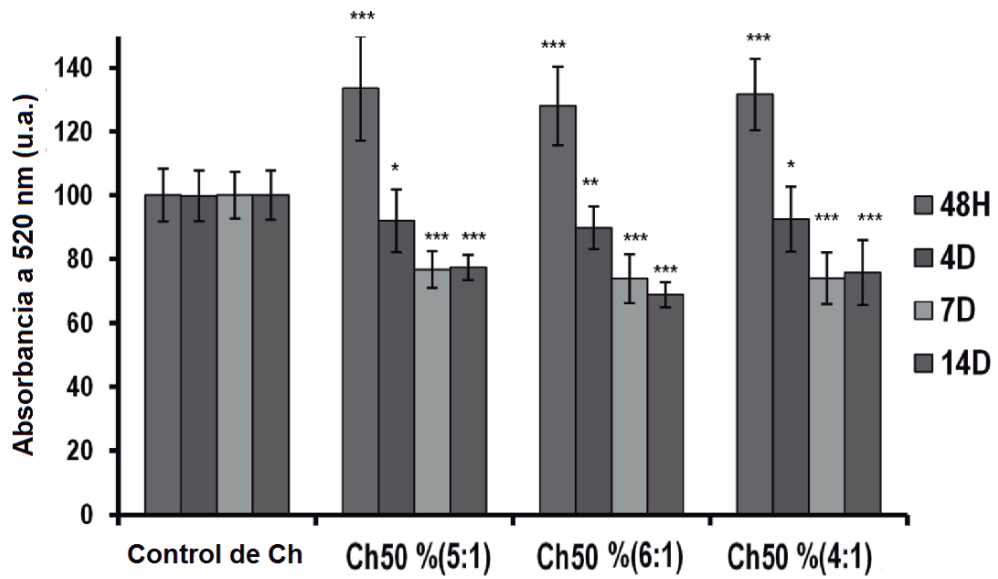


FIG. 16

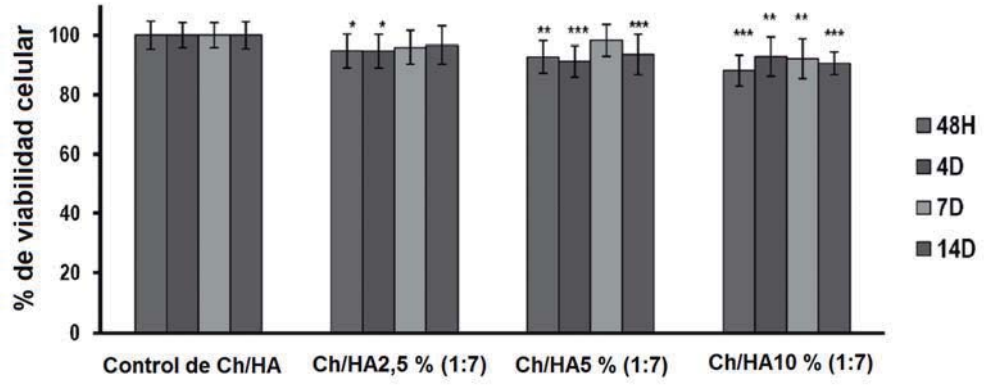


FIG. 17



②① N.º solicitud: 201730794

②② Fecha de presentación de la solicitud: 13.06.2017

③② Fecha de prioridad:

INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TECNICA

⑤① Int. Cl.: Ver Hoja Adicional

DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	⑤⑥ Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
X	JP 2011079950 A (TOYO INK MFG CO LTD) 21.04.2011, Párrafos [0011]-[0012], [0017], [0039]-[0040]; tablas 1 y 2.	1-4, 8, 9
X	JP 54044901 A (RICOH CO., LTD., JAPAN) 09.04.1979 (resumen). Base de datos: HCAPLUS [en línea] [recuperado el 23.04.2018]. Recuperado de <STN Internacional, Columbus, Ohio (EE.UU.). N° de acceso 1979:532140>.	1-4, 8, 9
X	JP 2012036122 A (NATIONAL INSTITUTE OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE & TECHNOLOGY) 23.02.2012. Ver párrafos [0018] y [0024].	1-4, 8, 9
A	MAWAD, D. et al. "A conducting polymer with enhanced electronic stability applied in cardiac models". Science Advances 2016, Volumen 2, Número 11, e1601007. [Publicado el 30.11.2016]. ISSN: 2375-2548. DOI: 10.1126/sciadv.1601007. Ver página 1, resumen.	1-17
A	WO 2008/156250 A1 (INDUSTRY-ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION, YONSEI UNIVERSITY) 24.12.2008, párrafos 1, 74-80.	1-17
A	PRETULA, J. et al. "H ₃ PO ₄ in a Direct Synthesis of Oligo-poly(ethylene phosphate) from Ethylene Glycol". Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry 2006, Volumen 44, Número 7, páginas 2358-2362. ISSN en línea: 1099-0518. DOI: 10.1002/pola.21332. [Publicado el 21.02.2006]. Ver página 2360, esquemas 1 y 2.	1-9

Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

El presente informe ha sido realizado

para todas las reivindicaciones

para las reivindicaciones nº:

Fecha de realización del informe
27.04.2018

Examinador
G. Esteban García

Página
1/2

CLASIFICACIÓN OBJETO DE LA SOLICITUD

C07F9/117 (2006.01)

A61L24/08 (2006.01)

A61L24/10 (2006.01)

A61L27/44 (2006.01)

A61L27/50 (2006.01)

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

C07F, A61L

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

INVENES, EPODOC, WPI, TXTE, REGISTRY, CAPLUS, BIOSIS, MEDLINE, XPESP, EMBASE, NCBI, GOOGLE SCHOLAR