

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



1 Número de publicación: 2 807 961

51 Int. Cl.:	
A61K 8/24	(2006.01)
A61K 8/29	(2006.01)
A61K 8/19	(2006.01)
C01B 25/32	(2006.01)
A61Q 17/04	(2006.01)

(12)

# TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

Т3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacior	nal: 06.03.2	017 PCT/IB2017/0	)51290
87) Fecha y número de publicación internacional:	14.09.2017	WO17153888	
96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea:	06.03.2017	E 17718738 (2)	
97) Fecha y número de publicación de la concesión europea:	29.04.2020	EP 3426224	

54) Título: Filtro solar físico que consiste en hidroxiapatita sustituida en una matriz orgánica

(30) Prioridad:

#### 07.03.2016 IT UA20161416

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente: 24.02.2021

Titular/es:
CONSIGLIO NAZIONALE DELLE RICERCHE (100.0%) Piazzale Aldo Moro 7 00185 Roma, IT
<sup>(72)</sup> Inventor/es:
TAMPIERI, ANNA; SANDRI, MONICA y SPRIO, SIMONE
(74) Agente/Representante:
RUO, Alessandro

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

Filtro solar físico que consiste en hidroxiapatita sustituida en una matriz orgánica

#### CAMPO DE LA INVENCIÓN

[0001] La presente invención se refiere a un filtro solar físico, formado por partículas de hidroxiapatita sustituida por iones de hierro y/o titanio en una matriz orgánica que consiste en un polímero biocompatible.

#### TÉCNICA ANTERIOR

15

20

35

**[0002]** Se sabe que las radiaciones solares, especialmente el componente ultravioleta (UV) del espectro de estas radiaciones, son responsables de diversos tipos de degradación fotoquímica. Estos pueden incluir la decoloración y el envejecimiento de pinturas, tejidos y recubrimientos de plástico, pero, sobre todo, alteraciones en tejidos cutáneos de humanos, potencialmente hasta la aparición de cáncer de piel; de hecho, una exposición aguda y crónica a los rayos UV puede derivar en gueradures, fateopreciación de terrar fateopreciáncia y una fateopreciación de cáncer de piel; de hecho, una exposición aguda y crónica a los rayos UV puede derivar en gueradures, fateopreciación de cáncer de piel; de hecho, una exposición aguda y crónica a los rayos UV puede derivar en gueradures categorias entres fateopreciación de cáncer de piel; de hecho, una exposición aguda y crónica a los rayos UV puede derivar en gueradures categorias entres fateopreciación de cáncer de piel; de hecho, una exposición aguda y crónica a los rayos UV puede derivar en gueradures categorias entres fateopreciación de cáncer de piel; de hecho, una exposición aguda y crónica a los rayos UV puede derivar en gueradures categorias entres fateopreciación de cáncer de piel; de hecho, una exposición aguda y crónica a los rayos UV puede derivar en de terma entres de hecho, una fateopreciación de cáncer de piel; de hecho, una exposición aguda y crónica a los rayos UV puede de hecho, una exposición de cáncer de piel; de hecho, una

10 humanos, potencialmente hasta la aparición de cáncer de piel; de hecho, una exposición aguda y crónica a los rayos UV puede derivar en quemaduras solares, fotoenvejecimiento, fotoinmunosupresión y una fotocarcinogénesis, que revisten gran preocupación para los jóvenes y, en particular, para los niños.

**[0003]** La radiación UV comprende la porción del espectro de longitudes de onda entre 100 y 400 nm, que, además, se dividen en UVC (100-290 nm), UVB (290-320 nm) y UVA (320-400 nm). Una exposición a la radiación UVC es de poco interés práctico, ya que las longitudes de onda inferiores a 290 nm son absorbidas por la capa de ozono y no llegan a la superficie terrestre, mientras que la exposición a UVA y UVB se considera inevitable.

**[0004]** Para impedir o mitigar los efectos negativos de la exposición a rayos UV, se pueden utilizar los denominados filtros solares, que son composiciones fluidas que se pueden extender sobre la parte que se va a proteger y que contienen componentes capaces de reducir la cantidad de radiación UV que alcanza a dicha parte; debido a esta característica, los filtros solares también se denominan comúnmente protectores solares. A pesar de que, como se ha mencionado, la exposición UV puede provocar degradación en artículos manufacturados y productos industriales, en el resto de la descripción se hará referencia a las aplicaciones para la protección cutánea, dada la importancia de esta última; no obstante, se entiende que los filtros solares descritos en el presente documento se pueden aplicar también en otros campos.

25 [0005] Los filtros solares se pueden dividir en dos clases principales: a) filtros químicos o biológicos, donde los componentes activos en la fotoprotección son moléculas orgánicas capaces de absorber los rayos UV; y b) filtros UV físicos o inorgánicos, comprendiendo barreras físicas que reflejan la radiación. Entre los componentes de fotoprotección química, el que se utiliza más ampliamente es el compuesto 1-(4-metoxifenil)-3-(4-tert-butilfenil)-propano-1,3-diona, al que se hace referencia comúnmente con los nombres de uso metoxidibenzoilmetano butilo o avobenzona, mientras que so metre los compuestos con actividad física se pueden mencionar en concreto TiO<sub>2</sub> y ZnO.

[0006] No obstante, los filtros solares actualmente en el mercado no están exentos de cuestiones críticas; los puntos debatidos en relación con su uso están relacionados con sus componentes y los efectos de su distribución en el medio ambiente, así como con su degradación tras la exposición a la luz solar y al efecto de los productos de degradación. Por ejemplo, se investigan los efectos sobre la piel (p. ej., irritación y sensibilización) y la penetración cutánea de los componentes de la crema; los efectos estrogénicos de los filtros químicos de UV; la actividad fotocatalítica y la fotodegradación a través de la exposición a radiación UV; y el déficit de vitamina D provocado por el uso excesivo de protectores solares, dando como resultado una absorción insuficiente de radiación UV en la piel.

[0007] La actividad fotocatalítica (tercer punto mencionado arriba) es una característica no deseable de cualquier protección solar, ya que podría derivar en la generación de radicales libres y otras especies reactivas que, por sí
mismas, pueden ser la causa de algunos de los problemas de salud asociados a la exposición a los rayos UV; en este sentido, véase, por ejemplo, el artículo "Current Sunscreen Controversies: A Critical Review" M. E. Burnett *et al.*, Photodermatology Photoimmunology and Photomedicine, 2011, 27(6): 58-67.

- [0008] Este inconveniente no está asociado únicamente a los filtros químicos de UV, por ejemplo, que contienen avobenzona como ingrediente activo, los cuales se sabe que experimentan fotodegradación, sino, especialmente, al uso de filtros físicos de UV que contienen nanopartículas de TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Fe<sub>x</sub>O<sub>y</sub>, Mg<sub>x</sub>O<sub>y</sub>, ZnO. Se constató que el uso de estos 45 compuestos en forma de nanopartículas mejora su efectividad, dando como resultado un mayor efecto de fotoprotección, al mismo tiempo que provoca, sin embargo, posibles problemas de seguridad asociados a las propiedades fotocatalíticas de estos minerales bajo luz UV-visible y su capacidad bien documentada para generar radicales libres reactivos mediante la exposición a radiación UV. Además, debido al creciente uso de los protectores 50 solares físicos, se han detectado recientemente mayores concentraciones de nanopartículas de TiO<sub>2</sub> y ZnO en el medio ambiente, especialmente en aguas costeras. Las nanopartículas de ZnO poseen efectos ecotoxicológicos tanto en especies acuáticas como en especies terrestres en una amplia gama de taxones, y, por encima de determinados niveles de concentración en entornos naturales, pueden suponer un riesgo significativo para la biota del ambiente; véase, por ejemplo, el artículo "Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review" H. Ma et al., Environmental Pollution, 55 2013, 172, 76-85.
  - **[0009]** Parece que las nanopartículas de TiO<sub>2</sub> muestran niveles inferiores de toxicidad en el fitoplancton marino en comparación con el ZnO, aunque se descubrió que presentaban un efecto ecotóxico en algas y dafnias.

**[0010]** Otro problema relacionado con el uso de filtros UV basados en nanopartículas inorgánicas se refiere a la penetración epidérmica de estas tras la aplicación tópica de protector solar. La capa córnea ha demostrado ser una barrera efectiva para impedir la entrada de nanopartículas de ZnO y TiO<sub>2</sub> en las capas más profundas de la piel sana, aunque se observa un alto grado de penetración en el caso de la piel dañada o enferma. Además, algunos estudios

- 5 mostraron que las formas micronizadas de dióxido de titanio y óxido de zinc (que, al reducir el tamaño de las partículas al orden de magnitud de nanómetros, permite que se filtren las radiaciones de longitud de onda baja, como UV, pero no la luz visible), utilizadas para impedir cualquier efecto de blanqueamiento no deseable en los protectores solares, pueden dar como resultado una mayor penetración del filtro físico en las capas más profundas de la epidermis, donde pueden desencadenar reacciones de estrés oxidativo que derivan en la reducción de colágeno, fotoenvejecimiento y
- 10 una fotocarcinogénesis; en este sentido, véase, por ejemplo, el artículo "Toxicity and penetration of TiO2 nanoparticles in airless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure", Jianhong Wu *et al.*, Toxicology letters 191 (2009) 1-8.

**[0011]** Las principales preocupaciones suscitadas por el uso de nanopartículas de  $TiO_2$  y ZnO en los filtros UV físicos están asociadas, por lo tanto, a su potencial fototoxicidad y a su penetración, derivando en efectos sistémicos y de bioacumulación en humanos y otros organismos.

**[0012]** Por consiguiente, en el campo todavía se advierte la necesidad de disponer de componentes activos para protectores solares que carezcan de los inconvenientes anteriormente expuestos o, en cualquier caso, que los presenten en menor medida en comparación con los materiales utilizados actualmente.

[0013] El objeto de la presente invención es proporcionar un material fotoactivo para su uso en filtros solares con características reducidas de fototoxicidad y penetración cutánea.

#### SUMARIO DE LA INVENCIÓN

**[0014]** Este objeto se logra con la presente invención, donde, en un primer aspecto de la misma, se refiere a una composición que comprende una matriz orgánica formada por moléculas de polímero, en las que se enlazan nanopartículas de hidroxiapatita sustituida por iones de titanio y/o hierro, en la que el fósforo está parcialmente sustituido por titanio en una cantidad de entre un 8 y un 50 % atómica con respecto al fósforo, y/o en la que el calcio está parcialmente sustituido por hierro en una cantidad de entre un 2 y un 40 % atómica con respecto al calcio, y donde la cantidad de la matriz orgánica es de entre un 5 y un 60 % en peso y la cantidad de hidroxiapatita sustituida es de entre un 35 y un 90 % en peso, estando constituida la parte restante por agua.

[0015] En un segundo aspecto de la misma, la invención se refiere al proceso para obtener dicha composición.

#### 30 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

[0016]

15

25

35

45

55

La figura 1 muestra fotomicrografías de microscopio electrónico de varias muestras de composición de la invención.

La figura 2 muestra el espectro de difracción de rayos X en polvo de tres muestras de composición de la invención.

Las figuras 3.A y 3.B muestran los espectros de reflectancia y absorción, respectivamente, de la luz UV-visible mediante muestras de composición de la invención.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

[0017] A continuación se describe con detalle la invención en referencia a las figuras.

[0018] La hidroxiapatita es el compuesto de fórmula Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>(OH), a menudo presentado también como dímero Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, que refleja la presencia de dos unidades básicas en la célula primaria del cristal. El compuesto está presente de forma natural como mineral (en el que el ion hidroxilo se puede sustituir parcialmente por iones de cloro, flúor o carbonato), y también es el mineral constituyente de los huesos de humanos y animales. El compuesto se indica también en la literatura mediante la abreviatura HA, de hidroxiapatita, que también se empleará en el presente texto.

**[0019]** Los inventores han verificado que la hidroxiapatita tiene unas características tales como para permitir el desarrollo de nuevos filtros solares seguros, debido a que, junto a su alta biocompatibilidad comparada con ZnO y TiO<sub>2</sub>, su banda de absorción/reflexión de la radiación UV se puede ampliar y modular en el rango deseado introduciendo iones dopantes adecuados en su estructura cristalina.

**[0020]** En el primer aspecto de esta, la invención se refiere a una composición que comprende una matriz orgánica en la que hay presentes, como elemento fotoactivo, nanopartículas de hidroxiapatita sustituidas por iones de titanio y/o hierro, según se ha indicado anteriormente.

50 **[0021]** En la presente invención, el término nanopartículas se refiere a partículas cuyo tamaño máximo no excede de 500 nm; en concreto, se observó que las nanopartículas obtenidas de acuerdo con el proceso de la invención no son, por lo general, mayores de aproximadamente 200 nm.

**[0022]** Además, por supuesto, la matriz debe ser inocua para la superficie que se va a proteger y, en el caso de la piel, debe ser no tóxica y asegurar valores de pH fisiológico (pH ligeramente ácido, aproximadamente entre 4,2 y 5,6) en el producto acabado. Los inventores han constatado que se pueden seleccionar matrices orgánicas adecuadas a partir de

3

ácido poliláctico, colágeno, alginato de sodio, polietilenglicoles (PEG), quitosano, partículas sólidas de lípidos (SLP) y, en concreto, gelatinas de biocompatibilidad conocida.

**[0023]** Según se ha mencionado, el componente fotoactivo de la composición de la invención es una hidroxiapatita modificada, en la que una cantidad de entre un 8 y un 50 % atómica de fósforo se sustituye por titanio, y/o una cantidad de entre un 2 y un 40 % atómica de calcio se sustituye por hierro. La HA sustituida de la invención se caracteriza por presentar un reducido grado de cristalinidad en comparación con la HA no sustituida, debido a los efectos de distorsión de la estructura cristalina inducidos por la presencia de iones de dopaje y a la interacción con la matriz polimérica durante el proceso de formación del material compuesto, objeto de la patente, que dificulta su crecimiento y maduración.

[0024] La composición contiene, además, valores porcentuales bajos en peso de agua, generalmente inferiores al 5 %.

- 10 **[0025]** Las partículas de HA contenidas en la composición de la invención son de tamaño nanométrico, por lo que se evita el problema del efecto de blanqueamiento; además, al encontrarse en relación estructural cercana con la matriz orgánica y, por lo tanto, al formar parte de partículas compuestas más grandes, también presentan un bajo poder de penetración cutánea.
- [0026] Para la aplicación como filtro solar, tras cualquier posible adición de agua, la composición de la invención se suele mezclar a continuación con otros componentes típicos de productos comerciales para la protección frente a radiaciones solares, como cremas y aceites que permiten su distribución uniforme en la piel, aceites perfumados o componentes de impermeabilización para hacer que la crema sea resistente en caso de inmersión en el agua.

[0027] El segundo aspecto de la invención se refiere al proceso para preparar la composición anteriormente descrita.

[0028] La dispersión de nanopartículas de HA en la matriz no tiene lugar por la mezcla mecánica de partículas de HA previamente formadas en la matriz orgánica, sino por un proceso denominado «biomineralización», en el que las partículas de HA se producen directamente dentro de la propia matriz.

[0029] En el proceso de biomineralización, la matriz orgánica desempeña una función fundamental al representar el sustrato sobre el que tiene lugar la deposición de la fase inorgánica. Las matrices poliméricas seleccionadas para el proceso de la invención son ricas en cargas positivas o negativas; estas cargas interactúan selectivamente con cationes, principalmente Ca<sup>2+</sup>, o los aniones, principalmente PO4<sup>3-</sup>, presentes en la solución, y dirigen e influyen en el crecimiento de la fase inorgánica. De esta manera, las matrices poliméricas controlan la nucleación, orientación, cristalización y morfología de las partículas de hidroxiapatita, que principalmente desempeñan una función de inhibidores de la cristalización. Como resultado de este proceso, la hidroxiapatita está nucleada en la matriz orgánica y se encuentra en relación estructural cercana con esta.

30 [0030] El proceso de la invención comprende las siguientes etapas:

5

a) preparar una solución acuosa que contiene un precursor de calcio y de al menos una sal de hierro (II) y al menos una sal de hierro (III);

b) preparar una solución hidroalcohólica de un precursor de titanio;

c) preparar una solución acuosa, conteniendo el constituyente de la matriz orgánica, de un compuesto de fósforo 35 soluble en agua;

d) añadir lenta y simultáneamente las soluciones de los precursores de titanio y de compuesto de fósforo/matriz orgánica a la solución que contiene el precursor de calcio;

e) permitir que el sistema reaccione a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y 70 °C durante un tiempo de entre 1 y 5 horas; y

40 f) someter a un tratamiento de liofilización al producto obtenido como resultado de la etapa e).

**[0031]** Como podrá observar un experto en la materia, las etapas mencionadas anteriormente se designan mediante las letras a) a f) con el fin de identificarlas claramente, aunque esto no implica que dichas etapas se deban llevar a cabo necesariamente en este orden y, en particular, las etapas a), b) y c) se pueden llevar a cabo siguiendo cualquier orden.

[0032] Las etapas a), b) y c) consisten en la preparación de las soluciones de los precursores de calcio/hierro, titanio y fósforo (este último conteniendo el constituyente de la matriz orgánica).

**[0033]** Para la preparación de la solución acuosa del precursor de calcio (etapa a), se utiliza una sal de este o, preferiblemente, el hidróxido, Ca(OH)<sub>2</sub>. A esta solución, se le añade un precursor de Fe (II) y un precursor de Fe (III) en una proporción molar de 1:1; los precursores de iones preferidos son sus nitratos y, en particular, sus cloruros FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O y/o FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O.

50 **[0034]** Los compuestos preferidos para la preparación de la solución del precursor de titanio (etapa b) son sus cloruros y alcóxidos, en particular el isopropóxido (también conocido como isopropilato), Ti(-O-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>4</sub>; si se utilizan alcóxidos, preferiblemente se disuelven primero en alcohol o en una mezcla hidroalcohólica (el alcohol utilizado es preferiblemente el mismo cuyo radical está presente en el compuesto).

**[0035]** El compuesto utilizado para la preparación de la solución del precursor de fósforo (etapa c) es un compuesto de fósforo soluble, que puede ser una sal (como fosfato de amonio), aunque, preferiblemente, es un ácido fosfórico y, más preferiblemente, el ácido ortofosfórico, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>.

- [0036] La formación de hidroxiapatita puede tener lugar en principio mediante la reacción de sales solubles que llevan los iones Ca<sup>2+</sup> y PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> en solución; en este caso, se seleccionan sales cuyos contraiones no interfieren con la composición final, como Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (nitrato como contraión del ion de calcio) y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (amonio como contraión del ion de fosfato). No obstante, la reacción preferida es una que utiliza Ca(OH)<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, ya que con la neutralización del ácido con la base se obtiene agua como único subproducto y es especialmente rápida. Por lo tanto, de aquí en adelante, se hará referencia en concreto a esta reacción.
- 10 **[0037]** Según se ha mencionado, el constituyente de la matriz orgánica que contendrá las partículas de HA está disuelto en la solución del precursor de fósforo. En este caso, al contrario que el calcio, fósforo, titanio y hierro, no es un «precursor», ya que el componente orgánico disuelto en la solución es el mismo que el que constituirá la matriz final.

**[0038]** Las concentraciones de soluciones de Ca utilizadas para la reacción de síntesis de HA sustituida se encuentran normalmente en el rango de 50-150 mg/ml para la solución de Ca, entre 75 y 110 mg/ml para P, entre 12 y 100 mg/ml para titanio y entre 10 y 45 mg/ml para Fe.

**[0039]** Las cantidades de precursores de Ca, Ti y Fe se calculan para que sean adecuadas para obtener la relación estequiométrica deseada entre estos tres elementos; si se utiliza H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> como precursor de fósforo, este se añade generalmente en cantidades molares que oscilan entre aproximadamente 0,5 y 0,7 veces con respecto a los moles del precursor de calcio. El cálculo de la cantidad de precursores de los distintos metales y de fósforo depende del grado concreto de sustitución de calcio deseado en la hidroxiapatita sustituida final, y se encuentra dentro de las habilidades que posee el químico medio.

**[0040]** En la etapa d), las soluciones de precursores de Ti y P/matriz orgánica se añaden simultáneamente a la solución que contiene los precursores de Ca y Fe. En esta etapa, la neutralización (salificación) de la solución de Ca(OH)<sub>2</sub> inicialmente básica la lleva a cabo mediante el ácido fosfórico; los iones presentes en el entorno de reacción interactúan con las moléculas de la matriz polimérica y se incorporan simultáneamente en la estructura de hidroxiapatita que se forma como resultado de la reacción. La mezcla resultante se deja reaccionar durante un período generalmente de entre 1 y 5 horas, preferiblemente con agitación a una temperatura de entre la temperatura ambiente y 70 °C (etapa e).

- [0041] Con este proceso, las nanopartículas de HA sustituida se forman directamente en las cadenas poliméricas de la matriz orgánica. La formación dentro de la matriz también da como resultado la obtención de dimensiones nanométricas; las nanopartículas de HA sustituida únicamente por Ti o por Ti y Fe presentan una forma esferoidal o, en cualquier caso, dimensiones homogéneas en las tres direcciones espaciales y entre aproximadamente 10 y 200 nm; en cambio, las nanopartículas de HA sustituida únicamente por Fe presentan una morfología de barra, con un eje principal que posee una longitud de entre aproximadamente 100 y 200 nm, y ejes secundarios que presentan una longitud de entre aproximadamente 20 y 30 nm.
- 35 **[0042]** La última etapa del proceso, la liofilización, se lleva a cabo empleando equipos y procesos que resultan conocidos en el campo.

**[0043]** La invención se describirá con mayor detalle mediante la siguiente parte experimental, que incluye la descripción de los métodos para llevar a cabo los ensayos de caracterización y ejemplos de producción de diversas formas de material compuesto de la invención y la medición de sus propiedades.

## 40 Métodos e instrumentos

### Análisis químico

15

20

25

45

[0044] El contenido de Ca, Ti, Fe y P en las muestras producidas se determinó empleando un espectrómetro de plasma acoplado inductivamente (ICP-OES Liberty 200, Varian, Clayton South, Australia), que utiliza longitudes de onda de 422,673 nm (Ca), 334,941 nm (Ti), 259,940 nm (Fe) y 213,618 nm (P). Las soluciones del análisis ICP se prepararon disolviendo 20 mg de muestra en una solución de HNO<sub>3</sub>/HCl diluida.

**[0045]** La cantidad de Fe<sup>2+</sup> se midió con un método colorimétrico basado en el uso de ortofenantrolina (1,10-fenantrolina, Merck, 99 % de pureza), descrito en el artículo "Intrinsic magnetism and hyperthermia in bioactive Fedoped hydroxyapatite", Tampieri A. *et al.*, (2012) Acta biomaterialia, 8(2), 843-851.

[0046] En pocas palabras, el método se basa en la detección a 510 nm mediante espectrofotometría UV-visible
(espectrómetro UV/VIS Lambda 35, Perkin Elmer) del complejo *redorange* [(C12H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>)<sub>3</sub>Fe]<sup>2+</sup> estable en el rango de pH de
4-5. Para la medición, se disolvieron 20 mg de polvo en 0,8 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (Aldrich, 96% de pureza en peso) tras comprobar que el ácido sulfúrico no altera la concentración del complejo Fe<sup>2+</sup> al menos en el tiempo necesario para realizar el análisis; a continuación, se añaden 10 ml de tampón de acetato de sodio (0,1 M, pH = 4) y, después, se añade el volumen de un 0,2 % en peso de solución de ortofenantrolina, que es necesaria para obtener una proporción molar nominal entre Fe<sup>2+</sup> y ortofenantrolina de 1:3. El volumen de la solución final se lleva a 50 ml con agua Millipore. La

55 molar nominal entre Fe<sup>2+</sup> y ortofenantrolina de 1:3. El volumen de la solución final se lleva a 50 ml con agua Millipore. La adición de ortofenantrolina se lleva a cabo inmediatamente después de la disolución de la muestra con ácido sulfúrico, y la solución se analiza 15 minutos después de añadir la ortofenantrolina.

[0047] La cantidad de Fe<sup>3+</sup> se determina como la diferencia entre la cantidad total de Fe (determinada mediante ICP) y la cantidad de Fe<sup>2+</sup> determinada mediante UV-VIS con el método descrito anteriormente.

#### Análisis difractométrico

[0048] La composición de la fase de cada muestra se determinó mediante difracción de rayos X (XRD) utilizando un 5 difractómetro D8 Advance (Bruker, Karlsruhe, Alemania) provisto de un detector ojo de lince (Lynx-eye) sensible a la posición utilizando radiación Cu K $\alpha$  ( $\lambda$  = 1,54178 Å) generada a 40 kV y 40 mA. Los espectros XRD se registraron en el rango 20 10-80° con una etapa (20) de 0,04° y un tiempo de recuento de 0,5 segundos. En caso de una evaluación cuantitativa de las composiciones de fase y los parámetros de celda, se utilizó una etapa de 0,02°.

#### Análisis SEM

10 [0049] La morfología de las muestras se analizó utilizando un microscopio electrónico de barrido (SEM, FEI Quanta 200, Eindhoven, Países Bajos) y la composición elemental se evaluó mediante espectroscopia por dispersión de energía de rayos X (EDX). Las muestras se montaron sobre soportes hechos de aluminio con cinta de carbono. Para las medidas de EDX, se utilizó un voltaje de aceleración de 10/12 kV y una distancia de trabajo de 10 mm.

#### Análisis termogravimétrico

[0050] El contenido de carbonato se evaluó en muestras secas mediante análisis termogravimétrico (TGA) utilizando un 15 instrumento Stanton STA 1500 (Stanton, Londres, R. Unido). Para cada ensayo, se pesaron aproximadamente 10 mg de apatita en un crisol de platino y se calentaron desde la temperatura ambiente hasta 1100 °C con flujo de nitrógeno, con una velocidad de calentamiento de 10 °C/min y utilizando alúmina como patrón de referencia. El contenido de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> se evaluó en función de la pérdida de peso observada entre 550 y 950 °C (un rango que es relevante para la 20 descomposición de carbonatos de HA, según se describe en el artículo "The cooperative effect of size and crystallinity degree on the resorption of biomimetic hydroxyapatite for soft tissue augmentation", lafisco, M. et al., (2010), The International journal of artificial organs, 33 (11), 765-774).

#### Absorción y reflexión UV-Vis

[0051] Los espectros de absorbancia UV-Vis de las muestras se obtuvieron suspendiendo 5 mg de polvo en 5 ml de 25 aqua Millipore, tras lo cual se midió la solución con un espectrofotómetro UV-VIS (LAMBDA 35, Perkin Elmer). Para determinar los espectros de reflectancia, el espectrofotómetro estaba provisto de una esfera integradora (Labsphere RSA-PE-20). En pocas palabras, se introdujeron aproximadamente 50 mg de polvo de la muestra en un soporte de muestras que, a continuación, se colocó en la ranura de la esfera integradora. El equipo se calibró con un estándar Spectralon (Labsphere SRS-99-010), y los espectros de reflectancia se recogieron en el rango de longitud de onda de 280-800 nm.

30

#### Determinación de potencial zeta y tamaño de las partículas

[0052] El tamaño y el potencial ζ de las muestras se midieron mediante dispersión dinámica de luz (DLS) utilizando un instrumento Zetasizer Nano ZS (Malvern, Worcestershire, R. Unido). Las muestras se suspendieron en agua a una concentración de 0,1 mg/ml.

[0053] Se utilizaron cubetas de cuarzo de pequeño volumen (105.251 -QS: Hellma, Müllheim, Alemania) para medir la 35 distribución de tamaño. Cada medición consistió en ensayos de 30 segundos cada uno, y se tomaron cuatro mediciones para cada muestra. El índice de polidispersidad (PDI) de las muestras también se calcula a partir de los resultados de estas mediciones.

[0054] El potencial  $\zeta$  se determinó como movilidad electroforética mediante velocimetría Doppler de láser utilizando 40 celdas de electroforesis desechables (DTS1061; Malvern, Worcestershire, R. Unido). Se realizaron 20 ensayos de 3 s cada uno para cada medición.

#### Abreviaturas

[0055] En los ejemplos que se indican a continuación, se utilizan las siguientes abreviaturas:

HA: Hidroxiapatita

45 Ti(iOPr)<sub>4</sub>: Tetraisopropilato de titanio

FeHA: Hidroxiapatita parcialmente sustituida por hierro

TiHA: Hidroxiapatita parcialmente sustituida por titanio

FeTiHA: Hidroxiapatita parcialmente sustituida por hierro y titanio

#### **EJEMPLO 1**

[0056] Este ejemplo se refiere a la preparación de una composición de gelatina biomineralizada con nanopartículas de 50 TiHA.

[0057] Se diluveron 3.32 gramos de gelatina de piel de cerdo (Italgelatine) en 83 ml de agua Millipore a 45 °C para obtener un 4% en peso de solución de gelatina. A esta solución se le añadieron 3,46 g de ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 85 %

en peso de solución acuosa), diluidos en 30 ml de agua Millipore. Se preparó una solución de Ti(iOPr)<sub>4</sub> por separado mezclando 2,20 g del compuesto con 15 ml de isopropanol (pureza > 99,7 %). La solución de ácido fosfórico/gelatina y la solución de Ti(iOPr)<sub>4</sub> se añadieron gota a gota a una suspensión obtenida dispersando 3,90 g de Ca(OH)<sub>2</sub> (97 % de pureza) en 100 ml de agua Millipore a 45 °C.

5 [0058] Se dejó reaccionar la mezcla resultante en agitación durante 2 horas a 45 °C y, a continuación, en reposo a temperatura ambiente durante 2 horas más. La fracción sólida resultante se extrajo mediante centrifugación y se lavó repetidamente con agua. Al final, la muestra obtenida de este modo se llevó a -40 °C y se liofilizó. Esta muestra se denominó Gel-TiHA. Las fotomicrografías SEM identificadas como C y D en la figura 1 muestran, con dos aumentos distintos, las partículas de esta muestra; como se puede observar en las imágenes, la muestra Gel-TiHA consiste en partículas con dimensiones similares en las tres direcciones espaciales, de entre aproximadamente 100 y 200 nm.

## EJEMPLO 2

**[0059]** Este ejemplo se refiere a la preparación de una composición de gelatina biomineralizada con nanopartículas de FeHA.

- [0060] Se siguió un proceso similar al del ejemplo 1 para la mineralización de gelatina con FeHA. En resumen, se mezclaron 4,2 g de ácido fosfórico con 100 ml de una solución de gelatina de piel de cerdo a un 4 % en peso. Se prepararon dos soluciones de sales de hierro por separado añadiendo 1,25 g de FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (pureza > 99,0 %) y 1,74 g de FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O (pureza > 99,0 %) a 8 ml de agua Millipore, respectivamente, para cada una. Por último, se prepará una suspensión de precursor de calcio mezclando 4,72 g de Ca(OH)<sub>2</sub> con 100 ml de agua Millipore a 45 °C. Las dos soluciones de sales de hierro se vertieron simultáneamente en la suspensión de Ca(OH)<sub>2</sub> y la solución de ácido
- fosfórico/gelatina se añadió gota a gota inmediatamente después. Al final de la reacción de neutralización, la muestra sólida resultante se recuperó mediante centrifugación, se lavó repetidamente con agua, se llevó a -40 °C y se liofilizó. Esta muestra se denominó Gel-FeHA. Las fotomicrografías SEM identificadas como E y F en la figura 1 muestran, con dos aumentos distintos, las partículas de esta muestra; como se puede observar en las imágenes, la muestra Gel-FeHA consiste en partículas con morfología similar a una aguja, con un eje principal que presenta una longitud de entre
- aproximadamente 100 y 200 nm, y ejes secundarios que presentan una longitud de entre aproximadamente 20 y 30 nm.

## EJEMPLO 3

**[0061]** Este ejemplo se refiere a la preparación de una composición de gelatina biomineralizada con nanopartículas de FeTiHA.

- [0062] Para la mineralización de gelatina con FeTiHA, se combinaron los dos procesos descritos para obtener Gel-TiHA y Gel-FeHA. En resumen, se mezclaron 4,2 g de ácido fosfórico con 30 ml de agua Millipore y, después, con 125 ml de una solución de gelatina de piel de cerdo a un 4 % en peso. La solución del precursor de titanio se obtuvo mezclando 3,15 g de Ti(iOPr)<sub>4</sub> con 15 ml de isopropanol. La suspensión del precursor de calcio se preparó añadiendo 4,72 g de Ca(OH)<sub>2</sub> a 100 ml de agua Millipore a 45 °C. Se prepararon dos soluciones de precursores de hierro disolviendo 1,2 g de FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O y 1,65 g de FeCl<sub>6</sub>·6H<sub>2</sub>O en 8 ml de agua Millipore, respectivamente, para cada una. Las dos soluciones
- 35 de precursores de hierro se vertieron en la solución del precursor de calcio, y las dos soluciones de ácido fosfórico/gelatina y Ti(iOPr)<sub>4</sub> se añadieron gota a gota a la mezcla obtenida de este modo inmediatamente después. Al final de la reacción de neutralización, la muestra sólida resultante se recuperó mediante centrifugación, se lavó repetidamente con agua, se llevó a -40 °C y se liofilizó. Esta muestra se denominó Gel-FeTiHA. Las fotomicrografías SEM identificadas como A y B en la figura 1 muestran, con dos aumentos distintos, las partículas de esta muestra; como
- 40 se puede observar en las imágenes, la muestra Gel-FeTiHA consiste en partículas con morfología y dimensiones similares a las de la muestra Gel-TiHA.

## EJEMPLO 4

[0063] Se llevaron a cabo análisis termogravimétricos e ICP en las muestras preparadas en los ejemplos 1-3 para determinar la composición química de las mismas.

45 **[0064]** Los análisis termogravimétricos determinan la composición de las muestras en términos de % en peso de agua, gelatina y fracción mineral. Los contenidos de agua y gelatina se calcularon mediante las pérdidas de peso, que se producen en el rango de 25-110 °C y 120-1000 °C, respectivamente, atribuyendo la masa residual a la HA sustituida. Los resultados de estos análisis se exponen en la Tabla 1.

Componente	<b>Gel-TiHA</b> (% en peso de componentes)	<b>Gel-FeHA</b> (% en peso de componentes)	Gel-FeTiHA (% en peso de componentes)
HA	73,61	81,68	77,52
Gelatina	20,93	13,82	17,21
Agua	2,16	2,26	2,50

Tabla 1

**[0065]** Los valores de cantidades de agua fueron muy similares en las tres muestras; las cantidades de gelatina y HA, en cambio, mostraron mayores variaciones en las distintas muestras.

**[0066]** La composición química de la parte mineral (HA sustituida) se midió con el análisis cuantitativo ICP en términos de relaciones atómicas entre los diversos elementos; los resultados del ensayo se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2

•

15

	Ca/P	Fe/Ca	Ti/Ca	(Ca+Fe)/P	Ca/(P+Ti)	Fe <sup>2+</sup> /Fe <sup>3+</sup>
Gel-TiHA	1,90 ± 0,2	/	0,15 ± 0,03	/	1,48 ± 0,10	/
Gel-FeHA	1,33 ± 0,1	0,33 ± 0,08	/	1,77 ± 0,13	/	1:1
Gel-FeTiHA	1,35 ± 0,1	0,21 ± 0,05	0,21 ± 0,05	1,63 ± 0,05	1,05	1:1

[0067] En general, todas las muestras presentan un valor de relación atómica Ca/P muy distinto con respecto a la HA pura (relación teórica 1,67): los valores de esta relación son inferiores a los teóricos y similares en las muestras Gel-FeHA y Gel-FeTiHA (1,33 y 1,35, respectivamente), mientras que el de la muestra Gel-TiHA, 1,90, es significativamente mayor que el teórico.

10 **[0068]** La relación atómica Ti/Ca de la muestra Gel-TiHA está en consonancia con la cantidad de titanio introducida nominalmente durante su preparación, mientras que la relación atómica Ca/(P+Ti) se desvía de la relación Ca/P de HA estequiométrica.

**[0069]** En la muestra Gel-FeTiHA, la relación atómica Ti/Ca (0,21) es mayor que la de la muestra Gel-TiHA, e incluso mayor que la que se puede derivar de la cantidad nominal de titanio introducida durante la síntesis (15 % en moles con respecto a Ca). Además, se midió una relación atómica Ca/(P+Ti) muy baja en esta muestra, igual a 1,05; esta se puede atribuir a la sustitución de Ca por iones de Fe, tal como confirma la relación atómica (Ca+Fe)/P de 1,62, un valor cercano al de la HA estequiométrica. Estos datos sugieren la presencia de una fase secundaria de TiO<sub>2</sub>.

[0070] Por último, la muestra Gel-FeHA presenta un mayor contenido relativo de Fe con respecto a Gel-FeTiHA: la relación atómica Fe/Ca en las dos muestras es de 0,33 y 0,21, respectivamente. Por consiguiente, también los valores de la relación atómica (Ca+Fe)/P son mayores en Gel-FeHA (1,77) que en Gel-FeTiHA (1,63). En cambio, la relación Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup> para ambas muestras está en plena conformidad con las cantidades de los dos iones introducidos nominalmente durante la síntesis.

#### EJEMPLO 5

- [0071] Los análisis de difracción de rayos X en polvo (XRD) se llevaron a cabo en las tres muestras preparadas en los ejemplos 1-3. Los tres espectros se muestran en la figura 2 escalonados mutuamente a lo largo del eje vertical para distinguirlos: el espectro asociado a la muestra Gel-FeTiHA es el inferior de la figura, el asociado a Gel-TiHA es el del medio y el asociado a Gel-FeHA se encuentra en la parte superior de la figura.
- [0072] Los perfiles de XRD muestran, para las tres muestras, solo la presencia de una fase cristalina que se puede identificar como HA: las posiciones de los picos corresponden a datos de la literatura atribuibles (mediante índices de Miller, que se muestran en la figura) a este compuesto. No se identifica ninguna fase cristalina secundaria; en función de esta observación, se puede concluir que la fase TiO<sub>2</sub>, cuya presencia se deduce a partir de los análisis químicos del ejemplo 4, es amorfa. Naturalmente, no se detectaron picos de difracción atribuibles a la gelatina, ya que se trata de un polímero orgánico amorfo.
- [0073] Todos los picos de los tres difractogramas están mal resueltos, con una baja intensidad relativa con respecto al fondo y una baja relación entre altura y anchura a la mitad de la altura, especialmente en el caso de Gel-FeTiHA. Estas características de los picos indican un bajo grado de cristalinidad del material. Esto se puede atribuir a diversos factores. En primer lugar, la baja temperatura de biomineralización no permite una reorganización atómica en favor de estructuras más cristalinas, que son termodinámicamente más estables. Un segundo factor es la presencia de la gelatina: los polímeros orgánicos amorfos pueden dirigir el proceso de mineralización hacia fases de baja cristalinidad, como se conoce en la técnica. Por último, la presencia de iones de hierro y/o titanio durante la biomineralización, en la que se
- 40 conoce en la tecnica. Por ultimo, la presencia de iones de hierro y/o titanio durante la biomineralización, en la que se forma la red cristalina, tiene el efecto de distorsionar la propia red, dando como resultado, por lo tanto, un aumento de las zonas desordenadas y provocando la formación de HA escasamente cristalina.

## EJEMPLO 6

[0074] Los valores de diámetro hidrodinámico (Hd), índice de polidispersidad (PDI) y potencial ζ de las muestras
preparadas en los ejemplos 1-3 se midieron utilizando los instrumentos y métodos anteriormente descritos.

[0075] Los resultados se indican en la Tabla 3.

Muestra	Hd (nm)	PDI	Potencial ζ (mV)
Gel-TiHA	531,3 ± 7,9	0,17 ± 0,05	3,12 ± 0,2
Gel-FeHA	552,0 ± 34,7	0,47 ± 0,03	- 15,1 ± 1,4
Gel-FeTiHA	421,9 ± 19,4	0,10 ± 0,06	$-10,4 \pm 0,7$

Tabla 3

[0076] Los valores Hd registrados mediante difracción de la luz son mucho más altos que los medidos mediante análisis SEM; estos valores son cientos de nanómetros para cada muestra, con valores similares para Gel-TiHA y Gel-FeHA (531,3 nm y 552,0 nm, respectivamente), y solo ligeramente inferiores para Gel-FeTiHA (421,9 nm). Esta diferencia se debe al hecho de que, para el análisis SEM, las muestras se suspendieron en etanol y se secaron por medio de una lámpara de infrarrojos sobre matriz de alúmina, mientras que, para el análisis DLS, fue necesario preparar una suspensión. En este sentido, mientras que con el SEM era posible determinar el tamaño de las únicas partículas secas, el resultado obtenido con el análisis DLS determina el tamaño de las partículas en el medio acuoso, proporcionando información adicional sobre el comportamiento de las partículas de gelatina mineralizadas en agua. Como es bien sabido en la literatura, las partículas nanométricas tienden a acumularse cuando están suspendidas en medios acuosos, de manera que los valores obtenidos a partir del DLS no están asociados a partículas únicas, sino a agregados de estas.

## **EJEMPLO 7**

5

10

[0077] Las propiedades de reflexión y absorción de luz UV-Vis de la composición de la invención se midieron utilizando los instrumentos y métodos descritos anteriormente. Los resultados se muestran en la figura 3. La figura 3.A muestra los 15 espectros de reflectancia de las muestras, en términos de porcentaje de radiación reflejada en función de la longitud de onda; los espectros de absorbancia se muestran en la figura 3.B, en unidades arbitrarias (u.a.), en función de la longitud de onda.

[0078] Los perfiles de reflectancia de Gel-FeHA y Gel-FeTiHA son similares entre sí, con una capacidad de reflectancia 20 relativamente baja (aproximadamente un 20 %) en longitudes de onda en el rango de 280-500 nm, seguida de un incremento gradual hasta alcanzar un 60 % de la luz reflejada alrededor de 650 nm de longitud de onda. Por otro lado, el perfil de reflectancia de Gel-TiHA es muy distinto, con una zona de reflectancia media entre 280 y 320 nm, seguida de un aumento rápido hasta alcanzar la reflectancia máxima (90 %) a aproximadamente 350 nm; tras este pico, la reflectancia se reduce lentamente, aunque nunca desciende por debajo de los valores de aproximadamente el 65 % (a 25 800 nm).

[0079] En lo que respecta también al comportamiento de la absorción, Gel-FeHA y Gel-FeTiHA presentan perfiles similares, con valores máximos registrados a 280 nm, seguidos por un punto de inflexión a aproximadamente 360 nm y, a continuación, una rápida reducción hasta aproximadamente 400 nm, tras lo cual el valor de absorción permanece fundamentalmente constante a lo largo del campo visible. Por otra parte, la muestra Gel-TiHA, a través del rango de medición completo, muestra niveles bajos de absorción, con un perfil que disminuye de un modo casi lineal con el aumento de la longitud de onda.

[0080] Estos resultados demuestran que Gel-TiHA posee excelentes propiedades de reflectancia en el rango UVA (reflectancia máxima a 350 nm) y puede reflejar la radiación también en el rango UVB (valores de reflectancia nunca inferiores al 65 %). En cambio, Gel-FeHA y Gel-FeTiHA presentan buenas propiedades de absorción en el rango UVB. Estas propiedades implican que Gel-TiHA es un filtro físico, eficaz para una composición de filtro solar, mientras que Gel-FeHA y Gel-FeTiHA se pueden utilizar en combinación con el primero para ampliar y aumentar el rango de protección y la eficacia protectora de los filtros solares en el rango UVB.

35

30

#### REIVINDICACIONES

1. Composición para la preparación de filtros solares físicos, comprendiendo una matriz orgánica formada por moléculas de polímero, en las que se enlazan nanopartículas de hidroxiapatita sustituida por iones de titanio y/o hierro, en la que el fósforo está parcialmente sustituido por titanio en una cantidad de entre un 8 y un 50 % atómica con respecto al fósforo,

y/o en la que el calcio está parcialmente sustituido por hierro en una cantidad de entre un 2 y un 40 % atómica con 5 respecto al calcio, y donde la cantidad de la matriz orgánica es de entre un 5 y un 60 % en peso y la cantidad de hidroxiapatita sustituida es de entre un 35 y un 90 % en peso, estando constituida la parte restante por agua.

2. Composición de acuerdo con la reivindicación 1, donde el compuesto que constituye la matriz orgánica se selecciona de entre ácido poliláctico, colágeno, alginato de sodio, polietilenglicoles (PEG), quitosano, partículas sólidas de lípidos (SLP) y gelatinas.

10

30

35

3. Composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, donde dichas partículas de hidroxiapatita tienen un tamaño de entre 10 y 200 nm.

4. Proceso para la preparación de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende las etapas de:

a) preparar una solución acuosa que contiene un precursor de calcio y de al menos una sal de hierro (II) y al menos 15 una sal de hierro (III);

b) preparar una solución hidroalcohólica de un precursor de titanio;

c) preparar una solución acuosa, conteniendo el constituyente de la matriz orgánica, de un compuesto de fósforo soluble en agua;

20 d) añadir lenta y simultáneamente las soluciones de los precursores de titanio y de compuesto de fósforo/matriz orgánica a la solución que contiene el precursor de calcio;

e) permitir que el sistema reaccione a una temperatura comprendida entre la temperatura ambiente y 70 °C durante un tiempo de entre 1 y 5 horas; y

f) someter a un tratamiento de liofilización al producto obtenido como resultado de la etapa e),

25 donde las nanopartículas de hidroxiapatita sustituida por iones de titanio y/o hierro se generan directamente en las moléculas de polímero de la matriz orgánica durante el proceso.

5. Proceso de acuerdo con la reivindicación 4 donde, en la solución de la etapa a), se utilizan, como precursor de calcio, una sal de este o el hidróxido (Ca(OH) 2), y donde el ion de calcio presenta una concentración de entre 50 y 150 mg/ml, y los precursores de hierro se emplean en la proporción molar 1:1 con una concentración global de iones de hierro de entre 10 y 45 mg/ml.

6. Proceso de acuerdo con la reivindicación 5, donde el precursor de calcio es Ca(OH) 2 y en el que los precursores de hierro (II) y hierro (III) son sus cloruros, respectivamente, FeCl 2·4H 2O y FeCl 3·6H 2O.

7. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6 donde, en la solución de la etapa b), como precursor de titanio, se emplea el isopropóxido (Ti(-O-CH(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>)<sub>4</sub>) y la solución presenta una concentración de entre 12 y 100 mg/ml de titanio.

8. Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7 donde, en la solución de la etapa c), como precursor de fósforo, se utiliza una sal de este o un ácido fosfórico, y la solución presenta una concentración de entre 75 y 110 mg/ml de fósforo.

9. Uso de una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 para la preparación de un filtro solar 40 de tipo físico.





Fig. 1 (continuará)





# Fig. 1 (continuará)





Fig. 1

Fig. 2





Fig. 3 (continuará)



Fig. 3