

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de publicación internacional
WO 2019/232656 A1

(43) Fecha de publicación internacional
12 de diciembre de 2019 (12.12.2019) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación internacional de patentes:
A61K 47/36 (2006.01) *A61B 17/08* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/CL2018/050042

Declaraciones según la Regla 4.17:

- sobre la identidad del inventor (Regla 4.17(i))
- sobre el derecho del solicitante para solicitar y que le sea concedida una patente (Regla 4.17(ii))
- sobre la calidad de inventor (Regla 4.17(iv))

(22) Fecha de presentación internacional:
07 de junio de 2018 (07.06.2018)

(25) Idioma de presentación: español

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- en blanco y negro; la solicitud internacional se presentó en colores o en escala de grises y puede descargarse de PATENTSCOPE.

(26) Idioma de publicación: español

(71) Solicitante: **CARDENAS Y CIA LTDA** [CL/CL]; Avenida Golfo de Arauco 3666. Parque Industrial. Coronel, Concepción, 4190046 (CL).

(72) Inventor: **CÁRDENAS TRIVIÑO, Galo**; Avenida Golfo de Arauco 3666. Parque Industrial. Coronel, Concepción, 4190046 (CL).

(74) Mandatario: **SILVA ABOGADOS & COMPAÑIA LIMITADA**; Hundaya 60. Piso 4. Las Condes, Santiago, 7550188 (CL).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI,

(54) Title: CHITOSAN GELS (A) CONTAINING METAL NANOPARTICLES OF COPPER, SILVER AND ANTIBIOTICS (CIPROFLOXACIN, CEFOTAXIME, GENTAMICIN AND CLOXACILLIN)

(54) Título: GELES DE QUITOSANO(A) CONTENIENDO NANOPARTICULAS METALICAS DE COBRE, PLATA Y ANTIBIOTICOS (CIPROFLOXACINO, CEFOTAXIME, GENTAMICINA Y CLOXACILINA)

(57) Abstract: The invention relates to chitosan gels (poly-beta-glucosamine) with bactericide and fungicide properties in a mixture with nanoparticles of copper and/or silver and/or antibiotics (ciprofloxacin, cloxacillin, gentamicin and cefotaxime and in mixtures of ciprofloxacin and cloxacillin, gentamicin and cefotaxime), as well as the production method and uses thereof.

(57) Resumen: En la presente invención se describen geles de quitosano (poli-beta-glucosamina) con propiedades bactericidas y fungicidas en mezcla con nanopartículas de cobre y/o plata y/o antibióticos (ciprofloxacino, cloxacilina, gentamicina y cefotaxime) y en mezclas de ciprofloxacino más cloxacilina, gentamicina más cefotaxime), el proceso de obtención y usos de los mismos.



WO 2019/232656 A1

**GELES DE QUITOSANO(A) CONTENIENDO NANOPARTICULAS METALICAS
DE COBRE, PLATA Y ANTIBIOTICOS (CIPROFLOXACINO, CEFOTAXIME,
GENTAMICINA Y CLOXACILINA)**

5 CAMPO DE APLICACIÓN

El campo de aplicación corresponde a medicina y biotecnología, más específicamente el tratamiento de infecciones cutáneas, especialmente bacterianas y fúngicas como úlceras neuropáticas o pie diabético, útiles además en heridas que requieran restauración de tejidos epidérmicos, dérmicos, neovascularización y neoangiogénesis
10 histopatológica.

ANTECEDENTES PREVIOS

Existe un problema a nivel salud en Centros asistenciales para el tratamiento de infecciones cutáneas (úlceras neuropáticas, píe diabético y otras) provocadas por
15 bacterias.

La piel cubre la superficie del cuerpo, formando una barrera protectora contra la acción de agentes químicos, microbianos o físicos sobre tejidos más profundos.

La piel es un tejido esencial en el control de la estabilidad del medio, está formado por dos capas de tejidos: una epidermis, superficial, y una dermis, profunda. La epidermis
20 es un tejido epitelial pluriestratificado de células originadas en el denominado estrato basal o germinativo, denominado también Capa de Malpighi, formada por células vivas que se reproducen continuamente, desplazando las células más jóvenes a las viejas, que mueren y se cargan de una proteína llamada queratina, y acaban desprendiéndose. La capa interna es la dermis, un tejido conjuntivo muy vascularizado
25 y que contiene varios tipos de receptores sensoriales, como los del sentido del tacto, temperatura y dolor. Se continúa con las membranas mucosas de los distintos canales. Está constituida por una red de colágeno y de fibras elásticas, capilares sanguíneos, nervio, lóbulos grasos y la base de los folículos pilosos y de las glándulas sudoríparas.

La piel realiza una función importante en el mantenimiento de la temperatura corporal gracias a la acción de las glándulas sudoríparas y de los capilares sanguíneos. Es decir, es fundamental en la homeostasis del organismo.

5 Este importante órgano, uno de los de mayor tamaño en el organismo (1,5 – 2,4 m²), está expuesto a muchas heridas que se traducen en problemas de continuidad o francas pérdidas de sustancia. Adicionalmente, la superficie abierta permite la invasión microbiana. Como resultado, la mayoría de las muertes ocurren la primera semana producto del shock (1,2).

10 El enfermo es hospitalizado para el manejo de la etapa aguda y subaguda de la lesión dérmica. Dependiendo de la gravedad del paciente o si además presenta alguna patología de base (epilepsia, alcoholismo, desórdenes psiquiátricos, diabetes, etc.) es internado para el tratamiento con altos costos en el sistema de salud y con una recuperación muy lenta.

Pie Diabético

15 Las infecciones asociadas al pie diabético se subdividen en dos grupos, superficiales y profundas. Las infecciones superficiales se presentan como celulitis localizada, pero el espectro de infecciones puede llegar a fasciitis necrotizante en las infecciones profundas. Los microorganismos involucrados en estas infecciones incluyen *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*,
20 *Acinetobacter baumannii*, enterobacterias y bacterias anaerobias estrictas. También se ha informado aislamiento de *Stenotrophomonas maltophilia* y *S. aureus* meticilino-resistente como agente etiológico en pacientes hospitalizados.

25 La diabetes mellitus en la mayor parte del mundo occidental y en países de desarrollo intermedio ha adquirido características epidémicas, redundando en una serie de complicaciones crónicas que incluyen entre otras cardiopatías coronaria, retinopatía diabética, neuropatía diabética, nefropatía diabética, aterosclerosis y compromiso neurovascular de extremidades que conlleva a la producción de lesiones en el pie con formación de úlceras de difícil manejo

30 Dado entre otros por deformidad anatómica, evidente alteración de macro y micro circulación, neuropatía que facilita el aumento del daño de piel y tejidos blandos sin

que el paciente necesariamente se percate de esta situación. Esto se conoce como pie diabético.

Todas estas complicaciones se asocian a una importante morbilidad y mortalidad que encarece el cuidado de estos pacientes en todo el mundo.

- 5 El pie diabético corresponde a una complicación tardía en la historia natural de la diabetes mellitus, produciéndose dada la destrucción de la barrera cutánea compromiso infeccioso de piel, partes blandas, fascias, tendones y finalmente hueso. Del punto de vista microbiológico estas infecciones cuando son superficiales son producidas típicamente por cepas de *Staphylococcus spp.* y *Streptococcus spp.*, sin embargo, a medida que progresan y se hacen más profunda son típicamente polimicrobianas y mixtas.

15 El manejo habitual de estos enfermos requiere un enfoque multidisciplinario dado fundamentalmente por cirugía vascular, quien intentará sobre la base del estudio angiográfico la estrategia de realizar cirugías de revascularización en la zona afectada, tratando de limitar al máximo la realización de cirugías de amputación; el endocrinólogo que intentará compensar del punto de vista metabólico al paciente y el infectólogo que adecuará la terapia antimicrobiana de acuerdo a las características propias del paciente, profundidad de la lesión, aislados microbiológicos y contexto epidemiológico.

20 En general un número muy importante de pacientes requerirá cirugías con amputación de extremidades a distintos niveles, redundando en importantes limitaciones en la calidad de vida del paciente; por otra parte la selección de la terapia antimicrobiana se ve fuertemente limitada por la mala vascularización del tejido y la creciente descripción de bacterias resistentes a los antibióticos.

25 En este sentido se explica que en el pie diabético se estén intentado alternativas terapéuticas distintas a las tradicionales en su manejo que incluyen el uso de formas larvales de insectos tratadas biológicamente que remueven el tejido necrótico de este tipo de lesiones, cámara hiperbárica para aumentar la oferta de oxígeno y facilitar la destrucción de bacterias anaerobias, entre otros.

Por lo anterior cualquier estrategia que intente facilitar la erradicación bacteriana por un lado y/o facilitar la regeneración del tejido fuertemente desvitalizado requiere una investigación acuciosa para establecer un posible rol coadyuvante en el tratamiento de este tipo de patología.

- 5 Los problemas de pie están presentes en más del 15% de los diabéticos. El pie diabético es la complicación que mayor número de hospitalizaciones motiva en la población diabética, siendo reconocida además como la principal causa de hospitalización prolongada en las salas de medicina y cirugía general. Se presenta tanto en la diabetes tipo 1 como en la tipo 2, con una prevalencia de un 5,3% a un
- 10 10,5%. El diabético presenta un riesgo acumulado de ulceración de un 15% durante su vida (3). El pie diabético corresponde a la primera causa de amputaciones mayores de origen no traumático, presentando los diabéticos un riesgo 10 veces mayor respecto a la población general de requerir una amputación, con tasas que alcanzan a 2,8% del total de los diabéticos.
- 15 La frecuencia internacional reconocida en países desarrollados respecto de la ulceración en pie diabético corresponde a un acumulado de 5,8% a 3 años, requiriéndose una amputación en el 15% de éste.

Aproximadamente el 15% de todos los pacientes con diabetes mellitus desarrollará una úlcera en el pie o en la pierna durante el transcurso de su enfermedad. La

20 magnitud de las cifras se pone de manifiesto por el hecho de que más del 25% de los ingresos hospitalarios de los diabéticos en USA y Gran Bretaña están relacionados con problemas en sus pies. En términos económicos, en el primer país citado, este problema ocasiona un costo anual próximo al billón de dólares.

Úlceras Venosas

- 25 Las úlceras venosas son una de las enfermedades de mayor prevalencia en adultos mayores, principalmente hipertensos y diabéticos, son heridas complejas que en vez de cicatrizar se convierten en lesiones permanentes en las extremidades inferiores, y que sólo con el uso de apósitos de última generación, sistemas de elasto compresión y tratamiento farmacológico, pueden sanarse en breve plazo mejorando la calidad de
- 30 quienes las padecen.

Las úlceras por hipertensión venosa constituyen el mayor porcentaje (entre el 75% y el 90%) de entre el total de las úlceras vasculares. Por su alta incidencia (entre el 2% y el 3% de la población) sus cuidados, constituyen según algunos estudios el 50% del tiempo total de enfermería en atención primaria.

- 5 La cronicidad y la reincidencia son sus características clínicas más relevantes, la mitad permanecen abiertas por encima de los nueve meses, un 20% lo están hasta los dos años, y un 10% hasta los cinco, reapareciendo un tercio de la inicialmente cicatrizadas dentro de los doce meses siguientes a su curación.

Úlceras Arteriales

- 10 Se pueden definir como aquellas que son consecuencia de un déficit de aporte sanguíneo en la extremidad afectada secundario a una arteriopatía generalmente crónica. También se las conoce como "isquémicas".

- 15 Suelen tener una evolución crónica, con mal pronóstico debido a la poca respuesta terapéutica y a los procesos sistémicos concomitantes en los enfermos, además de un alto riesgo de infección.

El tratamiento es complejo al ser origen del problema una oclusión arterial y mientras no se restaure la circulación difícilmente curará, por lo que la mejor actitud es la prevención.

- 20 Según diversos estudios suponen entre el 10% y el 25% de todas las úlceras vasculares, afectando mayormente a hombres mayores de 50 años, con arteriopatía periférica ocluyente. La diabetes y sobre todo el tabaquismo se consideran factores de alto riesgo para su aparición.

- 25 Su localización preferente en zonas dístales o en la cara antero-externa de la pierna, sobre prominencias óseas, puntos sometidos a presión en los pies, punta de dedos, zonas interdigitales, talón, cabezas de metatarsianos, entre otros.

Como otras causas de úlcera arterial se observan la macro y microangiopatía diabética, la tromboangiitis ocluyente (enfermedad de Buerger), la isquemia hipertensiva o las embolias arteriales agudas.

Debido a que no existe un producto que permita la recuperación de este tipo de heridas, es por esto que resulta pertinente la elaboración de un gel que controle la infección y permita una recuperación de heridas causadas por esta enfermedad.

Actividad del Quitosano sobre tejido celular

- 5 Se ha demostrado que el quitosano puede integrarse a nivel de células animales y microbianas. Esta propiedad del quitosano puede llevar a una variedad de aplicaciones biomédicas tales como favorecer la coagulación, bacteriostático y agente espermaticida (4).

Quitosano como agente Hemostático

- 10 El quitosano es un polication. Ya desde los años 50, los policationes se conocen que se unen a las células sanguíneas y son efectivos agentes aglutinantes. En los años 60, el quitosano fue investigado por sus habilidades aglutinantes. Se encontró que éste, aun a muy bajas concentraciones, tiene la habilidad de aglutinar las plaquetas. Esto lleva a considerarlo como agente pro coagulante (4). La aglutinación de
15 plaquetas por policationes es dependiente tanto de la estructura del polímero como de su peso molecular.

- Fuera de los seis policationes más comunes, solamente el quitosano es capaz de iniciar efectivamente la formación de un gel de sangre heparinizada. El quitosano con un peso molecular de 35.000 g/mol es capaz de producir un débil coágulo en sangre
20 heparinizada, mientras que el quitosano de peso molecular de 600.000 g/mol (4) produce un coágulo muy firme.

- Piel sintética. En la Universidad de Illinois (USA) se ha preparado piel sintética para cubrir pérdidas de sustancia tales como quemaduras y úlceras. Este revestimiento es una mezcla de tres biopolímeros: acetato de quitosano, sal de amonio de quercetina
25 (de lana de oveja) y acetato de colágeno (de cueros de vacuno). Nosotros preparamos Biopiel™ usando quitosano y ácidos grasos.

Suturas quirúrgicas: Quitina-quitosano en forma de fibras puede servir como suturas absorbibles de origen animal (5).

Aplicaciones oftalmológicas: Se han preparado lentes de contacto a partir de quitosano, los que son más biocompatibles que los obtenidos desde polímeros sintéticos. Son más moldeables y permeables al aire y absorbentes de agua (6).

5 Biomembranas artificiales para encapsular enzimas: El quitosano, un polímero catiónico, y el alginato, un polímero aniónico obtenido desde algas, interaccionan para formar una membrana insoluble en agua que se usa para encapsular insulina (7, 8).

En el campo de las membranas:

Wang y Spencer (9) informan estudios de membranas para ultrafiltración, en base a quitosano usando como substrato poroso dióxido de titanio.

10 Tomaszewska (10) informa de membranas de quitosano, con uso potencial en diálisis de riñón.

Otra aplicación industrial y biológica es la fabricación de hidrogeles. Hirano y Usutani (11), informan de hidrogeles preparados de soluciones acuosas que tienen utilidad en el área de la medicina, específicamente en el tratamiento de heridas.

15 Una propiedad importante de los polímeros en estudio es su solubilidad (12). Para la quitina los sistemas más utilizados son: (a) N,N-dimetilacetamida (DMAc) – 5% de LiCl y (b) N-metil-2-pirrolidona (NMP) – 5% de LiCl.

En cuanto a otras propiedades biológicas existen algunos ejemplos tales como:

20 Tokura y colaboradores (13) desarrollaron materiales biológicos en base a quitosano y derivados con propiedades antibacterianas y de biodegradabilidad.

Postieszny (14) reportó que el quitosano controla la transmisión del virus PSTV de la papa.

Staroniewicz y otros (15) estudiaron:

25 a) efecto bactericida sobre: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella Paratyphi B*.

b) efectos funguicida sobre: *Candida albicans*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Micorosporum canis*.

En todos los casos las especies fueron susceptibles al quitosano. Andrews ha determinado las concentraciones mínimas inhibitorias de diversas bacterias (16).

Quitosano en Cicatrización

La quitina (poli-N-acetil-glucosamina) se ha descrito que acelera el proceso de cicatrización disminuyendo el período de recuperación en algunos casos de lesiones por quemaduras.

Se ha aplicado quitina sobre suturas de origen natural como por ejemplo la seda y el catgut (submucosa intestinal) y su adición muestra un comportamiento con menos reacción inflamatoria tisular; lo mismo se observó al agregar quitina sobre apósitos de curaciones (17).

Quitosano en Tratamiento de heridas

El quitosano (poli-Beta-D-glucosamina), en cambio es un candidato muy atractivo para el tratamiento de heridas cruentas especialmente aquellas producidas por quemaduras. El mecanismo se explica de la siguiente manera: el quitosano puede formar láminas o películas biocompatibles y absorbentes. Su aplicación se puede hacer como film pre elaborado o una aplicación en estado líquido directamente sobre la lesión lo que formará la película. Esta película es permeable al oxígeno antagonizando positivamente la hipoxia de los tejidos afectados (18).

Por ser el pH ligeramente ácido, proporciona una sensación refrescante y anestésica.

Por último, al ser degradado por enzimas orgánicas no necesita ser retirado manualmente evitando maniobras dolorosas para el paciente.

Nanopartículas

La nanotecnología es una nueva rama de la ciencia especializada en estudiar y manipular a nivel atómico la materia. Este término fue acuñado por primera vez en una conferencia impartida el año 1959 por el físico estadounidense Richard Feynman (considerado el padre de la nanociencia), quién afirmó que los problemas del área de la física, química y biología podrían ser resueltos si fuésemos capaces de ver lo que estamos haciendo a nivel atómico, proponiendo así, fabricar productos en base a un reordenamiento de átomos y moléculas. Se presenta así por primera vez una nueva disciplina científica que promete en la era moderna: la "Nanotecnología". Desde

entonces, científicos de todo el mundo han observado el comportamiento de la materia en una escala nanométrica abriendo una perspectiva a nuevos conocimientos nunca antes explorados (19). En 1980 Eric Drexler, insinuó la posibilidad de crear sistemas de ingeniería a escala molecular, ya que él declaraba que:

- 5 “Todo tiene que ver con la forma en que están ordenados los átomos: “carbon y diamantes, arena vidrio, cáncer y tejido sano”; son ejemplos de pares de materiales constituidos por los mismos átomos, sin embargo, las variaciones en el orden de estos hacen la diferencia (20).

Las nanopartículas (NPs) son del orden del nanómetro, o milésima de micra, y el
10 número de átomos que las componen son del orden de centenas. En la actualidad, se han utilizado distintas técnicas experimentales que permiten el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación, caracterización y aplicación de NPs. Las nuevas propiedades físicas detectadas en diferentes tipos de NPs han despertado la curiosidad científica de posibles aplicaciones en la medicina, naciendo así un nuevo
15 concepto llamado “Nanomedicina”, que corresponde a una de las ramas más prometedoras dentro de los potenciales nuevos avances tecnológicos de esta área. Se podría aventurar una definición situándola como “rama de la nanotecnología que permitiría la posibilidad de curar enfermedades desde el interior del organismo, a nivel celular y/o molecular”.

20 Se considera que determinados campos pueden ser objeto de una auténtica revolución, especialmente: monitorización, reparación de tejidos, control de la evolución de enfermedades, defensa y mejora de los sistemas biológicos humanos, diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades, alivio del dolor, administración de medicamentos a células afectadas de forma selectiva, entre otras.
25 Todo ello constituiría nuevos avances tecnológicos en la salud, que la posicionarían en una nueva era científica y asistencial. La utilización de estas NPs con propiedades magnéticas puede tener una trascendental incidencia en fenómenos como la hipertermia y el transporte selectivo de fármacos, ambos de prometedor futuro en la terapia contra el cáncer, además de aplicaciones basadas en la endocitosis celular,
30 mediante la cual la célula capta e incorpora en su interior NPs magnéticas (NPMs) (21).

En la última década, se ha observado un crecimiento exponencial en el desarrollo y aprobación por parte de las autoridades reguladoras de medicamentos, nanosistemas terapéuticos híbridos y de transporte de fármacos con aplicación clínica en su mayoría como terapia oncológica. Estos nanosistemas terapéuticos incluyen por ejemplo:

5 liposomas, anticuerpos monoclonales e inmunoconjugados, NPs o polímeros terapéuticos como fármacos poliméricos o conjugados polímero-proteína. Estas nano construcciones a menudo multicomponentes pueden ser definidas como las primeras nanomedicinas con demostrado beneficio clínico, aunque en realidad este concepto no es completamente nuevo, ya que los inmuno conjugados, liposomas, NPs o los

10 conjugados poliméricos ya se conocían en los años 70, sin embargo, estaban consideradas como tecnologías individuales y competitivas. Los nanodispositivos son de 100 a 100.000 veces más pequeños que las células humanas. Como referencia, la cabeza de un alfiler mide un millón de nanómetros de ancho, un cabello humano cerca de 80.000 nanómetros de diámetro, mientras que una molécula de ADN es de 2 a 12

15 nanómetros de ancho.

En los últimos años, la plata ha ganado mucho interés debido a su buena conductividad, estabilidad química y su actividad catalítica y antibacteriana. Las AgNPs se están convirtiendo en una de las categorías de productos de mayor crecimiento en la industria de la nanotecnología, según un informe de investigación

20 de mercado realizado por Bourne (22). Su fuerte actividad antimicrobiana es la principal característica para el desarrollo de productos con AgNPs, actualmente, una amplia categoría de productos se encuentran disponibles en el mercado. En el ámbito médico, existen apósitos para heridas, dispositivos anticonceptivos, instrumental quirúrgico y prótesis óseas, todos ellos recubiertos o integrados con AgNPs para así

25 evitar el crecimiento bacteriano, Cheng et al. (23); Cohen et al., (24). Además, también se está evaluando la utilización de las AgNPs contra el tratamiento de enfermedades que requieren una concentración mantenida de fármaco en sangre o con un direccionamiento específico a células u órganos, Panyman y colab. (25), como ocurre con el virus del VIH-1, ya que ha sido demostrado que el tratamiento *in vitro* con AgNPs

30 interacciona con el virus e inhibe su capacidad para unirse a las células del huésped, Elechiguerra et al. (26). En la vida diaria los consumidores pueden tener contacto con las AgNPs contenidas en aerosoles, detergentes, frigoríficos, lavadoras, chupetes,

sistemas de purificación de aguas, pinturas para paredes y productos cosméticos, Zhang y Sun (27).

Las AgNPs también están incorporadas en la industria textil para la fabricación de prendas de vestir, ropa interior y calcetines, Lee y colab. (28). Mediante la introducción
5 de AgNPs en fibras sintéticas o naturales consiguen una potenciación de la actividad iónica gracias a la mayor cantidad de iones plata que son liberados. El resultado es la obtención de rápidos efectos antimicrobianos ó antiolor.

Geles

En la terapéutica actual son utilizadas con preferencia las formulaciones semi-sólidas
10 antibióticas en el tratamiento de las heridas, ya sean éstos provocados por daños térmicos, quirúrgicos u otros. El efecto de estos medicamentos radica en su actividad antimicrobiana, evitando o controlando las complicaciones sépticas, que se presentan como la causa principal que retarda el proceso normal de la cicatrización. Entre estos
15 agentes tópicos se encuentra la crema de sulfadiazina de plata, el ungüento de bacitracina, las soluciones de AgNO₃ al 0.5%, la nitrofurazona, etc. A pesar de la incidencia terapéutica de este grupo de medicamentos en la curación de estas afecciones, ninguno de ellos contribuye de forma directa en la reconstrucción tisular.

La solicitud AU2016335462 describe el uso de nanoparticulas cargadas con iones plata para tratar infecciones microbianas, sin aportar en la regeneración de tejidos y
20 sin considerar el uso de antibióticos.

Por lo anterior, de todas las aplicaciones posibles del quitosano, la biomédica es la más promisoría por los grandes efectos benéficos que tendría para la salud humana, y a muy bajo costo, destacando específicamente la actividad regeneradora de tejido
25 dañado. Esto sumado a la nanotecnología y a antimicrobianos, como iones metálicos y/o antibióticos, resolvería un problema técnico en el área de la medicina que afecta a millones de personas a nivel mundial.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA TÉCNICA

La presente solicitud describe la preparación de geles de uso tópico que contienen
30 una matriz de quitosano y nanopartículas cargadas con nanopartículas metálicas,

iones metálicos y/o antibióticos, componentes que le confieren a los geles propiedades regeneradoras de tejidos y antimicrobianas, útiles para su uso en la piel que presenta lesiones y/o infecciones bacterianas.

Método de Obtención

5 ETAPA 1: ELABORACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE FORMULACIONES DE LOS GELES

SINTESIS DE GELES

i) Elaboración de Geles de Quitosano

10 Las formulaciones se elaborarán de acuerdo a técnicas clásicas de la tecnología farmacéutica para la elaboración de formas farmacéuticas semisólidas.

Se utiliza un polímero de quitosano de grado de desacetilación superior a 90% y una masa molar entre 25,000 y 500.000 g/mol, el cual se obtiene por disolución a temperatura ambiente (15-25°C) en ácidos débiles orgánicos (acético, fórmico, láctico entre otros) hasta lograr una concentración entre 1 y 5% en masa.

15 ii) Obtención de quitosano mezclado con antibióticos.

A una matriz de quitosano se agrega uno o más antibióticos, en concentración de 0.1 a 5 % en masa y en relación 1:1 cuando hay una combinación de antibióticos, por el método de dispersión y agitación en atmósfera de nitrógeno gaseoso.

iii) Obtención de gel de quitosano dopado con nanopartículas metálicas.

20 a) Reacción de co-depositación. Este método involucra la co-deposición física de vapores metálicos con vapores orgánicos (2-etoxietanol) en Nitrógeno líquido, en un reactor de átomos metálicos; se introduce el metal a evaporar en un crisol de alúmina; se introduce el magneto y el quitosano sólido en el fondo del reactor; se conecta el matraz con el solvente a utilizar (2-etoxietanol) y todo el sistema se
25 evacua hasta alcanzar un alto vacío de 10^{-5} bar. Luego se sumerge el reactor en un Dewar de 5000 ml con nitrógeno líquido. Se enciende la fuente de poder hasta 40A, la cual evapora el solvente y luego el metal en su respectiva temperatura de ebullición, penetrando el solvente hacia el reactor en estado vapor. Se apaga la

fuerza de poder, se co-depositan el metal y el solvente en un proceso llamado nucleación por un periodo de 60 minutos aproximadamente, formándose finalmente una matriz “metal-orgánica” congelada en las paredes internas del reactor (Chemical Liquid Deposition).

5 b) Obtención del Quitosano dopado con nanopartículas. El quitosano dopado con las nanopartículas metálicas se obtiene por el descongelamiento de la matriz “metal-orgánica” que se encuentra en las paredes internas del reactor. Donde se agita la matriz por 12 horas con un agitador magnético y se deja reposar por un periodo de 2 horas aproximadamente obteniéndose la matriz “metal-orgánica-
10 polímero de la cual se extrae, conectando un matraz receptor a la línea de vacío. Una vez retirada la matriz, se realiza la evaporación del solvente la cual actúa como soporte de la mezcla nanopartículas/quitosano, hasta obtener partículas de quitosano sólidas. Estas partículas se encuentran dopadas con nanopartículas metálicas. (Solvated Metal Atom Dispersion, SMAD). Estando la concentración de
15 nanopartículas entre 0.1 a 5 % en masa.

iv) Caracterización del quitosano dopado con nanopartículas. Se caracterizan las nanopartículas de Ag y Cu soportadas en quitosano, mediante Microscopia Electrónica de Transmisión (TEM) y Electrónica de Barrido (SEM), equipado con un analizador de energía dispersiva de rayos X acoplado al microscopio, análisis
20 termogravimétrico (TGA) y Espectroscopia con Transformada de Fourier (FTIR).

v) Control de Calidad: se analiza actividad antimicrobiana de las nanopartículas metálicas y/o antibióticos soportadas en quitosano mediante pruebas de susceptibilidad a los microorganismos patógenos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimorium*, *S. epidermidis* y *Candida albicans* mediante dilución
25 en Caldo y difusión por disco.

A continuación se presentan ejemplos de la preparación, aplicación y uso de los geles antimicrobianos, los cuales permiten una mejor descripción de la presente invención, pero no limitan de manera alguna el espacio de la presente invención.

30

EJEMPLOS

1.- Determinación de la actividad antibacteriana de geles de quitosano con antibióticos.

Se dispuso de geles de quitosano adicionados de los antibióticos gentamicina, ciprofloxacina, cloxacilina y cefotaxima y dos mezclas de ellos. Para cada antibiótico se ensayó dos concentraciones una baja (LC= 1 mg/ml) y una alta (HC= 10 mg/ml). Además se contó con geles adicionados de sulfato de cobre (2,64 mg/ml), oxiclóruo de cobre (1,5 mg/ml) y nanopartículas de cobre) La actividad antibacteriana de los geles de quitosano con antibiótico y/o sales de cobre se determina mediante la medición de los halos de inhibición usando una metodología de difusión en agar. Para esto, los microorganismos a ensayar se cultivaron en agar soya tripticasa + 5% de sangre de cordero por 18-24 horas a 35 °C. De estos cultivos se preparó una suspensión ajustada a 0,5 Mc Farland en agua destilada estéril y con un hisopo se inoculó placas conteniendo 20 ml de agar Mueller-Hinton. Una vez inoculadas las placas se procede a realizar pocillos de 6 mm de diámetro en el agar (5 por placa) con ayuda de una varilla de vidrio (pipeta Pasteur). En los pocillos se coloca aproximadamente 30 g de gel con antibiótico. Las placas se incubaron a 35 °C por 24 horas y se mide el halo de inhibición.

Para la realización de este ensayo se usaran 6 cepas bacterianas: *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Pseudomonas sp.* (cepa de origen clínico multiresistente), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) y dos cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213 y ATCC 25923).

Tabla 1: Halos de inhibición (mm) de geles de quitosano adicionados de antibióticos o sales de cobre sobre diferentes especies bacterianas.

25

Antimicrobiano en gel de quitosano	P. aeruginosa	Pseudomonas sp. ATCC 27853 Clínica*	E. coli ATCC 25922	S. aureus ATCC 25923	E. faecalis ATCC 29212	S. aureus ATCC 29213
Gentamicina/láctico/LC	35	35	35	28	31	30
Gentamicina/láctico/HC	31	29	40	37	30	36
Cefotaxima/láctico/LC	18	18	37	32	26	33
Cefotaxima/acético/LC	15	10	30	27	27	28
Cefotaxima/láctico/HC	41	40	45	31	34	30
Cloxacilina/láctico/LC	6	6	6	6	6	6
Cloxacilina/láctico/HC	6	6	n.d.	8	6	6
Ciprofloxacino/láctico/HC	40	40	40	32	32	30
Ciprofloxacino/láctico/LC	40	40	44	30	34	30
Gentamicina- cefotaxima/acético/LC	32	37	37	26	30	25
Gentamicina- cefotaxima/láctico/LC	38	40	41	35	37	35
Cloxacilina- ciprofloxacina/láctico/HC	40	40	44	30	34	30
Nanopartícula de cobre/láctico	6	6	20	8	6	6
Sulfato de cobre/acético	9	9	15	6	6	6
Oxicloruro de cobre/acético	14	13	20	11	14	15
*: cepa multiresistente						

Se observa que, en general, ciprofloxacina es el antibiótico que muestra mayor actividad frente a los microorganismos ensayados, con halos de inhibición que oscilaron entre 30 y 44 mm y entre 30 y 46 mm para el antibiótico en baja y alta concentración respectivamente. Además, la mejor actividad se presentó frente a bacterias Gram negativas. Estos resultados son concordantes con lo informado en la literatura. Sin embargo, cabe mencionar que no se observa diferencias importantes en los diámetros de los halos al comparar para un mismo microorganismo el antibiótico a baja y alta concentración.

2.- Ensayos en humanos.

Se realizó un estudio de intervención terapéutica descriptivo, longitudinal y prospectivo.

Se incluyeron 30 pacientes, los cuales cumplieron los criterios de elegibilidad, configurando la muestra para el estudio actual. Todos los pacientes se iniciaron en el estudio el mismo día y permanecieron en el mismo hasta su finalización. Se emplearon las técnicas convencionales de anamnesis, examen físico, enfermería, de laboratorio clínico, anatomopatológico y microbiológico habituales para extracción de sangre y recolección de biomaterial para biopsia y cultivo. Los pacientes fueron tratados con la combinación de gel de Quitosano-plata y gel de ciprofloxacino-cloxacilina, tres veces por semana, hasta dos semanas, y se les realizó un seguimiento evolutivo durante 21 días posterior a la última aplicación terapéutica. El procedimiento de aplicación se caracterizó por: registro fotográfico, aplicación tópica del producto terapéutico combinado en proporción de 1 mm en toda la superficie de la lesión y colocación de apósito estéril después de la absorción total del producto terapéutico. Con los registros fotográficos se evaluó la exposición al diagnóstico y al tratamiento. El desenlace se evaluó categorizando la mejoría clínica de los pacientes en función del tiempo. Los investigadores evaluaron su consistencia con las fotografías recolectadas para identificar posibles errores de interpretación y de digitación, estas inconsistencias se discutieron en grupo y se corrigieron de acuerdo a los datos establecidos en las fotografías. A partir de la digitalización de las imágenes fotográficas se enmarcó el tiempo de seguimiento y se procedió con la información obtenida diseñar un modelo que permitió establecer el riesgo que tiene un paciente de mejoría clínica. Para la clasificación clínica de las úlceras cutáneas se empleó una técnica validada en Chile en estudios anteriores, la cual desarrolla los siguientes parámetros donde la Tipo 1 expresa el menor grado de afectación patológica y la Tipo 4 la mayor.

30

ASPECTO	1	2	3	4
	Eritematoso	Enrojecido	Amarillo	Necrótico
Mayor extensión	0-1 cm	> 1-3 cm	> 3-6 cm	> 6 cm
Profundidad	0	> 1 cm	1- 3 cm	> 3 cm
Exudado cantidad	Ausente	Escaso	Moderado	Abundante
Exudado calidad	Si exudado	Seroso	Turbio	Purulento
Tejido esfacelado o necrótico	Ausente	< 25 %	25 %- 50 %	>50 %
Tejido granulatorio	100-75%	50 % - < 75 %	25 % - < 50 %	<25 %
Edema	Ausente	+	++	+++
Dolor	0-1	2-3	4-6	7-10
Piel circundante	Sana	Descamada	Eritematosa	Macerada

El proceso de aplicación del producto terapéutico siempre fue precedido por acciones de asepsia de la región involucrada en la lesión a tratar. El estudio se desarrolló como expresa el siguiente algoritmo:

Actividades	Días		
	0	21	42
Consulta de evaluación clínica y de selección	X		
Distribución de los pacientes según edad, sexo y antecedentes mórbidos.	X		
Registro fotográfico de las úlceras cutáneas y de las alteraciones en la solución de continuidad de la piel.	X	X	X
Clasificación de la úlcera cutánea a partir de la valoración de los parámetros morfológicos macroscópicos	X		X
Aplicación protocolizada de gel terapéutico I y gel terapéutico II (descritos en anexo: ficha técnica del producto)			
Obtención de los parámetros analíticos		X	X
Obtención de los parámetros anatomopatológicos y microbiológicos		X	X

5

10

Descripción y operacionalización de variables

Dimensión	Variable	Clasificación	Definición operacional	Escala	Indicador
Antecedentes sociodemográficos y mórbidos	Edad	Cualitativa Ordinal Politémica	En años exactos cumplidos según fecha de nacimiento, al momento del estudio.	a) 18 a 37 años b) 38 a 55 años c) \geq 56 años	Frecuencia absoluta y porcentaje
	Sexo	Cualitativa Nominal Dicotómica	Se consideró según la condición del individuo determinada por las características biológicamente dadas por los genes.	a) Masculino b) Femenino	Frecuencia absoluta y porcentaje
	HTA	Cualitativa Nominal Dicotómica	Se consideró la presencia de HTA en aquel paciente, si estaba diagnosticado con anterioridad por su médico, si estaba en tratamiento con fármacos antihipertensivos, o durante el ingreso hospitalario se realizó el diagnóstico según los criterios propuestos por el <i>Joint National Committee</i> . ⁷	a) Si b) No	Frecuencia absoluta y porcentaje

Dimensión	Variable	Clasificación	Definición operacional	Escala	Indicador
Antecedentes sociodemográficos y mórbidos	DM	Cualitativa Nominal Dicotómica	Se consideró la presencia de DM en aquel paciente, si estaba diagnosticado con anterioridad por su médico, si estaba en tratamiento con fármacos hipoglucemiantes, o durante la investigación se realizó el diagnóstico según los criterios de la <i>American Diabetes Association</i> . ⁸	a) Si b) No	Frecuencia absoluta y porcentaje
	Insuficiencia arterial periférica	Cualitativa Nominal Dicotómica	Se consideró al conjunto de cuadros sindrómicos, agudos o crónicos, generalmente derivados de la presencia de una enfermedad arterial oclusiva, que condiciona un insuficiente flujo sanguíneo a las extremidades ⁹	a) Si b) No	Frecuencia absoluta y porcentaje

Dimensión	Variable	Clasificación	Definición operacional	Escala	Indicador
Antecedentes sociodemográficos y mórbidos	Insuficiencia venosa periférica	Cualitativa Nominal Dicotómica	Se consideró al conjunto de cuadros sindrómicos, agudos o crónicos, generalmente derivados de la presencia de una enfermedad venosa oclusiva, que condiciona el desequilibrio que se establece a nivel de la microcirculación entre unos factores que favorecen el retorno venoso y otros factores que lo dificultan. ¹⁰	a) Si b) No	Frecuencia absoluta y porcentaje
Antecedentes básicos del estado basal del organismo	Parámetros analíticos biológicos	Cuantitativa Continua	Se consideraron a los datos analíticos de función hematológica, renal y hepática (Leucocitos, Urea, Creatinina, GOT, GPT, GGT), obtenidos a través de métodos de laboratorio clínico.	Valores numéricos	Media y Desviación estándar

Dimensión	Variable	Clasificación	Definición operacional	Escala	Indicador
Clasificación de la úlcera cutánea	Úlcera cutánea	Cualitativa Ordinal Politómica	Se consideró a partir de la aplicación de un instrumento validado que tipifica las úlceras a partir del resultado del puntaje general que resulta de una valoración por parámetros entre 1 y 4 puntos de aspectos morfológicos macroscópicos (aspecto, mayor extensión, profundidad, cantidad de exudado, calidad de exudado, tejido esfacelado o necrótico, tejido granulatorio, edema, dolor, piel circundante) explorados en el sitio de lesión.	a) Tipo 1 (puntaje 10-15) b) Tipo 2 (puntaje 16-21) c) Tipo 3 (puntaje 22-27) c) Tipo 4 (puntaje 28-40)	Frecuencia absoluta y porcentaje

Perfil temporal. Definición conceptual: el tiempo se definió como los días transcurridos entre la primera y última fotografía control.

Perfil anatomopatológico. Definición conceptual: Se consideró como tal la realización de un informe anatomo patológico a partir del estudio microscópico de tejido obtenido de la úlcera cutánea y obtenidos por medio de cultivo que describe las características del comportamiento hístico global de las úlceras en los pacientes.

Perfil microbiológico. Definición conceptual: Se consideró como tal la realización de un informe microbiológico a partir del estudio del cultivo de tejido obtenido de la úlcera cutánea.

5 **Tejido eritematoso o epitelial. Definición conceptual:** aspecto rosado, brillante, frágil en sus inicios, indica que se encuentra en la fase de remodelación o por compresión o quemadura que afecta la dermis sin pérdida de la integridad cutánea.

Tejido enrojecido. Definición conceptual: presencia de tejido de granulación vascularizado y frágil que indica que se encuentra en la fase proliferativa.

10 **Tejido pálido. Definición conceptual:** presencia de fibrina, proteína insoluble que deriva del fibrinógeno por la acción de la trombina y es de color amarillo pálido. La palidez del tejido puede ser también por hipoxia (baja concentración de oxígeno en los tejidos) o por isquemia (déficit localizado de sangre en el tejido producido por vasoconstricción funcional o por obstrucción de los vasos).

15 **Tejido necrótico. Definición conceptual:** presencia de tejido muerto, seco, duro y de color negro, aunque el tejido conectivo muerto puede tener color gris y ser blando.

Extensión. Definición conceptual: está expresada en el diámetro de mayor extensión. Las herramientas de medición pueden ser una planilla circular, plantilla cuadrículada de acetato o una regla flexible. Auxiliado de una toma de imagen fotográfica.

20 **Profundidad. Definición conceptual:** en las úlceras cavitadas puede haber compromiso muscular, tendinoso u óseo, siendo a veces de difícil acceso. Para su medición se utiliza un hisopo para toma de cultivo, colocándolo en el punto más profundo y midiendo hasta el borde superior de la herida. Cuando esta tiene sacos o pliegues laterales, su medición se realiza de acuerdo a los punteros del reloj teniendo.
25 como base las 12, que corresponde a la cabeza de la persona que se está evaluando.

Exudado. Definición conceptual: constituye una parte importante del mecanismo de defensa de la herida. Se forma en la superficie como resultado de la pérdida de líquido

de los vasos sanguíneos pequeños, disminuye con la cicatrización y desaparece con la epitelización.

Exudado cantidad

Escaso = 1 - 5 cc

5 Moderado = 5 - 10 cc

Abundante = >10 cc

Exudado calidad

- Seroso: líquido claro, transparente, amarillento o rosado.
- Turbio: formado por la mezcla del exudado del proceso de cicatrización de la herida y detritus producto del debridamiento.
- 10 • Purulento: líquido espeso de color amarillento o verdoso, segregado por un tejido inflamado, y compuesto por suero, leucocitos, células muertas y por grasa (colesterol y glucosa).

Tejido esfacelado o necrótico. Definición conceptual: tejido pálido, hipóxico o isquémico. La presencia de tejido necrótico o esfacelado que se encuentra sobre la superficie de la herida y se mide en porcentaje.

15

Tejido de granulación. Definición conceptual: tejido conectivo rojizo, húmedo y frágil que llena la herida durante la fase proliferativa de la curación.

Edema. Definición conceptual: es el exceso de líquido en los tejidos subyacentes a la herida y se mide a través de la presión dactilar.

20

edema + = < 0,3 cm

edema + + = 0,3-0,5 cm

edema + + + = > 0,5 cm

Dolor. Definición conceptual: Escala analógica.

25 Sin dolor Peor dolor

1 _____ 4

Piel circundante. Definición conceptual: la piel cercana a la herida puede sufrir alteraciones de la integridad cutánea por efectos mecánicos o relacionados con el proceso inflamatorio, los que se pueden extender la lesión o dejar secuelas.

- Piel sana = Piel indemne
- Descamación = Exfoliación de células queratinizadas de tamaño variable, color plateado, blanco o tostado que indica sequedad de la piel y propensión a grietas y fisuras.
- Piel eritematosa = Epidermis enrojecida por acción mecánica, presión, fricción o dermatitis irritativa. Puede acompañarse de calor local.
- Piel macerada = Presenta excoriaciones (lesiones cutáneas debidas a pérdida de sustancia muy superficial que sólo afecta a la epidermis) y descomposición de los tejidos al estar en contacto con un medio húmedo.

Técnicas de procesamiento de la información

5 Los datos fueron almacenados y procesados automáticamente en el sistema *Statistical Package for Social Sciences* (Versión 19,0 para *Windows*). Como medidas de resumen en las variables cualitativas se emplearon frecuencias absolutas y porcentuales. En las variables cuantitativas se empleó la media y desviación estándar como medida de resumen. A partir de la digitalización de las imágenes fotográficas se
10 enmarcó el tiempo de seguimiento y se procedió con la información obtenida diseñar un modelo que permitió establecer el riesgo que tiene un paciente de mejoría clínica según la probabilidad asociada de Poisson, se estableció un nivel de confianza de 90 %. Se determinó la significación estadística en la variación en la tipificación de la úlcera antes y después del tratamiento, mediante la prueba de los rangos con signo
15 de Wilcoxon. Se estableció un nivel de confianza de 95 % y se consideró significativo todo valor de $p \leq 0,05$ para el estadígrafo asociado a la prueba. Los resultados se resumieron en tablas y en notas textuales explicativas generales.

Resultados y discusión

Se evaluaron 30 pacientes, 10 de ellos de sexo masculino y el 60 % de los pacientes tenían 58 años y más (Tabla 1), el tiempo en años de las úlceras y alteraciones en la solución de continuidad de la piel de estos pacientes sumaron 283 años.

- 5 Las úlceras tenían entre 1 y 24 centímetros cuadrados de área. El 73,3 % de los pacientes tenían una úlcera de etiología relacionada con insuficiencia venosa, seguido de un 13,3 % cuya etiología fue mixta (arterial y venosa), aunque solo reportaron dolor el 46,2 % de los pacientes para el 56,6 % de estos, el dolor era intenso y superaba el nivel 6, según la escala visual análoga y 2 pacientes reportaron un nivel de dolor de 8
10 y otros 2 pacientes manifestaron que el dolor como el máximo nivel de dolor de su vida calificándolo con valor de 4. Mientras que la diabetes mellitus se presentó en el 40 % de los pacientes y la hipertensión arterial en el 36,6 % (Tabla 2).

En la tabla 3 y en el gráfico 1 se reportó que la mayoría de los pacientes presentan úlceras cutáneas Tipo 4 (70, %), seguido por aquellos con úlceras cutáneas Tipo 3
15 (16,6 %). Destaca que solo hubo un paciente con úlcera tipo 1 (Tabla 3). Mientras que la tabla 4 comunica que se obtuvo posterior a la intervención terapéutica una disminución en los pacientes, de la frecuencia de úlcera cutánea Tipo 4 (40,0 %) y Tipo 3 (23,3 %), con incremento de las úlceras cutáneas Tipo 1 (16,6 %).

Al realizar la Prueba de rangos con signos de Wilcoxon (Tabla 5), se demostró que la
20 regresión de la severidad en la úlcera cutánea en la serie de pacientes estudiados después de la intervención terapéutica expresada en la reducción de la frecuencia de úlceras cutáneas Tipo 4 (70,0 % frente 40,0%; $p = 0,01$; $Z = -1,342$) e incremento de las Tipo 1 (3,3 % frente 16,3 %; $p = 0,00$; $Z = -6,042$), es estadísticamente significativa. Los resultados del análisis de la contribución del protocolo terapéutico a través de la
25 prueba de rangos con signos de Wilcoxon, demostró que la intervención aplicada produjo cambios favorables en la evolución clínica en la serie de pacientes estudiados, se evidenció que hubo un aporte a la reducción del área lesionada sin signos de infección y con bordes activos (Tabla 5). Se obtuvo un valor de probabilidad de 0,00 y 0,01, lo que permite rechazar la hipótesis nula, favoreciendo el criterio de las
30 características clínicas de la úlcera cutánea independientemente del grado de

severidad, tienen un mejor pronóstico evolutivo después de la aplicación de la estrategia terapéutica.

El modelo desarrollado para establecer el riesgo que tiene un paciente de mejoría clínica según la probabilidad asociada de Poisson, resultó 0,09. Este resultado
5 demuestra que un paciente con úlcera crónica de bordes no activos, con presencia de dolor y exudado excesivo, una vez recibida la atención terapéutica con gel AB Quitosano, se obtiene control del exudado y alivio el dolor (directa o indirectamente), con una probabilidad de 90 % (0,09) de mejoría clínica de su úlcera o afectación en la solución de continuidad de la piel. Este hallazgo coincide con el obtenido a través de
10 la prueba de rangos con signos de Wilcoxon.

Estas variables tienen importancia dado que el dolor expresa alguna anomalía en el proceso de cicatrización como la presencia de inflamación, con y sin infección, maceración misma del tejido perilesional. El dolor, considerado como el quinto signo vital, debe ser identificado y monitoreado en las úlceras. El mismo interfiere en el cierre
15 de las úlceras y heridas debido a una disminución directa del flujo sanguíneo. El exudado importa ya que entorpece la actividad de los factores de crecimiento, retardando el cierre. La epitelización ocurre desde los bordes principalmente, y es dependiente de una matriz extracelular que permite su migración, por lo que es una resultante de las anteriores condiciones.

20 En la presente investigación, se destaca que la aplicación terapéutica del gel AB quitosano no promovió procesos infecciosos, ni alteración de la función renal y hepática (Tabla 6).

Relevante resultó el respaldo de los estudios histopatológicos, para confirmar evolución clínica. Se evaluó cada caso en 3 instantes, al inicio, momento intermedio y
25 fin del protocolo de aplicación. Se observó:

a. Al inicio: La descripción global de esta fase, correspondería a:
"Fragmentos tisulares con abundantes cambios de carácter exudativo, con predominio polimorfonuclear y frecuentes piocitos que infiltran extensamente las muestras, reemplazando su arquitectura tradicional,
30 con signos de lisis tisular acentuados, focos de hemorragia reciente y

signos de hemorragia antigua. Se observa escasas formaciones vasculares de carácter capilar y estructura conservada. Se observa material desvitalizado en cobertura superficial, de carácter fibrinoleucocitario y serohemático”.

- 5 b. Momento intermedio: La descripción global de esta fase, correspondería a:
- “Fragmentos tisulares con signos de proliferación conectivo – vascular de carácter reparativo, caracterizado por instalación de red capilar congestiva, infiltración inflamatoria crónica de predominio
- 10 linfoplasmocitaria complementada con menor componente polimorfonuclear. No se observa material desvitalizado ni signos de microorganismos.
- c. Término de protocolo: La descripción global de esta fase, correspondería a:
- 15 “Fragmentos tisulares con notorios signos de maduración de proliferación conectivo vascular, con regresión de infiltrado inflamatorio y trama capilar. Refuerzo de fibras colágenas a nivel intersticial.

Respecto de cultivos microbiológicos realizados, se obtuvo el reporte de *Staphylococcus aureus*, como el microorganismo más frecuente, seguido por

20 *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus spp*, y bacterias coliformes, consistente con hallazgos reportados para este tipo de lesiones y patología concomitante, lo cual resulta de interés, por cuanto infecciones polimicrobianas pueden repercutir en aspectos fisiopatológicos que llevan a que estos microorganismos en comunidad dificulten la recuperación y cicatrización de la lesión. En efecto, cultivos tomados una

25 vez iniciada la aplicación del gel, resultaron persistentemente negativos.

Los hallazgos obtenidos en la investigación actual pudieran explicarse por las propiedades cicatricial y bactericida del producto terapéutico, con capacidad de provocar hiperplasia y aumento de la queratinización y en el caso particular de los fibroblastos y células endoteliales se observa un incremento de la producción de

30 proteínas de la superficie celular o de fibronectina, la cual proporciona la sustancia de

sustrato requerida para el crecimiento y la diferenciación de la epidermis. Los resultados de este estudio indican la factibilidad de uso del producto.

La revisión de literatura actual no muestra evidencias del empleo de la propuesta terapéutica aplicada en esta serie de casos, por lo que se considera un aporte
5 novedoso en la atención de la úlcera cutánea, que representa un serio problema de salud pública nacional y mundial. Sin embargo, los resultados obtenidos coinciden con los reportados en estudios similares.

REFERENCIAS

1. Beltrán C, Fernández A, Giglio S *et al.*. Tratamiento de la infección en el pie
10 diabético. Rev. Chil. Infectol. 18 (3): 212-224 (2001).
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2005.
3. Ramsey ds, Newton K. Blough. et al. Incidence, outcomes and cost of foot ulcers in patients with diabetes. Diab Care. 1999; 22: 382 – 387).
- 15 4. R. Olsen, D. Schwatzmüller, W. Weppner, “Biomedical Applications of Chitin and its Derivatives”,
Physical Properties and Applications, pp. 813-828 (1989).
5. M. Nakajima, K. Atsumi, et al., “Development of Absorbable Sutures from Chitin”, pp. 407-11,
20 Proceedings on Advances in Chitin, Chitosan, (1984).
6. Zikakis, J.P., (Ed.), “Chitin, Chitosan and Related Enzymes”, Academic Press, (1984).
7. J. Kost (Ed.), Pulsed and Self-Regulated Drug Delivery, CRC Press, Boca Raton, (1990).
- 25 8. K.E. Uhrich, S.M. Camizzaro, et al., Polymeric systems for controlled drug release, Chem. Rev.,
99, 3181 (1999).
9. Wang X. & Spencer G., <http://hubcap.clemson.edu/~xwang/chitosan.htm>,
Department of
30 Chemistry, Clemson University. USA.
10. Tomaszewska M., Chitin World, (Proc. Int. Conf. Chitin Chitosan), 6th, 583-589

- (1994).
11. Hirano S. y Usutani A., *Int. J. of Biological Macromolecules*, 20, 245-249 (1997).
12. Rathke T. y Hudson S., *J. M. S. Rev. Macromol. Chem. Phys.*, C34(3), 392-393 (1994).
- 5 13. Tokura S. et al, *Macromol. Symp.* 101, 389-396 (1996).
14. Pospieszny H., *Crop Protection*, 16, N° 2, 105-106 (1997).
15. Staroniewicz Z. et al, *Chitin World*, (Proc. Int. Conf. Chitin Chitosan), 6th, 374-377 (1994).
16. Andrews, J. Determination of minimum inhibitory concentration. *J. Antimicrob. Chemother*, 48
10 (suppl 1): 5-16 (2001).
17. L.Y. Chung, R.J. Schmidt, et al., *Journal of Biomedical Materials Research*, Vol.28, pp.463-469 (1994).
- 15 18. S.M. Hudson, "Review of Chitin and Chitosan as Fiber and Film Former", *Journal of Material Science*, C34(3), 375-437 (1994).
19. Concejo, J. Gonzalez, S. and Garcia, L. (2008) "Nanomedicina; el avance de la nanotecnología en
20 la medicina". Vol.1, pp 47-56.
20. Org. Mundial de la Salud, Centro de prensa, nota descriptiva N°297, "Cancer", 2013
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index/html> (Consulta 9 de Julio de 2013).
- 25 21. a) Medina, C.; Santos-Martinez, M; Radomski, M.W. *Chem. Rev.* 2005, 125, 1547-1562.
b) Yih, T.C.; Wei, C. (2010) Nanomedicine in cancer treatment. *Nanotechnol. Biol. Med.* 1, 191-192
22. Bourne, (<http://www.bourneresearch.com>)
- 30 23. Chang, D, Yang, J y Zhao, Y. *Chin. Med. Equip.* 4: 26-32 (2004).
24. Cohen, MS, Stern, JM, Vanni, AJ, Kelley, RS, Baumgart, R. Field, D, Libertino, JA y

Summerhayes, JC Surg. Infect. 8: 397-402 (2007).

25. Panyman, J y Labhassetwar, V. Adv. Drug Delivery Rev. 55:3329-3347 (2003).

26. Elechiguerra, J.L., Burt, J., Morones, JR, Camacho-Bragado, A., Gao, X., Lara, HV. Y Yacaman,

5 J. Nanobiotechnol. 3: 6 (2005).

27. Zhang, Y., Sun, J. Chin. J. Med. Instrum. 31: 35-38 (2007).

28. Lee, H., Park, H., Lee, Y.M., Kim, K. y Park, S.B. Chem. Commun. 28:2959-2961 (2007).

29. Iglesias González R. Resumen de las recomendaciones de la American Diabetes Association (ADA) 2014 para la práctica clínica en el manejo de la diabetes mellitus. Diabetes Care. 2014;37: S14-80.

30. Serrano Hernando FJ, Martín Conejero A. Rev Esp Cardiol. 2007;60(9):969-82.

31. Vázquez-Hernández I, Acevedo-Peña M. Prevalencia de insuficiencia venosa periférica en el personal de enfermería. Enfermería Universitaria. 2016;13(3):166-170

15 32. Suthar, Manish, et al. Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series. Journal of biomedical science. 2017; 24(1):16.

33. Nelson, T. G., et al. Cutaneous ulcers in a returning traveller: a rare case of imported diphtheria in the UK. Clinical and experimental dermatology. 2016;41(1):57-59.

20 34. Lewis, Hal A., et al. "Methotrexate-induced cutaneous ulceration in 3 nonpsoriatic patients: Report of a rare side effect." JAAD case reports. 2017;3(3): 236-239.

Conclusiones

Las úlceras cutáneas crónicas constituyen un problema sanitario relevante a nivel mundial, se calcula que entre 1% al 2% de la población padecerá sus consecuencias durante su vida. En Chile, las estadísticas disponibles muestran que

25 aproximadamente 160.000 pacientes son portadores de algún tipo de herida o úlcera, constituyéndose en un problema de salud pública. Se comprende por úlcera crónica "una lesión de piel mantenida en el tiempo, que implica pérdida de la epidermis, parte de la dermis e incluso hipodermis", con lo cual abarca este grupo a las úlceras

venosas, úlceras isquémicas, pie diabético, úlceras por presión, quemaduras y heridas quirúrgicas infectadas.

Las úlceras cutáneas crónicas ofrecen condiciones propicias para multiplicación microbiana, por la pérdida de integridad cutánea, hipoxia tisular y contaminación de tejidos expuestos, todo lo cual dificulta su cicatrización, sumado al aumento de
5 resistencia antibiótica observada en cepas frecuentemente detectadas, al menos para vehículos antibióticos usuales. Lo anterior, motiva el interés por conocer de principios activos de uso innovador, que faciliten la aplicación y efecto estable y persistente en tejidos lesionados, superponiéndose a mecanismos de resistencia bacteriana,
10 enriquecidos eventualmente por antibióticos de uso conocido.

Así, las variantes de gel provistas para este estudio, han permitido observar una evolución clínica objetivamente favorable y de mayor velocidad de recuperación a la que el paciente refería, con otros recursos terapéuticos hasta el momento de recibir la aplicación del gel, en un ambiente de alta asepsia.

15 Así el carácter de las variantes de gel aplicadas como agente terapéutico, demostró que:

- Es un agente que permite otorgar altos niveles de asepsia a la lesión tisular, acompañado de neoangiogénesis histopatológica, cambios regresivos en el infiltrado inflamatorio celular, con aparición de respuesta fibroblástica de
20 carácter cicatricial y signos de re-epitelización complementaria.
- es un agente que propende a mecanismos curación segura, bien tolerada, satisfactoria y con beneficios superiores a los obtenidos con otros recursos terapéuticos de uso en la atención de policlínico frecuente.
- Posee características de aplicación ambulatoria y autónoma por parte de los
25 pacientes, que en la medida que pueda complementarse con eventual perfil de acceso masivo y costo accesible, le incluirían en un potencial grupo de recursos terapéuticos rentables y de alta demanda, sujeto a estudios de esta índole a futuro.

Tabla 1. Distribución de los participantes según edad y sexo

Grupos de edad (años)	Sexo			
	Masculino		Femenino	
	No.	%	No.	%
18 a 37	1	3,3		
38 a 57	1	3,3	2	6,6
≥ 58	8	26,6	18	60,0
Total	10	33,3	20	66,6

Tabla 2. Frecuencia de antecedentes mórbidos en los pacientes

5

Antecedentes mórbidos	(n=30)	
	No.	%
Hipertensión arterial	11	36,6
Diabetes Mellitus	12	40,0
Etiología		
Insuficiencia arterial periférica	22	73,3
Insuficiencia venosa periférica	3	10,0
Insuficiencia arterial periférica e Insuficiencia venosa periférica (Mixta)	4	13,3

Tabla 3. Frecuencia en los pacientes de úlcera cutánea según el puntaje obtenido en el algoritmo de clasificación antes del protocolo terapéutico

Clasificación de la úlcera cutánea	(n=30)	
	No.	%
Tipo 1	1	3,3
Tipo 2	3	10,0
Tipo 3	5	16,6
Tipo 4	21	70,0

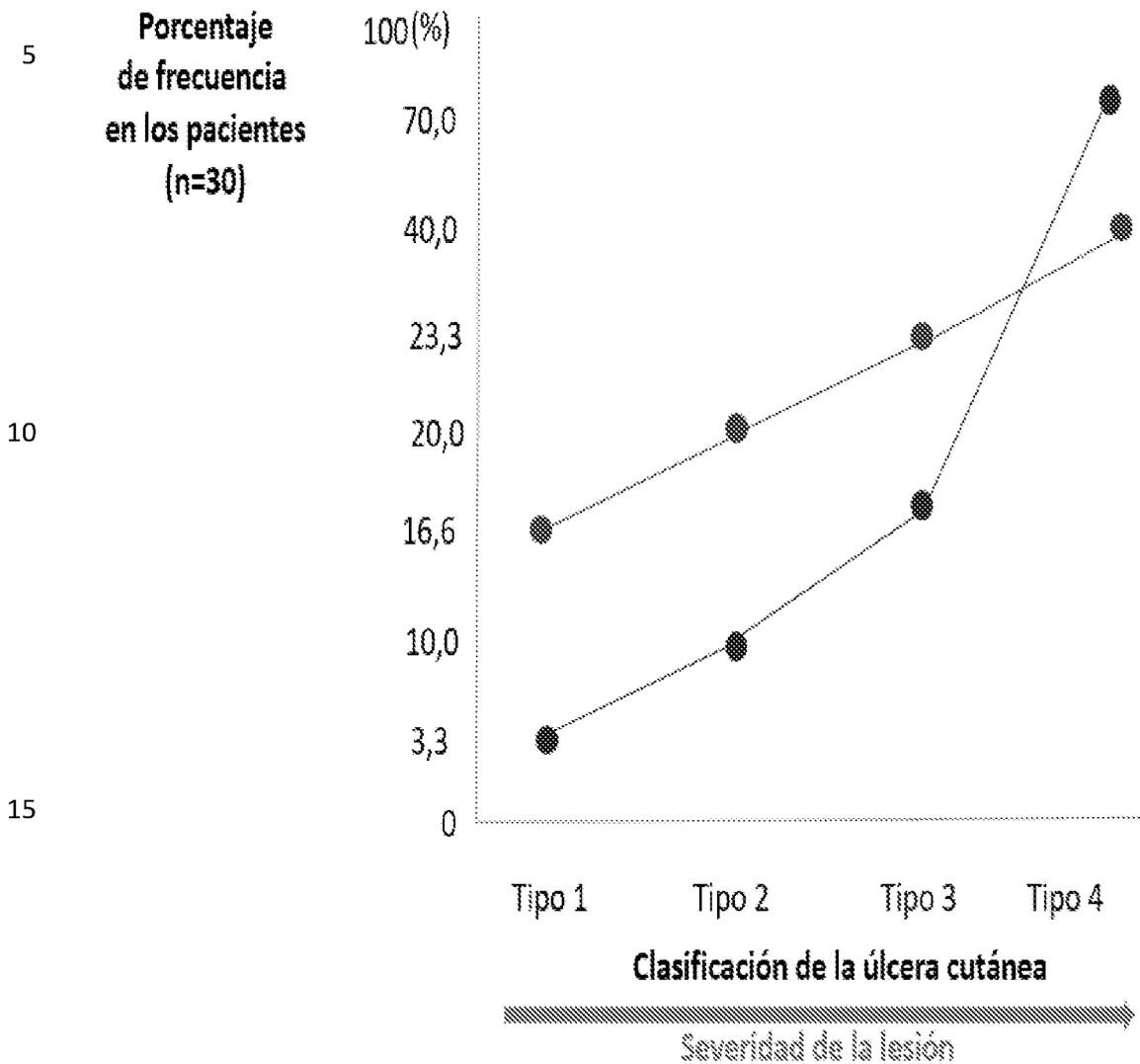


Tabla 5. Análisis de la evolución de la úlcera cutánea antes y después del tratamiento

Clasificación de la úlcera cutánea	Protocolo terapéutico				Valor p*	Valor Z ^Y
	Antes n = 30		Después n = 30			
	No.	%	No.	%		
Tipo 1	1	3,3	5	16,6	0,00	-6,042
Tipo 2	3	10,0	6	20,0	0,00	-3,842
Tipo 3	5	16,6	7	23,3	0,01	-3,624
Tipo 4	21	70,0	12	40,0	0,01	-1,342

*Valor de probabilidad, prueba de los rangos con signos de Wilcoxon. Intervalo de confianza 95 % ($p \leq 0,05$).

- 5 †Valor de la distribución de la variable aleatoria normal estándar, prueba de los rangos con signos de Wilcoxon. Intervalo de confianza 95 % ($p \leq 0,05$).

Tabla 6. Evolución de la función renal, hepática y hematológica en los pacientes estudiados

Parámetros analíticos	(n=30)	
	Media/Desviación estándar	
	Día 0	Día 42
Leucocitos (cel/mm ³)	11.678 ± 2	8.677 ± 2
Urea (mg/dL)	163 ± 11	121 ± 10
Creatinina (mg/dL)	2,7 ± 0,5	2,0 ± 0,5
GOT (U/l)	62 ± 0,5	42 ± 5
GPT (U/l)	51 ± 2	43 ± 2
GGT (U/l)	49 ± 3,5	51 ± 3,5

EVOLUCION HISTOPATOLOGICA

Material y método;

1. Se procedió a obtener biopsia por modalidad punch 2mm de diámetro, y profundidad de 2-3mm.
- 5 2. Se tomó 3 biopsias por cada paciente, a los días 1- 21 y 42. Cada punch fue inmerso en formalina tamponada al 10% (25 cc).
3. Cada muestra se procesó a las 24 horas de su obtención.
4. Se hizo tinción Hematoxilina-eosina, Van Giesson y Giemsa para cada inclusión.

10 **Hallazgos:**

2. De la muestra inicial:

- a. En la totalidad de los casos se observó material tisular evaluable.
- b. En 41,3 % de los casos,
 - 15 i. se observó material fibrinoleucocitario superficial (de tipo purulento, desvitalizado) en más del 50% del material evaluado.
 - ii. En 24,1% de los casos, correspondió a más del 75% del material evaluado
- c. En el 100% de los casos se observó abundante infiltrado inflamatorio, de predominio polimorfonuclear.
- 20 d. En el 27,5 % de los casos se observó material seroleucocitario y hemático superficial (de tipo costroso)
- e. 10,3% de los casos presentaron signos de esclerosis subepitelial.
- f. 82.7% de los casos presentó signos de vascularización deficiente, para la evolución clínica en tiempo.
- 25 g. 93.1% tenían intensos signos clínicos de carácter exudativo, al menos focalmente.
- h. 17.2% presentaba depósito paratrófico de alguna sustancia, mayormente hemosiderina.
- 30 i. 48.2% de los casos examinados presentó acúmulos hiperbasófilos microgranulares, del tipo colonias bacterianas. En 6,8 % de los casos, se observaron imágenes sugerentes de esporas e hifas.

- 5 j. La descripción global de esta fase, correspondería a: “Fragmentos tisulares con abundantes cambios de carácter exudativo, con predominio polimorfonuclear y frecuentes picocitos e que infiltran extensamente las muestras, remplazando su arquitectura tradicional, con signos de lisis tisular acentuados, focos de hemorragia reciente y signos de hemorragia antigua. Se observa escasas formaciones vasculares de carácter capilar y estructura conservada. Se observa material desvitalizado en cobertura superficial, de carácter fibrinoleucocitario y serohemático”
- 10 k. La conclusión diagnóstica global para esta fase, fue de: “Solución de continuidad tegumentaria, con intenso proceso inflamatorio crónico activo asociado, cuyo espectro diagnóstico incluye: úlcera de pie diabético, foliculitis pustular y trayecto fistuloso, entre otros.”
3. De la muestra intermedia:
- 15 a. En la totalidad de los casos se observó material tisular evaluable.
- b. En el 86,2% de los casos se observó signos de intensidad variable, de proliferación fibroblástica de carácter reparativo.
- c. En el 27.5 % de los casos se observó signos de re-epitelización periférica, inmadura e incipiente (bordes de la ulcera)
- 20 d. En 65.5 % de los casos, :
- i. se observó infiltrado inflamatorio de predominio mononuclear, linfoplasmocitario, de tipo crónico, en más del 50% del material evaluado.
- ii. En 41.3% de los casos, correspondió a más del 75% del material evaluado
- 25 e. En 27.5% de los casos presentaron signos de esclerosis subepitelial.
- f. En 86.2% de los casos se observó recuperación de patrón vascular, signos de proliferación capilar y endotelial, con signos de edema leve a moderado (neoangiogénensis).
- 30 g. 93.1% de los casos no presentaron signos de material fibrinoleucocitario superficial, ni serohemático de tipo costroso superficial.

- h. No se observó acúmulos hiperbasófilos microgranulares, del tipo colonias bacterianas ni imágenes sugerentes de esporas e hifas, en ninguno de los casos examinados
- 5 i. La descripción global de esta fase, correspondería a: “Fragmentos tisulares con signos de proliferación conectivo – vascular de carácter reparativo, caracterizado por instalación de red capilar congestiva, infiltración inflamatoria crónica de predominio linfoplasmocitaria complementada con menor componente polimorfonuclear. No se observa material desvitalizado ni signos de microorganismos.
- 10 j. La conclusión diagnóstica global para esta fase, fue de: “Solución de continuidad tegumentaria, con desarrollo de tejido granulación, congestivo. No se observan signos de infección. Incipientes signos periféricos de re-epitelización, con diferenciación celular incompleta”.
4. De la muestra final:
- 15 a. En la totalidad de los casos se observó material tisular evaluable.
- b. En el 96,5% de los casos presentó signos de regresión de infiltrado inflamatorio, ubicado mayormente a nivel perivascular.
- c. En 93,1 % de los casos, no se observó material fibrinoleucocitario superficial (de tipo purulento, desvitalizado) ni hemático superficial (de tipo costroso)
- 20 d. El 100% de los casos presentó signos de reduplicación de fibras colágenas en matriz intersticial.
- e. El 100% de los casos presento signos de regresión de trama capilar.
- f. No se observó acúmulos hiperbasófilos microgranulares, del tipo colonias bacterianas ni imágenes sugerentes de esporas e hifas, en ninguno de los casos examinados
- 25 g. La descripción global de esta fase, correspondería a: “Fragmentos tisulares con notorios signos de maduración de proliferación conectivo vascular, con regresión de infiltrado inflamatorio y trama capilar. Refuerzo de fibras colágenas a nivel intersticial.
- 30 h. La conclusión diagnóstica global para esta fase, fue de: “Solución de continuidad tegumentaria, con cambios tisulares de carácter cicatricial.

Signos de re-epitelización con adecuada diferenciación tisular. No se observan microorganismos”.

REIVINDICACIONES

1.- Método de obtención de un gel biodegradable y biocompatible, CARACTERIZADO porque comprende los siguientes pasos:

5 i) Elaboración de Geles de Quitosano;

Se utiliza un polímero de quitosano de grado de desacetilación superior a 90% y una masa molar entre 25,000 y 500.000 g/mol, el cual se obtiene por disolución a temperatura ambiente (15-25°C) en ácidos débiles orgánicos (acético, fórmico, láctico entre otros) hasta lograr una concentración entre 1 y 5% en masa;

10 ii) Obtención de quitosano mezclado con antibióticos;

A la matriz de quitosano obtenida en (i) se agrega uno o más antibióticos, por el método de dispersión y agitación en atmósfera de nitrógeno gaseoso, estando los antibióticos en una concentración de 0.1 a 5 % en masa y cuando están combinados en una relación de 1:1;

15 iii) Obtención de nanopartículas;

Reacción de co-depositación. Este método involucra la co-deposición física de vapores metálicos (cobre y plata) con vapores orgánicos (2-etoxietanol) en Nitrógeno líquido, en un reactor de átomos metálicos; se introduce el metal a evaporar en el crisol de alumina; se introduce el magneto y el quitosano sólido en el fondo del reactor;

20 se conecta el matraz con el solvente a utilizar (2-etoxietanol) y todo el sistema se evacua hasta alcanzar un alto vacío de 10^{-5} bar. Luego se sumerge el reactor en un Dewar de 5000 ml con nitrógeno líquido. Se enciende la fuente de poder hasta 40A, la cual evapora el solvente y luego el metal en su respectiva temperatura de ebullición, penetrando el solvente hacia el reactor en estado vapor. Se apaga la fuente de poder,

25 se co-depositan el metal y el solvente en un proceso llamado nucleación por un periodo de 60 minutos aproximadamente, formándose finalmente una matriz "metal-orgánica" congelada en las paredes internas del reactor;

iv) Obtención del Quitosano dopado con nanopartículas. Se obtiene por el descongelamiento de la matriz "metal-orgánica" que se encuentra en las paredes

30 internas del reactor. Donde se agita la matriz por 12 horas con un agitador magnético

y se deja reposar por un periodo de 2 horas aproximadamente obteniéndose la matriz “metal-orgánica-polímero de la cual se extrae, conectando un matraz recibidor a la línea de vacío. Una vez retirada la matriz, se realiza la evaporación del solvente la cual actúa como soporte de la mezcla nanopartículas/quitosano, hasta obtener

5 partículas de quitosano sólidas. Estas partículas se encuentran dopadas con nanopartículas metálicas. Estando en una concentración de 1 a 5 % en masa respecto al polímero quitosano.

2.- El Método de obtención de un gel biodegradable y biocompatible según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque los antibióticos corresponden a

10 ciprofloxacino y/o cloxacilina solos o en combinación y/o cefotaxime y/o gentamicina solos o en combinación.

3. El método de obtención de un gel biodegradable y biocompatible según la reivindicación 1, CARACTERIZADO porque las nanopartículas corresponden a cobre

15 y/o plata solos o en combinación.

4. Gel biodegradable y biocompatible, CARACTERIZADO porque comprende una matriz polimérica de quitosano en una concentración de 1 a 5% en masa, conteniendo

20 nanopartículas metálicas de 10 a 100 nm, en una concentración de 1 a 5 % en masas y/o conteniendo antibióticos, en una concentración de 0.1 a 5 % en masa y aditivos entre 1 a 5% en masa.

5.- Gel de acuerdo a la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque el quitosano corresponde a poli-beta-D-glucosamina y la masa molar de la matriz polimérica es

25 entre 25.000 y 500.000 g/mol con grado de pureza superior al 95% en masa.

6. Gel de acuerdo a la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque los iones metálicos corresponden a cobre y/o plata solos o en combinación.

30

7. Gel de acuerdo a la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque los antibióticos corresponden a ciprofloxacino y/o cloxacilina solos o en combinación y/o cefotaxime y/o gentamicina solos o en combinación.
- 5 8. Gel de acuerdo a la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque los antibióticos combinados se encuentran en proporción 1:1.
9. Gel de acuerdo a la reivindicación 4, CARACTERIZADO porque los aditivos corresponden a carbopol, hidroquinona, goma guar, goma xantica y/o goma arábica.
- 10 10. Uso del gel de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 9, CARACTERIZADO porque sirve para tratamiento de infecciones cutáneas bacterianas ya sean úlceras neuropáticas o pie diabético.
- 15 11. Uso del gel de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 9, CARACTERIZADO porque sirve para la restauración de tejidos epidérmicos, dérmicos, neovascularización y angiogénesis.
- 20 12. Uso del gel de acuerdo con las reivindicaciones 4 a 9, CARACTERIZADO porque sirve como matriz de crecimiento celular de fibroblastos en tejidos epidérmicos y dérmicos.

CASO	Biopsia	Imagen
------	---------	--------

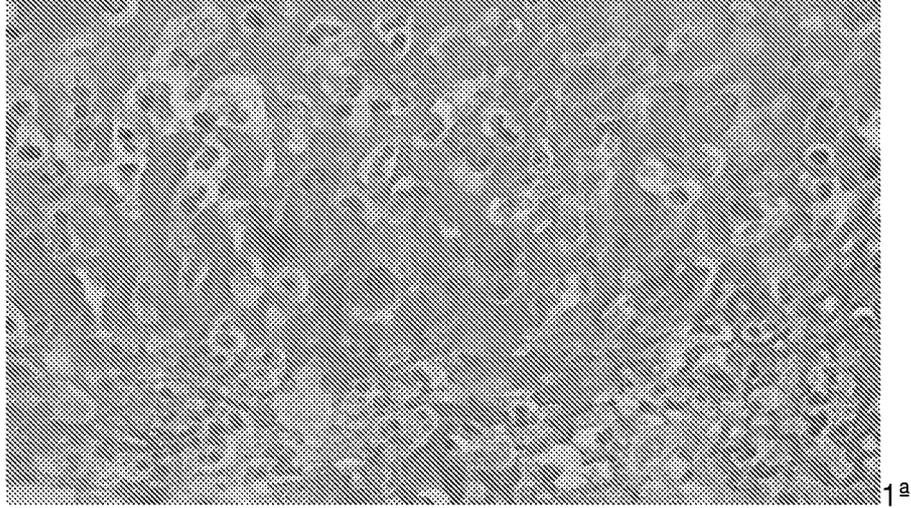


FIGURA 1

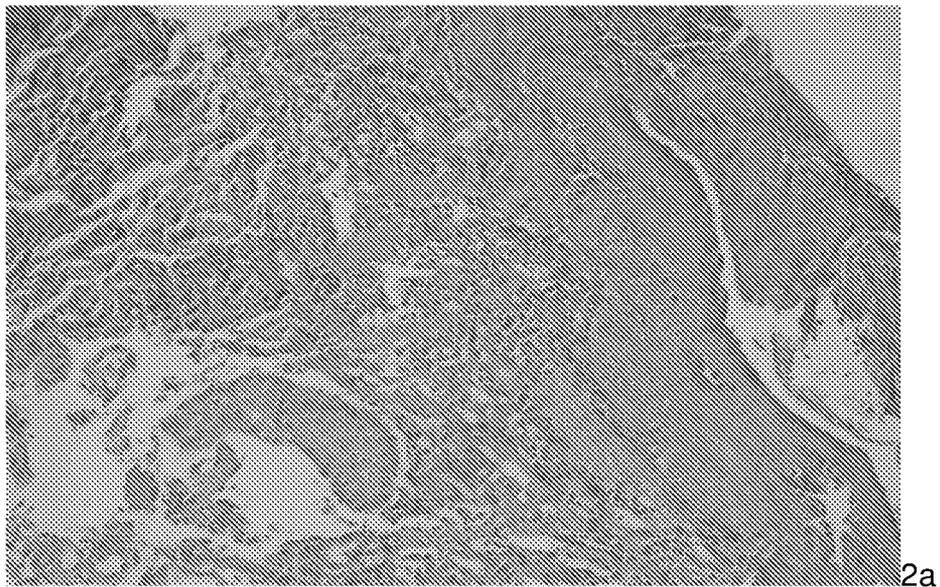


FIGURA 2

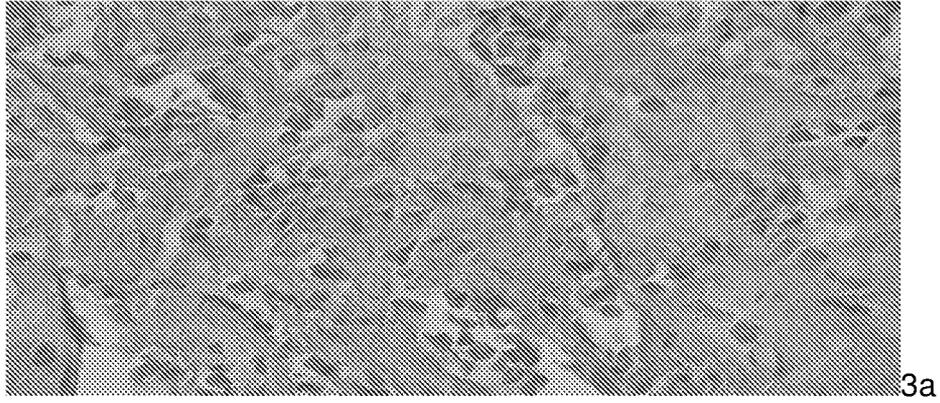


FIGURA 3

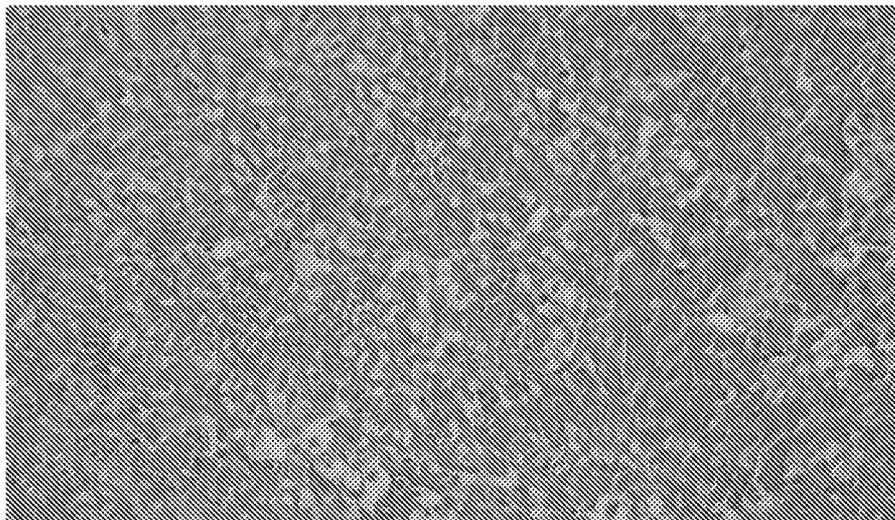


FIGURA 4

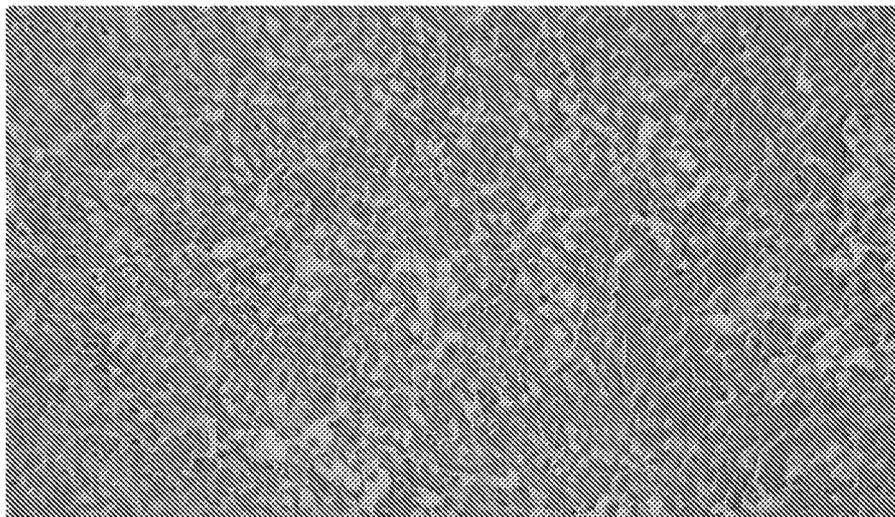


FIGURA 5

EVOLUCION FOTOGRAFICA DE ULCERAS

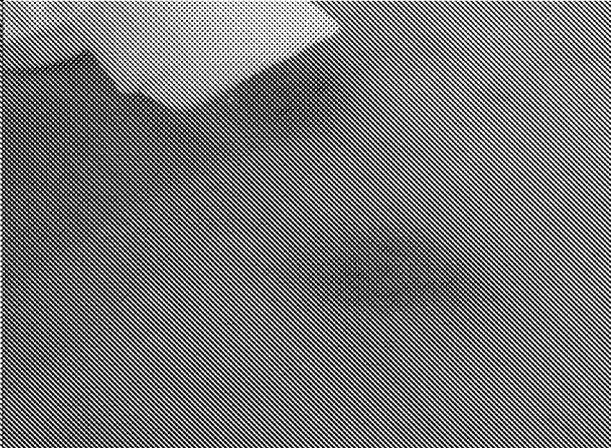
Paciente	Edad	Inicio	Antecedentes
N°1	74 años	05/04/2018	hipertensión, DM
5 de abril 2018 Lesiones con signos de infección Lesión enrojecida y secreción	12 de abril 2018 Lesiones limpias sin signos de infección Lesión inferior nuevo tejido epitelial.		
			

FIGURA 6

Paciente	Edad	Inicio	Antecedentes
N°2	79 años	05/04/2018	Hipertensión.
5 de abril 2018 Lesión con signos de infección	12 de abril 2018 Lesión con menos enrojecimiento		
			
19 de abril 2018 Leves signos de la lesión.			
			

FIGURA 7

Paciente	Edad	Inicio	Antecedentes
N°3	88 años	05/04/2018	DM
5 de abril 2018 Lesión con signos de infección.		12 de abril 2018 Disminución de enrojecimiento	
			
19 de abril 2018 Ulcera cerrada			

FIGURA 8

Paciente	Edad	Inicio	Antecedentes
Nº4	69 años	05/04/2018	hipertensión, DM
5 de abril 2018 Lesión ulcera con eritema en la periferia	14 de abril 2018 Lesión con disminución en su diámetro Disminuye el eritema en la periferia.		
			

FIGURA 9

Paciente	Edad	Inicio	Antecedentes
N°5	74 años	05/04/2018	Hipertensión
5 de abril 2018 Lesión infectada eritematosa Con secreción.		19 de abril 2018 Lesión con signos de mejoría	
			

FIGURA 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2018/050042

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (CIP): A61K 47/36, A61K 47/48, A61B 17/08 (2018.01) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) (CIP): A61K 47/36, A61K 47/48, A61B 17/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) STNext, PATENTINSPIRATION, GOOGLE PATENTS, PUBMED, ESP@CENET		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	WO 2017/001808 A1 (UNIVERSITE DE LILLE 1, SCIENCES ET TECHNOLOGIES) 05/01/2017 The whole document	1, 2, 4, 5, 7-11 1-12
Y	DAI, T. et al. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2011, vol. 9, no 7, p. 857-879. DOI: 10.1586/eri.11.59 The whole document	12
Y	MANIKANDAN, A. & SATHIYABAMA, M. Green Synthesis of Copper-Chitosan Nanoparticles and Study of its Antibacterial Activity. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 2014, vol. 6, p. 1-6. DOI: 10.4172/2157-7439.1000251 The whole document	1-12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 November 2018 (30.11.2018)		Date of mailing of the international search report 07 December 2018 (07.12.2018)
Name and mailing address of the ISA/ CL Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2018/050042

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 2014/0377331 A1 (CG BIO CO., LTD) 25/12/2014 The whole document	1, 3-6, 9-12
A	GARCÍA M.C. et al. Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin. Carbohydrate Polymers, 2017, vol. 175, p. 75-86. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.07.053 The whole document	
A	CÁRDENAS, G. et al. Colloidal Cu nanoparticles/chitosan composite film obtained by microwave heating for food package applications. Polymer Bulletin, 2009, vol. 62, no 4, p. 511-524. DOI: 10.1007/s00289-008-0031-x The whole document	
A	ABDELGHANY, S.M. et al. Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards Pseudomonas aeruginosa infection. International Journal of nanomedicine, 2012, vol. 7, p. 4053-4063. DOI: 10.2147/IJN.S34341 The whole document	
A	US 2008/0147019 A1 (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, INC.) 19/06/2008 The whole document	
A	LEÓN, Y. et al. Synthesis and characterizations of metallic nanoparticles in chitosan by chemical reduction. Journal of the Chilean Chemical Society, 2017, vol. 62, no 4, p. 3760-3764. DOI: 10.4067/s0717-9707017000403760 The whole document	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CL2018/050042

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

- 1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

- 2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

- 3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

(Box III)

The application relates to the treatment of cutaneous infections, particularly bacterial and fungal cutaneous infections, such as neuropathic ulcers or diabetic foot, which can also be used on wounds that require the restoration of epidermal or dermal tissues, neovascularisation and histopathological neoangiogenesis (see the first paragraph on page 1 of the application). The set of claims consists of the following independent claims:

Claim 1 defines a method for obtaining a biodegradable gel comprising chitosan, antibiotics and/or metal nanoparticles; claim 4 relates to a biodegradable gel comprising a polymer matrix of chitosan, antibiotics and/or metal nanoparticles; and claim 10 relates to the use of the biocompatible biodegradable gel described, for the treatment of bacterial cutaneous infections.

The aforementioned gels share the common feature of consisting of chitosan and being suitable for use in the treatment of bacterial cutaneous infections. However, as a result of an a posteriori analysis, it is concluded that this common feature is already known in the prior art (see document D1, which describes a method for synthesising a hydrogel comprising chitosan and antibiotics, which is suitable for use in the treatment of bacterial cutaneous infections). Consequently, the above cannot be considered as a common inventive concept and, therefore, the application lacks unity of invention.

In view of the foregoing, the following three groups of inventions have been identified:

GROUP 1 (claims 1, 2, 4, 5, 7-12 in part): method for obtaining a biodegradable gel comprising chitosan and antibiotics, said biodegradable gel, and the use thereof for the treatment of bacterial cutaneous infections.

GROUP 2 (claims 1, 3-6 and 9-12 in part): method for obtaining a biodegradable gel comprising chitosan and metal nanoparticles, said biodegradable gel, and the use thereof for the treatment of bacterial cutaneous infections.

GROUP 3 (claims 1-12 in part): method for obtaining a biodegradable gel comprising chitosan, antibiotics and metal nanoparticles, said biodegradable gel, and the use thereof for the treatment of bacterial cutaneous infections.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CL2018/050042

WO 2017/001808 A1	05/01/2017	CA 2991000 A1	05/06/2017
		FR 3038318 A1	06/06/2017
		CN 107949598 A	20/04/2018
		EP 3317326 A1	09/05/2018
		US 2018/0186939 A1	05/07/2018
		JP 2018519120 A	19/07/2018

US 2014/0377331 A1	25/12/2014	WO 2013/109004 A1	25/07/2013
		KR 20130085245 A	29/07/2013
		CN 104080487 A	01/10/2014
		EP 2805734 A1	26/11/2014

US 2008/0147019 A1	19/06/2008	WO 2008/075222 A1	26/06/2008
--------------------	------------	-------------------	------------

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050042

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

(CIP): A61K 47/36, A61K 47/48, A61B 17/08 (2018.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

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

(CIP): A61K 47/36, A61K 47/48, A61B 17/08

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) **STNext, PATENTINSPIRATION, GOOGLE PATENTS, PUBMED, ESP@CENET**

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
X Y	WO 2017/001808 A1 (UNIVERSITE DE LILLE 1, SCIENCES ET TECHNOLOGIES) 05/01/2017 Todo el documento	1, 2, 4, 5, 7-11 1-12
Y	DAI, T. et al. Chitosan preparations for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects. Expert Review of Anti-infective Therapy, 2011, vol. 9, no 7, p. 857-879. DOI: 10.1586/eri.11.59 Todo el documento	12
Y	MANIKANDAN, A. & SATHIYABAMA, M. Green Synthesis of Copper-Chitosan Nanoparticles and Study of its Antibacterial Activity. Journal of Nanomedicine & Nanotechnology, 2014, vol. 6, p. 1-6. DOI: 10.4172/2157-7439.1000251 Todo el documento	1-12

En la continuación del Recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el Anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T"	documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.		
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.		
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"X"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	"Y"	documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a o tro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	"&"	documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 30/11/2018	30/noviembre/2018	Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional 07/12/2018	07/diciembre/2018
---	-------------------	---	-------------------

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional INAPI, Av. Libertador Bernardo O'Higgins 194, Piso 17, Santiago, Chile	Funcionario autorizado NAVARRO, Claudio
N° de fax	N° de teléfono 56-2-28870551

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050042

C (continuación). DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones N°
Y	US 2014/0377331 A1 (CG BIO CO., LTD) 25/12/2014 Todo el documento	1, 3-6, 9-12
A	GARCÍA M.C. et al. Bioadhesive and biocompatible films as wound dressing materials based on a novel dendronized chitosan loaded with ciprofloxacin. Carbohydrate Polymers, 2017, vol. 175, p. 75-86. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.07.053 Todo el documento	
A	CÁRDENAS, G. et al. Colloidal Cu nanoparticles/chitosan composite film obtained by microwave heating for food package applications. Polymer Bulletin, 2009, vol. 62, no 4, p. 511-524. DOI: 10.1007/s00289-008-0031-x Todo el documento	
A	ABDELGHANY, S.M. et al. Gentamicin-loaded nanoparticles show improved antimicrobial effects towards Pseudomonas aeruginosa infection. International Journal of nanomedicine, 2012, vol. 7, p. 4053-4063. DOI: 10.2147/IJN.S34341 Todo el documento	
A	US 2008/0147019 A1 (KIMBERLY-CLARK WORLDWIDE, INC.) 19/06/2008 Todo el documento	
A	LEÓN, Y. et al. Synthesis and characterizations of metallic nanoparticles in chitosan by chemical reduction. Journal of the Chilean Chemical Society, 2017, vol. 62, no 4, p. 3760-3764. DOI: 10.4067/s0717-9707017000403760 Todo el documento	

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050042

Recuadro II Observaciones cuando se estime que algunas reivindicaciones no pueden ser objeto de búsqueda (continuación del punto 2 de la primera hoja)

Este informe de búsqueda internacional no se ha realizado en relación a ciertas reivindicaciones según el Artículo 17.2)a) por los siguientes motivos:

1. Las reivindicaciones N°s:
se refieren a un objeto con respecto al cual esta Administración no está obligada a proceder a la búsqueda, a saber:

2. Las reivindicaciones N°s:
se refieren a elementos de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos establecidos, de tal modo que no pueda efectuarse una búsqueda provechosa, concretamente:

3. Las reivindicaciones N°s:
son reivindicaciones dependientes y no están redactadas de conformidad con los párrafos segundo y tercero de la Regla 6.4.a).

Recuadro III Observaciones cuando falta unidad de invención (continuación del punto 3 de la primera hoja)

La Administración encargada de la búsqueda internacional ha detectado varias invenciones en la presente solicitud internacional, a saber:
Ver Hoja Adicional

1. Dado que todas las tasas adicionales requeridas han sido satisfechas por el solicitante dentro del plazo, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda.
2. Dado que todas las reivindicaciones que pueden ser objeto de búsqueda podrían serlo sin realizar un esfuerzo que justifique tasas adicionales, esta Administración no requirió el pago de tasas adicionales.
3. Dado que tan sólo una parte de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha dentro del plazo por el solicitante, el presente informe de búsqueda de tipo internacional comprende solamente aquellas reivindicaciones respecto de las cuales han sido satisfechas las tasas, concretamente las reivindicaciones N°s:
4. Ninguna de las tasas adicionales requeridas ha sido satisfecha por el solicitante dentro de plazo. En consecuencia, el presente informe de búsqueda de tipo internacional se limita a la invención mencionada en primer término en las reivindicaciones, cubierta por las reivindicaciones N°s:

Indicación en cuanto a la protesta

- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante y, en su caso, el pago de una tasa de protesta.
- Se acompañó a las tasas adicionales la protesta del solicitante, pero la tasa de protesta aplicable no se pagó en el plazo establecido en el requerimiento.
- El pago de las tasas adicionales no ha sido acompañado de ninguna protesta.

(Recuadro III)

La solicitud está relacionada con el tratamiento de infecciones cutáneas, especialmente bacterianas y fúngicas como úlceras neuropáticas o pie diabético, útiles además en heridas que requieran restauración de tejidos epidérmicos, dérmicos, neovascularización y neoangiogénesis histopatológica (ver 1er párrafo de la página 1 de la solicitud). El pliego está formado por las siguientes cláusulas independientes:

La reivindicación 1 define un método de obtención de un gel biodegradable que comprende quitosano, antibióticos y/o nanopartículas metálicas; la reivindicación 4 hace referencia a un gel biodegradable que comprende una matriz polimérica de quitosano, antibióticos y/o nanopartículas metálicas; y la reivindicación 10 relacionada al uso del gel biodegradable y biocompatible descrito, para el tratamiento de infecciones cutáneas bacterianas.

Los geles antes descritos tienen como característica común estar compuestos por quitosano y resultar útiles para el tratamiento de infecciones cutáneas bacterianas. No obstante, como resultado de un análisis a posteriori, se concluye que dicha característica común ya es conocida en el arte previo (ver documento D1, que describe un método para sintetizar un hidrogel que comprende quitosano y antibióticos, que resulta útil para el tratamiento de infecciones cutáneas bacterianas). De esta forma, lo anterior no puede ser considerado como un Concepto Común Inventivo, y, en consecuencia, la solicitud presenta falta de Unidad de Invención.

Como resultado de lo anterior, se han identificado 3 grupos de invenciones:

GRUPO 1 (reivindicaciones 1,2,4,5,7-12 de manera parcial): método de obtención de un gel biodegradable que comprende quitosano y antibióticos, dicho gel biodegradable, y su uso para el tratamiento de infecciones cutáneas bacterianas.

GRUPO 2 (reivindicaciones 1, 3-6 y 9-12 de manera parcial): método de obtención de un gel biodegradable que comprende quitosano y nanopartículas metálicas, dicho gel biodegradable, y uso de este para el tratamiento de infecciones cutáneas bacterianas.

GRUPO 3 (reivindicaciones 1-12 de manera parcial): método de obtención de un gel biodegradable que comprende quitosano, antibióticos y nanopartículas metálicas, dicho gel biodegradable, y su uso para el tratamiento de infecciones cutáneas bacterianas.

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional N°

PCT/CL2018/050042

Documento de patente citado en Informe de Búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de Familia	Fecha de Publicación
WO 2017/001808 A1	05/01/2017	CA 2991000 A1	05/06/2017
		FR 3038318 A1	06/06/2017
		CN 107949598 A	20/04/2018
		EP 3317326 A1	09/05/2018
		US 2018/0186939 A1	05/07/2018
		JP 2018519120 A	19/07/2018
US 2014/0377331 A1	25/12/2014	WO 2013/109004 A1	25/07/2013
		KR 20130085245 A	29/07/2013
		CN 104080487 A	01/10/2014
		EP 2805734 A1	26/11/2014
US 2008/0147019 A1	19/06/2008	WO 2008/075222 A1	26/06/2008