

# **QUÍMICA**

## **CLASIFICACIÓN 1**

## DESCRIPCIÓN

Biomaterial con osteostatina para regeneración ósea e ingeniería tisular.

### 5 Sector de la técnica

La presente invención se encuadra en el campo técnico de fabricación de materiales osteoinductores para regeneración ósea e ingeniería tisular. De manera más concreta, la invención se refiere a la síntesis de biomateriales osteoinductores formados por una biocerámica bioactiva en la que se inmoviliza un péptido con propiedades que impulsan la osteogénesis, lo que da lugar a un producto con propiedades osteoformadoras. La molécula inmovilizada es el pentapéptido formado por la secuencia de aminoácidos 107 a 111 (Treonina-Arginina-Serina-Alanina-Triptófano, TRSAW) de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP), pentapéptido también conocido como osteostatina. Como matriz en la que se va a inmovilizar y liberar la PTHrP (107-111), se utilizan las biocerámicas bioactivas. El resultado de la invención es susceptible de utilizarse en aplicaciones clínicas que requieran biomateriales para promover regeneración ósea y osteointegración, como los defectos óseos producidos por la extracción quirúrgica de tumores o quistes, y traumatismos en situación normal u osteopélica.

### Estado de la técnica

La reparación del daño óseo, a diferencia de lo que ocurre en la mayoría de los órganos que tras un daño desarrollan una cicatrización fibrosa como paso previo a su normalización de aspecto y función, implica la formación de un nuevo tejido óseo, indistinguible del sano, a través de un proceso que remeda al desarrollo óseo embrionario (*Deschaseaux y cols. Trends Mol Med, 2009. 15:417-29*). Sin embargo, existen situaciones de daño osteoarticular con frecuencia irreversible, tales como las fracturas (sobre todo en presencia de osteopenia/osteoporosis), que justifican una demanda cada vez mayor de herramientas de ingeniería tisular para acelerar la regeneración ósea. Entre ellas, se han utilizado a este respecto una variedad de factores de crecimiento, aunque ninguno ideal (*Ohba y cols. IBMS BoneKEy 2009; 6:405-19*).

La PTHrP y su receptor, el receptor de PTH tipo 1 (PTHR1), se expresan en los condrocitos y en los osteoblastos; este sistema ejerce un importante papel modulador de la formación ósea en el feto y en el adulto (*Bisello y cols. Endocrinology 2004; 145: 3551-3*). La administración intermitente del fragmento N-terminal 1-36 de la PTHrP, que interacciona con el PTHR1 en los osteoblastos, aumenta la masa ósea actuando sobre la formación ósea en situación de depleción estrogénica tanto en animales como en humanos (*Stewart y cols. J Bone Miner Res 2000; 15:1517-25; Horwitz y cols. J Clin Endocrinol Metab 2003; 88:569-75; Horwitz y cols. J Clin Endocrinol Metab 2010; 95:1279-87*).

Por otra parte, estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado que el fragmento C-terminal 107-139 de la PTHrP, que puede generarse *in vivo* por rotura proteolítica de la proteína intacta, posee una potente acción antiresortiva atribuida a su epítipo N-terminal 107-111 -formado por la secuencia de aminoácidos Treonina-Arginina-Serina-Alanina-Triptófano (TRSAW) en humano y roedores, conocida como osteostatina- a través de sus efectos directos sobre la formación y la actividad de los osteoclastos (*Fenton y cols. Endocrinology 1991; 129: 1762-8; Cornish y cols. Endocrinology 1997; 38:1299-304*). De ahí que se haya propuesto la utilización del péptido TRSAW en el tratamiento de patologías en las que está indicada la inhibición de la resorción ósea (ES2135398T3).

Un estudio inicial en ratas ovariectomizadas para determinar la relación entre su efecto antiresortivo y una posible acción que impulsa la osteogénesis de este fragmento C-terminal de la PTHrP condujo a resultados no concluyentes (*Rouffet y cols. Reprod Nutr Dev 1994; 34:473-81*). Sin embargo, recientemente, se ha demostrado que ratones con delección de ambas regiones, media y C-terminal, de la PTHrP presentan osteoporosis y una disminución de la formación ósea (*Miao y cols. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105: 20309-14*). Además, en un estudio reciente, se ha demostrado que la administración subcutánea cada 2 días, durante 2 semanas, del fragmento nativo PTHrP (107-139), de modo similar a la del fragmento N-terminal PTHrP (1-36), revierte los efectos deletéreos de la 3-metilprednisolona y de la diabetes mellitus tipo 1 sobre la regeneración ósea tras la ablación medular en ratones [*Lozano y cols. Endocrinology 2009; 150:2027-2035; Fernández de Castro y cols. Tissue Eng Part A. 2009 Oct 27. [Epub ahead of print] PMID: 19860552; Lozano y cols. Bone 44 (Suppl. 2):S355, 2009*]. Por otra parte, la mayoría de los datos obtenidos *in vitro* en cultivos de células osteoblásticas indican que la PTHrP (107-139) y la osteostatina incrementan el crecimiento y la viabilidad así como la diferenciación de los osteoblastos (*Valín y cols. Endocrinology 2001; 142: 2752-9; Guillén y cols. J Biol Chem 2002; 277:28109-17; de Gortázar y cols. Calcif Tissue Int 2006; 79:360-9; Alonso y cols. J Cell Physiol 2008; 217:717-27; Lozano y cols. Acta Biomater. 2010; 6: 797-803*). Aunque el receptor mediador de los efectos de la PTHrP (107-111) en los osteoblastos es aún desconocido, este péptido parece interaccionar con el receptor del factor vascular del endotelio tipo 2 (*de Gortázar y cols. Calcif Tissue Int 2006; Alonso y cols. J Cell Physiol 2008*).

Los hallazgos expuestos demuestran las propiedades que impulsan la osteogénesis de la PTHrP (107-139) a través de su epítipo 107-111 por interacción con los osteoblastos. Estas observaciones abren nuevas aproximaciones experimentales en ingeniería tisular para promover la reparación ósea.

## Descripción de la invención

La presente invención se refiere a biocerámicas capaces de interactuar con el tejido óseo cuando se implantan, es decir bioactivas, en las que se inmoviliza el péptido correspondiente a la secuencia 107-111 (TRSAW) (caracterizado por SEQ ID NO: 2) de la proteína relacionada con la parathormona (PTHrP) (caracterizada por SEQ ID NO: 1).

La proteína PTHrP se ha descrito en diferentes especies animales entre las que se encuentran varios mamíferos, incluida la especie humana. Se trata de una proteína muy conservada y, en mamíferos, el péptido TRSAW se mantiene en la misma posición, es decir, la secuencia 107-111 de la PTHrP (Figura 2). En la presente invención se han utilizado como modelos la PTHrP humana (SEQ ID NO: 1) y el péptido PTHrP (107-111) (SEQ ID NO: 2) humano en representación de la proteína y el péptido de los animales mamíferos.

En esta invención se entiende por “biocerámicas bioactivas *in vivo*” aquellas cerámicas que, cuando se implantan en tejido vivo, inducen la formación de una unión mecánicamente fuerte entre la biocerámica y el tejido circundante. Aunque para algunas biocerámicas con muy alta bioactividad, particularmente ciertos vidrios, se ha descrito su capacidad de unirse también a tejidos blandos, en general, el término “bioactividad” se aplica a aquellos materiales que son capaces de unirse al hueso, evitando la formación de una cápsula fibrosa, y es así como va a utilizarse en el ámbito de esta patente.

La bioactividad de una biocerámica puede evaluarse mediante medidas mecánicas, comprobando la fortaleza de la unión entre la biocerámica y el hueso, y por estudios histológicos, comprobando la ausencia de tejido fibroso interpuesto entre la biocerámica y el tejido óseo. Para definir el grado de bioactividad de una biocerámica bioactiva *in vivo*, se ha propuesto un índice de bioactividad,  $I_B$ , definido como  $I_B = 100/t_{0.5bb}$ , donde  $t_{0.5bb}$  es el tiempo necesario para que más del 50% de la superficie del implante se haya unido al hueso (Hench, in: *Bioceramics. Materials Characteristics Versus In Vivo Behavior*, Vol. 523, eds. P. Ducheyne et al *Annals of New York Academy of Sciences*, New York, 1988, p. 54). El material para el que se ha observado mayor índice de bioactividad es el Bioglass®45S5 con un  $I_B$  de 12,5, lo que significa que tras 8 días de implantación, más de la mitad del implante se ha unido al hueso. Para el resto de las biocerámicas bioactivas *in vivo*, como la hidroxiapatita o la vitrocerámica apatita/wollastonita, se necesita un mes para llegar a esa situación, por tanto, tienen un  $I_B$  en torno a 3. Las cerámicas no bioactivas como la alúmina o la circona tienen un  $I_B = 0$  ya que nunca llegan a enlazarse al hueso.

Por otra parte, para agilizar el análisis de las nuevas cerámicas candidatas a materiales bioactivos implantables y minimizar el sufrimiento de los animales de experimentación, se propuso evaluar previamente las biocerámicas sumergiéndolas en disoluciones que simularan al plasma sanguíneo (Ogino y cols. 1980; *J Biomed Mater Res* 14: 55-64, Kokubo y cols. *J Biomed Mater Res* 1990; 24: 721-34). Dichos ensayos, son denominados a veces ensayos de “bioactividad *in vitro*” y permiten preseleccionar las biocerámicas más prometedoras para proseguir el estudio en cultivos celulares y modelos animales. En estos estudios se mide el tiempo necesario para que la biocerámica se recubra de una capa de nanocristales de hidroxicarbonato apatita (HCA) análogos a los del hueso, tras permanecer en un fluido biológico simulado. La validez de estos ensayos proviene de la hipótesis que considera que aquellos materiales cuya reactividad facilite la formación *in vitro* de HCA serán capaces de enlazarse firmemente al hueso cuando se implanten. Existe alguna controversia a este respecto, pues se ha encontrado que el comportamiento de algunas biocerámicas contradice dicha hipótesis. Sin embargo, estos ensayos están muy generalizados y han dado origen a una categoría de biocerámicas que en esta patente denominaremos “biocerámicas bioactivas *in vitro*” que son aquellas que se recubren de HCA tras permanecer en un fluido simulado, pero cuyo comportamiento *in vivo* aún no se conoce. Son diversos los fluidos y protocolos utilizados para estudiar la “bioactividad *in vitro*”, pero la mayoría de los autores utilizan el “Simulated Body Fluid” (SBF) propuesto por Kokubo T (*Biomaterials* 1991; 12: 155-63) y protocolos que suelen presentar variaciones pequeñas respecto al detallado por Kokubo y Takadama (*Biomaterials* 2006; 27: 2907-2915). En la mayor parte de las biocerámicas bioactivas *in vitro*, la deposición de HCA requiere entre 3 y 7 días. Sin embargo, hay biocerámicas que necesitan más de 14 días; mientras que para ciertos vidrios con mesoporosidad ordenada obtenidos con una plantilla orgánica, se ha detectado la capa HCA tras sólo 8 horas en SBF (López-Noriega y cols. *Chem Mat* 2006; 18: 3137-44), para otros materiales mesoporosos de sílice se ha visto que son necesarios 30 ó, incluso, 60 días (Izquierdo-Barba y cols. *Solid State Sci* 2005; 7: 983-989).

Si bien en la literatura científica se aplica el adjetivo “bioactivo” a una gran variedad de cerámicas, incluyendo algunas cuya bioactividad no se ha probado *in vivo* y que, *in vitro*, tardan largos periodos de tiempo en deponer en su superficie una capa de HCA, en el contexto de esta invención, con ánimo de ser estrictos, se consideran y denominan “biocerámicas bioactivas *in vitro*” aquellas en las que la deposición de la capa de HCA al permanecer en fluidos corporales simulados estándares, tiene lugar en menos de 15 días de incubación.

La invención se extiende tanto a las biocerámicas bioactivas *in vivo* aprobadas para uso clínico que ya han mostrado bioactividad tras ser implantadas, como a otras desarrolladas más recientemente, para las que sólo se sabe que son bioactivas en condiciones *in vitro*. Las biocerámicas bioactivas *in vivo* comerciales se pueden agrupar en tres grupos:

- Fosfatos de calcio. En esta categoría se incluyen la hidroxiapatita, la hidroxicarbonato apatita, la hidroxiapatita dopada con silicio o la hidroxicarbonato apatita conteniendo matriz orgánica de origen natural. Todos estos fosfatos de calcio pueden presentar diferente: (i) tamaño de cristal: que puede variar desde unos pocos micrómetros, hasta tamaño nanométrico, como el de las apatitas biológicas, (ii) porosidad y superficie específica, (iii) cantidad y tipo de sustituyentes y (iv) origen: pueden ser sintéticos o naturales, en este último caso proceden-

tes de animales o de corales. Diversas biocerámicas bioactivas basadas en fosfatos de calcio se comercializan bajo nombres comerciales como: Osteograft<sup>®</sup>, Frios<sup>®</sup>, Norian<sup>®</sup> SRS, Apatos<sup>®</sup>, Gen-Os<sup>®</sup>, Putty<sup>®</sup>, Laddec<sup>®</sup>, Endobon<sup>®</sup>, Easygraft<sup>®</sup>, Actifuse<sup>®</sup> ABX o Pro Osteen<sup>®</sup>.

- 5 - Biovidrios. La mayoría de los vidrios bioactivos comerciales se obtienen por fusión y enfriamiento rápido. En este caso el contenido en SiO<sub>2</sub> es cercano al 50%. Están empezando a comercializarse vidrios obtenidos por sol-gel que, por su gran porosidad y superficie específica, pueden presentar bioactividad hasta el 90% en SiO<sub>2</sub>. A continuación, se indican algunos biovidrios comerciales y su composición, expresada como porcentajes en peso, todos ellos obtenidos por fusión, excepto TheraGlass<sup>®</sup> por sol-gel: Novabone<sup>®</sup>45S5: 46.1% SiO<sub>2</sub> - 24.4% Na<sub>2</sub>O - 26.9% CaO - 2.6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; Bioactive glass 13-93: 54.6% SiO<sub>2</sub> - 6% Na<sub>2</sub>O - 22.1% CaO - 1.7% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> - 7.9% K<sub>2</sub>O - 7.7% MgO; BoneAlive<sup>®</sup> S53P4: 53.86% SiO<sub>2</sub> - 22.65% Na<sub>2</sub>O - 21.77% CaO - 1.72% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; Stronbone<sup>®</sup>: 44.47% SiO<sub>2</sub> - 27.26% Na<sub>2</sub>O - 21.47% CaO - 2.39% SrO - 4.42% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> o TheraGlass<sup>®</sup>: 70 mol% SiO<sub>2</sub> - 30% CaO.
- 10
- 15 - Biovitrocerámicas. Al desvitrificar parcialmente un vidrio se obtienen vitrocerámicas con menor bioactividad pero con mejor comportamiento mecánico que el vidrio de partida. A continuación se citan algunas biovitrocerámicas comerciales junto con la fase/fases cristalinas formadas en la desvitrificación: Ceravital<sup>®</sup>: apatita; Cerabone<sup>®</sup> A/W: apatita y wollastonita; Ilmaplant<sup>®</sup>: apatita y wollastonita; Bioverit<sup>®</sup> I: apatita y flogopita; Bioverit<sup>®</sup> II: mica y cordierita.
- 20

En cuanto a las biocerámicas en proceso de estudio que han mostrado bioactividad *in vitro* se incluyen expresamente los vidrios de mesoporosidad ordenada obtenidos con una plantilla orgánica, algunos de los cuales sólo tardan 8 horas en recubrirse de HCA. La invención también se extiende a materiales híbridos orgánico-inorgánicos que presentan bioactividad *in vitro* con interesantes propiedades mecánicas y de disolución para aplicaciones clínicas específicas. Entre ellos los pertenecientes a los sistemas CaO-SiO<sub>2</sub>-polidimetilsiloxano y CaO-SiO<sub>2</sub>-polivinil alcohol (*Salinas y cols. Key Eng. Mat. 2004: 254-256: 481-484*) y otros sistemas relacionados (*Manzano y cols. Prog Sol Stat Chem 2006; 34: 267-277, Colilla y cols. Chem. Mater. 2006; 18: 5676-5683, Salinas y cols. Chem Mater 2009; 21: 41-47*) o los llamados geles estrella (“star gels”) por su característica estructura que produce unas destacadas propiedades mecánicas (*Manzano y cols. Chem Mater 2006; 18: 5696-5703*).

25

30

Las principales aplicaciones de las biocerámicas bioactivas son el relleno de defectos óseos y periodontales, la fabricación de piezas pequeñas y el recubrimiento de prótesis. En el tratamiento de defectos óseos producidos por diversas patologías o traumatismos, hay situaciones (p.e., cuando dichos defectos superan un cierto tamaño, alcanzando la consideración de defectos críticos) en las que es necesario utilizar técnicas de ingeniería tisular para promover la regeneración ósea. En este sentido, es necesario un material que aporte propiedades mecánicas y que promueva la osteoregeneración. Por ello, disponer de un procedimiento que confiera carácter osteoinductor a las biocerámicas bioactivas, como el que se describe en esta patente, aumenta sus prestaciones terapéuticas, acortando significativamente el proceso de reparación al aumentar la cantidad y calidad de tejido óseo neoformado. De tal forma, sus aplicaciones en regeneración ósea e ingeniería tisular ósea se amplían, por ejemplo, a: reparación de lesiones locales óseas (osteonecrosis, fracturas y traumatismos), neoformación ósea en defectos dentales y osteoregeneración en sujetos osteopénicos/osteoporóticos.

35

40

En la presente invención, el término osteoinductor se utiliza para designar aquellos materiales cuya actividad induce osteogénesis actuando sobre células osteoprogenitoras y promoviendo su diferenciación a osteoblastos.

45

La unión de la PTHrP (107-111) a una biocerámica bioactiva produce un efecto sinérgico que conduce a materiales con características osteoinductoras, por tanto con condiciones mejoradas con respecto a cada uno de los elementos por separado, con propiedades y características idóneas para aplicaciones de ingeniería tisular ósea. En primer lugar, le confiere carácter local, ya que actúa fundamentalmente en el sitio de implantación, lo que permite disminuir la dosis de PTHrP (107-111) y reducir los efectos secundarios potenciales. En segundo lugar, la retención que ejerce la biocerámica sobre el pentapéptido, que produce una liberación retardada y controlada del mismo, puede ser considerada como una nueva propiedad de este pentapéptido que, al contar con un adecuado soporte y una adecuada liberación, proporciona carácter osteoinductor al conjunto “biocerámica + pentapéptido” de la presente invención.

50

Los sistemas biocerámica-PTHrP (107-111) obtenidos presentan propiedades osteoinductoras con independencia del grado de bioactividad *in vivo* o *in vitro* que presente la cerámica soporte del péptido. Ello justifica su utilización para el tratamiento de lesiones óseas. La forma más sencilla de efectuar la carga del péptido se realiza sumergiendo la biocerámica bioactiva en una disolución de PTHrP (107-111), preferentemente en solución salina fosfatada a pH fisiológico, donde se mantiene en agitación entre 12 y 48 horas a 2-10°C. De este modo, la actividad biológica del péptido no se ve afectada tras su inmovilización en la biocerámica a través de interacciones electrostáticas.

55

60

También se describe en esta invención un método para controlar la interacción entre el péptido y la biocerámica, que comprende funcionalizar la superficie de la biocerámica con grupos de diferente naturaleza química, tamaño y afinidad por el agua. La funcionalización química de la superficie de la biocerámica se facilita por la presencia de grupos silanol (Si-OH) en su superficie. Estos grupos están presentes en la mayoría de las biocerámicas que presentan bioactividad (*in vivo* o *in vitro*) que se incluyen en la invención, como los biovidrios, de fusión y sol-gel, las biovitrocerámicas, los vidrios con plantilla o los materiales híbridos orgánico-inorgánicos. La hidroxiapatita y compuestos relacionados carecen de grupos silanol en superficie, pero éstos pueden generarse dopando los materiales con silicio. De esta forma

65

la funcionalización de las biocerámicas puede realizarse con grupos alquílicos apolares de diferente longitud, desde 1 átomo de carbono (C1, -Si-CH<sub>3</sub>) hasta 18 (C18, -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>-CH<sub>3</sub>) pasando por C3, C4, C8, etc. También se puede realizar con grupos polares como: -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH<sub>2</sub>, -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-SH, -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-CN, -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-COOH, -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-Cl, con anillos aromáticos, como -Si-fenilo, -Si-benzilo, y con muchos otros grupos como aminas cuaternarias de cadena corta -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N<sup>+</sup>-(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> o de cadena larga -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-N<sup>+</sup>-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>17</sub>-CH<sub>3</sub>, diaminas conteniendo una primaria y una secundaria, como -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>, conteniendo átomos de fósforo, como -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>-PO-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>, derivados del ácido acrílico -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-OCOC(CH<sub>3</sub>)=CH<sub>2</sub> o incluso dendrímeros de poli(propileno imina) (PPI) con x = 3, 7 y 15, de fórmula -Si-(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-NH-CO-NH-(PPI)-(NH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>, (Vallet-Regí y col. *Angew Chem Int Ed* 2007; 46: 7548-7558 Manzano y cols. *Expert Opin Drug Deliv* 2009; 6:1383-1400; Manzano y Vallet-Regí *J Mater Chem* 2010; 20: 5593-5604). Tras cargar la PTHrP (107-111) en los materiales funcionalizados se obtienen sistemas que también presentan propiedades osteoinductoras. Sin embargo, dichas propiedades varían respecto al material sin funcionalizar y también en función del agente utilizado para la funcionalización.

Alternativamente, el péptido PTHrP (107-111) se puede inmovilizar de forma covalente sobre la superficie de la biocerámica, previamente funcionalizada con grupos amino. El pentapéptido, que puede ser activado en su extremo carboxílico utilizando una carbodiimida, formará un enlace covalente tipo amida con la superficie de la biocerámica que dificultará la lixiviación al medio de la osteostatina.

Los materiales objeto de esta invención pueden manipularse para adaptar su forma física a su uso particular como relleno de defectos periodontales y óseos producidos por tumores o traumatismos y para estimular la reparación ósea en el hueso normal u osteoporótico, elaborando los preparados adecuados. Así, pueden fabricarse con forma de andamios tridimensionales macroporosos, utilizando técnicas de prototipado rápido, o bien compactando los materiales en forma de partículas mediante prensado uniaxial utilizando moldes con la forma y tamaño deseado para las piezas seguido de prensado isostático en frío.

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Efecto osteogénico de la PTHrP (107-111) cargada en distintas biocerámicas utilizando cultivo de células osteoblásticas *in vitro*. A) Mineralización por absorción de rojo de alizarina en las células osteoblásticas de ratón MC3T3-E1 en presencia o ausencia de nanohidroxiapatita dopada con silicio, (nHA-Si), cargada o no con la osteostatina inmovilizada por adsorción a los 12 días de cultivo. B) Mineralización (determinada con rojo de alizarina a los 12 días de cultivo), así como síntesis de colágeno y proliferación (medida por exclusión de azul de tripán) a los 2 días, en células MC3T3-E1 en presencia de HA-Si-NH<sub>2</sub> con PTHrP (107-111) -activada o no con EDC- e inmovilizada por unión covalente o sin el péptido (control), a los 2 días de cultivo. Los resultados (media±EEM) preliminares corresponden a 2 experimentos por duplicado.

Figura 2. Alineamiento de proteínas pertenecientes a la familia de la hormona paratiroidea. Se han alineado algunas de las PTHrP conocidas de mamíferos y aves con la de la especie humana. En el caso de la proteína del gato y de la oveja, la secuencia no está completa. En letra blanca con fondo negro se destaca la identidad del PTHrP (107-111) en las distintas secuencias, que es del 100% en los mamíferos y del 80% en el caso de la secuencia de ave.

### Modo de realización de la invención

La presente invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, los cuales no pretenden ser limitativos de su alcance.

#### Ejemplo 1

##### Inmovilización de la osteostatina por adsorción

Para inmovilizar la osteostatina en la biocerámica hidroxiapatita (HA) dopada con silicio de tamaño de partícula nanométrico, nHA-Si, se sumergió la biocerámica en una disolución del pentapéptido PTHrP (107-111) de concentración 100 nM en solución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico a 4°C durante 24 horas con agitación (Zambonin y col *J Bone Joint Surg* 2000; 82:457-60) en condiciones estériles. Tras ese tiempo, los materiales se secaron al aire a temperatura ambiente en condiciones estériles.

La comprobación de que la carga peptídica había sido efectiva se realizó: bien incluyendo un trazador, [<sup>125</sup>I-[Tyr<sup>116</sup>] PTHrP (107-115)] o similar conteniendo la secuencia 107-111, junto a la osteostatina sin marcar durante la carga, como se ha indicado (Lozano y cols. *Acta Biomater.* 2010; *Acta Biomater.* 6: 797-803); o bien por HPLC de los eluidos tras su concentración y eliminación de sales con cartuchos de C18.

Para determinar la capacidad para impulsar la osteogénesis de nHA-Si cargada o no con la osteostatina, se analizó la mineralización en cultivos de células osteoblásticas de ratón bien caracterizadas: MC3T3-E1. Para ello, las células fueron sembradas a una densidad inicial de 20.000 células/cm<sup>2</sup> en medio α-MEM y SFB al 10%, 1% de penicilina-estreptomina y L-glutamina 5 mM en pocillos de una placa P-6 conteniendo el biomaterial. Las células se cultivaron en medio de diferenciación (con ácido ascórbico 50 μg/ml y β-glicerolfosfato 10 mM) durante 12 días. A continuación, las células se fijaron con etanol 70% durante 1 hora y, posteriormente, se añadió rojo de alizarina 40 mM, pH 4.2,

5 durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las células con tampón salino y agua destilada, la tinción se eluyó con cloruro de cetilpiridinio al 10% en fosfato sódico 10 mM, pH 7.0, midiendo la absorbancia a 620 nm. En la Fig. 1A se describe el aumento de mineralización inducido en estas células por la presencia del péptido de la PTHrP.

## Ejemplo 2

### 10 *Inmovilización covalente de la osteostatina*

15 Se realizó la inmovilización covalente del péptido PTHrP (107-111) sobre la hidroxiapatita dopada con silicio de tamaño nanométrico, nHA-Si, mediante la formación de un enlace tipo amida. Para ello se funcionalizó la superficie de la hidroxiapatita dopada con silicio con grupos amino mediante la condensación de los grupos silanol de la superficie de la biocerámica con aminopropil trietoxisilano (APTES). Para realizar la funcionalización, se sumergieron las piezas de biocerámica, que previamente habían sido secadas durante 2 horas a 90°C, en tolueno y se añadió un exceso de APTES y se puso a reaccionar durante toda la noche a 110°C con agitación magnética. Transcurrido ese tiempo, las piezas fueron lavadas sucesivamente con tolueno, éter y etanol (este último lavado para esterilizar).

20 Por otro lado, el péptido PTHrP (107-111) se activó en su extremo carboxílico usando [1-Etil-3-(3-dimetilamino-propil)carbodiimida] (EDC) en condiciones acuosas. Para ello, se preparó una disolución acuosa tamponada a pH 4.8 (tampón acetato) del péptido PTHrP (107-111) (2 mg/mL) a la que se le añadió un exceso de EDC, agitando a continuación a temperatura ambiente durante 20 minutos. A continuación, las piezas se introdujeron en una disolución acuosa tamponada a pH 8 (tampón fosfato) (previamente lavadas un par de veces con esta misma disolución). A continuación, a cada una de las piezas de la biocerámica se les añadieron 50  $\mu$ L de la disolución de PTHrP (107-111) activado con EDC. Con el objetivo de comparar el efecto activador de la EDC sobre las piezas del mismo material, y siguiendo el mismo protocolo, se añadieron 50  $\mu$ L de disolución del péptido PTHrP (107-111) sin EDC. Los materiales fueron agitados en un agitador orbital durante 12 horas a temperatura ambiente y, posteriormente, lavados sucesivamente con disolución tamponada a pH 8 y, finalmente, se secaron a temperatura ambiente. La carga del péptido fue cuantificada mediante microanálisis y HPLC de los eluidos.

30 Previo a su exposición a los cultivos celulares, los biomateriales se esterilizaron por inmersión en etanol al 70% y/o exposición de una noche a radiación ultravioleta en una cámara de flujo laminar para cultivo celular.

35 Para determinar la capacidad para impulsar la osteogénesis de estas biocerámicas dopadas o no con la osteostatina, las células MC3T3-E1 se sembraron como se ha indicado en el Ejemplo 1 en pocillos de P6 con los distintos biomateriales durante 2 días para analizar la proliferación celular y la síntesis de colágeno. En el primer caso, las células no adheridas recogidas y mezcladas con las adheridas (después de una tripsinización suave) fueron teñidas con azul de tripán al 4% (1:1, v/v). El número total de células se contó en un hemocitómetro. Alternativamente, el crecimiento celular se analizó utilizando un ensayo estándar colorimétrico (*CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous Assay*; Promega, Madison, WI). Del medio condicionado celular (2 ml) se pipetearon 100  $\mu$ L en pocillos de una placa P-96. A continuación, se añadió 40 20  $\mu$ L de una solución que contenía 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio (MTS) y el agente acoplador de electrones etosulfato de fenazina, que combinado con MTS forma una sal estable, incubando durante dos horas. Finalmente, se midió la absorbancia a 490 nm en un lector Opsys MR Reader (Dynerx Technologies, Chantilly, VA).

45 La síntesis de colágeno se analizó con un método estándar (*Sircol<sup>™</sup> collagen assay*, Biocolor, Newtownabbey, Irlanda del Norte). Las células se levantaron de la monocapa raspando y resuspendiendo en tampón salino fosfatado, se centrifugaron a 10.000 g durante 10 minutos y se incubaron en ácido acético 0,5 M durante 30 minutos. El sobrenadante resultante se incubó en agitación con Rojo Sirio (que se une al colágeno tipo I y V) durante 30 minutos, midiendo la absorbancia a 540 nm. La cantidad de colágeno se determinó frente a una curva estándar de concentraciones conocidas de colágeno y se normalizó por el contenido proteico celular. La mineralización se analizó como en el Ejemplo 1.

50 La presencia de osteostatina se asoció con un aumento de la proliferación y de la función osteoblástica (síntesis de colágeno y capacidad de mineralización), respecto a los materiales sin el péptido cargado, en estas células (Fig. 1B).

## REIVINDICACIONES

### 1. Biomaterial que comprende:

- 5
- una biocerámica seleccionada entre el grupo formado por las biocerámicas bioactivas *in vivo* y las biocerámicas cuya bioactividad se determina *in vitro*, en medios de cultivo estándares que simulan fluidos corporales, mediante la detección en menos de 15 días de una capa de nanocristales de hidroxicarbonato apatita sobre la propia biocerámica bioactiva *in vitro*;
- 10
- el péptido PTHrP (107-111), denominado osteostatina y **caracterizado** por SEQ ID NO: 2.

15 2. Biomaterial, según la reivindicación 1, en el que la biocerámica bioactiva *in vivo* seleccionada es un fosfato de calcio, un biovidrio, una biovitrocerámica, un material híbrido orgánico-inorgánicos o un gel estrella.

3. Biomaterial, según la reivindicación 2, en el que el fosfato de calcio seleccionado es la nanoapatita.

20 4. Método para fabricar el biomaterial definido en las reivindicaciones 1-3 que comprende sumergir la biocerámica bioactiva *in vivo* o *in vitro* en una disolución de PTHrP (107-111), entre 12 y 48 horas, a una temperatura de 2-10°C.

5. Método, según la reivindicación 4, que comprende un paso previo de funcionalización de la biocerámica a través de los grupos silanol (Si-OH) que hay en su superficie.

25 6. Método para fabricar el biomaterial definido en las reivindicaciones 1-3 que comprende:

- la funcionalización de la biocerámica mediante un grupo amino;
  - la activación del extremo carboxílico del péptido PTHrP (107-111), **caracterizado** por SEQ ID NO: 2, mediante una carbodiimida;
  - la inmovilización covalente del péptido PTHrP (107-111) **caracterizado** por SEQ ID NO: 2, sobre la superficie de la biocerámica.
- 30

35 7. Uso del biomaterial definido en las reivindicaciones 1-3 o elaborado según los métodos de las reivindicaciones 4-6 en la elaboración de un preparado para regeneración ósea.

40 8. Uso del biomaterial definido en las reivindicaciones 1-3 o elaborado según los métodos de las reivindicaciones 4-6 en la fabricación de un preparado para ingeniería tisular ósea.

9. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-8 en el que la regeneración ósea y/o la ingeniería tisular ósea son necesarias para reparación de lesiones locales óseas y/o neoformación ósea en defectos dentales y osteoregeneración en sujetos osteopénicos/osteoporóticos.

45 11. Uso según cualquiera de las reivindicaciones 7-9 en el que el preparado está indicado para especies animales de mamífero, incluida la especie humana.

50

55

60

65

Fig. 1 A

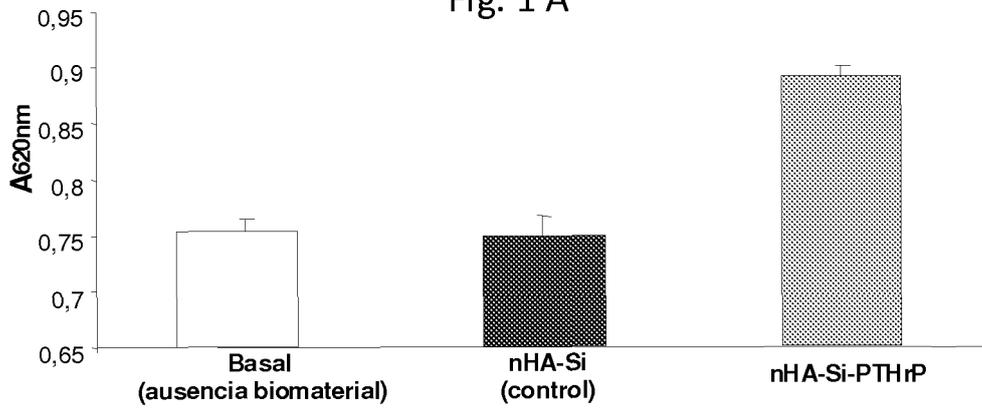


Fig. 1 B

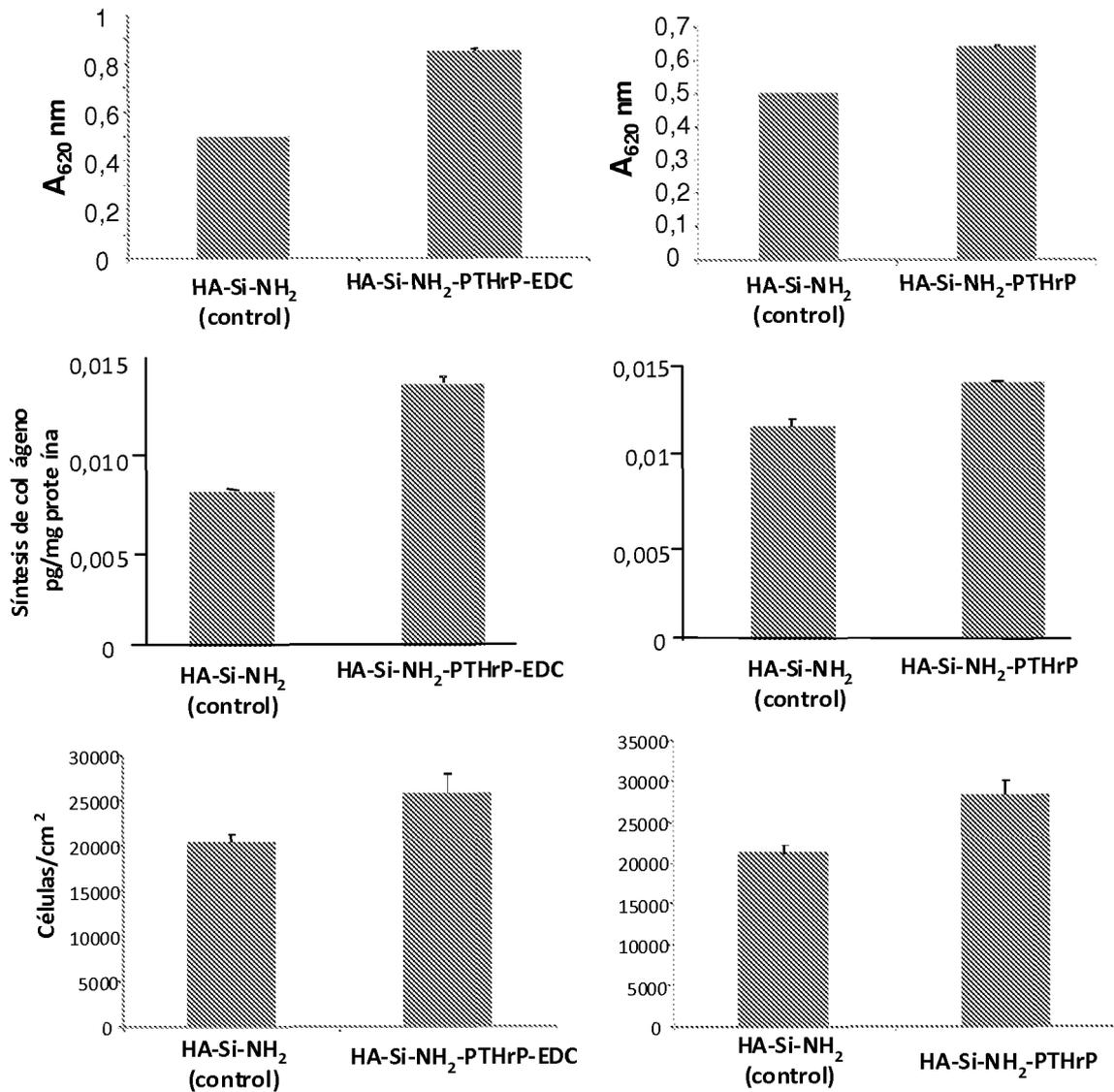
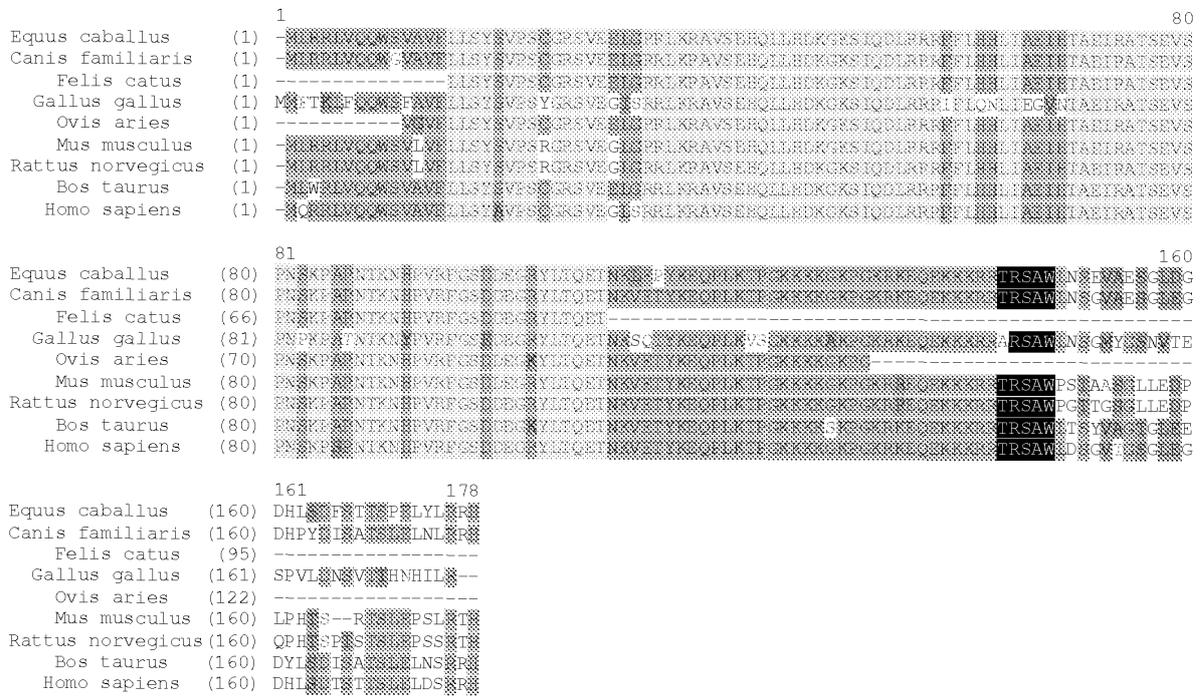


Fig. 2



## LISTA DE SECUENCIAS

- 5 <110> Universidad Complutense de Madrid,  
Fundación Jiménez Díaz,  
Universidad de Alcalá de Henares
- <120> Biomaterial con osteostatina para regeneración ósea e ingeniería tisular
- 10 <160> 2
- <210> 1  
<211> 177
- 15 <212> PRT  
<213> *Homo sapiens*
- <220>  
20 <221> SIGNAL  
<222> (-36)...(-13)
- <220>  
25 <221> PROPEP  
<222> (-12)...(-3)
- <220>  
30 <221> CHAIN  
<222> (1)...(141)
- <220>  
35 <221> SITE  
<222> (107)...(111)  
<223> osteostatina
- 40 <300>  
<301> Suva, L.J., Winslow, G.A., Wettenhall, R.E.H., Hammonds, R.G., Moseley, J.M., Diefenbach-Jagger, H., Rodda, C.P., Kemp, B.E., Rodriguez, H., Chen, E.Y., Hudson, P.J., Martin, T.J. y Wood, W.I.
- 45 <302> A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression  
<303> Science  
<304> 237  
<305> 4817
- 50 <306> 893-896  
<307> 1987  
<308> UniProtKB P12272
- 55 <309> 1989-10-01
- <400> 1
- |    |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|    | Met | Gln | Arg | Arg | Leu | Val | Gln | Gln | Trp | Ser | Val | Ala | Val | Phe | Leu | Leu |
| 60 |     | -35 |     |     |     |     | -30 |     |     |     |     | -25 |     |     |     |     |
|    | Ser | Tyr | Ala | Val | Pro | Ser | Cys | Gly | Arg | Ser | Val | Glu | Gly | Leu | Ser | Arg |
|    | -20 |     |     |     |     | -15 |     |     |     |     | -10 |     |     |     | -5  |     |
|    | Arg | Leu | Lys | Arg | Ala | Val | Ser | Glu | His | Gln | Leu | Leu | His | Asp | Lys | Gly |
| 65 |     |     |     |     | 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |
|    | Lys | Ser | Ile | Gln | Asp | Leu | Arg | Arg | Arg | Phe | Phe | Leu | His | His | Leu | Ile |
|    |     |     | 15  |     |     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |

Ala Glu Ile His Thr Ala Glu Ile Arg Ala Thr Ser Glu Val Ser Pro  
 30 35 40  
 5 Asn Ser Lys Pro Ser Pro Asn Thr Lys Asn His Pro Val Arg Phe Gly  
 45 50 55 60  
 Ser Asp Asp Glu Gly Arg Tyr Leu Thr Gln Glu Thr Asn Lys Val Glu  
 10 65 70 75  
 Thr Tyr Lys Glu Gln Pro Leu Lys Thr Pro Gly Lys Lys Lys Gly  
 80 85 90  
 15 Lys Pro Gly Lys Arg Lys Glu Gln Glu Lys Lys Lys Arg Arg Thr Arg  
 95 100 105  
 Ser Ala Trp Leu Asp Ser Gly Val Thr Gly Ser Gly Leu Glu Gly Asp  
 20 110 115 120  
 His Leu Ser Asp Thr Ser Thr Thr Ser Leu Glu Leu Asp Ser Arg Arg  
 125 130 135 140  
 25 His

<210> 2

<211> 5

30 <212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<300>

35 <301> Suva, L.J., Winslow, G.A., Wettenhall, R.E.H., Hammonds, R.G., Moseley, J.M., Diefenbach-Jagger, H., Rod-  
 da, C.P., Kemp, B.E., Rodriguez, H., Chen, E.Y., Hudson, P.J., Martin, T.J. y Wood, W.I.

<302> A parathyroid hormone-related protein implicated in malignant hypercalcemia: cloning and expression

<303> Science

40 <304> 237

<305> 4817

<306> 893-896

45 <307> 1987

<308> UniProtKB P12272

<309> 1989-10-01

50 <400> 2

Thr Arg Ser Ala Trp  
 1 5

55

60

65

# **QUÍMICA**

## **CLASIFICACIÓN 2**

## DESCRIPCIÓN

Dispositivo y método de depuración de aire por oxidación fotocatalítica

### 5 SECTOR DE LA TÉCNICA

La presente invención se refiere al sector de la técnica de dispositivos empleados para la purificación de aire, en transporte, edificaciones o cualquier circuito de aire, mediante procesos de oxidación fotocatalítica.

10

### ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Las propiedades fotocatalíticas del óxido de titanio, variedad anatasa, son bien conocidas “Titanium Dioxide Nanomaterials: Synthesis, Properties, Modifications, and Applications” de X. Chen y S. Mao. Chem. Rev. 2007, 107, 2891-2959 y “Photoinduced reactivity of titanium dioxide” de O.Carp, C.L.Huisman y A.Reller, Progress in Solid State Chemistry 32 (2004) 33–177. Ya se ha patentado anteriormente un método de oxidación de chapa de titanio con el fin de obtener al mismo tiempo efectos arquitectónicos visuales de color y capacidad catalítica que se encuentra en la patente española ES2616276 “Procedimiento para obtener una chapa de titanio con actividad fotocatalítica”.

20

En el ámbito del transporte y almacenamiento de frutas y verduras la eliminación de eteno o etileno es importante para conservar los alimentos. Para conservar de forma eficiente las frutas y verduras durante las etapas de almacenamiento y transporte refrigerado el etileno debe ser eliminado de las cámaras utilizadas. Este proceso de eliminación de etileno actualmente se realiza de manera comercial:

25

- Utilizando filtros absorbentes que se colocan en bolsas en las cajas o envases de frutas y verduras o en las rejillas de aspiración de los equipos de frío (<https://www.deccoiberica.es/etileno-en-frutas-reducir-perdidas-postcosecha/>).
- Utilizando ozono (O<sub>3</sub>) para oxidar el etileno, inicialmente a óxido de etileno y posteriormente a CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (<https://www.cosemarozono.com/soluciones/higiene-alimentaria/como-eliminar-etileno-fruta/>).
- Utilizando sustancias sólidas oxidantes fuertes como el permanganato de potasio (KMnO<sub>4</sub>) soportadas sobre materiales adsorbentes (zeolitas, sepiolitas, alúmina, perlitas, etc.).

30

- Utilizando compuestos inhibidores de la producción de etileno, como el 1-metilciclopropeno, la aminoetoxi-vinil-glicina o el ácido aminooxiacético (“Etileno y retardantes de la maduración en la postcosecha de productos agrícolas. Una revisión”. REVISTA COLOMBIANA DE CIENCIAS HORTÍCOLAS - Vol. 8 - No. 2 - pp. 302-313, julio-diciembre 2014).

5

## DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Para depurar el aire de compuestos orgánicos y/u otros compuestos oxidables se propone la presente invención en la cual se realiza en una línea de flujo de atmósfera gaseosa en un circuito de circulación de aire un proceso fotocatalítico que comprende al menos una superficie recubierta de un material fotocatalizador, siendo el material fotocatalizador el dióxido de titanio variedad anatasa, y al menos una fuente de radiación ultravioleta. Este dispositivo de depuración realiza el proceso de foto-oxidación de los compuestos orgánicos y/o de aquellos otros compuestos no deseados oxidables.

10

Este método de depuración se puede emplear para eliminar en almacenes y edificaciones, que utilizan sistemas de calefacción/refrigeración por aire, compuestos orgánicos y/u otros compuestos oxidables no deseados. También tiene aplicación para la depuración de aire que no provenga de sistemas de calefacción y/o refrigeración donde se requiera eliminar compuestos orgánicos y/u otros compuestos oxidables en dicho flujo de aire.

15

La presente invención propone el uso de óxido de titanio ( $TiO_2$ ), variedad anatasa, como material fotocatalizador, insertándolo en líneas de flujo gaseosos existentes o creadas exprofeso para esta función descontaminante. Se pretende que pueda ser usada funcionalmente para la eliminación de olores, compuestos orgánicos y/u otros compuestos oxidables en los sistemas de calefacción y aire acondicionado de automóviles, en los sistemas de refrigeración y calefacción por aire de interiores de edificios y en camiones de transporte de productos perecederos, principalmente frutas y verduras.

20

25

Entre los componentes orgánicos foto-oxidables, aunque de diferente origen, podemos incluir el formaldehído (metanal) sobre el cual existe una creciente preocupación ambiental en lo que se ha llegado a llamar “edificios enfermos” y que recientemente están generando amplias investigaciones a nivel arquitectónico.

30

Como se ha indicado anteriormente la presente invención divulga un dispositivo para depuración de aire en atmósferas cerradas en un flujo recirculado y además puede utilizarse en depuración de aire en atmósferas abiertas sin necesidad que el flujo se recircule.

5

El dispositivo de depuración de aire por oxidación fotocatalítica comprende al menos una superficie recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa configurada para estar en contacto con un flujo de aire a depurar. El dispositivo de depuración de aire comprende además al menos una fuente de radiación ultravioleta configurada para iluminar la al menos

10 superficie recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa de modo que se produce la fotooxidación de los compuestos oxidables del aire.

En el método de depuración de aire por oxidación fotocatalítica para eliminar compuestos orgánicos volátiles y/u otros compuestos oxidables en el aire se procede a:

15

- proporcionar un flujo de aire a depurar;
  - poner la al menos una superficie recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa en contacto con el flujo de aire a depurar; y
  - iluminar la al menos una superficie recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa mediante al menos una fuente de radiación ultravioleta.
- 20

## DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Figura 1. Celda de fotocátalisis diseñada y utilizada en los análisis realizados conteniendo en su interior un material fotocatalítico consistente en una chapa de titanio electro-oxidada.

25

Figura 2. Espectros de transmitancia entre  $2000\text{ cm}^{-1}$  y  $4000\text{ cm}^{-1}$  obtenidos para el etileno, la ventana de cuarzo de calidad espectroscópica y el cuerpo de cuarzo.

Figura 3. Evolución temporal de la concentración relativa de la mezcla etileno/nitrógeno en la celda de fotocátalisis sin la chapa de titanio electro-oxidada insertada.

30

Figura 4. Evolución temporal del espectro de absorbancia de  $40\text{ cm}^3$  de la mezcla etileno/nitrógeno en aire en la celda de fotocátalisis con la chapa de titanio electro-oxidada insertada sin recirculación de aire.

35

Figura 5. Evolución temporal de la concentración relativa de 40 cm<sup>3</sup> de la mezcla etileno/nitrógeno en aire en la celda de fotocátalisis sin recirculación de aire.

Figura 6. Celda de fotocátalisis que contiene la chapa de titanio en su interior que funciona como fotorreactor (izquierda) y celda de análisis (derecha).

Figura 7. Evolución temporal del espectro de absorbancia de 40 cm<sup>3</sup> de la mezcla etileno/nitrógeno en aire en la celda de fotocátalisis con recirculación de aire.

Figura 8. Evolución temporal durante el proceso de fotocátalisis de la concentración de etileno oxidado (en Kg/m<sup>3</sup>) por unidad de área de la chapa de titanio electro-oxidada (en m<sup>2</sup>), al añadir 40 cm<sup>3</sup> de la mezcla etileno/nitrógeno a la celda de fotocátalisis con recirculación de aire.

Figura 9. Vista esquemática de una configuración del dispositivo de depuración con la superficie recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa ubicada dentro de un subsistema de depuración conectado en serie con el circuito de circulación que comprende el flujo de aire a depurar.

Figura 10. Vista esquemática de otra configuración posible del dispositivo de depuración donde la superficie recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa se ubica en subsistema de depuración conectado en paralelo con circuito de circulación que comprende el flujo de aire a depurar.

Figura 11. Una superficie interior de un tubo cilíndrico recubierto con óxido de titanio de variedad anatasa y una fuente de radiación ultravioleta que ilumina la superficie recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa.

## DESCRIPCIÓN DE LAS REALIZACIONES

El dispositivo (1) de depuración de aire objeto de la presente invención comprende al menos una superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa. El óxido de titanio de variedad anatasa se puede formar, por ejemplo, electrolíticamente, electroquímicamente o mediante deposición seguido por un tratamiento a una temperatura adecuada. La al menos una superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa está configurada para exponerse a una radiación ultravioleta generada por al menos una fuente (4) de radiación ultravioleta en donde la al menos una fuente (4) de radiación ultravioleta es preferentemente

de bajo consumo, tipo LED o lámparas fluorescentes adecuadas. Todas las superficies (3) recubiertas de óxido de titanio de variedad anatasa están configuradas para estar en contacto con un flujo (5) de aire a depurar. La al menos una fuente (4) de radiación ultravioleta se configura para estar en contacto, o, alternativamente, no estar en contacto con el flujo (5) de  
5 aire a depurar.

La al menos una superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa está diseñada en relación al volumen de aire que se desea depurar, a mayor volumen de aire a depurar, mayor superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa a utilizar o  
10 mayores caudales de flujo de aire.

La inserción de la al menos una superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa en el flujo (5) de aire a depurar e iluminada por la al menos una fuente (4) de radiación ultravioleta da como resultado la oxidación y eliminación de los microorganismos, por foto-  
15 oxidación y de los componentes orgánicos volátiles generados causantes del mal olor.

En una realización el dispositivo (1) de depuración comprende un circuito de circulación (6) de aire de flujo (5) de aire a depurar, en donde el circuito de circulación (6) de aire comprende al menos un dispositivo (60) de refrigeración/calefacción de flujo forzado y en donde el  
20 dispositivo (60) de refrigeración/calefacción de flujo forzado comprende un evaporador (40). El circuito de circulación (6) de aire es un circuito de aire formado por cualquier instalación de circuitos de aire preexistente por ejemplo en edificios o instalaciones de refrigeración en vehículos. La superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa se inserta aguas arriba o aguas abajo del evaporador (40). Preferiblemente se inserta la superficie (3)  
25 recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa a continuación de una etapa de refrigeración debido a que el flujo (5) de aire a depurar estará más saturada en humedad. En concreto se inserta la superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa preferiblemente aguas abajo del evaporador (40), esta configuración se muestra en la Figura 9.

30 Preferiblemente para la eliminación de compuestos orgánicos volátiles y/u otros compuestos oxidables en circuitos de circulación (6) de aire empleados para grandes volúmenes de aire a depurar se procede con aumentar el caudal del flujo (5) de aire a depurar sobre la superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa.

35

En otra realización del dispositivo (1) de depuración la superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa es una superficie que se inserta dentro del dispositivo (60) de refrigeración/calefacción de flujo forzado.

- 5 En otra realización del dispositivo (1) de depuración la superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa es una superficie del dispositivo (60) de refrigeración/calefacción de flujo forzado, como, por ejemplo, unos alabes de ventilador del evaporador (40).

10 En otra realización del dispositivo (1) de depuración la superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa es cualquier superficie ubicada dentro del circuito de circulación (6) de aire expuesta al flujo (5) de aire a depurar. Además la superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa puede ser cualquier superficie nueva añadida a dicho circuito de circulación (6) de aire que esté expuesta al flujo (5) de aire a depurar.

- 15 En otra realización del dispositivo (1) de depuración comprende un circuito de circulación (6) de aire de flujo (5) de aire a depurar, estando la al menos una superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa dispuesta dentro del circuito de circulación (6) de aire.

20 En otra realización del dispositivo (1) de depuración comprende un subsistema de depuración (7) conectado en serie con el circuito de circulación (6) de aire de flujo (5) de aire a depurar, estando la al menos superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa dispuesta dentro del subsistema de depuración (7) (véase Figura 9).

25 En otra realización del dispositivo (1) de depuración comprende el subsistema de depuración (7) conectado en paralelo con el circuito de circulación (6) de aire de flujo (5) de aire a depurar, estando la superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa dispuesta dentro del subsistema de depuración (7) (véase Figura 10).

30 En otro ejemplo de realización el dispositivo (1) de depuración de aire comprende un tubo cilíndrico (8) o de otro perfil. De forma particular en este ejemplo de realización la superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa es una superficie cilíndrica interior (8.1) del tubo cilíndrico (8). El tubo cilíndrico (8) tiene formado electrolíticamente o depositado en su interior óxido de titanio ( $TiO_2$ ), que se trata a una temperatura adecuada para formar la variedad anatasa activa, y que está iluminado interiormente por al menos una fuente (4) de radiación ultravioleta que puede ser, entre otros, al menos una lámpara o al menos un conjunto  
35 de LED configurados para emitir radiación ultravioleta. Estas fuentes (4) de radiación

ultravioleta se pueden utilizar sobre cualquier superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa.

Para que funcione como depurador dicho tubo cilíndrico (8), se debe disponer de forma intercalada, insertada o integrada en una línea de flujo (5) de aire a depurar o corriente gaseosa existente, como las que se encuentran en sistemas de ventilación o refrigeración/calefacción de un automóvil, de un camión o de una vivienda, o en una línea de flujo (5) de aire a depurar creada expresamente para ello, preferentemente a continuación de una etapa de refrigeración, debido a que la corriente gaseosa estará más saturada en humedad. Estando dispuesto el dispositivo (1) de depuración de aire de forma intercalada, insertada o integrada en un flujo (5) de aire a depurar el óxido de titanio de variedad anatasa, que es un fotocatalizador activo, con ayuda de la humedad existente, es capaz de oxidar los compuestos orgánicos existentes en la atmósfera que se pretende depurar, eliminándolos y, con ello, sus efectos negativos (malos olores, por ejemplo).

En un ejemplo de realización el material del tubo cilíndrico (8) puede ser de titanio metálico oxidado electroquímicamente y que, mediante tratamiento a la temperatura adecuada, se transforma en la variedad activa del  $TiO_2$ , anatasa, pudiéndose formar nanotubos de  $TiO_2$  con la ordenación adecuada (mayor superficie activa). El tubo cilíndrico (8) puede ser también de material plástico y pintado internamente con pinturas fotocatalíticas existentes ya en el mercado.

A continuación se detalla otro ejemplo de realización empleado para el desarrollo de la investigación de la presente solicitud. Se emplea este ejemplo de realización para dos configuraciones distintas que pretenden demostrar el funcionamiento mejorado de oxidación de compuestos orgánicos mediante la fotocatalisis generada por el óxido de titanio y las lámparas UV cuando existe una recirculación de aire. La primera configuración esta provista del aire a depurar dentro de una celda (12) de fotocatalisis sin recirculación del aire y la segunda configuración esta provista del aire a depurar dentro de la celda (12) de fotocatalisis y una celda (17) de análisis, en donde se recircula el aire entre la celda (12) de fotocatalisis y la celda (17) de análisis.

La celda (12) de fotocatalisis comprende un cuerpo (16) de cuarzo que tiene un primer extremo longitudinal (18) y un segundo extremo longitudinal (19), en el primer extremo longitudinal (18) se acopla una primera ventana (20) de cuarzo en tapón roscado y en el segundo extremo longitudinal (19) se acopla una segunda ventana (21) de cuarzo, formando así la celda (12) de fotocatalisis una cámara (13) de celda (12) de fotocatalisis. Además, la celda (12) de

fotocatálisis comprende un primer conducto (28) de celda (12) de fotocátalisis y un segundo conducto (29) de celda (12) de fotocátalisis conectados fluidamente con la cámara (13) de celda (12) de fotocátalisis.

5 La celda (17) de análisis comprende un cuerpo (22) de vidrio que tiene un primer extremo longitudinal (23) y un segundo extremo longitudinal (24), en el primer extremo longitudinal (23) se acopla una primera ventana (25) de fluorita y en el segundo extremo longitudinal (24) se acopla una segunda ventana (26) de fluorita, formando así la celda (17) de análisis una cámara (14) de celda (17) de análisis. Además, la celda (17) de análisis comprende un primer  
10 conducto (30) de celda (17) de análisis y un segundo conducto (31) de celda (17) de análisis conectados fluidamente que facilita la entrada y salida de la mezcla gaseosa a analizar, proveniente de la celda (12) de fotocátalisis.

Las dimensiones de la celda (12) de fotocátalisis son 4 cm de diámetro interno y 10 cm de  
15 longitud, formando la celda (12) de fotocátalisis y las dos ventanas (20, 21) la cámara (13) de celda (12) de fotocátalisis. Esta cámara (13) de celda (12) de fotocátalisis se ha utilizado como reactor para estudiar la capacidad fotocatalítica de la superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa aplicado en diferentes soportes y sobre diferentes compuestos oxidables, como los  $\text{NO}_x$  y compuestos orgánicos volátiles, como etileno, demostrando que  
20 pueden ser eliminados y/o transformados a ion nitrato (caso del  $\text{NO}_x$ ), y a  $\text{CO}_2$  y agua en el caso de la materia orgánica.

El volumen total de la cámara (13) de celda (12) de fotocátalisis es de aproximadamente 132  $\text{cm}^3$ . En la Figura 1 se muestra la celda (12) de fotocátalisis diseñada conteniendo en su interior una chapa (15) de titanio electrooxidada como material fotocatalítico.

25 Con el objeto de determinar la zona de medida de la concentración del posible contaminante, se ha de realizar y obtener el espectro infrarrojo (IR) de la celda (12) de fotocátalisis y del contaminante a estudiar. Como ejemplo, se muestran a continuación los espectros de transmitancia tanto de la celda (12) de fotocátalisis vacía como del etileno, véase la Figura 2.  
30 Para la realización dinámica se obtuvo el espectro infrarrojo (IR) de la celda (17) de análisis del mismo modo que se obtuvo para la celda (12) de fotocátalisis mostrado en la Figura 2. Con este fin se utilizó una fuente (50) de radiación infrarroja que ilumina la celda (17) de análisis.

35 El análisis de la gráfica muestra que la celda (12) de fotocátalisis de cuarzo es transparente en la región entre  $3300 \text{ cm}^{-1}$  y los  $2700 \text{ cm}^{-1}$ , zona en la que el etileno presenta bandas de

absorción que pueden, por tanto, ser visualizadas. Como el cuarzo es transparente para la radiación UV la propia celda (12) de fotocátalisis podría ser utilizada para realizar la exposición del material fotocatalítico. El gas utilizado en los experimentos realizados ha sido una mezcla de etileno al 5% en volumen en N<sub>2</sub>.

5

Para la medida de la concentración de etileno se utilizará la ley de Lambert –Beer,  $A = \epsilon \cdot b \cdot c$ , donde A es la absorbancia,  $\epsilon$  es la absortividad molar del compuesto, b es la longitud de la celda y c es la concentración. Para un mismo compuesto y celda, la absorbancia es proporcional a la concentración:  $A = \text{constante} \cdot c$ .

10

Si realizamos medidas de absorbancia A en función del tiempo en un proceso de oxidación catalítica, y las dividimos entre la absorbancia al inicio del análisis A<sub>0</sub>, podemos obtener una medida de la concentración relativa c/c<sub>0</sub>, y determinar con ello la velocidad de la reacción.

$$A/A_0 = c / c_0$$

15

A continuación, con el objeto de determinar las condiciones óptimas de uso y tiempos de utilización, se realizaron varios experimentos.

20

Para comprobar la estanqueidad de la celda (12) de fotocátalisis se llenó totalmente la misma con la mezcla etileno/nitrógeno y se procedió a medir el espectro de absorbancia en función del tiempo para el etileno y obtener así su variación temporal, véase Figura 3. Se puede observar que no hay variación en la concentración relativa c/c<sub>0</sub>, ya que la evolución temporal apenas varía.

25

A continuación, se procede a hacer el análisis en modo estático, sin recirculación de aire y en modo dinámico, con recirculación de aire.

30

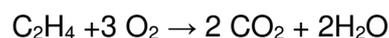
Para comprobar si el proceso funciona en manera estática se introdujo la chapa (15) de titanio electro-oxidada en la celda (12) de fotocátalisis. A continuación se introdujeron en la celda (12) de fotocátalisis, con una jeringa, 40 cm<sup>3</sup> de mezcla etileno/nitrógeno al 5%, luego se expuso la celda (12) de fotocátalisis a radiación ultravioleta mediante una fuente (4) de radiación ultravioleta de forma continuada durante el análisis. Se procedió a medir el espectro de absorbancia en el rango mencionado más arriba entre 3300 y 2700 cm<sup>-1</sup>, correspondiente al etileno, en función del tiempo, véase Figura 4, así como su variación temporal, véase Figura 5. . Según se puede apreciar, la absorbancia relativa varía, disminuyendo, pero levemente. Es por ello por lo que para aumentar la eficacia de la foto-oxidación se recurre a utilizar una

35

doble celda, es decir, una celda (12) de fotocátalisis que funcionará como fotorreactor y otra celda (17) de análisis, impulsando el gas de una a otra mediante una bomba (27) de membrana y con un caudal de 0,00016667 m<sup>3</sup>/s (10 L/minuto).

5 El circuito para el análisis es el siguiente, se conecta el segundo conducto (29) de celda (12) de fotocátalisis con el segundo conducto (31) de celda (17) de análisis mediante una primera tubería (34) que comprende una válvula (33). El primer conducto (30) de celda (17) de análisis se conecta a la bomba (27) de membrana mediante una segunda tubería (35) que comprende una válvula (33). La bomba (27) de membrana se conecta a conecta con el primer conducto  
10 (28) de celda (12) de fotocátalisis mediante una tercera tubería (36), cerrando así el circuito de aire.

La reacción estequiométrica de oxidación sería:



15

Para que la reacción se complete debería haber al menos el triple de cantidad de oxígeno que de etileno en la celda (12) de fotocátalisis, dando igual realizar el cálculo en moles que en volúmenes, considerando los gases como ideales en las condiciones ambientales utilizadas (presión y temperatura ambientales).

20

Con el objeto de comprobar que en las condiciones utilizadas hay suficiente oxígeno para producir la oxidación del etileno inyectado, se realizó un cálculo previo utilizando para ello condiciones normales (25 °C y 1 atm), demostrándose que se está trabajando en esas condiciones.

25

Contenido de O<sub>2</sub> = (V<sub>celda</sub> - V<sub>inyectado</sub>) x Riqueza = (132-40) x 21% = 19,3 cm<sup>3</sup>

Contenido en etileno = V<sub>inyectado</sub> x Riqueza<sub>etileno</sub> = 40 x 5% = 2 cm<sup>3</sup>

30 Para comprobar si el proceso funciona mejor en modo dinámico se introdujo la chapa (15) de titanio electro-oxidada en la celda (12) de fotocátalisis, después se introdujeron en la celda (12) de fotocátalisis, mediante una jeringa, 40 cm<sup>3</sup> de mezcla etileno/nitrógeno y se expuso la celda (12) de fotocátalisis a radiación ultravioleta mediante una lámpara de radiación ultravioleta de forma continuada durante el análisis. La mezcla se hizo recircular, mediante la bomba (27) de membrana con un caudal de 0,00016667 m<sup>3</sup>/s (10 L/minuto), pasando la  
35 mezcla a una celda (17) de análisis (es decir, la celda (17) de análisis de medidas de IR),

véase Figura 6, y se procedió a medir el espectro de absorbancia en función del tiempo para la mezcla etileno/nitrógeno, véase Figura 7, así como su variación temporal, véase Figura 8.

5 Como se puede apreciar en la gráfica, la concentración del etileno va disminuyendo a lo largo del tiempo, evidenciando la degradación por oxidación de la molécula de etileno por la acción del fotocatalizador. Esta degradación es inicialmente más rápida y se va ralentizando con el paso del tiempo.

El ajuste de los datos de la Figura 8 podría aproximarse a la ecuación siguiente:

10  $(c \cdot \text{Área}^{-1}) = 8,8653e^{-0,022 \cdot t}$  con un coeficiente de regresión muy cercano a la unidad ( $R^2 = 0,9985$ ), indicativo de un buen ajuste.

15

## REIVINDICACIONES

1. Dispositivo (1) de depuración de aire por oxidación fotocatalítica caracterizado por que comprende,  
5  
- al menos una superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa configurada para estar en contacto con un flujo (5) de aire a depurar,  
- al menos una fuente (4) de radiación ultravioleta configurada para iluminar la al menos superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa de modo que se produce  
10 la fotooxidación de los compuestos oxidables del aire.
2. Dispositivo (1) de depuración de aire por oxidación fotocatalítica según la reivindicación 1, en donde la al menos una fuente (4) de radiación ultravioleta está configurada para estar en contacto con el flujo (5) de aire a depurar.  
15
3. Dispositivo (1) de depuración de aire por oxidación fotocatalítica según la reivindicación 1 ó 2, en donde el dispositivo (1) de depuración comprende un circuito de circulación (6) de aire de flujo (5) de aire a depurar, estando la al menos una superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa dispuesta dentro del circuito de circulación (6) de  
20 aire.
4. Dispositivo (1) de depuración de aire por oxidación fotocatalítica según la reivindicación 1 ó 2, en donde el dispositivo (1) de depuración comprende un subsistema de depuración (7) conectado en serie con el circuito de circulación (6) de aire de flujo (5) de aire a  
25 depurar, estando la al menos superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa dispuesta dentro del subsistema de depuración (7).
5. Dispositivo (1) de depuración de aire por oxidación fotocatalítica según la reivindicación 1 ó 2, en donde el dispositivo (1) de depuración comprende el subsistema de depuración  
30 (7) conectado en paralelo con el circuito de circulación (6) de aire de flujo (5) de aire a depurar, estando la superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad dispuesta dentro del subsistema de depuración (7).
6. Dispositivo (1) de depuración de aire por oxidación fotocatalítica según la reivindicación  
35 3 a 5, en donde el circuito de circulación (6) de aire comprende un dispositivo (60) de

refrigeración/calefacción de flujo forzado, comprendiendo el dispositivo (60) de refrigeración/calefacción de flujo forzado un evaporador (40).

- 5 7. Dispositivo (1) de depuración de aire por oxidación fotocatalítica según la reivindicación 6, en donde la al menos una superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa está situada aguas abajo del evaporador (40).
- 10 8. Dispositivo (1) de depuración de aire por oxidación fotocatalítica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores en donde la al menos una superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa es una superficie cilíndrica interior (8.1) de un tubo cilíndrico (8).
- 15 9. Dispositivo (1) de depuración de aire por oxidación fotocatalítica según cualquiera de las reivindicaciones anteriores donde la al menos una fuente (4) de radiación ultravioleta es una del siguiente grupo que consiste en:
- al menos una lámpara; y
  - al menos un LED.
- 20 10. Método de depuración de aire por oxidación fotocatalítica en donde para la eliminación de compuestos orgánicos volátiles y/u otros compuestos oxidables en el aire se procede a:
- proporcionar un flujo (5) de aire a depurar;
  - poner la al menos una superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa en contacto con el flujo (5) de aire a depurar; y
  - iluminar la al menos una superficie (3) recubierta de óxido de titanio de variedad anatasa mediante al menos una fuente (4) de radiación ultravioleta.
- 25
- 30

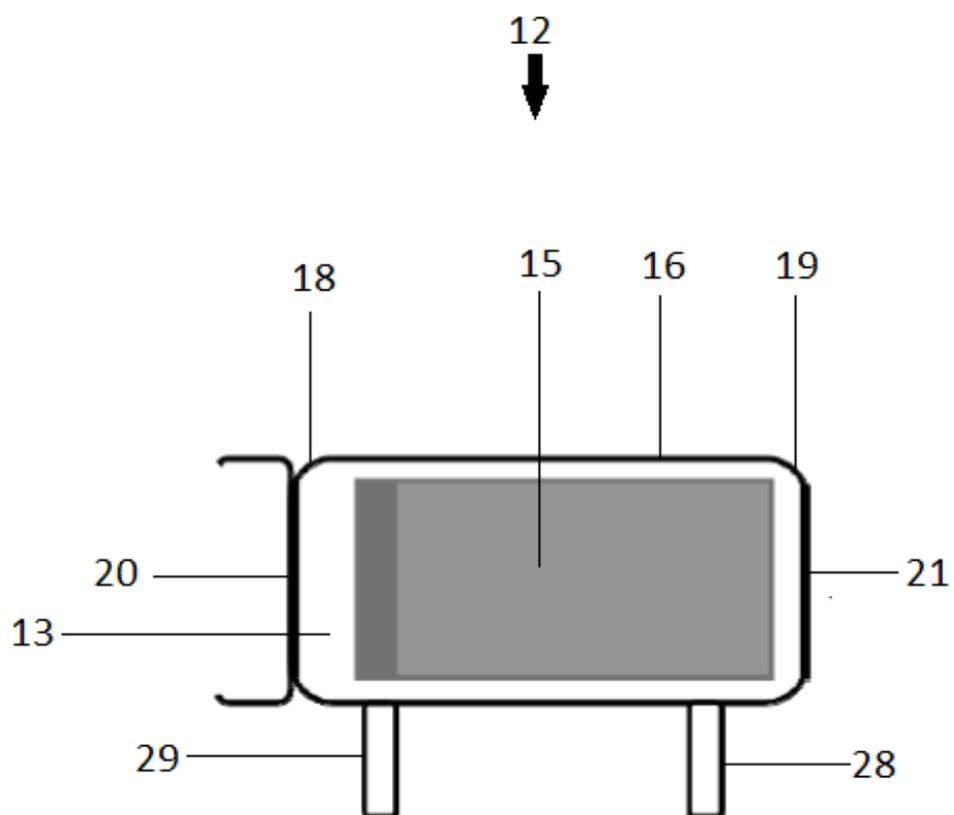


FIG. 1

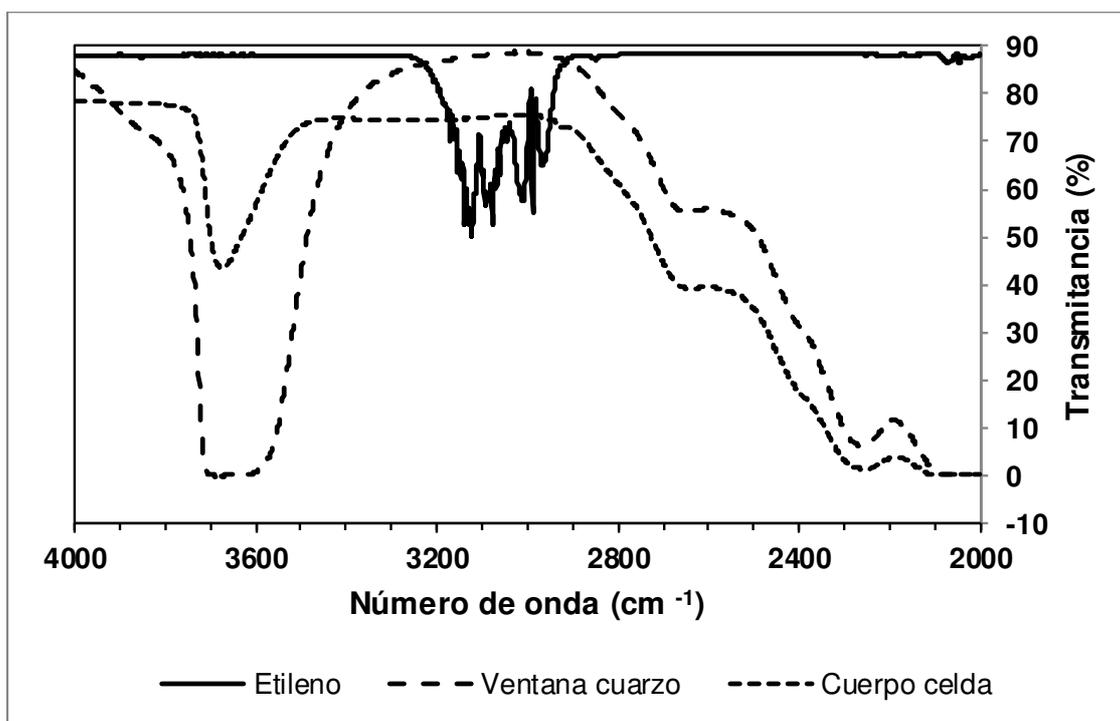


FIG. 2

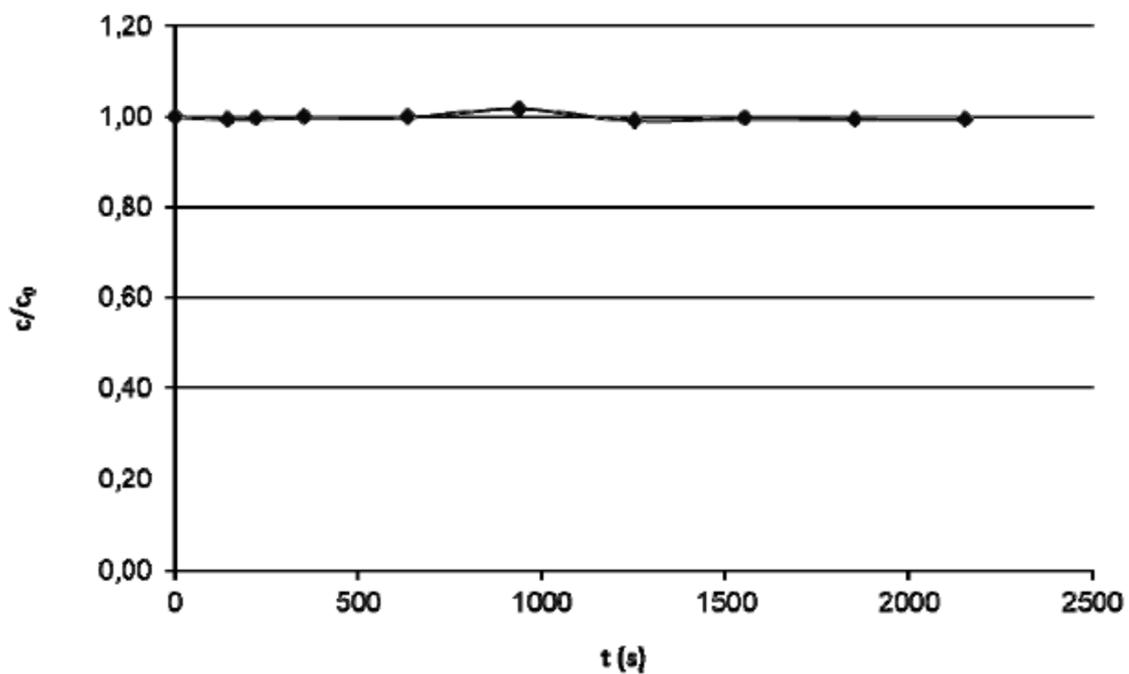


FIG. 3

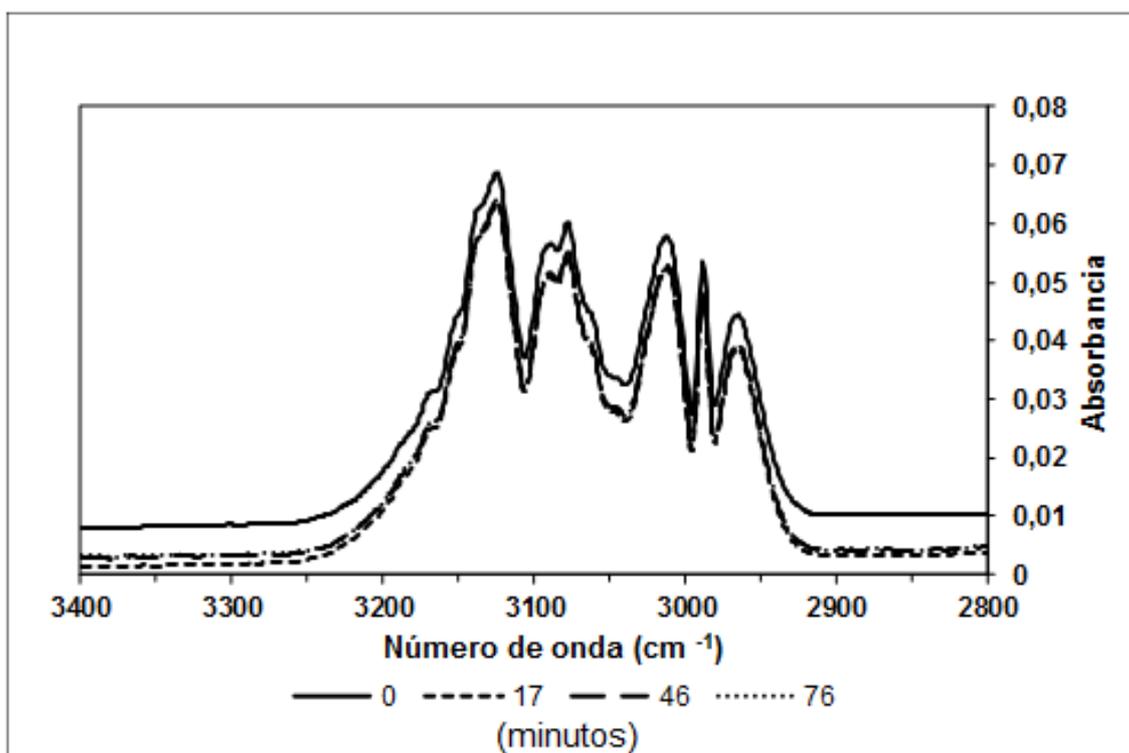


FIG. 4

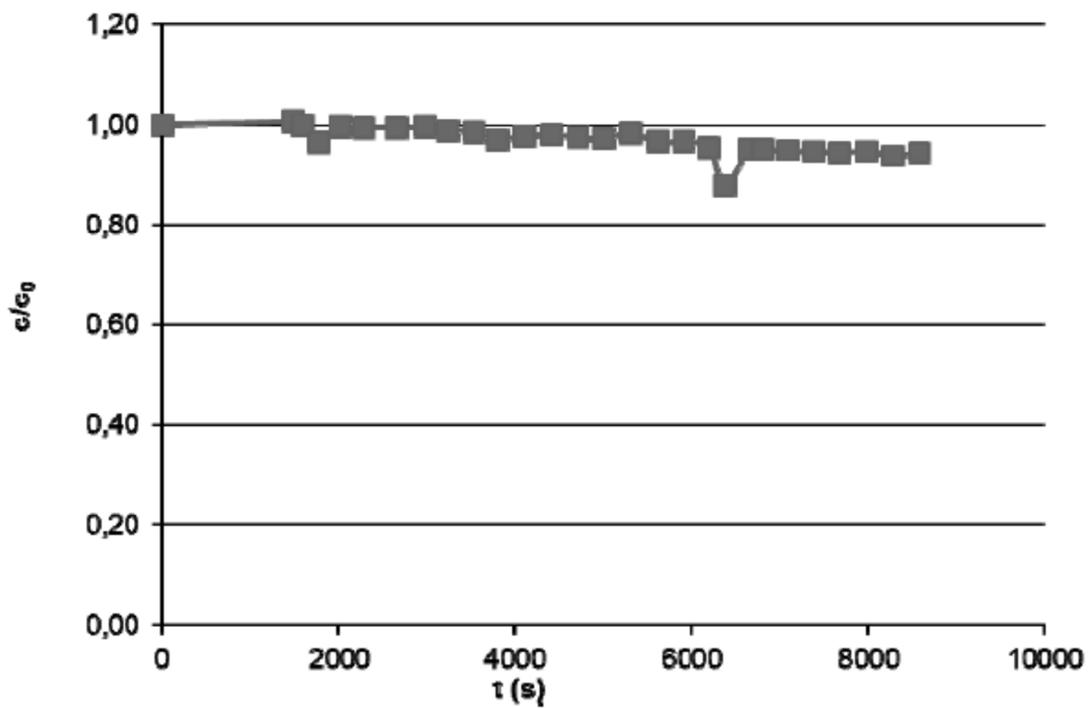


FIG. 5

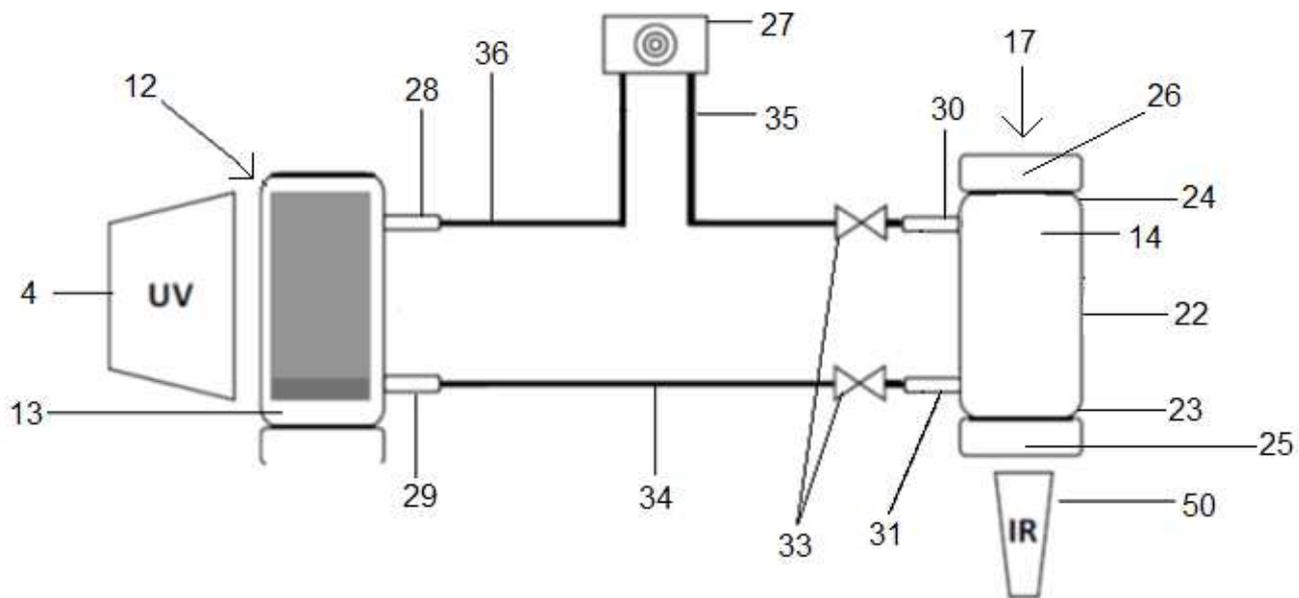


FIG. 6

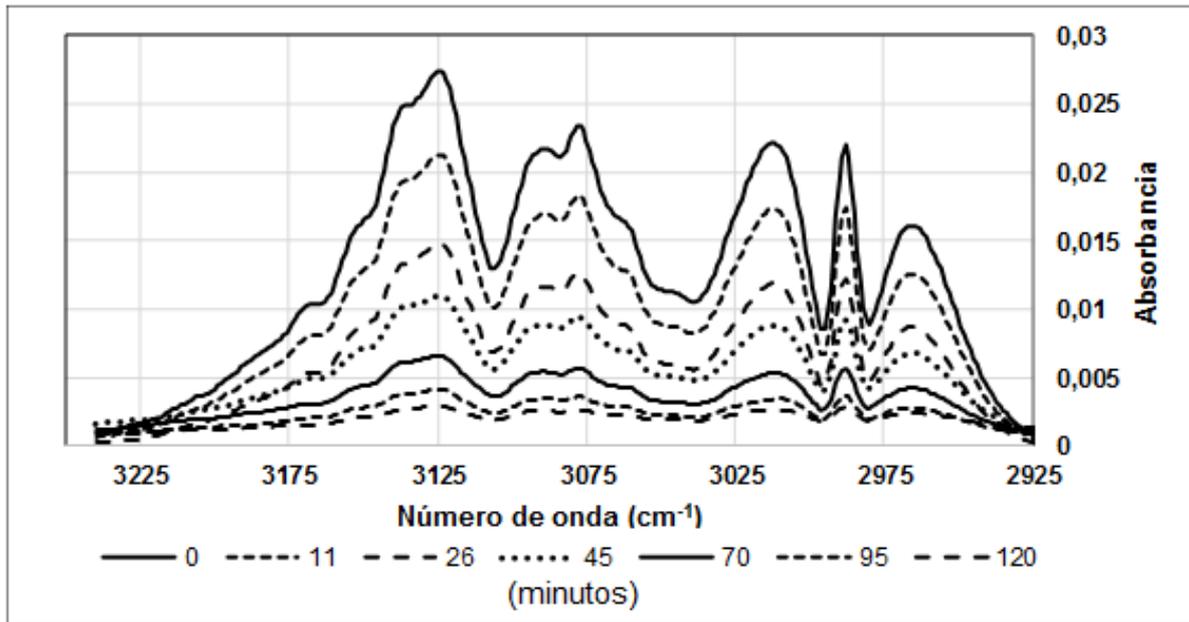


FIG. 7

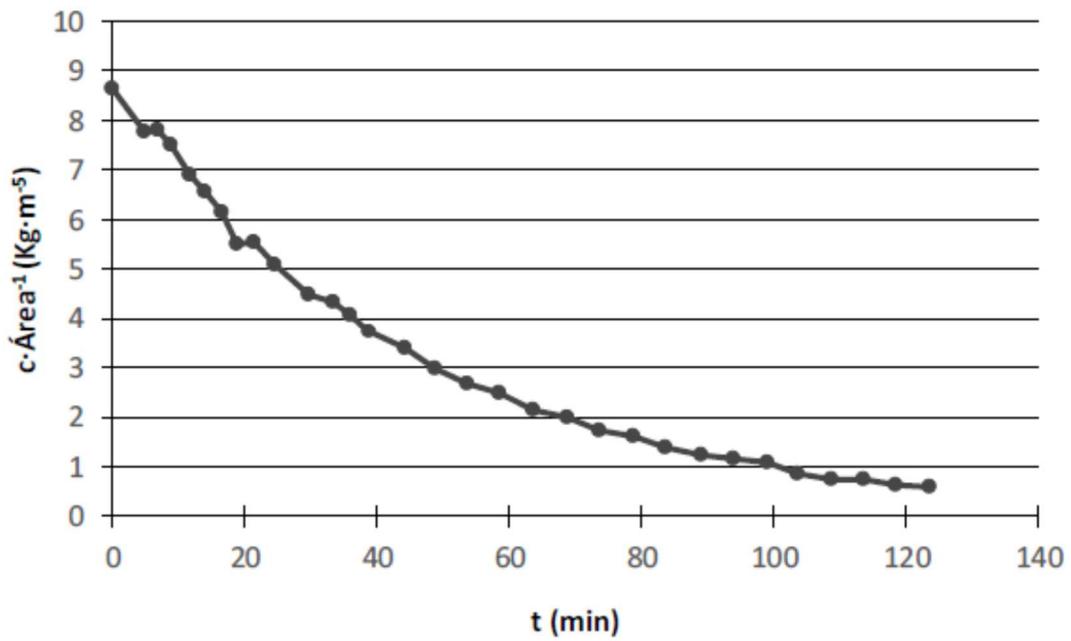


FIG. 8

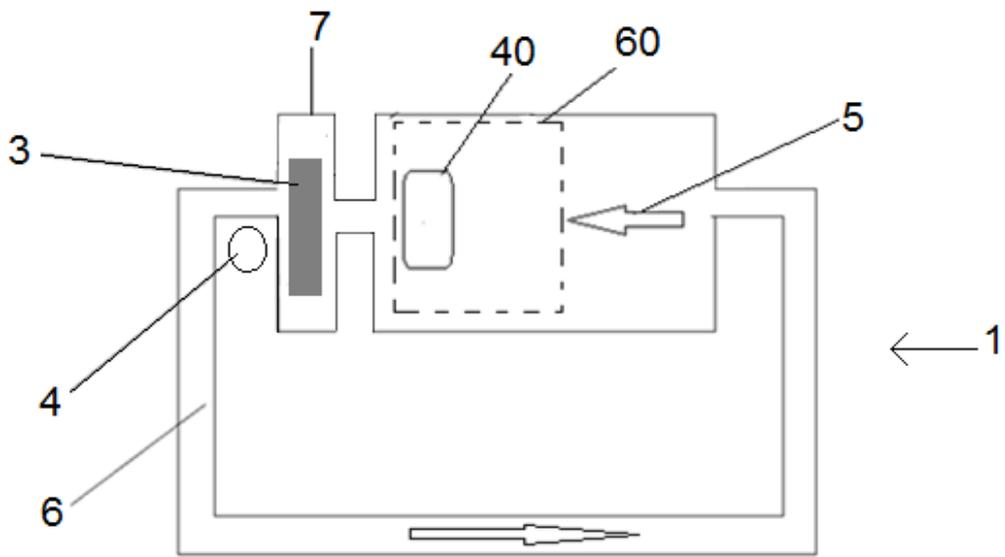


FIG. 9

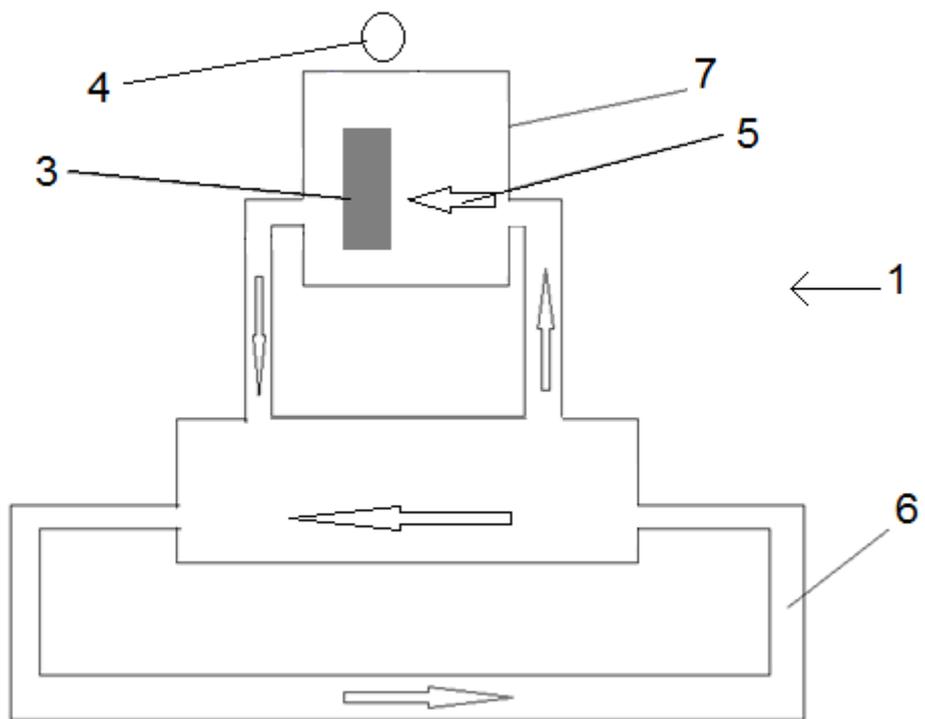


FIG. 10

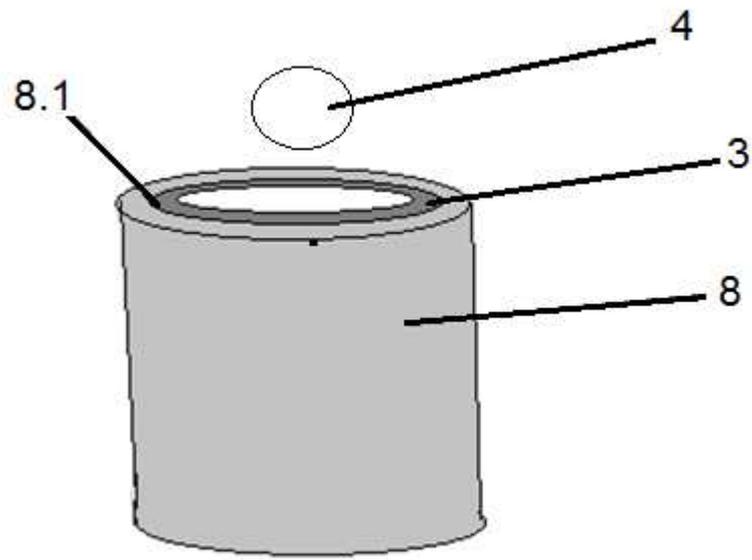


FIG. 11