



República Federativa do Brasil  
Ministério da Indústria, Comércio Exterior  
e Serviços  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102016011411-0 A2

(22) Data do Depósito: 19/05/2016

(43) Data da Publicação: 05/12/2017



\* B R 1 0 2 0 1 6 0 1 1 4 1 1 A

**(54) Título:** PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANAS REGENERATIVAS PARA TRATAMENTO DE LESÕES E MEMBRANAS REGENERATIVAS PARA TRATAMENTO DE LESÕES

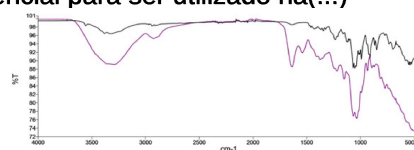
**(51) Int. Cl.:** A61L 15/28; A61L 15/44; C08L 5/08

**(73) Titular(es):** ASSOCIAÇÃO PRÓ ENSINO SUPERIOR EM NOVO HAMBURGO

**(72) Inventor(es):** VANUSCA DALOSTO JAHNO; LEISLE DANIELA MALLMANN

**(74) Procurador(es):** MILTON LUCÍDIO LEÃO BARCELLOS

**(57) Resumo:** PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANAS REGENERATIVAS PARA TRATAMENTO DE LESÕES E MEMBRANAS REGENERATIVAS PARA TRATAMENTO DE LESÕES A presente invenção pertence ao setor tecnológico de engenharia de tecidos e refere-se, mais especificamente, ao desenvolvimento de membranas regenerativas teciduais compostas a partir de derivados de polissacarídeos e seu respectivo processo de produção. O invento objetiva agregar melhorias nas características de membranas de quitosana usadas como substitutos temporários para lesões, sem aumentar demasiadamente o custo de produção. Para isso foram feitas membranas de quitosana-k-carragenana com extrato de ficocolóides extraídos de resíduos de algas Nori. Foi convertida a biomassa em um produto com valor agregado, atendendo requisitos socioambientais tornando-o mais acessível à maioria da população que necessita de tal assistência. As membranas formadas de complexos polieletrônicos (PEC's) com extrato de ficocolóides apresentam-se mais dúcteis devido às características plastificantes do ficocolóide, além de maior estabilidade térmica e rugosidade, resultando em um filme com bom potencial para ser utilizado na(...)



— Alga Nori.  
— Kappa carragenana.

**PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANAS REGENERATIVAS PARA  
TRATAMENTO DE LESÕES E MEMBRANAS REGENERATIVAS PARA  
TRATAMENTO DE LESÕES**

**Setor tecnológico da invenção**

[01] De uma maneira geral a presente invenção pertence ao setor tecnológico de engenharia de tecidos e se refere, mais especificamente, a membranas regenerativas teciduais utilizadas para o tratamento de lesões de pele, compostas de complexos polieletrônicos (PEC's) *de quitosana-k-carragenana* com extrato de *ficocolóides* extraídos de resíduos de algas *Nori* e seu respectivo processo de produção.

**Estado da técnica conhecido**

[02] Peles artificiais podem servir como substitutos temporários, recobrando a lesão e reduzindo a perda de fluidos e a ocorrência de infecções. A biologia molecular e celular, que engloba a tecnologia para o desenvolvimento de novos tecidos, intersecta áreas da engenharia, biologia e ciências clínicas. A partir da união de conhecimentos e técnicas destes setores, podem ser constatados diversos avanços em pesquisas e na criação de novos substitutos biocompatíveis para fins médicos.

[03] A engenharia tecidual consiste no desenvolvimento e manipulação de moléculas, células-tronco ou matrizes biocompatíveis para a substituição biológica e utilização de produtos no tratamento de lesões de pele, mantendo, regenerando ou mesmo melhorando o funcionamento de órgãos e tecidos vivos. Neste sentido scaffolds porosos são necessários para servir como suporte e guia no crescimento de células e para promover a regeneração de tecidos em três dimensões. *Scaffolds* são estruturas porosas que servem como matrizes para o crescimento do tecido. Sistemas à base de polissacarídeos representam uma alternativa promissora para a produção destes suportes.

[04] O estudo da aplicação de polímeros naturais, como material para o uso na engenharia tecidual, cresceu significativamente devido ao fato de apresentarem características uniformes que facilitam as modificações necessárias para atender

requisitos específicos de cada aplicação. Dito isso, atualmente diversos estudos têm apontado o uso de polímeros de origem natural como quitosana, alginato, gelatina, celulose e seus derivados, separadamente ou combinados, para aplicações em engenharia de tecidos. Observa-se crescente comercialização de membranas regenerativas teciduais para aplicação em lesões de pele, porém as soluções atuais geralmente são de custo elevado, dificultando o acesso à maioria da população que necessita de tal assistência.

[05] Existem diversas alternativas relacionadas à produção e componentes dessas membranas de quitosana e que representam o atual estado da técnica. Essas alternativas são descritas em documentos de patentes e alguns exemplos podem ser observados ao longo deste relatório. A patente de invenção nº PI 0902681-9 – “*Preparo, uso e aplicação de membranas hemostáticas de derivados de quitosana e colágeno*”, relata a preparação e utilização de bandagens de derivados de quitosana e colágeno, contendo ou não aditivos, produzidas a partir de materiais de baixo custo e fácil obtenção. A solução é utilizada especialmente em casos de tratamentos de hemorragias, ferimentos, sangramentos e procedimentos cirúrgicos e pós-cirúrgicos resultando em um produto de boa eficiência quanto à redução do tempo de coagulação, proteção contra agentes externos e aceleração do processo de cicatrização.

[06] Outra alternativa de membranas regenerativas é observada na patente de invenção nº PI 1003294-0 – “*Desenvolvimento de um gel a base de algas marinhas para tratamento de lesões cutâneas*”. A invenção refere-se a uma formulação de gel a base de algas marinhas vermelhas do litoral cearense. As algas *Soliena fihiformis* e *Pterocladia capillacea* são obtidas a partir do processo de maricultura em praias. A primeira espécie fornece um polissacarídeo sulfatado para a formação do gel e a segunda apresenta uma fração protéica (tectina). Quanto a sua ação anti-inflamatória, os componentes, quando aplicados em ensaio de migração celular induzida por lambda carragenana, foram capazes de reduzir o número de neutrófilos envolvidos no processo inflamatório.

[07] Dentre outras alternativas encontram-se as patentes de invenção nº PI 0504952-0 – “*O uso de quitina e quitosana na preparação de membranas para regeneração de tecidos e cicatrizações*”, nº PI 0606096-0 – “*O uso de bandagens e membranas produzidas com quitina e quitosana combinadas com diversos aditivos na regeneração de tecidos e cicatrizações em ferimentos, lesões e queimaduras* –”, e a ainda a patente de invenção nº PI 1004841-3 – “*Membrana de quitosana e alginato incorporando fármacos*”, a qual descreve uma membrana composta de quitosana, alginato e excipientes adequados, contendo ou não um agente antimicrobiano à base de prata estabilizada. Os polissacarídeos empregados são biocompatíveis, atóxicos e facilitam a cicatrização de feridas, já o composto contendo prata em sua estrutura atua sobre infecções bacterianas.

[08] Ainda dentro do contexto da presente invenção, existem algumas alternativas que se relacionam com o objeto do presente relatório descritivo como, por exemplo, a invenção revelada na patente chinesa nº CN 102886070 – “*Sodium alginate and chitosan skin tissue engineering scaffold material and preparation method thereof*” que se refere a um material composto de alginato de sódio e quitosana utilizado para a engenharia de tecidos e seu respectivo método de preparação. O material compreende alginato de sódio e quitosana, com  $\text{CaCl}_2$  como agente de reticulação polimérica para formação de uma base a ser aplicada na pele do indivíduo.

[09] Por fim, a patente europeia nº EP 2793908 – “*Composition, preparation, and use of dense chitosan membrane materials*” também traz em seu escopo uma composição que compreende a quitosana para produção de uma película ou membrana densa. Na tecnologia em questão ocorre a aplicação de uma força de compressão e vácuo coincidentes durante o processo, resultando em uma solução de quitosana neutralizada que pode ser utilizada para uma variedade de aplicações médicas tanto para uso veterinário como para uso em seres humanos.

[010] Levando em consideração todas as anterioridades citadas acima e que compõem o estado atual da técnica referente às membranas regenerativas, é possível destacar que o grande diferencial do invento aqui proposto, está na

matéria-prima utilizada para a produção de complexos polieletrônicos (PEC's) de polissacarídeos. Inconvenientes existentes nas membranas atualmente utilizadas no setor da engenharia tecidual revelam a existência de uma lacuna na criação de membranas que possam ser produzidas a partir de um processo com características mais sustentáveis e menos onerosas. Ou seja, um processo que dispense a obtenção de polímeros através de produção artificial como no caso do processo de maricultura presente na patente nº PI 1003294-0, citada acima, e ainda que seja capaz de converter biomassa em um produto com valor agregado. Dessa forma, não se conhece no estado da técnica uma alternativa que gere menor impacto ambiental, bem como uma tecnologia que faça a utilização de extrato de ficocolóides extraídos a partir de resíduos de alga *Nori* utilizadas em estabelecimentos de comércio alimentar, como por exemplo, temakerias.

[011] As membranas estudadas de quitosana apresentam limitações quanto as aplicações para crescimento de células e quanto a sua resistência mecânica. Filmes produzidos exclusivamente a partir de derivados de quitina e quitosana não são normalmente indicados para serem utilizados como *scaffold*, pois apresentam baixos valores de adesão de células em superfícies de membranas. Dessa forma este tipo de filme poderá ser usado somente como curativos do tipo barreira, já que estes apresentam como funções principais a proteção física e microbiológica do ferimento, além do controle da perda de fluidos corpóreos. Melhorar estas características tem sido foco de diversos estudos, mas nenhum prioriza o custo benefício do processo como um todo.

[012] Devido à grande incidência de vítimas de queimaduras existe a necessidade de desenvolvimento de biomateriais com a capacidade de mimetizar a pele e que sejam de custo reduzido. Dessa forma, não se conhece no estado da técnica uma alternativa como a proposta referente ao presente relatório descritivo, na qual utilizam-se resíduos de alga *Nori* para produção de membranas regenerativas teciduais com possíveis características de *scaffolds* que permitam o crescimento do tecido, tendo como premissas atender requisitos socioambientais.

**Novidades e objetivos da invenção**

[013] Com o objetivo de sanar as falhas do estado atual da técnica destacadas a cima, a presente patente de invenção visa propor uma solução para o problema principal envolvendo a produção de membranas para aplicação no processo de regeneração tecidual. Um dos maiores inconvenientes do processo de produção de tais membranas consiste no alto custo do produto atualmente comercializado, sendo pouco acessíveis à maioria da população. Além disso, observa-se a falta de um processo com características mais sustentáveis em comparação com as técnicas aplicadas atualmente.

[014] Para solucionar estes problemas foram desenvolvidos membranas e géis de *quitosana-k-carragenana* com extrato de *ficocolóides*. A extração dos *ficocolóides* ocorre a partir da biomassa oriunda de resíduos de algas *Nori*, produzidos por temakerias, por exemplo, representando uma das maiores diferenças metodológicas na produção de PEC's de polissacarídeos da presente invenção em comparação às outras tecnologias atualmente existentes.

[015] Os complexos desenvolvidos, formados entre quitosana, k-carragenana e extrato de ficocolóides, apresentam grande potencial para utilização como biomaterial visto que os PEC's apresentam melhores características de resistência térmica, melhor estabilidade química e maior rugosidade quando comparados às membranas feitas exclusivamente de *quitosana*. Os *ficocolóides extraídos* mostram-se promissores na regeneração tecidual devido às suas similaridades estruturais com a carragenana comercial e apresentarem um custo reduzido de obtenção.

[016] Um dos fatores que permite o desenvolvimento de biomateriais usando *ficocolóides* e *quitosana* é a sua capacidade de formar complexos polieletrólíticos por ligações iônicas, pela interação entre os grupos sulfônicos da *carragenana* e amina da *quitosana*, formando assim uma matriz tridimensional. A presença de grupos amino nas cadeias poliméricas permite que a *quitosana* atue como polieletrólito catiônico em pH menor que 6,5 e apresente alta densidade de cargas, que se adsorvem facilmente nas superfícies carregadas negativamente.

Como as membranas serão aplicadas em curativos cutâneos os resultados obtidos são positivos para aplicação em pH fisiológico.

[017] Além disso, obteve-se um produto intermediário, um gel de *quitosana-k-carragenana* com extrato de alga com grande quantidade de água acumulada, que poderá também ser utilizado para fins médicos. Nas blendas produzidas, tanto no gel e membrana, houve coacervação efetiva entre as cadeias dos ficocolóides e as da *quitosana*. A miscibilidade foi comprovada pelas técnicas laboratoriais de espectroscopia vibracional no infravermelho e calorimetria exploratória diferencial (DSC). Outra evidência que comprova a miscibilidade é inferida a partir da microscopia eletrônica de varredura que mostra coacervação, mantendo a estrutura laminar.

#### **Descrição dos desenhos anexos**

[018] A fim de que a presente invenção seja plenamente compreendida e levada à prática por qualquer técnico deste setor tecnológico, a mesma será descrita de forma clara, concisa e suficiente, tendo como base os desenhos anexos, que a ilustram e subsidiam abaixo listados:

[019] **Figura 1** representa o espectro comparativo de Alga Nori e carragenana comercial.

[020] **Figura 2** representa o espectro de extração de ficocolóides em banho-maria após três horas a 80°C.

[021] **Figura 3** representa o fluxograma de extração de polissacarídeos de acordo com a presente invenção.

[022] **Figura 4** representa o fluxograma relativo à produção das membranas de *quitosana* de acordo com a presente invenção.

[023] **Figura 5** representa o mecanismo de gelificação das carragenanas.

[024] **Figura 6** representa a foto da membrana de *quitosana*.

[025] **Figura 7** representa a imagem da membrana de *quitosana-k-carragenana* com extrato de ficocolóides concentrada.

[026] **Figura 8** representa a membrana de *quitosana-k-carragenana* com extrato ficocolóides diluída.

[027] **Figura 9** representa o espectro de infravermelho das membranas de PEC com extrato de ficocoloide.

[028] **Figura 10** representa o espectro de infravermelho do gel de PEC com extrato de ficocoloide diluído.

[029] **Figura 11** representa a micrografia da membrana de quitosana-k-carragenana com extrato de alga diluída (100x)

[030] **Figura 12** representa a micrografia da membrana de quitosana (100x).

[031] **Figura 13** representa o termograma da amostra de membrana de quitosana-k-carragenana com extrato de alga diluído

[032] **Figura 14** representa o termograma da amostra de gel de quitosana-k-carragenana.

#### **Descrição detalhada da invenção**

[033] Para agregar melhorias nas características de membranas de *quitosana* sem onerar muito o custo do processo de produção, houve o desenvolvimento de membranas de *quitosana-k-carragenana* com extrato de *ficocolóides* extraídos de resíduos de algas *Nori*. Tal processo de produção é viável devido a capacidade destes polissacarídeos formarem complexos polieletrólíticos por ligações iônicas, pela interação entre os grupos sulfônicos da *carragenana* e amina da *quitosana*, formando uma matriz tridimensional. A presença de grupos amino nas cadeias poliméricas permite que a *quitosana* atue como polieletrólito catiônico em pH menor que 6,5 e apresente alta densidade de cargas, que se adsorvem facilmente nas superfícies carregadas negativamente.

[034] Para dar início ao processo de produção referente a presente invenção, é realizada a extração dos ficocolóides da biomassa produzida de resíduos de algas *Nori* oriundas de estabelecimentos de comércio alimentar. Foi realizada uma análise inicial da alga *Nori* para visualizar qual a provável composição da mesma. O espectro da Figura 1 mostra uma correlação entre a alga e carragenana comercial, sendo possível inferir que a amostra de alga *Nori* analisada possui ligações típicas de polissacarídeos.



[035] As condições de extração dos ficocolóides foram testadas com diferentes temperaturas e concentrações de solução de cátions com o objetivo de avaliar, qualitativamente, a influência das variáveis de entrada (condição da alga, quantidade de água, temperatura, adição de NaOH) sobre a resposta de extração de polissacarídeos. Para isso foi realizado um planejamento das análises do processo e acompanhamento constante dos espectros de infravermelho gerados até que não fossem mais verificadas variações nos gráficos experimentais.

[036] Conforme pode ser observado no fluxograma da Figura 3, após a seleção das algas, as mesmas devem passar por uma etapa de lavagem para a remoção de resíduos grosseiros e sais que possam estar depositos em sua superfície. Logo após a lavagem as algas são secas em estufa (com set de temperatura entre 50°C e 55°C) até atingirem um peso constante. Ocorre então a sanitização com 2,5% de Hipoclorito. Para determinada quantidade de alga em gramas (g) é inserida proporcionalmente uma quantidade de água destilada (mililitro).

[037] Dito isso, experimentalmente, a nível laboratorial foram pesados 10g de algas *Nori*, embebidas com 10mL de água destilada, a solução deve apresentar uma proporção de 1/1 de alga e água e deve ser mantida nesta condição por um período de 120 a 130 minutos. Passado este tempo a mistura de água e alga é triturada em um liquidificador industrial e colocada em banho-maria. Nesta etapa ocorre o acompanhamento contínuo do espectro de infravermelho do extrato com a finalidade de verificar sua taxa de variação. No momento em que não são mais observadas variações no espectro a amostra é tirada do banho-maria. A amostra é tratada com solução de cátions NaOH 1M e, ainda aquecida, é encaminhada para o processo de filtração a vácuo obtendo-se o extrato.

[038] Ao fim do processo de extração dos *ficocolóides*, foi constado que a temperatura impacta diretamente na qualidade da extração, sendo que se obteve uma melhor condição para o produto final aplicando-se uma condição ao banho-maria de 70 a 80°C por um período de três a quatro horas. Com temperaturas maiores à 100°C ocorreu degradação da alga e, por esta razão não apareceram picos característicos de polissacarídeos. Com a adição de NaOH houve um

impacto na extração em temperatura de 55°C, onde foi possível observar um aumento da amplitude das bandas. Com uma temperatura de 80°C não houve mais modificações significativas nos picos dos espectros de infravermelho e acredita-se que isso ocorreu pelo processo ter atingido a qualidade máxima de extração de polissacarídeos a esta temperatura, sendo que, através do estudo dos espectros de infravermelho é possível observar a presença dos polissacarídeos no extrato.

[039] O espectro de infravermelho da extração mostrado na Figura 2 apresenta bandas características de polissacarídeos na região de 1000 e 1100  $\text{cm}^{-1}$ . A absorção em 1014  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída a ligação S=O em C6, típico das carragenanas precursoras. Observou-se uma absorção na região próxima a 1200  $\text{cm}^{-1}$  que pode ser atribuída a grupos éster sulfato total. A presença de galactose e C-O-SO<sub>2</sub> sobre C6 da galactose no extrato podem ser identificadas pela presença de banda próxima a 950 e 880  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente.

[040] Acredita-se que há pouca ou nenhuma quantidade de carragenana do tipo iota, pois esta possui uma banda típica próximo a 805  $\text{cm}^{-1}$  que não está presente no espectro da Figura 2. Podemos supor que o espectro obtido indica que o ficocolóide extraído pode conter carragenana mu e percussores. Essa não é uma informação conclusiva e, sugere-se complementar os estudos com análises de quantificação de polissacarídeos e sulfatos.

[041] Analisando ainda a Figura 2 verifica-se bandas próximas a 3200 e a 1200  $\text{cm}^{-1}$  que podem ser referentes às ligações -OH. Na banda de 3200  $\text{cm}^{-1}$  podemos ainda ter mascarada a NH<sub>2</sub> e a banda típica de amida primária pode ser observada próxima a 1650  $\text{cm}^{-1}$ . É natural que algumas aminas se formem durante a decomposição de material orgânico. A presença de amina no extrato pode ser justificada pela ocorrência de histamina, que ocorre em uma ampla variedade de plantas superiores e sua presença em algas marinhas tem sido relatada em pequenas quantidades em alga marinha vermelha. As aminas biogênicas podem ter sido formadas por decomposição térmica ou ainda através

da descarboxilação de aminoácidos como resultado do metabolismo normal de animais, vegetais e micro-organismos.

[042] Galactanas naturalmente sulfatadas extraídas de algumas espécies de algas vermelhas (Rhodophyta) podem servir como uma fonte de oligossacarídeos com sulfatação específica. Os ácidos carboxílicos podem sofrer reações de redução, gerando nitrilas, o que justificaria a ocorrência de banda em  $2300\text{ cm}^{-1}$  no espectro do extrato.

[043] É possível supor a presença de glucose proveniente de contaminação do polissacarídeo de reserva das algas vermelhas (amido das florídeas), pela presença de bandas próximas a  $1100\text{ cm}^{-1}$  (relacionada ao éter) e em pequenos picos entre  $1300\text{ cm}^{-1}$  e  $1400\text{ cm}^{-1}$  (referente ao ácido carboxílico).

[044] Ainda pode-se verificar a presença de ácido pirúvico no extrato devido às bandas próximas a  $1200\text{ cm}^{-1}$  e  $1000\text{ cm}^{-1}$ , típicas de éster. As agaranas podem apresentar elevados níveis de substituição por sulfato, metil, acetal de ácido pirúvico e glicosilação. Essas podem ser encontradas também nas carragenanas, porém em baixos níveis.

[045] Sendo assim, é possível que a composição da alga Nori apresente ampla diversidade estrutural e que possivelmente dependa de diferentes propriedades físico-químicas e biológicas. É possível observar a presença de polissacarídeos no extrato, porém, este pode ainda apresentar outros compostos (sejam estes devido às características da alga ou ainda em função das condições de extração).

[046] Para a produção das membranas, representado no fluxograma da Figura 4, inicialmente é necessário o preparo de uma solução de *quitosana* 0,75 % (p/v) com ácido acético de concentração 0,5 M e, solução de *carragenana* com extrato da alga 1,7% (p/v). A solução de *carragenana* com extrato de água se dá pela dissolução de kappa *carragenana* comercial no extrato obtido. Esta dissolução é realizada para contornar a variabilidade das características dos resíduos de alga e garantir um padrão mínimo de gelificação. As soluções devem ser mantidas sob agitação constante por um período mínimo de quatro horas antes de dar seguimento ao processo de produção das membranas.

[047] O fluxograma relativo ao processo descreve as etapas da produção das membranas e representa a membrana de quitosana (referência) e duas composições testadas de PEC com extrato de ficocolóides, intituladas como membrana de *quitosana-k-carragenana* com extrato de ficocolóide concentrada e membrana de quitosana-k-carragenana com ficocolóide de alga diluída.

[048] O preparo das membranas de quitosana ocorre de acordo com a técnica de neutralização e evaporação de solvente em estufa com temperatura entre 60 e 70°C. Para tal colocou-se a solução de quitosana em placas de petri na estufa até evaporação do solvente.

[049] Para preparo da membrana de quitosana-k-carragenana com extrato de ficocolóide concentrada foi realizada a mistura, sob agitação constante, por um período mínimo de 48 horas, de solução de carragenana/extrato de alga e de solução de quitosana, numa proporção de 5,7/1 respectivamente, e NaOH para ajuste do pH em 6. Posteriormente a mistura é disposta em placa de petri e seca em estufa com temperatura entre 60 e 70°C até evaporação do solvente.

[050] Para o preparo da membrana de *quitosana-k-carragenana* com extrato de ficocolóide diluída, é inicialmente realizada a neutralização da solução *quitosana* com NaOH para ajuste do pH em 6. Em seguida é efetuada a mistura, sob agitação constante, por um período mínimo de 48 horas, da solução de *carragenana*/extrato de alga e da solução de *quitosana* neutralizada, numa proporção de 1/5,7 respectivamente. Tal mistura é então disposta em placa de Petri e, igualmente às outras membranas, passa por uma etapa de secagem em estufa.

[051] Durante a etapa de secagem as amostras de PEC devem passar por um processo de gelificação. Este método consiste em alternar processos de resfriamento e aquecimento de forma cíclica, sendo os tempos de uma hora e de 15 minutos para aquecimento e resfriamento respectivamente em cada ciclo. O modelo mais aceito que teoriza o processo de gelificação dos polímeros sugere que, em altas temperaturas, os polissacarídeos permanecem na forma de novelos aleatórios, porém, ao resfriarem, assumem uma conformação em dupla hélice.

Isso leva à formação de pequenos domínios independentes envolvendo um número limitado de cadeias via associação intermolecular. O conteúdo de sulfatos (carga negativa da hélice) requer a presença de cátions neutralizadores para associar as hélices. Neste contexto quando cátions são incorporados, diferentes domínios permitem a ligação cruzada das hélices à longa distância formando uma rede coesiva. Uma vez que as hélices são formadas, elas se agregam. Essa estrutura quaternária contribui para as propriedades mecânicas e de textura dos géis resultantes. Na Figura 5 é possível verificar o mecanismo de gelificação das carragenanas.

[052] Após concluído o processo de secagem adiciona-se NaOH 1 M suficiente para cobrir todas as membranas ainda nas placas de petri, afim de neutralizar os grupos residuais existentes e garantir a completa reticulação da membrana. Mantem-se nesta condição por um intervalo de tempo de 1 a 3 minutos e, então lava-se com água destilada abundante. A etapa seguinte envolve a eliminação da água residual em um dessecador com sílica gel sob vácuo por no mínimo 24 horas. Após este período as membranas podem ser removidas e estão prontas para utilização.

[053] É possível verificar que com o pH=6,0 a interação entre a *quitosana* e *carragenana* foi maximizada e obtêm-se os melhores resultados para a produção das membranas. O valor ajustado ficou intermediário aos valores de pKa da *quitosana* e da *carragenana*, garantindo que a *quitosana* esteja potencialmente *protonada* e a *carragenana* desprotonada. Como as membranas serão aplicadas em curativos cutâneos os resultados obtidos são positivos para aplicação em pH fisiológico. Vale ressaltar, que com um pH abaixo de aproximadamente 4,0 as soluções de *carragenanas* perdem viscosidade e força do gel. Para evitar a excessiva degradação ácida é necessário manter o pH do PEC sempre acima de 5.

[054] Na Figura 6 é apresentada a foto da membrana de quitosana. De uma forma geral observa-se que as membranas constituídas unicamente de quitosana

apresentam baixa flexibilidade no estado seco, o que poderá causar dificuldades na aplicação como curativo para queimaduras cutâneas.

[055] Observou-se que não ocorreu uma boa interação entre as matérias primas na membrana de quitosana-k-carragenana com extrato de alga concentrada, representado na Figura 7. Sugere-se que o aspecto grumoso é devido a separação de fases ocasionado pelo maior teor de polissacarídeos na mistura tornando a combinação destes mais difíceis. Já a membrana de quitosana-k-carragenana com extrato de alga diluída apresentou aroma agradável de alga, coeritividade e bastante flexibilidade. Na Figura 8 é apresentada foto da membrana de PEC's com extrato de ficocoloides diluída obtida.

[056] Nota-se que as membranas são assimétricas, pois mostram morfologia porosa diferente do lado do vidro e do lado do ar. Foi possível verificar que a interação e comportamento dos PEC's variam de acordo com a concentração dos polímeros e o meio de dispersão, podendo afetar as propriedades dos polímeros interligados, tais como características mecânicas, solubilidade e permeabilidade. Pode ocorrer modificação da estrutura final se as interações iônicas forem muito fortes, como precipitação, dificultando ou mesmo impedindo a formação da película, conforme verificado na membrana de quitosana e k-carragenana com extrato de alga concentrada.

[057] Durante a fabricação da membrana obteve-se um produto intermediário, que possivelmente poderá ser utilizado para fins médicos também. Com ajuste adequado do pH da solução de PEC, mantendo a mesma em meio neutro com pH entre 7 e 7,5, foi obtido um gel com grande quantidade de água acumulada.

[058] Nas Figuras 9 e 10 são apresentados os espectros das membranas de quitosana e k-carragenana e do gel obtido do PEC, respectivamente. É possível verificar que as membranas apresentaram bandas características da quitosana próximas de  $3000\text{ cm}^{-1}$  a  $3400\text{ cm}^{-1}$  para os grupos hidroxila,  $2900\text{ cm}^{-1}$  para C-H,  $1650\text{ cm}^{-1}$  para deformação axial C=O de amida I,  $1400\text{ cm}^{-1}$  para a deformação angular simétrica de CH<sub>3</sub>,  $1047\text{ cm}^{-1}$  para C-O-C. Observam-se ainda bandas de absorção típicas de carragenana por volta da região de  $850\text{ cm}^{-1}$ , que

corresponde à galactose-4-sulfato, em  $920\text{ cm}^{-1}$  são atribuídas à galactose. O grupo funcional  $\text{O}=\text{S}=\text{O}$  pode ser evidenciado pela absorção de ondas em  $1228\text{ cm}^{-1}$ . Podemos inferir que houve coacervação efetiva entre as cadeias de carragenana e as de quitosana, pela observância das bandas características dos dois espécimes de polissacarídeos.

[059] Nas micrografias apresentadas na Figura 11 e Figura 12, é possível verificar que a menor rugosidade foi observada para a membrana preparada somente de quitosana, sendo que as membranas de PEC se mostraram bastante rugosas. Acredita-se que isso se deve ao maior intumescimento gerado em função das ligações cruzadas. Maiores taxas de proliferação de células cultivadas em *scaffolds* são verificadas com maiores porosidades.

[060] Acredita-se que as membranas feitas de PEC com extrato de ficocolóide apresentem maior deformação até a ruptura que as feitas exclusivamente de quitosana. Ou seja, estima-se que as membranas sejam mais dúcteis que as de quitosana, devido às características de plastificante do ficocolóide. O MEV evidencia que os filmes feitos de PEC apresentam superfície rugosa. As ligações de hidrogênio na matriz polimérica dos PEC's permitem a incorporação de moléculas de água nas redes cristalinas, provocando uma modificação no polimorfismo que pode ser o responsável pelo aumento da mobilidade da cadeia. A melhora visual na flexibilidade das membranas está diretamente ligada à diminuição das forças intermoleculares ao longo da rede tridimensional devido ao aumento da absorção de água na estrutura.

[061] O aumento na porosidade da membrana melhora a propriedade de ductilidade. Na Figura 13 é apresentado o termograma da amostra de membrana de quitosana-k-carragenana com extrato de alga diluído e na Figura 14 é apresentado o termograma da amostra do gel de quitosana-k-carragenana. É possível verificar que aparece apenas um pico de temperatura de transição vítrea. Podemos então, inferir que houve uma boa miscibilidade dos sistemas poliméricos.

[062] O gel e todas as membranas feitas de PEC's apresentam degradação térmica com início próxima a 230°C, não havendo mudança da resistência térmica quando comparada às matérias primas isoladamente. Podendo concluir pela análise térmica que houve boa miscibilidade entre os polímeros pela ocorrência de apenas uma Tg. Os complexos obtidos com a presente invenção proporcionaram um retardamento na temperatura de desidratação do material sugerindo uma maior estabilidade térmica, tendo este filme um bom potencial para ser utilizado na regeneração tecidual.

[063] De acordo com o objetivo proposto para este trabalho os filmes apresentaram características compatíveis para que sejam seguidos estudos adicionais visando sua utilização como biomembranas. As membranas de PEC's com extrato de ficocolóides diluída mostrou-se devidamente complexada, flexível, hidrófilo em pH fisiológico, com características rugosas e com caráter social e ambiental.

[064] É importante salientar que as figuras e descrição realizadas não possuem o condão de limitar as formas de execução do conceito inventivo ora proposto, mas sim de ilustrar e tornar compreensíveis as inovações conceituais reveladas nesta solução. Desse modo, as descrições e imagens devem ser interpretadas de forma ilustrativa e não limitativa, podendo existir outras formas equivalentes ou análogas de implementação do conceito inventivo ora revelado e que não fujam do espectro de proteção delineado na solução proposta.

Tratou-se no presente relatório descritivo de um aperfeiçoamento no processo de produção de membranas regenerativas de derivados de polissacarídeos para tratamento de lesões e as membranas regenerativas resultantes de tal processo, dotado de novidade, ato inventivo, suficiência descritiva, aplicação industrial e, conseqüentemente, revestido de todos os requisitos essenciais para a concessão do privilégio pleiteado.



## REIVINDICAÇÕES

**1 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES** caracterizado por compreender as seguintes etapas:

- selecionar algas;
- extrair *ficocolóides* da biomassa de algas;
- obter soluções de *quitosana* e de *carragenana* com extrato de *ficocolóides*;
- manter as soluções sob agitação constante;
- neutralizar a solução de *quitosana*;
- misturar as soluções de *quitosana* e de *carragenana*;
- manter a mistura sob agitação constante;
- adicionar NaOH na mistura;
- manter a mistura sob agitação constante;
- colocar mistura em placa de petri;
- secar a mistura;
- realizar reticulação final das membranas; e
- enviar membranas a um dessecador.

**2 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 1, e ainda caracterizado por obter como produto final membranas de *quitosana-k-carragenana* com extrato de *ficocolóides* extraídos de resíduos de algas *Nori*.

**3 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 1, e ainda caracterizado por dispensar a etapa de neutralização da solução de *quitosana* para o preparo da membrana de *quitosana-k-carragenana* com extrato de *ficocolóides* concentrado.

**4 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 1, e ainda caracterizado por a etapa de manter as soluções sob agitação constante durar pelo menos 4 horas.

**5 - - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 1, e ainda caracterizado por a etapa de misturar as soluções compreender uma solução de

*carragenana*/extrato de alga e de solução de quitosana, numa proporção de 5,7/1 respectivamente no preparo da membrana concentrada.

**6 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 1, e ainda **caracterizado por** a etapa de misturar as soluções compreender uma solução de *carragenana*/extrato de alga e de solução de *quitosana* neutralizada, numa proporção de 1/5,7 respectivamente no preparo da membrana diluída.

**7 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 1, e ainda **caracterizado por** a etapa de manter a mistura sob agitação constante durar pelo menos 48 horas após a adição de NaOH.

**8 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 1, e ainda **caracterizado por** a etapa de secar a mistura compreender um processo de gelificação com aproximadamente 1 hora em aquecimento e aproximadamente 15 minutos em resfriamento em cada ciclo.

**9 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicações 1 e 8, e ainda **caracterizado por** a etapa de secar a mistura ser realizada em estufa com temperatura entre 60 e 70°C até evaporação do solvente.

**10 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 1, e ainda **caracterizado por** a etapa de realizar reticulação final das membranas manter as membranas cobertas com NaOH 1M das membranas por um intervalo de tempo de 1 a 3 minutos e posterior lavagem com água destilada.

**11 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 1, e ainda **caracterizado por** a etapa de enviar membranas a um dessecador manter as membranas no dessecador com sílica gel sob vácuo por pelo menos 24 horas.

**12 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 1, e ainda **caracterizado por** a etapa de extrair ficocolóides das algas compreender as seguintes etapas:

- Lavar as algas selecionadas;
- Secar as algas;
- Sanitizar as algas com Hipoclorito;
- Embeber as algas sanitizadas em água destilada;
- Triturar a mistura de algas e água;
- Colocar a mistura triturada em banho-maria;
- Observar espectro de infravermelho do extrato;
- Retirar a mistura do banho-maria;
- Tratar a mistura com solução de cátions NaOH; e
- Filtrar à vácuo a solução.

**13 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 12, e ainda **caracterizado por** a etapa de secar as algas ser realizada em estufa com set de temperatura entre 50°C e 55°C.

**14 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 12, e ainda **caracterizado por** a sanitização das algas com 2,5% de Hipoclorito.

**15 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 12, e ainda **caracterizado por** a etapa de embeber as algas sanitizadas em água destilada apresentar uma proporção de 1/1 de alga e água e ser mantida nesta condição por um período de 120 a 130 minutos.

**16 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 12, e ainda **caracterizado por** a etapa de retirar a mistura do banho-maria ocorrer quando não forem mais observadas variações no espectro infravermelho do extrato.

**17 - PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES**, de acordo com a reivindicação 12, e ainda **caracterizado por** o banho-maria ser realizado a uma temperatura de 80°C com duração de três a quatro horas.

**18 - MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES** composta de polissacarídeos **caracterizada por** conter em sua composição

derivados de polissacarídeos *quitosana-k-carragenana* com extrato de ficocolóides extraídos de resíduos de algas Nori.

**19 - MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES** conforme reivindicação 18, e ainda **caracterizada por** apresentar-se na forma concentrada ou diluída.

**20 - MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES,** de acordo com a reivindicação 18, e ainda **caracterizada por** compreender uma solução de *quitosana* 0,75 % (p/v) com ácido acético de concentração 0,5 M; e solução de *carragenana* com extrato de ficocolóides 1,7% (p/v).

**21 - USO DE MEMBRANA REGENERATIVA PARA TRATAMENTO DE LESÕES** **caracterizada por** compreender curativos cutâneos ou em forma de gel de *quitosana-k-carragenana* com água acumulada.

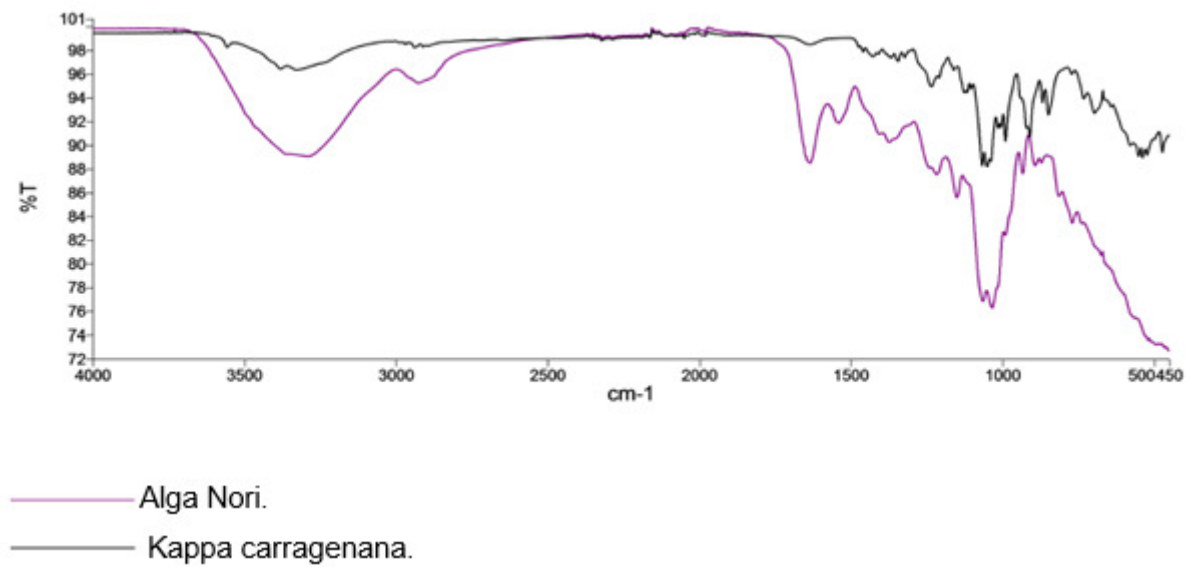


Fig. 1

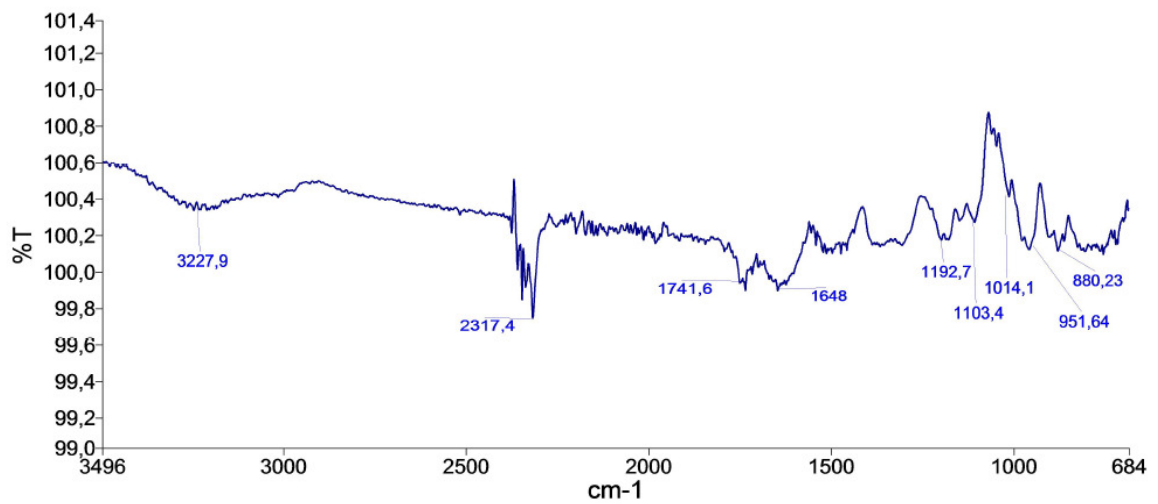


Fig. 2

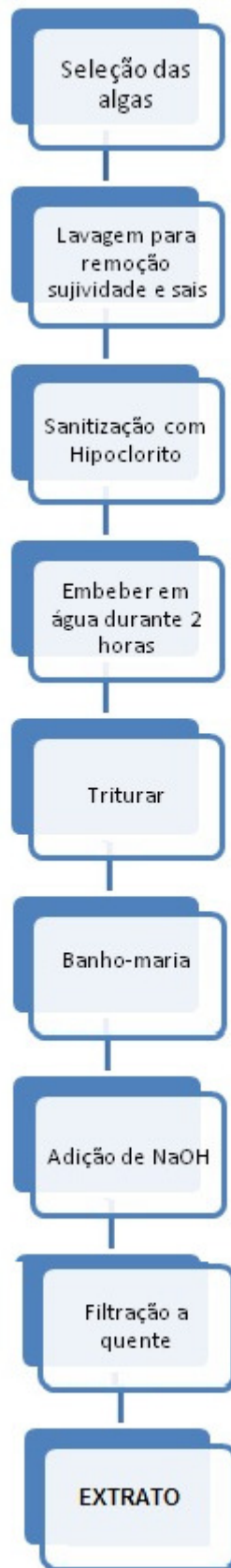


Fig. 3

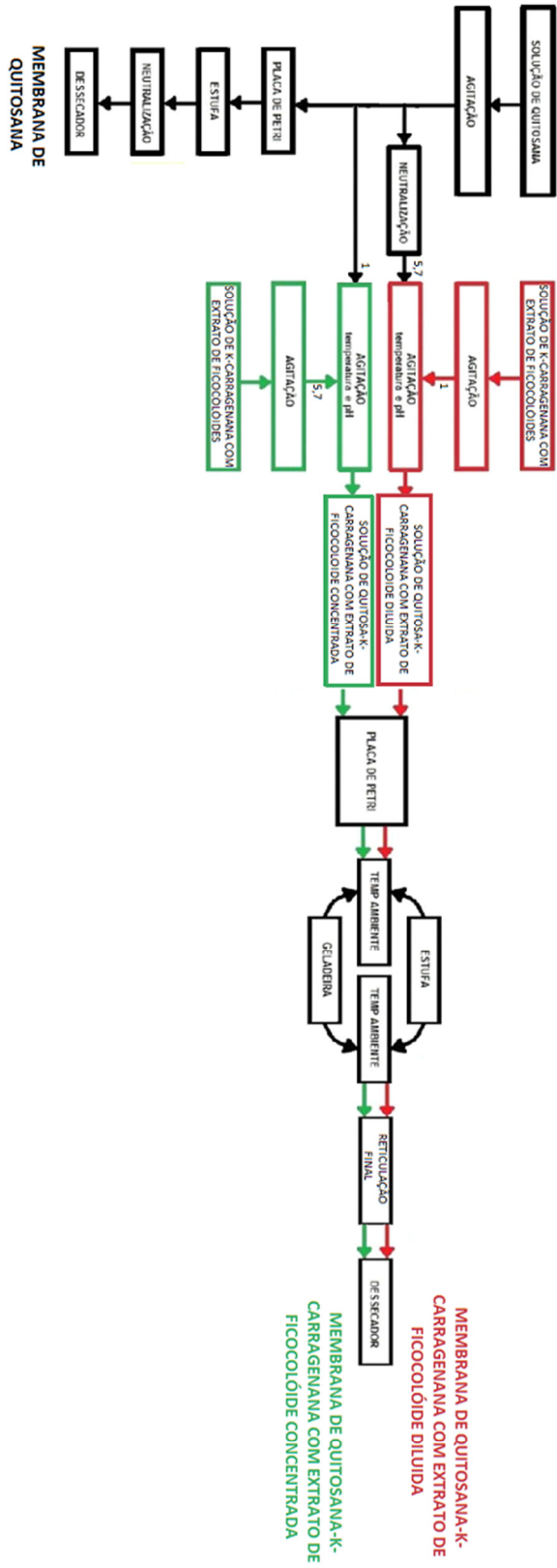


Fig. 4

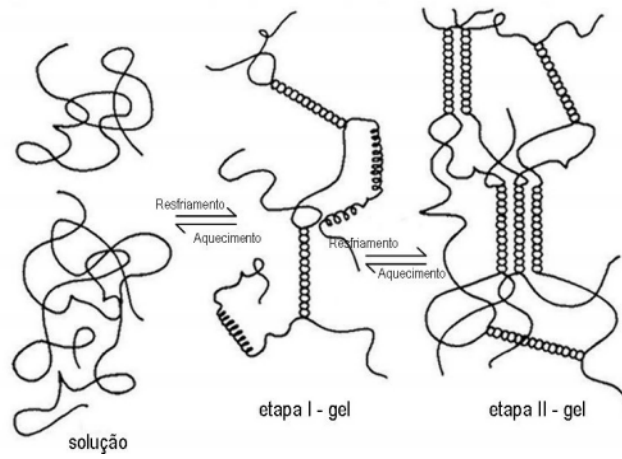


Fig. 5



Fig. 6



Fig. 7

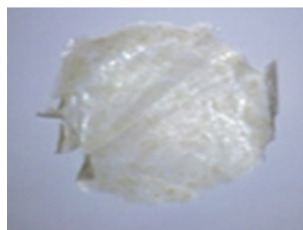


Fig. 8



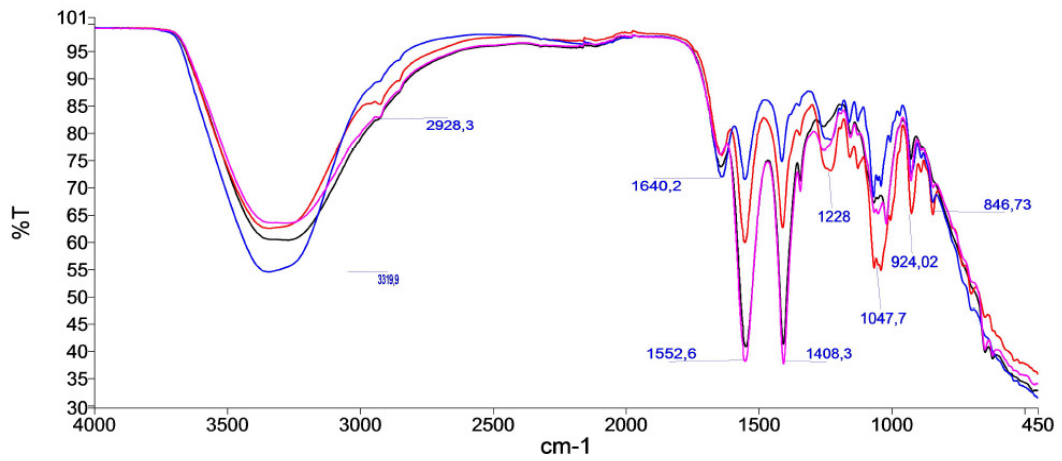


Fig. 9

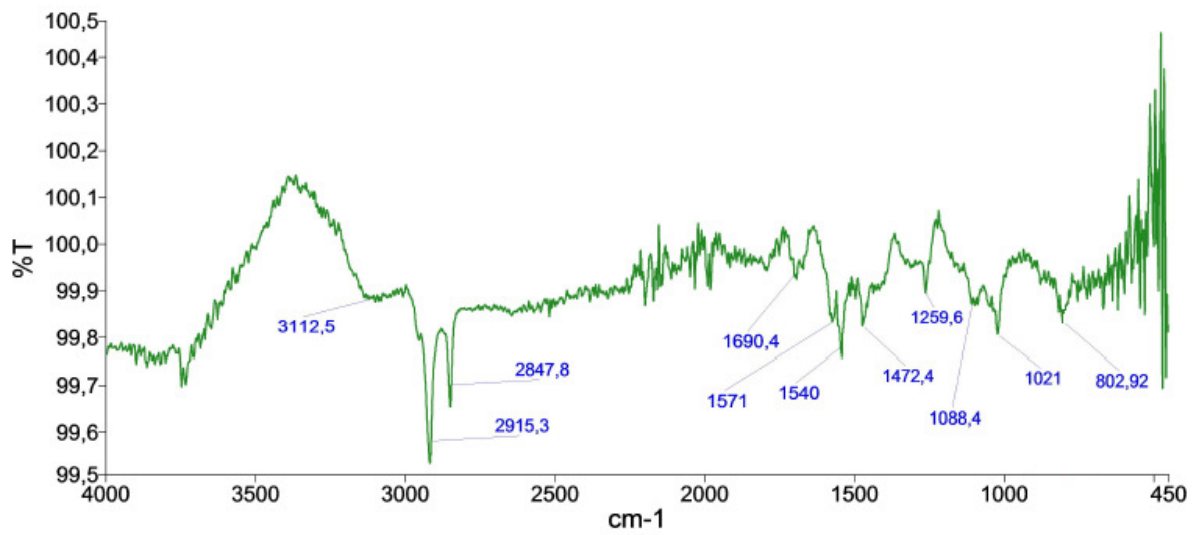


Fig. 10

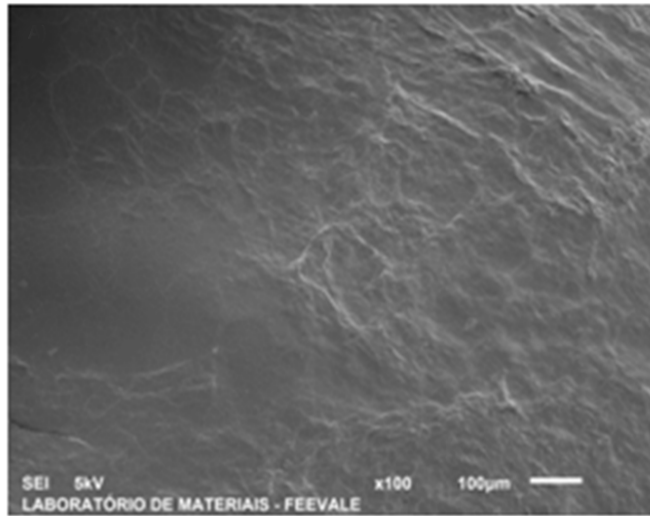


Fig. 11

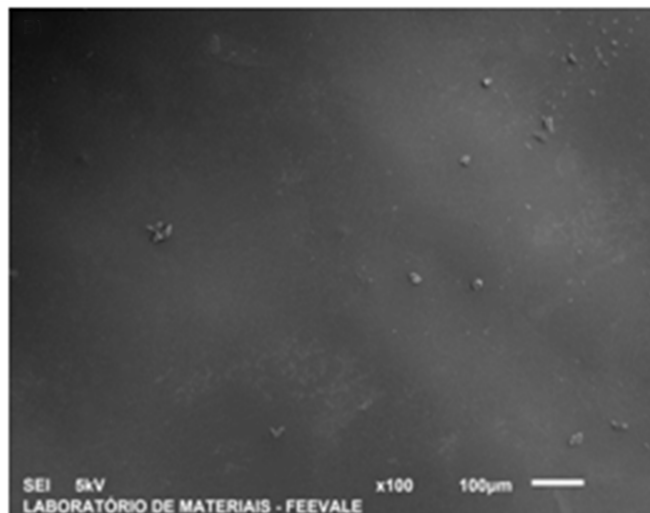


Fig. 12

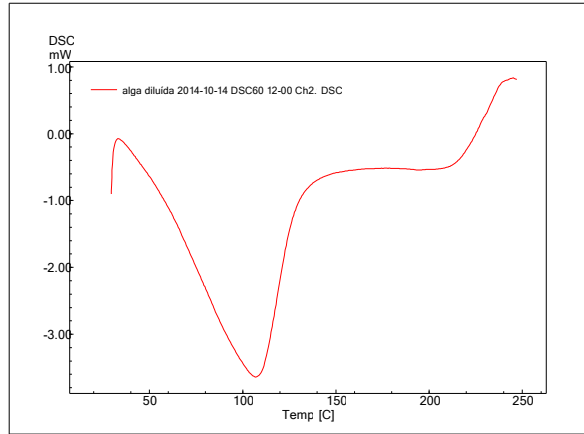


Fig. 13

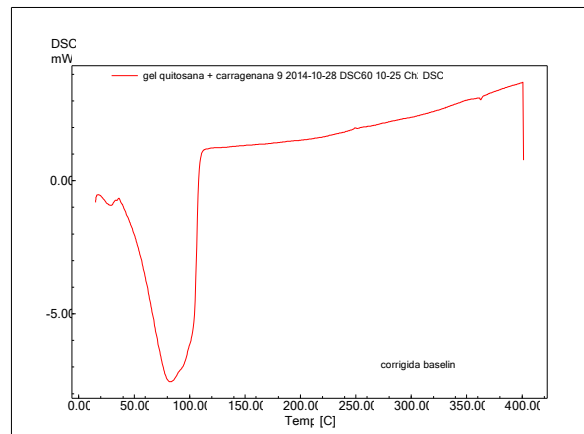


Fig. 14

**RESUMO****PROCESSO DE PRODUÇÃO DE MEMBRANAS REGENERATIVAS PARA TRATAMENTO DE LESÕES E MEMBRANAS REGENERATIVAS PARA TRATAMENTO DE LESÕES**

A presente invenção pertence ao setor tecnológico de engenharia de tecidos e refere-se, mais especificamente, ao desenvolvimento de membranas regenerativas teciduais compostas a partir de derivados de polissacarídeos e seu respectivo processo de produção. O invento objetiva agregar melhorias nas características de membranas de *quitosana* usadas como substitutos temporários para lesões, sem aumentar demasiadamente o custo de produção. Para isso foram feitas membranas de *quitosana-k-carragenana* com extrato de *ficocolóides* extraídos de resíduos de algas *Nori*. Foi convertida a biomassa em um produto com valor agregado, atendendo requisitos socioambientais tornando-o mais acessível à maioria da população que necessita de tal assistência. As membranas formadas de complexos polieletrônicos (PEC's) com extrato de ficocolóides apresentam-se mais dúcteis devido às características plastificantes do *ficocolóide*, além de maior estabilidade térmica e rugosidade, resultando em um filme com bom potencial para ser utilizado na regeneração tecidual, inclusive como *scaffolds*. Além disso, obteve-se um produto intermediário que consiste em um gel de *quitosana-k-carragenana* com extrato de ficocolóides que também poderá ser utilizado para fins médicos.