



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

(21) BR 102015017435-7 A2

(22) Data do Depósito: 17/07/2015

(43) Data da Publicação: 18/07/2017



\* B R 1 0 2 0 1 5 0 1 7 4 3 5 A

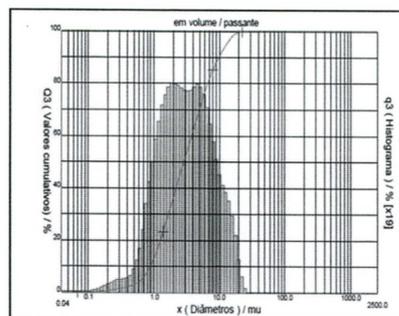
**(54) Título:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANA ELETROFIADA, MEMBRANA OBTIDA PELO REFERIDO PROCESSO, COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE REGENERAÇÃO EX-VIVO

**(51) Int. Cl.:** A61K 35/748; A61L 15/14; D04H 1/728

**(73) Titular(es):** UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**(72) Inventor(es):** CHRISTIAN VIEZZER;  
CARLOS PEREZ BERGMANN; MARIA  
MADALENA DE CAMARGO FORTE; ANNELISE  
KOPP ALVES

**(57) Resumo:** PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANA ELETROFIADA, MEMBRANA OBTIDA PELO REFERIDO PROCESSO, COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE REGENERAÇÃO EX-VIVO. A presente invenção descreve um processo de obtenção de membrana eletrofiada que compreende a etapa de obtenção de membrana de polímero de polihidróxibutirato (ou, abreviadamente, PHB) em solvente orgânico. A presente invenção também descreve a membrana eletrofiada obtida pelo referido processo e uma composição que compreende a referida membrana eletrofiada e pelo menos um veículo biologicamente aceitável. Também são descritos o uso da referida membrana para preparar uma composição para tratar lesões de tecidos biológicos e também um processo de regeneração ex-vivo que compreende a etapa de contatar a membrana eletrofiada elou a composição com pelo menos um tecido biológico. A presente invenção situa-se nos campos da Química, da Farmácia e da Engenharia de Biomateriais.



PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANA ELETROFIADA, MEMBRANA  
OBTIDA PELO REFERIDO PROCESSO, COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE  
REGENERAÇÃO *EX-VIVO*

**Campo da Invenção**

**[0001]** A presente invenção descreve um processo de obtenção de membrana eletrofiada que compreende a etapa de obtenção de membrana de polímero de polihidróxibutirato (também abreviadamente denominado PHB no presente pedido de patente) em solvente orgânico. A presente invenção também descreve a membrana eletrofiada obtida pelo referido processo e uma composição que compreende a referida membrana eletrofiada e pelo menos um veículo biologicamente aceitável. Também são descritos o uso da referida membrana para preparar uma composição para tratar lesões de tecidos biológicos e também um processo de regeneração *ex-vivo* que compreende a etapa de contatar a membrana eletrofiada e/ou a composição com pelo menos um tecido biológico. A presente invenção situa-se nos campos da Química, da Farmácia e da Engenharia de Biomateriais.

**Antecedentes da Invenção**

**[0002]** A Engenharia Tecidual é um campo interdisciplinar que aplica os princípios da Engenharia e Ciências da Vida para o desenvolvimento de substitutos biológicos de modo que estes restaurem, mantenham ou possam melhorar a função do tecido ou mesmo do órgão por inteiro (LANGER e VACANTI, 1993). Segundo Nichols (2008), a Engenharia Tecidual como alternativa para Medicina Regenerativa tem como função a reconstrução tecidual através de equivalentes de tecidos (arcabouços) para reparar as funções fisiológicas perdidas devido a doenças ou injúrias.

**[0003]** A diferenciação das células-tronco mesenquimais (CTM) é regulada por fatores físicos e químicos do seu microambiente extracelular, sendo que a complexa interação célula-substrato e célula-célula ativam vias específicas que regulam a diferenciação celular (PHILLIPS, 2010; LIU, 2013,

FRICAIN, 2013). Além de estímulos bioquímicos, diversas propriedades físicas dos materiais sintéticos estão correlacionadas com a diferenciação das CTM, incluindo micro-padrões de adesão que ditam a forma da célula, bem como a rigidez e nanotopografia do substrato (LI, 2013). Entre essas propriedades físicas, a rigidez apresenta grande destaque. Estudos recentes com queratinócitos e CTM mostram que as células não só sentem a rigidez de um polímero, como respondem ao *feed-back* mecânico fornecido pelas proteínas ancoradas à rede polimérica (LI, 2013). A topologia do material e a sua hidrofobicidade/hidrofilicidade influenciam nas características de adesão, proliferação celular e resposta imune através dos mecanismos celulares de sinalização (SCHWARTZ, 2002).

**[0004]** Na última década, a utilização de fibras poliméricas eletrofiadas tem atraído atenção da comunidade científica na fabricação de biomateriais (ZHANG, 2005; GUERRINI, 2006), por apresentar-se como um material com excelentes propriedades para construção de arcabouços para a Engenharia Tecidual (BOUDRIOT, 2006). Concorreu para isso, um grande esforço na intenção de mimetizar as características naturais de matriz extracelular para facilitar a adesão, a proliferação, a diferenciação celular e a gênese de um novo tecido (MA, 2008).

**[0005]** O equipamento básico para a eletrofiação, também conhecida como *electrospinning*, é constituído por uma seringa que contém a solução de um polímero condutor, uma bomba de infusão, dois eletrodos e uma fonte de alta tensão que pode variar de 5 a 60 kV.

**[0006]** As fibras são formadas a partir do estiramento da gota do polímero na ponta da agulha. Quando se aplica uma alta tensão na extremidade da agulha, induz-se uma carga na gota polimérica. Uma vez que as cargas no interior da gota atingem um valor crítico, um jato da solução surge a partir da gota (cone de Taylor) em decorrência do equilíbrio entre as forças eletrostáticas da superfície carregada e a tensão superficial da solução (YARIN, 2001).

**[0007]** Um equipamento de *eletrospinning* pode ser usado para formar fibras e esferas dependendo dos parâmetros aplicados no processo de eletrofiação, tais como a distância entre a fonte e o coletor, viscosidade da solução, tensão aplicada, entre outros.

**[0008]** A possibilidade de produzir compósitos eletrofiados abre uma nova oportunidade para a fabricação de materiais nanoestruturados para Engenharia Tecedual. A Nanotecnologia é uma ferramenta poderosa na Ciência dos Materiais, sendo potencialmente capaz de incorporar biomimetismo em nanoescala. Superfícies nano-funcionalizadas apresentam propriedades biológicas promissoras, que quando aplicadas em biomateriais podem melhorar significativamente a aplicação clínica destes (LIU, 2010). Os nanomateriais oferecem uma maneira de mimetizar a arquitetura natural da matriz extracelular que consiste em fibras com diâmetros entre o micrômetro e o nanômetro, a qual pode fornecer uma grande área superficial em relação ao volume, aumentando assim a área de contato, facilitando as interações entre as células e o material (ASHAMMAKHI, 2009).

**[0009]** Na busca pelo estado da técnica em literaturas científica e patentária, foram encontrados os seguintes documentos que tratam sobre o tema:

**[0010]** O documento PI 0904515-5 A2 apresenta uma matriz de suporte eletrofiada obtida de um biopolímero produzido por microalgas e/ou cianobactérias. A presente invenção difere do referido documento, dentre outras razões técnicas, pelo fato de a matriz ser composta de um poliéster poli(hidroxibutirato) produzido por bactérias e ter em sua matriz nanoestruturas, bem como nanopartículas de pHA. Além disso, o referido documento trata de um processo de obtenção distinto.

**[0011]** O documento US 2009/002891 A1 apresenta uma matriz de suporte eletrofiada compósito obtido de um poliéster: policaprolactona, poli(ácido glicólico), poli(ácido lático) e poli(ácido lático-co-glicólico) entre outros que não poli(hidroxialcanoatos) e polissacarídeos com fosfato de cálcio.

A presente invenção difere do referido documento pelo fato de, na presente invenção, a matriz ser composta de um poliéster poli(hidroxibutirato) produzido por bactérias e ter em sua matriz nanoestruturas, bem como nanopartículas de pHA. Também difere pelo fato de tratar-se de um método de obtenção das fibras que produz tamanhos de fibras e poros diferentes daquelas descritas no referido documento.

**[0012]** O documento US 2010/017295 A1 apresenta uma matriz de suporte eletrofiada compósito obtido de um poliéster: policaprolactona, poli(ácido glicólico), poli(ácido lático) e poli(ácido lático-co-glicólico), gelatina e partículas de HA maior que 1  $\mu\text{m}$ . A presente invenção difere do referido documento, dentre outras razões técnicas, pelo fato de, na presente invenção, a matriz ser composta de um poliéster poli(hidroxibutirato) produzido por bactérias e ter em sua matriz nanoestruturas, bem como nanopartículas de pHA. Também difere pelo fato de tratar-se de um método de obtenção das fibras que produz tamanhos de fibras e poros diferentes daqueles descritos no referido documento.

**[0013]** O documento US 2010/0303881 A1 revela fibras eletrofiadas obtidas de polímeros com agentes bioativos, para aplicação em regeneração de nervos. A presente invenção difere do referido documento também pelo fato de, na presente invenção, a matriz ser composta de um poliéster comercial produzido por bactérias e ter em sua matriz nanoestruturas, bem como nanopartículas de pHA. Também difere pelo fato de ser um método de obtenção distinto daquele descrito no referido documento.

**[0014]** O documento PI 1107303-9 A2 revela um substituto ou curativo tissular obtido por *eletrospinning* com poliéster não sendo poli(hidroxialcanoatos) com microalga *Spirulina*. A presente invenção difere do referido documento, dentre outras razões técnicas, pelo fato de a matriz ser composta de um poliéster poli(hidroxibutirato) especificamente o PHB e ter em sua matriz nanoestruturas, bem como nanopartículas de pHA. Também difere do referido documento pelo fato de a presente invenção revelar um método de

obtenção distinto e tamanho do diâmetro final das fibras também distinto daquele revelado no referido documento.

**[0015]** O documento de Ito et al. (Ito Y, Hasuda H, Kamitakahara M, et al. A composite of hydroxyapatite with electrospun biodegradable nanofibers as a tissue engineering material. *J Biosci Bioeng.* 2005;100(1):43–49.) revela uma membrana do copolímero de polihidroxibutirato-co-hidroxivalerato. No entanto, a presente invenção difere da membrana revelada por Ito e colaboradores, dentre outras razões técnicas, por tratar-se de uma membrana de homopolímero polihidroxibutirato e utilizar hidroxiapatita sintética e cristalina e a qual está inserida na matriz eletrofiada, bem como adsorvida ao longo das fibras (nanopartículas).

**[0016]** Assim, do que se depreende da literatura pesquisada, não foram encontrados documentos antecipando ou sugerindo os ensinamentos da presente invenção, de forma que a solução aqui proposta possui novidade e atividade inventiva frente ao estado da técnica.

**[0017]** Portanto, é evidente que se trata de um problema do estado da técnica um processo de obtenção de membranas eletrofiadas microestruturadas ou nanoestruturadas e que as ditas membranas eletrofiadas sejam biocompatíveis e possuam, concretamente, resultados satisfatórios e/ou surpreendentes nos experimentos.

### **Sumário da Invenção**

**[0018]** Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir de um processo de obtenção de membrana eletrofiada nanoestruturada ou microestruturada e que apresenta biocompatibilidade, tais como bioabsorção, resistência, flexibilidade, biodegradabilidade, bem como a incorporação efetiva de partículas (e/ou de nanopartículas) de hidroxiapatita.

**[0019]** É um dos objetos da presente invenção um processo de obtenção de membrana eletrofiada caracterizado por compreender as etapas de:

a) obtenção de membrana de polímero de polihidróxibutirato (PHB) em solvente orgânico;

b) adição de hidroxiapatita na solução de polímero de polihidróxibutirato (PHB) da etapa a); e/ou

c) adição de nanopartículas de hidroxiapatita na solução de polímero de polihidróxibutirato (PHB) da etapa a) e/ou da etapa b).

**[0020]** É um outro objeto da presente invenção uma membrana eletrofiada obtida pelo processo conforme descrito pela presente invenção.

**[0021]** É um outro objeto da presente invenção uma composição que compreende a membrana conforme descrita pela presente invenção e pelo menos um veículo biologicamente aceitável.

**[0022]** É um outro objeto da presente invenção o uso da membrana conforme descrita pela presente invenção no preparo de uma composição para tratar lesões de tecidos biológicos.

**[0023]** É um outro objeto da presente invenção um processo de regeneração *ex-vivo* que compreende a etapa de contatar a membrana eletrofiada e/ou a composição conforme descrita(s) pela presente invenção com pelo menos um tecido biológico.

**[0024]** Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados refere-se à membrana eletrofiada obtida pelo processo de obtenção conforme revelado na presente invenção.

**[0025]** Estes e outros objetos da invenção serão imediatamente valorizados pelos versados na arte e pelas empresas com interesses no segmento, e serão descritos em detalhes suficientes para sua reprodução na descrição a seguir.

#### **Breve Descrição das Figuras**

**[0026]** Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente, são apresentadas as presentes figuras:

**[0027]** A Figura 1a mostra a distribuição de tamanho das partículas de HA utilizadas na fabricação dos arcaçoucos microestruturados.

- [0028]** A Figura 1b mostra a distribuição de tamanho das partículas de HA utilizadas no sobrenadante em solução para obtenção de fibras nanoestruturadas.
- [0029]** A Figura 2 mostra a imagem dos arcabouços destacando: i. uma fração da membrana eletrofiada; ii. arcabouço C0; iii. arcabouço C1; iv. arcabouço C2.
- [0030]** A Figura 3a mostra imagem obtida por microscopia eletrônica da fibra de C0, indicando-se a morfologia das fibras.
- [0031]** A Figura 3b mostra imagem obtida por microscopia eletrônica da fibra de C0, indicando-se a morfologia das fibras.
- [0032]** A Figura 3c é uma ampliação da imagem obtida por microscopia eletrônica para mostrar a disposição da nanotextura ao longo das fibras C0.
- [0033]** A Figura 3d indica a distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas para a fibra C0.
- [0034]** A Figura 3e indica a distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas para a fibra C0.
- [0035]** A Figura 4a mostra uma imagem obtida por microscopia eletrônica da fibra C1, indicando-se a morfologia das fibras.
- [0036]** A Figura 4b mostra uma imagem obtida por microscopia eletrônica da fibra C1, indicando-se a morfologia das fibras.
- [0037]** A Figura 4c mostra uma imagem obtida por microscopia eletrônica da fibra C1, indicando-se a disposição da nanotextura ao longo das fibras.
- [0038]** A Figura 4d mostra um espectro de EDS do arcabouço para as fibras C1.
- [0039]** A Figura 4e mostra a distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas para as fibras C1.
- [0040]** A Figura 4f mostra a distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas para as fibras C1.
- [0041]** A Figura 5a mostra uma imagem obtida por microscopia eletrônica da fibra C2, indicando-se a morfologia das fibras.

- [0042]** A Figura 5b mostra uma imagem obtida por microscopia eletrônica da fibra C2, indicando-se a morfologia das fibras.
- [0043]** A Figura 5c mostra uma imagem obtida por microscopia eletrônica da fibra C2, indicando-se a disposição da nanotextura ao longo das fibras.
- [0044]** A Figura 5d mostra um espectro de EDS do arcabouço para as fibras C2.
- [0045]** A Figura 5e mostra distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas para as fibras C2.
- [0046]** A Figura 5f mostra distribuição do diâmetro das fibras e das nanoestruturas para as fibras C2.
- [0047]** A Figura 6 mostra o Espectro Raman dos arcabouços demonstrando as bandas referentes aos grupos da hidroxiapatita e do polímero PHB, sendo: a) o arcabouço de C0; b) arcabouço C1; c) arcabouço C2.  $\delta$ : deformação,  $\nu$ : estiramento, s: simétrico, as: assimétrico.
- [0048]** A Figura 7 mostra a curva ATG de perda de massa em relação à temperatura dos arcabouços em atmosfera de ar sintético.
- [0049]** A Figura 8 mostra a avaliação da citotoxicidade dos arcabouços.
- [0050]** A Figura 9 mostra a taxa de proliferação celular, densidade óptica em função do tempo de cultivo (\* $p < 0,05$ ;  $n=3$ ).
- [0051]** A Figura 10 mostra a cultura no dia 3 mostrando as células tronco-mesenquimais aderidas nos arcabouços a) C0; b) C1; c) C2 e d) controle. As células estão coradas com Azul de Toluidina.
- [0052]** A Figura 11 mostra a cultura no dia 7 mostrando as células tronco-mesenquimais aderidas nos arcabouços a) C0; b) C1; c) C2 e d) controle. As células estão coradas com Azul de Toluidina.
- [0053]** A Figura 12 mostra a cultura no dia 14 mostrando as células tronco-mesenquimais aderidas nos arcabouços a) C0 b) C1; c) C2 e d) controle. As células estão coradas com Azul de Toluidina.
- [0054]** A Figura 13 mostra a mineralização da matriz. Valores de densidade óptica dos arcabouços investigados em função de tempo,

comparados à densidade óptica do osso cortical (n=3, p< 0,05 †: diferença estatística entre o osso e os demais grupos, #: diferença estatística de ambos C1 e C2 do dia 14 entre PHB e cont., \*: diferença estatística do C1 do dia 7 entre PHB, cnt).

### **Descrição Detalhada da Invenção**

**[0055]** É um dos objetos da presente invenção um processo de obtenção de membrana eletrofiada que compreende as etapas de:

**[0056]** a) obtenção de membrana de polímero de polihidróxibutirato (PHB) em solvente orgânico;

**[0057]** b) adição de hidroxiapatita na solução de polímero de polihidróxibutirato (PHB) da etapa a); e/ou

**[0058]** c) adição de nanopartículas de hidroxiapatita na solução de polímero de polihidróxibutirato (PHB) da etapa a) e/ou da etapa b).

**[0059]** Em uma concretização, o solvente orgânico é selecionado dentre: clorofórmio, dimetilformamida, bis (2 – metoxietil) éter e 2,2,2-trifluoro-etanol.

**[0060]** Em uma concretização, a hidroxiapatita apresentar tamanho de partícula entre 0,05 µm e 5,0 µm.

**[0061]** Em uma concretização, as lesões são de pele e/ou de mucosas de mamíferos.

**[0062]** É um outro objeto da presente invenção uma membrana eletrofiada obtida pelo processo conforme descrito pela presente invenção.

**[0063]** É um outro objeto da presente invenção uma composição que compreende a membrana conforme descrita pela presente invenção e pelo menos um veículo biologicamente aceitável.

**[0064]** É um outro objeto da presente invenção o uso da membrana conforme descrita na presente invenção por ser no preparo de uma composição para tratar lesões de tecidos biológicos.

**[0065]** É um outro objeto da presente invenção um processo de regeneração *ex-vivo* e que compreende a etapa de contatar a membrana eletrofiada com pelo menos um tecido biológico.

**[0066]**      Hidroxiapatita

**[0067]**      No presente pedido de patente, o termo “hidroxiapatita” é entendido como sendo o mineral de fórmula  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$  e/ou de fórmula  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , sendo uma forma de apatita de cálcio.

**[0068]**      Membrana de PHB

**[0069]**      No presente pedido de patente, o termo “membrana de PHB” é entendido como sendo uma membrana microestruturada ou nanoestruturada de polihidróxibutirato (PHB) e que pode conter partículas (micropartículas ou nanopartículas) de polihidróxibutirato. A referida membrana de PHB pode ser obtida, por exemplo, pela técnica denominada eletrofição possui diversas aplicações e vantagens, conforme revelado no presente pedido de patente.

**[0070]**      Polihidróxibutirato (ou, abreviadamente, “PHB”)

**[0071]**      No presente pedido de patente, o termo “polihidróxibutirato” é entendido como sendo um polímero pertencente à classe dos poliésteres e que pode ser produzido tanto pela via sintética quanto por microrganismos específicos ou plantas. O termo também engloba a forma poli-3-hidróxibutirato (P3HB), a qual é o tipo mais comum de polihidróxialcanoato.

**[0072]**      Solvente orgânico

**[0073]**      No presente pedido de patente, o termo “solvente orgânico” é entendido como sendo qualquer solvente orgânico apropriado para a aplicação que se pretende. Exemplos não limitantes de solvente orgânico incluem: clorofórmio, dimetilformamida (DMF), acetato de etila, dentre outros solventes orgânicos que, por exemplo, possuem propriedades físico-químicas próximas ao do clorofórmio (não sendo necessariamente clorados).

**[0074]**      nHAp

**[0075]**      No presente pedido de patente, o termo “nHAp” é entendido como uma abreviação para a expressão “nanopartículas de hidroxiapatita”.

**[0076]**      HAp

**[0077]**      No presente pedido de patente, o termo “HAp” é entendido como uma abreviação para a expressão “hidroxiapatita”.

**[0078]**      Veículo biologicamente aceitável

**[0079]**      O termo “veículo biologicamente aceitável”, no contexto do presente pedido de patente, deve ser entendido como sendo qualquer veículo biológico ou farmacêutico e que apresente adequada biocompatibilidade com os demais componentes da composição.

**[0080]**      Tecido biológico

**[0081]**      O termo “tecido biológico”, no contexto do presente pedido de patente, deve ser entendido como sendo qualquer tecido que apresente origem biológica como, por exemplo, qualquer camada da pele humana e/ou de animais, mucosas de quaisquer órgãos encontrados nos seres humanos e/ou em mamíferos em geral, dentre outros tecidos biológicos.

**[0082]**      A presente invenção provê diversas vantagens frente ao estado da técnica, tais como, mas não se limitando a, um processo de obtenção de membrana eletrofiada, sendo que a dita membrana eletrofiada apresenta comprovada biocompatibilidade com tecidos biológicos e efetiva incorporação de nanopartículas e/ou micropartículas de hidroxiapatita.

#### **Exemplo 1. Exemplos de concretização da presente invenção**

**[0083]**      Os exemplos aqui mostrados têm o intuito somente de exemplificar uma das inúmeras maneiras de se realizar a invenção, contudo sem limitar, o escopo da mesma.

#### **Exemplo 1: Exemplo de obtenção dos arcabouços (membranas de PHB contendo hidroxiapatita e membranas de PHB não contendo hidroxiapatita)**

**[0084]**      Para a confecção das membranas de PHB, primeiramente foi ajustada a concentração do polímero de PHB a 0,5 mg/mL em clorofórmio. Para uma melhor solubilização do polímero de PHB, este foi mantido em refluxo à temperatura de 70 °C por 4 horas. Após, foi adicionado o DMF e mantido por agitação por 30 minutos, seguido de 15 minutos em banho de ultrassom. Posteriormente foi avaliada a influência da vazão na morfologia das fibras. Para a confecção de arcabouços compósitos de HAp foram empregadas

duas técnicas, sendo que as ditas duas técnicas são: (I) adicionar HAp na solução do polímero de PHB e (II) embeber a membrana de PHB em uma solução de nHAp. Para ambas as técnicas, a solubilização do polímero foi idêntica à utilizada na fabricação da membrana de PHB.

**[0085]** A seguir estão descritas mais detalhadamente as duas técnicas/metodologias empregadas:

**[0086]** Técnica (I): Após a solubilização do PHB, foi adicionado HAp à solução e esta solução colocada em banho de ultrassom por 30 minutos. Posteriormente seguiu-se com a eletrofiliação da membrana.

**[0087]** Técnica (II): Para a confecção deste arcabouço foram preparadas uma solução de HAp em álcool etílico nas seguintes concentrações: 0,5 mg/mL e deixado por 30 minutos em banho de ultrassom. Após o preparo das soluções contendo nHAp, a membrana de PHB permaneceu embebido nesta solução por 24 horas e, em seguida, a referida membrana foi lavada por três vezes em água deionizada e lavada uma vez em álcool para a retirada de excesso de nHAp e secas a temperatura ambiente.

**[0088]** Processo de eletrofiliação

**[0089]** Os arcabouços foram fabricados e nomeados de acordo com a Tabela 1, utilizando a proporção de 10:2 mL (v/v) de clorofórmio e dimetilformamida, respectivamente. O sistema utilizado no processo de eletrofiliação foi composto por:

**[0090]** Fonte de alta tensão;

**[0091]** Conjunto de seringa plástica e capilar: foram utilizadas seringas plásticas com capacidade de 5 mL (Walmur). Agulhas hipodérmicas de aço inox com diâmetro interno de 1,2 mm e ponta romba serviram como capilar a partir do qual o fluido foi submetido ao campo elétrico. Durante o processo de eletrofiliação, o capilar foi conectado diretamente à fonte de alta tensão;

**[0092]** Coletor: o coletor constitui-se de um cilindro de alumínio de 100 mm de diâmetro. O coletor foi revestido com papel alumínio comum para

facilitar a remoção das fibras formadas. As fibras foram coletadas no modo estático, ou seja, sem a rotação do cilindro coletor;

**[0093]** Bomba de infusão: para manter constante o fluxo de material ejetado pelo capilar.

**Tabela 1 - Parâmetros de eletrofiação utilizados para a produção dos arcabouços**

Amostra	Distância(cm)	Tensão (kV)	Fluxo (mL/h)	Conc. da solução (mg/mL)	
				PHB	HAp/nHAp
C0			3,5		—
C1	14	15	3,0	41,6	9,1
C2			3,5		0,5*

\* utilizado somente o sobrenadante da solução.

**[0094] Caracterização dos arcabouços**

**[0095] Microscopia eletrônica de varredura (MEV)**

**[0096]** Para a obtenção das imagens e caracterização morfológica dos arcabouços selecionados, foi utilizado o equipamento JEOL modelo JSM-6060. Para as análises de espectroscopia elétrons secundários dispersos (EDS, em inglês), utilizou-se o equipamento JEOL modelo JSM-5800 com tensão de 10 kV. As amostras foram recobertas com carbono e ouro.

**[0097] Medidas de diâmetros das fibras e estruturas**

**[0098]** Para obtenção da distribuição do tamanho das fibras e das estruturas, as membranas foram divididas em quatro quadrantes e foram obtidas quatro imagens a partir deles. Após, com o uso do *software ImageJ* foram feitas quarenta contagens para cada imagem. As medidas de diâmetro das fibras/microestruturas foram obtidas a partir de imagens com aumento de 1.500x e para as nanoestruturas, imagens com aumento entre 35.000 - 70.000x.

**[0099] Espectroscopia Raman**

**[0100]** Para investigar a presença da hidroxiapatita, foi realizada a análise de espectroscopia Raman, com o equipamento modelo Renishaw inVia Spectrometer, na faixa de 400-1200  $\text{cm}^{-1}$ , utilizando laser de 532 nm de comprimento de onda. Para cada registro, o número de acumulações a cada varredura foi de cinco, e o tempo de exposição foi de 10 segundos.

**[0101] Área superficial específica pelo método Brunauer-Emmet-Teller (BET)**

**[0102]** As análises de área superficial específica foram realizadas com o equipamento *Quantachrome Nova® Surface Area Analyser*. As amostras foram previamente preparadas em vácuo a temperatura de 60° C por 24 horas para a remoção de umidade.

**[0103] Tamanho de poros pelo método Barret, Joyner-Halenda (BJH)**

**[0104]** As análises de tamanho de poros foram realizadas com o equipamento *Quantachrome Nova® Surface Area Analyser*. As amostras foram previamente preparadas em vácuo a temperatura de 60° C por 24 horas para a remoção de umidade.

**[0105] Análise termogravimétrica**

**[0106]** A análise termogravimétrica (ATG) foi utilizada para verificar o teor de HAp, bem como a sua influência da estabilidade térmica nos arcabouços compósito. As análises foram realizadas com o equipamento TGA/SDTA 851e Mettler-Toledo, utilizando uma taxa de aquecimento de 10 °C/min. As análises foram realizadas na faixa de temperatura de 30 °C a 1000 °C em atmosfera de ar sintético com fluxo de 40 mL/min.

**[0107] Granulometria da HAp**

**[0108]** A distribuição do tamanho expressa em histogramas das partículas do pó de hidroxiapatita, bem como da fração do sobrenadante da solução de HAp utilizada para obtenção de fibras nanoestruturadas, são apresentadas, respetivamente, na Figura 1a e na Figura 1b. Ambas podem ser consideradas monomodais e com estreita distribuição de tamanho de partículas.

**[0109]** A Tabela 2 apresenta os valores correspondentes aos menores diâmetros a 10%, 50% e 90% e o diâmetro médio das partículas analisadas. Os resultados indicam que a HAp utilizada apresenta tamanho médio de partículas de ordem micrométrica (mHA) e nanométrica (nHA), no caso da fração do sobrenadante da solução de HAp, utilizada para obtenção de fibras nanoestruturadas C2. Isso está em concordância com a proposta deste trabalho de produzir arcabouços micro/nanoestruturados a partir da incorporação da HAp nas matrizes eletrofiadas de PHB.

**Tabela 2 - Tamanho médio das partículas de hidroxiapatita**

<b>Amostras</b>	<b><math>D_{10}</math> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>D_{50}</math> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>D_{90}</math> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	<b><math>D_{\text{médio}}</math> (<math>\mu\text{m}</math>)</b>
mHA	0,89	2,89	9,83	4,26
nHA	0,07	0,13	0,23	0,14

**[0110]** **Caracterização das membranas**

**[0111]** **Morfologia dos acabouços**

**[0112]** Foram fabricados arcabouços utilizando a técnica de eletrofiação para serem avaliados na etapa de biocompatibilidade. Os arcabouços deveriam mimetizar tanto quanto possível uma matriz extracelular óssea, apresentando adesão e permitindo a proliferação e diferenciação de células mesenquimais de rato nos arcabouços. A Figura 2 apresenta o aspecto macroscópico dos arcabouços eletrofiados, são apresentadas duas morfologias básicas, uma microestruturada com contas de HAp dispersas na matriz orgânica, e a outra nanoestruturada no qual os cristais de HAp estão revestindo a matriz orgânica.

**[0113]** As Figuras 3, 4 e 5 apresentam imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura dos arcabouços eletrofiados selecionados, correspondendo respectivamente ao arcabouço com fibras de C0 e dos compósitos C1 e C2.

**[0114]** Indistintamente, os arcabouços formados por fibras de PHB apresentam poros interconectados em uma estrutura 3D, e estão orientadas aleatoriamente. Junto às imagens das fibras em cada figura, está o gráfico de

histogramas correspondente à determinação do tamanho médio obtido pela análise de imagem pelo *software ImageJ*. Assim, os resultados indicaram um diâmetro médio das fibras de C0 de  $0,552 \pm 0,152 \mu\text{m}$ . As fibras dos compósitos C1 (Figura 6.4) e C2 (Figura 6.5) apresentaram respectivamente tamanhos médios de  $0,627 \pm 0,190 \mu\text{m}$  e  $0,668 \pm 0,134 \mu\text{m}$ . Também se pode observar que todos os arcabouços apresentam estruturas nanométricas ao logo das fibras.

**[0115]** Em se tratando do arcabouço C1, observou-se que ocorre a dispersão da HAp ao logo da membrana com formato de esfera de HAp. Além do mais, estas estruturas de ordem micrométrica apresentam um tamanho médio de  $5,58 \pm 2,05 \mu\text{m}$ . O arcabouço C1 também apresenta ao longo de suas fibras nHAp incorporadas, observado nas em detalhe como maior aumento. Este maior aumento permitiu uma estimativa do tamanho das partículas sobre as fibras, atingindo um diâmetro médio da ordem de  $0,116 \mu\text{m}$ . No entanto, a maior parte da HAp está dispersa na matriz em formas de mHAp.

**[0116]** Em relação ao arcabouço C2, as nanoestruturas apresentam um diâmetro maior, cerca de 40nm, se comparadas com a membrana de PHB. Este aumento está relacionado com a adsorção de nHAp na superfície da membrana eletrofiadas (Figura 6.6.c).

**[0117]** Comparando a morfologia dos arcabouços C0 e C1, pode-se notar que a adição da HAp na solução de *eletrospinning* muda significativamente a estrutura dos arcabouços, no tocante à quantidade de fibras por volume em toda a extensão da matriz eletrofiadas, e conseqüentemente, proporcionou um aumento no tamanho dos poros.

**[0118]** A presença de HAp ao longo da superfície das fibras foi confirmada pela análise de EDS (Figura 4d e Figura 5d). A hidroxiapatita apresentou razão molar de Ca/P de 1,67. Também pela análise de EDS, pode-se notar o aparecimento de magnésio,  $< 2,0 \%$  o qual pode ser encontrado nas HAp sintéticos ou naturais, devido a substituição do átomo de  $\text{Ca}^{+2}$  pelo átomo de  $\text{Mg}^{2+}$ .

**[0119]** Segundo Megelski (2010), uma maneira de formar na superfície das fibras eletrofiadas nanoestruturas, é através da utilização de solventes com diferentes pontos de ebulição e constante dielétricas. Durante o evento da evaporação do solvente, a solução torna-se termodinamicamente instável, levando a separação de fases: uma fase rica em polímero e uma fase deficiente de polímero.

**[0120]** O clorofórmio é um dos poucos solventes que solubiliza o PHB, seu ponto de ebulição e constante dielétrica são baixos, o que leva à rápida cristalização do PHB no processo de eletrofiação (CORREIA, 2013). Em contrapartida, a dimetilformamida (DMF) é um solvente dipolar aprótico, que tem a constante dielétrica e o ponto de ebulição elevados.

**[0121]** No processo de eletrofiação, a pressão de vapor do solvente desempenha um papel crítico na determinação da taxa de evaporação e no tempo de secagem. A volatilidade do solvente influencia o processo de separação de fases e a cristalização, desempenhando um papel significativo na formação das nanoestruturas. Estruturas de nanoporos e nanotextura na superfície das fibras foram relatadas devido a esse processo de separação de fases (BOGNITZKI, 2001; WANG, 2009; BHARDWAJ, 2010).

**[0122]** Nos experimentos realizados, a adição de DMF na solução polimérica provavelmente reduziu sua pressão de vapor. Conseqüentemente, diminuiu a evaporação do solvente a partir dos jatos, permitindo que os jatos permanecessem carregados e estirados como fibras. Desta maneira, a rápida evaporação do clorofórmio induziu a separação de fases, e o colapso resultante da pressão ambiente e repulsão elétrica reduzida permitiu a formação das nanoestruturas das fibras.

**[0123]** Lin *et al.* (2010) apresentou uma abordagem direta para a fabricação de nanoporos via *electrospinning* em fibras de polímero de poliestireno (PS), fibras com micro e nanoporos, tanto no núcleo, quanto sobre as superfícies, bem como estruturas rugosas na superfície das fibras. As estruturas foram produzidas variando as composições dos solventes e as

concentrações das soluções de PS. O estudo relatou que a utilização de solvente altamente volátil no processo de eletrofiação favoreceu a produção de nanoestrutura nas fibras.

**[0124]** A importância da mineralização dispersa nas superfícies reside no fato de que as estruturas que contêm cálcio podem expor maior número de sítios de ligação, em virtude da sua maior área superficial para adsorção de biomoléculas (BARBIERI, 2013).

**[0125]** Chae *et al.* (2009) obtiveram fibras eletrofiadas de alginato com HA amorfo. A nucleação da HA foi induzida pela ligação entre os grupos  $\text{COO}^-$  do alginato e o  $\text{Ca}^{2+}$  proveniente da HA. Em seu trabalho, observaram que ocorreu uma maior adesão e proliferação de osteoblastos de rato nos compósitos HA/alginato quando comparados aos arcabouços de alginato puro.

**[0126]** A dissociação dos grupos  $-\text{COOH}$  e  $-\text{OH}$ , presentes nos poliésteres PLGA/PLA, forma cargas negativas as quais servem de sítios de nucleação de íons de cálcio na superfície do arcabouço (CHEN, 2005; NGIAM, 2009). Conseqüentemente, como a estrutura do PHB é similar a destes poliésteres, apresentando ambos os grupos, pode-se esperar que sejam formados sítios de nucleação do íon cálcio, tornando possível o recobrimento uniforme da HAp sobre a superfície das fibras que formam o arcabouço.

**[0127]** A incorporação de características nanotopográficas ao projetar a arquitetura da superfície do arcabouço, a fim de mimetizar a nanoestrutura do osso natural, é uma área de intensa investigação na Engenharia Tecidual óssea (STEVENS, 2005; BERRY, 2006). A rugosidade da superfície aumenta a reatividade para o estabelecimento da ligação mediada pelas integrinas, intensificando a proliferação e a diferenciação celular (YUAN, 1999; SIMON, 2003).

**[0128]** Área superficial específica e tamanho de mesoporos

**[0129]** A Tabela 3 apresenta os diâmetros dos poros e a área superficial específica dos arcabouços investigados. Nota-se que todos os arcabouços apresentam poros que podem ser classificados como mesoporos (poros com

diâmetro entre 2 nm e 50 nm). Para os arcabouços compósitos PHB+HA, o volume total e diâmetro médio dos mesoporos foram afetados pela presença da HA, independente desta ser micro ou nanométrica. De fato, para arcabouços de fibras PHB+HAp, C1 e C2, a área superficial aumentou mais de 200% e quase 100% respectivamente, em relação à área do arcabouço PHB sem HAp (C0). O aumento foi bastante significativo também quanto ao volume dos mesoporos e tamanho médio dos mesoporos.

**Tabela 3 - Área superficial e volume e tamanho dos mesoporos**

Amostras	Área superficial específica $S_{BET}$ ( $m^2/g$ )	Volume dos mesoporos ( $cm^3/g$ )	Diâmetro dos mesoporos (nm)
C0	2,467	0,015	4,386
C1	7,075	0,047	12,334
C2	4,940	0,048	12,484

**[0130]** Os mesoporos encontrados no arcabouço PHB aos vazios encontrados entre as nanoestruturas na superfície das fibras que desta forma contribuiu para a formação dos mesoporos.

**[0131]** Deve-se salientar que o fato de as membranas apresentarem mesoporos potencializa seu uso como adsorventes de fármacos e moléculas de interesse específico, direcionando a regeneração e modulando a resposta imune do biomaterial.

**[0132] Análise de fases por espectroscopia raman**

**[0133]** A Figura 8 apresenta um espectro Raman dos arcabouços C1 e C2, incluindo para efeito de comparação o espectro do arcabouço C0. A fração orgânica dos arcabouços está representada pelas bandas características do polímero PHB nas regiões de  $433\text{ cm}^{-1}$ ,  $599\text{ cm}^{-1}$ ,  $840\text{ cm}^{-1}$  e  $1058\text{ cm}^{-1}$ . As

bandas referentes à HAp são a banda  $430\text{ cm}^{-1}$ , referente à deformação assimétrica do  $\text{PO}_4$  da hidroxiapatita e a da região entre  $550\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ , que se sobrepõe às bandas referentes à deformação dos grupo  $\text{-CCO-}$  e  $\text{-C-CH}_3$ , respectivamente, do polímero PHB (FURUKAWA, 2006).

**[0134]** No espectro do arcabouço C2, os picos referentes à HAp encontram-se com uma menor intensidade quando comparados aos picos de HAp do arcabouço C1. Isso se deve provavelmente pela menor concentração de HAp no arcabouço C2.

**[0135]** Teor de hidroxiapatita nos arcabouços

**[0136]** A Figura 9 apresenta a curva de perda de massa dos arcabouços em atmosfera de ar sintético. A Tabela 4 resume os principais dados obtidos da análise termogravimétrica. Pelos dados da análise termogravimétrica, foi possível calcular o teor de HA efetivamente presente nos arcabouços C1 e C2. Os valores encontrados foram aproximadamente 35% e 11%, respectivamente. Esses valores já têm descontados a massa remanescente de 5% acima de  $300^\circ\text{ C}$ , provavelmente cinzas, do polímero PHB.

**[0137]** Também se pode notar que a incorporação da hidroxiapatita no arcabouço C1 e C2 quando comparado ao arcabouço PHB contribuiu para o aumento da temperatura de degradação de ambos os arcabouço.

**[0138]** Pode-se observar que nenhum arcabouço perdeu massa até a temperatura de  $200^\circ\text{ C}$ , o que é um indicativo de que o solvente utilizado na fabricação das fibras foi evaporado em sua totalidade durante o processo de *eletrospinning*.

Arcabouço	$T_{inicial}$ ( $^\circ\text{C}$ )	$T_{final}$ ( $^\circ\text{C}$ )	Massa remanescente
-----------	------------------------------------	----------------------------------	--------------------

Tabela

			(%)
C0	235	252	5
C1	246	270	45
C2	243	268	16

4 -

### Temperatura de degradação dos arcabouços

[0139]

#### Exemplo 2

[0140]

#### Avaliação da biocompatibilidade

[0141]

#### Isolamento das Células de Medula Óssea

[0142]

Para a obtenção das células de medula óssea, foram utilizados ratos *Wistar* machos, anestesiados com Ketamina/Clorpromazina (8:2 v/v) conforme o peso do animal, e sacrificados com guilhotina. As células da medula óssea foram obtidas das diáfises do fêmur, onde foram injetados 10 mL de meio DMEM sem soro. A suspensão da medula foi centrifugada a 400 g e ressuspendida em 5 mL de meio DMEM, para a separação por gradiente de densidade usando Histopaque-1077. Para tanto, a suspensão da medula em meio DMEM foi transferida para um tubo cônico de 15 mL, contendo 5 mL de Histopaque-1077 e centrifugadas a 400 g, durante 30 minutos. A camada de células mononucleares foi coletada na interface Histopaque-DMEM e lavada com 10 mL de DPBS, após foi centrifugada a 1.500 rpm, por 3 minutos, sendo repetida essa etapa duas vezes.

[0143]

Em seguida, as células foram ressuspendidas com 1 mL de meio DMEM e foram realizadas contagem e avaliação da viabilidade pelo método de exclusão com Azul de Tripán em câmara de Neubauer.

[0144]

#### Caracterização da população celular por citometria de fluxo

[0145]

A fração mononuclear proveniente da medula óssea foi caracterizada com os anticorpos CD3, CD45, CD49b e CD90 exclusivos para ratos, conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), na concentração de um 1:10 em PBS

**[0146]** A suspensão das células foi incubada com os anticorpos a 5 °C no escuro por 15 minutos. Após, as células foram lavadas com PBS e centrifugadas a 1.500 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas com 1 mL de paraformaldeído 4% (em PBS). As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACScalibur (Becton Dickinson Immunocytometry Systems). Os dados obtidos correspondem a, pelo menos, 50.000 eventos, sendo analisados no programa WinMDI 2.8.

**[0147] Cultivo celular**

**[0148]** A fração mononuclear foi colocada em cultura em meio DMEM suplementado com L-glutamina, 10% de SFB, 100 UI/mL de penicilina, 100 UI/mL de estreptomicina e 100 µg/mL de gentamicina, com densidade de  $0,1 \times 10^7$  células em garrafas de cultura de 75 cm<sup>2</sup>. Logo em seguida, foram incubadas em estufa umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37° C por 72 horas. Então, as células não aderentes foram removidas através da troca do meio.

**[0149]** Posteriormente, quando as células em cultivo alcançaram confluência de aproximadamente 80%, foi feito o repique com Tripsina-0,25 EDTA 1x. O meio de cultura foi removido, e as células mesenquimais permaneceram aderidas à garrafa de cultura. Após quatro passagens, as células foram utilizadas para as avaliações nos arcabouços.

**[0150] Avaliação da citotoxicidade**

**[0151]** Para avaliar a citotoxicidade dos arcabouços, foi utilizado o método da redução do sal de formazan (MTT), conforme a norma ISO 10993/5. Para tanto, os arcabouços foram imersos no meio de cultura (DMEM), sendo o solvente de extração. Os extratos permaneceram durante os períodos de 3, 7 e 14 dias em estufa a 37° C com 5% de CO<sub>2</sub> em agitação. A proporção da área da superfície da amostra para o volume de meio foi de 3cm<sup>2</sup> /mL, de acordo com a essa norma.

**[0152]** A técnica tem como princípio a determinação da habilidade de células vivas em reduzirem brometo 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2il-tetrazólico formando cristais insolúveis de formazan de coloração violeta. Os

sais de formazan foram solubilizados em DMSO e a densidade óptica foi mensurada a 570nm, com o espectrofotômetro de microplaca (BioRad). A porcentagem de células viáveis foi calculada em relação ao grupo controle que não recebeu os extratos dos polímeros.

**[0153] Avaliação da proliferação celular**

**[0154]** Os arcabouços foram confeccionados em formato de disco com diâmetro de 5,0 mm e colocados em placas de cultura de 96 poços. Sobre os discos (n=3), foram semeadas  $0,5 \times 10^4$  células, nos períodos de 3, 7 e 14 dias, com meio DMEM suplementado, porém sem meio de indução osteogênico. A cada três dias, as células foram lavadas com DPBS e trocados os meios. A proliferação celular foi mensurada através da técnica de MTT, comparando as absorbâncias entre os períodos avaliados.

**[0155] Mineralização dos arcabouços**

**[0156]** O método de cultivo foi o mesmo empregado para a avaliação da proliferação celular, como acima descrito.

**[0157]** Para avaliar a mineralização dos arcabouços, foi utilizada a técnica de coloração com a solução de Vermelho de Alizarina S (VAS) [4,1mM/pH 4,1], que é um corante antraquinona utilizado para corar depósitos de cálcio. O corante forma um complexo com cálcio durante o processo de quelatação resultando em birrefringência. Esta é uma técnica amplamente utilizada para avaliar a diferenciação óssea de célula-tronco.

**[0158]** No entanto, para quantificar a mineralização entre os períodos, a VAS foi extraída utilizando 10% de ácido acético em DMSO, e mesurado no espectrofotômetro de microplaca (BioRad), com comprimento de onda de 504nm. Foi preparado um branco em paralelo para cada período e a densidade óptica, dependente da concentração do soluto (VAS), observada nos grupos C0, C1 e C2 subtraída da densidade óptica do branco. Também foi feito um controle positivo, utilizando um fragmento de 5,0mm da tíbia do rato doador das células da medula óssea. Deste modo, foi possível comparar os valores da densidade óptica em relação a uma matriz óssea mineralizada.

**[0159] Análise estatística**

**[0160]** Os dados quantitativos foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão Para a comparação dos grupos, foram utilizados análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey para comparações pareadas. Valores com  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos. Toda a análise estatística foi realizada com auxílio do *software* estatístico *GraphPad Prism6*.

**[0161] Citotoxicidade**

**[0162]** O ensaio colorimétrico de viabilidade celular utilizando sal de tetrazólio é baseado na capacidade das células viáveis reduzirem o sal de tetrazólio em compostos formazan, produzindo uma coloração violeta que pode ser quantificada em espectrofotômetro. O valor da densidade óptica está diretamente relacionado ao número de células viáveis. Desta maneira, torna-se útil para avaliar a citotoxicidade.

**[0163]** Segundo a norma ISO 10993-5, para avaliação *in vitro* de dispositivos médicos, compostos que apresentam viabilidade celular  $> 80\%$  são considerados de pouca ou nenhuma citotoxicidade, sendo bons candidatos para uso médico. Conforme a Tabela 5 da norma ISO 10993-5, todos os materiais apresentam uma leve citotoxicidade.

**Tabela 5 - Classificação de citotoxicidade segundo a norma ISO 1099-5**

	Viabilidade celular (%)*
Citotoxicidade	Faixa
Não -citotóxico	$> 90$
Levemente citotóxico	80 a 89
Moderadamente citotóxico	50 a 79
Severamente citotóxico	$< 50$

\* porcentagem em relação ao controle

**[0164]** Os dados da viabilidade celular nos períodos de 3, 7 e 14 dias são apresentados na Figura 10. Os resultados da citotoxicidade dos arcabouços após 3, 7 e 14 dias indicou que todos os arcabouços apresentaram viabilidade

celular maior que 79%, sendo esta a apresentada pelo arcabouço de PHB após 3 dias.

**[0165]** De maneira geral, todos os materiais implantados geram uma resposta imunológica, quer seja pelo material, quer seja pelo processo cirúrgico. Dependendo desta resposta, o implante terá sucesso em sua função ou pode ser rejeitado ou encapsulado. Apesar dos arcababouços investigados apresentarem uma resposta citotóxica leve, esta pode trazer benefícios no processo de cicatrização e remodelamento do tecido na área implantada.

**[0166]** Estudos recentes mostram que além das células-tronco serem atraídas aos locais de injúria tecidual, por intermédio de quimiocinas, elas também podem modular a resposta inflamatória no local (DAZZI, 2006; SCHEIBE, 2012).

**[0167]** A análise *in vitro* da viabilidade celular é o primeiro passo para avaliar a biocompatibilidade de um biomaterial. No entanto, outras características dos biomateriais também são importantes quando se avalia o sucesso destes quando implantados. Um aspecto muito importante é a adesão celular.

**[0168]** Adesão e proliferação celular

**[0169]** A importância da adesão está relacionada à finalidade para qual se pretende utilizar o biomaterial. Aqui, sua importância é significativa, pois se trata de arcabouços utilizados em Engenharia Tecidual, onde se visa a regeneração e o remodelamento de tecidos duros ou moles. Isto se difere de dispositivos utilizados em contato com o tecido sanguíneo, onde a adesão celular pode levar ao acúmulo de plaquetas e células responsáveis pela coagulação, e deste modo inviabilizar a utilização do biomaterial.

**[0170]** Assim, nos arcabouços a adesão celular é um importante parâmetro pelo qual superfícies podem ser avaliadas para determinar a adequação para o uso proposto como biomateriais na Engenharia Tecidual. A capacidade da célula em aderir e proliferar-se sobre a superfície do material é a primeira fase de interação célula-material (EL-AMIN, 2003).

**[0171]** Desta forma, foi analisada a adesão e proliferação de células-tronco mesenquimais de rato nos arcabouços micro e nanoestruturados e seus compósitos. Para tanto, foram avaliados três períodos: 3, 7 e 14 dias, após esses períodos, as células foram fixadas e coradas com Azul de Toluidina e visualizadas em microscópio óptico para observar a adesão das células, bem como sua morfologia, que foram comparadas ao grupo controle - células cultivadas sobre a placa de cultura. Igualmente, foi avaliada a proliferação das células nos períodos citados através da comparação entre os grupos e períodos. A proliferação foi avaliada utilizando o ensaio de MTT nas células aderidas nos arcabouços, permitindo determinar a taxa de proliferação das células aderidas quando comparada ao grupo controle.

**[0172]** A Figura 11 apresenta as curvas de proliferação dos arcabouços nos períodos de tempo investigados. Como a adesão e a proliferação são características que estão intimamente interligadas na interação célula-material, elas serão discutidas em conjunto, para melhor compreensão dos mecanismos envolvidos.

**[0173]** Observa-se que em todos os períodos as células proliferam, mostrando excelente atividade celular. Quando comparado à proliferação entre os dias para cada grupo, foi encontrada uma diferença estatística no grupo controle no dia três, quando comparado aos dias sete e quatorze. Ao contrário do grupo PHB, que apresentou uma diferença significativa na proliferação nos dias três e sete quando comparado ao dia quatorze. Ambos os compósitos mostraram somente diferença estatística no dia três comparado ao dia quatorze.

**[0174]** No entanto, quando os grupos foram comparados entre eles em cada período, observa-se uma diferença na proliferação do grupo PHB no dia três em relação aos grupos controle no dia sete e para ambos os arcabouços e grupo controle no dia quatorze. Nos demais períodos, e grupos, não foram encontradas diferenças significativas.

**[0175]** Observando o gráfico da proliferação, nota-se que o grupo PHB apresenta baixa proliferação nos períodos de três a sete dias. Essas curvas podem ser explicadas pelas características da célula e da interação desta com a superfície do arcabouço PHB. Também se encontra uma diminuição na proliferação do grupo controle entre os dias sete e quatorze.

**[0176]** Em se tratando do grupo controle, a diminuição da proliferação pode ser atribuída à alta densidade celular encontrada no dia sete, que se observa melhor na microfotografia das células coradas do controle no dia sete. Esta alta densidade pode ter contribuído para a diminuição da proliferação das células na superfície do poço na placa de cultura, na qual se pode notar uma confluência das células. Deste modo, a falta de espaço para as células crescerem pode ter acarretado a diminuição da atividade mitótica.

**[0177]** A atividade mitótica é um mecanismo encontrado nas células eucarióticas que ajuda a manter o equilíbrio nos tecidos, permitindo o crescimento organizado, evitando o crescimento descontrolado e o surgimento de neoplasias. Um dos fatores que desencadeia o mecanismo é a inibição da proliferação celular por contato entre as células, quando estas se encontram em alta densidade.

**[0178]** Logo, para o grupo C0, a superfície deste polímero pode ter contribuído para a diminuição da adesão celular. Devido provavelmente à hifrofobicidade do PHB, houve uma menor adesão das células e, conseqüentemente uma menor taxa na proliferação nos períodos iniciais. No entanto, observa-se que as células proliferam até o dia 14. Estudos mostram que o balanço entre grupos hidrofílicos e hidrofóbicos contribui para uma melhor adesão celular (OLMEDILLA, 2006).

**[0179]** Deste modo, com a adição de HAp nos arcabouços C1 e C2 houve uma diminuição da hifrofobicidade do polímero PHB, devido à contribuição da hidrofobicidade da HAp, contribuindo para uma melhor adesão das células. No entanto, a proliferação celular permanece discreta nos grupos C1 e C2, ao longo dos períodos, porém é constante. Essa singela proliferação

das células sobre os arcabouços C1 e C2 pode estar ligada ao comprometimento das CTMs em linhagem osteoprogenitora.

**[0180]** Até o terceiro dia de cultura, ambos os grupos apresentaram praticamente a mesma densidade celular e não produziram uma matriz mineralizada, como será visto na Figura 13. Após o terceiro dia, inicia-se a formação da matriz mineralizada nos arcabouços C1 e C2 e há uma diminuição na taxa de proliferação celular, quando comparada ao controle. A diminuição na taxa de proliferação pode estar associada à perda do caráter de auto-renovação, característica das células-tronco, levando a uma diminuição na cinética da divisão das células aderidas nos compósitos. O mesmo não é observado no arcabouço PHB, pois as células, depois do dia sete, apresentam uma taxa de proliferação elevada. As Figuras 10, 11 e 12 apresentam imagens obtidas por microscopia ótica das células aderidas nos arcabouços e no grupo controle nos períodos estudados.

**[0181]** Constata-se que as células nos arcabouços apresentam morfologia similar à do grupo controle, apresentam características de células aderidas, morfologia estrelada. Também, é vista a interação entre célula-célula, e que elas estão espalhadas sob a superfície dos arcabouços, isso devido aos prolongamentos citoplasmáticos que estão indicados com setas pretas. Observa-se, principalmente no arcabouço C1, que as células estão no interior da matriz. Como foi visto pelas imagens do MEV, as mHAp dispersas na matriz eletrofiadas diminuem o número de fibras, formando um maior espaço entre elas e, conseqüentemente, há um aumento no tamanho de poros entre as fibras. Essa estrutura estratificada permite que as células se infiltrem na matriz do arcabouço. Nota-se, ainda, a ancoragem das células pontualmente ao longo das fibras indicado pelas setas brancas.

**[0182] Mineralização dos arcabouços**

**[0183]** A Figura 13 apresenta os gráficos com os valores de densidade óptica dos arcabouços investigados em função de tempo, comparados à

densidade óptica do osso cortical, utilizado como controle positivo de uma matriz mineralizada.

**[0184]** A produção da matriz mineralizada é um indicador de diferenciação das células óssea, e a alizarina é utilizada para a confirmação da mineralização através indicação da coloração vermelha (BIRMINGHAM, 2012; KYLLÖNEN, 2013; UDDIN, 2013), devido à sua complexação com o cálcio encontrado da HA quando observado em microscopia ótica.

**[0185]** Como os arcabouços compósitos apresentam em sua matriz HAp ficaria difícil analisar o quanto as células contribuíram, ou se realmente contribuíram, para a mineralização. Desta forma, a alizarina foi extraída em meio ácido com DMSO. Para não ter a interferência da contribuição da HAp dos arcabouços e conseqüentemente, um falso positivo da mineralização da matriz.

**[0186]** Observa-se na Figura 13 que todos os arcabouços e o controle (células mesenquimais) apresentam diferença significativa quando comparada ao controle positivo (osso cortical). No entanto, os grupos C1 e C2 apresentam a partir do dia sete um aumento na mineralização, indicando que as células estão produzindo uma matriz mineralizada sobre os arcabouços. Comparando o grupo controle e o arcabouço C0, em todos os períodos as células mantêm um nível basal. A mesma Figura 13 permite comparar os grupos controle e os arcabouços, visualizando-se a formação da matriz mineralizada nos arcabouços C1 e C2.

**[0187]** No dia três, ambos os grupos apresentam um nível basal, sendo que no dia sete, pode-se observar a produção da matriz mineralizada nos arcabouços C1 e C2. Se tratando do arcabouço C1, quando comparado ao grupo controle no dia sete, foi encontrada uma diferença significativa na produção da matriz mineralizada. O mesmo não foi encontrado quando se comparou o arcabouço C1 ao arcabouço C0 e ao arcabouço C2 no mesmo período. No entanto, quando comparado no dia três, todos os grupos demonstraram diferença significativa, sendo observada também uma diferença

significativa no dia 14 entre o grupo controle e o arcabouço C0. No dia quatorze, o arcabouço C1 difere na produção da matriz mineralizada para ambos os grupos controle e C0 em todos os períodos, não sendo encontrada diferença estatística quando se compara os grupos C2 e C1 no dia sete.

**[0188]** O arcabouço C2 no dia quatorze também apresenta uma diferença significativa quando comparado aos grupos controle e C0 nos períodos analisados. No entanto no dia três e sete, não foi encontrada uma diferença significativa quando o arcabouço C2 foi comparado ao grupo controle e ao C0. Nos períodos dos dias sete e quatorze, quando os arcabouços C1 e C2 são comparados, não foi encontrada uma diferença significativa.

**[0189]** Os versados na arte valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção nas modalidades apresentadas e em outras variantes, abrangidas no escopo das reivindicações anexas.

### **Reivindicações**

1. PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANA ELETROFIADA **caracterizado por** compreender as etapas de:

- a) obtenção de membrana de polímero de polihidróxibutirato em solvente orgânico;
- b) adição de hidroxiapatita na solução de polímero de polihidróxibutirato da etapa a); e/ou
- c) adição de nanopartículas de hidroxiapatita na solução de polímero de polihidróxibutirato da etapa a) e/ou da etapa b).

2. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** solvente orgânico ser selecionado dentre: clorofórmio, dimetilformamida, bis (2 – metoxietil) éter e 2,2,2-trifluoro-etanol.

3. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, **caracterizado pela** hidroxiapatita apresentar tamanho de partícula entre 0,05  $\mu\text{m}$  e 5,0  $\mu\text{m}$ .

4. MEMBRANA ELETROFIADA **caracterizada por** ser obtida pelo processo conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5. COMPOSIÇÃO **caracterizada por** compreender a membrana conforme definida na reivindicação 4 e pelo menos um veículo biologicamente aceitável.

6. USO DA MEMBRANA conforme definida na reivindicação 5 **caracterizada por** ser no preparo de uma composição para tratar lesões de tecidos biológicos.

7. Uso, de acordo com a reivindicação 6, **caracterizado pelas** lesões serem de pele e/ou de mucosas de mamíferos.

8. PROCESSO DE REGENERAÇÃO *EX-VIVO* **caracterizado por** compreender a etapa de contatar a membrana eletrofiada conforme definida na reivindicação 5 e/ou a composição conforme definida na reivindicação 6 com pelo menos um tecido biológico.

9. PROCESSO, de acordo com a reivindicação 8, **caracterizado pelo** tecido biológico ser pele e/ou mucosas de mamíferos.

FIGURAS

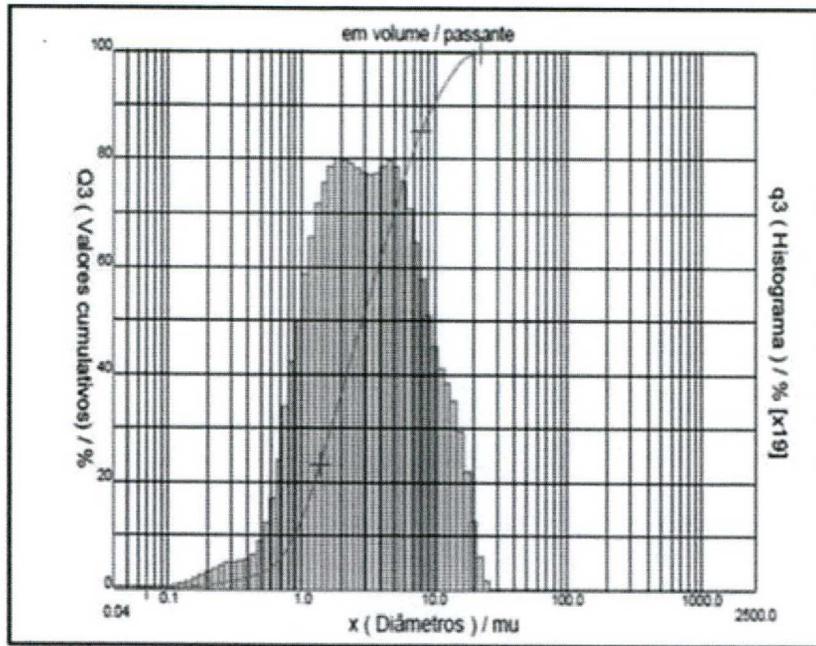


Figura 1a

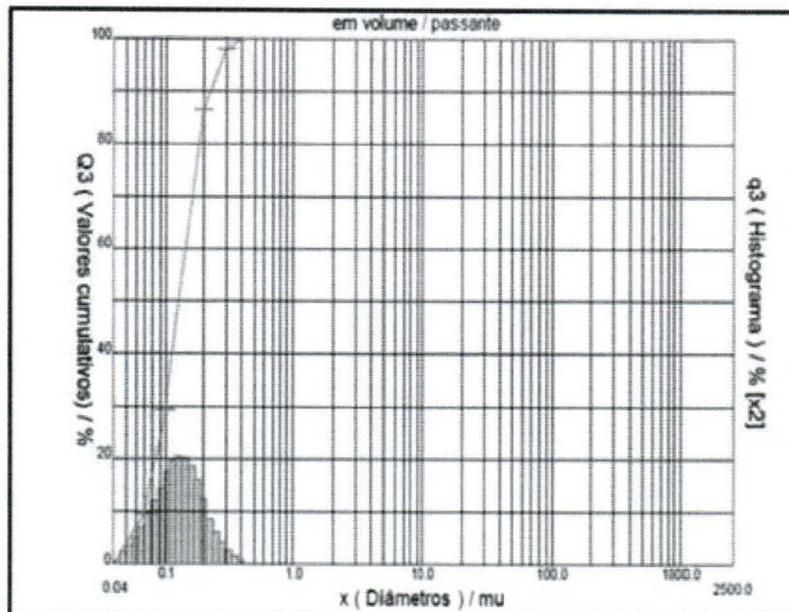


Figura 1b

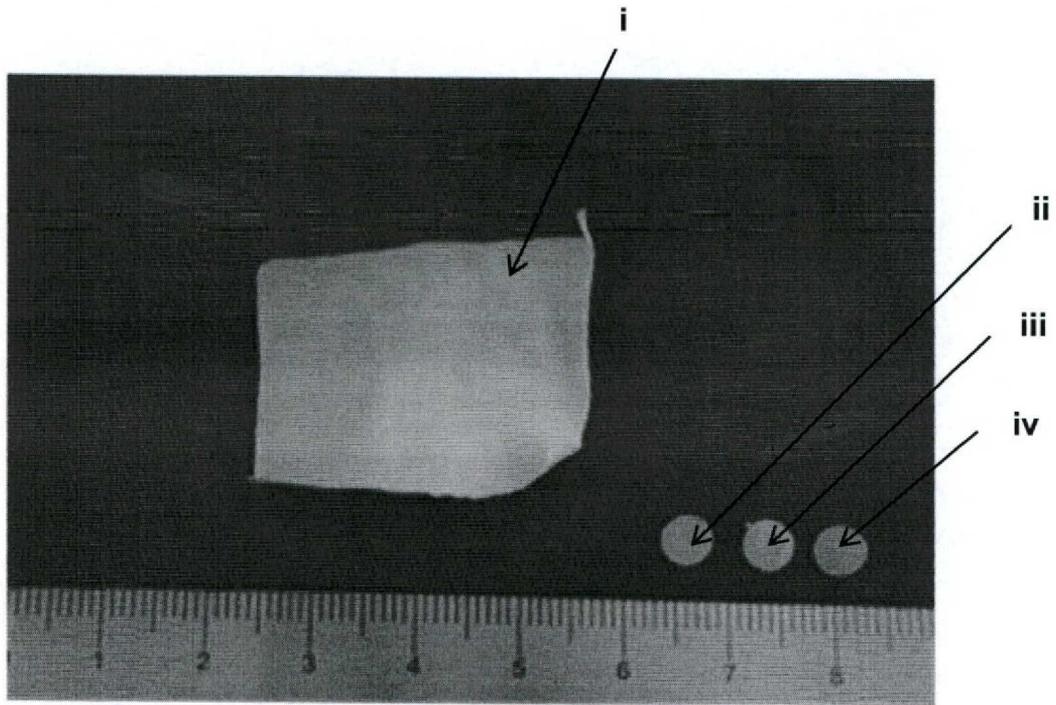


Figura 2

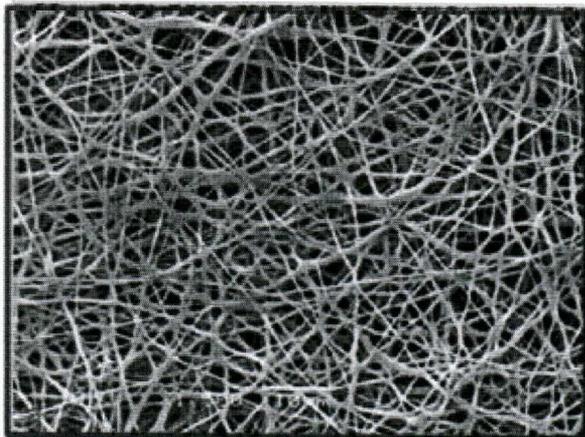


Figura 3a

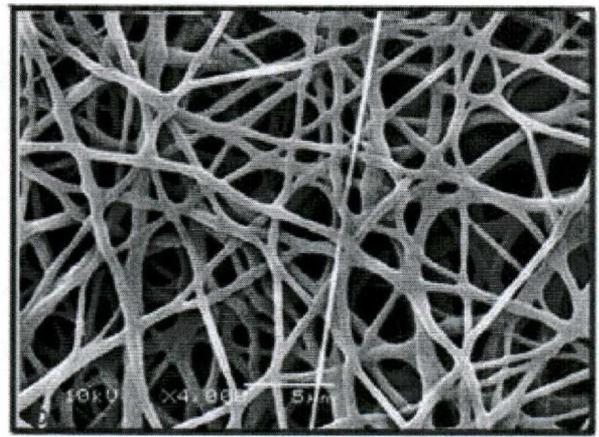


Figura 3b

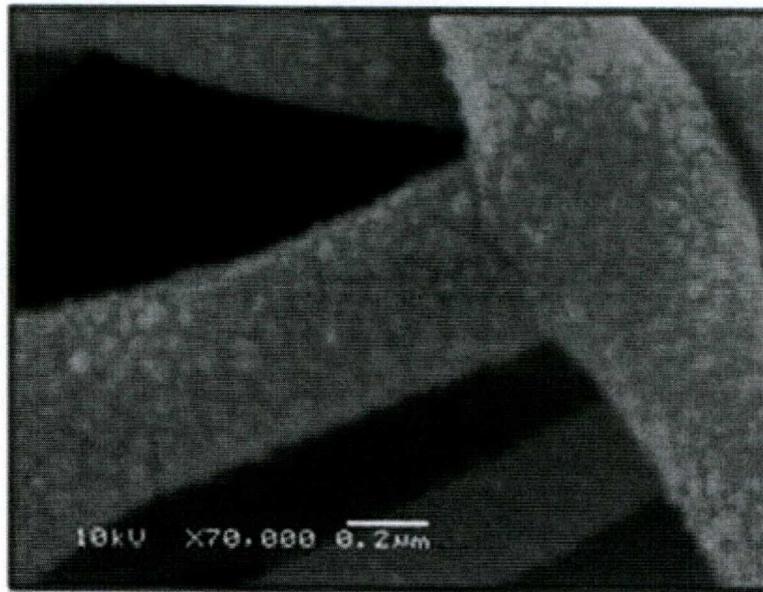


Figura 3c

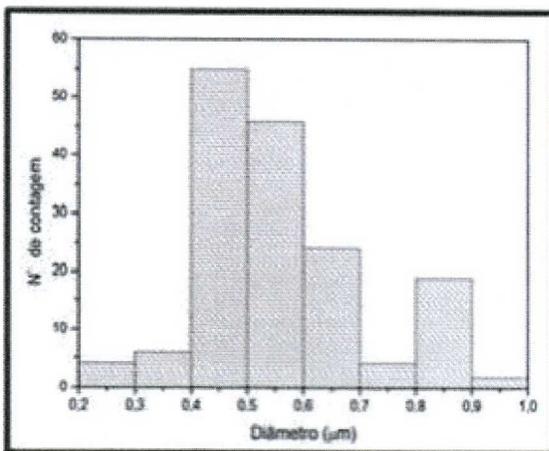


Figura 3d

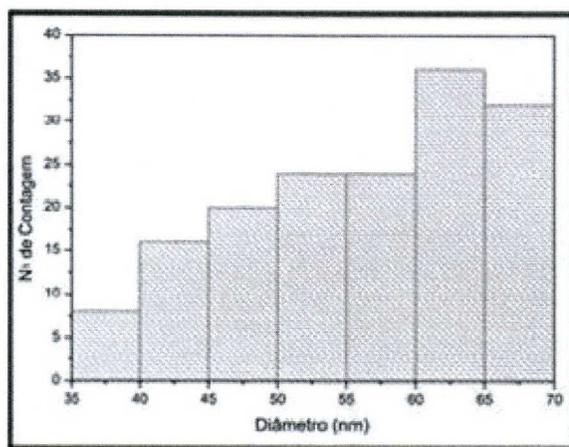


Figura 3e

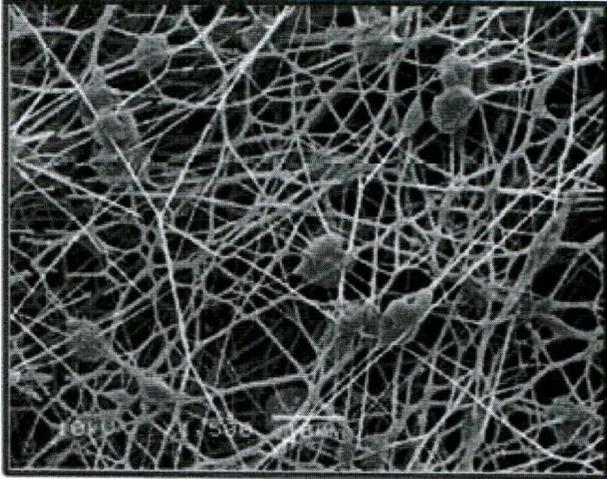


Figura 4a

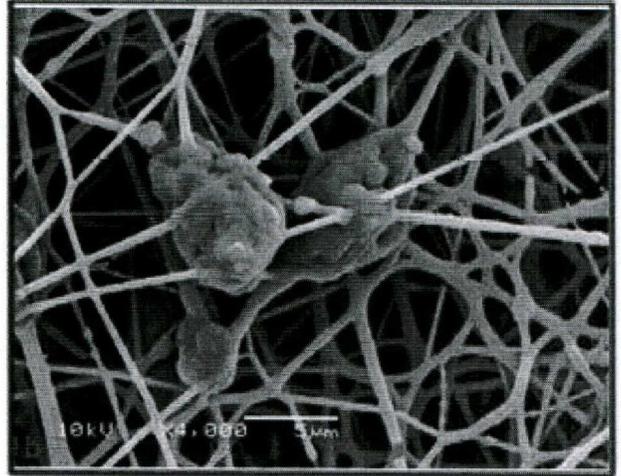


Figura 4b

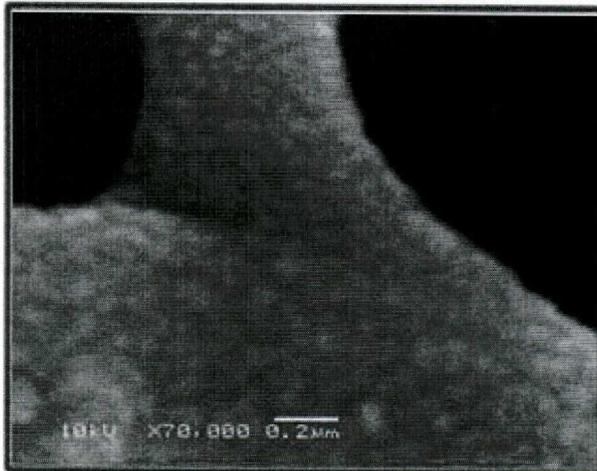


Figura 4c

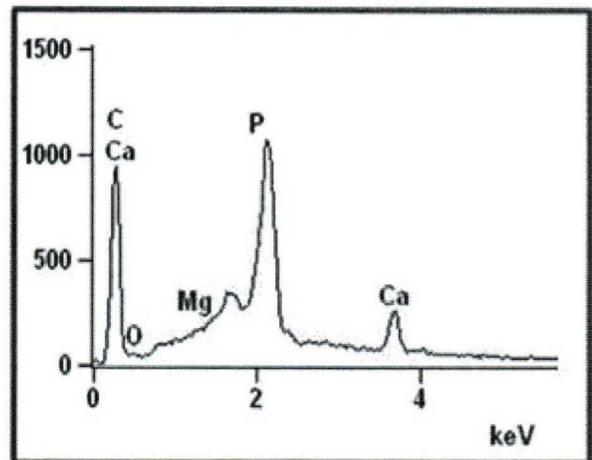


Figura 4d

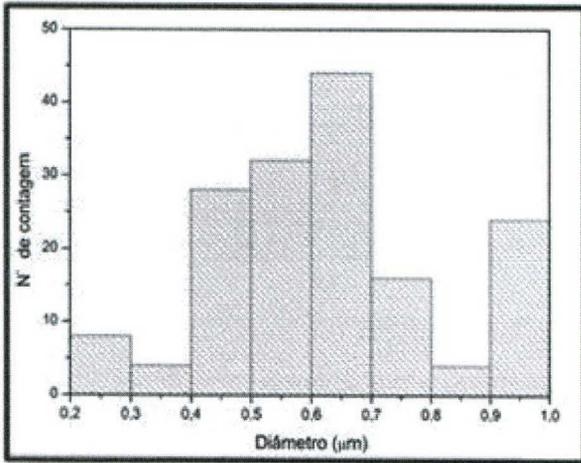


Figura 4e

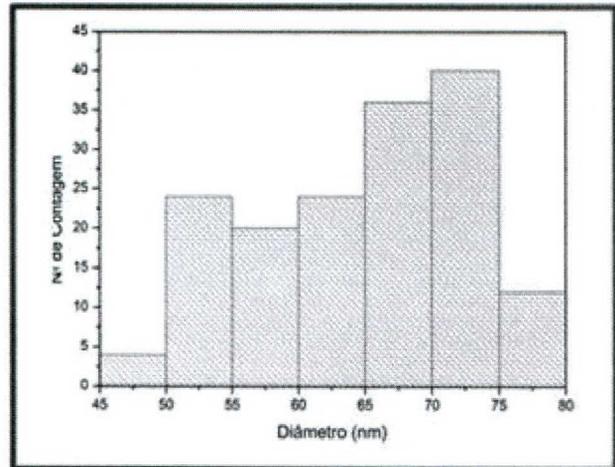


Figura 4f

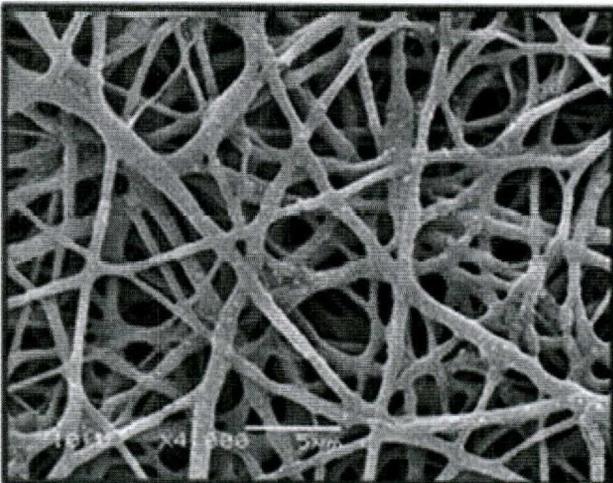


Figura 5a

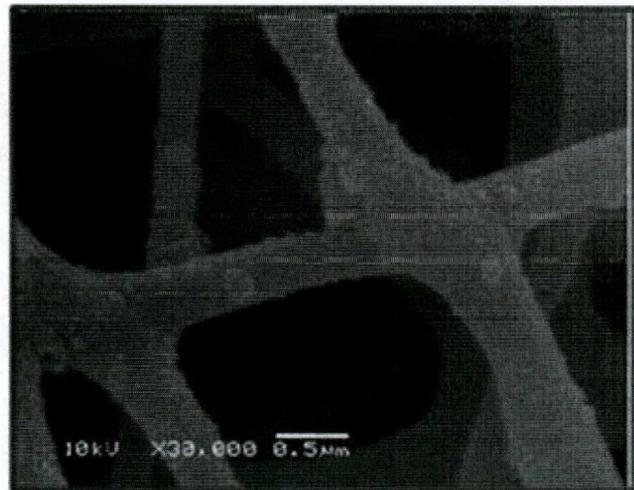


Figura 5b

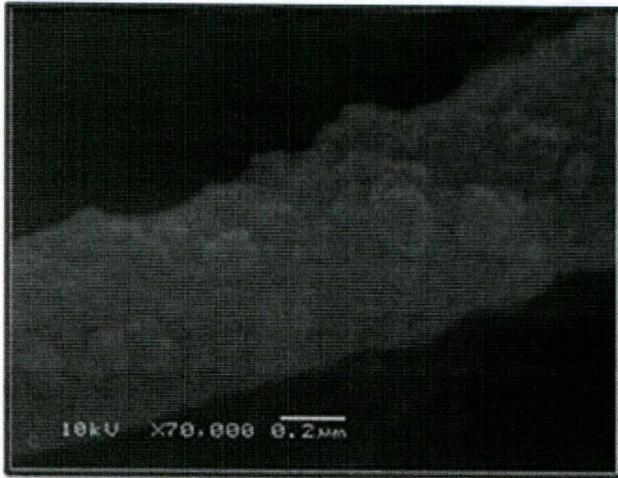


Figura 5c

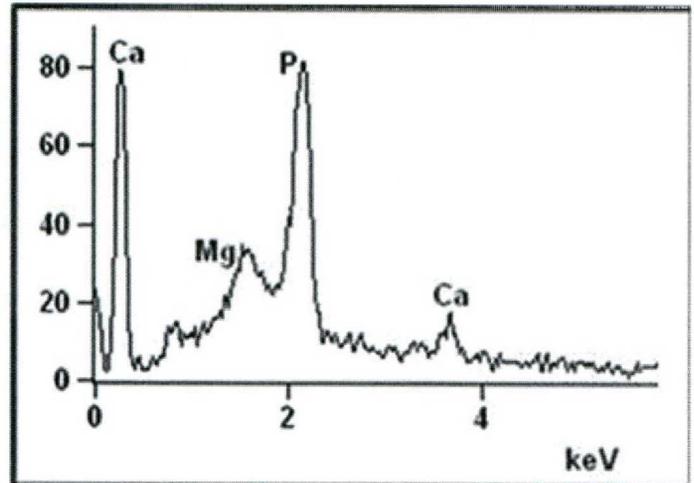


Figura 5d

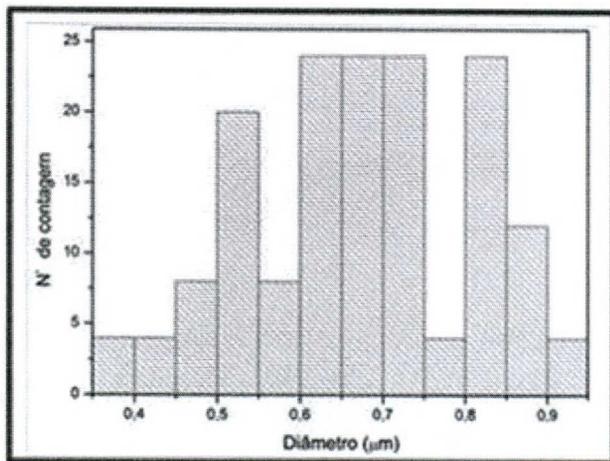


Figura 5e

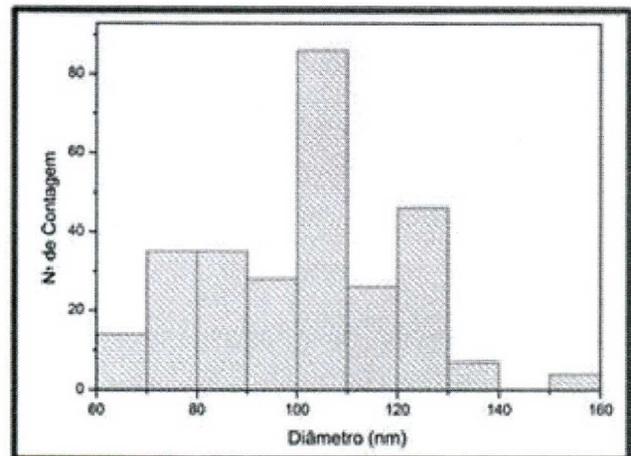


Figura 5f

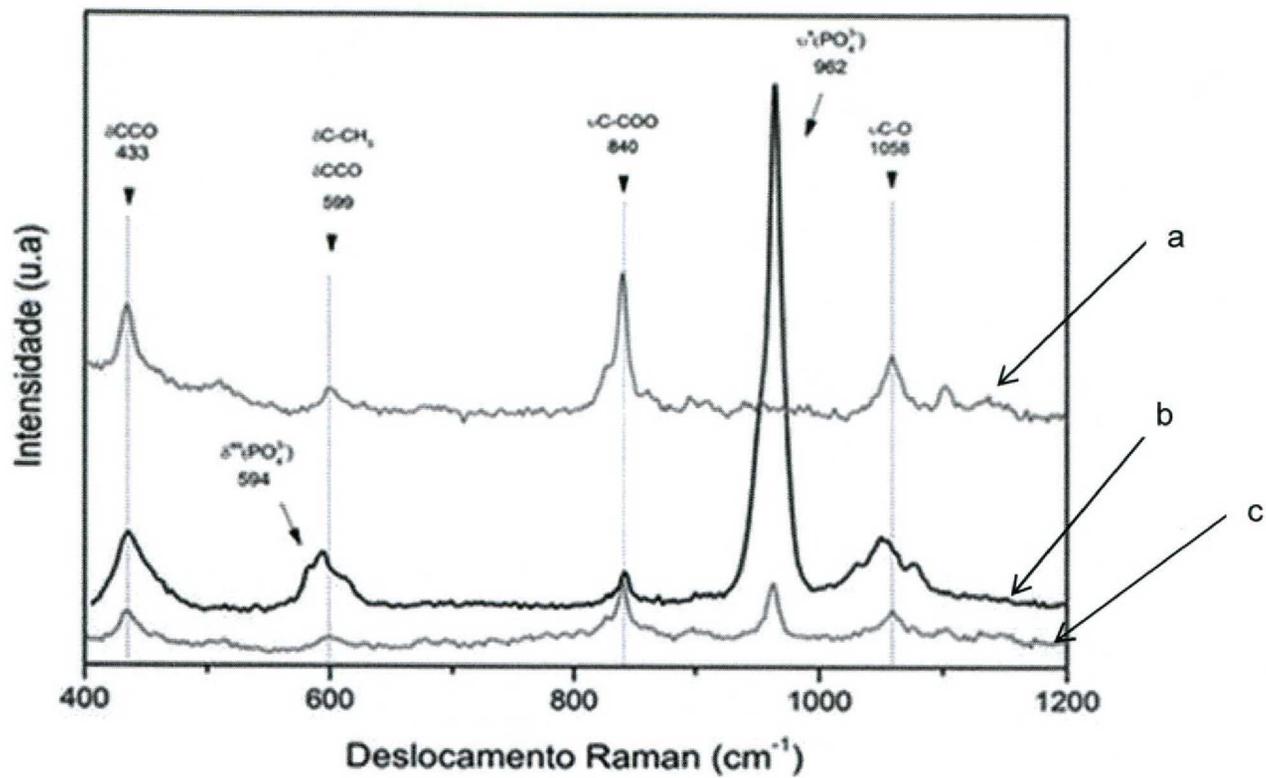


Figura 6

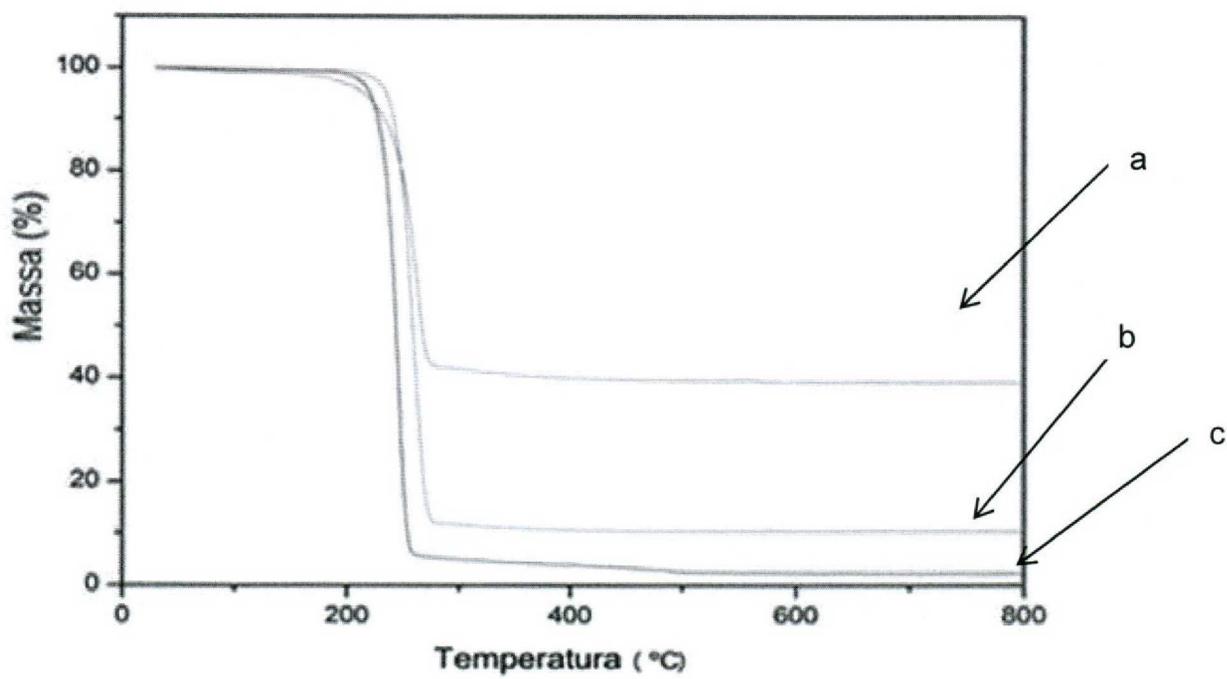


Figura 7

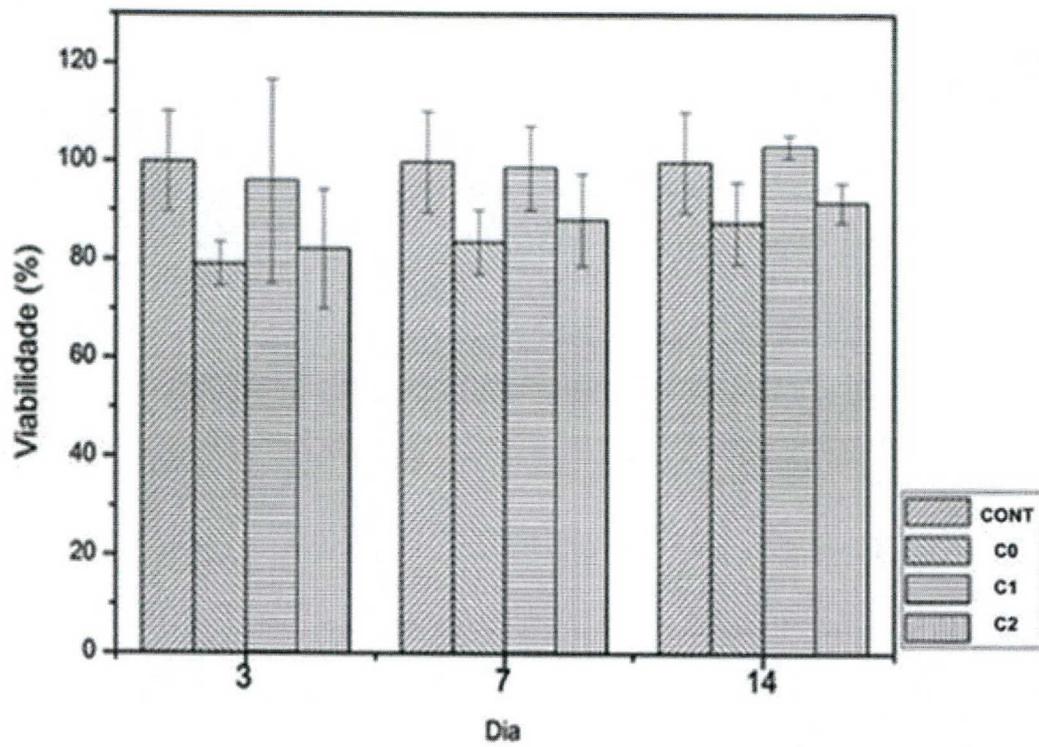


Figura 8

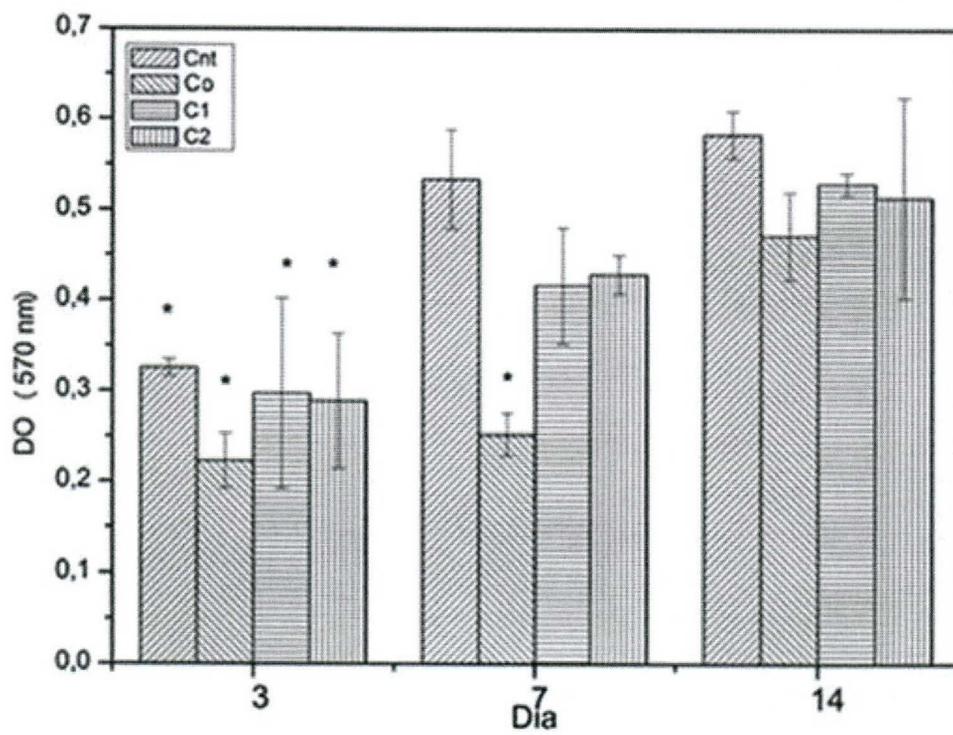
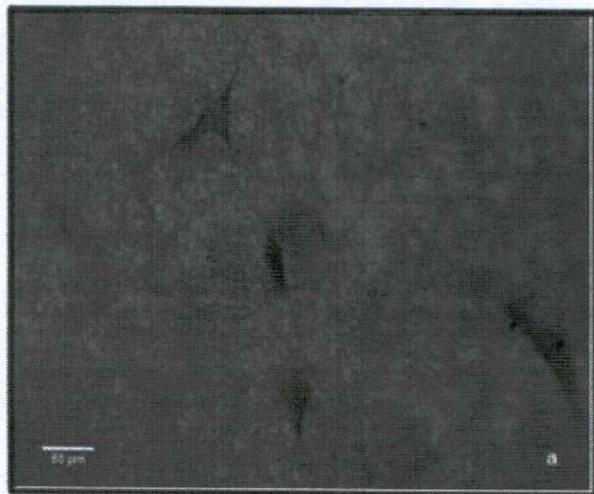
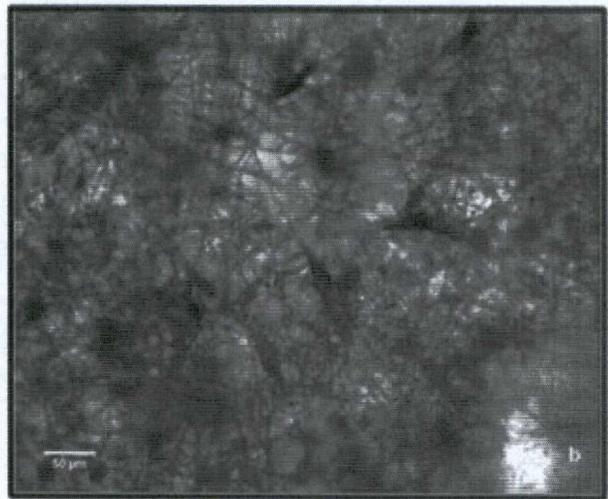


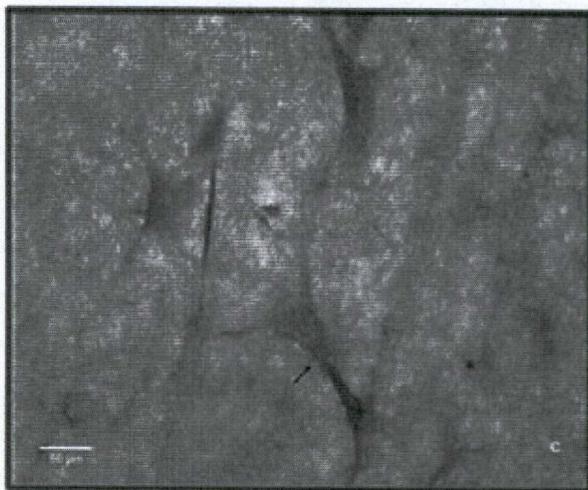
Figura 9



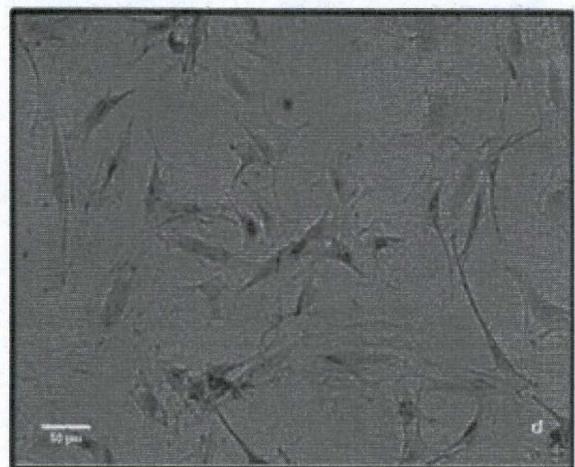
a



b

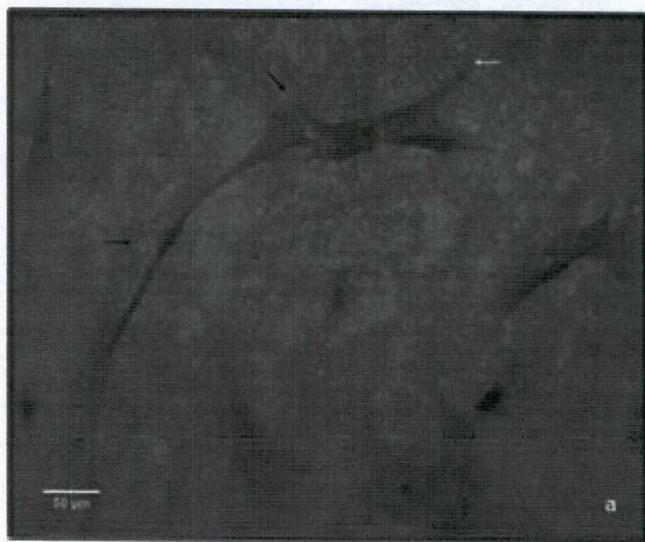


c

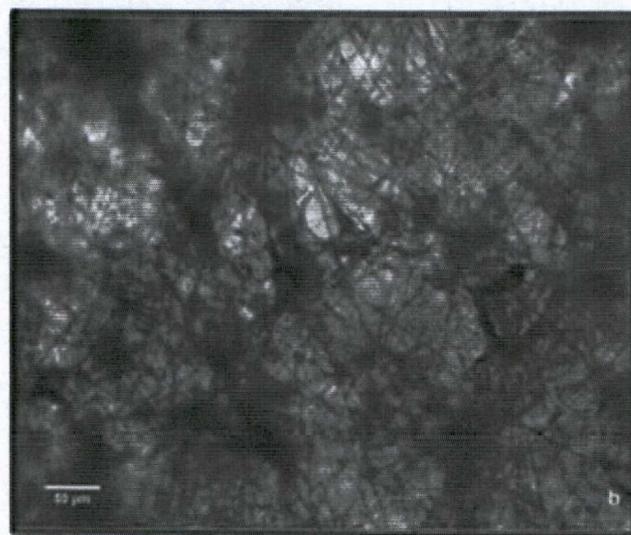


d

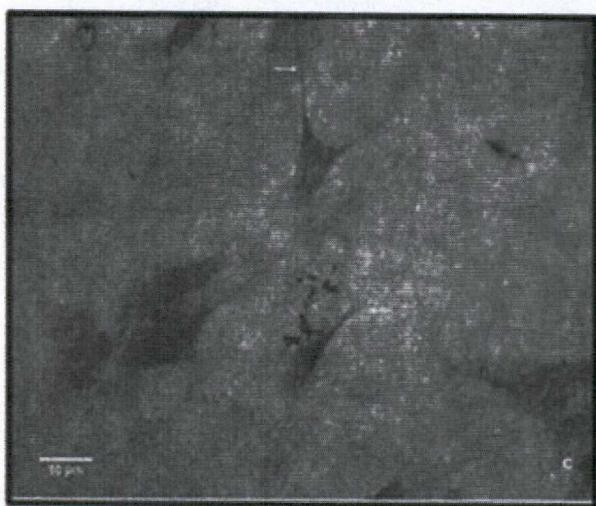
Figura 10



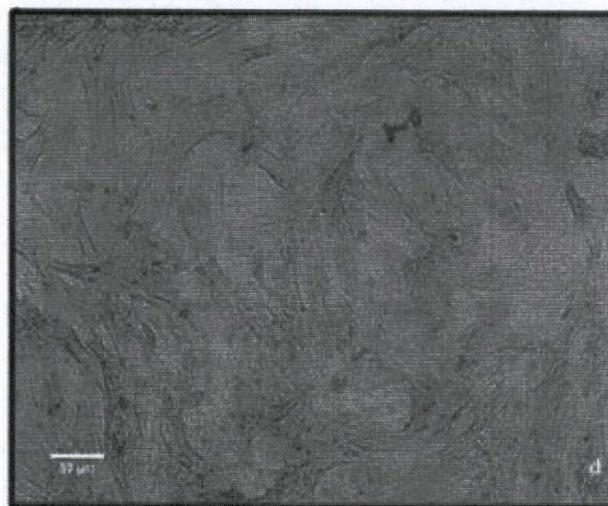
a



b

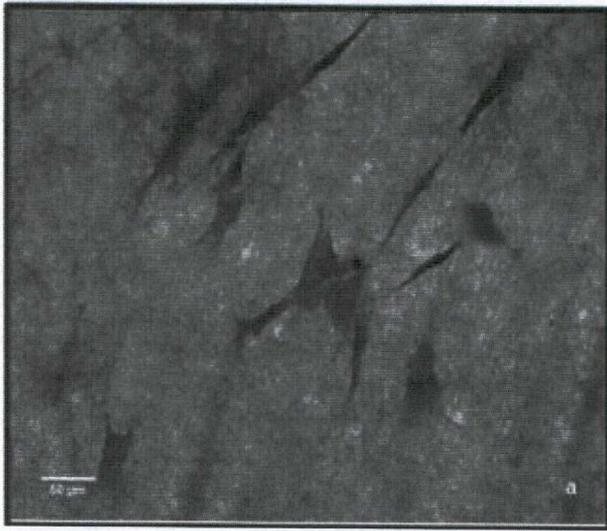


c

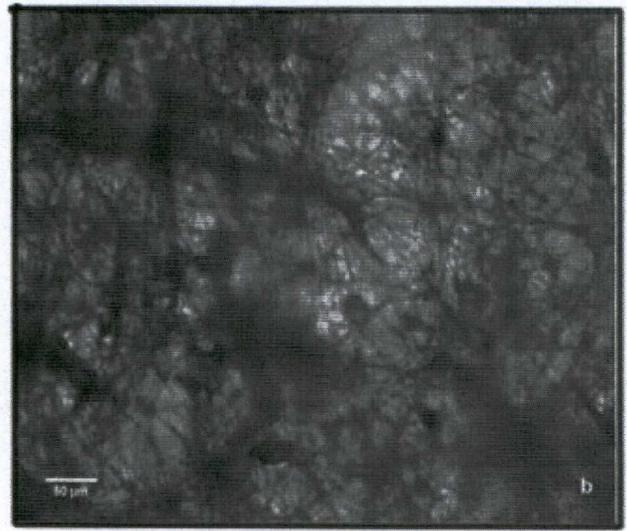


d

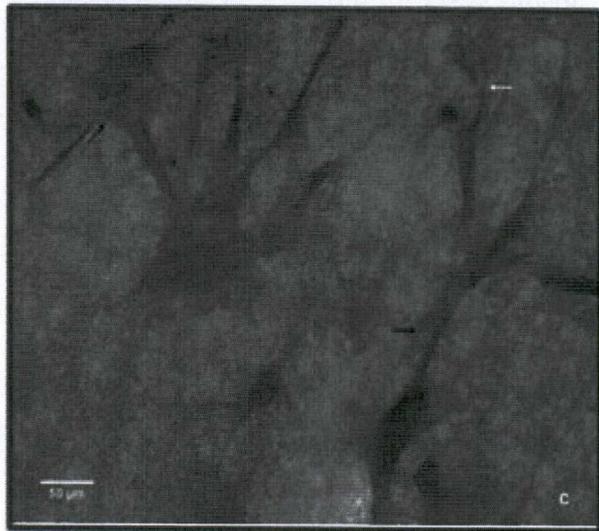
Figura 11



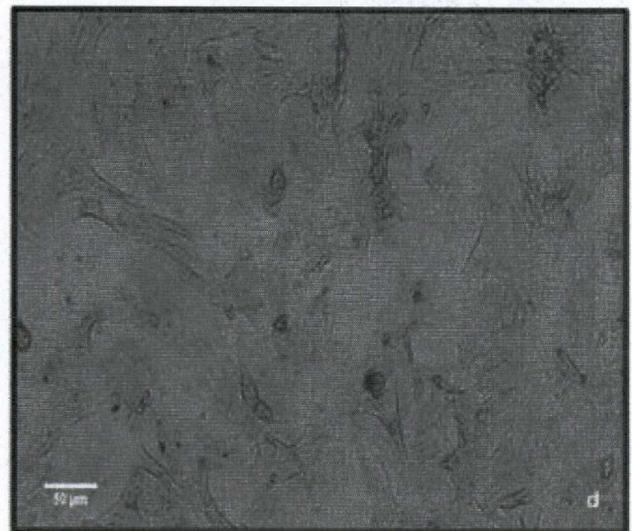
a



b



c



d

Figura 12

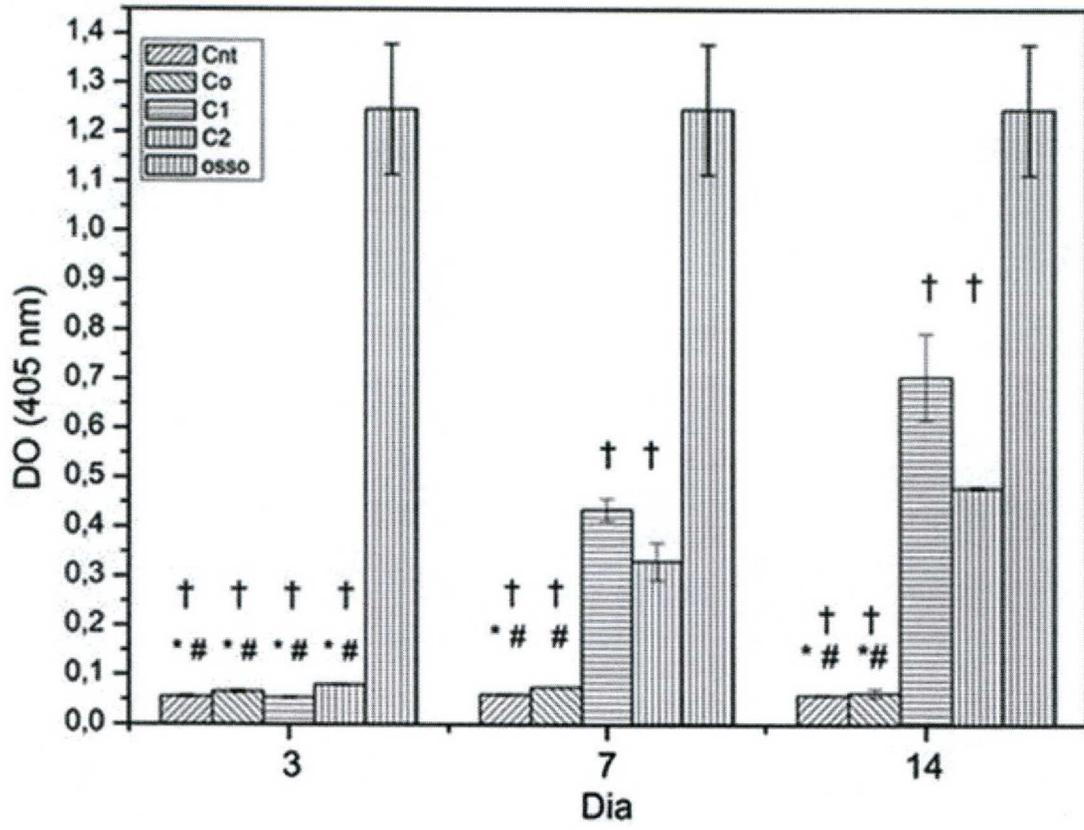


Figura 13

### **Resumo**

#### PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANA ELETROFIADA, MEMBRANA OBTIDA PELO REFERIDO PROCESSO, COMPOSIÇÃO E PROCESSO DE REGENERAÇÃO *EX-VIVO*

A presente invenção descreve um processo de obtenção de membrana eletrofiada que compreende a etapa de obtenção de membrana de polímero de polihidróxibutirato (ou, abreviadamente, PHB) em solvente orgânico. A presente invenção também descreve a membrana eletrofiada obtida pelo referido processo e uma composição que compreende a referida membrana eletrofiada e pelo menos um veículo biologicamente aceitável. Também são descritos o uso da referida membrana para preparar uma composição para tratar lesões de tecidos biológicos e também um processo de regeneração *ex-vivo* que compreende a etapa de contatar a membrana eletrofiada e/ou a composição com pelo menos um tecido biológico. A presente invenção situa-se nos campos da Química, da Farmácia e da Engenharia de Biomateriais.

FIGURAS

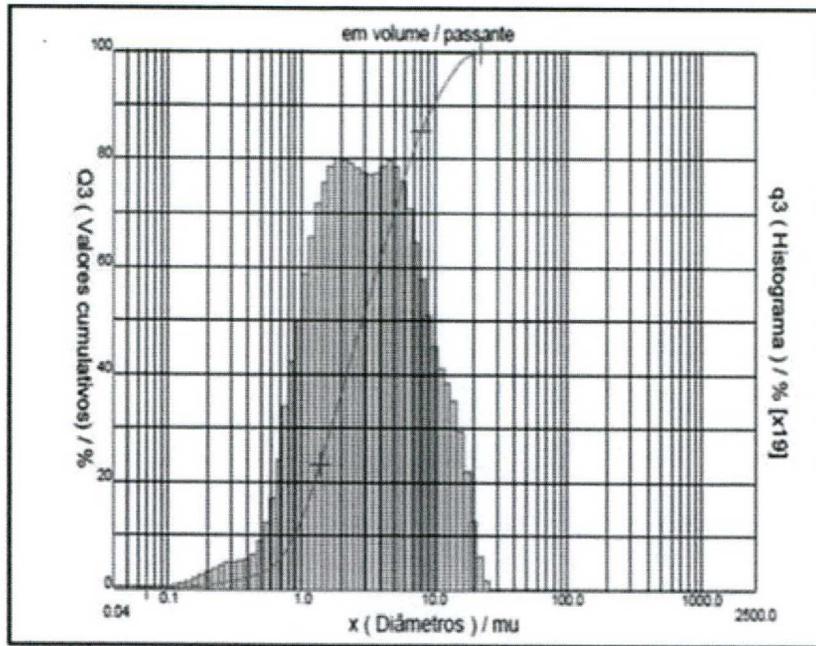


Figura 1a

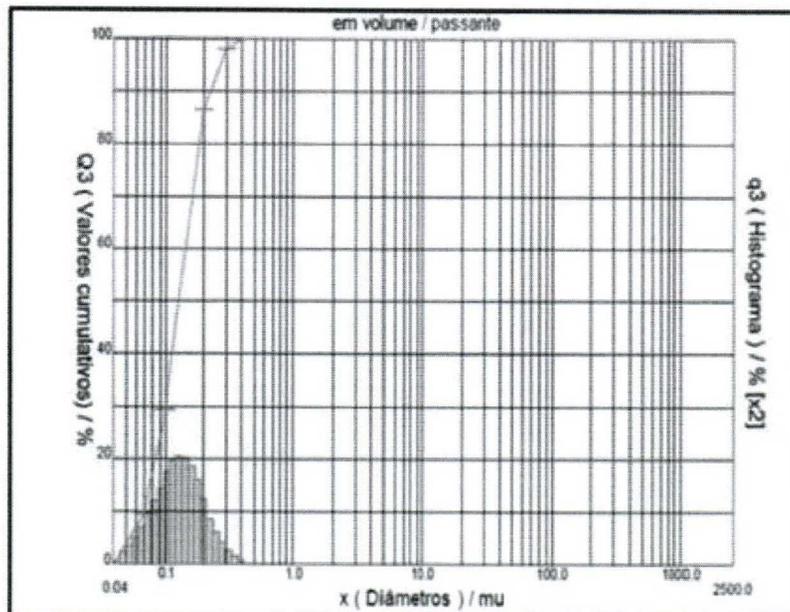


Figura 1b