



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

**(21) BR 10 2012 005341-1 A2**

(22) Data de Depósito: 09/03/2012  
(43) Data da Publicação: 26/11/2013  
(RPI 2238)



**(51) Int.Cl.:**  
A61L 27/28  
A61L 27/32  
A61L 27/56

**(54) Título:** PROCESSO DE CRIOPOLIMERIZAÇÃO DE COMONÔMEROS ANFOLÍTICOS PARA OBTENÇÃO DE ARCABOUÇOS E ARCABOUÇOS OBTIDOS

**(73) Titular(es):** Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**(72) Inventor(es):** Julio San Roman del Bairro, Luis Maria Rodriguez Lorenzo, Luis Alberto dos Santos, Tiago Moreno Volkmer, Vânia Caldas de Souza

**(57) Resumo:** PROCESSO DE CRIOPOLIMERIZAÇÃO DE COMONÔMEROS ANFOLÍTICOS PARA OBTENÇÃO DE ARCABOUÇOS E ARCABOUÇOS OBTIDOS. A presente invenção descreve um novo método para a obtenção de um biomaterial na forma de arcabouços implantáveis para utilização em engenharia de tecidos na área da saúde. Mais especificamente o método compreende criopolimerização de polímeros anfotéricos reforçados com fosfato de cálcio para a utilização em engenharia de tecidos.

## **Relatório Descritivo de Patente de Invenção**

### **PROCESSO DE CRIOPOLIMERIZAÇÃO DE COMONÔMEROS ANFOLÍTICOS PARA OBTENÇÃO DE ARCABOUÇOS E ARCABOUÇOS OBTIDOS**

#### **5 Campo da Invenção**

A presente invenção descreve um novo método para a obtenção de um biomaterial na forma de arcabouços implantáveis para utilização em engenharia de tecidos, na área da saúde. Mais especificamente o processo compreende criopolimerização de polímeros anfolíticos reforçados com fosfato de cálcio para a utilização em engenharia de tecidos. A presente invenção se situa no campo da Engenharia de tecidos e da Medicina.

#### **Antecedentes da Invenção**

A aplicação de biomateriais remonta à pré-história, no entanto, a palavra "biomaterial" como a utilizamos atualmente, há poucos anos foi introduzida na nomenclatura médica.

A definição de biomateriais mais aceita atualmente é a da Conferência de Consenso em biomateriais para aplicações clínicas, de 1982, a qual conceitua biomaterial como "Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais"

Inúmeros fatores devem ser considerados antes que um material possa ser utilizado como implante. Como característica imprescindível, estes materiais devem ser biocompatíveis, ou seja, devem atender aos requisitos para os quais foram projetados, não estimulando ou provocando o mínimo de reações alérgicas ou inflamatórias

Assim, a biocompatibilidade pode ser entendida como habilidade do material e de seus possíveis produtos de degradação de serem tolerados pelos

tecidos envoltórios e não causarem prejuízo ao organismo a curto e longo prazo. Para um material ser aceito como um material de implante é necessário que ele atenda alguns requisitos fundamentais:

- 5           • O material deve ser biocompatível, ou seja, sua presença não deve causar efeitos nocivos no local do implante ou no sistema biológico;
- Os tecidos não devem causar a degradação do material, como por exemplo, corrosão em metais, ou pelo menos de forma tolerável;
- 10       • O material deve ser biofuncional, ou seja, deve ter as características mecânicas adequadas para cumprir a função desejada, pelo tempo desejado;
- O material deve ser esterilizável.

15       Embora biomateriais sejam primeiramente usados para aplicações médicas, também são usados em diversas aplicações, tais como dispositivos para crescimento de células em uma cultura, para análise de proteínas sanguíneas em laboratório clínico, em equipamentos para processamento de biomoléculas, entre outras.

20       Devido ao aumento na expectativa de vida, aumenta o número de pacientes nos hospitais em função principalmente da ocorrência de osteoporose e acidentes com lesões graves por meio de veículos de transporte. Esta demanda por próteses, implantes e equipamentos médicos, gera a necessidade de avanços no campo dos biomateriais e pesquisas em biotecnologia.

25       O critério de seleção de biomaterias é baseado principalmente na aplicação a que se destinam. Por exemplo, para dispositivos que fiquem em contato com o sangue, esses materiais são:

- 30           • Componentes de dispositivos extracorpóreos que removem e retornam sangue do corpo;
- Dispositivos que são inseridos em um vaso sanguíneo;
- Dispositivos que ficam permanentemente implantados.

Para dispositivos de aplicações em tecidos moles, os materiais se propõem a aumentar ou redefinir o tecido (ex.: implantes de seios e implantes faciais). Em aplicações ortopédicas e odontológicas, os materiais são componentes de implantes estruturais (ex.: prótese de juntas e implantes de raiz de dente) ou são usados para reparar defeitos ósseos (ex.: parafusos e pinos inseridos em osso).

Biomateriais poliméricos, biopolímeros, podem ser empregados na engenharia de tecidos visando promover a adesão celular, manutenção da função de diferenciação celular sem impedir a proliferação, como moldes para organizar e direcionar o crescimento de células e auxiliar na função da matriz extracelular.

Arcabouços porosos com utilização como implantes na área biomédica e em Engenharia de Tecidos são normalmente sintetizados por técnicas como eletrofiação (electrospinning), lixiviação (particulate leaching) e separação sólido líquido (TIPS).

A presente invenção descreve um novo método para a obtenção de um biomaterial na forma de arcabouços implantáveis para utilização em engenharia de tecidos na área da saúde. Mais especificamente, o método da presente invenção compreende criopolimerização de polímeros anfófilos reforçados com fosfato de cálcio para a utilização em engenharia de tecidos.

A busca na literatura científica e patentária apontou alguns documentos relevantes para a presente invenção, os quais serão descritos a seguir.

O documento KR 100743562 (B1) descreve um álcool polivinílico/hidroxipatita criogel e um método de produção do mesmo com poros gelatinosos, com excelente absorção e configuração estável que muda somente com variação da temperatura sem aditivos químicos, exceto água. Hidroxipatita se dispersa em água usando ondas supersônicas (S10), álcool polivinílico se dissolve na hidroxipatita dispersa na água para obtenção de álcool polivinílico/hidroxipatita (S11). Esta solução é resfriada (S12) e fundida (S13). A presente invenção difere deste documento pelo fato de o polímero da presente invenção pelo método utilizado para a fabricação dos criogéis do

referido documento obter criogéis a base de PVA entre-cruzados fisicamente, enquanto que na presente invenção utilizou-se um entre-cruzante químico.

5 O documento WO 2010029344 (A2) descreve um processo para prepare de criogel HA, o processo compreende os passos de combinar HA, um agente entre-cruzante e um solvente para formar uma solução, congelar essa solução antes da formação de 10% ou menos de ligações do entre-cruzante. A presente invenção difere deste documento, pois não há o reforço do fosfato de cálcio.

10 O documento US 2007/009580 (A1) descreve um método de síntese de hidrogel não adesivo compreendendo irradiação da solução com o polímero biológico, este é biodegradável e biocompatível, usando radiação ionizante. Os radicais livres do polímero biológico são formados e o entre-cruzamento ocorre entre eles e o hidrogel fornecido. A presente invenção difere deste documento, pois o método de síntese e a composição polimérica são diferentes da presente  
15 invenção e não há o reforço do fosfato de cálcio.

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.

20

### **Sumário da Invenção**

Em um aspecto, a presente invenção proporciona um novo método para a obtenção de um biomaterial na forma de arcabouços implantáveis para  
25 utilização em engenharia de tecidos na área da saúde. Mais especificamente, o método compreende criopolimerização de polímeros anfolíticos reforçados com fosfato de cálcio para a utilização em engenharia de tecidos.

É, portanto, um objeto da presente invenção o processo de obtenção de biomaterial na forma de arcabouços implantáveis compreendendo banho  
30 criostático.

Em uma realização preferencial o processo compreende pelo menos

uma das seguintes etapas:

- a) formação de uma solução aquosa compreendendo a junção de monômero anfolítico com um agente entrecruzante;
- b) adição de uma fase cerâmica a esta solução;
- 5 c) agitação magnética da solução;
- d) banho de gelo da solução;
- e) vazamento da solução em moldes e adicionar a ela o sistema catalítico;
- f) submissão da solução a um banho criostático por 20h;
- 10 g) liofilização da solução;
- h) formação de criogéis;
- i) mergulho dos criogéis sob agitação por 24h;
- j) secagem a vácuo.

15 É ainda um objeto da presente invenção arcabouços porosos compreendendo comonômeros criopolimerizados.

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.

## 20 **Descrição Detalhada da Invenção**

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.

25 Em um aspecto, a presente invenção proporciona um novo método para a obtenção de um biomaterial na forma de arcabouços implantáveis para utilização em engenharia de tecidos na área da saúde. Mais especificamente o método compreende criopolimerização de polímeros anfolíticos reforçados com fosfato de cálcio para a utilização em engenharia de tecidos.

### Processo de obtenção de biomaterial na forma de arcabouços implantáveis

- 30 a) Formação de uma solução aquosa compreendendo a junção de monômero anfolítico com um agente entre-cruzante;

- b) adição de uma fase cerâmica a esta solução;
- c) agitação magnética da solução;
- d) banho de gelo da solução;
- e) vazamento da solução em moldes e adicionar a ela o sistema catalítico;
- f) submissão da solução a um banho criostático por 20h;
- g) liofilização da solução;
- h) formação de criogéis;
- i) mergulho dos criogéis sob agitação por 24h;
- j) secagem a vácuo.

#### Arcabouços porosos

Arcabouços porosos são suportes físicos e guias para a criação de tecidos in vitro, visando um posterior transplante. São compostos de polímeros biodegradáveis, como, por exemplo, poli (3-hidroxibutirato) (PHB), e o seu copolímero poli (3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV). Estes polímeros são poliésteres bacterianos e biocompatíveis com vários tipos celulares.

#### **Exemplo 1. Realização Preferencial**

Inicialmente avaliou-se a influência da adição de um comonomero ácido acrílico (Ácido Acrílico (AA) ou Ácido Metacrílico (MA)) sobre as propriedades de criogéis sintetizados a partir do monômero anfolítico, dimetil aminoetil metacrilato (DMAEMA). O teor total de monômero foi mantido em 15%, na proporção de 1 parte de comonômero para 20 partes de monômero. Para avaliar a influencia do comonomero foram feitas reações com e sem nenhum destes. Também foram testados dois agentes entrecruzantes: N,N'-Metileno Bisacrilamida (MBAM) e Trietileno Glicol Dimetacrilato (TEGMA) na razão de 1:300 em relação ao teor total de monômero, também foram feitas reações sem a adição de entrecruzante. No sistema catalítico, utilizou-se o acelerador, TEMED, e o iniciador, SPS, nas razões de 1:30 e 1:300 em relação ao teor total de monômero, respectivamente. A Tabela 1 mostra os teores de cada

reagente utilizado nas reações de síntese dos criogéis do sistema AA ou MA/DMAEMA.

**Tabela 1.** Proporção entre os reagentes utilizados na síntese dos criogéis do sistema monômero/comonômero e agente entrecruzante.

Reagente/ Amostra	MT	MM	DT	DM	AT	AM
<b>DMAEMA</b>	14,25	14,25	15	15	14,25	14,25
<b>MA</b>	0,75	0,75	-	-	-	-
<b>AA</b>	-	-	-	-	0,75	0,75
<b>TEGMA</b>	0,05	-	0,05	-	0,05	-
<b>MBAM</b>	-	0,05	-	0,05	-	0,05
<b>SPS</b>	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
<b>TEMED</b>	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
<b>Água</b>	84,85	84,85	84,85	84,85	84,85	84,85

O nome de cada amostra foi designado de acordo com o comonômero e agente entrecruzante utilizado, sendo que a amostra MT é composta pelo comonômero MA e pelo agente entrecruzante TEGMA, já a amostra MM é composta pelo comonômero MA e pelo agente entrecruzante MBAM. As amostras DT e DM não apresentam comonômero em sua composição (designado por D devido ao nome do monômero utilizado, o DMAEMA) e foram utilizados TEGMA e MBAM como agente entrecruzante, respectivamente. Enquanto que as amostras AT e AM têm como comonômero o Ácido Acrílico (AA) e como agente entrecruzante TEGMA e MBAM, respectivamente.

O método utilizado para a extração do gelo é um fator importante na síntese dos criogéis e pode alterara as propriedades físicas destes, de maneira que se utilizou 2 métodos para estudar este processo:

(1) Liofilização: Ao serem retiradas do banho termostático a  $-20^{\circ}\text{C}$ , os criogéis foram colocados diretamente no liofilizador por 20 horas para que ocorresse a sublimação dos cristais de gelo.



(2) Descongelamento: A solução ainda congelada era retirada do banho termostático a  $-20^{\circ}\text{C}$  e colocada na geladeira a  $-4^{\circ}\text{C}$  por 24 horas, até o derretimento total do gelo.

Após as sínteses descritas na Tabela 1, os criogéis foram caracterizados apresentando os resultados descritos a seguir.

Nem o comonômero, nem o agente entre-cruzante alteraram significativamente a estrutura química dos criogéis sintetizados, informação extraída a partir das análises de FTIR e  $\text{C}^{13}$ -RMN. O método de extração do gelo afetou fortemente a densidade e porosidade dos criogéis sintetizados, sendo que as amostras cujo gelo foi extraído por liofilização obtiveram menor densidade e maior porosidade atingindo valores de até 43% para a composição contendo AA como comonomero e MBAM como agente entrecruzante. Já as amostras cujo gelo foi extraído por derretimento apresentaram valores de porosidade na faixa entre 9,4 e 21%. As amostras cujo gelo foi extraído por liofilização apresentaram maior tamanho médio de poros, além de apresentar uma distribuição de tamanho de poros mais larga. A porosidade não apresentou efeito significativo nos valores do quociente de equilíbrio de inchamento (ESR). E a adição do comonômero na composição dos criogéis aumentou significativamente o valor do quociente de equilíbrio no inchamento (ESR) dos polímeros da faixa entre 4 e 6, para a faixa entre 8 e 11.

Entretanto a síntese de criogéis a partir do sistema supracitado não apresentou grande estabilidade química, de maneira que ocorreu uma grande variação nas propriedades dos criogéis sintetizados em função de fatores externos, como temperatura ambiente e umidade. Devido à falta de reprodutibilidade do sistema acima, optou-se pela síntese de criogéis baseados no monômero anfófilo DMAEMA em conjunto com o monômero polimérico hidroxietil metacrilato (HEMA) devido ao fato de este possuir enorme biocompatibilidade e estabilidade química.

Neste estudo o teor total de monômero foi ajustado a 10%. Seis composições foram sintetizadas variando as proporções de HEMA e DMAEMA em 75:25, 50:50 e 25:75 com e sem a adição de 5% em massa de  $\alpha$ -fosfato

tricalcico sintetizado por combustão. A viscosidade do meio foi aumentada pela adição de uma solução de 1% de gelatina. O entrecruzante usado neste trabalho foi o Trietileno Glicol Dimetacrilato (TEGDMA, 90%) e a sua razão para o monômero foi de 1:300 de acordo com estudo o anterior. O sistema catalítico foi composto pelo acelerador, TEMED e pelo iniciador SPS, com as razões de 1:30 e 1:300 em relação ao total de monômero, respectivamente. As composições estudadas são mostradas na Tabela 2.

**Tabela 2.** Proporção entre os reagentes utilizados na síntese dos criogéis do sistema HEMA/DMAEMA.

Reagente	25%	25% HEMA	50%	50% HEMA	75%	75% HEMA
	HEMA	+ 5%TCP	HEMA	+ 5%TCP	HEMA	+ 5%TCP
<b>DMAEMA</b>	7,5	7,5	5	5	2,5	2,5
<b>HEMA</b>	2,5	2,5	5	5	7,5	7,5
<b>TEGMA</b>	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
<b>TEMED</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>SPS</b>	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
<b>Agua</b>	89,6	89,6	89,6	89,6	89,6	89,6
<b>Gelatina</b>	-	1	-	1	-	1
<b><math>\alpha</math>-TCP</b>	-	5	-	5	-	5

Com relação a este sistema pudemos observar que foram sintetizados criogéis altamente porosos com potencial de aplicação em engenharia de tecidos. A incorporação do  $\alpha$ -TCP ao sistema polimérico se deu com sucesso com a ajuda da adição de gelatina para aumentar a viscosidade da solução monomérica diluída. A técnica de EDS permitiu comprovar a incorporação do  $\alpha$ -TCP à matriz polimérica. Poros de até 1 mm e porosidade de 75% foram observados nas amostras com razão monomérica de 25%HEMA + TCP. A adição de gelatina e  $\alpha$ -TCP foram fatores importantes para o aumento da porosidade dos arcabouços, visto que a gelatina incorporada serviu como agente porogênico. As amostras com maior teor de DMAEMA incharam mais

do que as com maior teor de HEMA, sendo que as amostras 25%HEMA atingiram um quociente de equilíbrio de inchamento (ESR) de aproximadamente 6. O ESR foi afetado apenas pela composição dos monômeros, não sendo afetado pela adição da gelatina ou do fosfato de cálcio.

5 Além disso, as composições contendo maiores teores de DMAEMA (25%HEMA) apresentaram maiores valores de peso molecular entre ligações entrecruzadas e maior tamanho de rede; por outro lado apresentaram menores valores de densidade de ligações entrecruzadas e de módulo de elasticidades. Já maiores teores de DMAEMA e a adição da fase cerâmica resultaram em  
10 criogéis com comportamentos de degradação mais rápidos em PBS, sendo que as amostras perderam completamente sua integridade mecânica após 1 semana de imersão. A adição de DMAEMA, um monômero sensível ao pH, mesmo que em pequenas quantidades conferiu ao criogel essa propriedade, sendo que em pHs ácidos (pH 2,0) os criogéis de composição 25%HEMA  
15 incharam a um ESR ao redor de 16, enquanto que em pHs básicos (pH 10,0) esse valor se situou ao redor de 5. O módulo de elasticidade medido por meio de reologia foram entre 10 e 50 vezes menores do que os calculados através das equações que relacionavam esta propriedade com o peso molecular entre ligações entrecruzadas, fato que pode ser explicado pela alta porosidade do  
20 sistema.

A posteriori, elegeu-se o sistema contendo de 75% HEMA e 25% DMAEMA para os ensaios de viabilidade e proliferação celular, os quais permitiram prever o comportamento preliminar da relação dos criogéis do sistema HEMA/DMAEMA com células tronco mesenquimais e osteoblastos. A  
25 partir destes ensaios verificou-se que:

Os criogéis testados são biocompatíveis e osteoindutores, permitiram a adesão e a proliferação de osteoblastos e de células tronco mesenquimais, as quais expressaram os marcadores bioquímicos correspondentes ao fenótipo osteogênico. Assim como, que a presença de colágeno do tipo I e de fosfatase  
30 alcalina são bons indicativos do potencial destes materiais para o seu uso como biomaterial;

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

### Reivindicações

#### PROCESSO DE CRIOPOLIMERIZAÇÃO DE COMONÔMEROS ANFOLÍTICOS PARA OBTENÇÃO DE ARCABOUÇOS E ARCABOUÇOS OBTIDOS

- 5 1) Processo de obtenção de biomaterial na forma de arcabouços implantáveis **caracterizado por** compreender banho criostático.
- 2) Processo de obtenção de biomaterial na forma de arcabouços implantáveis, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado por** compreender pelo menos uma das seguintes etapas:
- 10 a) formação de uma solução aquosa compreendendo a junção de monômero anfótilico com um agente entrecruzante;
- b) adição de uma fase cerâmica a esta solução;
- c) agitação magnética da solução;
- d) banho de gelo da solução;
- 15 e) vazamento da solução em moldes e adicionar a ela o sistema catalítico;
- f) submissão da solução a um banho criostático por 20h;
- g) liofilização da solução;
- h) formação de criogéis;
- 20 i) mergulho dos criogéis sob agitação por 24h;
- j) secagem a vácuo.
- 3) Arcabouços porosos **caracterizados por** compreenderem comonômeros criopolimerizados.

**Resumo**

**PROCESSO DE CRIOPOLIMERIZAÇÃO DE COMONÔMEROS ANFOLÍTICOS  
PARA OBTENÇÃO DE ARCABOUÇOS E ARCABOUÇOS OBTIDOS**

- 5        A presente invenção descreve um novo método para a obtenção de um biomaterial na forma de arcabouços implantáveis para utilização em engenharia de tecidos na área da saúde. Mais especificamente o método compreende criopolimerização de polímeros anfotéricos reforçados com fosfato de cálcio para a utilização em engenharia de tecidos.