(12) PEDIDO INTERNACIONAL PUBLICADO SOB O TRATADO DE COOPERAÇÃO EM MATÉRIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organização Mundial da Propriedade Intelectual
Secretaria Internacional

(43) Data de Publicação Internacional
22 de Junho de 2017 (22.06.2017)

WIPO | PCT

(10) Número de Publicação Internacional
WO 2017/100878 A1

(51) Classificação Internacional de Patentes :
C08J 5/18 (2006.01) *A61K 31/36* (2006.01)
C08J 5/22 (2006.01) *A61K 31/715* (2006.01)
C08J 7/12 (2006.01) *A61K 47/36* (2006.01)
C08L 5/00 (2006.01) *A61L 31/06* (2006.01)
C08L 5/02 (2006.01) *B01D 67/00* (2006.01)
C08L 1/26 (2006.01) *B01D 69/02* (2006.01)
A61K 8/60 (2006.01) *B01D 71/06* (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01)

(21) Número do Pedido Internacional :
PCT/BR2016/000130

(22) Data do Depósito Internacional :
18 de Novembro de 2016 (18.11.2016)

(25) Língua de Depósito Internacional : Português

(26) Língua de Publicação : Português

(30) Dados Relativos à Prioridade :
br 10 2015 031933 9
18 de Dezembro de 2015 (18.12.2015) BR

(71) Requerente : **UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP** [BR/BR]; Rua Roxo Moreira 1831 - Cidade Universitária, "Zeferino Vaz" - Distrito de Barão Geraldo, Caixa Postal 6.131, CEP-13083-970 Campinas - SP (BR).

(72) Inventores : **GENEVRO, Giovana Maria**; Rua Alfredo Richard Klein, 312, CEP: 79823-440 Dourados - MS (BR). **GOMES NETO, Reginaldo José**; Rua Jogo do Carneiro, 25, Bairro da Saúde, CEP: 40045-040 Salvador - BA (BR). **DE MORAES, Mariana Agostini**; Rua Dr. Rubens Gomes Bueno, 395, Bairro Várzea de Baixo, CEP: 04730-000 São Paulo - SP (BR). **BEPPU, Marisa Masumi**; Rua Olympio Pattaro, 182, Distrito de Barão Geraldo, CEP: 13085-045 Campinas - SP (BR).

(74) Mandatário : **SILVADO, Fernanda Lavras Costallat**; Rua Roxo Moreira 1831 - Cidade Universitária, "Zeferino Vaz" - Distrito de Barão Geraldo, Caixa Postal 6.131, CEP-13083-970 Campinas - SP (BR).

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

(Continua na página seguinte)

(54) Title : PROCESS FOR PRODUCING ASYMMETRIC MEMBRANES, MEMBRANES THUS PRODUCED AND USE THEREOF

(54) Título : PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS ASSIMÉTRICAS, MEMBRANAS ASSIM OBTIDAS E USO



Figura 1

(57) Abstract : The present invention relates to a process for producing an asymmetric glucomannan membrane without using organic solvents. The invention further relates to an asymmetric glucomannan membrane produced using this process. The invention has applications in the field of biomedicine, and more particularly in regenerative medicine and tissue engineering as a scaffold for the regeneration of various types of tissues, such as, inter alia, skin, cartilaginous tissue and muscle tissue.

(57) Resumo : A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de membrana assimétrica de glucomanana sem utilização de solventes orgânicos. Adicionalmente, a invenção refere-se à membrana assimétrica de glucomanana obtida a partir do processo. A invenção tem aplicações na área biomédica, mais especificamente, medicina regenerativa e engenharia tecidual como *scaffold* para regeneração de diversos tipos de tecidos, tais como pele, cartilaginoso, muscular, entre outros.

WO 2017/100878 A1

(84) Estados Designados *(sem indicação contrária, para todos os tipos de proteção regional existentes)* : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasiático (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), Europeu (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

— *com relatório de pesquisa internacional (Art. 21(3))*

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS ASSIMÉTRICAS, MEMBRANAS ASSIM OBTIDAS E USO

CAMPO DA INVENÇÃO

[001] A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de membrana assimétrica de glucomanana sem utilização de solventes orgânicos. Adicionalmente, a invenção refere-se a membrana assimétrica de glucomanana obtida a partir do processo.

[002] A invenção tem aplicações na área biomédica, mais especificamente, medicina regenerativa e engenharia tecidual como *scaffold* para regeneração de diversos tipos de tecidos, tais como pele, cartilaginoso, muscular, entre outros.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

[003] A pele é o maior orgão nos vertebrados, ocupa uma área de aproximadamente 2 m^2, e representa aproximadamente um décimo da massa corporal. Tem uma estrutura complexa em três camadas, epiderme, derme e hipoderme, que constitui uma barreira externa para a proteção dos orgãos internos da contaminação por patógenos microbianos, das injúrias químicas e mecânicas, além de regular a temperatura do corpo e previnir a desidratação.

[004] A perda da integridade da pele pode ocorrer por diversos fatores, entre os quais desordens genéticas, traumas agudos, feridas crônicas ou intervenções cirúrgicas. Queimaduras são a causa mais comum de perda de pele e podem resultar em ferimentos profundos que comprometem a imunidade e a imagem do corpo, além de induzir a perda de fluidos e deixar cicatrizes, e por fim podem deixar o paciente incapaz ou até mesmo levar a morte.

[005] Entre as alternativas nos casos de perdas extensivas de pele, tem-se o enxerto de pele autólogo, porém locais doadores de tecido saudável são extremamente limitados; e o transplante de um individuo para o outro,

entretanto seu uso depende da disponibilidade em bancos de pele, motivos religiosos, varredura para doenças virais e esterilização padronizada para reduzir os riscos para os pacientes.

[006] Durante as últimas décadas, enormes esforços têm sido feitos para tornar o processo de cicatrização de feridas menos doloroso e mais rápido. Durante o desenvolvimento de novos curativos para cicatrização de ferimentos e queimaduras tem se buscado imitar as propriedades da pele.

[007] Como resultado de intensa pesquisa, diversos substitutos para a pele foram desenvolvidos, e alguns deles já estão disponíveis para uso clínico. Estes podem ser livres de células bem como conter células, desta forma estes substitutos da pele protegem da perda de fluidos e da contaminação, ao mesmo tempo em que realizam a entrega de componentes da matriz extracelular, citocinas e fatores de crescimento, favorecendo a cicatrização da ferida. Estes curativos podem ser usados como uma cobertura temporária até um autotransplante estar disponível, ou até mesmo permanecer na ferida durante ou após a cicatrização.

[008] Estão disponíveis para uso clínico substitutos do tipo epidermal, dermal e epidermal/dermal, a escolha dependerá da gravidade da ferida. Os substitutos do tipo epidermal buscam restaurar a camada epidermal da pele, em geral são de difícil manipulação devido a sua natureza fina e frágil, não são capazes de tratar feridas de queimadura de terceiro grau e sua produção é demorada. Os substitutos dermais são biomatrizes que atendem todos os requerimentos da camada dermal, são úteis para reparar defeitos de maior profundidade na pele, afetam epiderme e derme, além de melhorar a qualidade da cicatriz, prevenir a contração da ferida e fornecer suporte mecânico. Porém este tipo de substituto não é capaz de mimetizar de modo eficiente as

camadas da derme e da epiderme. Já os substitutos do tipo epidermal/dermal são a mais avançada construção disponível para uso clínico, pois contem queratinócitos e fibroblastos em uma matriz 3D, agregando potencial para regenerar a derme e a epiderme. Entretanto o custo de produção é elevado e alguns casos de rejeição foram relatados para este tipo de substituto.

[009] Esforços recentes tem como objetivo o desenvolvimento de membranas assimétricas tentando mimetizar toda as camadas da pele. Entre os substitutos descritos anteriormente apenas o tipo epidermal/dermal apresenta geometria assimétrica. As camadas epidermal e dermal correspondem respectivamente a camada densa e a camada interior esponjosa das membranas assimétricas.

[010] Pesquisadores envolvidos na medicina regenerativa começaram desenvolvendo curativos oclusivos como Opsite®, Omiderm® ou Spandre®, que são impermeáveis e, consequentemente, não permitiram a absorção de exsudato, resultando em um processo de cicatrização demorada. Posteriormente, desenvolveram curativos com macroporos (por exemplo Coldex® e Surfasoft®), eficientes na drenagem do exsudato da ferida. Porém, estes não foram capazes de evitar a invasão de microrganismos e desidratação da ferida. Então, chegou-se à conclusão de que a combinação de ambos os sistemas seria o ideal, uma vez que poderia impedir a penetração de bactérias, e ao mesmo tempo, permitir a absorção do exsudato e troca gasosa. Assim, deu-se origem a curativos com uma sub-camada de um hidrogel macroporoso, associada a uma camada superior hidrofóbica microporosa ou densa, resultando em uma membrana assimétrica. Lyofoam® e Epigard®, por exemplo, pertencem a esse tipo de curativo.

[011] Entre os métodos descritos no estado da técnica para obtencão de membranas assimétricas o método mais comum de preparo é inversão de fases por imersão-precipitação.

Primeiramente, a solução de polímero é colocada em um molde para a formação de um filme fino. Na sequência o filme é imerso em solução não solvente, onde o coagulante ocupa o lugar do solvente, ocorrendo a precipitação. Porém, esse processo não permite controle sobre a estrutura formada, sendo necessárias algumas modificações para obter o produto como desejado. Mudar a composição da solução a ser moldada, ou do banho de coagulação, ou ainda adicionar etapas como evaporação (conhecido como inversão de fases seco/úmido) são opções para se obter um maior controle da estrutura a ser formada. A principal desvantagem desse método é o uso de solventes orgânicos tóxicos, com geração de resíduos e o tempo de preparo, visto que geralmente o banho de imersão dura 24 h.

[012] No estado da técnica entre os principais polímeros utilizados para obtenção de membranas assimétricas tem-se o poliuretano (PU) e a celulose (CS). As membranas obtidas com os polímeros relatados apresentam diversas características como atividade antimicrobiana, biocompatibilidade, propriedades hemostáticas, permeação a água e gás. Entretanto, a técnica de inversão de fases utilizada para obter estas membranas assimétricas requer, como já descrito, o uso de solventes orgânicos tóxicos que podem ser removidos apenas com etapas de purificação adicionais ao processo de produção destas membranas.

[013] O documento CN101816525-A de 23/04/2010 (Manufacturing method of double-sided heterogeneous glucomannan sponge, Jianhui Huang) relata uma esponja heterogênea de dupla face e o método de fabricação desta. A preparação de uma mistura contendo glucomanana é colocada em um recipiente, aquecida e retirada. A seguir há a preparação da outra mistura de glucomanana que é posteriormente adicionada ao recipiente. As duas membranas são então unidas. O processo apresenta etapas de aquecimento

e resfriamento, o uso de soluções distintas para o preparo da membrana heterogênea, e os poros são feitos através do uso de agulhas como molde. Entretanto, a etapa de reticulação (processo de ligação cruzada entre as moléculas), essencial para conferir estabilidade e diminuir a solubilidade em água, por exemplo, não é bem descrita no documento, não é conhecido se usa agente alcalino ou outros reagentes. Além disso a aplicação da membrana descrita neste documento é como esponja de banho. A invenção proposta difere do documento CN101816525-A principalmente pelo fato de ser um material assimétrico, lado denso e outro poroso, obtendo-se uma membrana de hidrogel feita de uma única solução de glucomanana na presença de hidróxido de sódio. A aplicação no caso da invenção é preferencialmente como curativos e não como esponja para higiene pessoal. A principal vantagem da presente invenção frente a descrita no documento CN101816525-A é a obtenção de uma membrana assimétrica de aplicação como curativo, pois possui duas faces com funções distintas. Face porosa, para absorção de exsudato e densa para controle de invasão bacteriana e umidade. Já a esponja, como a descrita no documento CN101816525-A é um material poroso, por mais que apresente lados com densidade de poros diferentes, não apresenta uma face densa. O processo da presente invenção é mais simples, exige menos manipulação uma vez que uma única solução é utilizada, seca parcialmente em estufa e é congelada em freezer convencional.

[014] No documento CN103214697-A de 22/03/13 tem-se a descrição de uma composição contendo glucomanana e um agente alcalino além de agentes formadores de espuma. O produto passa por etapas de congelamento, descongelamento branqueamento e secagem. A invenção proposta difere do documento CN103214697-A principalmente pelo fato de o produto ser uma membrana de hidrogel assimétrica e não uma

esponja. O processo de obtenção de poros no caso da invenção se dá pelo congelamento da água contida nas membranas e consequente formação de cristais de gelo, que formam os poros, já no documento CN103214697-A usa-se agentes formadores de espuma e choque térmico (aquecimento a altas temperaturas seguido de congelamento). O processo descrito para o documento CN103214697-A possui uma série de etapas e reagentes, diferentemente da inovação proposta que apenas utiliza hidróxido de sódio como agente formador do gel, secagem parcial para formação de camadas com diferentes quantias de água e congelamento para formar cristais de gelo e consequentemente poros após o degelo. A membrana assimétrica apresenta vantagem sobre esponjas (material poroso) para uso como curativo, pois em um mesmo material apresenta faces com funções distintas: Face porosa, para absorção de exsudato e face densa para controle de invasão bacteriana e umidade. O processo também é mais simples, uma vez que não exige outros reagentes além de glucomanana e hidróxido de sódio, além disso não exige temperaturas tão elevadas para o preparo.

[015] O documento TW201134833-A de 06/04/10 (Method of manufacturing double-sided heterogeneous glucomannan sponge application thereof have two surfaces of different roughness degrees and can be adapted for different skins of human bodies, HUANG J) relata um método de produção de uma membrana de glucomanana com lados heterogêneos. A preparação de uma mistura contendo glucomanana é colocada em um recipiente, aquecida e retirada. A seguir há a preparação da outra mistura que é posteriormente adicionada ao recipiente. As duas membranas são então unidas e congeladas. As diferentes densidades dessa membrana é devido ao tempo de reação diferente que são submetidas as misturas. A invenção proposta difere do descrito no documento TW201134833-A principalmente pelo fato de ser um

material assimétrico, lado denso e outro poroso, e não somente diferença de densidade, o invento é uma membrana de hidrogel feita de uma única solução de glucomanana na presença de hidróxido de sódio. O processo do documento TW201134833-A não usa secagem, apenas aquecimento para favorecer a reticulação. Enquanto no invento proposto utiliza-se secagem para obter partes da membrana com diferentes quantias de água e após congelamento ter poros maiores na parte mais úmida da membrana, o documento TW201134833-A usa tempo de reação diferente para as misturas, e com isso densidade de poros diferentes. A aplicação no caso da invenção é preferencialmente como curativos e não como esponja para higiene pessoal. Para aplicação como curativo, membrana assimétrica possui vantagem devido às duas faces com funções distintas. Face porosa, para absorção de exsudato, e face densa, para controle de invasão bacteriana e umidade. A esponja é um material poroso, por mais que apresente lados com densidade de poros diferentes, não apresenta uma face densa. Outra vantagem é o fato do processo ser mais simples, exige menos manipulação uma vez que uma única solução é utilizada, seca parcialmente em estufa e congelada em freezer convencional

[016] No documento CN102389584-A de 08/11/11 descreve-se a preparação de curativos de glucomanana, cujo processo de preparo ocorre através da agitação sob aquecimento da solução de glucomanana, seguida de pré-resfriamento, secagem à vácuo e estabilização, denominado banho de coagulação. A invenção proposta difere do documento CN102389584-A principalmente pelo fato de ser uma membrana gel, assimétrica. O método de produção é mais simples, sendo apenas secagem parcial em estufa e congelamento. O banho de coagulação (solução com pH elevado), utilizado no processo do documento CN102389584-A é uma etapa adicional que gera mais resíduos e, consequente, exige maior controle e

tratamento desses resíduos. Na invenção proposta, o hidróxido de sódio é adicionado na solução, então o gel é formado durante a etapa de secagem, dispensando etapas de estabilização posteriores. A membrana assimétrica, tem suas vantagens na aplicação como curativos pois apresenta uma face porosa para absorção do excesso de exsudato da ferida e também uma face densa para controle de umidade e invasão de microrganismos. No documento CN102389584-A membrana formada é porosa como um todo, a membrana obtida na presente invenção é assimétrica, com duas faces distintas uma porosa e outra densa.

[017] O documento CN103386150B de 04/07/13 se refere a um método de preparo e a aplicação de uma membrana (filme) composta de glucomanana, quitosana e ácido hialurônico, que passa pelo processo de mistura, neutralização, secagem, resfriamento e liofilização (apresentando alto gasto energético). A invenção proposta difere do documento CN103386150B principalmente pelo fato de ser uma membrana gel, assimétrica e produzida apenas a partir de glucomanana. O método de produção é mais simples, sendo apenas secagem parcial e congelamento. O fato de ser produzido apenas de glucomanana, torna o material mais barato e o preparo simplificado. A membrana assimétrica tem suas vantagens na aplicação como curativos pois apresenta uma face porosa para absorção do excesso de exsudato da ferida e também uma face densa para controle de umidade e invasão de microrganismos. O material do documento CN103386150B é um filme, ou seja, uma membrana densa, enquanto o objeto da presente invenção é uma membrana assimétrica com duas faces distintas, uma porosa e outra densa.

[018] É possível verificar que nenhuma das patentes descritas anteriormente como estado da técnica apresenta como produto uma membrana com face densa e outra porosa, e também o processo de produção é sempre diferente apesar de

conter etapas semelhantes, o objetivo das etapas é diferente. Nenhum processo utiliza secagem parcial, para obter partes de uma mesma membrana com quantidades diferentes de água, para posterior formação de poros a partir de degelo dos cristais de gelo formados no congelamento.

[019] O método proposto é atóxico e apresenta poucas etapas, sem a necessidade de etapas adicionais de purificação. A presente tecnologia propõe inovação tanto no método de preparo das membranas como no polímero a ser utilizado para esse fim. O polímero é a glucomanana de konjac (KGM), comumente extraída de tubérculos da planta Amorphophallus Konjac, é um polissacarídeo neutro da família das mananas, muito abundante na natureza. Glucomananas são hemiceluloses encontradas em madeiras moles e representam cerca de 16 a 18% da parede das células lenhosas .

[020] Como biomaterial, a glucomanana pode ser utilizada na liberação de fármacos, devido a sua biodegradabilidade e capacidade de formação de gel. A glucomanana é um material que apresenta características interessantes para aplicação como curativo, visto que é conhecida por possuir boa elasticidade e capacidade de formação de gel e filmes. Como curativo, KGM pura e combinada com quitosana foram preparados na forma de filme. Estes materiais apresentaram características satisfatórias para a aplicação em questão.

[021] Diante do exposto, seria útil se a técnica dispusesse de uma membrana assimétrica com duas faces distintas, uma face densa e outra porosa, pois para uso como curativo cada uma dessas faces tem um papel fundamental para a cicatrização da lesão a ser tratada. A face densa controla a passagem de microrganismos e também a perda excessiva de umidade. A face porosa, por sua vez, absorve o excesso de exsudato da ferida. O seu processo de obtenção é atóxico e apresenta poucas etapas, sem a necessidade de etapas

adicionais de purificação. A matéria prima é de baixo custo e é utilizada em pequenas quantidades. O processo de obtenção é simples, sendo apenas necessário etapas de secagem e congelamento, sem a necessidade de pós-tratamentos nem geração de resíduos. Não se faz uso de altas temperaturas no processo de secagem, nem temperaturas muito baixas para o congelamento. As membranas obtidas são biodegradáveis, não tóxicas e possuem baixo custo de obtenção.

BREVE DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

[022] A presente invenção refere-se a um processo de obtenção de membrana assimétrica que compreende as seguintes etapas:

a. Adicionar 1,1 g de KGM para cada 100 mL de água destilada;
b. Homogeneizar por agitação;
c. Adicionar solução 1 mol/L de NaOH à solução obtida em (b) até que a concentração final de glucomanana, preferencialmente de konjac, seja 1% e de NaOH seja 0,1 mol/L;
d. Verter 0,95 g da solução obtida em (c) para cada cm^2 do molde utilizado;
e. Secar a solução contida no molde até que resulte em uma membrana com 20-25%, preferencialmente 20%, da massa inicial;
f. Congelar a membrana obtida em (e) por até 24 h;
g. Descongelar a membrana obtida em (f);
h. Lavar com água destilada até a neutralização do pH; e
i. Obter as membranas assimétricas.

[023] A membrana assimétrica obtida pelo processo é maleável, com uma face densa e outra porosa, atóxica, resistência a tração (TS) e percentual de alongamento (E) de 0,51 ± 0,12 MPa e 80,84 ± 23,27%, respectivamente.

[024] Adicionalmente a membrana assimétrica possui aplicação na área biomédica, principalmente na área de medicina regenerativa e engenharia tecidual, como *scaffold* para regeneração de tecidos, tais como pele, cartilaginoso, muscular, entre outros.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1: Representa uma imagem da membrana de KGM (glucomanana de konjac).

Figura 2: Micrografias de membranas de KGM a) superfície de topo e b) face inferior (fundo).

Figura 3: Imagens de microscopia confocal das membranas de KGM nos dias (a) 1 e (b) 4 de cultura celular.

Figura 4: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da cultura celular nos dias (a) 1 e (b) 4 nas membranas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[025] A invenção se refere a um processo de obtenção de membrana assimétrica de glucomanana, a membrana assimétrica assim obtida e seus usos.

[026] O processo de obtenção da membrana assimétrica compreende as seguintes etapas:

a. Adicionar 1,1 g de KGM para cada 100 mL de água destilada;
b. Homogeneizar por agitação a 600 rpm preferencialmente por 4 horas;
c. Adicionar solução 1 mol/L de NaOH a solução obtida em (b) até que a concentração final de KGM seja 1% e de NaOH seja 0,1 mol/L;
d. Verter 0,95 g da solução obtida em (c) para cada cm^2 do molde utilizado;
e. Secar a solução contida no molde em estufa a temperatura entre 60-70°C, preferencialmente 60 °C, até que resulte em uma membrana com 20-25%, preferencialmente 20%, da massa inicial;

f. Congelar a membrana obtida em (e) a temperatura -6°C a -8°C, preferencialmente -6°C, por até 24 h;
g. Descongelar a membrana obtida em (f) a temperatura entre 20-25°C;
h. Lavar com água destilada até a neutralização do pH; e
i. Obtenção as membranas assimétricas.

[027] A faixa de massa final em relação a massa inicial após a secagem é essencial para as características da membrana final, pois estabelece a porção de membrana com maior quantidade de água, se secar mais obtém-se uma membrana densa por completo e se secar menos, a membrana fica mais espessa, mais gelatinosa.

[028] Adicionalmente é objeto da presente invenção a membrana assimétrica e seus usos.

[029] A membrana assimétrica de hidrogel é maleável, com uma face densa e outra porosa, que apresenta resistência a tração (TS) e percentual de alongamento (E) de 0,51 ± 0,12 MPa e 80,84 ± 23,27%, respectivamente. Não apresenta toxicidade celular.

[030] A membrana obtida tem aplicação na área biomédica, principalmente na área de medicina regenerativa e engenharia tecidual, pois pode ser utilizado como *scaffold* para regeneração de diversos tipos de tecidos, tais como pele, cartilaginoso, muscular, entre outros.

Exemplo de concretização

[031] Para preparar membranas assimétricas, contendo uma camada de topo (voltada ao ambiente) mais densa e uma camada inferior (em contato com a ferida) mais porosa, preparou-se o material de maneira a formar um hidrogel fino durante a etapa de secagem (casting).

[032] No processo de secagem parcial, ocorre a formação de uma película na superfície da membrana, onde o material encontra-se mais concentrado devido à perda da umidade para

o meio. Essa face da membrana fica com poros menores em relação à face inferior da membrana. Por fim, a utilização da técnica de congelamento/descongelamento, possibilita a obtenção de poros maiores na porção da membrana que foi parcialmente seca (menor concentração). O maior volume de tal porção engloba maior quantidade de moléculas de água que formam cristais ao serem congeladas. Durante o descongelamento do material, os cristais de água dão lugar aos poros, cujo tamanho depende diretamente da taxa de congelamento aplicada.

[033] A membrana obtida é um material bastante resistente ao manuseio, com aspecto muito interessante (Figura 1) para a aplicação como curativo de alto desempenho.

[034] A análise da morfologia das membranas por MEV (Figura 2) mostra que as membranas apresentam uma face mais densa e outra mais porosa, com uma estrutura de poros bem definidos, apresentando a estrutura que se almejava.

[035] Para comprovar a baixa citotoxicidade dessas membranas, fibroblastos L929 foram semeados na concentração de 2×10^4 células por poço. As células foram cultivadas a 37 °C e 5% de CO_2.

[036] As Figuras 3 e 4 apresentam imagens das amostras durante a cultura celular. A Figura 3 apresenta imagens de microscopia confocal e a Figura 4 imagens de microscopia eletrônica de varredura.

[037] Na Figura 3 podemos observar em verde o citoesqueleto das células (corados com faloidina) e em vermelho o núcleo (corados com iodeto de propídeo). Após 1 dia de cultura, a concentração celular era baixa e as células apresentavam-se arredondadas, o que pode ser justificado pelo fato das células ainda estarem se adaptando ao material e também aos efeitos da tripsina (utilizada para descolar as células do fundo da placa de cultura). Já no quarto dia de cultura as células proliferaram, a população de células

aumentou consideravelmente e apresentavam formato alongado, típico de células de fibroblastos bem instaladas.

[038] Na Figura 4 novamente podemos observar que a população de células no primeiro dia de cultura era baixa e que as células proliferaram bem ao longo do período de cultura, sendo que no quarto dia as células já ocupavam quase que totalmente a superfície da membrana de KGM. A morfologia das células também pode ser observada nas imagens de microscopia eletrônica de varredura (Figura 4) e confirma as características descritas na imagem de confocal (Figura 3).

[039] Um bom curativo deve resistir à tração e à deformação natural exercida pela pele sem ser danificado. As membranas foram analisadas quanto à sua capacidade de resistir à tração e percentual de alongamento.

[040] O ensaio foi realizado em um texturômetro TA.XT2 (Stable Microsystems SMD), com célula de carga de 50 kg. A força exercida pelo equipamento por área da membrana (área = espessura x largura) no momento de ruptura é considerada a força de resistência à tração desse material. O percentual de alongamento é a distância percorrida pelas garras até o momento da ruptura pelo comprimento inicial da membrana. A resistência a tração (TS) e percentual de alongamento (E) das membranas foram de 0,51 ± 0,12 MPa e 80,84 ± 23,27%, respectivamente. A pele humana normal, apresenta valores de TS de 2,5 a 16 MPa. Os testes foram realizados em amostras hidratadas e a água age como um plastificante natural na estrutura do polímero, aumentando a sua flexibilidade e, portanto, diminuindo os seus valores de TS. O alongamento das membranas foi adequado para o objetivo proposto, visto que a elasticidade da pele normal humana é de aproximadamente 70%.

[041] Desta forma, a membrana obtida a partir do processo descrito possui as seguintes características: membrana de hidrogel, maleável, com uma face densa e outra porosa, que

apresenta resistência à tração (TS) e percentual de alongamento (E) de 0,51 ± 0,12 MPa e 80,84 ± 23,27%, respectivamente. Não apresenta toxicidade para as células (fibroblastos L929).

REIVINDICAÇÕES

1. Processo de obtenção de membrana assimétrica **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

a. Adicionar 1,1 g de KGM para cada 100 mL de água destilada;

b. Homogeneizar por agitação;

c. Adicionar solução 1 mol/L de NaOH à solução obtida em (b) até que a concentração final de glucomanana seja 1% e de NaOH seja 0,1 mol/L;

d. Verter 0,95 g da solução obtida em (c) para cada cm^2 do molde utilizado;

e. Secar a solução contida no molde até que resulte em uma membrana com 20-25%, preferencialmente 20%, da massa inicial;

f. Congelar a membrana obtida em (e) por até 24 h;

g. Descongelar a membrana obtida em (f);

h. Lavar com água destilada até a neutralização do pH; e

i. Obter as membranas assimétricas.

2. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato de glucomanana ser preferencialmente de konjac.

3. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato da agitação (etapa b) ser realizada preferencialmente a 600 rpm por 4 horas.

4. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato da secagem (etapa e) ocorrer preferencialmente em estufa a uma temperatura variável entre 60 e 70°C, preferencialmente 60 °C.

5. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato do congelamento (etapa f) ocorrer a uma temperatura variável entre -6°C e -8°C, preferencialmente -6°C.

6. Processo, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato do descongelamento (etapa f) ocorrer a uma temperatura variável entre 20 e 25°C.

7. Membrana assimétrica **caracterizada por** ser obtida pelo processo descrito nas reivindicações de 1 a 6 e ser maleável, com uma face densa e outra porosa, atóxica, resistência a tração (TS) e percentual de alongamento (E) de 0,51 ± 0,12 MPa e 80,84 ± 23,27%, respectivamente.

8. Membrana assimétrica **caracterizada por** ser maleável, com uma face densa e outra porosa, atóxica, resistência a tração (TS) e percentual de alongamento (E) de 0,51 ± 0,12 MPa e 80,84 ± 23,27%, respectivamente.

9. Uso da membrana assimétrica descrita na reivindicação 7 ou 8 **caracterizado por** ter aplicação na área biomédica, principalmente na área de medicina regenerativa e engenharia tecidual, como *scaffold* para regeneração de tecidos, tais como pele, cartilaginoso, muscular, entre outros.



Figura 1

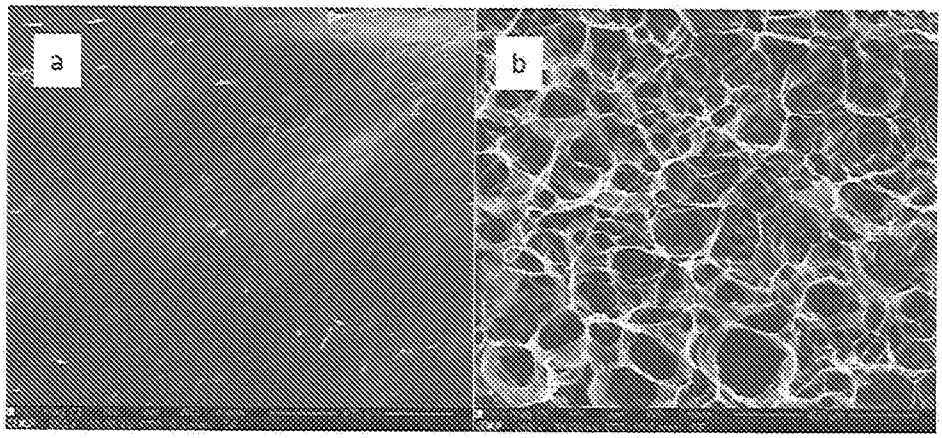


Figura 2

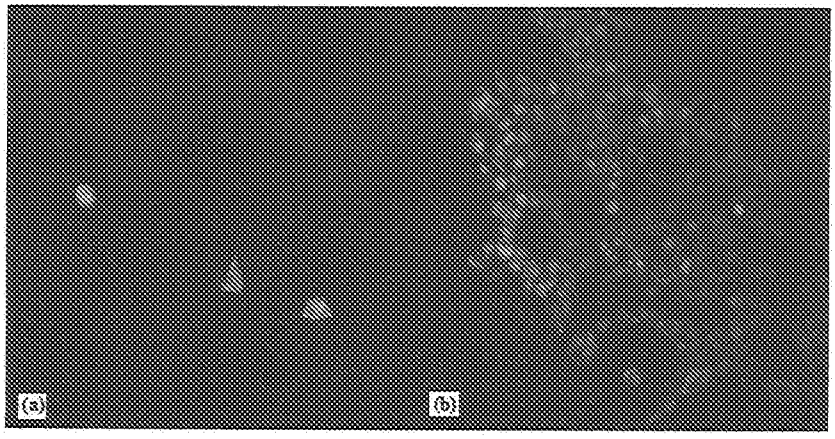


Figura 3

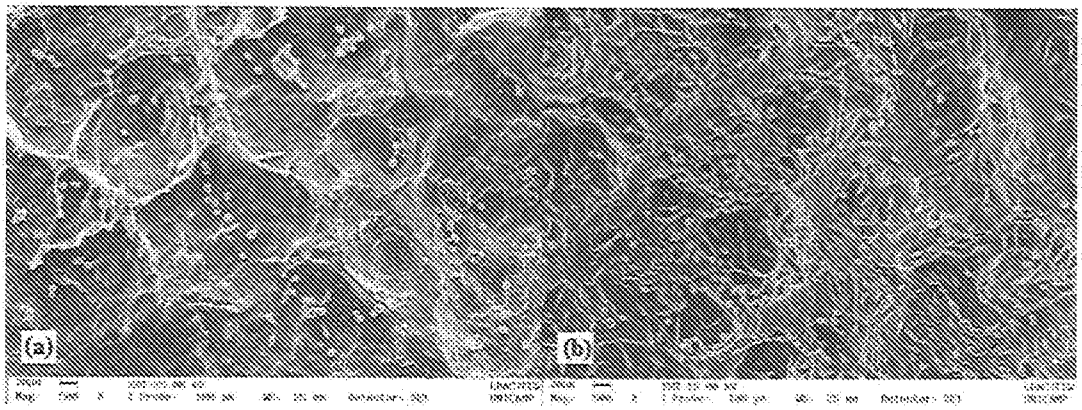


Figura 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/BR2016/000130

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C08J 5/18, C08J 5/22, C08J 7/12, C08L 5/00, C08L5/02, C08L 1/26, A61K 8/60, A61K 8/73, A61K 31/736, A61K 31/715, A61K 47/36, A61L 31/06, B01D 67/00, B01D 69/02, B01D 71/06 (2006.01).

SEE SUPPLEMENTAL SHEET

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C08J, C08L, A61K, A61L, B01D.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC-INTERNAL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010255076 Al (ULTRACEUTICALS R D PTYT.TD [AU] } 07 October 2010 (2010-10-07) Abstract.. Paragraphs 8-16, 22-27, 50, 55, 56, 64, 68, 73, 79, 85. claims 1-4, 17 and 18.	1-9
X	CN 104927074 A (UNIV FUJIAN AGR1C FORESTRY) 23 September 2015 (2015-09-23) Abstract..	1-9
X	CN 104817647 A (UNIV FUJIAN AGRÍC FORESTRY) 05 August 2015 (2015-08-05) Abstract..	1-9
X	CN 102228410 A (UNIV FUJIAN AGRIC FORESTRY) 02 November 2011 (201 1-11 -02) Abstract..	1-9

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 DECEMBER 2016	18/01/2014

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
INPI Rua Sao Bento nº 1, 17º andar cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ	**José Rufino de Oliveira Junior**
Facsimile No. +55 21 3037-3663	Telephone No. +55 21 3037-3493/3742

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/BR2016/000130

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP H10236949 Á (UME CQLLOÍD KK) 08 September 1998 (1998-09-08) Abstract.	1-9
Y	CN 103044700 A (UNIV KUNMING SCIENCE TECH) 17April 2013 (2013-04-17) Abstract.	1-9
Y	US 2014315308 Al (UNIV CALIFÓRNIA [US]) 23October 2014 (2014-10-23) Abstract.. Figures 4 and 8. Pages 1-6. Claims n° I and 15.	1-9
A	CN 101524095 A (UNIV TIANJIN SCIENCE TECH) 09 September 2009 (2009-09-09) Abstract.	1-9
A	CN 104437115 A (SHANDONG INST COMMERCE TECH) 25 March 2015 (2015-03-25) Abstract.	1-9

US 2010255076 A1	2010-10-07	US 9433805 B2	2016-09-06
		AU 2008307152 A1	2009-04-09
		CA 2701323 A1	2009-04-09
		EP 2229175 A1	2010-09-22
		WO 2009043111 A1	2009-04-09
CN 104927074 A	2015-09-23	NONE	
CN 104817647 A	2015-08-05	NONE	
CN 102228410 A	2011-11-02	CN 102228410 B	2012-07-25
JP H10236949 A	1998-09-08	JP 3420456 B2	2003-06-23
CN 103044700 A	2013-04-17	CN 103044700 B	2014-08-06
US 2014315308 A1	2014-10-23	US 9359591 B2	2016-06-07
		CA 2857283 A1	2013-06-06
		CN 103958666 A	2014-07-30
		EP 2785830 A1	2014-10-08
		HK 1202889 A1	2015-10-09
		JP 2015502746 A	2015-01-29
		KR 20140103931 A	2014-08-27
		MX 2014006371 A	2014-09-22
		WO 2013082239 A1	2013-06-06
CN 101524095 A	2009-09-09	NONE	
CN 104437115 A	2015-03-25	CN 104437115 B	2016-06-08

CPC: C08J 5/18, C08J 5/22, C08J 7/12, C08L 5/00, C08L5/02, C08L 1/26, A61K 8/60, A61K 8/73, A61K 31/736, A61K 31/715, A61K 47/36, A61L 31/06, B01D 67/00, B01D 69/02, B01D 71/06, C08B 37/0087, C08J 220/0484, C08J 2207/10

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL

Depósito internacional Nº
PCT/BR2016/000130

A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

C08J 5/18, C08J 5/22, C08J 7/12, C08L 5/00, C08L5/02, C08L 1/26, A61K 8/60, A61K 8/73, A61K 31/736, A61K 31/715, A61K 47/36, A61L 31/06, B01D 67/00, B01D 69/02, B01D 71/06 (2006.01). Este campo de classificação continua em folha suplementar.

De acordo com a Classificação Internacional de Patentes (IPC) ou conforme a classificação nacional e IPC

B. DOMÍNIOS ABRANGIDOS PELA PESQUISA

Documentação mínima pesquisada (sistema de classificação seguido pelo símbolo da classificação)

C08J, C08L, A61K, A61L, B01D.

Documentação adicional pesquisada, além da mínima, na medida em que tais documentos estão incluídos nos domínios pesquisados

Base de dados eletrônica consultada durante a pesquisa internacional (nome da base de dados e, se necessário, termos usados na pesquisa)

EPODOC-INTERNAL

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
X	US 2010255076 A1 (ULTRACEUTICALS R D PTY LTD [AU]) 07 outubro 2010 (2010-10-07) Resumo. Parágrafos 8-16, 22-27, 50, 55, 56, 64, 68, 73, 79, 85. Reivindicações 1-4, 17 e 18.	1-9
X	CN 104927074 A (UNIV FUJIAN AGRIC FORESTRY) 23 setembro 2015 (2015-09-23) Resumo.	1-9
X	CN 104817647 A (UNIV FUJIAN AGRIC FORESTRY) 05 agosto 2015 (2015-08-05) Resumo.	1-9
X	CN 102228410 A (UNIV FUJIAN AGRIC FORESTRY) 02 novembro 2011 (2011-11-02) Resumo.	1-9

☒ Documentos adicionais estão listados na continuação do quadro C ☒ Ver o anexo de famílias das patentes

* Categorias especiais dos documentos citados:

"A" documento que define o estado geral da técnica, mas não é considerado de particular relevância.

"E" pedido ou patente anterior, mas publicada após ou na data do depósito internacional

"L" documento que pode lançar dúvida na(s) reivindicação(ões) de prioridade ou na qual é citado para determinar a data de outra citação ou por outra razão especial

"O" documento referente a uma divulgação oral, uso, exibição ou por outros meios.

"P" documento publicado antes do depósito internacional, porém posterior a data de prioridade reivindicada.

"T" documento publicado depois da data de depósito internacional, ou de prioridade e que não conflita como depósito, porém citado para entender o princípio ou teoria na qual se baseia a invenção.

"X" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova e não pode ser considerada envolver uma atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente.

"Y" documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada envolver atividade inventiva quando o documento é combinado comum outro documento ou mais de um, tal combinação sendo óbvia para um técnico no assunto.

"&" documento membro da mesma família de patentes.

Data da conclusão da pesquisa internacional	Data do envio do relatório de pesquisa internacional:
14 DEZEMBRO 2016	18/01/2017

Nome e endereço postal da ISA/**BR**	Funcionário autorizado
INPI INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Rua Sao Bento nº 1, 17º andar cep: 20090-010, Centro - Rio de Janeiro/RJ	**José Rufino de Oliveira Junior**
Nº de fax: +55 21 3037-3663	Nº de telefone: +55 21 3037-3493/3742

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoria*	Documentos citados, com indicação de partes relevantes, se apropriado	Relevante para as reivindicações Nº
Y	JP H10236949 A (UNIE COLLOID KK) 08 setembro 1998 (1998-09-08) Resumo.	1-9
Y	CN 103044700 A (UNIV KUNMING SCIENCE TECH) 17 abril 2013 (2013-04-17) Resumo.	1-9
Y	US 2014315308 A1 (UNIV CALIFORNIA [US]) 23 outubro 2014 (2014-10-23) Resumo. Figuras 4 e 8. Páginas 1-6. Reivndicações nºs 1 e 15.	1-9
A	CN 101524095 A (UNIV TIANJIN SCIENCE TECH) 09 setembro 2009 (2009-09-09) Resumo.	1-9
A	CN 104437115 A (SHANDONG INST COMMERCE TECH) 25 março 2015 (2015-03-25) Resumo.	1-9

RELATÓRIO DE PESQUISA INTERNACIONAL
Informação relativa a membros da família da patentes

Depósito internacional Nº
PCT/BR2016/000130

Documentos de patente citados no relatório de pesquisa	Data de publicação	Membro(s) da família de patentes	Data de publicação
US 2010255076 A1	2010-10-07	US 9433805 B2	2016-09-06
		AU 2008307152 A1	2009-04-09
		CA 2701323 A1	2009-04-09
		EP 2229175 A1	2010-09-22
		WO 2009043111 A1	2009-04-09
CN 104927074 A	2015-09-23	Nenhum	
CN 104817647 A	2015-08-05	Nenhum	
CN 102228410 A	2011-11-02	CN 102228410 B	2012-07-25
JP H10236949 A	1998-09-08	JP 3420456 B2	2003-06-23
CN 103044700 A	2013-04-17	CN 103044700 B	2014-08-06
US 2014315308 A1	2014-10-23	US 9359591 B2	2016-06-07
		CA 2857283 A1	2013-06-06
		CN 103958666 A	2014-07-30
		EP 2785830 A1	2014-10-08
		HK 1202889 A1	2015-10-09
		JP 2015502746 A	2015-01-29
		KR 20140103931 A	2014-08-27
		MX 2014006371 A	2014-09-22
		WO 2013082239 A1	2013-06-06
CN 101524095 A	2009-09-09	Nenhum	
CN 104437115 A	2015-03-25	CN 104437115 B	2016-06-08

Quadro Suplementar

No caso **do espaço em qualquer quadro precedente não for suficiente**.
Continuação de: A. CLASSIFICAÇÃO DO OBJETO

CPC: C08J 5/18, C08J 5/22, C08J 7/12, C08L 5/00, C08L5/02, C08L 1/26, A61K 8/60, A61K 8/73, A61K 31/736, A61K 31/715, A61K 47/36, A61L 31/06, B01D 67/00, B01D 69/02, B01D 71/06, C08B 37/0087, C08J 220/0484, C08J 2207/10