



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

(21) BR 102016006072-9 A2

(22) Data do Depósito: 18/03/2016

(43) Data da Publicação: 26/09/2017



(54) Título: FIBRAS-GÉIS BIOSORVENTES ,
USO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DAS
MESMAS

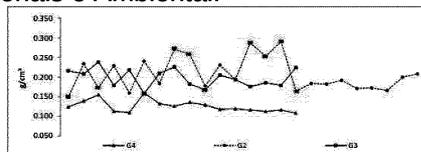
(51) Int. Cl.: C08L 5/04; D01D 5/06; C08F 8/00;
C08B 37/00; A61L 15/28

(52) CPC: C08L 5/04,D01D 5/06,C08F 8/00,
C08B 37/0039,A61L 15/28

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

(72) Inventor(es): LUCE HELENA KOCHER;
LUÍS ALBERTO LOUREIRO DOS SANTOS

(57) Resumo: A presente invenção refere-se à obtenção de um material, denominado como fibras-géis, composto por ágar (ou agarose) e alginato. Este material tem propriedades adsorventes, de forma que poderá ser utilizado na engenharia de tecidos, como scaffold (estrutura) para cultivo celular; em tratamento de efluentes e de emissões atmosféricas, como biosorvente (adsorvente) de constituintes e íons metálicos; na agronomia, como material adsorvido de nutrientes para enxerto e plantio; na indústria como produtos de higiene (absorventes e fraldas), materiais de implantes, coberturas, adesivos bioabsorventes, dentre outros. A presente invenção se situa nos campos da Química, Farmácia, Engenharias de Materiais e Ambiental.



FIBRAS-GÉIS BIOSSORVENTES , USO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DAS MESMAS

Campo da Invenção

[0001] A presente invenção refere-se à obtenção de um material, denominado como fibras-géis, composto por ágar (ou agarose) e alginato. Este material tem propriedades adsorventes, de forma que poderá ser utilizado na engenharia de tecidos, como scaffold (estrutura) para cultivo celular; em tratamento de efluentes e de emissões atmosféricas, como bioissorvente (adsorvente) de constituintes e íons metálicos; na agronomia, como material adsorvido de nutrientes para enxerto e plantio; na indústria como produtos de higiene (absorventes e fraldas), materiais de implantes, coberturas, adesivos bioabsorventes, dentre outros. A presente invenção se situa nos campos da Química, Farmácia, Engenharias de Materiais e Ambiental.

Antecedentes da Invenção

[0002] A engenharia de tecidos é uma área da ciência que reúne conhecimentos multidisciplinares no intuito de desenvolver substitutos biológicos que restaurem, mantenham ou melhorem a função de um tecido ou de um órgão de acordo com Langer e Vacantti (1993). Outros autores diferenciam a engenharia de tecidos (ou também chamada de bioengenharia tecidual) da regeneração tecidual *in situ*, onde na primeira há a utilização de biomateriais e células para a aplicação junto aos tecidos vivos, enquanto a segunda, procura mimetizar a matriz extracelular através da aplicação dos biomateriais, junto ou não a fatores, que possam gerar alguma resposta celular para produção *in vivo* de outras células. No mesmo sentido, a terapia celular pode ser adotada de forma particular ou em conjunto à engenharia de tecidos e à regeneração tecidual *in situ*, já que se baseia na injeção de células, adicionadas ou não a fatores de crescimento, aplicadas especificamente no local do tecido lesionado ou na circulação sanguínea, para regenerar tecidos.

[0003] Os biomateriais de origem natural ou sintética podem ser utilizados de forma transitória ou permanente junto aos tecidos, além de serem

classificados como bioativos, bioinertes, biotoleráveis ou bioabsorvíveis. As características físico-químicas dos biomateriais implicarão em respostas biológicas diferentes quando utilizados em um ou outro tecido. Assim sendo, na maioria das vezes procura-se estudar quais são as características do tecido que se busca compatibilizar, antes do desenvolvimento de um novo biomaterial, a fim de que as chances de sucesso sejam maiores do que se houvesse desenvolvido um material sem avaliação dos pré-requisitos de sua utilização.

[0004] Com relação à aplicação de adsorventes para tratamento de efluentes, pode-se dizer que os bioadsorventes são os materiais que têm maior disponibilidade, aplicabilidade e menores custos para a sua utilização. Foi observado que tanto o alginato de sódio quanto o ágar são bons adsorventes de íons metálicos, segundo Gupta, B. et al (2008); Manal, M. A. et al (2004); Mahmoodi, N. M. (2011); Singh, L. et al (2012); Huang, C. et al (1995) e Díaz, E. D. A. et al (2007). Assim sendo, a aplicação como bioadsorvente também parece ser promissora.

[0005] Os géis têm sido extensivamente aplicados no desenvolvimento dos biomateriais utilizados em tecidos moles (*soft tissues*), ou seja, tecidos que não requerem grandes resistências mecânicas como, por exemplo, tecido epitelial, tecido nervoso, conjuntivos: cartilaginoso, adiposo e sanguíneo. Em relação a esses materiais, destacamos como características mais marcantes a hidrofiliabilidade (afinidade por água) e insolubilidade de suas redes formadas, a certa temperatura. Contudo, essas características são específicas de hidrogéis, ou seja, géis, em que o agente de intumescimento é a água.

[0006] A hidrofiliabilidade de um hidrogel, ou seja, a sua afinidade com a água, pode ser regulada por grupamentos tais como $-OH$, $-COOH$, $-CONH_2$, $-NH_2$ e SO_3H , de forma a gerar hidrogéis neutros ou iônicos. Enquanto que a insolubilidade do hidrogel, e até mesmo dos géis em geral, está interligada ao grau de entrelaçamento das moléculas poliméricas ou ao número de reticulações existentes na rede, e/ou pelo grau das interações físicas.

[0007] Fibras têm sido extensivamente utilizadas como *scaffolds* devido a sua estrutura aleatoriamente permeável, e ordenada, com diâmetro definido. São geralmente obtidas por eletrospinning (Lee, J. et al,2012) ou gel-spinning (Fukae, R., et al,2005)

[0008] O uso de fibras-géis ou chamadas géis fibras na área de engenharia tecidual tem sido pouco explorado, contudo encontram-se as denominações (Fukae, R et al, 2005 e Lee, D. Y. et al, 2007). Entretanto, o mais comumente encontrado na literatura são as expressões para fibras ou para géis e filmes separadamente.

[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 BR 10 2012 010542-0 revela uma composição de material injetável biorreabsorvível e bioativo, denominado osso injetável biorreabsorvívelbioativo ou pasta moldável, para engenharia de tecidos. Es te documento diferencia-se da presente invenção pois utiliza materiais diferentes dos descritos pelos inventores para a obtenção do biomaterial de regeneração celular.

[0011] O documento PI 1107193-1 revela um processo de obtenção de fibras de alginato e a fibra obtida pelo referido processo. Entretanto, o referido documento não revela o emprego de uma blenda de polissacarídeos na fibra obtida. Além disso, o referido documento não revela a aplicação de uma solução alcoólica em baixa temperatura, tampouco identifica o material como fibra-gel ou revela sua utilização para diferentes aplicações (como, por exemplo, biossorvente e adsorvente de nutrientes)

[0012] 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.

[0013] Desta forma, são necessários maiores estudos e

desenvolvimentos de biomateriais na forma de géis e fibras para que esses apresentem maior aplicabilidade dentro do campo da engenharia de tecidos, e, conseqüentemente, de materiais.

Sumário da Invenção

[0014] Dessa forma, a presente invenção tem por objetivo resolver os problemas constantes no estado da técnica a partir do desenvolvimento de fibras-géis obtidas a partir de uma blenda de polissacarídeos que podem ser utilizadas como membranas absorventes, *scaffolds* de cultura celular para aplicação em engenharia de tecidos, *drug deliveries*, sem, no entanto limitar-se a esses usos. Os polissacarídeos utilizados nesta invenção são o alginato e o ágar ou agarose.

[0015] O material apresentado, devido à sua composição e processo de fabricação, tem características fibrosas e intumescedoras, próprias de géis, e por isso, o mesmo foi denominado de fibra-gel. Esta nomenclatura já foi utilizada na literatura; contudo, as particularidades, ou seja, sua composição química conjuntamente com o processo de fabricação deste material não são encontradas na literatura.

[0016] A maior vantagem do uso dos ficocolóides, substâncias mucilaginosas extraídas de algas, compostas por polissacarídeos coloidais, é o seu comportamento líquido-gel em solução aquosa.

[0017] As fibras desta invenção tem basicamente a constituição destes polissacarídeos naturais, e o que se pretende é a formação de uma rede porosa, que tenha a característica de tecido maleável e biocompatível, como pode ser esperada destes géis. Contudo, esta estrutura fibrosa tridimensional deverá resistir mecanicamente aos esforços que ocorrerão de sua utilização como precursor para o crescimento de células, que mimetizarão a matriz extracelular e possivelmente proverão a vascularização de parte de um órgão ou tecido, ou mesmo, que o dê origem.

[0018] Outras características podem ser citadas referentes aos hidrogéis,

como o desenvolvido na presente invenção principalmente quanto a sua aplicação na engenharia de tecidos: são atóxicos, têm capacidade de intumescimento em fluidos biológicos e em água, têm consistência elastomérica, de forma a minimizar os efeitos do atrito sobre osteócitos vivos, têm alta permeabilidade aos fluidos corpóreos devido a alta porosidade, permitem a incorporação de fármacos de diferentes polaridades para liberação controlada de drogas (MOURA, 2005), além de serem altamente biocompatíveis, biodegradáveis e boa parte deles reconhecidos por moléculas biológicas (LIN e METTERS, 2006).

[0019] Como primeiro objeto, a invenção apresenta fibras-géis bioabsorventes constituídas de uma blenda dos polissacarídeos ágar ou agarose e alginato.

[0020] Como segundo objeto, a invenção apresenta o uso das fibras géis, conforme definidas no primeiro objeto, na aplicação da confecção de não tecidos para uso como recobrimentos de feridas e queimados; no uso como scaffolds de cultura celular para aplicação em engenharia de tecidos; no uso na constituição de absorventes higiênicos e fraldas descartáveis; uso dessas na constituição de fibras absorvíveis para reforço de materiais absorvíveis implantáveis; na utilização em sistemas de liberação controlada de fármacos e fatores de crescimento, tanto para feridas e queimados quanto para implantes; uso como barreiras de tecidos em odontologia e medicina; uso como absorventes de fluídos e hemóstase em cirurgias; uso como filtros de particulados; uso como membrana semipermeável e como adsorvente para tratamento de efluentes, e no uso como membranas bioabsorventes de constituintes e íons metálicos.

[0021] Como terceiro objeto, a invenção apresenta o processo de produção de fibras-géis, conforme definido no primeiro objeto, compreendendo as seguintes etapas:

a) Adição de uma solução aquosa dos polissacarídeos ágar ou agarose e alginato por meio do seu escoamento através de um orifício a uma

vazão constante até encontrar um meio polar, que se encontra em movimento rotacional com a formação de um vórtex, para que ocorra a formação das fibras;

b) Após a formação das fibras, incorporação de aditivos que proporcionem a modificação da morfologia das fibras ou o tamanho das cadeias;

c) Retirada das fibras-géis do meio polar e posterior lavagem dessas com cloreto de cálcio, a fim de gelificar o restante do alginato presente;

d) Filtração das fibras para a retirada do máximo de solução alcoólica e lavagem dessas com uma solução de agente reticulante, no caso do uso para produtos antissépticos.

e) Congelamento destas fibras, para conseguinte liofilização.

[0022] Ainda, o conceito inventivo comum a todos os contextos de proteção reivindicados é o desenvolvimento das fibras-géis constituídas de alginato e ágar ou agarose e uso deste material como biossorvente.

[0023] 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

[0024] Com o intuito de melhor definir e esclarecer o conteúdo do presente pedido de patente apresentamos abaixo as figuras:

[0025] A figura 1 mostra um gráfico das medias de densidade volumétrica de amostras em formato circular dos grupos G2, G3 e G4 em uma solução 2% de cloreto de cálcio, nas proporções 1:1 de cada polissacarídeo.

[0026] A figura 2 mostra um gráfico comparativo com os valores de densidade das fibras do grupo G1 e das fibras retangulares.

[0027] A figura 3 mostra um gráfico comparativo entre os valores de porosidade do grupo G1 para as duas medidas de porosidade por Arquimedes

e pela ASTM F2450-10 (“porosidade volumétrica”).

[0028] A figura 4 mostra um gráfico comparativo entre os valores de porosidade obtidos pelo método de Arquimedes, para fibras produzidas em uma solução aquosa a 2% (50% alginato - 50% ágar), desidratadas com álcool a temperatura de 1 °C ou 19 °C, reticuladas com cloreto de cálcio a 1% ou a 2%, por 2 ou por 10 minutos.

[0029] A figura 5 mostra um gráfico com os valores das quadruplicatas da corrida eletroforética na fibra 2% 50% AG bacter. - 50% AL e triplicata para o gel 2% 50AG 50% AL.

[0030] A figura 6 mostra um gráfico com os valores de inchamento do grupo G1.

[0031] A figura 7 mostra um gráfico comparativo entre os valores de inchamento ao longo do tempo, para fibras de formato circular.

[0032] A figura 8 mostra um gráfico com a média das 8 medidas de viscosidade de solução aquosa de alginato de sódio a 2% nas temperaturas 40, 60 e 80 °C, a 10 rpm.

[0033] A figura 9 mostra as medidas de viscosidade obtidas para a solução aquosa de ágar 2% a 40 °C, em diferentes velocidades de rotação.

[0034] A figura 10 mostra as medidas de viscosidade obtidas para a solução aquosa de ágar 2% a 60 °C, em diferentes velocidades de rotação.

[0035] A figura 11 mostra as medidas de viscosidade obtidas para a solução aquosa de ágar 2% a 80 °C, em diferentes velocidades de rotação.

[0036] A figura 12 mostra a média dos valores de viscosidade obtidos para a solução da blenda polimérica 2% (50% alginato - 50% ágar), nas temperaturas 40. 60 e 80 °C, em diferentes velocidades de rotação.

[0037] A figura 13 mostra a média dos valores de viscosidade obtidos para a solução da blenda polimérica 2% (50% alginato - 50% ágar), nas temperaturas 40. 60 e 80 °C, nas velocidades de rotação 10, 20 e 30 rpm.

[0038] A figura 14 mostra imagens de microscopia eletrônica das fibras-géis formadas a partir de uma solução aquosa a 2%, com diferentes

proporções de polissacarídeos da blenda, sendo as imagens com legenda A e B) correspondentes a fibras 2% (40% alginato, 60% agar), e C e D correspondentes a fibras 2% (60% alginato, 40% agar).

[0039] A figura 15 mostra uma fotografia do aspecto das fibras formadas a partir de solução aquosa de 2% de polissacarídeos nas proporções 40% alginato: 60% ágar, para a imagem A; e 60% alginato: 40% ágar, para a imagem B.

[0040] A figura 16 mostra a fotografia das amostras em forma de tecido produzidas a partir de solução 2% de polissacarídeos, 50% alginato - 50% ágar, utilizando os agentes gelificante e reticulador, cloreto de cálcio e gluteraldeído, respectivamente. Na imagem com a legenda A), foi utilizado gelificante 2% e reticulador (0,25%); já na imagem com a legenda B) não foi utilizado o gelificante, somente 0,25% de gluteraldeído.

[0041] A figura 17 mostra imagens de microscopia eletrônica das fibras obtidas a partir de uma solução 2% de polissacarídeos, 50% alginato - 50% ágar, utilizando gelificante e reticulador gluteraldeído.

[0042] A figura 18 mostra um detalhe da imagem de microscopia eletrônica das fibras obtidas a partir de uma solução 2% de polissacarídeos, 50% alginato - 50% ágar, utilizando gelificante e reticulador gluteraldeído.

[0043] A figura 19 mostra fotografias de amostras de fibras produzidas a partir de solução 2% de polissacarídeos, 50% alginato - 50% ágar, gelificadas em solução aquosa de cloreto de cálcio 2%. Sendo a imagem de legenda A) correspondente à amostra sem reticulador tanino, e a imagem de legenda B) correspondente à amostra com reticulador tanino 2%, 40 °C.

[0044] Figura 20 mostra resultados de citotoxicidade pelo método indireto para amostras de diferentes concentrações e mesmo método de obtenção e reticulação.

[0045] Figura 21 mostra os resultados de citotoxicidade pelo método indireto para as amostras 2%, 50% ag - 50% al, utilizadas no teste de reticulante.

[0046] Figura 22 mostra os resultados de citotoxicidade pelo método direto para amostras de diferentes concentrações e mesmo método de reticulação e fabricação.

[0047] Figura 23 mostra os resultados de citotoxicidade pelo método direto para as amostras 2%, 50% ag - 50% al, utilizadas no teste de reticulante.

Descrição Detalhada da Invenção

[0048] A presente invenção descreve o desenvolvimento de fibras-géis a partir de uma blenda de polissacarídeos, sendo estes alginato e ágar ou agarose, de forma que este objeto possa ser utilizado como membranas absorventes, *scaffolds* de cultura celular para aplicação em engenharia de tecidos, *drug deliveries*, sem, no entanto limitar-se a esses usos.

[0049] Em um primeiro objeto, a presente invenção apresenta fibras-géis bioabsorventes constituídas de ágar ou agarose e alginato.

[0050] Em uma concretização, o alginato é alginato de sódio ou alginato de cálcio.

[0051] Em uma concretização, a blenda de polissacarídeos contém pelo menos 40% de alginato de sódio em sua composição.

[0052] Em um segundo objeto, a presente invenção apresenta o uso das fibras-géis, definidas no primeiro objeto, compreendendo a sua aplicação e uso na confecção de não tecidos para uso como recobrimentos de feridas e queimados; como *scaffolds* de cultura celular para aplicação em engenharia de tecidos; na constituição de absorventes higiênicos e fraldas descartáveis; na constituição de fibras absorvíveis para reforço de materiais absorvíveis implantáveis; em sistemas de liberação controlada de fármacos e fatores de crescimento, tanto para feridas e queimados quanto para implantes; como barreiras de tecidos em odontologia e medicina; como absorventes de fluídos e hemóstase em cirurgias; como filtros de particulados; como membrana semipermeável e como adsorvente para tratamento de efluentes, e como membranas bioabsorventes de constituintes e íons metálicos.

[0053] Em um terceiro objeto, a presente invenção apresenta o processo de produção das fibras-géis definidas no primeiro objeto, que compreendem as seguintes etapas:

a) Adição de uma solução aquosa dos polissacarídeos ágar ou agarose e alginato por meio do seu escoamento através de um orifício a uma vazão constante até encontrar um meio polar, que se encontra em movimento rotacional com a formação de um vórtex, para que ocorra a formação das fibras;

b) Após a formação das fibras, incorporação de aditivos que proporcionem a modificação da morfologia das fibras ou o tamanho das cadeias;

c) Retirada das fibras-géis do meio polar e posterior lavagem dessas com cloreto de cálcio, a fim de gelificar o restante do alginato presente;

d) Filtração das fibras para a retirada do máximo de solução alcoólica e lavagem dessas com uma solução de agente reticulante, no caso do uso para produtos antissépticos.

e) Congelamento destas fibras, para conseguinte liofilização.

[0054] Em uma concretização, o meio polar da etapa a) é o meio alcoólico etanol 99%, a temperatura do meio alcoólico utilizado é mais baixa do que a solução polimérica, compreendendo a faixa entre -4 °C e 10 °C, e a proporção entre os polissacarídeos - ágar ou agarose e alginato de sódio - na solução adicionada ao meio alcoólico compreende uma viscosidade suficiente que permita o seu escoamento através de um orifício.

[0055] Em uma concretização, a velocidade de rotação do meio polar da etapa a) compreender o intervalo entre 300 rpm e 500 rpm.

[0056] Em uma concretização, os aditivos acrescentados à blenda na etapa b) compreendem os aditivos selecionados do grupo de glicerol, polietileno glicol, peróxido de hidrogênio, ácido itacônico, poli(óxido de etileno) e álcool polivinílico.

[0057] Em uma concretização, a solução de cloreto de cálcio utilizada na

etapa c) apresenta concentração entre 1 % a 2% e permanece em contato com as fibras-géis em um intervalo de 2 a 10 minutos.

[0058] Em uma concretização, a solução de agente reticulante é uma solução de tanino a 2 %.

[0059] Em uma concretização, a temperatura de congelamento da etapa e) é por volta de -20 °C.

[0060] Definições de termos e discussão de particularidades:

Alginato de sódio

[0061] Composto químico de fórmula química empírica: $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$, é um polissacarídeo encontrado em algas marinhas marrons, formando de 30% a 60% da constituição de suas paredes celulares. O primeiro a analisar e denominar a substância como ácido algínico foi o Dr. E.C.C. Standford, cientista escocês, que em 1883 descobriu que o alginato era um polímero linear composto de ácido 1,4 β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G). Estes dois ácidos são estereoquimicamente diferentes e dependendo dos tipos de espécies de algas, a proporção entre M e G varia consideravelmente, resultando em diferenças nas propriedades físicas dos produtos obtidos.

[0062] Os alginatos têm a característica de formarem géis e servirem como espessantes principalmente na indústria alimentícia. Atualmente, outras aplicações têm sido estudadas extensivamente devido a sua compatibilidade tecidual, que inclui regeneração de tecidos de pele, cartilagem, ossos, fígado e coração (BHATTARAI et al., 2006; HASHIMOTO et al., 2004; LI et al., 2005; ALSBERG et al., 2001; YANG et al., 2001; DAR et al., 2002).

Ágar ou Agar-ágar

[0063] É um polissacarídeo heterogêneo linear, formado por dois tipos de polissacarídeos: a agarose e a agarpectina. A agarose é a fração geleificante, formada por cadeias alternadas de β -1,3 D-galactose e α -1,4 3,6-anidro-L-galactose, essencialmente livres de cargas sulfatadas, enquanto que a

agaropectina é a fração não-geleificante do ágar, formada por agarose e porcentagens variadas de éster sulfato, ácido D-glucurônico, além de pequenas quantidades de ácido pirúvico, que dependendo do tipo de algas marinhas, são encontrados em diferentes proporções na constituição da agaropectina. Essencialmente pode-se dizer que a agarose e a agaropectina se diferem pela presença de constituintes piruvato e de sulfato respectivamente. O conteúdo de sulfato confere maior resistência aos géis formados, enquanto que o conteúdo de piruvato tem a função de degradar aminoácidos, regulando os processos metabólicos.

[0064] O ágar é um material com grande potencial para utilização como *scaffold* para engenharia de tecidos, já que se trata de um polissacarídeo hidrofílico, que possibilita a transferência de massa (nutrientes e metabólitos) através de seu meio, é biocompatível, é utilizado extensivamente na indústria alimentícia, farmacêutica, em cultivos celulares, em análises de eletroforese, possui baixa taxa de degradação em meios aquosos (Bao et al, 2008), é inerte à células mamíferas (Nisbet et al, 2008 apud Lewitus et al, 2011), é não aderente celular (Rago et al, 2008 apud Lewitus et al, 2011), pode ser “funcionalizado”, pois contém hidroxilas em sua cadeia possibilitando a incorporação de grupamentos, como proteínas, peptídeos e glicogênio ao longo dela, além de formar géis porosos (Pernodet et al, 1997 apud Lewitus et al, 2011).Dentre as vantagens apresentadas por este material, destaca-se o fato deste não Devido à estrutura de dupla hélice do ágar, a água fica retida em seus interstícios por pontes de hidrogênio, aumentando o volume da estrutura do gel e tornando-o termo-reversível. Dentre os hidrocolóides é um dos poucos que não necessita de um agente facilitador iônico que promova a geleificação, como ocorre com o alginato de sódio que requer um cátion divalente, como por exemplo, ocorre quando da utilização de cloreto de cálcio; contudo a adição de sais pode auxiliar no processo de junção das hélices formadas, bem como o tipo de solvente ou taxa de resfriamento (Viebke, Christer, 1994).

[0065] Com baixas concentrações, próximas a 0,5%, e em temperaturas

moderadas, já é possível conseguir a formação de géis rígidos a partir do resfriamento de suas soluções aquosas.

[0066] A força de gel do ágar é influenciada pelos fatores de concentração, tempo, resfriamento ou cura, pH e conteúdo de açúcar. O pH afeta notadamente a força de gel do ágar: o decréscimo do pH diminui a força de gel. O conteúdo de açúcar também tem um efeito considerável sobre o gel, pois seu aumento resulta em um gel com maior dureza, porém com menor coesão.

[0067] Para o alginato, tem-se o modelo “caixa de ovos” para a formação do gel físico de alginato. Quando se adiciona cálcio à solução de alginato de sódio, ocorre a substituição total ou parcial dos íons sódio. As cadeias de unidades de ácido gulurônico atuam como um análogo bidimensional das caixas de ovos, com interstícios nos quais os íons cálcio podem empacotar e se coordenarem, ajudando a manter as moléculas de alginato juntas, resultando em uma estrutura gel.

[0068] Devido à característica de formação de géis permeáveis a algumas substâncias e com relativa flexibilidade é que se visualizou a possibilidade de utilizar estes hidrocolóides como *soft tissues*. O ágar já é utilizado para a separação de proteínas como o RNA e o DNA, bem como meio de cultivo para bactérias e fungos; e por isso, propõe-se sua utilização para a engenharia de tecidos. Contudo, as estruturas teciduais requerem composição de matriz extracelular, que só será desenvolvida se houver vazios (poros) em tamanho suficiente para que após a adesão das células às fibras, possa haver transferência de massa e movimento dos constituintes da matriz extracelular através dos vazios ou dos poros das fibras.

[0069] Dentre os usos potenciais do invento, mas não se limitando a estes, destacamos a utilização na confecção de não tecidos para uso como recobrimentos de feridas e queimados; uso como absorventes higiênicos e fraldas descartáveis; estruturas tridimensionais para crescimento de células e tecidos em engenharia de tecidos; uso de fibras absorvíveis para reforço de

materiais absorvíveis implantáveis; uso em sistemas de liberação controlada de fármacos e fatores de crescimento, tanto para feridas e queimados quanto para implantes; uso como barreiras de tecidos em odontologia e medicina; uso como absorventes de fluídos e hemóstase em cirurgia; uso como filtros de particulados; uso como membrana semipermeável; uso como adsorvente para tratamento de efluentes, visto que os biossorventes são os materiais que têm maior disponibilidade, aplicabilidade e menor custo para a sua utilização.

Exemplos -Concretizações

[0070] 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 I - Formação das fibras

[0071] O processo de formação das fibras-géis consiste na injeção de uma solução aquosa de polissacarídeos, mais precisamente o ágar (ou agarose) e alginato de sódio que tenha viscosidade suficiente a fim de permitir seu escoamento através de um orifício até encontrar um meio alcoólico (etanol, metanol, álcool isopropílico, ou outros álcoois).

[0072] Esta solução deve estar em movimento rotacional, formando um vórtex, que possibilite a desidratação e formação das fibras. A rotação do meio alcoólico pode ser efetuada por ação mecânica, adaptando impelidor de pás ou hélices, ou mesmo magneticamente, bem como por qualquer outra forma qualquer de agitação. A velocidade de rotação deve ser ajustada de forma que permita a formação de fibras, pelo estiramento destas no meio em agitação, estando tipicamente acima de 300rpm, de acordo com os experimentos já realizados. Observou-se que para a viscosidade estudada da blenda de polissacarídeos (dado ainda a ser medido), a rotação máxima deve ser menor que 500rpm.

[0073] À solução aquosa de ágar e alginato de sódio podem ser adicionados aditivos para modificação do polímero, como, por exemplo,

glicerol, polietileno glicol (co-solventes apolares), peróxido de hidrogênio, ácido itacônico (redutores de tamanho de cadeia), poli(óxido de etileno), álcool polivinílico (auxiliares de fiação) ou outros, de forma a modificar a morfologia das fibras ou o tamanho das cadeias, de forma a se obter diferentes faixas de viscosidade.

[0074] A inovação desta invenção em relação ao outro processo de patente também pode ser verificada na utilização de uma solução alcoólica com temperaturas abaixo de 10 °C até -4 °C. Esta amplitude térmica em relação à solução polimérica conferiu fibras com textura suave ao toque e mais flexíveis, devido a diferença na taxa de resfriamento das fibras e conseqüentemente formação das mesmas (foi verificado que a taxa de resfriamento dos géis modifica a sua estrutura: Aymard, P et al, 2001).

[0075] Após o processo de formação de fibras, as mesmas foram retiradas do meio alcoólico e lavadas em cloreto de cálcio, a fim de gelificar o alginato, convertendo total ou parcialmente o alginato de sódio em alginato de cálcio. Esta conversão de alginato de sódio em alginato de cálcio pode também ser feita no líquido em que é gotejada a solução de alginato de sódio, tipicamente sendo utilizado o nitrato de cálcio junto à solução alcoólica.

[0076] Testou-se se a temperatura do álcool (a 1 °e a 19 °C) e se o tempo de contato (a 2 min e a 10min) com soluções de cloreto de cálcio (a 1% e a 2% em solução aquosa), modificariam as características de porosidade das fibras (figura 4).

[0077] Após a lavagem, as fibras foram filtradas para que fosse eliminada o máximo da solução, e congeladas (de preferência por volta de -20°C), por no mínimo 01 dia, para depois serem liofilizadas.

[0078] Antes do congelamento também foi testado o tratamento com tanino para confecção de outro tipo de produto, com propriedades antissépticas e cujas fibras parecem estar mais unidas (mais reticuladas); contudo mais flexíveis e macias ao toque.

[0079] Foram obtidas soluções de alginato de sódio e ágar nas

concentrações de 1, 2 e 4% (w/v), nas seguintes proporções.

Tabela 1. Soluções de alginato de sódio e ágar.

Solução	Concentração alginato	Concentração ágar
1%	0%	100%
	10%	90%
	50%	50%
	20%	80%
	60%	40%
	40%	60%
2%	0%	100%
	10%	90%
	50%	50%
	20%	80%
	60%	40%
	40%	60%
4%	0%	100%
	10%	90%
	50%	50%
	20%	80%
	60%	40%
	40%	60%

Exemplo II - – Caracterização física

[0080] Foi observado que para as amostras de proporção de 100% de ágar, independentemente da concentração da solução (se 1%, 2% ou 4%), não é perceptível a formação das fibras.

[0081] A solução polimérica parece desaparecer na solução alcoólica. Também para as proporções de 10% e de 20% de alginato não foi possível a formação de fibras visivelmente; contudo, foi observada a formação de pequenos grãos dispersos na solução alcoólica, de modo que foi possível fazer a filtração destes, secá-los em liofilizador e a partir disso observá-los em microscopia eletrônica de varredura. Observou-se a formação de grânulos, sem forma definida, com medidas de superfície de 200 até 50 microns.

[0082] Somente foi observada a formação de estrutura fibrosa

macroscopicamente e microscopicamente para as concentrações estudadas acima de 50% de alginato na blenda, como observado na figura 9.

[0083] Foram escolhidas as fibras a 2% 1:1 para as seguintes análises por visualmente serem superficialmente mais porosas, e; portanto, mais adequadas para a utilização como *scaffolds*. Desta forma, foi possível inferir as medidas de comprimento e diâmetro mínimo das fibras, como sendo respectivamente, 30 μm e 2,5 μm .

Densidade real:

[0084] Seguiu-se a norma ASTM D792-08, para obtenção da densidade real de cada um dos constituintes utilizados para fabricação das fibras, e conseqüentemente através da especificação de produção de cada fibra, obteve-se também a densidade real das fibras (ps).

Densidade volumétrica/aparente

[0085] Para obtenção da densidade aparente (ou volumétrica) das amostras liofilizadas foram medidas as dimensões (espessura e diâmetro) e pesadas as amostras em formato circular (espessura média de 1.66 \pm 0.35, diâmetro: 15mm) das fibras 2% 1:1 (identificadas como G2, G3 e G4), de fibras do mesmo formato para diferentes especificações (identificadas como G1, conforme Tabela 2), em formato cilíndrico (7 corpos de prova: 30mm de comprimento e 14,5mm de diâmetro interno), com constituição 2% 1:1, 4%1:1 e 4% 60%- 40% de alginato de sódio e ágar, respectivamente, e em formato retangular (dimensões 10,60mm, 49mm e 4mm) à concentração a 4%, com as proporções de 50%-50% e de 60%- 40% de alginato de sódio e ágar, respectivamente.

Tabela 2. Concentrações e proporções das fibras do grupo G1

n° amostra	Característica da solução	Características do processamento	
		Temperatura de aquecimento (aquec.) e injeção(inj.) da solução	Temperatura da solução alcóolica

1	2% 1:1	aquec. 80 °C, inj 40 °C	4 °C
2	2% 1:1	aquec. 80 °C, inj 40 °C	4 °C
3	2% 1:1	aquec. 80 °C, inj 40 °C	10 °C
4	2% 1:1	aquec. 80 °C, inj 40 °C	10 °C
11	2% 80% alginato : 20% ágar	aquec. 80 °C, inj 40 °C	10 °C
12	2% 80% alginato : 20% ágar	aquec. 80 °C, inj 40 °C	10 °C
13	2% 1:1, ágar bacteriológico	aquec. 80 °C, inj 40 °C	10 °C
14	2% 1:1, ágar bacteriológico	aquec. 80 °C, inj 40 °C	10 °C
17 A	4% 60% alginato : 40% ágar	aquec. 80 °C, inj 40 °C	20 °C
17 B	4% 60% alginato : 40% ágar	aquec. 80 °C, inj 40 °C	20 °C
19 A	2% alginato	aquec. 80 °C, inj 40 °C	20 °C
19 B	2% alginato	aquec. 80 °C, inj 40 °C	20 °C
22	2% 1:1	aquec. 80 °C, inj 40 °C	~25 °C
23	2% 1:1	aquec. 80 °C, inj 40 °C	~25 °C
24	2% 1:1	aquec. 60 °C, inj. 50 °C	~25 °C
25	2% 1:1	aquec. 60 °C, inj. 50 °C	~25 °C

[0086] Os resultados dos valores obtidos das amostras referentes a tabela 2, a densidade volumétrica das amostras em formato circular 2% 1:1, dos grupos G2, G3 e G4 são demonstrados na Figura 1. Já os resultados da densidade das fibras do grupo G1 e das fibras retangulares encontram-se na Figura 2.

Porosidade:

[0087] Foi utilizado o método de Archimedes (ASTM C-20) para medida de porosidade das amostras identificadas como G1 (com diferentes especificações conforme Tabela 2), de amostras em formato circular a 2% (50% ágar - 50% alginato) submetidas à desidratação em álcool a 1 °C e a 19 °C, variando o tempo de contato com o cloreto de cálcio a 1% e 2%, e das fibras em formato retangular na concentração a 4%, com as proporções de 50%-50% e de 60%- 40% de alginato de sódio e ágar, respectivamente. Também foi utilizado o método descrito na norma ASTM F2450-10 em que se pode estimar o percentual da porosidade para comparação.

[0088] Comparando os resultados da comparação entre valores de porosidade do grupo G1 para os dois métodos de medida de porosidade, como

demonstrado no gráfico da Figura 3, observa-se que os valores de porosidade volumétrica se distanciaram em muito daqueles verificados pelo método de Arquimedes. Uma das hipóteses para maiores porosidades obtidas por Arquimedes se deve ao fato de que o álcool utilizado era uma solução aquosa a 5%. Por conter água em solução, mesmo que minimamente, os valores podem estar superestimados, já que a água pode ter permeado para dentro da estrutura do hidrogel aumentando a massa durante os experimentos. Esta hipótese leva a crer que possa ter ocorrido modificação da microestrutura, já que as amostras que novamente passaram por congelamento e liofilização apresentaram uma pequena variação na segunda medida de porosidade, principalmente para as amostras nº 3 e 4. A única diferença entre estas amostras de mesma composição de fabricação das amostras 1 e 2, é a temperatura do álcool, que para 3 e 4 estava a 10 °C, enquanto para 1 e 2 a temperatura era de 4 °C.

[0089] Já os resultados de porosidade volumétrica apresentaram variações de até 5% do valor de porosidade para a maioria dos dados; ainda assim, variando até mais de 10% para as amostras 11 e 12 e 24 e 25.

[0090] Os resultados da Figura 4 mostram o impacto da temperatura de desidratação do álcool, bem como a concentração e o tempo de banho no cloreto de cálcio, sobre as porosidades das fibras de formato circular.

[0091] A temperatura do álcool em nada parece ter influenciado a porosidade das fibras. Entretanto, no que se refere à reticulação com cloreto de cálcio, percebe-se que, quanto maior tempo de contato com a solução, menores são os valores de porosidade das fibras. O que parece fazer sentido, já que a conformação “caixa de ovo” do alginato somente se estabelece através da atratividade dos íons cálcio para dentro da rede da blenda. Da mesma forma, quanto menor a quantidade de cátions disponíveis em solução (1% CaCl₂), mais tempo será necessário para uma maior reticulação.

[0092] Através deste experimento entende-se que é possível controlar a porosidade da fibra através do uso do reticulante.

[0093] Como comparativo, foram realizadas eletroforeses em fibras-géis e em géis, para demonstrar a diferença de permeabilidade.

[0094] Utilizou-se o marcador azul de bromofenol (3,3,5,5 - tetrabromofenolsulfonftaleína), que possui peso molecular de 670 Daltons, para medir a difusão desta molécula nas fibras-gel imersas em meio TAE para aplicação da eletroforese (100mV).

Tabela 3. Amostras para o experimento de eletroforese.

Tipo de amostra	Concentração/Proporção	Diâmetro da seringa de injeção da solução polissacarídica
Fibra liofilizada	2% 50% ágar bacteriológico - 50% alginato	1mm
Fibra liofilizada	2% 50% ágar - 50% alginato	1mm
Fibra liofilizada	2% 20% ágar bacteriológico - 80% alginato	1mm
Fibra liofilizada	2% 20% ágar - 80% alginato	1mm
Fibra liofilizada	2% 50% ágar - 50% alginato	0.5 mm
Gel	2% 50% ágar - 50% alginato	1mm
Gel	4% 50% ágar - 50% alginato	1mm
Gel	4% 40% ágar - 60% alginato	1mm

[0095] O experimento de eletroforese foi realizado durante 30 min, desde a injeção do marcador, em que a distância da corrida do marcador em direção ao cátodo (d_x) sobre os tipos de amostras, ou seja, a migração do marcador foi sendo acompanhada e depois medida com uma régua calibrada. A solução tampão utilizada, na qual as amostras foram mergulhadas, foi o TAE (Tris-Acetato-EDTA), que possui pH 8, e faz com que o bromofenol, que tem carga negativa, se direcione para o cátodo da cuba eletroforética.

[0096] O parâmetro que relaciona a distância que o bromofenol se desloca no tempo de 30 minutos, quando aplicado um potencial elétrico de 100 mV, na solução TAE, chama-se mobilidade eletroforética (U , m^2/Vs), que pode ser obtida dividindo a velocidade com que o marcador migra pelo gradiente de

campo elétrico (voltagem total/distância entre os dois intereletrodos, 100mV/0.21m) a que está submetido.

[0097] Através da aplicação da eletroforese verificou-se a permeabilidade do bromofenol no interior da estrutura dos géis e das fibras-gel, intumescidos com solução TAE. As seguintes amostras de: fibra 2% 50% ágar bacteriológico – 50% alginato, que foi medida em quadruplicata (4 amostras) e o gel a 2% 50% ágar- 50% alginato, que foi medido em triplicata (3 amostras), os resultados estão apresentados na figura 5, com os limites de controle: média +/- desvio padrão entre as quatro amostras. Na tabela 4 encontram-se os resultados de migração para cada tipo de amostra.

Tabela 4. Acompanhamento da permeabilidade do marcador bromofenol medida em "cm" para cada tipo de fibra ou gel.

Tipo	Concentração/Proporção	Diâmetro da seringa	Migração (cm)
fb	2% 50% ágar bacteriológico (AG.B.) - 50% alginato (AL)	1mm	1.1
fb	2% 50% ágar (AG) - 50% alginato (AL)	1mm	1.0
fb	2% 20% ágar bacteriológico (AG.B.) - 80% alginato (AL)	1mm	1.1
fb	2%20% ágar (AG) - 80% alginato (AL)	1mm	0.95
fb	2% 50% ágar (AG) - 50% alginato (AL)	0.5 mm	0.7
g	2% 50% ágar (AG) - 50% alginato (AL)	1mm	0.8
g	4% 50% ágar (AG) - 50% alginato (AL)	1mm	0.6
g	4% 40% ágar (AG) - 60% alginato (AL)	1mm	0.8

[0098] Qualitativamente pode-se dizer que houve alguma diferença entre géis e fibras, já que o marcador apresentou uma leve facilidade de permeabilidade nestas. Possivelmente isso se deve devido aos vazios presentes na estrutura tridimensionalmente fibrosa, que facilitam o preenchimento com a solução TAE, e inclusive um maior intumescimento das fibras-gel do que dos géis devido à própria estrutura macroscópica e possibilidade de expansão devido à maior área superficial das fibras. A solução aquosa penetra nos géis e nas fibras-gel, preenchendo com hidroxilas o interior

das moléculas helicoidais de ágar, fazendo com que as estruturas se expandem e auxiliem no desvio das cargas.

Inchamento

[0099] Foi medida a absorção das amostras identificadas como G1 e das amostras submetidas a diferentes parâmetros de temperatura de desidratação das fibras e reticulação das mesmas. Na Figura 6 seguem os valores obtidos para o grupo G1 em relação à capacidade de absorção de água destilada a 20 °C.

[0100] As pesagens das amostras úmidas foram realizadas a cada 30 minutos, durante 1 hora; contudo, nas três oportunidades verificou-se que praticamente o valor de inchamento variou muito pouco para cada amostra.

[0101] As únicas amostras que apresentam uma grande variação entre as pesagens são as amostras 17A e 17B e a n° 23. As primeiras têm concentração 4% e proporção 40% ágar e 60% alginato; enquanto, que a n° 23 tem a mesma constituição da n° 22, 2% (50% ágar – 50% alginato), que não apresentou grandes variações. Sobre a amostra n° 23 houve uma falha na estrutura da fibra fazendo com que a mesma se separasse em duas na última análise de inchamento, possivelmente corroborando para uma maior variabilidade.

[0102] Verifica-se que as amostras 19A e 19B, são aquelas que apresentaram os mais baixos valores de inchamento, uma média de 251%. Estas são aquelas em que somente alginato de sódio (2%) foi utilizado. Este comportamento demonstra que o alginato de sódio é um material pouquíssimo polar, de forma que as hidroxilas não penetram na conformação “caixa de ovo”, super reticulada. Ainda assim, os valores obtidos na dissertação são maiores do que os encontrados para outros *scaffolds* de alginato, como por exemplo, 91,83% (WANG ET AL,2011). Os maiores valores podem sugerir que a formação macroscópica, devido à injeção da solução polissacarídica, cria maiores porosidades, do que apenas o depósito da solução em um molde.

[0103] Para aquelas amostras em que se procurou verificar o impacto da temperatura de desidratação do álcool, bem como a concentração da solução reticuladora e o tempo de contato com os materiais, conforme seguem os resultados de inchamento na Figura 7.

[0104] Através desta figura percebemos que, conforme houve tempo disponível, água suficiente foi absorvida para alcançar valores de inchamento próximos de 700%.

[0105] Outro adsorvato utilizado foi o violeta cristal na forma cloreto (Vetec, CAS: 548-62-9), massa molar: $407,5 \text{ g mol}^{-1}$, em pH 9.

[0106] Este método consiste em cominuir a amostra adsorvente, preparar a solução com o adsorvato em específica concentração, e mantê-los em contato durante 24 horas, sob agitação e temperatura controlada de $35 \text{ }^\circ\text{C}$. Ou seja, foram realizados testes isotérmicos de sorção, com tempo de contato de 24 horas, a 156 rpm.

[0107] Foram pesados 0,03 g da amostra das fibras-géis secas, e preparados 50 ppm de solução de cada tipo de adsorvato. Foram realizadas as leituras de absorbância das respectivas soluções iniciais e finais, após o período de sorção.

Tabela 5. Resultados da adsorção de violeta cristal.

Solução	Absorção em 635 nm	Absorção do corante (%)
violeta cristal (50 ppm)	0,812	-----
Após sorção com fibra não moída	0,373	54
Após sorção com fibra moída	0,338	58

[0108] Os resultados demonstram percentual de remoção de cor de até 54% para fibra-gel não moída e até 58% de remoção de cor para fibra-gel cominuída.

Viscosidades

[0109] As viscosidades das soluções foram medidas e os resultados

mostraram-se diferentes entre os constituintes e a solução formada a partir deles.

[0110] Percebe-se que a solução aquosa a 2% de alginato apresenta um significativo decréscimo das medidas de viscosidade com o aumento da temperatura, como já era esperado para líquidos com características newtonianas. A Figura 8 demonstra a média das viscosidades de solução aquosa de alginato de sódio %, nas temperaturas 40, 60 e 80 °C, a 10 rpm.

[0111] Já para a solução aquosa de ágar a 2% é evidenciado um comportamento bem diferente. Os pontos plotados referentes ao alginato 2% foram obtidos através de leituras bem estáveis que durante 1 minuto permaneceram constantes aos parâmetros de medida (temperatura e rotação), apresentando desvios padrão não maiores do que 0.09 entre as medidas para cada condição. Entretanto, para as medidas de ágar a 2%, observou-se que não houve estabilidade na obtenção dos valores de viscosidade para as temperaturas de 60 °C e 80 °C, havendo continuamente um aumento da viscosidade. Assim sendo, na busca de uma condição estável para a medida da viscosidade, foi necessário que se medisse o parâmetro em diferentes velocidades (torque do spindle).

[0112] Primeiramente realizaram-se medidas a 40 °C, havendo possibilidade de medição apenas a 40 rpm. Entretanto, assim que a viscosidade foi aumentando, a necessidade de aumentar a velocidade por conta da escala do equipamento para cada faixa de viscosidades e rotações foi sendo necessária. Vê-se que somente a 100 rpm, a 40 °C, foi possível a obtenção de medidas de viscosidade que fossem mais estáveis, evidenciando uma baixa viscosidade (4cP), conforme observa-se na Figura 9.

[0113] Ao modificarmos a temperatura para 60 °C as medidas não permaneceram constantes para a velocidade inicial de 20rpm, saltando de uma média de 5 cP para 30 cP em torno de 13 minutos de acompanhamento das medidas. Isso indica que possivelmente conformações ou associações entre as moléculas estavam ocorrendo, já que certa resistência ao escoamento estava

sendo detectada pelo *spindle* do viscosímetro (aumentando a viscosidade), e necessitando a modificação do parâmetro de agitação (velocidade).

[0114] Ao aumentarmos a velocidade para 50 rpm, mantiveram-se estáveis as medidas, em torno de 10cP. Depois se optou por diminuir a escala para 10 rpm, e para a surpresa, foi possível de medir a viscosidade, sendo que esta aumentou significativamente, para algo em torno de 56 cP. Tais fenômenos podem ser observados no gráfico da Figura 10.

[0115] Já a 80 °C observa-se que o ágar 2% apresenta medidas estáveis a 10 e a 30 rpm; contudo, ao diminuir novamente a velocidade de rotação (para 20 e após para 10 rpm), continuamente a viscosidade aumentou, apesar de ocorrer de forma mais lenta do que a 60 °C. Suzuki et al (2011) verificou que para moléculas de agarose nas temperaturas entre 80 °C e 97 °C, as massas moleculares variavam de 1,5 a 5,5 x 10⁻⁵ e as viscosidades, de 4 para 14 cP. Os valores de viscosidade obtidos para a temperatura de 80 °C são realmente próximos aos encontrados na literatura, conforme indica a tendência na Figura 11.

[0116] Percebe-se que existe uma faixa de viscosidades para cada temperatura, e que dependendo da energia cinética empregada na agitação das soluções (rpm), mesmo que para temperaturas diferentes, a viscosidade pode equivaler-se. Na Figura 12 fica clara a repetitibilidade das medidas, após a troca de rotações, para cada temperatura.

[0117] Em relação às médias das medidas de viscosidade para cada temperatura em cada velocidade (10, 20 e 30 rpm), pode-se perceber que com o aumento da velocidade há o decréscimo na viscosidade, como era de se esperar (Figura 13).

[0118] O resultado inesperado foi o de obtermos uma viscosidade maior a 80 °C do que a 60 °C, já que para líquidos espera-se que quanto maior a temperatura, maior a energia cinética entre as moléculas, e conseqüentemente menor é o intervalo de tempo em que as forças intermoleculares são efetivas, resultando em uma diminuição da viscosidade (resistência devido ao atrito

interno das moléculas), mobilidade e expansão volumétrica. Pode-se inferir que na faixa de temperaturas entre 60 °C e 80 °C ocorre algum fenômeno que atrai mais as moléculas umas às outras, com o auxílio de energia calorífica (pelo aumento da temperatura), resultando em um aumento do atrito interno, ou seja, da viscosidade para estas situações. Algumas modificações de conformação ou mesmo quebra de ligações químicas poderão requerer mais energia para ocorrerem. Por isso, uma das hipóteses a considerar é que nesta faixa de temperatura pode ocorrer a polimerização entre o ágar e o alginato de sódio, ou entre as espécies umas com as outras.

[0119] De acordo com a literatura a temperatura de fusão do ágar é próxima de 100 °C, conforme Labropoulos et al 2002 apud Arnott et al, 1974; Dea et al, 1972 e Rees, 1972. Esta informação também corresponde aos estudos de outros autores, conforme Boral & Bohidar, 2009, a temperatura do fundido do ágar é próxima dos 85 °C; dependendo do tipo de ágar, concentração do gel e velocidade de mistura da solução, a faixa de fusão do ágar pode estar entre 77 e 86 °C, conforme Ross et al, 2006 apud Watase et al 1989; conforme estudos com diferentes tipos e origens de ágar, a temperatura fica acima de 80 °C (Lahrech et al, 2005 e Murano et al, 1992).

[0120] Já o aumento ou a diminuição da rotação apenas resultará, para qualquer temperatura, com que o intervalo de tempo em que ocorrem as forças intermoleculares seja maior ou menor, havendo variação da atividade entre as moléculas, ou seja, repercutindo na mudança de viscosidade. Esta mudança poderá impactará no grau de porosidade, permeabilidade e resistência dos géis de ágar, conforme Ross et al (2005).

[0121] Para uma mesma rotação, a variação da viscosidade é muito pequena (10% entre uma e outra temperatura), e pode ser considerada desprezível para a caracterização do fluido como não-newtoniano.

[0122] Comparando os resultados com aqueles obtidos por Suzuki, H. et al. (2001), em que relaciona viscosidades de diferentes origens de ágar com o peso médio molecular aparente, para soluções aquosas a 1,5%, a 60 °C e 30

rpm, pode-se inferir que os pesos moleculares das amostras deste estudo possam ser maiores do que 3×10^5 M.

[0123] Assim, a partir desta discussão, entende-se que o controle sobre as variáveis de mistura (velocidade) e do processo de gelificação é necessário, principalmente quando há a proposição de caracterizar as fibras-géis formadas.

[0124] Conforme Tako e Nakamura (1988 apud SUZUKI, H. et al., 2001) as moléculas de agarose adotam uma conformação randomicamente colóide acima de 60 °C, e entre 60 °C e 40 °C, pontes de hidrogênio intramoleculares à agarose são formadas, e abaixo de 40 °C, pontes de hidrogênio intermoleculares. Isso pode responder as mudanças de viscosidade que ocorreram subitamente a 60 °C.

Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

[0125] O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi do Centro de Microscopia Eletrônica (CME) da UFRGS um equipamento marca JEOL, modelo JSM-6060. As amostras foram cobertas com uma dupla fina camada de carbono via *sputtering* e a tensão aplicada foi de 10 kV. Para análise da amostra de tanino não foi utilizado recobrimento metálico, e a tensão de análise foi de 5kV.

[0126] Não foram encontradas diferenças morfológicas significativas entre o ágar e o alginato de sódio nas fibras compostas por estes, que indicassem grande diferença de heterogeneidade dos constituintes, corroborando para a ideia de que formaram uma blenda.

[0127] Também não foi detectada a formação de fibras, utilizando-se baixas proporções de alginato: 10% e 20% na mistura. Para 10% de alginato foram obtidas micropartículas sem formato específico com tamanho aproximado entre 100 e 200 microns, independentemente de aumentada a concentração. E para 20% de alginato na composição houve a formação de um aglomerado de micropartículas, uma espécie de placa, sem formação fibrosa.

[0128] Somente foi observada a formação de estrutura fibrosa

macroscopicamente e microscopicamente para as concentrações estudadas acima de 40% de alginato na blenda, conforme as Figuras 14 e 15.

[0129] Percebeu-se pouca diferença visual, nas imagens obtidas por MEV entre as fibras obtidas nas proporções: 60% alginato: 40% ágar e 40% alginato: 60% agar. Entretanto, pode-se dizer que as fibras com maior quantidade de alginato de sódio, parecem menos planas do que as outras e mais rugosas. Comparando com a morfologia das fibras para as concentrações 2% 50%-50%, pode-se dizer que aquelas com diferentes proporções entre os constituintes apresentam maiores superfícies planas do que cilíndricas.

[0130] Assim sendo, visando certa e necessária porosidade e permeabilidade das fibras utilizadas como *scaffolds*, optou-se por utilizar as fibras a 2% 50%-50% para os testes de engenharia de tecidos. Também para esta proporção foram testadas as condições dos agentes reticulador e gelificante na produção das fibras, e das porosidades e inchamento das fibras.

[0131] O efeito do glutaraldeído pode ser visto na Figura 16. Somente foi obtido um tecido bem tramado e o mais homogêneo possível na condição de utilização do cloreto de cálcio, apesar do uso do glutaraldeído. Na condição de somente utilizar o glutaraldeído percebe-se que as fibras se separam, contribuindo para a obtenção de conjuntos de fibras quebradiços.

[0132] Da mesma forma, foi testada a utilização do tanino como agente reticulador, devido ao seu uso como eficiente reticulante no curtimento do couro e devido as suas propriedades antisépticas, anteriormente já descritas nesta dissertação. Foi empregada uma solução aquosa de tanino a 2%, e a 40 °C, após a lavagem com cloreto de cálcio. O tanino mostrou ser um reticulante facilmente adsorvido nas fibras de alginato de sódio e ágar (2%, 50%-50%), conferindo certa suavidade ao toque do tecido; contudo, pouca diferença visual (e também por microscopia eletrônica de varredura) foi percebida quanto ao entrelaçamento das fibras, conforme demonstrado nas Figuras 17, 18 e 19.

[0133] Devido ao fato de que tanto o glutaraldeído como o tanino podem ser tóxicos em alguma proporção às células, e já havendo a toxicidade de

possíveis componentes do alginato de sódio, o desenvolvimento do estudo para a sua utilização não foi levado adiante.

[0134] Para a conformação das fibras em outros formatos, verificou-se que houve a necessidade da utilização de uma maior concentração de polissacarídeos em solução aquosa, do tipo 4%. Para a concentração 2%, houve redução nas dimensões das amostras gelificadas com cloreto de cálcio, logo após serem liofilizadas: 18% de encolhimento em relação ao seu comprimento inicial, 29% em relação a sua largura inicial e 38 % em relação a sua espessura inicial. E da mesma forma, verificou-se que as amostras que não foram reticuladas, ou seja, que não passaram pelo processo de lavagem com o cloreto de cálcio (N-L), variaram ainda mais significativamente as suas dimensões.

[0135] Realizando a reticulação das fibras fabricadas em maiores concentrações, e utilizando-se maior proporção em alginato, percebe-se um maior enovelamento das fibras, fazendo com que a trama da amostra fique mais fechada e menos suscetível a variações das dimensões do molde, após a liofilização.

[0136] Com o decorrer dos experimentos, concluiu-se que para fabricar amostras com dimensões, que não estejam suscetíveis a grandes mudanças de especificação e reproduzam a forma do molde utilizado, a utilização do ágar, que é um gel termoreversível, e muito mais higroscópico que o alginato de sódio, deve ser minimizada na constituição do material, a fim de evitar estas interferências de comportamento do ágar no material. Contudo há que se manter o mínimo quanto às propriedades do ágar que superam a utilização somente de alginato de sódio no biomaterial, como por exemplo, maior permeabilidade de íons, maior higroscopicidade e grande biocompatibilidade. Percebe-se que o alginato de sódio mantém as características físicas da amostra, já que não se trata de um material termoreversível e não é tão mais higroscópico quanto o ágar. Dessa forma, a utilização de uma solução aquosa a 4% de polissacarídeos, na proporção 40% de ágar e 60% de alginato

mostrou-se mais adequada para esta conformação.

[0137] 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.

Citotoxicidade

[0138] Foram realizadas as análises de citotoxicidade conforme a norma ISO 10.993-6:2009 utilizando-se tanto o método indireto, quanto o direto para as amostras da tabela 6, as amostras A, A', B, B', C e C' (figura 4) também foram testadas.

Tabela 6. Amostras testadas quanto a citotoxicidade com variação de concentração entre as fibras.

Especificação das fibras:	Nomenclatura utilizada para os testes de citotoxicidade
Fb 2%, 50% ag – 50% al, alc 20 °C, Lav 2% CaCl ₂	Agar – Alg (2:50:50) (W)
Fb 2%, 50% ag – 50% al, alc 20 °C, Lav 2% CaCl ₂ e 2% Tan	Agar – Alg (2:50:50) – Tan (W)
Fb 1%, 50% ag – 50% al, alc 20 °C, Lav 2% CaCl ₂	Agar – Alg (1:50:50)
Fb 2%, 60% ag – 40% al, alc 20 °C, Lav 2% CaCl ₂	Agar – Alg (2:60:40)
Fb 1%, 60% ag – 40% al, alc 20 °C, Lav 2% CaCl ₂	Agar – Alg (1:60:40)
Fb 2% al, alc 20 °C, Lav 2% CaCl ₂	Alg
Fb 2%, 50% ag – 50% al, álcool 19 °C, Lav 2% CaCl ₂ (2 min)	A
Fb 2%, 50% ag – 50% al, álcool 1 °C, Lav 2% CaCl ₂ (2 min)	A'
Fb 2%, 50% ag – 50% al, álcool 19 °C,	B

Lav 2% CaCl ₂ (10 min)	
Fb 2%, 50% ag – 50% al, álcool 1 °C, Lav 2% CaCl ₂ (10 min)	B'
Fb 2%, 50% ag – 50% al, álcool 19 °C, Lav 1% CaCl ₂ (2 min)	C
Fb 2%, 50% ag – 50% al, álcool 1 °C, Lav 1% CaCl ₂ (2 min)	C'

[0139] O objetivo da análise das amostras descritas na Tabela 6 foi verificar a influência da proporção de alginato sobre a citotoxicidade das fibras formadas, uma vez que possivelmente o alginato possa ser citotóxico.

[0140] O método indireto da análise de citotoxicidade consiste em manter o biomaterial em contato com o meio de cultura (DMEM - Meio Eagle Modificado por Dulbecco + 20% de soro fetal bovino), a 37 °C, sem agitação, por 24 horas, para depois extrair todo o líquido em que o biomaterial ficou imerso, e adicioná-lo a células vivas para o acompanhamento da citotoxicidade.

[0141] Já o método direto consiste em adicionar as células e o meio de cultura juntamente com o biomaterial, e incubar por 24h para o acompanhamento da citotoxicidade.

[0142] Os ensaios foram realizados por pesquisadores do laboratório de Células Tronco e Engenharia de Tecidos da Universidade Luterana do Brasil (Canoas, Brasil), utilizando células do tipo fibroblastos da linhagem L929 de murinos.

[0143] Para cada tipo de fibra e de método utilizado foram realizadas as análises de citotoxicidade em sextuplicatas.

[0144] Cada especificação de fibras foi cortada em tamanhos menores que 0.5 mm x 0.5 mm e colocadas em placas de cultivo de 96 poços com 104 células por poço (e volume médio de meio e células de 100 µL). Duas horas antes de alcançar às 24 horas de incubação das células com o líquido coletado do método indireto, ou das células e do meio junto ao biomaterial, o meio de

cultura foi removido e foi adicionado 50 µL de MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (1 mg/mL) para leituras de absorvância em ultravioleta em $\lambda = 570$ nm. Os resultados de citotoxicidade foram expressos em percentual com relação ao controle negativo (células em contato com DMSO – dimetil-sulfóxido), e relacionados com o controle positivo: células L929 cultivadas sem biomaterial em meio de cultura DMEM, 20% soro fetal bovino.

[0145] Os fibroblastos foram utilizados, pois são células derivadas do tecido conjuntivo, grandes, jovens, muito resistentes, e que se multiplicam rapidamente (MONTANARI, T., 2015) por isso, geralmente são utilizadas para os primeiros testes in vitro.

[0146] Os resultados de citotoxicidade para o método indireto referente aos biomateriais compostos por fibras de diferentes concentrações mostraram maior atividade celular do que os resultados das amostras com diferenças quanto ao teste de reticulante (cloreto de cálcio), conforme Figura 20 e Figura 21.

[0147] A Amostra Agar-Alg (2:50:50) - Tan (W) foi a única considerada citotóxica para os dois métodos, apresentando morte celular de até 69% e de 72% para o método indireto e para o direto, respectivamente, conforme Figura 20 e Figura 22. Quantidades de tanino já foram referidas na literatura (Chung et al, 1998 apud Monteiro et al, 2005) como citotóxicas, e o resultado evidencia isto.

[0148] De certa forma, comparando os resultados entre as amostras de diferentes concentrações, percebe-se que as fibras formadas somente a partir de alginato de sódio apresentaram menor atividade celular, porém não foram consideradas citotóxicas (Figura 20, Figura 22).

Reivindicações

1. FIBRAS-GÉIS BIOSSORVENTES **caracterizadas por** serem constituídas de uma blenda dos polissacarídeos ágar ou agarose e alginato
2. FIBRAS-GÉIS BIOSSORVENTES de acordo com a reivindicação 1, **caracterizadas pelo** alginato ser alginato de sódio ou alginato de cálcio
3. FIBRAS-GÉIS BIOSSORVENTES de acordo com a reivindicação 2, **caracterizadas por** compreenderem pelo menos 40% de alginato de sódio em sua composição
4. USO DAS FIBRAS GÉIS conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** serem aplicadas na confecção de não tecidos para uso como recobrimentos de feridas e queimados; como *scaffolds* de cultura celular para aplicação em engenharia de tecidos; na constituição de absorventes higiênicos e fraldas descartáveis; na constituição de fibras absorvíveis para reforço de materiais absorvíveis implantáveis; em sistemas de liberação controlada de fármacos e fatores de crescimento, tanto para feridas e queimados quanto para implantes; como barreiras de tecidos em odontologia e medicina; como absorventes de fluídos e hemóstase em cirurgias; como filtros de particulados; como membrana semipermeável e como adsorvente para tratamento de efluentes, e como membranas bioissorventes de constituintes e íons metálicos
5. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FIBRAS-GÉIS conforme definidas em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizado por** compreender as seguintes etapas:
 - a) Adição de uma solução aquosa dos polissacarídeos ágar ou agarose e alginato por meio do seu escoamento através de um orifício a uma vazão constante até encontrar um meio polar, que se encontra em movimento rotacional com a formação de um vórtex, para que ocorra a formação das fibras;
 - b) Após a formação das fibras, incorporação de aditivos que proporcionem a modificação da morfologia das fibras ou o tamanho das

cadeias;

c) Retirada das fibras-géis do meio polar e posterior lavagem dessas com cloreto de cálcio, a fim de gelificar o restante do alginato presente;

d) Filtração das fibras para a retirada do máximo de solução polar e lavagem dessas com uma solução de agente reticulante, no caso do uso para produtos antissépticos;

e) Congelamento destas fibras, para conseguinte liofilização

6. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FIBRAS-GÉIS de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelo** meio polar da etapa a) ser o meio alcoólico etanol 99%, pela temperatura do meio alcoólico utilizado ser mais baixa do que a solução polimérica, compreendendo a faixa entre -4 °C e 10 °C, e pela proporção entre os polissacarídeos (ágar ou agarose e alginato) na solução adicionada ao meio alcoólico compreender uma viscosidade suficiente que permita o seu escoamento através de um orifício

7. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FIBRAS-GÉIS de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pela** velocidade de rotação do meio polar da etapa a) compreender o intervalo entre 300 rpm e 500 rpm

8. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FIBRAS-GÉIS de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pelos** aditivos acrescentados à blenda na etapa b) compreenderem os aditivos selecionados do grupo de glicerol, polietileno glicol, peróxido de hidrogênio, ácido itacônico, poli(óxido de etileno) e álcool polivinílico

9. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FIBRAS-GÉIS de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pela** solução de cloreto de cálcio utilizada na etapa c) apresentar concentração de 1% a 2% e permanecer em contato com as fibras-géis em um intervalo de 2 a 10 minutos

10. PROCESSO DE PRODUÇÃO DE FIBRAS-GÉIS de acordo com a reivindicação 5, **caracterizado pela** solução de agente reticulante ser selecionada do grupo consistindo de uma solução de tanino a 2%, de uma solução de gluteraldeído, ou combinação das mesmas

FIGURAS

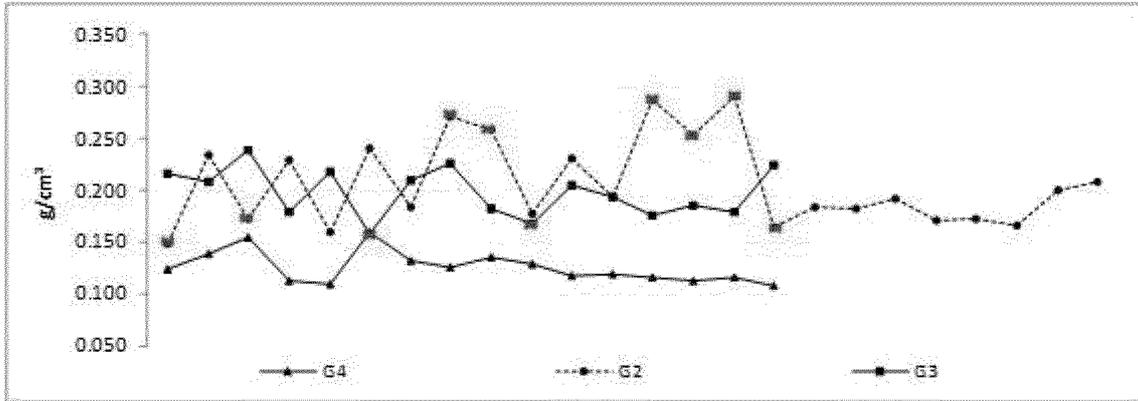


Figura 1

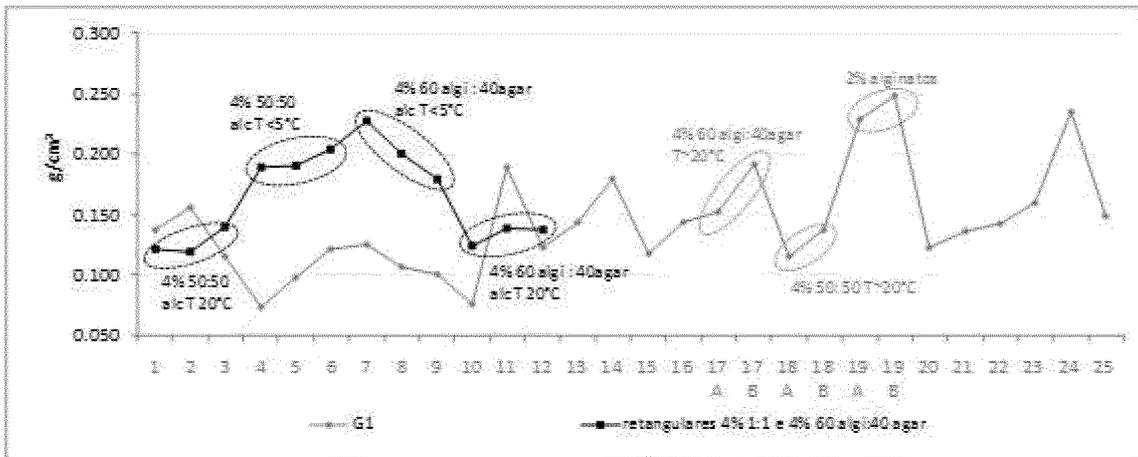


Figura 2

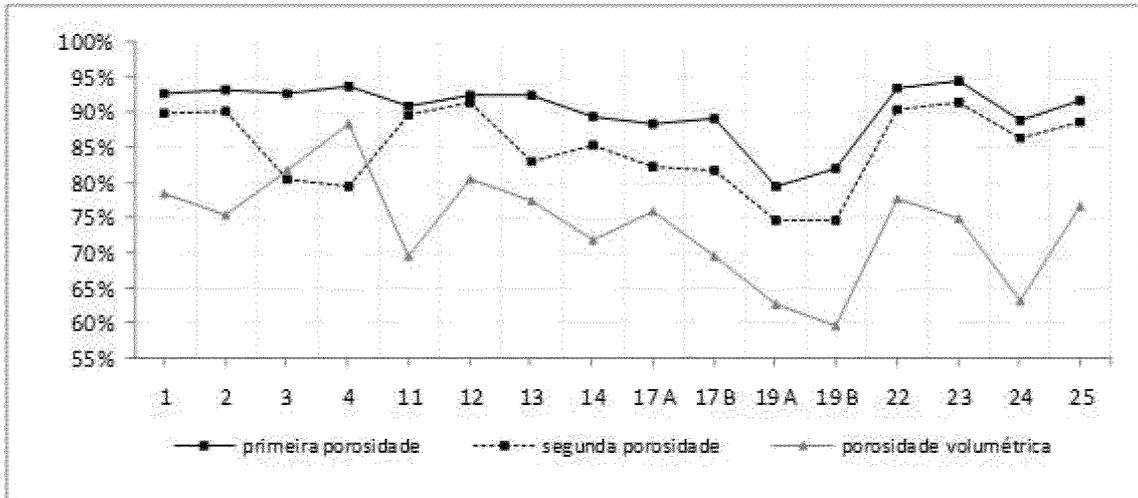


Figura 3

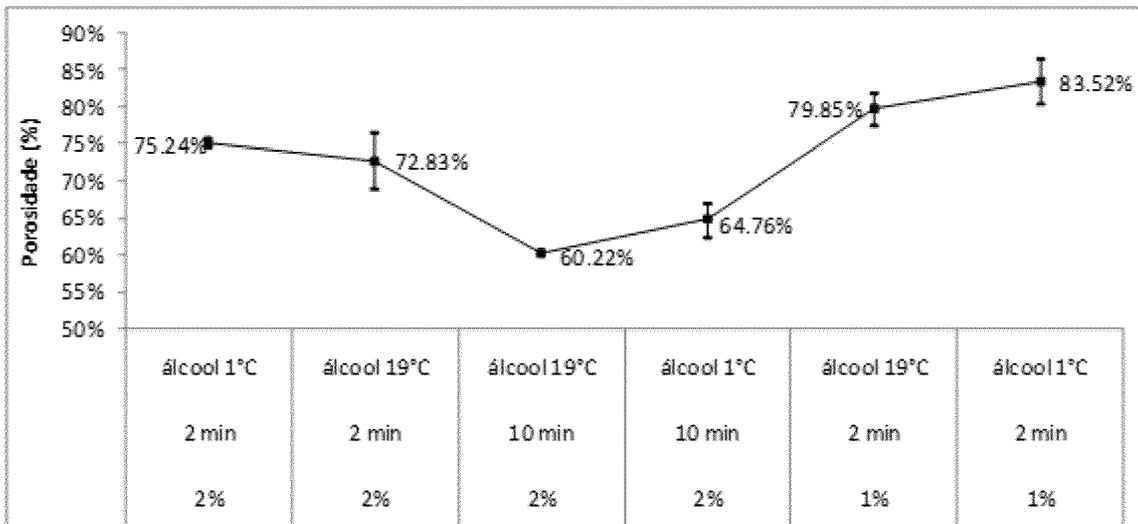


Figura 4

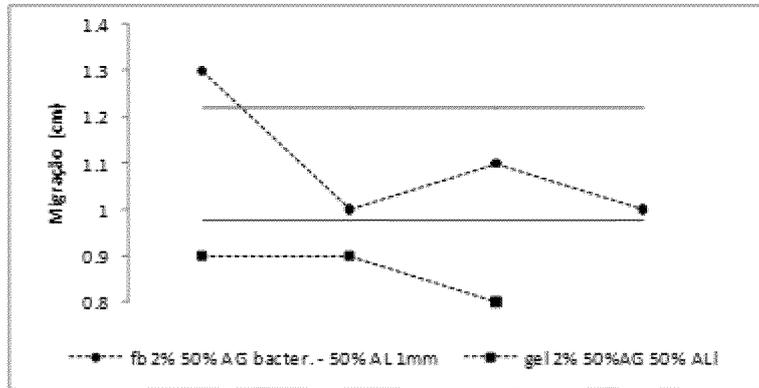


Figura 5

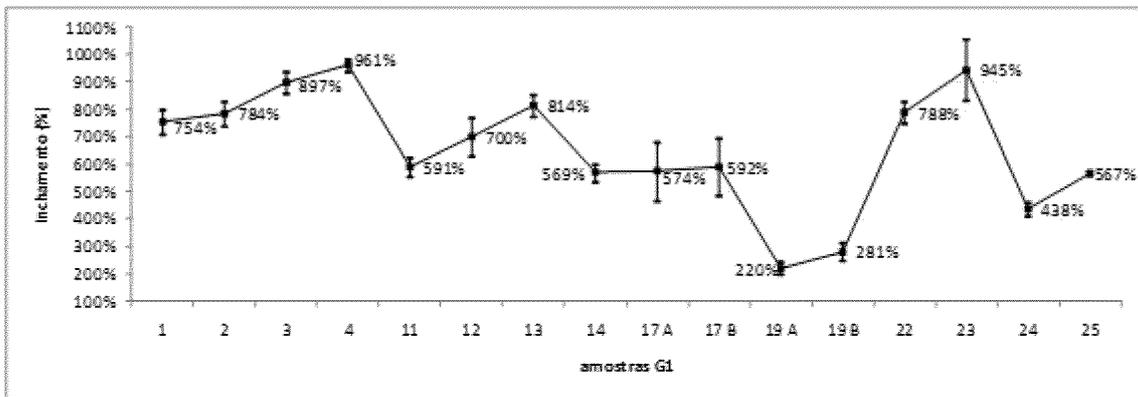


Figura 6

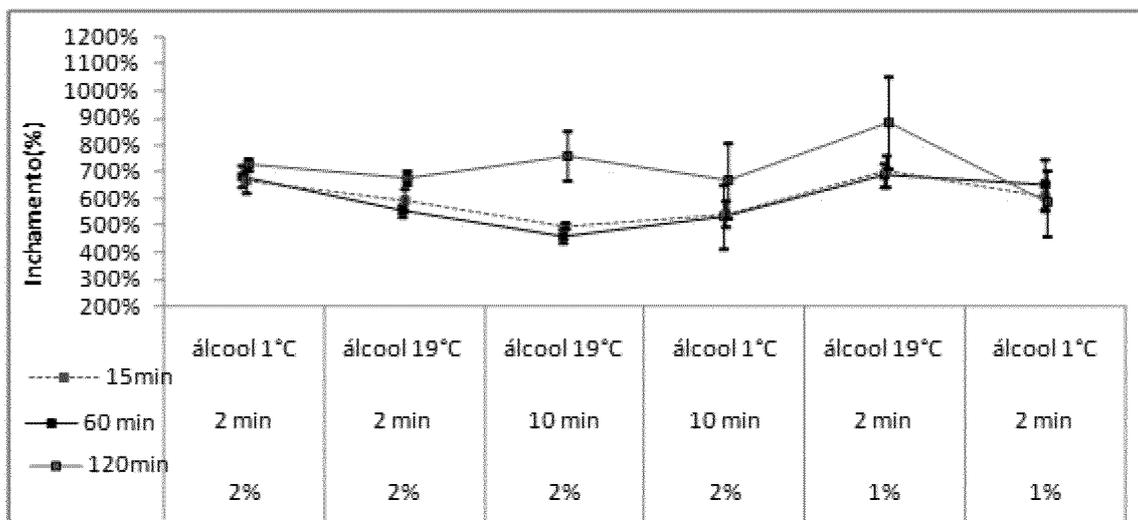


Figura 7

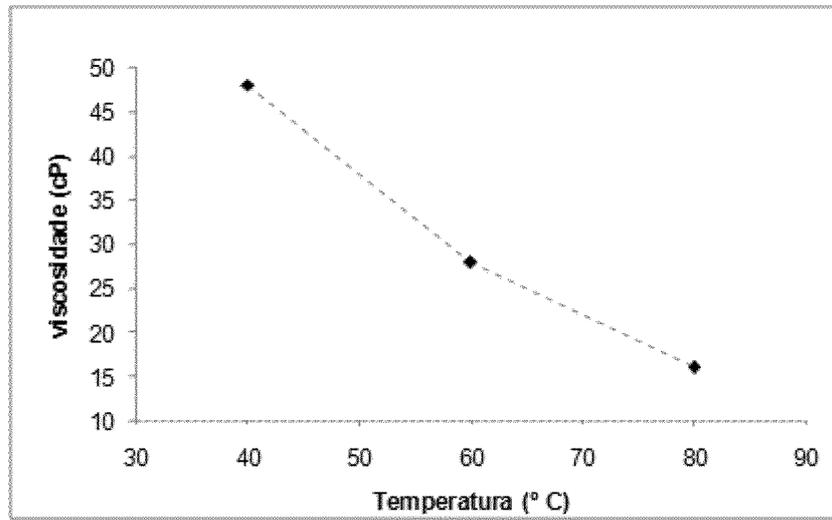


Figura 8

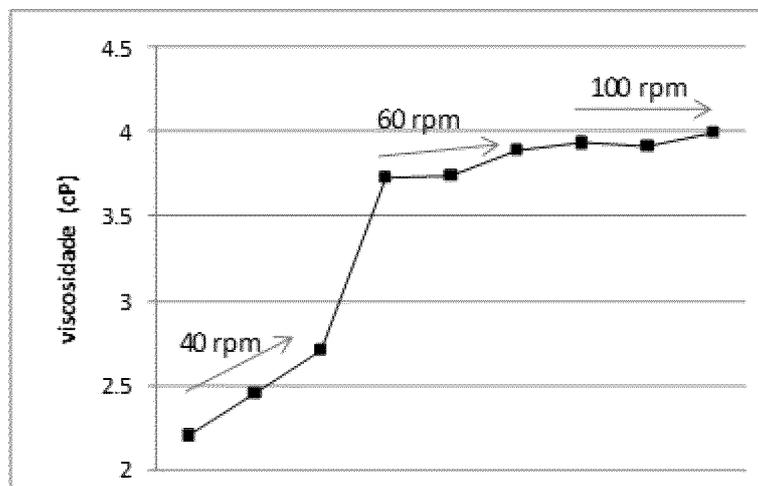


Figura 9

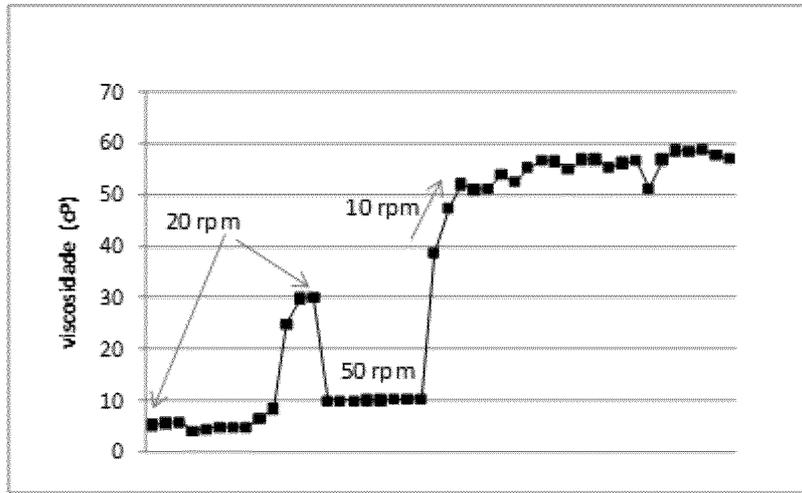


Figura 10

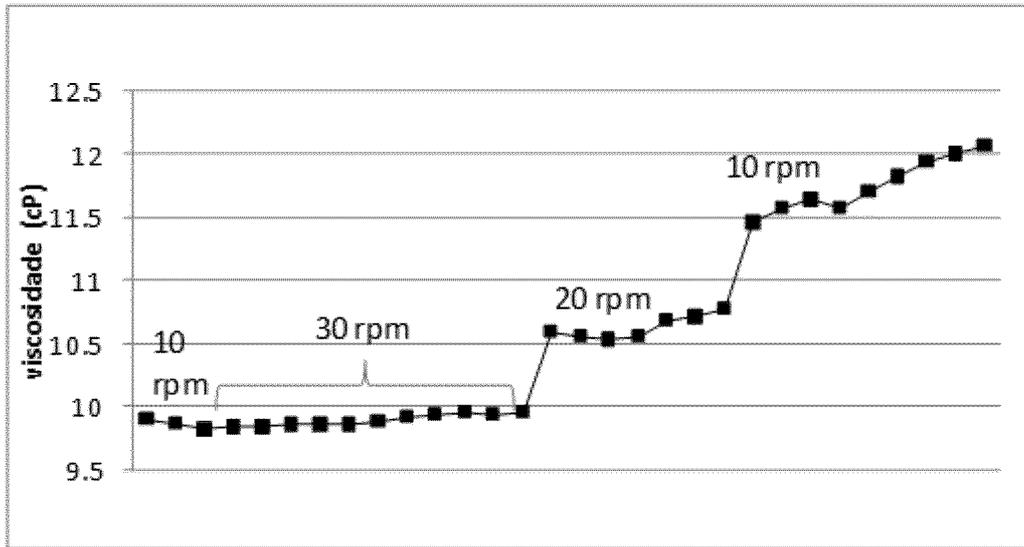


Figura 11

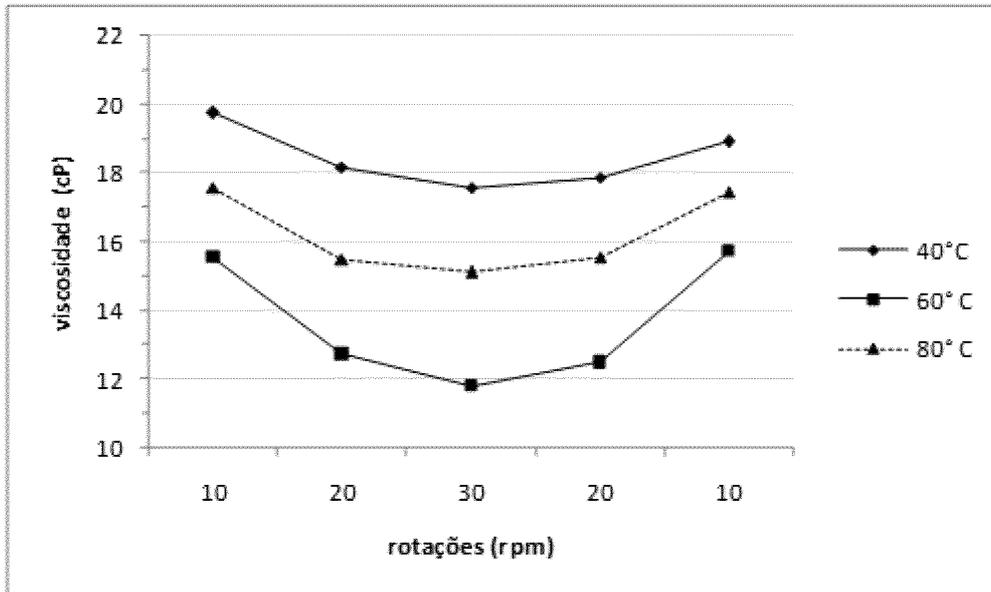


Figura 12

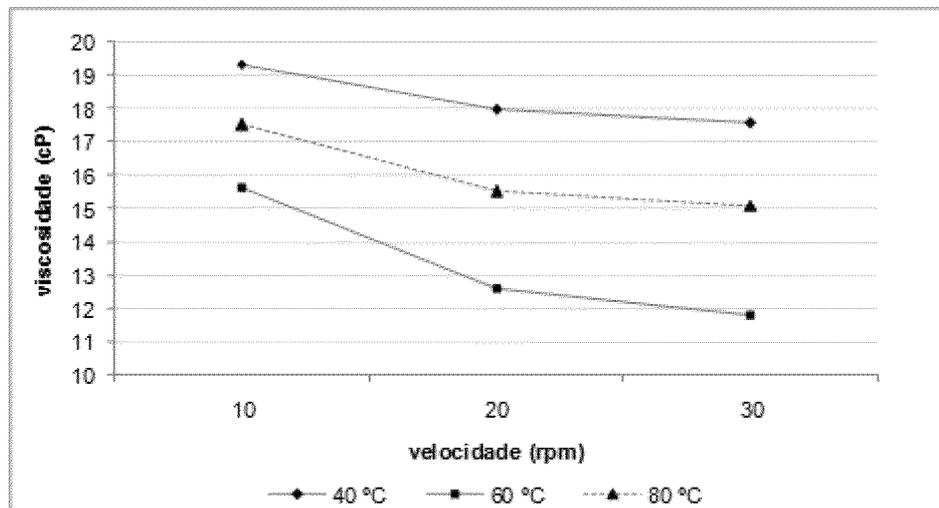


Figura 13

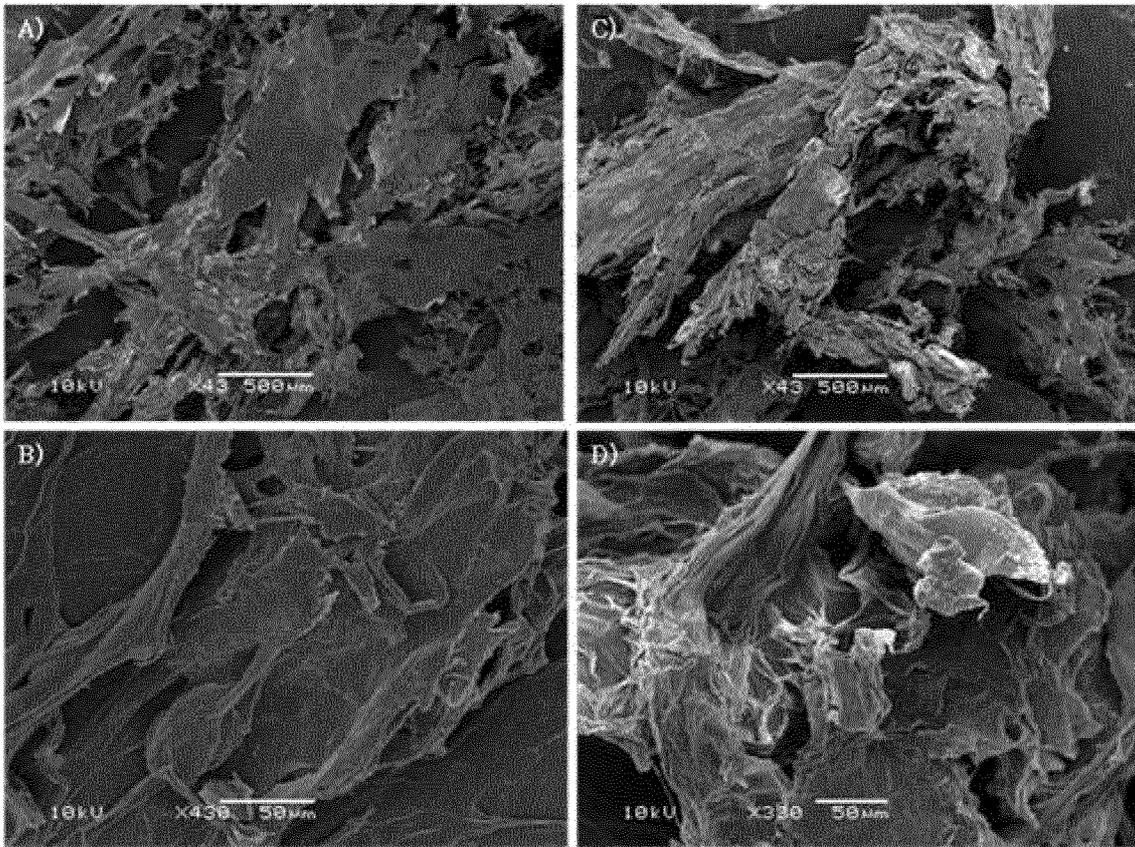


Figura 14

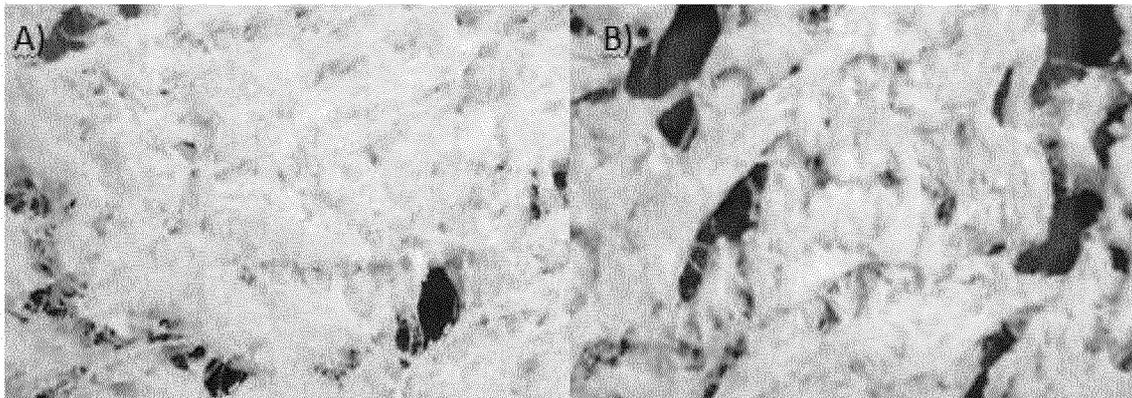


Figura 15

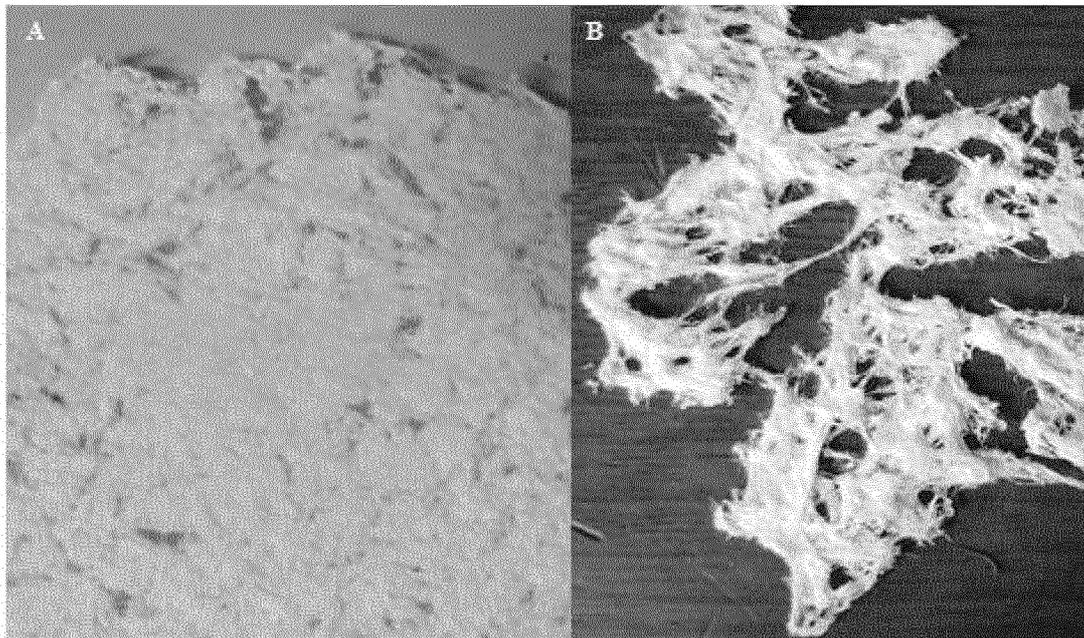


Figura 16

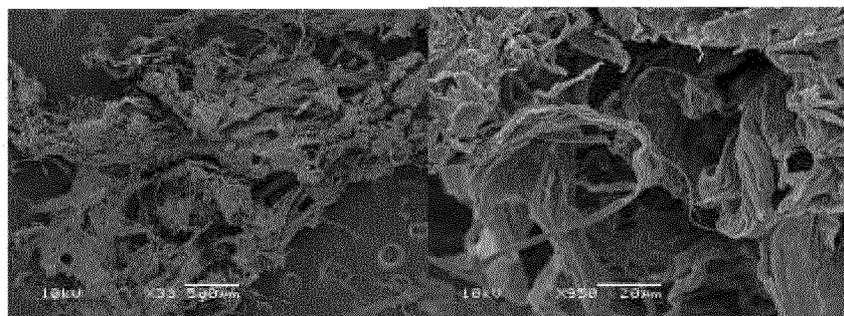


Figura 17

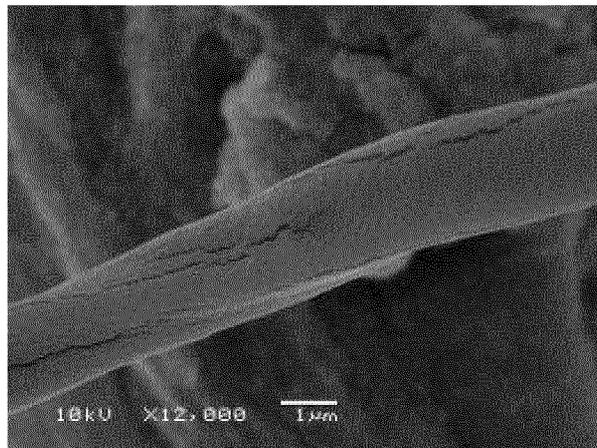


Figura 18

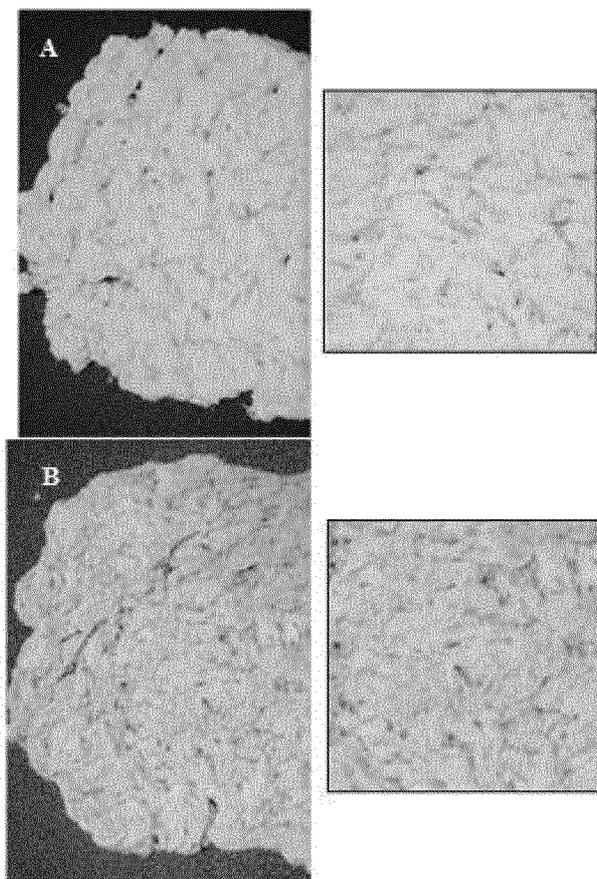


Figura 19

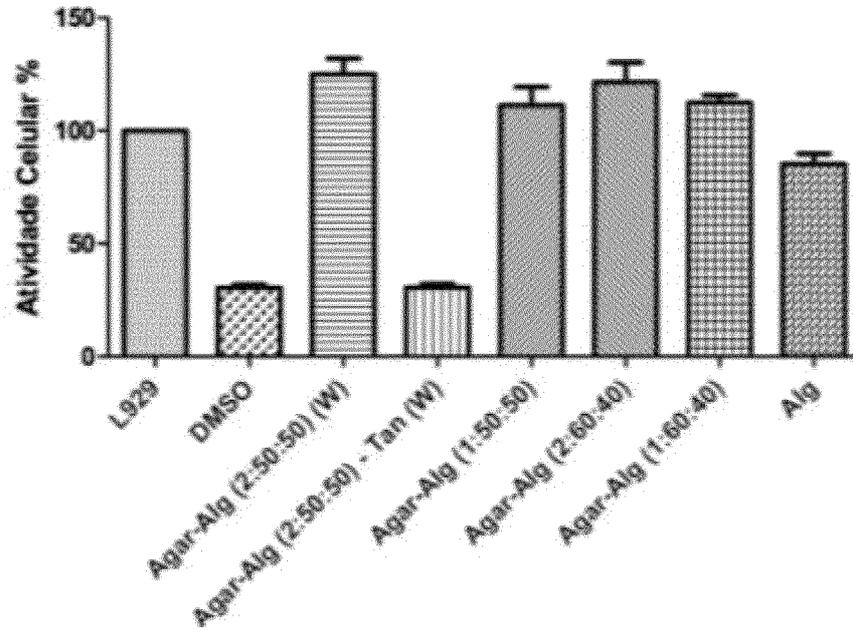


Figura 20

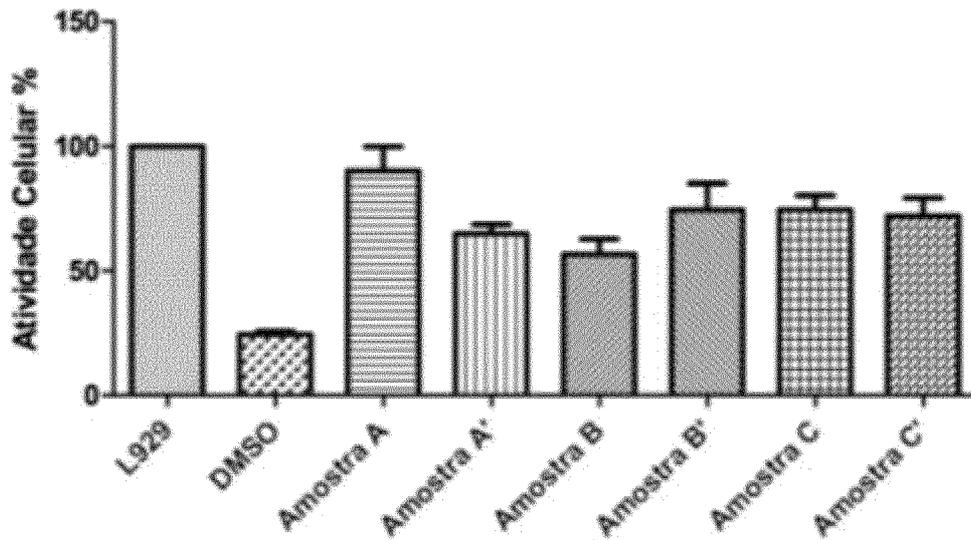


Figura 21

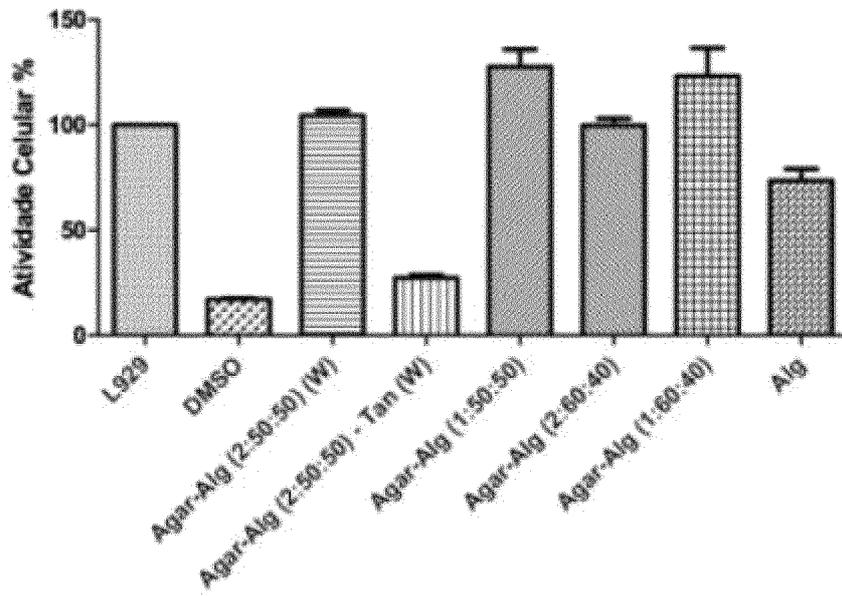


Figura 22

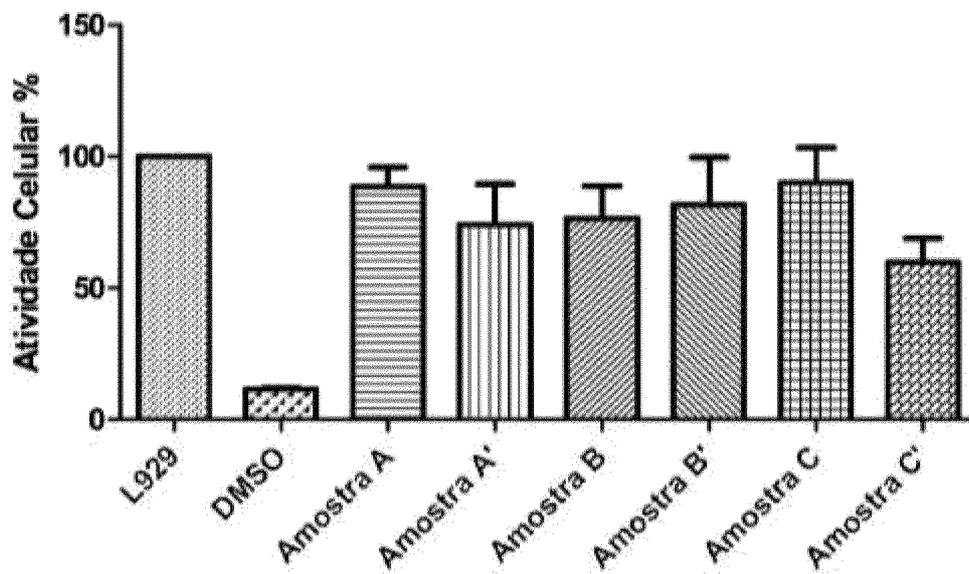


Figura 23

Resumo

FIBRAS-GÉIS BIOSSORVENTES, USO E PROCESSO DE PRODUÇÃO DAS MESMAS

A presente invenção refere-se à obtenção de um material, denominado como fibras-géis, composto por ágar (ou agarose) e alginato. Este material tem propriedades adsorventes, de forma que poderá ser utilizado na engenharia de tecidos, como *scaffold* (estrutura) para cultivo celular; em tratamento de efluentes e de emissões atmosféricas, como bioissorvente (adsorvente) de constituintes e íons metálicos; na agronomia, como material adsorvido de nutrientes para enxerto e plantio; na indústria como produtos de higiene (absorventes e fraldas), materiais de implantes, coberturas, adesivos bioabsorventes, dentre outros. A presente invenção se situa nos campos da Química, Farmácia, Engenharias de Materiais e Ambiental.