



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA ECONOMIA
INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL

CARTA PATENTE Nº BR 102014018509-7

O INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL concede a presente PATENTE DE INVENÇÃO, que outorga ao seu titular a propriedade da invenção caracterizada neste título, em todo o território nacional, garantindo os direitos dela decorrentes, previstos na legislação em vigor.

(21) Número do Depósito: BR 102014018509-7

(22) Data do Depósito: 28/07/2014

(43) Data da Publicação Nacional: 27/09/2016

(51) Classificação Internacional: C08F 283/00; C08F 2/02; C08F 220/20.

(52) Classificação CPC: C08F 283/00; C08F 2/02; C08L 2205/04; C08F 220/20; A61L 2430/00.

(54) Título: REDE SEMI-INTERPENETRANTE DE POLI 2-HIDRÓXIETILMETACRILATO-POLI ÁCIDO LÁCTICO, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E USO

(73) Titular: UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP, Pessoa Jurídica. CGC/CPF: 46068425000133. Endereço: Cidade Universitária Zeferino Vaz - Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP, BRASIL(BR), 13084-971, Brasileira; UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ, -. CGC/CPF: 34621748000123. Endereço: Rua Augusto Corrêa,1, Guamá, Belém, PA, BRASIL(BR), 66075-900, Brasileira

(72) Inventor: RUBENS MACIEL FILHO; MARCELE FONSECA PASSOS.

Prazo de Validade: 20 (vinte) anos contados a partir de 28/07/2014, observadas as condições legais

Expedida em: 12/01/2021

Assinado digitalmente por:

Liane Elizabeth Caldeira Lage

Diretora de Patentes, Programas de Computador e Topografias de Circuitos Integrados

**REDE SEMI-INTERPENETRANTE DE POLI 2-HIDRÓXIETILMETACRILATO-
POLI ÁCIDO LÁCTICO, SEU PROCESSO DE PRODUÇÃO E USO**

CAMPO DA INVENÇÃO

[1]A presente invenção trata-se de uma rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxiethylmetacrilato-poli ácido láctico (PHEMA-PLA) que compreende o polímero PLA entrelaçado na rede do polímero PHEMA, seu processo de produção e uso.

[2]A presente invenção pertence ao campo dos biomateriais poliméricos úteis ao cultivo celular.

ESTADO DA TÉCNICA

[3]A síntese e caracterização de biomateriais para aplicações médicas, nos últimos tempos, vêm integrando diversas áreas científicas. Biólogos, físicos, químicos, farmacêuticos, engenheiros e médicos buscam, incessantemente, satisfazer as condições fisiológicas e anatômicas de órgãos e/ou tecidos danificados. Para isso, estudam materiais de origem natural, tal como o colágeno e a elastina, assim como materiais de origem artificial, como por exemplo, metais, cerâmicas e polímeros. Independente da natureza, estes materiais devem satisfazer critérios de biocompatibilidade e baixo índice de rejeição após implantados.

[4]Atualmente, muita ênfase é dada aos polímeros sintéticos. A versatilidade, as propriedades físicas e

mecânicas, a resistência à corrosão e a possibilidade de polimerização "in situ" alimentam a extensa pesquisa nas últimas décadas, ilustrando aplicações como implantes, arcabouços tridimensionais (*scaffolds*), cultura de células e engenharia tecidual.

[5]Redes poliméricas interpenetrantes (IPN) ou semi-interpenetrantes (semi-IPN) recebem diferentes nomenclaturas na literatura e, em alguns casos, encontram-se divergência em suas definições. Alguns materiais descritos como semi-IPN estão covalentemente ligados (copolímeros) ou recebem denominações de blends poliméricas. Segundo a IUPAC, rede interpenetrante pode ser definida como: "um polímero compreendendo de duas ou mais redes que são pelo menos parcialmente entrelaçadas em uma escala molecular, mas não covalentemente ligados um ao outro e que não podem ser separados, a menos que as ligações químicas sejam quebradas. Uma mistura de duas ou mais redes poliméricas pré-formadas não é uma rede IPN (Wu, Liu et al., 2011; Loureiro et al., 2012).

[6]Redes semi-interpenetrantes (semi-IPN), conhecidas desde 1960, é uma mistura polimérica, em princípio, que tem a possibilidade de separação de seus componentes sem que haja quebra de ligações químicas (Loureiro et al, 2012; Moszczyński et al., 2007).

[1]Polímeros como o poli (ácido láctico) (PLA), poli ácido glicólico (PLGA), poliuretano (PU) e poli 2-

hidróxietilmetacrilato (PHEMA) são pertencentes ao estado da técnica, apresentam características interessantes para fins específicos, englobando desde a necessidade de arcabouços totalmente biodegradáveis até implantes não degradáveis.

[2] Biomateriais obtidos a partir dos polímeros PHEMA e PLA possuem uma ampla gama de aplicações médicas, variando de sistemas de liberação controlada de fármacos até a fabricação de implantes cirúrgicos degradáveis. O poli(ácido láctico) (PLA) oferece a vantagem de ser um poliéster hidrofóbico, que *in vivo*, degrada-se em componentes não-tóxicos. Por outro lado, o PHEMA, oferece a possibilidade de fácil modificação da estrutura por simples substituição do componente acrilato, sendo ajustável quimicamente em termos de hidrofiliicidade, pH e temperatura. O PHEMA tem sido extensivamente aplicado como lentes de contato, keratoproteses e implantes orbitais, devido às similaridades com os tecidos vivos e alta capacidade de absorção de água (Bryant *et al*, 2007).

[3] A combinação de PHEMA com poliéster, em geral, não é bem conhecida e foi descrita em poucos trabalhos (Wolf *et al*, 2009). Os pioneiros na síntese de poli acrilatos/poliéster foram Chen *et al* (2002) e Schappacher *et al* (2007) que, empregaram, respectivamente, o poli metil metacrilato-poli vinil e poli metil metacrilato- poli caprolactona para aplicações em sistemas de liberação

controlada de drogas. Wolf, Friedemann e Frey em 2009 também sintetizaram blocos de poli (lactideo)-PHEMA. Nesse contexto, temos que o PHEMA apresenta deficientes propriedades mecânicas, principalmente quando inchado em água, dificultando seu uso para aplicações cuja resistência a ciclos contínuos de carga sejam essenciais, tornando-se um material frágil e quebradiço. O PLA, por outro lado, apresenta uma superfície lisa, que dificulta a adsorção de proteínas e crescimento celular para aplicação como *scaffolds* e, ainda, possui uma taxa de degradação relativamente alta.

[4]Em geral, a rota de polimerização de PHEMA com poliéster (formando copolímero PHEMA-poliéster) é realizada em etapas, a partir de iniciadores bifuncionais, polimerização por abertura de anel (ROP), polimerização radicalar por transferência de átomos (ATRP) e uso de solventes como dimetil sulfóxido.

[5]O documento US2011245420 refere-se a um copolímero constituído de um poli ácido láctico modificado com um ácido acrílico e poli etileno glicol (PEG), no qual o monômero HEMA e o PLLA/PLA são abrangidos, respectivamente. O processo envolve a mistura das entidades poliméricas na presença de um iniciador em condições de temperatura e pressão apropriadas, formando o copolímero cuja aplicação envolve a engenharia de tecidos, materiais para implante, dentre outras. Contudo, a presente tecnologia difere-se

deste invento pela técnica de síntese. O processo de obtenção da rede polimérica semi-interpenetrante de PHEMA-PLA envolve o controle das variações entálpicas da reação por um novo método totalmente seco, livre de solventes e em uma única etapa de processamento. O documento apresentado utiliza clorofórmio para a dissolução do PLA, seguida da mistura deste com ácido acrílico, termoiniciador e PEG, sendo necessária uma etapa posterior de remoção do clorofórmio residual. A presença de qualquer solvente tóxico pode inviabilizar o uso do material em aplicações médicas. Trata-se, portanto, de uma etapa delicada e de diferencial do atual invento. Ainda, o documento envolve a necessidade de três polímeros para obter as características de dureza e resistência apresentadas: PLA, polímero acrílico e PEG, e utiliza processo mecânico (extrusora) para fusão da blenda. Aqui, apenas dois polímeros estão unidos: PLA e PHEMA (poli 2-hidróxiethylmetacrilato), obtendo excelentes características para aplicações médicas. Há uma redução de custo e tempo de processo. Os precursores (HEMA e iniciador) do PHEMA são inchados e polimerizados na matriz do PLA, via controle adequado das condições de síntese (temperatura, pressão, fração mássica e fluxo dos gases inertes), sem uso de solventes em quaisquer das etapas.

[6]O documento US2010160467 refere-se a um híbrido organo-inorgânico utilizado como suporte para imobilização

de nano-hidroxiapatita. A referida matriz polimérica é composta de, no mínimo, um polímero no qual o PLLA/PLA é abrangido. Este último é diretamente conectado um poli ácido acrílico no qual o poli ácido metacrílico é contemplado. O processo de produção do copolímero envolve a adição do 1-etil-3-dimetilaminopropil carbodiimida (EDC). A hidroxiapatita é utilizada para promover a adesão e diferenciação das células. Diferentemente, a presente invenção não utiliza solventes no processo e o PHEMA difere-se quimicamente do poli ácido metacrílico do documento citado. Há a formação de uma rede orgânica, sem presença de partículas inorgânicas. O PHEMA apresenta em sua estrutura grupos ácidos reativos, que introduzidos à matriz do PLA, auxilia no crescimento e adesão celular.

[7]O documento US2002150753 refere-se a uma matriz constituída de um copolímero biodegradável poroso produzido através de um processo que utiliza uma técnica de separação de fases na presença de solventes como o tetrahidrofurano (THF), benzeno e dimetilformamida (DMF). A composição polimérica obtida é constituída de um polímero hidrofóbico no qual o PLLA/PLA é abrangido e, um polímero hidrofílico contemplando o poli ácido metacrílico. A presente invenção difere-se principalmente pela ausência de solventes durante a síntese dos biomateriais. Os solventes frequentemente usados nos protocolos e métodos de fabricação podem afetar as propriedades mássicas e biocompatíveis do PLA. Ainda, o

PHEMA classificado como polímero acrílico, é uma material mais flexível, de fácil manipulação e com características similares aos tecidos moles do organismo.

[8]Portanto, o estado da técnica sugere que a combinação da rede de PHEMA-PLA apresenta as propriedades mecânicas de aderência e degradabilidade aprimoradas em relação aos polímeros PHEMA e PLA isolados - trata-se de um efeito sinérgico, no qual propriedades químicas anteriormente ausentes nas entidades isoladas tornam-se evidentes após a combinação de ambas. Entretanto, as rotas sintéticas atualmente conhecidas para a produção deste tipo de rede, são realizadas mediante utilização de solventes e/ou agentes de reticulação, tóxicos e prejudiciais ao organismo vivo. Estes reagentes podem inviabilizar o produto final, caso não sejam removidos de forma eficaz.

OBJETIVO DA INVENÇÃO

[9]O primeiro objetivo da presente invenção é uma rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxiethylmetacrilato-poliácido láctico(PHEMA-PLA) que apresenta propriedades mecânicas de adesão e degradabilidade aprimoradas em relação aos polímeros descritos no estado da técnica, sendo útil na bioengenharia tecidual.

[10]O segundo objetivo da presente invenção é um processo de produção de uma rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxiethylmetacrilato-poli ácido láctico (PHEMA-PLA) através do controle das variações entálpicas, que é

rápido, de baixo custo de produção, e que não utiliza agente químico de reticulação e/ou solventes.

[11]O terceiro objetivo da presente invenção é o uso da rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxiethylmetacrilato-poli ácido láctico (PHEMA-PLA) em engenharia tecidual, para o cultivo celular, e regeneração parcial de tecido cartilaginoso em geral, como por exemplo, para a regeneração de menisco, pavilhão auditivo, cartilagem nasal e cartilagem costal.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[12]Para se obter uma completa visualização dos objetivos da presente invenção, é necessária a leitura deste documento e a análise dos desenhos que o acompanham e aos quais se faz referências conforme segue abaixo.

[13]Figura 1 - Gráfico DSC da mistura HEMA-TBPO 1% m/m + PLA sob aquecimento e resfriamento controlados.

[14]Figura 2 - Gráfico DSC do PLA; da reação HEMA-TBPO 1% m/m; e da mistura HEMA-TBPO 1% m/m + PLA sob aquecimento a taxa de 10° C/min.

[15]Figura 3 - Gráfico DSC da rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA sob aquecimento e resfriamento controlados.

[16]Figura 4 - Perfil de inchamento das amostras de PHEMA sintetizado e PHEMA-PLA em etanol a 37°C.

[17]Figura 5 - Micrografias do PHEMA: (a) e (c) comercial com aumento de 150 e 500 vezes; (b) e (d) PHEMA

sintetizado com aumento de 150 e 500 vezes.

[18]Figura 6 - Micrografias do PLA: (a) aumento de 150 vezes; (b) aumento de 500 vezes.

[19]Figura 7 - Micrografias da rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA: (a) aumento de 150 vezes; (b) aumento de 500 vezes.

[20] Figura 8 - Imagens macroscópicas dos materiais utilizados nos testes *in vitro* e *in vivo*: (a) PLA; (b) PHEMA; (c) Rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA.

[21]Figura 9 - Fibroblastos humanos (MRC-5), cultivados sobre o PLA, por 72 horas: (a)1mm; (b)100µm; (c)60µm.

[22]Figura 10 - Adesão de fibroblastos humanos (MRC-5) na superfície do PLA (Teste *in vitro* por 7 dias).

[23]Figura 11 - PLA implantado por 4 dias no dorso de camundongos suíços: (a) 200µm; (b)100µm.

[24]Figura 12 - Adesão e proliferação do tecido de camundongo na rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA: (A)1mm; (B)200µm; (C) 40µm.

[25]Figura 13 - Viabilidade celular de células MRC-5 em discos de PHEMA-PLA e PHEMA após 24 horas de cultivo. $p<0,001$ $n=3$.

[26]Figura 14: Viabilidade celular de células MRC-5 em discos de PHEMA-PLA e PHEMA após 7 dias de cultivo. $p<0,001$ $n=3$

[27]Figura 15-Análise de biocompatibilidade dos

materiais implantados por 72 horas *in vivo*: (A) Controle; (B) Algodão: hiperemia (seta amarela) e vasodilatação (seta pontilhada); (C) PLA; e (D) Rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA.

[28]Figura 16 - Análise de biocompatibilidade dos materiais implantados por 7 dias *in vivo*. (A) Controle; (B) Algodão-hiperemia (seta amarela), indícios de encapsulamento (seta branca pontilhada), edema (dados não mostrados) e vasodilatação (seta pontilhada laranja); (C) PET(polietileno); (D)PLA; (E) Rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA (seta azul- localização dos materiais).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[29]A presente invenção trata-se de uma rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxietilmetacrilato-poli ácido láctico (PHEMA-PLA) que compreende o polímero PLA entrelaçado na rede do polímero PHEMA, seu processo de produção e uso.

[30]A rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxietilmetacrilato-poli ácido láctico (PHEMA-PLA) compreende, respectivamente, entre 20:80 e 80:20 % m/m dos precursores da polimerização (HEMA+TBPO) e PLA. O PLA pode ser substituído por outro poliéster selecionado do grupo do poli L- ácido láctico (PLLA), o poli D -ácido láctico (PDLA) ou uma mistura destes(PDLLA).

[31]A rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxietilmetacrilato-poli ácido láctico (PHEMA-PLA)

apresenta propriedades físicas, tais como, temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c) e temperatura de fusão (T_m), diferenciadas em relação aos polímeros PHEMA e ao poliéster isolados; estabilidade térmica compreendida entre as temperaturas de degradação dos polímeros isolados.

[32] Preferencialmente, a rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxi-etilmetacrilato-poli ácido láctico (PHEMA-PLA) da presente invenção compreende respectivamente entre 30:70 e 70:30 % m/m dos precursores da polimerização (HEMA+TBPO) e do poli-L ácido láctico (PLA), poli D- ácido láctico (PDLA) ou uma mistura destes (PDLLA). Mais preferencialmente ainda, a rede compreende entre 40:60 e 60:40 % m/m dos precursores da polimerização (HEMA e TBPO) e de PLA, respectivamente.

[33] A Tabela 1 abaixo apresenta os dados relativos às propriedades físicas dos polímeros: PHEMA, PLA e da rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxi-etilmetacrilato-poli ácido láctico (PHEMA-PLA)

[34] Tabela 1: T_g , T_c e T_m dos polímeros em estudo: PHEMA, PLA e rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA.

Polímeros	TEMP. DE TRANSIÇÃO VÍTREA (T_g)	TEMP. DE CRISTALIZAÇÃO (T_c)	TEMP. DE FUSÃO (T_m)
PLA	65,20	137,08	190,42

Polímeros	TEMP. DE TRANSIÇÃO VÍTREA (T_g)	TEMP. DE CRISTALIZAÇÃO (T_c)	TEMP. DE FUSÃO (T_m)
PHEMA (a)	102,75	-	-
PHEMA (b)	101,99	-	-
PHEMA-PLA	57,28	109,60	173,79

OBS.: (a) PHEMA comercial; (b) PHEMA sintetizado pelo método proposto

[35] A rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxiethylmetacrilato-poli ácido láctico (PHEMA-PLA) da presente invenção apresenta temperatura média de degradação, determinada pela perda de massa (TGA/DTGA), entre 70°C e 450°C, ou seja, entre a temperatura dos polímeros isolados.

[36] Testes de inchamento demonstram que a rede semi-interpenetrante da presente invenção apresenta um teor de inchamento entre 3 a 5 vezes menor que o teor de inchamento do polímero de PHEMA isolado. Como o PLA apresenta uma estrutura molecular hidrofóbica, torna-se evidente que o menor teor de inchamento da rede semi-interpenetrante PHEMA-PLA é decorrente da presença das moléculas hidrofóbicas do PLA neste objeto da invenção.

[37] Conforme pode ser verificado nas Figuras 13 e 14, em virtude das propriedades apresentadas, a rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA da presente invenção permitiu o crescimento e adesão celular. As características deste material são úteis para o cultivo celular de células

animais em engenharia tecidual.

[38]O segundo objeto desta invenção é o processo de produção de uma rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxiethylmetacrilato- poli ácido láctico (PHEMA-PLA) via controle das variáveis entálpicas, sem uso de solventes, em um método totalmente seco, que compreende as etapas simultâneas de:

- (a) Produção do polímero PHEMA;
- (b) Fusão do poliéster (PLA);
- (c) Entrelaçamento das cadeias moleculares do PLA sob a rede polimérica do PHEMA formado.

[39]Na etapa (a) o PHEMA é obtido pela mistura do monômero 2-hidróxi etil metacrilato (HEMA) com 0,1 a 5% de um termoiniciador, a uma temperatura de reação variável entre 200 e 300°C, em atmosfera modificada, e taxa de aquecimento variável entre 5 e 15°C/minuto e por um tempo variável entre 15 e 20 minutos.

[40]Preferencialmente, é utilizado entre 0,5 a 2% do termoiniciador di terc- butil peróxido (TBPO); a uma temperatura de reação variável entre 220 e 280°C, a atmosfera é modificada por N₂, e taxa de aquecimento variável entre 8 e 11°C/minuto.

[41]Nesta etapa, não é utilizado nenhum solvente ou agente de reticulação, fato que contrasta com os processos de obtenção dos polímeros PHEMA conhecidos pelos especialistas nesta área técnica.

[42] A mistura entre HEMA+termoiniciador obtida na etapa (a) é mantida sob aquecimento, até o final da etapa (b).

[43] Na etapa (b), um poliéster que compreende poli ácido láctico (PLA), é fundido a uma temperatura entre 200 a 300°C, a uma taxa de aquecimento de entre 5 a 15°C/minuto, sob fluxo de N₂ entre 50 a 200 mL/min e por um período de tempo de 15 a 50 minutos.

[44] Na etapa (c), as cadeias moleculares do PLA penetram na rede polimérica do PHEMA obtido, formando uma rede semi-interpenetrante.

[45] Em seguida, entre 20 e 80% em massa da mistura HEMA+TBPO é adicionada entre 80 e 20% em massa do PLA. Preferencialmente, a temperatura de fusão é de entre 220 a 280°C; é adicionada entre 30 e 70% em massa da mistura HEMA+TBPO a entre 70 e 30% do PLA. Mais preferencialmente, ainda, entre 40 e 60% em massa da mistura HEMA+TBPO a entre 60 e 40% do PLA. Após resfriamento, é obtida a rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxi etil metacrilato-poli ácido láctico; preferencialmente, nesta invenção, a rede semi-interpenetrante obtida é a rede de PHEMA-PLLA que apresenta propriedades físicas e químicas distintas das propriedades apresentadas pelos polímeros PHEMA e PLA, ou PLLA isolados.

[46] É sabido que o poli 2- hidróxi etil metacrilato (PHEMA) e o poli ácido láctico (PLA) são materiais poliméricos altamente conhecidos em termos de

biocompatibilidade para aplicações médicas. Entretanto, também é sabido que o PHEMA, embora bem tolerável *in vivo*, necessita de grupos funcionais que permitam a adsorção de proteínas. A falta de grupos funcionais que permitam a adsorção de proteínas não inviabiliza o uso do PHEMA em engenharia tecidual, apenas dificulta a adesão celular a este polímero e, conseqüentemente, seu uso para certas aplicações em engenharia tecidual. Já os isômeros L-lactídeo do poli ácido láctico contém limitações de uso, por ser um material relativamente hidrofóbico e ter taxa de degradação baixa.

[47]As redes semi-interpenetrantes de PHEMA-PLA da presente invenção podem ser usadas na engenharia tecidual, pois, devido à natureza deste produto, que conforme poderá ser observado nos exemplos abaixo, demonstrou ser um biomaterial anfifílico apresentando excelente adesão e, viabilizando o crescimento celular.

[48]Além disso, é também sabido que os polímeros PHEMA têm problemas quanto às propriedades mecânicas, principalmente quando inchado em água, dificultando seu uso para aplicações cuja resistência a ciclos contínuos de carga sejam essenciais, tornando-se um material frágil e quebradiço. Por outro lado, os polímeros PLA apresentam uma superfície lisa que dificulta a adsorção de proteínas e crescimento celular para aplicação como *scaffolds*. Logo, as redes semi-interpenetrantes de poli 2-

hidróxiethylmetacrilato-poli ácido láctico (PHEMA-PLA) que são preferenciais da presente invenção, fornecem propriedades mecânicas, aderência e degradabilidade melhoradas, tendo excelente aderência e viabilidade celular, que a tornam potencialmente viáveis para aplicação dos biomateriais em odontologia, regeneração parcial de cartilagem em geral, regeneração de menisco, regeneração do pavilhão auditivo, regeneração da cartilagem nasal e regeneração da cartilagem costal.

[49]Finalmente, é um objeto da presente invenção, o uso da rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxiethylmetacrilato-poliácido láctico (PHEMA-PLA) no cultivo de células animais e na engenharia tecidual, tais como, por exemplo, no cultivo de condrócitos e osteócitos.

Exemplo 1 - Síntese:

[50]As redes semi-interpenetrantes de PHEMA-PLA foram obtidas sob condições controladas de fração mássica (40 a 60%), taxa de aquecimento (10°C/min) e fluxo de nitrogênio (gás de arraste) (100 mL /min). O PLA foi fundido até 250°C com massa variando de 10 a 20 mg. Em seguida, a mistura HEMA + 1% m/m de TBPO foi adicionada ao filme polimérico de PLA na concentração mássica de 60 e 40%.

[51]Para fins de controle, foram produzidos polímeros PHEMA. Neste caso, a mistura do monômero, 2-hidróxi etil metacrilato (HEMA), com o termoiniciador, di terc- butil peróxido (TBPO), na concentração de 1% m/m em relação ao

teor inicial do monômero, foi submetida a aquecimento até 250°C, sob fluxo de nitrogênio 100 mL/min e taxa de aquecimento 10° C/min, sem acréscimo de solventes ou agentes de reticulação. A massa utilizada variou de 10 a 20 mg.

Exemplo 2 - Caracterização:

[52]Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC): As propriedades físicas dos filmes de PLA, PHEMA e da rede semi-IPN de PHEMA-PLA foram medidas usando DSC Mettler Toledo 823e. Foi utilizada taxa de aquecimento de 10°C/min, sob atmosfera de N₂ a 100 mL/min. As amostras foram pesadas em panela padrão de alumínio 40µL, com tampa furada e invertida e massa entre 10 e 20 mg. O ponto de fusão e a entalpia do índio foram utilizados para calibração.

[53]O grau de cristalinidade do PLA foi determinado segundo Equação (1):

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^\infty} \cdot 100 \quad (1)$$

[54]Onde: ΔH_m é a entalpia endotérmica de fusão do PLA, ΔH_c é a entalpia exotérmica referente à energia absorvida pelos cristais durante o aquecimento (entalpia de cristalização a frio) e ΔH_m^∞ é a entalpia teórica do PLA 100 % cristalino, assumida a 93 J/ g (Harris at Lee, 2008; Morales and Pereira, 2012).

[55]Espectroscopia por Transformada de Fourier (FTIR): Os espectros dos biomateriais foram analisados por

transmitância direta (ATR), usando o espectrofotômetro Thermo Scientific Nicolet IR 100, 400-4000 cm^{-1} , resolução 4 cm^{-1} .

[56]Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM): Micrografias dos biomateriais foram obtidas usando microscópio LEO Electron Microscopy SEM / Oxford, Leo model 440i, com aumentos de 150 a 500.000 vezes.

[57]Análise Termogravimétrica (TGA): A estabilidade térmica foi avaliada utilizando-se o equipamento TGA, modelo 2960 SDT V3.0F, sob fluxo de nitrogênio de 100mL/min e taxa de aquecimento de 10°C/min. Os dados são reportados em termos da variação de massa e das temperaturas iniciais e finais de decomposição térmica dos biomateriais.

[58]Ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H RMN): Os espectros dos polímeros comerciais (PLA e PHEMA) foram obtidos utilizando-se equipamento Bruker a 250Mhz. Os espectros foram medidos em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d_6), respectivamente, a 25°C.

[59]Inchamento/ intumescimento: Amostras de PHEMA sintetizadas e PHEMA-PLA foram imersas por 26 horas em etanol a temperatura de 37°C. Pontos aleatórios das massas inchadas, dentro deste período de tempo, foram tomados a fim de elucidar o comportamento do grau de inchamento. A massa molecular numérica (M_n) e ponderal médias (M_w) do PLA

foi avaliada a partir de medidas reológicas do polímero fundido. Reômetro Haake ReoStress 6000, Thermo Scientific, foi utilizado para obter a viscosidade a taxa de cisalhamento zero (η_0) do PLA. As medidas foram realizadas a 200°C, em estado estacionário, discos de 20 mm de diâmetro, a 40 min de processo. Taxas de cisalhamento foram testadas de 0,001 a 10 s⁻¹, com gaps de 1mm. Todos os testes foram realizados sob atmosfera de nitrogênio para evitar oxidação do polímero.

[60]A Equação de Mark-Houwink foi utilizada para relacionar a massa molecular com as propriedades reológicas do PLA a 200°C. Os parâmetros K e a, foram obtidos de Inkinen et al. (2011), sendo, respectivamente: 2,3 e 3,7. Os dados experimentais foram comparados com a correlação de Carreau-Yasuda.

Exemplo 3 - Biocompatibilidade:

Exemplo 3.1 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV):

[61]O biomaterial (rede semi-IPN de PHEMA-PLA) foi retirado da cultura e fixado em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído a 25%, 4% de paraformaldeído e 2,5% de sacarose, em tampão cacodilato de sódio (KHANDWEKAR, 2010), 0,1 M e pH 7,2 por 2 horas a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilato 0,1 M e, posteriormente, pós-fiadas em solução contendo 1% tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio a 0,8% por 1 hora a temperatura ambiente. O material foi

lavado e, então, desidratado em séries crescentes de etanol (50, 70, 90% e 100%) (KIM, 2011; DIAS, 2010), durante 20 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram secas pelo método do ponto crítico (Modelo K 850 - Marca Emitech) usando CO₂. O material foi montado em suporte apropriado (*stub*) e metalizado com uma película de ouro de aproximadamente 2µm de espessura, usando o aparelho Emitech K550-England. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de varredura LEO 1450VP do Instituto Evandro Chagas.

Exemplo 3.2 - Cultivo Celular:

[62] Foi realizada cultura 3D de células de fibroblastos humanos (human fetal Lung Fibroblast cell line - MRC-5) sobre o bloco de PHEMA-PLA. As células foram semeadas na concentração de 5×10^5 por biomaterial. A rede semi-IPN de PHEMA-PLA foi mantido em 300µl de meio modificado Dulbecco (modified Dulbecco's Eagle's médium - DMEM) com 10% de soro fetal bovino por 24 horas em estufa a 37°C com 5% de CO₂. A análise da proliferação celular foi realizada através do teste de viabilidade celular com - 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT).

Exemplo 3.3 -Viabilidade Celular MTT:

[63] Para o ensaio da curva de tempo, as células de fibroblastos foram cultivadas juntamente com o biomaterial após 24 h e 7 dias de cultivo na placa de teste. Duas horas antes do término do experimento foi adicionado

brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT), formando células viáveis. A leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro a $\lambda = 570$ nm.

Exemplo 4: Testes *in vivo* e *in vitro*

[64]As Figuras 8(a), 8(b) e 8(c) mostram as imagens do PLA, PHEMA e das redes semi-interpenetrantes de PHEMA-PLA utilizadas nos testes *in vitro* e *in vivo*. Todos os polímeros foram obtidos com dimensões aproximadas de 5 mm cada.

Exemplo 4.1: *In vitro* do PLA

[65]Fibroblastos humanos (MRC-5), cultivados sobre o PLA, por 72 horas, são demonstradas na Figura 9 (a), sob aumento de 17X. Na Figura 9 (b), ampliação de 253X, é possível perceber a boa adesão das células no PLA e a formação da monocamada celular. A Figura 9 (c) demonstra a conexão célula-célula sem qualquer alteração estrutural. São observados espaços entre as células, demonstrando a superfície lisa do PLA. Tais resultados confirmam a ausência de citotoxicidade celular do PLA dentro do período em estudo.

[66]A Figura 10 demonstra a aderência de fibroblasto na rede de PLA. Há a formação de uma monocamada de células na superfície do material, demonstrando uma ótima superfície de adesão e conexão célula-célula. Não houve morte celular no período de 7 dias, e conseqüentemente, ausência de

citotoxicidade.

Exemplo 4.2: *In vivo* do PLA

[67]A Figura 11 mostra as micrografias do PLA, implantado por 4 dias no tecido subcutâneo do dorso de camundongos suíços. Nas imagens, observa-se que o PLA está totalmente coberto pelo tecido da pele do animal. A um aumento de 92X (Figura 11 (b)), torna-se mais evidente a camada da pele interagindo completamente com o PLA, demonstrando, ainda, a presença de poros mais definidos. Os resultados mostraram que houve biocompatibilidade entre o material e a pele dos camundongos suíços.

Exemplo 4.2: *In vivo* da rede PHEMA-PLA

[68]A Figura 12 mostra a aderência de fibroblastos sob a rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA, *in vivo*, após 4 dias de implantação. A Figura 12(a), mostra uma visão geral do biomaterial e o tecido, com a presença de uma monocamada de células na superfície do material, observada com maiores detalhes na Figura 12(b).

[69]É verificada a migração de tecidos e células para formação de uma cápsula fibrosa em volta do PHEMA-PLA. Na Figura 12 (c), aumento de 748X, percebe-se características típicas de fibroblastos apresentando alto grau de adesão e conexão celular para formação da monocamada.

Exemplo 5: Biocompatibilidade da rede semi-IPN de PHEMA-PLA *in vitro*

[70]Células de fibroblastos humanos (MRC-5) foram

cultivadas sobre as amostras de PHEMA, PLA e sobre as redes semi-interpenetrantes de PHEMA-PLA. Todos os materiais foram incubados por 24 horas e 7 dias. A Figura 13 demonstra $95\pm 15\%$ de viabilidade celular para os materiais de PHEMA-PLA após 24 horas, não demonstrando diferença significativa quando comparado com os controles positivos para o polietileno (PET-LISO ou PET) ($91\pm 5\%$), PLA ($90\pm 8\%$) e PHEMA ($98\pm 3\%$). Enquanto que, o controle negativo tratado com fenol 1%, promoveu morte de 75% das células cultivadas.

[71]A viabilidade celular *in vitro*, após 7 dias, para as redes semi-interpenetrantes de PHEMA-PLA e para o PHEMA é verificada na Figura 14. As células demonstraram $98\pm 7\%$ de viabilidade para as redes semi-interpenetrantes de PHEMA-PLA, não demonstrando diferença significativa quando comparado com os controles positivos para PET ($80\pm 7\%$), PLA ($90\pm 7\%$) e PHEMA ($95\pm 8\%$). Enquanto que, o controle negativo tratado com fenol 1% promoveu morte de 88% das células. Em todos os testes, houve proliferação e adesão das células MRC-5 sobre o biomaterial. Em nossos testes não houve a necessidade da utilização de proteína de adesão sobre a rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA, indicando a alta afinidade das células pelo material. Isto demonstra a capacidade da rede semi-IPN de PHEMA-PLA para conexão e crescimento celular. Também, mostra que os materiais testados podem ser utilizados *in vivo* para os testes de biocompatibilidade.

Exemplo 6: Biocompatibilidade da rede semi-IPN de PHEMA-PLA *in vivo*

[72] Os camundongos suíços foram divididos em 4 grupos de 4 animais cada: PET; PLA; PHEMA-PLA e controle negativo com algodão. A Figura 15A demonstra a integridade da pele na ausência de um agente exógeno, com o calibre normal dos vasos que irrigam a área. Na Figura 15B, observa-se um processo inflamatório induzido por um pellet de algodão. A presença de hiperemia (seta amarela) e vasodilatação (seta pontilhada) sugerem uma ativação do organismo rejeitando o material exógeno. Por outro lado, o PLA analisado (Figura 15C) não demonstrou vasodilatação e nem hiperemia. Além disso, os resultados dos testes *in vivo* da rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA no dorso de camundongos suíços corroboram com as análises de citotoxicidade *in vitro*, uma vez que o material não promoveu características de ativação do processo inflamatório (Figura 15D).

[73] A Figura 16 mostra os testes *in vivo* dos materiais a um tempo de implante de 7 dias. Os animais foram divididos em 5 grupos: CONTROLE, PET; PLA; PHEMA-PLA e controle negativo com algodão. Novamente, verifica-se na Figura 16 A (controle positivo), a integridade da pele na ausência de um agente exógeno, com o calibre normal dos vasos que irrigam a área. Na Figura 16B, observa-se um intenso processo inflamatório induzido por um pellet de algodão. Há hiperemia exacerbada (seta amarela), indícios

de encapsulamento (seta branca pontilhada), edema (dados não mostrados) e vasodilatação (seta pontilhada laranja). Tais efeitos sugerem uma rejeição do organismo ao material exógeno. Por outro lado, nas Figuras 16C e 16D (setas azuis), o PET e o PLA, respectivamente, não demonstraram características de processo inflamatório. Para a rede semi-interpenetrante de PHEMA-PLA (Figura 16E- seta azul), os resultados foram similares aos controles positivos.

REIVINDICAÇÕES

1. Rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxietilmetacrilato-poli ácido láctico **caracterizada por** compreender o polímero PLA entrelaçado na rede do polímero PHEMA.
2. Rede, de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada por** compreender respectivamente entre 20:80 e 80:20 % m/m dos precursores da polimerização (HEMA+TBPO) e de PLA.
3. Rede, de acordo com a reivindicação 1 **caracterizada pelo** fato do PLA poder ser substituído por um poliéster selecionado do grupo poli-L ácido láctico (PLLA), o poli D-ácido láctico (PDLA) ou uma mistura destes (PDLLA).
4. Rede, de acordo com a reivindicação 3 **caracterizada por** compreender respectivamente entre 30:70 e 70:30 % m/m dos precursores da polimerização (HEMA+TBPO) e do poli-L ácido láctico (PLA), poli D-ácido láctico (PDLA) ou uma mistura destes (PDLLA).
5. Rede, de acordo com a reivindicação 2 **caracterizada por** compreender, mais preferencialmente, entre 40:60 e 60:40 % m/m dos precursores da polimerização (HEMA e TBPO) e de PLA, respectivamente.
6. Processo de produção de uma rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxietilmetacrilato-poli ácido láctico (PHEMA-PLA) **caracterizado por** ser realizado via controle das variáveis entálpicas, sem uso de solventes, totalmente seco, que compreende as etapas simultâneas de:

- a) Produção do polímero PHEMA;
- b) Fusão do poliéster (PLA), e
- c) Entrelaçamento das cadeias moleculares do PLA sob a rede polimérica do PHEMA formado.

7. Processo, de acordo com a reivindicação 6 **caracterizado pelo** fato de na etapa (a) o PHEMA é obtido pela mistura do monômero 2-hidróxi etil metacrilato (HEMA) com 0,1 a 5% de um termoiniciador, a uma temperatura de reação variável entre 200 e 300°C, em atmosfera modificada por nitrogênio, e taxa de aquecimento variável entre 5 e 15°C/minuto e por um tempo variável entre 15 e 20 minutos.

8. Processo, de acordo com a reivindicação 7 **caracterizado por** preferencialmente, é utilizado entre 0,5 a 2% do termoiniciador di terc- butil peróxido (TBPO); a temperatura de reação variável entre 220 e 280°C, a atmosfera é modificada por N₂, e taxa de aquecimento variável entre 8 e 11°C/minuto.

9. Processo, de acordo com a reivindicação 6 **caracterizado pelo** fato de na etapa (b), um poliéster que compreende poli ácido láctico (PLA), é fundido a uma temperatura variável entre 200 e 300°C, a uma taxa de aquecimento variável entre 5 e 15°C/minuto, sob fluxo de N₂ entre 50 a 200 mL/min e por um período de tempo variável entre 15 e 50 minutos; em seguida, entre 20 e 80% em massa % da mistura HEMA+TBPO é adicionada entre 80 e 20% em massa do PLA.

10. Processo, de acordo com a reivindicação 6 **caracterizado**

pelo fato da mistura entre HEMA+termoiniciador obtida na etapa (a) ser mantida sob aquecimento, até o final da etapa (b).

11. Processo, de acordo com a reivindicação 6 **caracterizado por** preferencialmente, a temperatura de fusão ser de entre 220 a 280°C; ser adicionada entre 30 e 70% em massa da mistura HEMA+TBPO a entre 70 e 30% do PLA.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 11 **caracterizado por** mais preferencialmente, entre 40 e 60% em massa da mistura HEMA+TBPO a entre 60 e 40% do PLA.

13. Uso da rede semi-interpenetrante de poli 2-hidróxietilmetacrilato-poli ácido láctico de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5 **caracterizado por** ser aplicável em cultivo celular e na engenharia tecidual.

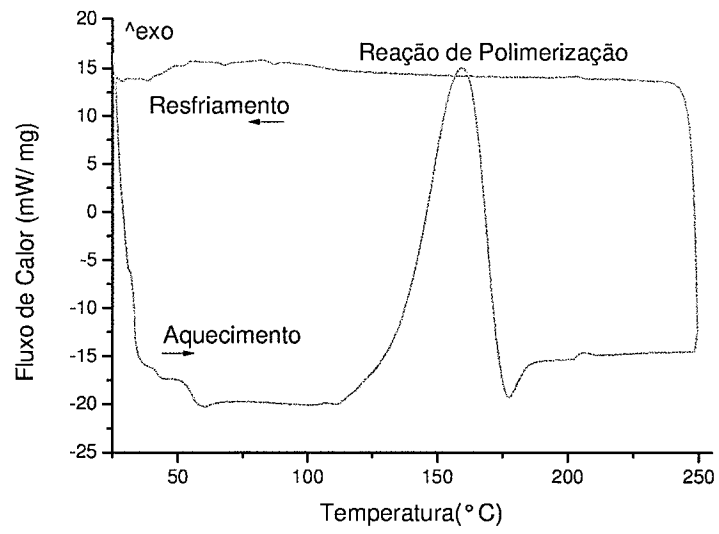


Figura 1

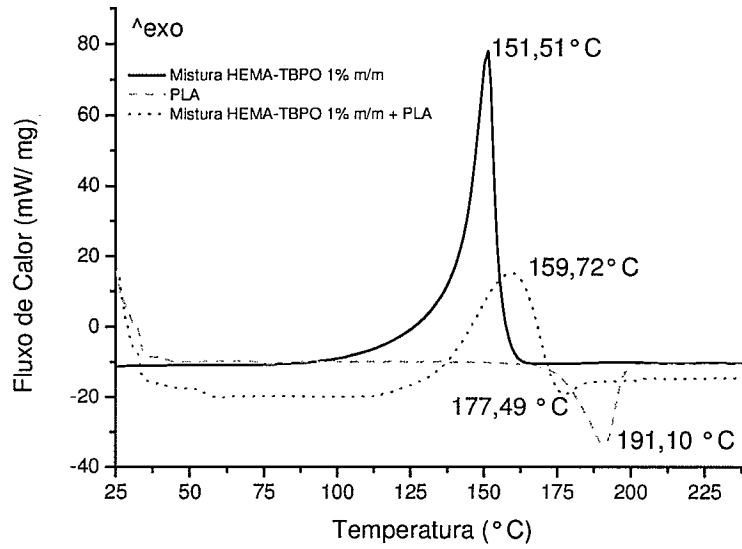


Figura 2

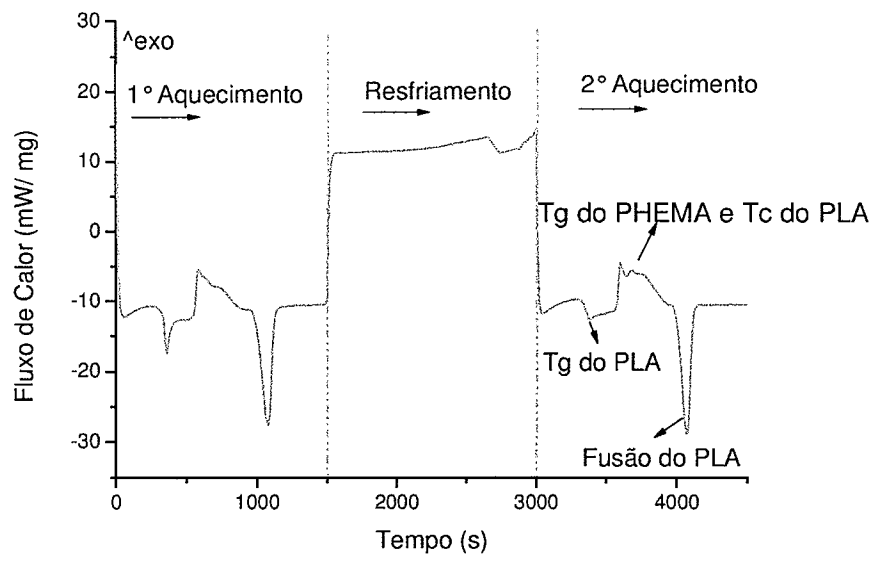


Figura 3

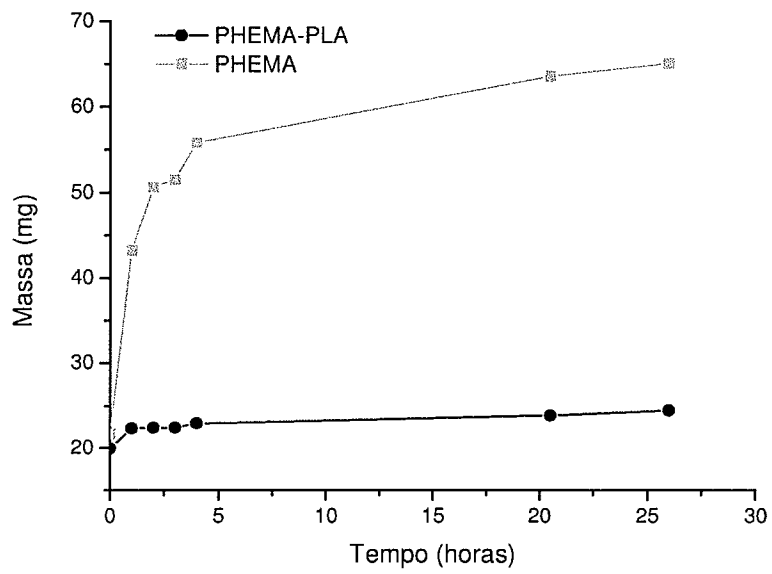
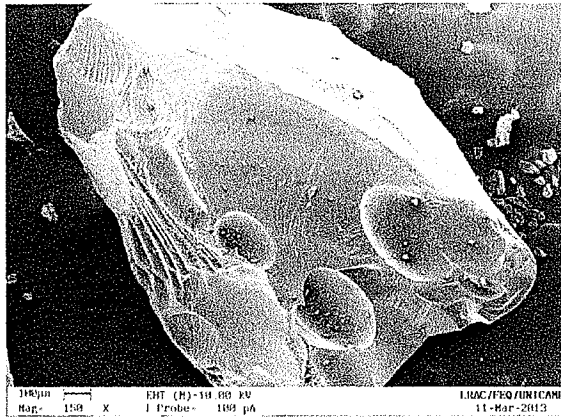
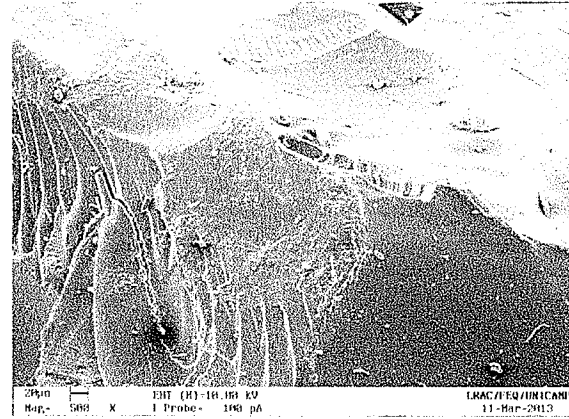


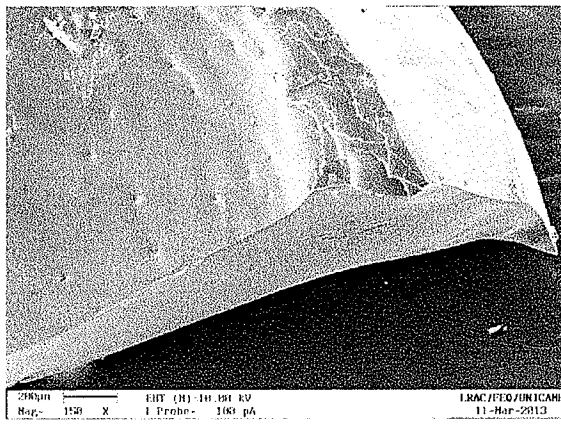
Figura 4



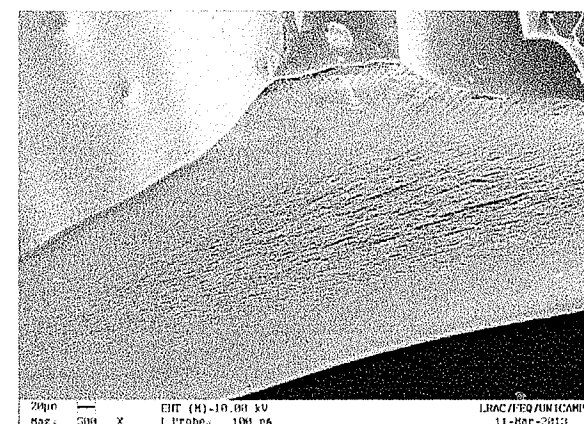
(a)



(b)

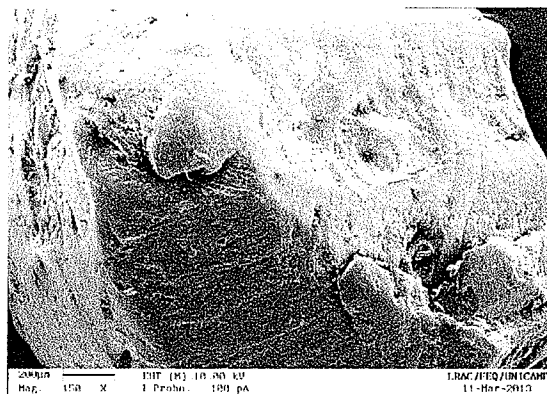


(c)

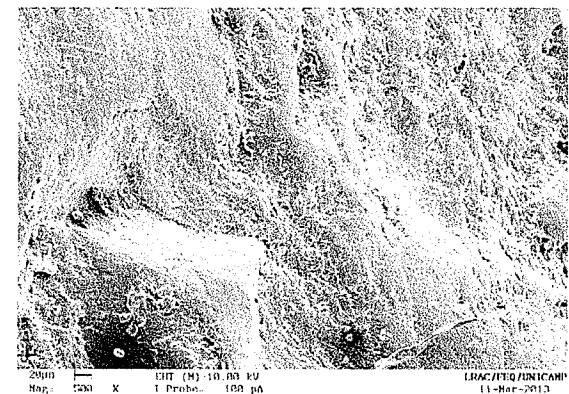


(d)

Figura 5



(a)



(b)

Figura 6

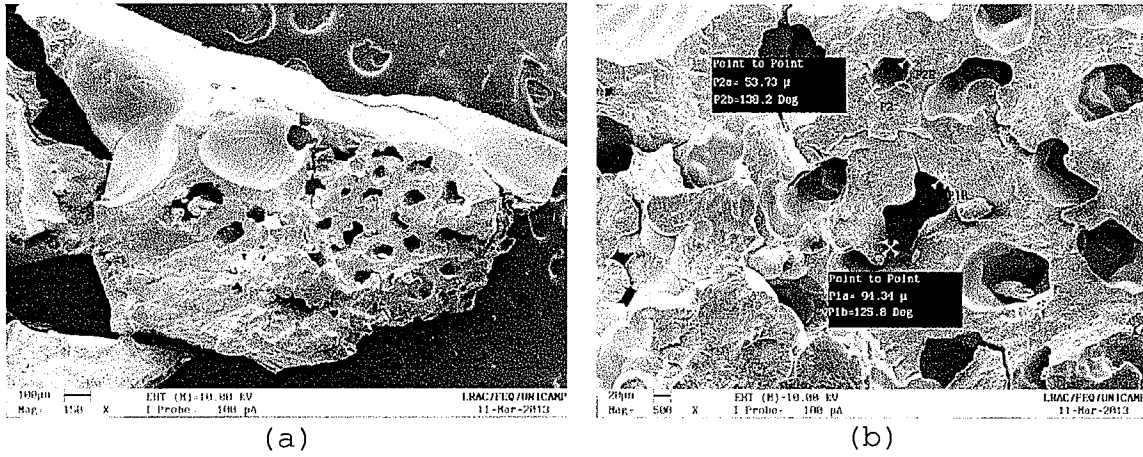


Figura 7

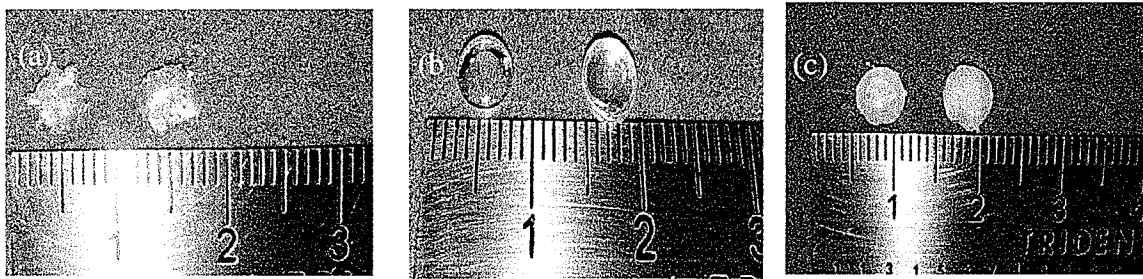


Figura 8

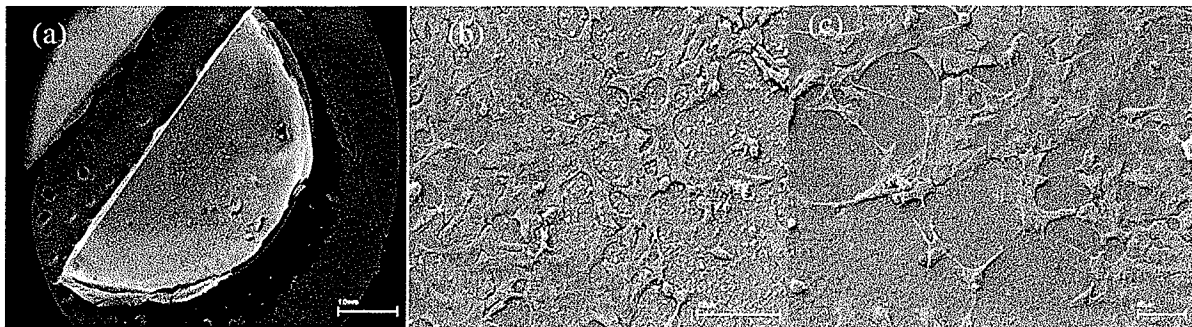


Figura 9

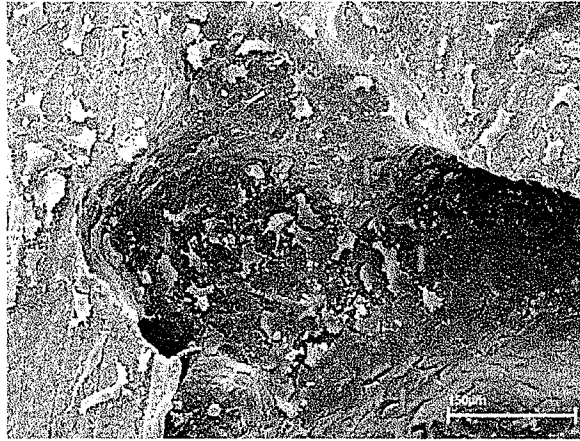


Figura 10

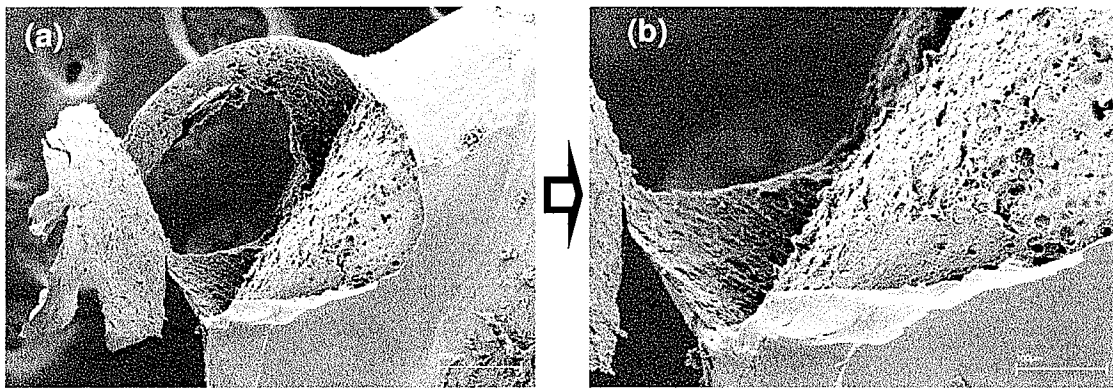


Figura 11

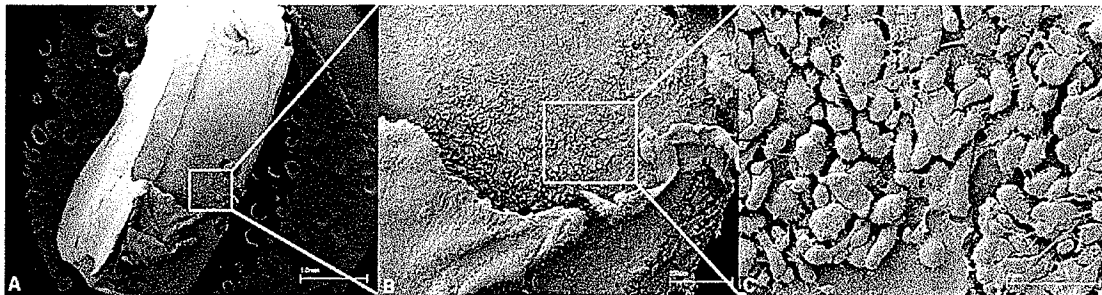


Figura 12

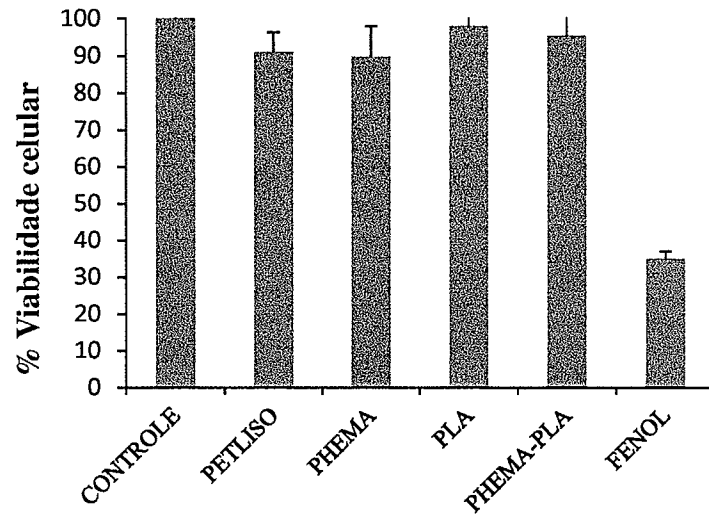


Figura 13

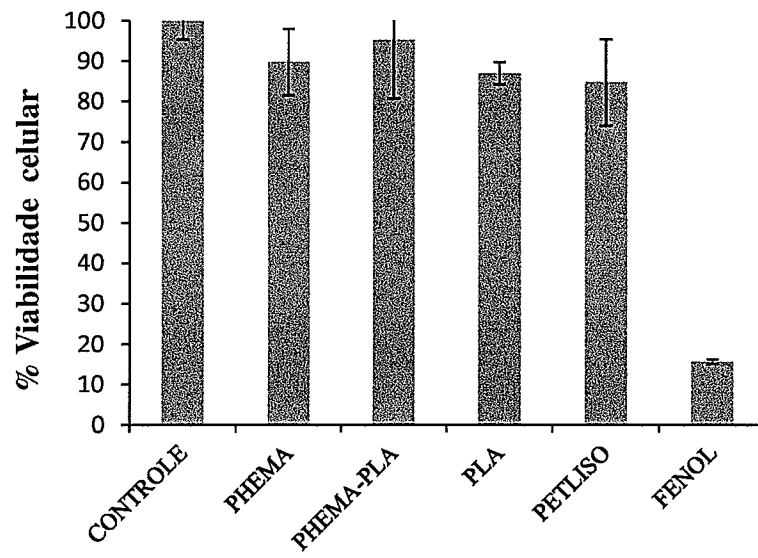


Figura 14

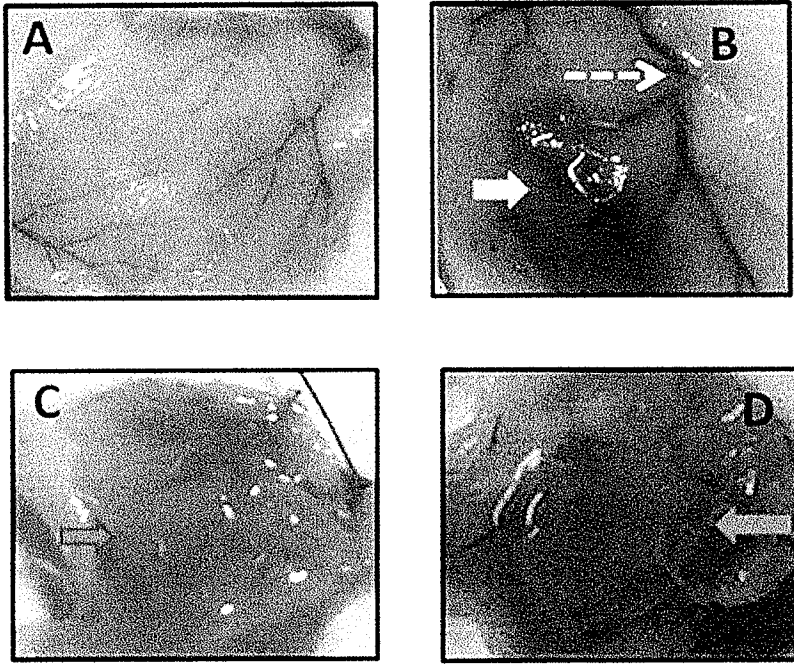


Figura 15

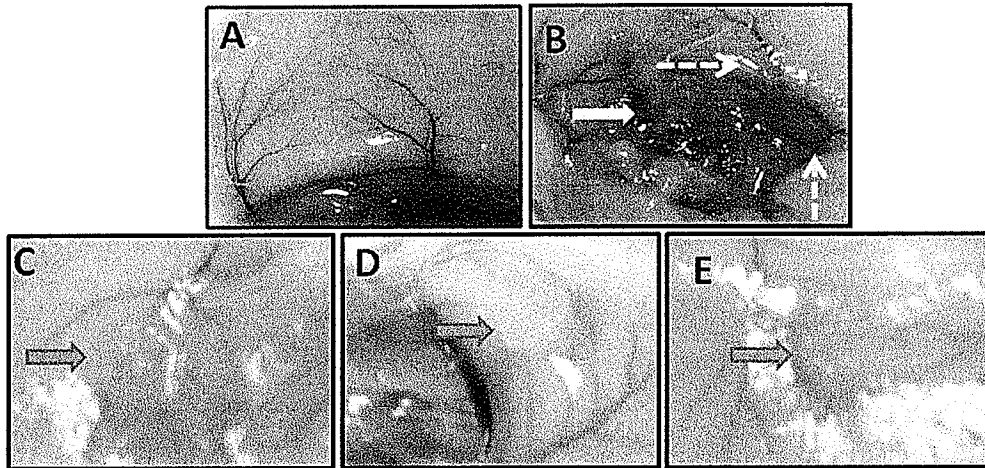


Figura 16