



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2018 004486 9

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 48031918000124

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Rua Quirino de Andrade, 215

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 01049-010

País: Brasil

Telefone: 11 56270217

Fax: 11 56270103

Email: auin@unesp.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE ALGINATO-QUITOSANA-FUCOIDAM PARA RECONSTRUÇÃO CIRÚRGICA DA SUPERFÍCIE OCULAR

Resumo: É descrita a patente de invenção pertencente ao campo dos produtos que envolvem membranas sintéticas para reconstrução da superfície ocular, de humanos e de animais, que compreende a utilização de polímeros marinhos biocompatíveis, tais como alginato, quitosana e fucoidam de *Fucus vesiculosus*. Por se tratarem de membranas sintéticas, fabricadas sob condições controladas, apresentam uniformidade estrutural. Ademais, podem ser esterilizadas e armazenadas em temperatura ambiente, sem necessidade de agentes criopreservantes.

Figura a publicar: 1A

Dados do Procurador

Procurador:

Nome ou Razão Social: Sérgio Victor Mastrorocco

Numero OAB: 296946SP

Numero API: 1705

CPF/CNPJ: 02990560823

Endereço: Rua Amaral Gama, 333 - Conjunto 164 - Santana

Cidade: São Paulo

Estado: SP

CEP: 02018-001

Telefone: (11) 2639-7200

Fax: (11) 2973-5032

Email: sergio@mastrorocco.com.br

Dados do Inventor (72)

Inventor 1 de 2

Nome: MARCELA ALDROVANI RODRIGUES

CPF: 30263498875

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Biólogo, biomédico e afins

Endereço: Rua Matias de Albuquerque, 1001, Jardim Maria Lúcia

Cidade: São José do Rio Preto

Estado: SP

CEP: 15047-103

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70696

Fax: (11) 562 70692

Email: auin@unesp.br

Inventor 2 de 2

Nome: JOSÉ LUIZ LAUS

CPF: 04185653840

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Dr. Mario de Assis Moura, 280, apto 33, Jardim Nova Aliança

Cidade: Ribeirão Preto

Estado: SP

CEP: 14026-578

País: BRASIL

Telefone: (11) 562 70696

Fax: (11) 562 70692

Email: auin@unesp.br

Documentos anexados

Tipo Anexo	Nome
Procuração	procuracao FUNDUNESP para o INPI.pdf
Comprovante de pagamento de GRU 200	17AUIN013 - GRU e comprov pagto.pdf
Declaração negativa de acesso	17AUIN013 - Declaracao Negativa AUIN.pdf
Documento de Cessão	17AUIN013 - MEMBRANA_ALGINATO - Termo Cessao Inventores (3).pdf
Relatório Descritivo	17AUIN013 - MEMBRANA DE ALGINATO-QUITOSANA-FUCOIDAM PARA RECONSTRUÇÃO_relatorio.pdf
Reivindicação	17AUIN013 - MEMBRANA DE ALGINATO-QUITOSANA-FUCOIDAM PARA RECONSTRUÇÃO_reivindicacoes.pdf
Desenho	17AUIN013 - DESENHOS.pdf
Resumo	17AUIN013 - MEMBRANA DE ALGINATO-QUITOSANA-FUCOIDAM PARA RECONSTRUÇÃO_resumo.pdf

Acesso ao Patrimônio Genético

- ☒ Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

Declaração de veracidade

- ☒ Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

PROCURAÇÃO

Por este instrumento, a **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30/01/1976, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, CEP 01049-010, São Paulo/SP, inscrita no CNPJ do MF sob o nº 48.031.918/0001-24, doravante designada simplesmente **UNESP**, neste ato, representada por seu Magnífico Reitor, de acordo com o Art. 34, I de seu Estatuto, Prof. Dr. **SANDRO ROBERTO VALENTINI**, brasileiro, professor universitário, portador do RG nº 10.289.419-X SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 083.891.058-02, ou quem legalmente o substitua, nomeia e constitui seus procuradores, **1) LEOPOLDO CAMPOS ZUANETI**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 235.031; **2) SÉRGIO VICTOR MASTROROCCO**, brasileiro, advogado, devidamente inscrito na Ordem dos Advogados do Brasil Seção de São Paulo sob o número 296.946, e **3) VITOR GARCIA KOPP**, brasileiro, engenheiro, portador do RG nº 36.688.444-X SSP/SP, inscrito no CPF/MF sob o nº 375.214.338-07, outorgando-lhes poderes para representá-la perante o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, para o fim de requerer e processar direitos de propriedade intelectual, tais como patentes de invenção, de modelos de utilidade, desenhos industriais, registros de marcas de produto, de serviço, coletivas ou de certificação, de indicações geográficas, cultivares, direitos de autor, de programas de computador e mantê-los em vigor com amplos e ilimitados poderes para assinar petições, autorizações para cópia, termos de cessão de direitos, acordos de gestão e compartilhamento de propriedade intelectual, documentos diversos relacionados ao processo administrativo de proteção de direitos de propriedade industrial, incluindo, mas não se limitando aos documentos já utilizados pelo INPI, bem como àqueles que vierem a ser adotados e utilizados para instrução processual de patentes, modelos de utilidades, marcas, desenhos industriais e programas de computador, pagar taxas, retribuições, impostos, fazer prova de uso das invenções patenteadas ou das marcas registradas, efetuar pagamentos e receber restituições, dando as respectivas quitações, apresentar oposições, recursos, réplicas, desistir, renunciar, anotar, averbar contratos de licença e transferências de tecnologia, elaborar notificações extrajudiciais, requerer prorrogação dos prazos de proteção, fazer declarações, opor, protestar, impugnar, recorrer, pedir reconsideração, manifestar-se sobre oposições e recursos, obter vista de processos, cumprir exigências, apresentar defesas escritas ou orais, desistir, replicar, transigir, receber, juntar e retirar documentos, requerer caducidade e contestar pedido de caducidade, requerer e contestar nulidade administrativa e licença compulsória, preencher qualquer tipo de formalidade, requerer anotação e averbação de cessão, alterações de nome e de sede, proceder à publicação de editais de chamamento para instruir, elaborar, firmar e acompanhar contratos de transferência de tecnologia e/ou licenciamento com exclusividade ou não, e praticar para o fim mencionado todos os atos necessários perante as autoridades administrativas competentes no Brasil em benefício da Outorgante.

Este instrumento é válido até 30 de junho de 2018.

São Paulo, 27 de junho de 2017.


SANDRO ROBERTO VALENTINI

001-9		RECIBO DO SACADO	
Local de Pagamento			
Pagável em qualquer Banco			
Cedente			
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial			
Data do Documento	Nº. documento	Empenho	Data Process.
22/09/2016	1607579736	R.C.	22/09/2016
Uso Banco	Carteira	Especie	Quantidade
	18/027	RS	
Número:		NN Complementar:	
Natureza: 10 - Patente de		Petição Vinculada RPI Valor	
Cod		Serviço	
200 - Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção		RS 70,00	
entrada na fase nacional do PCT			
OAB: 23503/SP		Procurador: Leopoldo Campos Zuanetti	
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança		RS 70,00	
Sacado			
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO			
Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010			
Sacador/Avalista			
Corte na linha pontilhada		Autenticação mecânica - Controle Cedente	

001-9		00199.53637 10000.022169 07579.736211 6 00000000007000	
Local de Pagamento			
Pagável em qualquer Banco			
Cedente			
INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial			
Data do Documento	Nº. documento	Empenho	Data Process.
22/09/2016	1607579736	R.C.	22/09/2016
Uso Banco	Carteira	Especie	Quantidade
	18/027	RS	
Instruções:			
1. Valores expressos em reais.			
2. Pagamento em cheque, anotar no verso o 'Nosso Número'.			
3. Pagamento via SIAFI(OB-FATURA): Identificar na 'ob' o 'Nosso Número'.			
4. Vencimento contra apresentação.			
OAB: 23503/SP		Procurador: Leopoldo Campos Zuanetti	
Governo Federal - Guia de Recolhimento da União. GRU - Cobrança		RS 70,00	
Sacado			
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO			
Rua Quirino de Andrade, 215, São Paulo, BR/SP, 01049-010			
Sacador/Avalista			
Corte na linha pontilhada		Autenticação mecânica - Ficha de Compensação	

- GRU ÚNICA: a GRU apresentada ao INPI, como comprovante da retribuição, deve ser única. Não utilize cópias desta GRU para outro pagamento. - PAGAMENTO: o pagamento da GRU deve ser providenciado no PRAZO ADMINISTRATIVO, regulamentado em lei ou Ato Normativo próprio.

FUNDACAO PARA O DESENVOLVIMENTO DA UNESP FUNDUNESP Agência: 0239 Conta Corrente: 13-002911-5

DETALHE DO COMPROMISSO

Convênio:	0033-0239-004900019792	Conta de Débito:	0239-000130027340
Tipo do Documento:	CNPJ	CPF/CNPJ do Fornecedor:	
Nome do Fornecedor:	000009853INPI - INST. NACIONAL		
No. compromisso banco:	1023666000200008	No. compromisso cliente:	757973/DS1 1011
Tipo de Pagamento:	BLQ Outros		
Código de Barras:	00199536371000002216907579736211600000000007000		
Valor Nominal:	70,00		
Desc./Abat.:	0,00	Juros:	0,00
Data de Vencimento:	10/10/2016		
Data de Pagamento:	10/10/2016		
Situação:	Efetivado	No. Protocolo:	PGTFORNB10102016900115619
No. Lista de Débito:			
Autenticação:			

Valor a Pagar: 70,00

Tipo de Serviço: Pagamento Fornecedor
Complemento do Tipo de Serviço:

Emitir Aviso: Não emitir

Central de Atendimento 4004-2125 (Regiões Metropolitanas)
Santander Empresarial 0800 726 2125 (Demais Localidades)

SAC 0800 762 7777
Ouvidoria 0800 726 0322

[retornar](#)[imprimir](#)

DECLARAÇÃO NEGATIVA DE ACESSO A RECURSOS DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

Título: Processo de obtenção de membranas de alginato-quitosana-fucoidam para reconstrução cirúrgica da superfície ocular

Titular: Universidade Estadual Paulista "Júlio De Mesquita Filho"

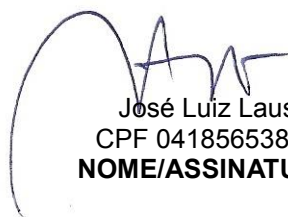
Inventores: Marcela Aldrovani, José Luiz Laus

Nós, inventores abaixo assinados, declaramos que o objeto do presente pedido de patente não foi obtido em decorrência de acesso à amostra de componente do patrimônio genético brasileiro; o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000 ou não se aplica.

Jaboticabal, 01 de dezembro de 2017.



Marcela Aldrovani
CPF 30263498875
NOME/ASSINATURA



José Luiz Laus
CPF 04185653840
NOME/ASSINATURA

TERMO DE CESSÃO DE DIREITOS SOBRE PROPRIEDADE INTELECTUAL

Cedentes: 1. **MARCELA ALDROVANI RODRIGUES**, brasileira, solteira, bióloga, inscrita no CPF/MF sob o nº 302.634.988-75, portadora do documento de identidade RG nº 29.108.521-0, SSP/SP, residente em São José do Rio Preto (SP), na Rua Matias de Albuquerque, 1001, Jardim Maria Lúcia, CEP 15.047-103; 2. **JOSÉ LUIZ LAUS**, brasileiro, casado, professor universitário, inscrito no CPF/MF sob o nº 041.856.538-40, portador do documento de identidade RG nº 10.199.081-9, SSP/SP, residente em Ribeirão Preto (SP), na Rua Dr. Mario de Assis Moura, 280, apartamento 33, Jardim Nova Aliança, CEP 14026-578.

Cessionária: **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" - UNESP**, autarquia estadual de regime especial, criada pela Lei nº 952 de 30.01.1976, devidamente inscrita no CNPJ/MF sob o nº 48.031.918/0001-24, com sede na Rua Quirino de Andrade, 215, Centro, São Paulo (SP), CEP 01.049-010.

Pelo presente instrumento, nesta e na melhor forma de direito, os Cedentes autorizam a Cessionária a depositar o pedido de patente intitulado "**PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE ALGINATO-QUITOSANA-FUCOIDAM PARA RECONSTRUÇÃO CIRÚRGICA DA SUPERFÍCIE OCULAR**" junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial, cedendo todos os direitos patrimoniais a ele relativos na forma e para os fins do disposto na Lei 9.279 de 14.05.1996 e Lei 8.666 de 21.06.1993, Artigo 111, a título gratuito, sem qualquer restrição quanto à forma, tempo ou lugar, desde já ficando autorizadas quaisquer alterações que venham a ser consubstanciadas em futuras atualizações, modificações ou derivações tecnológicas.

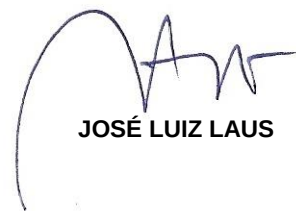
Por ser a expressão da verdade, este documento é firmado na presença de duas testemunhas que também o assinam.

São José do Rio Preto, 05 de outubro de 2017.

Cedentes:



MARCELA ALDROVANI RODRIGUES



JOSÉ LUIZ LAUS

Cessionária:

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" – UNESP

Testemunhas:

1. Keyla Santos Bento
CPF/MF: 323.669.268-55

2. Vitor Garcia Kopp
CPF/MF: 375.214.338-07

17AUIN013

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE ALGINATO-QUITOSANA-FUCOIDAM PARA RECONSTRUÇÃO CIRÚRGICA DA SUPERFÍCIE OCULAR

[001] CAMPO DE APLICAÇÃO

[002] Trata o presente relatório descritivo da patente de invenção de um biomaterial sintético obtido através de método à base de três polímeros de crustáceo e de algas marinhas. O produto pode ser utilizado como substrato para cultivo e carreamento de células, *graft* em cirurgias corneais superficiais, patch ou remendo em cirurgias que requerem revestimento temporário da superfície ocular, segundo os mais modernos conceitos bioquímicos e de acordo com as normas e especificações exigidas, revestindo-se de características próprias e dotadas com requisitos fundamentais de novidade e atividade inventiva, fazendo resultar uma série de reais e extraordinárias vantagens técnicas, práticas e econômicas.

[003] ANTECEDENTES DA PRESENTE INVENÇÃO

[004] Como é do conhecimento dos técnicos no assunto, as afecções de superfície ocular caracterizam-se por alterações morfofuncionais heterogêneas, de fisiopatogenia variável (HOLLAND et al., 2015). Fatores hereditários, idiopáticos ou adquiridos têm sido apontados como causas ensejantes. Tais afecções se manifestam, especialmente, como condições alérgicas, tóxicas ou inflamatórias. Medicamentos de uso sistêmico ou local podem contribuir para o estabelecimento das lesões (BRIGHTBILL et al., 2008). As afecções de superfície ocular, geralmente, surgem acompanhadas de blefarite, de disfunção das glândulas meibomianas, do glaucoma ou de hipoplasia da fóvea ou do nervo óptico (HOLLAND et al., 2015). Os sinais clínicos mais evidentes são o blefarospasmo, a fotofobia, o edema, a secreção ocular e a neovascularização corneal (GOMES et

al., 1999; LAUS & ORIÁ, 1999).

[005] As lesões de maior repercussão são as que se estendem para o limbo, induzindo perda de células tronco (CTs) e suscitando a uma condição clínica conhecida como deficiência de células tronco límbicas (LSCD). Dependendo do quantitativo de CTs perdidas, o epitélio corneal perde a estabilidade físico-química e se torna vulnerável à invasão por células epiteliais globulares produtoras de mucina, provenientes da conjuntiva (KIM & TSENG, 1995; PUANGSRICHAREN & TSENG, 1995; DANIELS et al., 2001; DUA et al., 2003; DUA et al., 2004). A conjuntivalização secundária à LSCD está acompanhada por graus variáveis de reparação estromal e de opacidade corneal, que proporcionam diminuição ou perda da visão em casos mais graves (DUA et al., 2003; BAYLIS et al., 2011). Estima-se que 65% dos casos de conjuntivalização se apresentem como lesões difusas associadas à perda total de CTs límbicas (BAYLIS et al., 2011).

[006] Condutas terapêuticas nas afecções de superfície ocular, notadamente quando há LSCD, apoiam-se na restauração funcional do estroma e na reposição das CTs perdidas. Em 1983, Thoft & Friend realizaram a primeira tentativa de transplante límbico alógeno. Durante o procedimento, denominado ceratoepitelioplastia, lentículas de estroma corneal coberto por epitélio eram implantadas no estroma límbico. Em 1989, o transplante de limbo córneo-conjuntival emergiu como opção promissora, porém, para a obtenção de tecido viável, realizavam-se biópsias demasiadamente extensas e de risco para o olho doador, inviabilizando, em alguns casos, o sucesso dos procedimentos autógenos ou dos alógenos entre indivíduos vivos (KENYON & TSENG, 1989; TSAI et al., 1990). Fragmentos do limbo, da conjuntiva, ou o anel corneoescleral, de doador cadáver, podem

ser empregados no tratamento da LSCD, porém, obrigam que se associe imunossupressão sistêmica prolongada. Ademais, estima-se que 24% dos casos tratados com tecidos de cadáver evoluem para falência e recidiva da LSCD, no interregno de cinco anos (SOLOMON et al., 2002).

[007] A reconstrução da superfície ocular pela transplantação de membranas biológicas (notadamente a membrana amniótica (MA) humana) ou sintéticas que mimetizam o microambiente do nicho das CTs/células progenitoras é o método de eleição para se tratar lesões de superfície ocular, notadamente as que culminam em LSCD (DUA et al., 2004). As membranas podem ser utilizadas/transplantadas como graft ou como patch (remendo) para revestimento temporário da superfície ocular.

[008] Apesar de a MA humana ser um biomaterial promissor, sua obtenção depende da doação espontânea de placentas, o que, muitas vezes, dificulta sua seleção, estocagem e padronização estrutural, para fins terapêuticos. À similitude do que ocorre com outros materiais biológicos, as propriedades da MA humana variam de acordo com a “doadora”, dificultando a reprodutibilidade dos resultados clínicos. As condições nutricionais da gestante doadora, o tempo de gestação e o sexo do bebê parecem modular a síntese de fatores de crescimento do âmnion, notadamente do fator transformador de crescimento beta (TGF-beta) e do fator de crescimento epidérmico (EGF) (HOPKINSON et al., 2006). Ademais, Connon et al. (2010) estabeleceram que a espessura, o índice de refração e a transparência da MA humana variam segundo sua localização na placenta em relação ao cordão umbilical. Outro problema é que aplicações de membranas biológicas, por se tratar de produto de origem animal, não são aceitas por praticantes ou seguidores de algumas religiões.

[009] À medida que os procedimentos para reconstrução da superfície ocular adquirem popularidade mundial, ampliar a gama de biomateriais alternativos (grafts/patches), estruturalmente uniformes e capazes de suportarem o crescimento de células, sem desestabilizá-las, além de se integrarem à córnea, sem risco de rejeição, tornou-se necessidade que tem mobilizado diversos grupos de pesquisadores.

[010] Muitos polímeros têm sido testados como matéria prima para a confecção de membranas sintéticas destinadas à bioengenharia de tecidos. Notadamente os polímeros obtidos do exoesqueleto de artrópodes marinhos e da matriz extracelular de algas marrons são facilmente encontrados na natureza, e apresentam características físicas e biológicas relevantes para a ciência de biomateriais e a medicina regenerativa (AZEVEDO et al., 2007; D'AYALA et al., 2008; HACKET et al., 2009; ZIBERMANN, 2011). Quitosana (Chi), alginato (Alg) e fucoidam (Fuc) são polímeros biocompatíveis e biodegradáveis que podem modular a expressão de diversos fatores de crescimento e atuar como agentes anti-inflamatórios, antivirais, antioxidantes e anticomplemento (AZEVEDO et al., 2007; D'AYALA et al., 2008; HACKET et al., 2009; ZIBERMANN, 2011).

[011] Sistemas constituídos pelos polímeros supramencionados têm sido amplamente usados para cultivar células adultas isoladas de vários tecidos de origem animal. A exploração dos polímeros de algas e de crustáceos, visando-se o desenvolvimento de produtos para aplicações clínico-cirúrgicas, segue princípios de processamento biotecnológico sustentável de recursos naturais marinhos. No Brasil, a ação biotecnológica marinha está regulamentada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) e tem por objetivos estimular e fomentar a utilização da biodiversidade existente nas zonas costeiras e de transição e nas áreas marítimas sob jurisdição de interesse

nacional, contribuindo para a promoção de inovações nas áreas de saúde, agropecuária, veterinária e industrial, bem como para o desenvolvimento econômico do país.

[012] Há evidências que alguns efeitos ou propriedades deles, quando em conjunto, podem ser melhorados ou alterados, em relação aos polímeros isolados. Por exemplo, adição de Fuc aos hidrogéis de Chi aumenta a bioadesividade desse produto, o que, no caso da superfície ocular, oferece a perspectiva da criação de um material bioativo que possa ser fixado à superfície corneal sem necessidade de suturas. Dispositivos formados por Chi e Alg são mais estáveis às alterações em pH e mais efetivos na liberação controlada de princípios ativos (WANG et al., 2001; ZIBERMANN, 2011). Compósitos de Fuc, Alg e Chi estão sendo empregados, com sucesso, na regeneração de cartilagens articulares e na fabricação de bandagens e curativos que aceleram a reparação de feridas da pele, com formação mínima de cicatrizes (MATSUI et al., 2001; RODRIGUES et al., 2008; MURAKAMI et al., 2010; ZIBERMANN, 2011). Há evidências que Fuc, Alg e Chi são capazes de modular atividades biológicas das células epiteliais de revestimento, incluindo a produção de ribossomos, a expressão das regiões organizadoras do nucléolo e os processos de divisão e proliferação (ZIBERMANN, 2011). Biomateriais (scaffolds) de Alg têm sido utilizados para carrear proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) e células progenitoras (ZIBERMANN, 2011; VENTAKETASEN et al., 2014). Constructos de Chi e Alg têm sido explorados na bioengenharia de tendões e de discos intervertebrais (HACKETT et al., 2009; ZIBERMANN, 2011). Compósitos de Chi, Alg, CTs mesenquimais e BMP-2 já foram empregados na confecção de ossos artificiais. Arcabouços de Chi enriquecidos com plasma rico em plaquetas têm sido testados na

regeneração óssea. O Fuc tem sido testado como modulador de infiltração leucocitária (durante a reparação corneal) e como substituto sintético da heparina (em cirurgia cardíaca). Evidências apontam que o Fuc, associado com outros polímeros, dentre eles a Chi, ativa o fator 1 derivado de célula estromal, promovendo recrutamento e proliferação de CTs (ZIBERMANN, 2011). Investigações visando uma possível aplicação em ortopedia mostraram que o Fuc aumenta os níveis in situ de fosfatase alcalina e promove a expressão de colágeno tipo I, de osteocalcina, de osteopontina, de fator de transcrição relacionado à Runt e de BMP-2 (VENTAKETASEN et al., 2014). Ele parece ser capaz de estimular a diferenciação de CTs derivadas de tecidos adiposos.

[013] Em oftalmologia, diferentes combinações ou concentrações de Chi, Alg e Fuc têm sido avaliadas, em caráter experimental, notadamente para a fabricação de dispositivos de liberação controlada e prolongada de antibióticos destinados ao tratamento de doenças oculares; de hidrogéis para cultivar células endoteliais destinadas à membrana de Descemet; e de microcápsulas para expandir células epiteliais do pigmento da retina (LIU et al., 2008; MOTWANI et al., 2008; WIKSTRÖN et al., 2008; HACKET et al., 2009; LIANG et al., 2010). Hidrogéis de Alg e matrizes de Chi já foram utilizados, com êxito, como substratos para cultivo de CTs límbicas corneais (OZTÜRK et al., 2006, LAI & HSIUE, 2007, YEH et al., 2007). Em córneas com queimadura por álcali, o Fuc foi experimentalmente usado para modular o processo de reparação tecidual (GAN et al., 1990); todavia, seu efeito sob células epiteliais límbicas corneais expandidas ex vivo permanece desconhecido.

[014] A literatura patentária não compreende, até o presente, protocolos para construção ou dados de aplicações de membranas

mistas de Fuc-Alg-Chi para aplicações oftálmicas, notadamente para aplicações como graft ou patch em cirurgias da superfície ocular, o que nos motivou a conceber a presente tecnologia. Portanto, a presente tecnologia foi motivada pela necessidade e o anseio científico de ampliar a gama de membranas sintéticas, estruturalmente uniformes, e capazes de se integrarem à córnea ou de protegê-la, minimizando riscos relacionados à transplantação de biomateriais. Ademais, ampliar a gama de biomateriais destinados à córnea é um dos caminhos para a individualização do tratamento de cada paciente, a melhora de resultados pós-operatórios e a abertura de novas possibilidades terapêuticas. O desenvolvimento de novas tecnologias, tal como a nossa, permite que mais pacientes com afecções da superfície ocular tenham acesso ao tratamento cirúrgico, incluindo aqueles que por razões religiosas não aceitam transplantação de membranas biológicas. A presente tecnologia, também, é uma alternativa acessível para tratar afecções corneais, como úlceras, em animais de companhia, como cães e gatos, ou de criação, como os cavalos.

[015] ESTADO DA TÉCNICA

[016] O documento de patente US20080102135 depositado em 01/05/2008 descreve um método de obtenção e armazenamento de membrana amniótica equina em cirurgias oftalmológicas veterinárias.

[017] O documento de patente US20160082151 depositado em 20/12/2013 descreve o método de preparação de material antibacteriano para reparo de córneas.

[018] O documento de patente WO2016171745 depositado em 25/04/2015 apresenta uma composição de matriz biomimética à base de colágeno, podendo ser utilizado como reparo terapêutico em cirurgias oftalmológicas.

[019] O documento de patente CA 2536923 depositado em 07/09/2004 apresenta o processo de produção de um compósito à base de matrizes biomiméticas extracelulares.

[020] Analisando os objetos dos documentos acima citados e conhecidos do estado da técnica, como poderá ser observado, tratam-se de tecnologias diversas da presente patente, de modo que nenhum apresenta integralmente as características construtivas da membrana de alginato-quitosana-fucoidam, objeto da presente patente.

[021] É, pois, um dos objetivos da presente patente prover um biomaterial sintético a base de três polímeros de crustáceo e de algas marinhas (quitosana com deacetilação de 85%, alginato, e extrato bruto de fucoidam de *Fucus vesiculosus*). Entende-se, por inovação, o protocolo de produção e o produto final. O biomaterial foi construído empregando-se princípios de química supramolecular, que envolveu associação dos três polímeros supramencionados por meio de reticulação térmica em estufa de circulação de ar, com temperatura constante de 37 graus Celsius, e de reticulação iônica por imersão em solução aquosa de cloreto de cálcio 2%. O produto final é uma membrana semitransparente, cujo estudo por microscopias revela fibras interconectadas em estrutura porosa, que possui capacidade limitada de intumescimento após imersão em água destilada, em tampão fosfato salino ou em solução aquosa de ácido acético 3%, é biodegradável e biocompatível com tecido corneal de mamíferos. As membranas podem ser embaladas individualmente e esterilizadas com óxido de etileno. A estocagem pode ser feita em temperatura ambiente.

[022] O produto pode ser utilizado como substrato para cultivo e carreamento de células, graft em cirurgias corneais superficiais, patch ou remendo em cirurgias que requerem revestimento temporário da

superfície ocular. Pode ser acomodado em lentes ou dispositivos de contato para uso como curativo biológico.

[023] O produto desenvolvido, por se tratar de membrana sintética, tem múltiplas vantagens sobre membranas biológicas. Incluindo as modificadas por processamento e comercialmente disponíveis, tradicionalmente utilizadas em cirurgias corneais, como as reconstrutivas da superfície ocular. Diferentemente das membranas biológicas, cuja algumas propriedades, inclusive as estruturais, variam em função de características inerentes ao indivíduo doador, nosso produto sintético é estruturalmente uniforme. Ele pode ser esterilizado e estocado em temperatura ambiente, sem necessidade de agentes crio-preservantes. A tecnologia é inclusiva, pois pode beneficiar pacientes com afecções corneais que por razões religiosas não aceitam tratamentos que envolvem membranas biológicas de origem animal. Pode também ser utilizada para tratar afecções corneais em animais de companhia, como os cães e os gatos, e de criação (cavalos, por exemplo). A eficiência do produto, na expansão de células epiteliais limbais corneais ex-vivo, é compatível com a da MA desepitelizada humana criopreservada, todavia, ele é isento de risco de transmissão de doenças virais. Como vantagem adicional o produto é biodegradável. Estudos ex-vivo e in vivo comprovaram a biocompatibilidade do produto com tecido corneal de mamíferos. O custo de produção das membranas, em larga escala, é baixo.

[024] As membranas foram produzidas empregando-se as seguintes matérias-primas: extrato bruto de fucoïdam (Fuc) da alga *Fucus vesiculosus*, na forma bruta; alginato de sódio (Alg); e quitosana (Chi) com grau de desacetilação mínimo de 85%.

[025] Duas soluções (A e B) foram preparadas e misturadas. A Preparação da solução A foi obtida com quitosana diluída a 1%

(massa/volume de solução) em 45 mL de solução aquosa de ácido acético glacial 2%. Em seguida, adicionou-se 45 mL de acetona. O Becker contendo a solução foi coberto com *parafilm* e a solução mantida sob agitação magnética constante de 100 rpm através de agitador magnético, até a dissolução completa da quitosana (4 horas).

[026] Para a solução B, preparou-se 90 mL de solução aquosa (água destilada) contendo 0,5% de alginato (massa/volume de solução) e 0,25% de fucoidam (massa/volume de solução). O Becker contendo a solução foi coberto com *parafilm* e a solução mantida sob agitação magnética constante de 100 rpm através de agitador magnético, até a dissolução completa do alginato e do fucoidam (4 horas).

[027] A solução B foi adicionada gota a gota sobre a solução A, sob agitação magnética constante de 100 rpm através de agitador magnético. A mistura obtida foi agitada por aproximadamente 48 horas a 100 rpm. Em seguida adicionou-se 16,54 mL de solução aquosa de NaOH 0,5%, sob agitação magnética de 1000 rpm, por 30 minutos. Na sequência, 1,5 mL de solução aquosa de cloreto de cálcio 2% foi adicionada à solução sob agitação de 1000 rpm, por 30 minutos. A solução resultante foi filtrada e desaerada em bomba de vácuo, por 100 minutos. Logo após, ela foi distribuída em placas de Petri de vidro (80 mm x 15 mm) para secagem. As placas foram colocadas em estufa com circulação de ar, em temperatura constante de 37 graus Celsius, por 24 horas. Após, as placas contendo as membranas foram retiradas da estufa e imersas por 20 segundos em solução aquosa de cloreto de cálcio 2%. Finalmente, as placas foram mantidas em repouso, por três dias, até a secagem das membranas, que foram, então, retiradas das placas de Petri e caracterizadas.

[028] A caracterização das membranas foi feita em três etapas. A primeira etapa compreendeu os testes de intumescimento,

degradação, as medidas de porosidade e a avaliação estrutural por microscopia eletrônica de varredura. O teste de intumescimento visou avaliar as características hidrofílicas das membranas e sua capacidade de absorção de fluídos. Fragmentos de membranas foram pesados e, individualmente, imersos em tampão fosfato salino (PBS), pH 7,4, ou em ácido acético 3%. Todas as amostras foram incubadas em temperatura ambiente controlada (8°C), sendo retiradas para pesagem após uma e 24 horas de imersão. Em cada tempo, elas foram pesadas três vezes para eliminação de erros sistemáticos. A taxa de intumescimento foi calculada com a média das três pesagens. Fragmentos de botões corneais hígidos (de coelhos) foram submetidos ao mesmo protocolo, para fins comparativos.

[029] O teste de degradação visou a avaliar o comportamento de materiais biodegradáveis em soluções que simulam as propriedades fisiológicas do sangue e dos fluidos corporais. Fragmentos de membranas foram incubados (37°C) em PBS, pH 7,4 contendo 1000 U/L de lisozima. As amostras foram pesadas imediatamente antes e a cada três dias após a imersão, até sua degradação total. Cada amostra foi lavada em água deionizada (para remoção de íons) e pesada três vezes. As taxas de degradação foram calculadas com a média das três pesagens.

[030] A presença de porosidades nas membranas foi avaliada pelo método de deslocamento dos líquidos. Inicialmente, um volume fixo de etanol PA foi calculado com base no peso seco de dez fragmentos do biomaterial. Ato contínuo, os fragmentos foram imersos em etanol por 48 horas e, então, pesados. A porosidade foi calculada com a fórmula: $(V2-V1-V3) / (V2-V3) \times 100$; onde V1 é o peso inicial da amostra, V2 é o peso resultante da soma do álcool com a amostra submersa e V3 é o volume do etanol após remoção da amostra.

[031] Após a fixação em glutaraldeído 3%, as membranas foram tratadas com tetróxido de ósmio e desidratadas em soluções crescentes de etanol. Em seguida, foram secadas em câmara de dióxido de carbono (37°C e sob pressão de 1500 PSI), metalizadas em ouro e montadas com fita adesiva. As avaliações foram realizadas com acelerações de 15 Kv.

[032] A segunda etapa do desenvolvimento compreendeu os estudos ex-vivo. Os procedimentos foram executados empregando-se protocolo de cultura em explante. O intento está recomendado para o estabelecimento de culturas primárias, quando se dispõe de pouca quantidade de tecido, e visando-se a minimizar o risco de perdas celulares por desagregação enzimática. Fragmentos de membranas de Fuc-Alg-Chi foram fixados dentro de insertos posicionados em placas de seis poços, para não emergirem durante o cultivo. Explantes de limbo corneoescleral removidos de coelhos foram, com a face epitelial voltada para cima, sobre a região central dos substratos mencionados. Alguns explantes de limbo foram plaqueados, sem membrana de retroalimentação (para fins de controle). As condições (incubadora com 5% de CO₂ e temperatura constante de 37°C) e o meio de cultura foram os mesmos para todos: DMEM/HAM-F12 contendo 10% de soro fetal bovino, 0,5% de dimetilsulfóxido, 5 ng/mL de selenato de sódio, 5 ug/mL de apo-transferrina, 2 ng/mL de fator de crescimento epidermal, 0,1 µg/mL de toxina colérica, 1 µg/mL de insulina, 5 µg/mL de hidrocortisona, penicilina, estreptomicina e anfotericina B. As amostras foram cultivadas por 15 dias. O meio de cultura foi trocado a cada três dias. Cada amostra recebeu 2,5 mL de meio de cultura (por troca). As culturas foram monitoradas diariamente, em relação ao crescimento, migração e morfologia celulares, em microscopia de luz invertida (Axio Observer, Zeiss,

Göttingen, Germany).

[033] As áreas de crescimento epitelial foram mensuradas, em “pixels”, no décimo quinto dia de cultivo, empregando-se software Image J. Ao término dos procedimentos em cultivo celular, as amostras foram encaminhadas à confecção de cortes histológicos.

[034] As amostras foram avaliadas quanto a expressão do par de citoqueratinas 3/12 (K3/K67) e a do fator de transcrição nuclear delta p63 (marcador positivo de células progenitoras). Os dados foram avaliados, subjetivamente, por um único examinador, qualitativamente, segundo a intensidade das imunomarcações, em ausente (-), discreto (+), moderado (++) e intenso (+++).

[035] A terceira etapa do desenvolvimento foi a realização dos estudos in vivo. Foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) da raça Nova Zelândia Branco, adultos, machos ou fêmeas, com peso médio de 3 kg. Eles foram mantidos individualmente, em ambiente ventilado, em gaiolas apropriadas, limpas e higienizadas, com dieta à base de ração comercial e de água potável, à vontade. Previamente à inclusão na pesquisa, os coelhos foram avaliados à semiotécnica oftálmica balizada no teste lacrimal de Schirmer, na biomicroscopia com luz em fenda, na tonometria de aplanção, na oftalmoscopia binocular indireta e na prova do tingimento pela fluoresceína. Apenas os livres de alterações oculares e em aparente higidez sistêmica foram utilizados.

[036] Foram formados três grupos de pesquisa: os dois primeiros constituídos por olhos direitos de 24 coelhos (12 coelhos por grupo), que foram submetidos a procedimento cirúrgico para confecção de um “bolso” no estroma corneal anterior, o qual recebeu (grupo I, experimental) ou não (grupo II, controle negativo) uma membrana de Fuc-Alg-Chi. Os olhos foram avaliados quanto à ocorrência de

manifestações clínicas (blefarospasmo, secreção ocular, hiperemia conjuntival, opacidade e neovascularização), empregando-se critérios quali-quantitativos (manifestação ausente, discreta, moderada, ou severa). Após as avaliações, quatro coelhos de cada grupo foram escolhidos, ao acaso, para eutanásia e colheita das córneas para avaliações à microscopia de luz comum e à microscopia de luz polarizada.

[037] As membranas construídas com Fuc, Alg e Chi apresentaram-se com absorção de fluídos similar ao da córnea (ou seja, intumesceram), após imersão em água, tampão fosfato salino ou solução de ácido acético glacial 3%. Em todos os meios de embebição, as membranas ganharam peso após 1 hora de imersão, quando comparadas ao basal ($P < 0,01$) (Figuras 1, 2 e 3). Em 24 horas, elas tenderam a estabilização e absorveram pouca quantidade de fluídos (a absorção contínua e exacerbada de fluídos poderia ensejar desarranjo fibrilar e degradação precoce das membranas, inviabilizando a sua utilização como substrato de cultivo). As membranas, no ensaio in vitro, degradaram 18 dias após a imersão em solução enzimática.

[038] As membranas apresentaram poros cujos tamanhos variaram entre 61 e 308 μm . Estudos à microscopia eletrônica de varredura confirmaram que as membranas de Fuc-Alg- Chi são constituídas fibras interconectadas, em uma estrutura porosa e estruturalmente “grosseira”.

[039] Relativamente aos cultivos celulares, os explantes límbicos e as células que dele migraram aderiram à membrana de Fuc-Alg-Chi. Células aderentes apresentaram-se com formato poliédrico, enquanto células não aderentes foram globulares. Crescimento e migração de células foram observados, a partir do quinto dia de cultivo, em 85%

das amostras. Células diferenciadas, positivas para a expressão de K3/K12 (citoqueratinas específicas do epitélio corneal), foram observadas em todas as amostras. A membrana de Fuc-Alg-Chi atuou como nicho biológico substituto que favoreceu a diferenciação a diferenciação do epitélio corneal, ao mesmo tempo em que preservou sua “stemness”, como demonstrado pela presença de células progenitoras imunopositivas para o fator de transcrição nuclear p63 (4,3% da população celular total).

[040] Após implantação das membranas no tecido corneal, avaliações à microscopia mostraram epitelização, densidade de células estromais e organização de colágeno dentro da normalidade. Edema não foi observado. A implantação da membrana não suscitou alterações histopatológicas sugestivas de inflamação ou de reações imunológicas. No trigésimo dia de avaliação não se observaram vestígios da membrana, indicando que ela havia sido totalmente degradada. O sítio de implantação da membrana evoluiu com remodelamento e reparo tecidual.

[041] BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[042] Para complementar a presente descrição, de modo a obter uma melhor compreensão das características da presente patente, e de acordo com uma preferencial realização prática da mesma, acompanha a descrição, em anexo, um conjunto de figuras, onde de maneira exemplificada embora não limitativa, se representa o seguinte:

[043] As figuras 1A e 1B representam o perfil de intumescimento da membrana de Fuc-Alg-Chi (A) e da córnea (B), após imersão em água.

[044] As figuras 2A e 2B representam o perfil de intumescimento da membrana de Fuc-Alg-Chi (A) e da córnea (B), após imersão em

tampão fosfato salino.

[045] As figuras 3A e 3B representam o perfil de intumescimento da membrana de Fuc-Alg-Chi (A) e da córnea (B), após imersão em ácido acético 3%.

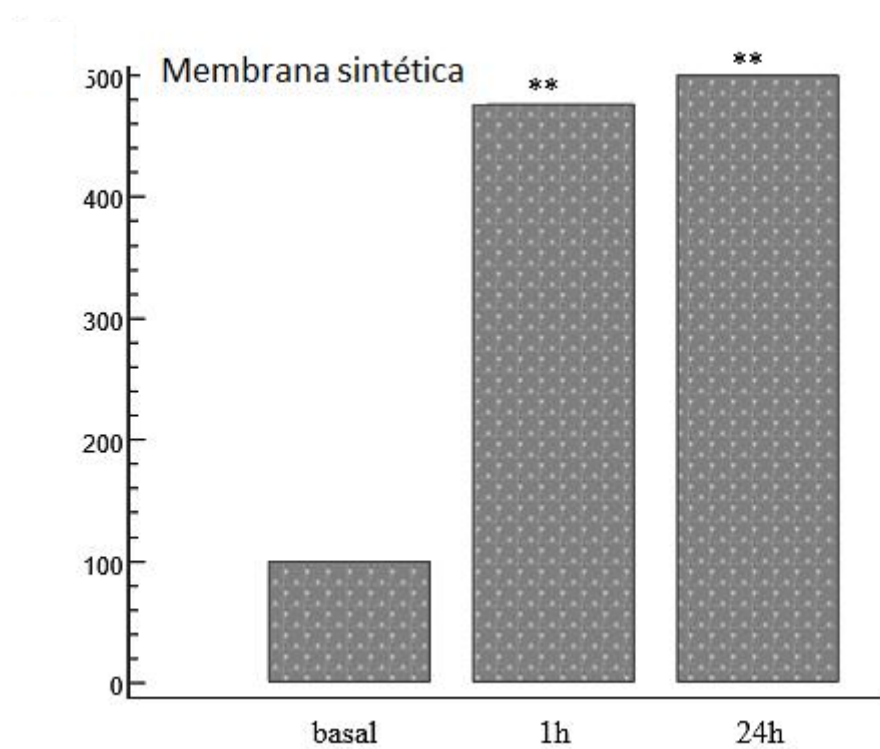
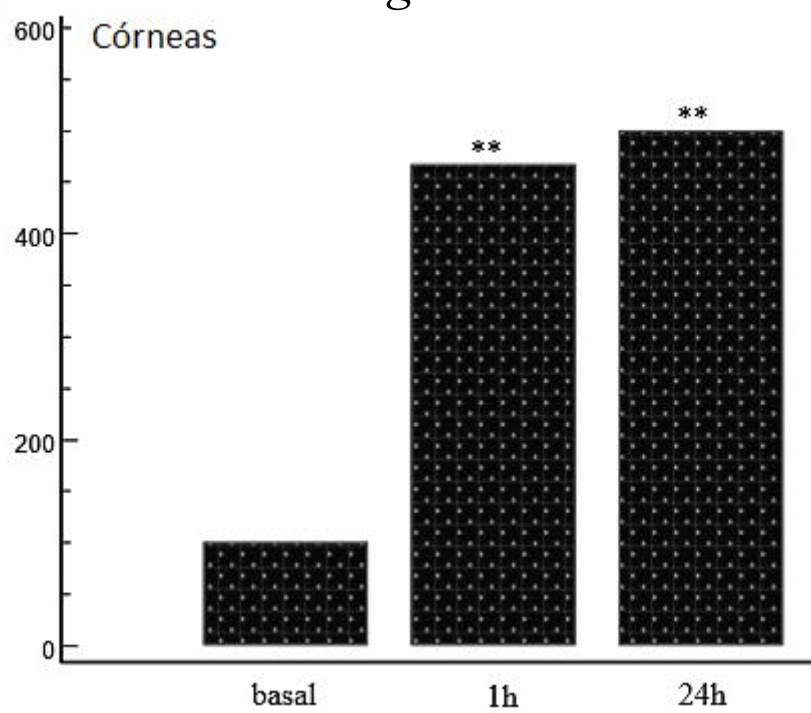
[046] Tendo sido descrita e ilustrada a presente invenção, é para ser compreendido que a mesma pode sofrer inúmeras modificações e variações em sua forma de realização, desde que tais modificações e variações não se afastem a partir do espírito e escopo da invenção, tal como definido no quadro reivindicatório.

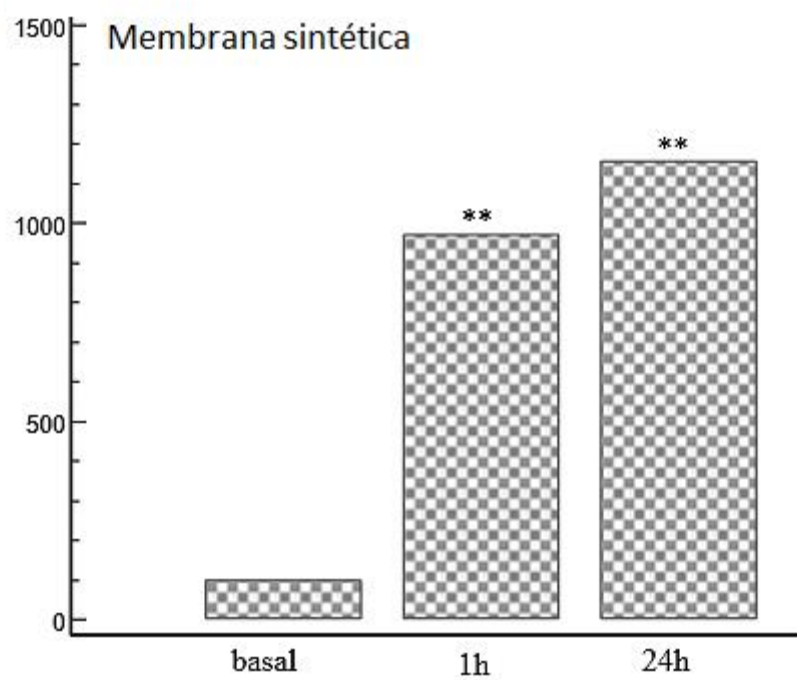
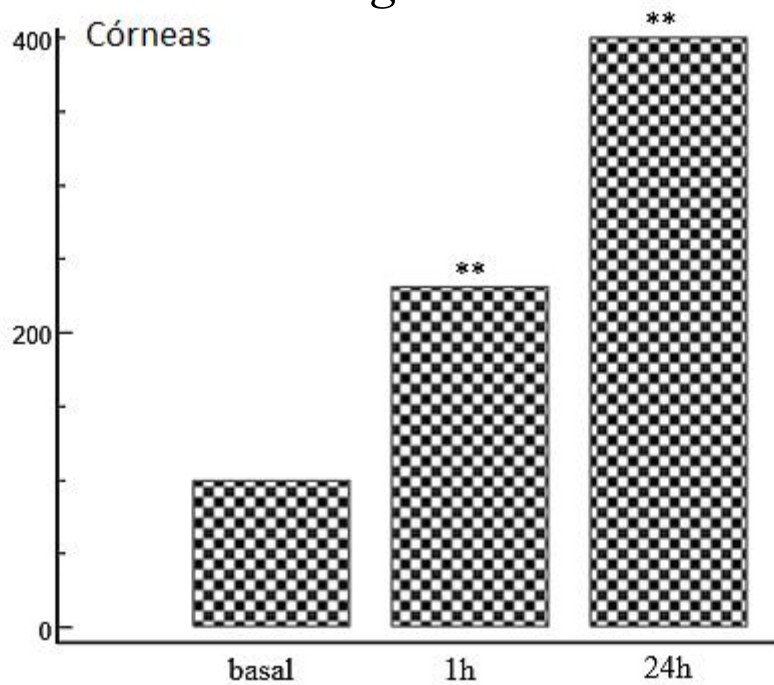
REIVINDICAÇÕES

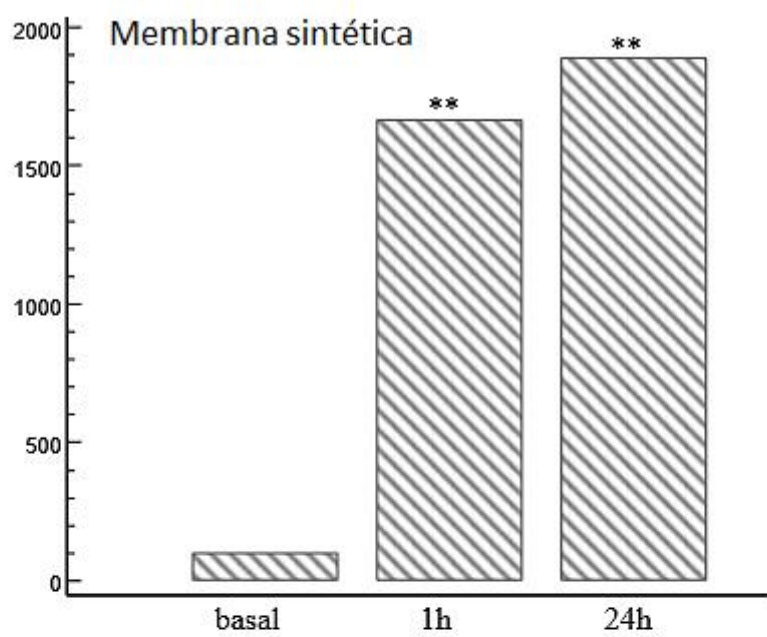
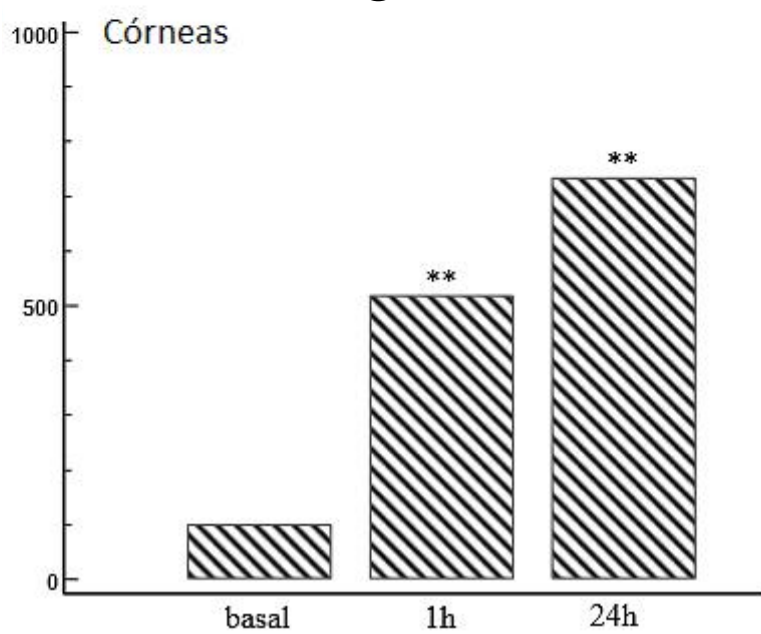
1 – PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE ALGINATO-QUITOSANA-FUCOIDAM PARA RECONSTRUÇÃO CIRÚRGICA DA SUPERFÍCIE OCULAR, caracterizado pela ação de misturar solução de alginato, solução de quitosana entre 70% e 95% e solução de extrato bruto de fucoïdam de *Fucus vesiculosus*, promover a reticulação térmica e promover a reticulação iônica.

2 – PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE ALGINATO-QUITOSANA-FUCOIDAM PARA RECONSTRUÇÃO CIRÚRGICA DA SUPERFÍCIE OCULAR, caracterizado pelo fato de proporcionar membranas sintéticas compreendendo alginato, quitosana entre 70% e 95% e extrato bruto de fucoïdam de *Fucus vesiculosus*.

3 – PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE ALGINATO-QUITOSANA-FUCOIDAM PARA RECONSTRUÇÃO CIRÚRGICA DA SUPERFÍCIE OCULAR, de acordo com a reivindicação 2, caracterizado pelo fato de implantar membranas de alginato, quitosana entre 70% e 95% e extrato bruto de fucoïdam de *Fucus vesiculosus* na córnea de humanos e de animais.

*Fig. 1A**Fig. 1B*

*Fig. 2A**Fig. 2B*

*Fig. 3A**Fig. 3B*

RESUMO

PROCESSO DE OBTENÇÃO DE MEMBRANAS DE ALGINATO-QUITOSANA-FUCOIDAM PARA RECONSTRUÇÃO CIRÚRGICA DA SUPERFÍCIE OCULAR

É descrita a patente de invenção pertencente ao campo dos produtos que envolvem membranas sintéticas para reconstrução da superfície ocular, de humanos e de animais, que compreende a utilização de polímeros marinhos biocompatíveis, tais como alginato, quitosana e fucoïdam de *Fucus vesiculosus*. Por se tratarem de membranas sintéticas, fabricadas sob condições controladas, apresentam uniformidade estrutural. Ademais, podem ser esterilizadas e armazenadas em temperatura ambiente, sem necessidade de agentes criopreservantes.