



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102021002043-1 A2



(22) Data do Depósito: 03/02/2021

(43) Data da Publicação Nacional: 16/08/2022

(54) **Título:** MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE AGENTES HEMOSTÁTICOS E ANTIHEMORRÁGICOS A BASE DE PECTINAS; AGENTES HEMOSTÁTICOS E ANTIHEMORRÁGICOS A BASE DE PECTINAS E SEU USO

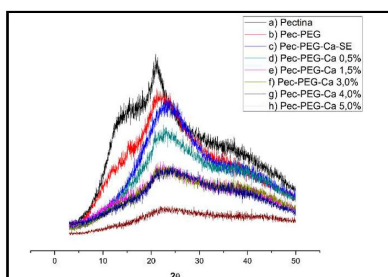
(51) **Int. Cl.:** A61L 15/28; A61L 15/64.

(52) **CPC:** A61L 15/28; A61L 15/64.

(71) **Depositante(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO.

(72) **Inventor(es):** JOSE GERALDO NERY; OSCAR ANTONIO NIÑO SANTISTEBAN; GUILHERME MOLINARI SACCO.

(57) **Resumo:** MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE AGENTES HEMOSTÁTICOS E ANTIHEMORRÁGICOS A BASE DE PECTINAS; AGENTES HEMOSTÁTICOS E ANTIHEMORRÁGICOS A BASE DE PECTINAS E SEU USO. O presente pedido de patente de invenção refere-se a uma nova tecnologia que consiste no método de preparação de agentes hemostáticos e anti-hemorragicos a base de pectinas, assim como o biopolímero de pectina e seus derivados como agentes hemostáticos para uso em aplicações cirúrgicas e odontológicas. Os novos agentes hemostáticos a base de pectina foram sintetizados, caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas, e sistematicamente modulados para atuarem com maior eficiência na cascata de coagulação. Os estudos da ação hemostática dos novos agentes derivados de pectina foram feitos in vitro, empregando-se para isso análises tromboelastográficas, comparadas à ação de agentes hemostáticos comerciais à base de quitosana, celulose e materiais inorgânicos e sua ação foi superior aos dos agentes hemostáticos comerciais. A avaliação de parâmetros tais como: a) o tempo reação para de formação de um coágulo de com tamanho de aproximadamente 2 mm, o que caracteriza o início da produção de fibrina, b) o tempo de formação de um coágulo firme de 20 mm e a taxa de geração de trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina,(...).



## **MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE AGENTES HEMOSTÁTICOS E ANTI-HEMORRÁGICOS A BASE DE PECTINAS; AGENTES HEMOSTÁTICOS E ANTI-HEMORRÁGICOS A BASE DE PECTINAS E SEU USO**

[001] O presente pedido de patente de invenção refere-se a uma nova tecnologia que consiste no método de preparação de agentes hemostáticos e anti-hemorrágicos a base de pectinas, assim como o biopolímero de pectina e seus derivados como agentes hemostáticos para uso em aplicações cirúrgicas e odontológicas.

### **CAMPO DE APLICAÇÃO**

[002] O presente pedido de patente de invenção refere-se para uso em aplicações cirúrgicas e odontológicas.

### **ESTADO DA TÉCNICA**

[003] O documento CA2666158 A1, intitulado “*MATERIAL / DISPOSITIVO HEMOSTÁTICO FUNCIONAL DE NANO-CAMADA*” utiliza um nano-revestimento de um óxido, como sílica, um silicato ou outro óxido eficaz em uma superfície para acelerar a coagulação do sangue em mamíferos e animais. A camada hemostática tem uma espessura que é eficaz para a hemostasia, mas pode ser feita fina o suficiente para resultar em um filme reabsorvível que pode ser aplicado a um dispositivo biocompatível ou reabsorvível que pode ser usado em aplicações cirúrgicas, bem como em aplicações tópicas como trauma.

[004] No documento “*Potential hemostatic agent based on extracted pectin from calamansi peels (Citrus microcarpa) blend with polyethylene oxide*” é descrito o potencial hemostático da pectina. No entanto, os inventores utilizam apenas um tipo de pectina (no caso a pectina extraída da *Citrus microcarpa*, deixando, portanto, em aberto a possibilidade do uso de outras fontes de pectinas, como o ácido D-Galacturônico. A presente invenção pode ser usada para diferentes pontes de pectina com diversos graus de metilização (*degree of methylation*). Ainda, os autores usam a técnica de radiação gama para efetuação das reações de *cross-linking*. Na presente tecnologia, as reações de *cross-linking* são feitas usando temperatura na faixa 40-50°C. Analisando a tecnologia descrita na patente identificam-se importantes diferenças em relação ao que presente pedido de patente de invenção. O presente pedido de patente de invenção

utiliza apenas um tipo de pectina (no caso, a pectina extraída da *Citrus microcarpa*, deixando, portanto, em aberto, a possibilidade do uso de outras fontes de pectinas (ácido D-Galacturônico)). No presente pedido de patente de invenção pode ser usada para diferentes pontes de pectina com diversos graus de metilização (*degree of methylization*). A patente usa a técnica de radiação gama para efetuação das reações de *cross-linking*. O presente pedido de patente de invenção, as reações de *cross-linking* são realizadas utilizando a temperatura na faixa 40-50°C.

[005] O documento CA2836067 A1 intitulado “*CURATIVOS E SELANTES HEMOSTÁTICOS DE GELATINA-TRANSGLUTAMINASE*”, refere-se a um material adesivo para uso médico compreendendo gelatina e um material de reticulação não tóxico, como a transglutaminase. Uma forma de realização opcional da invenção inclui pensos nos quais uma camada de uma transglutaminase é ensanduichada entre uma primeira e uma segunda camada de gelatina. Os produtos hemostáticos são úteis para o tratamento de tecidos feridos.

[006] O documento CA2873162 A1, intitulado “*FOLHA FORMADA DE PRODUTO E MATERIAL HEMOSTÁTICO*”, fornece os seguintes: uma folha de moldagem de uma composição de polímero que contém pelo menos um tipo de substância proteica selecionada de entre o grupo que consiste em fibrinogênios e trombinas e pelo menos um tipo de polímero selecionado de entre o grupo que consiste em poliésteres alifáticos e água polímeros solúveis; e uma folha moldada laminada contendo uma primeira camada de composição de polímero contendo um fibrinogênio e um polímero solúvel em água e uma segunda camada de composição de polímero contendo uma trombina e um poliéster alifático. Essas molduras de folha são aplicadas nos locais da ferida e funcionam como materiais hemostáticos.

[007] O documento AU 2001255716 B2 intitulado “*Hemostatic compositions of polyacids and polyalkylene oxides and methods for their use*”, destaca-se que a patente apresenta ação hemostática devido à presença da trombina apenas. Ou seja, alega que qualquer combinação complexa de óxido polialcalinos (PO) e poliácidos (PA), só possuem ação hemostática com a adição de trombina. Enquanto na presente tecnologia a ação hemostática pode ocorrer sem/com a presença de agentes biológicos

ativos (trombina, fibrina, albumina). A referida patente revela uma diferença entre a ação hemostática da apresentada em seu descritivo com o presente pedido de patente de invenção. Mostra-se claramente explícito que o material apresentado ou descrito na patente só tem ação hemostática devido à presença da trombina. Ou seja, os ensinamentos da referida patente alegam que qualquer combinação complexa de óxido polialcalinos (PO) e poliácidos (PA), só possuem ação hemostática com a adição de trombina. Essa é uma diferença enorme entre o pedido de patente de invenção aqui pleiteado e o material descrito na referida patente. Em geral os agentes hemostáticos podem ser classificados como agentes hemostáticos passivos ou ativos. O material descrito no presente pedido de patente de invenção pode ser ativo ou passivo, ou seja, sua ação hemostática pode ocorrer tanto na presença de proteínas (Trombina, Fibrina, Albumina) ou não. No caso da patente em questão, em todos os processos descritos ou métodos, há a necessidade da adição exclusivamente de trombina. O material descrito nessa patente tem sua ação hemostática apenas com a adição de trombina. No material do presente pedido de patente de invenção, essa ação hemostática pode ocorrer sem/com a presença de agentes biológicos ativos (trombina, fibrina, albumina).

#### OBJETIVOS DA INVENÇÃO

[008] Os objetivos do presente pedido de patente de invenção são: a síntese dos novos agentes hemostáticos a base de pectina, assim como a caracterização por diferentes técnicas espectroscópicas, e sistematicamente modulados para atuarem com maior eficiência na cascata de coagulação. Os estudos da ação hemostática dos novos agentes derivados de pectina foram feitos *in vitro*, empregando-se para isso análises tromboelastográficas, comparadas à ação de agentes hemostáticos comerciais à base de quitosana, celulose e materiais inorgânicos e sua ação foi superior aos dos agentes hemostáticos comerciais. A avaliação de parâmetros tais como: a) o tempo reação para de formação de um coágulo de com tamanho de aproximadamente 2 mm, o que caracteriza o início da produção de fibrina, b) o tempo de formação de um coágulo firme de 20 mm e a taxa de geração de trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina, c) propriedade elástica da fibrina formada e adesão plaquetária.

#### DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO E DAS FIGURAS

[009] Apesar dos avanços na intervenção médica, as complicações hemorrágicas continuam a ser uma das principais causas de morte em todo o mundo. Assim, o desenvolvimento de métodos eficazes para o tratamento de hemorragias descontroladas tornou-se uma das prioridades em vários centros de pesquisa médica.

[010] Por definição um agente hemostático ideal deve ter a capacidade de interromper o sangramento arterial e venoso, estar disponível para uso imediato, ser funcional e de fácil aplicação, leve, durável, estável e, seguro e de baixo custo.

[011] Atualmente, existem no mercado, agentes hemostáticos feitos à base de materiais inorgânicos e orgânicos, ou mesmo compósitos. Entre os materiais orgânicos destaca-se o grupo de agentes hemostáticos elaborados a partir de biopolímeros naturais tais como quitosana e celulose. O conjunto de certas características inerentes desses biopolímeros tais como o tamanho de suas cadeias moleculares, a possibilidade e facilidade de modulação da densidade de cargas dessas cadeias, controle do grau de cristalinidade, da área superficial externa, do grau de hidrofobicidade/hidrofilicidade, e-biocompatibilidade favorecem seu uso como matéria-prima para a produção de agentes hemostáticos tópicos.

[012] O potencial hemostático dos biopolímeros como a quitosana e celulose levou ao desenvolvimento e comercialização de produtos tais como *Surgicel* (produto a base de celulose, comercializado pela Johnson-Jonhson) e *Lyostypt®* e *Hemocon* (produto a base de quitosana comercializado pela empresa Tricol Biomedical Inc.). Embora, os biopolímeros quitosana e celulose encontram aplicações como agentes hemostáticos, o mesmo não ocorre com outro biopolímero abundante na biomassa brasileira: a pectina. Quimicamente a pectina é constituída essencialmente por ésteres metílicos parciais do ácido poligalacturônico com um peso molecular máximo de 150.000 Daltons, podendo se obtida por extração aquosa de um material vegetal comestível (geralmente frutos cítricos ou maçã), seguido de uma precipitação seletiva feita com o emprego de álcool e sais. Frutos cítricos e maçãs possuem uma alta concentração de pectina e estão disponíveis em quantidade suficiente para que seu processo de industrialização seja economicamente viável, pois já são parte de uma biomassa abundante resultante do final de uma cadeia produtiva já fortemente estabelecida e inserida na economia

brasileira e mundial (no caso a indústria de sucos cítricos).

[013] A inovação tecnológica e inventiva reivindicada no presente pedido de patente de invenção abrange o desenvolvimento de agentes hemostáticos a base de pectinas para aplicações cirúrgicas e odontológicas.

[014] Agentes hemostáticos a base de pectina foram sintetizados, caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas, e sistematicamente modulados para atuarem com maior eficiência na cascata de coagulação. O estudo da ação hemostática dos novos agentes derivados de pectina foi feito *in vitro*, empregando-se para isso análises tromboelastográficas, comparadas à ação de agentes hemostáticos à base de quitosana, celulose e agentes hemostáticos inorgânicos tais como zeólitas. As principais variáveis estudadas foram:

- a) o tempo reação para de formação de um coágulo de com tamanho de aproximadamente 2 mm, que caracteriza o início da produção de fibrina;
- b) o tempo de formação de um coágulo firme de 20 mm e a taxa de geração de trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina;
- c) a caracterização da propriedade elástica da fibrina formada e da adesão paqueraria.

[015] Os testes tromboelastográficos foram realizados em cooperação com o Hemocentro da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-FAMERP, usando amostras de sangue de pacientes voluntários dos seguintes grupos:

- a) pacientes normais;
- b) com deficiência congênita de fatores de coagulação (trombofilias e hemofilia) e;
- c) com deficiência adquirida de fatores de coagulação (hepatopatias crônicas).

[016] No que tange à preparação dos agentes hemostáticos e anti-hemorrágicos na forma de filmes e esponjas à base de Pectina, as etapas são a seguir explicadas:

- Preparação de filmes hemostáticos a base de pectina usando método *cross-linking* por difusão em meio contendo íons de cálcio

[017] A síntese foi elaborada no procedimento experimental descrito por Rezvanian *et al*, com as modificações necessárias para que se obtivesse o material hemostático e anti-hemorrágico com as características e propriedades reivindicadas nesse pedido de patente.

[018] Entre os diversos procedimentos experimentais possíveis de preparação do material, um exemplo típico é descrito da seguinte maneira:

[019] Pectina (*Pectin from citrus peel Galacturonic Acid 74% Aldrich; MW 25,000~50,000*), foi dissolvida em uma solução composta de Glicerol 50% (w/w), Etanol 20% (w/w) e Água Destilada 30% (w/w), e mistura reacional foi mantida sob agitação constante (1000 rpm) a 40°C/3h. Concomitantemente soluções de CaCl<sub>2</sub> em diferentes concentrações (0,5%, 1,5%,3%,4% e 5%) (w/v) e Polietileno Glycol PEG 7% (w/w) foram preparadas, e em adicionadas lentamente à solução de pectina até completa homogeneização, e formação de uma membrana de hidrogel. A membrana de hidrogel foi recuperada por filtração, e lavada com água deionizada até que pH=7.0, em seguida foi transferida para uma placa de petri e seca em estufa a 50°C/12h, e o produto final é obtido na forma de filme.

- Síntese de Esponjas Hemostáticas e anti-hemorrágicas por Cross-Linking através do Método de Configuração Interna

[020] A síntese foi baseada no trabalho experimental reportado por Veronovski *et al.*, com as modificações necessárias para que se obtivesse esponjas hemostática e anti-hemorrágicas com as características e propriedades reivindicadas nesse pedido de patente.

[021] Entre os diversos procedimentos experimentais possíveis, um exemplo típico da preparação de esponjas hemostáticas a base de pectina é descrito da seguinte maneira:

[022] Pectina (2 g) (*Pectin from citrus peel Galacturonic Acid 74% Aldrich; MW 25,000~50,000*) 2% (w/w) foi dissolvida e agitada em água destilada (85 mL) e etanol (15 mL), e mantida sob agitação constante por 2h. Após homogeneização da solução de pectina, foi adicionado 0,15 g de Na(PO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> 1.5 %w/w), e a reação foi mantida à 40° C por 30 min, seguida da adição de 120g de CaHPO<sub>4</sub> (w/w), e a agitação foi mantida constante até completa homogeneização da solução. A estabilização do pH da solução foi feita pela adição de uma solução de ácido-δ-lactone (2M) até que o pH=7.0 fosse alcançado. O hidrogel formado foi vertido em uma cuba de vidro circular, raio de 10 cm, onde a esponja foi moldada no formato circular, e a cuba

contendo a solução gel foi colocado em ambiente refrigerado para que a solidificação da esponja hemostática fosse completa. Os graus de desidratação das esponjas hemostáticas foram controlados através da imersão da esponja hemostática em solução de etanol/água nas seguintes proporções: etanol/H<sub>2</sub>O nas proporções: 10/90; 30/70; 50/50; 70/30 e solução 100 % de etanol. Após a imersão da esponja na solução etanol/H<sub>2</sub>O, o produto foi seco a 50 °C por 48 horas para remoção do resíduo de etanol. O produto final (esponja hemostática a base de pectina) foi liofilizada e esterilizada com óxido de etileno, de acordo com o protocolo da Anvisa de esterilização.

- Síntese do filme hemostático de pectina em meio contendo cálcio (0,5% de CaCl<sub>2</sub>) através do método de *Cross-Linking* por difusão (Pec-PEG-Ca 0.5%)

[023] 5g de Pectina de casca de laranja (*Sigma-Aldrich pectin from citrus peel, galacturonic acid ≥ 74%, 19500 g/mol*), foi misturada com 100 mL de água Destilada (pH aprox.7) , e 2.5 g de PEG 400W (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol Av. Mol.wt:400 (PEG)*) em um béquer , e mantido sob agitação constante (800 rpm) numa temperatura controlada de 50°C até completa homogeneização. Após completa homogeneização do gel, foram adicionado 10 ml de álcool etílico (*Sigma-Aldrich Ethanol ACS reagent ≥ 99,5%*), e a reação prosseguiu por mais 1 hora sob agitação constante. Em seguida, 20 g do gel foi colocado em uma placa petri e seco numa estufa por 48 horas, a uma temperatura de 50°C. Após a secagem do filme, o procedimento de *cross-linking* foi preparado da seguinte maneira:

[024] Uma solução de 100 mL de água destilada (pH 7 aprox.), 7 mL de PEG (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol*) e 0.5 g de CaCl<sub>2</sub> (*Sigma-Aldrich calcium chloride dehydrate ACS reagent ≥ 99%*), foi preparada sob agitação constante (600 rpm) à temperatura ambiente, até a obtenção de uma solução límpida e transparente, e o filme foi imerso nessa solução, através de procedimentos experimentais bastante meticulosos, cujo um dos exemplos é descrito a seguir: a) Imersão por 5min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool); b) Imersão por 10min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);

c) Imersão por 20min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);

d) Imersão por 30min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool). Após o período de imersão filme foi seco à temperatura ambiente, e em seguida liofilizado e esterilizado com óxido de etileno, de acordo com o protocolo da Anvisa de esterilização.

- Síntese do filme hemostático de pectina em meio contendo cálcio (1,5% de CaCl<sub>2</sub>) através do método de *Cross-Linking* por difusão (Pec-PEG-Ca 1.5%)

[025] 5g de Pectina de casca de laranja (*Sigma-Aldrich pectin from citrus peel, galacturonic acid ≥ 74%, 19500 g/mol*), foi misturada com 100ml de água destilada (pH aprox.7), e 2.5g de PEG 400W (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol Av. Mol.wt:400 (PEG)*) em um béquer, e mantido sob agitação constante (800 rpm) numa temperatura controlada de 50°C até completa homogeneização. Após completa homogeneização do gel, foram adicionado 10 ml de álcool etílico (*Sigma-Aldrich Ethanol ACS reagent ≥ 99,5%*), e a reação prosseguiu por mais 1 hora sob agitação constante. Em seguida, 20 g do gel foi colocado em uma placa petri e seco numa estufa por 48 horas a uma temperatura de 50°C. Após a secagem do filme, o procedimento de *cross-linking* foi preparado da seguinte maneira:

[026] Uma solução de, 100 mL de água destilada (pH 7 aprox.), 7 mL de PEG (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol*) e 1.5g de CaCl<sub>2</sub> (*Sigma-Aldrich calcium chloride dehydrate ACS reagent ≥ 99%*), foi preparada sob agitação constante (600 rpm) à temperatura ambiente, até a obtenção de uma solução límpida e transparente, e o filme foi imerso nessa solução, através de procedimentos experimentais bastante meticulosos, cujo um dos exemplos é descrito a seguir:

a) Imersão por 5min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);

b) Imersão por 10min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);

c) Imersão por 20min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);

d) Imersão por 30min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool). Após o período de imersão filme foi seco à temperatura ambiente, e em seguida liofilizado e esterilizado com óxido de etileno, de acordo com o protocolo da Anvisa de esterilização.

- Síntese do filme hemostático de pectina em meio contendo cálcio (3% de CaCl<sub>2</sub>) através do método de *Cross-Linking* por difusão (Pec-PEG-Ca 3%)

[027] 5g de Pectina de casca de laranja (*Sigma-Aldrich pectin from citrus peel, galacturonic acid ≥ 74%, 19500 g/mol*), foi misturada com 100ml de água Destilada (pH aprox.7) , e 2.5g de PEG 400W (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol Av. Mol.wt:400 (PEG)*) em um béquer ,e mantido sob agitação constante (800 rpm) numa temperatura controlada de 50°C até completa homogeneização. Após completa homogeneização do gel, foram adicionado 10 ml de álcool etílico (*Sigma-Aldrich Ethanol ACS reagent ≥ 99,5%*), e a reação prosseguiu por mais 1 hora sob agitação constante. Em seguida, 20 g do gel foi colocado em uma placa petri e seco numa estufa por 48 horas a uma temperatura de 50°C. Após a secagem do filme, o procedimento de *cross-linking* foi preparado da seguinte maneira:

[028] Uma solução de, 100 mL de água destilada (pH 7 aprox.), 7 mL de PEG (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol*) e 3,0 g de CaCl<sub>2</sub> (*Sigma-Aldrich calcium chloride dehydrate ACS reagent ≥ 99%*), foi preparada sob agitação constante (600 rpm) à temperatura ambiente, até a obtenção de uma solução límpida e transparente, e o filme foi imerso nessa solução, através de procedimentos experimentais bastante meticulosos, cujo um dos exemplos é descrito a seguir:

- a) Imersão por 5min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- b) Imersão por 10min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- c) Imersão por 20min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- d) Imersão por 30min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool). Após o período de imersão filme foi seco à

temperatura ambiente, e em seguida liofilizado e esterilizado com óxido de etileno, de acordo com o protocolo da Anvisa de esterilização.

- Síntese do filme hemostático de pectina em meio contendo cálcio ( 4% de CaCl<sub>2</sub>) através do método de *Cross-Linking* por difusão (Pec-PEG-Ca 4%)

[029] 5g de Pectina de casca de laranja (*Sigma-Aldrich pectin from citrus peel, galacturonic acid ≥ 74%, 19500 g/mol*), foi misturada com 100ml de água Destilada (pH aprox.7) , e 2.5g de PEG 400W (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol Av. Mol.wt:400 (PEG)*) em um béquer, e mantido sob agitação constante (800 rpm) numa temperatura controlada de 50°C até completa homogeneização. Após completa homogeneização do gel, foram adicionado 10 ml de álcool etílico (*Sigma-Aldrich Ethanol ACS reagent ≥ 99,5%*), e a reação prosseguiu por mais 1 hora sob agitação constante. Em seguida, 20 g do gel foi colocado em uma placa petri e seco numa estufa por 48 horas a uma temperatura de 50°C. Após a secagem do filme, o procedimento de *cross-linking* foi preparado da seguinte maneira:

[030] Uma solução de 100 mL de água destilada (pH 7 aprox.), 7 mL de PEG (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol* ) e 4g de CaCl<sub>2</sub> (*Sigma-Aldrich calcium chloride dehydrate ACS reagent ≥ 99%*), foi preparada sob agitação constante (600 rpm) à temperatura ambiente, até a obtenção de uma solução límpida e transparente, e o filme foi imerso nessa solução, através de procedimentos experimentais bastante meticulosos, cujo um dos exemplos é descrito a seguir:

- a) Imersão por 5min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- b) Imersão por 10min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- c) Imersão por 20min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- d) Imersão por 30min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool). Após o período de imersão filme foi seco à temperatura ambiente, e em seguida liofilizado e esterilizado com óxido de etileno, de acordo com o protocolo da Anvisa de esterilização.

- Síntese do filme hemostático de pectina em meio contendo cálcio (5% de CaCl<sub>2</sub>) através do método de Cross-Linking por difusão (Pec-PEG-Ca 5%)

[031] 5g de Pectina de casca de laranja (*Sigma-Aldrich pectin from citrus peel, galacturonic acid ≥ 74%, 19500 g/mol*), foi misturada com 100ml de água destilada (pH aprox.7) , e 2.5g de PEG 400W (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol Av. Mol.wt:400 (PEG)*) em um béquer, e mantido sob agitação constante (800 rpm) numa temperatura controlada de 50°C até completa homogeneização. Após completa homogeneização do gel, foram adicionado 10 ml de álcool etílico (*Sigma-Aldrich Ethanol ACS reagent ≥ 99,5%*) e a reação prosseguiu por mais 1 hora sob agitação constante. Em seguida, 20 g do gel foi colocado em uma placa petri e seco numa estufa por 48 horas a uma temperatura de 50°C. Após a secagem do filme, o procedimento de *cross-linking* foi preparado da seguinte maneira:

[032] Uma solução de, 100 mL de água destilada (pH 7 aprox.), 7 mL de PEG (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol*) e 5g de CaCl<sub>2</sub> (*Sigma-Aldrich calcium chloride dehydrate ACS reagent ≥ 99%* ), foi preparada sob agitação constante (600 rpm) à temperatura ambiente, até a obtenção de uma solução límpida e transparente, e o filme foi imerso nessa solução, através de procedimentos experimentais bastante meticulosos, cujo um dos exemplos é descrito a seguir:

- a) Imersão por 5min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- b) Imersão por 10min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- c) Imersão por 20min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- d) Imersão por 30min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool). Após o período de imersão filme foi seco à temperatura ambiente, e em seguida liofilizado e esterilizado com óxido de etileno, de acordo com o protocolo da Anvisa de esterilização.

- Síntese do filme hemostático de pectina em meio contendo cálcio através do método

de Cross-Linking por difusão substituindo as cadeias do grupo methoxyl da Pectina. (Pec-PEG-Ca-SE)

[033] Filmes hemostáticos ou anti-hemorrágicos a base de pectina foram preparados em diferentes taxas molares de ions de cálcio em relação aos grupos metoxílicos do ácido galacturônico que compõem a cadeia da pectina. Um exemplo de preparação, no caso 2:1, foi feito da seguinte maneira:

[034] 1,0 g de Pectina de casca de laranja (*Sigma-Aldrich pectin from citrus peel, galacturonic acid ≥ 74%*) e 2,50 g de PEG 400W (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol Av. Mol.wt:400*) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada (pH= 7), sob a agitação constante (1000 rpm) por 2 horas a temperatura de 45-50°C, até formação de uma mistura homogênea e transparente (SOLUÇÃO A).

[035] A solução de *Cross-Linking* (SOLUÇÃO B) foi preparada da seguinte maneira: 10 mL de água, 5 mL de Ethanol (*Sigma-Aldrich Ethanol ACS reagent ≥ 99,5%*) e 92 mg de CaCl<sub>2</sub> (*Sigma-Aldrich calcium chloride dehydrate ACS reagent ≥ 99%*), foram misturados sob agitação constante (400 rpm) e à temperatura ambiente até obtenção de uma solução transparente e homogênea (SOLUÇÃO B). Em seguida, utilizando-se uma pipeta *pasteur* e sob agitação constante, a SOLUÇÃO B foi adicionada à SOLUÇÃO A. A reação foi mantida por 1 h/ 45°C sob agitação constante (1000 rpm). Após o termino da reação, a mistura final foi depositada numa placa de *petri*, seca em estufa (48 horas/45 °C). Após o período de imersão filme foi seco à temperatura ambiente, e em seguida liofilizado e esterilizado com óxido de etileno, de acordo com o protocolo da Anvisa de esterilização.

- Caracterização físico-química dos materiais hemostáticos e anti-hemorrágicos

[036] Os biopolímeros foram caracterizados empregando-se técnicas espectroscópicas já consolidadas para caracterização de biomateriais e biopolímeros. No presente pedido de patente de invenção, foram executadas análises de Difração de Raios-X (DRX), Ressonância Magnética Nuclear do Estado Sólido-Ângulo Mágico (<sup>1</sup>H-NMR; <sup>13</sup>C-CP-MAS-NMR), Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletronica de Transmissão de alta resolução (HTEM), determinação ponto isoelétrico e medidas de mobilidade

eletroforética Potencial Zeta. A ação hemostática e anti-hemorrágica foi analisada por análise tromboelastografica e por microscopia de contraste.

[037] A Figura 1 apresenta os padrões de Difração de Raios-X típicos dos diversos materiais hemostáticos e anti-hemorrágicos desenvolvidos nessa patente. O difratograma de Raios-X dos agentes hemostáticos e anti-hemorrágicos apresenta: a) Pectina pura (*Sigma-Aldrich pectin from citrus peel, galacturonic acid  $\geq 74\%$* ); b) Filme de Pectina e PEG (Pec-PEG); c) Filme hemostático ou anti-hemorrágico de Pectina e PEG *cross-Linked* por meio de difusão direta, (Pec-PEG-Ca-SE); d) Filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 0.5 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 0.5%); e) Filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 1.5 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 1.5%); f) Filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 3 % de cálcio; g) Filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 4 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 4%) e h) Filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 5 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 5%).

As Figuras 2-9 apresentam os espectros típicos de FT-IR dos materiais hemostáticos e anti-hemorrágicos desenvolvidos nesse pedido de patente.

A Figura 2 apresenta o espectro FT-IR da Pectina pura (*Sigma-Aldrich pectin from citrus peel, galacturonic acid  $\geq 74\%$* ).

A Figura 3 apresenta o espectro de FT-IR do filme de Pectina e PEG (Pec-PEG) não *cross-linked* com íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ).

A Figura 4 apresenta o espectro de FT-IR do filme hemostático ou anti-hemorrágico da Pectina e do PEG *cross-Linked* por meio de difusão direta, (Pec-PEG-Ca-SE).

A Figura 5 apresenta o espectro FT-IR do filme hemostático e do anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 0.5 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 0.5%).

A Figura 6 apresenta o espectro FT-IR do filme hemostático e do anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 1.5 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 1.5%).

A Figura 7 apresenta o espectro FT-IR do filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 3 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 3%).

A Figura 8 apresenta o espectro FT-IR do filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 4 % de cálcio (Pec-PEG-Ca-4%).

A Figura 9 apresenta o espectro FT-IR do filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 5 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 5%).

As Figuras 10-13 apresentam as micrografias eletrônicas (MEV) dos filmes hemostáticos ou anti-hemorrágicos preparados nesse pedido de patente.

A Figura 10 apresenta as análises de MEV do Filme de Pectina e PEG (Pec-PEG) não *cross-linked* com íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), nos aumentos: a) x100, b) x500, c) x2000.

A Figura 11 apresenta as análises MEV do filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 0.5 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 0.5%) nos aumentos: a) x500, b) x1000, c) x2000.

A Figura 12 apresenta as análises de MEV do filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 3 % de cálcio nos aumentos: a) x200, b) x500, c) x2000.

A Figura 13 apresenta as análises de MEV do filme hemostático ou anti-hemorrágico de Pectina e PEG *cross-linked* por meio de difusão direta, (Pec-PEG-Ca-SE) nos aumentos: a) x500; b) x1000 e c) x2000.

[038] No que tange ao teste *in vitro* da ação hemostática e anti-hemorrágica avaliada por de Microscopia de Contraste, para estes testes foram utilizados 2  $\mu\text{l}$  de sangue de carneiro, depositado à superfície dos filmes hemostáticos desenvolvidos e descritos nesse pedido de patente.

[039] As figuras 14 e 15 mostram o controle dos experimentos. A Figura 14 mostra o controle do sangue de Carneiro e a Figura 15 apresenta a superfície do filme de Pectina PEG com *cross-linking* de  $\text{CaCl}_2$ .

As figuras 16 até 21 mostram a ação hemostática dos filmes sintetizados por *cross-linking* de difusão externa. As imagens obtidas foram tomadas cada 2 minutos após o depósito do sangue sobre a superfície, até completar 10 minutos para cada amostra.

A Figura 16 apresenta as análises de Microscopia de Contraste para o filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 0,5 % de

cálcio (Pec-PEG-Ca 0,5%): a) 0 minutos, b) 2 minutos, c) 4 minutos, d) 6 minutos, e) 8 minutos, f) 10 minutos.

A Figura 17 apresenta as análises de Microscopia de Contraste para o filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 1,5 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 1,5%): a) 0 minutos, b) 2 minutos, c) 4 minutos, d) 6 minutos, e) 8 minutos, f) 10 minutos.

A Figura 18 apresenta as análises de Microscopia de contraste para o filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 3 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 3%): a) 0 minutos, b) 2 minutos, c) 4 minutos, d) 6 minutos, e) 8 minutos, f) 10 minutos.

A Figura 19 apresenta as análises de Microscopia de Contraste para o filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 4 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 4%): a) 0 minutos, b) 2 minutos, c) 4 minutos, d) 6 minutos, e) 8 minutos, f) 10 minutos.

A Figura 20 apresenta as análises de Microscopia de contraste para o filme hemostático e anti-hemorrágico *cross-linked* por difusão direta contendo 5 % de cálcio (Pec-PEG-Ca 5%): a) 0 minutos, b) 2 minutos, c) 4 minutos, d) 6 minutos, e) 8 minutos, f) 10 minutos.

A Figura 21 apresenta as análises do filme hemostático ou anti-hemorrágico de Pectina e PEG *cross-linked* por meio de difusão direta, (Pec-PEG-Ca-SE): a) 0 minutos, b) 2 minutos, c) 4 minutos, d) 6 minutos, e) 8 minutos, f) 10 minutos.

## REIVINDICAÇÕES

**1. PREPARAÇÃO DE FILMES HEMOSTÁTICOS A BASE DE PECTINA UTILIZANDO O MÉTODO *CROSS-LINKING* POR DIFUSÃO EM MEIO CONTENDO ÍONS CÁLCIO, caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

a) Etapa 1: A pectina (*Pectin from citrus peel Galacturonic Acid 74% Aldrich; MW 25,000~50,000*) ser dissolvida em uma solução composta de Glicerol 50% (w/w), Etanol 20% (w/w) e Água Destilada 30% (w/w), e mistura reacional foi mantida sob agitação constante (1000 rpm) a 40°C/3h;

b) Etapa 2: Concomitantemente soluções de CaCl<sub>2</sub> em diferentes concentrações (0,5%, 1,5%,3%,4% e 5%) (w/v) e Polietileno Glycol PEG 7% (w/w) foram preparadas, e em adicionadas lentamente à solução de pectina até completa homogeneização, e formação de uma membrana de hidrogel;

c) Etapa 3: A membrana de hidrogel foi recuperada por filtração, e lavada com água deionizada até que pH=7.0, em seguida foi transferida para uma placa de petri e seca em estufa a 50°C/12h, e o produto final é obtido na forma de filme.

**2. “PREPARAÇÃO DE ESPONJAS HEMOSTÁTICAS A BASE DE PECTINA UTILIZANDO *CROSS-LINKING* POR MÉTODO DE CONFIGURAÇÃO INTERNA”, caracterizado por** compreender as seguintes etapas:

- Etapa 1: A pectina (2 g) (*Pectin from citrus peel Galacturonic Acid 74% Aldrich; MW 25,000~50,000*) 2% (w/w) foi dissolvida e agitada em água destilada (85 mL) e etanol (15 mL), e mantida sob agitação constante por 2h;

- Etapa 2: Após homogeneização da solução de pectina, foi adicionado 0,15 g de Na(PO<sub>3</sub>)<sub>6</sub> 1.5 %w/w), e a reação foi mantida à 40° C por 30 min, seguida da adição de 120g de CaHPO<sub>4</sub> (w/w), e a agitação foi mantida constante até completa homogeneização da solução;

- Etapa 3: A estabilização do pH da solução foi feita pela adição de uma solução de ácido-δ-lactone (2M) até que o pH=7.0 fosse alcançado;

- Etapa 4: O hidrogel formado foi vertido em uma cuba de vidro circular, raio de 10 cm, onde a esponja foi moldada no formato circular, e a cuba contendo a solução gel foi colocado em ambiente refrigerado para que solidificação da esponja hemostática fosse

completa;

- Etapa 5: os graus de desidratação das esponjas hemostáticas foram controlados através da imersão da esponja hemostática em solução de etanol/água nas seguintes proporções: etanol/H<sub>2</sub>O nas proporções: 10/90; 30/70; 50/50; 70/30 e solução 100 % de etanol;

- Etapa 6: Após a imersão da esponja na solução etanol/H<sub>2</sub>O, o produto foi seco à 50 °C por 48 horas para remoção do resíduo de etanol;

- Etapa 7: O produto final (esponja hemostática a base de pectina) foi liofilizada e esterilizada com óxido de etileno, de acordo com o protocolo da Anvisa de esterilização.

**3. “PREPARAÇÃO DE FILMES HEMOSTÁTICOS A BASE DE PECTINA UTILIZANDO O MÉTODO *CROSS-LINKING* POR DIFUSÃO EM MEIO CONTENDO ÍONS CÁLCIO”, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por compreender as seguintes etapas:**

- Etapa 1: 5g de Pectina de casca de laranja (*Sigma-Aldrich pectin from citrus peel, galacturonic acid ≥ 74%, 19500 gr/mol*), foi misturada com 100 mL de água Destilada (pH aprox.7) , e 2.5 g de PEG 400W (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol Av. Mol.wt:400 (PEG)*) em um béquer, e mantido sob agitação constante (800 rpm) numa temperatura controlada de 50°C até completa homogeneização;

- Etapa 2: Após completa homogeneização do gel, foram adicionado 10 ml de álcool etílico (*Sigma-Aldrich Ethanol ACS reagent ≥ 99,5%*), e a reação prosseguiu por mais 1 hora sob agitação constante;

- Etapa 3: Em seguida, 20 g do gel foi colocado em uma placa petri e seco numa estufa por 48 horas, a uma temperatura de 50°C.;

- Etapa 4: Após a secagem do filme, o procedimento de *cross-linking* foi preparado da seguinte maneira: uma solução de 100 mL de água destilada (pH 7 aprox.), 7 mL de PEG (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol*) e 0.5 g de CaCl<sub>2</sub> (*Sigma-Aldrich calcium chloride dehydrate ACS reagent ≥ 99%*), foi preparada sob agitação constante (600 rpm) à temperatura ambiente, até a obtenção de uma solução límpida e transparente, e o filme foi imerso nessa solução, através de procedimentos experimentais bastante

meticulosos, cujo um dos exemplos é descrito a seguir:

- a) Imersão por 5min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- b) Imersão por 10min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- c) Imersão por 20min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);
- d) Imersão por 30min – pausa de 2min (retirada do excesso de cálcio do filme com lenços umedecidos sem álcool);

- Etapa 5: Após o período de imersão filme foi seco à temperatura ambiente, e em seguida liofilizado e esterilizado com óxido de etileno, de acordo com o protocolo da Anvisa de esterilização.

4. **“PREPARAÇÃO DE FILMES HEMOSTÁTICOS A BASE DE PECTINA UTILIZANDO O MÉTODO *CROSS-LINKING* POR DIFUSÃO EM MEIO CONTENDO ÍONS CÁLCIO”**, de acordo com as reivindicações 1 e 3, em que que as etapas 1 a 5 da reivindicação 3 são iguais e **caracterizado pelo** fato de que a etapa 4 diferencia-se da apresentada na reivindicação 3, apenas por apresentar o valor de 1.5g de CaCl<sub>2</sub>.

5. **“PREPARAÇÃO DE FILMES HEMOSTÁTICOS A BASE DE PECTINA UTILIZANDO O MÉTODO *CROSS-LINKING* POR DIFUSÃO EM MEIO CONTENDO ÍONS CÁLCIO”**, de acordo com as reivindicações 1 e 3, em que que as etapas 1 a 5 da reivindicação 3 são iguais e **caracterizado pelo** fato de que a etapa 4 diferencia-se da apresentada na reivindicação 3, apenas por apresentar o valor de 3,0g de CaCl<sub>2</sub>.

6. **“PREPARAÇÃO DE FILMES HEMOSTÁTICOS A BASE DE PECTINA UTILIZANDO O MÉTODO *CROSS-LINKING* POR DIFUSÃO EM MEIO CONTENDO ÍONS CÁLCIO”**, de acordo com as reivindicações 1 e 3, em que que as etapas 1 a 5 da reivindicação 3 são iguais e **caracterizado pelo** fato de que a etapa 4 diferencia-se da apresentada na reivindicação 3, apenas por apresentar o valor de 4,0g de CaCl<sub>2</sub>.

7. **“PREPARAÇÃO DE FILMES HEMOSTÁTICOS A BASE DE PECTINA UTILIZANDO O MÉTODO *CROSS-LINKING* POR DIFUSÃO EM MEIO CONTENDO ÍONS CÁLCIO”**, de acordo com as reivindicações 1 e 3, em que que as etapas 1 a 5 da

reivindicação 3 são iguais e **caracterizado pelo** fato de que a etapa 4 diferencia-se da apresentada na reivindicação 3, apenas por apresentar o valor de 5,0g de CaCl<sub>2</sub>.

8. **“PREPARAÇÃO DE FILMES HEMOSTÁTICOS DE PECTINA EM MEIO CONTENDO CÁLCIO ATRAVÉS DO MÉTODO CROSS-LINKING POR DIFUSÃO SUBSTITUINDO CADEIAS DO GRUPO METHOXIL DA PECTINA”**, caracterizado **por** compreender as seguintes etapas:

- Etapa 1: 1,0 g de Pectina de casca de laranja (*Sigma-Aldrich pectin from citrus peel, galacturonic acid ≥ 74%*) e 2,50 g de PEG 400W (*Sigma-Aldrich Polyethylene Glycol Av. Mol.wt:400*) foram dissolvidos em 100 mL de água destilada (pH= 7), sob a agitação constante (1000 rpm) por 2 horas a temperatura de 45-50°C, até formação de uma mistura homogênea e transparente (SOLUÇÃO A);
- Etapa 2: A solução de *Cross-Linking* (SOLUÇÃO B) foi preparada da seguinte maneira: 10 mL de água, 5 mL de Ethanol (*Sigma-Aldrich Ethanol ACS reagent ≥ 99,5%*) e 92 mg de CaCl<sub>2</sub> (*Sigma-Aldrich calcium chloride dehydrate ACS reagent ≥ 99%*), foram misturados sob agitação constante (400 rpm) e à temperatura ambiente até obtenção de uma solução transparente e homogênea (SOLUÇÃO B);
- Etapa 3: Em seguida, utilizando-se uma pipeta *pasteur* e sob agitação constante, a SOLUÇÃO B foi adicionada à SOLUÇÃO A;
- Etapa 4: A reação foi mantida por 1 h/ 45°C sob agitação constante (1000 rpm);
- Etapa 5: Após o término da reação, a mistura final foi depositada numa placa de *petri*, seca em estufa (48 horas/45 °C);
- Etapa 6: Após o período de imersão filme foi seco à temperatura ambiente, e em seguida liofilizado e esterilizado com óxido de etileno, de acordo com o protocolo da Anvisa de esterilização.

9. **“FILMES HEMOSTÁTICOS A BASE DE PECTINA UTILIZANDO O MÉTODO CROSS-LINKING POR DIFUSÃO EM MEIO CONTENDO ÍONS CÁLCIO”**, caracterizados pelo fato de serem preparados pelas condições apresentadas de acordo com as reivindicações 1 e 3 a 7.

10. **“ESPONJAS HEMOSTÁTICAS A BASE DE PECTINA UTILIZANDO CROSS-LINKING POR MÉTODO DE CONFIGURAÇÃO INTERNA”**, caracterizadas pelo fato

de serem preparados pelas condições apresentadas de acordo com a reivindicação 2.

11. **“FILMES HEMOSTÁTICOS DE PECTINA EM MEIO CONTENDO CÁLCIO ATRAVÉS DO MÉTODO CROSS-LINKING POR DIFUSÃO SUBSTITUINDO CADEIAS DO GRUPO METHOXIL DA PECTINA”**, caracterizados pelo fato de serem preparados pelas condições apresentadas de acordo com a reivindicação 8.

12. **“USO DOS FILMES HEMOSTÁTICOS A BASE DE PECTINA UTILIZANDO O MÉTODO *CROSS-LINKING* POR DIFUSÃO EM MEIO CONTENDO ÍONS CÁLCIO”**, caracterizados pelo fato de serem utilizados em aplicações cirúrgicas e odontológicas.

13. **“USO DE ESPONJAS HEMOSTÁTICAS A BASE DE PECTINA UTILIZANDO *CROSS-LINKING* POR MÉTODO DE CONFIGURAÇÃO INTERNA”**, caracterizadas pelo fato de serem utilizadas em aplicações cirúrgicas e odontológicas.

14. **“USO DE FILMES HEMOSTÁTICOS DE PECTINA EM MEIO CONTENDO CÁLCIO ATRAVÉS DO MÉTODO CROSS-LINKING POR DIFUSÃO SUBSTITUINDO CADEIAS DO GRUPO METHOXIL DA PECTINA”**, caracterizados pelo fato de serem utilizados em aplicações cirúrgicas e odontológicas.

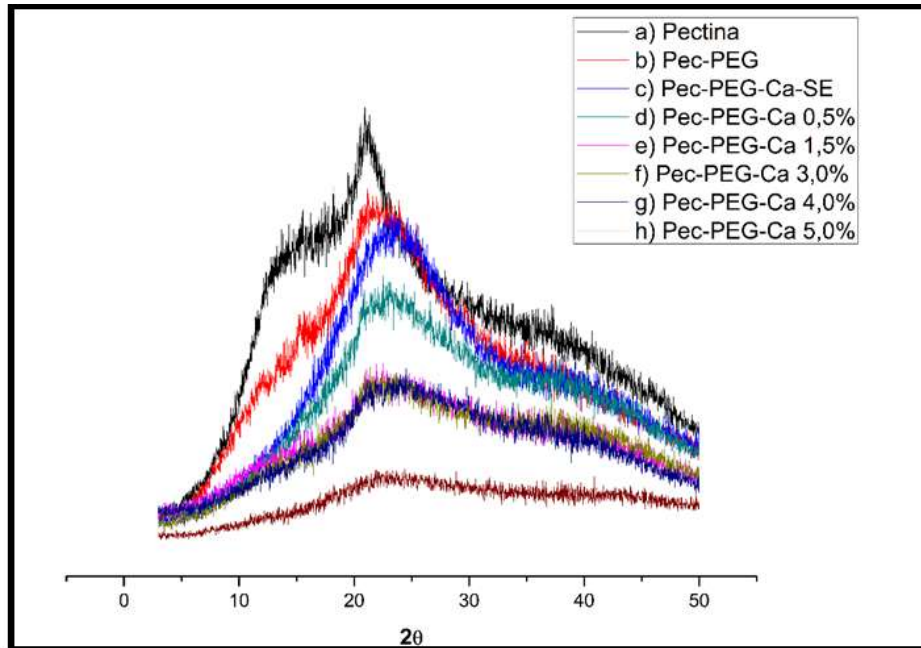


FIGURA 1

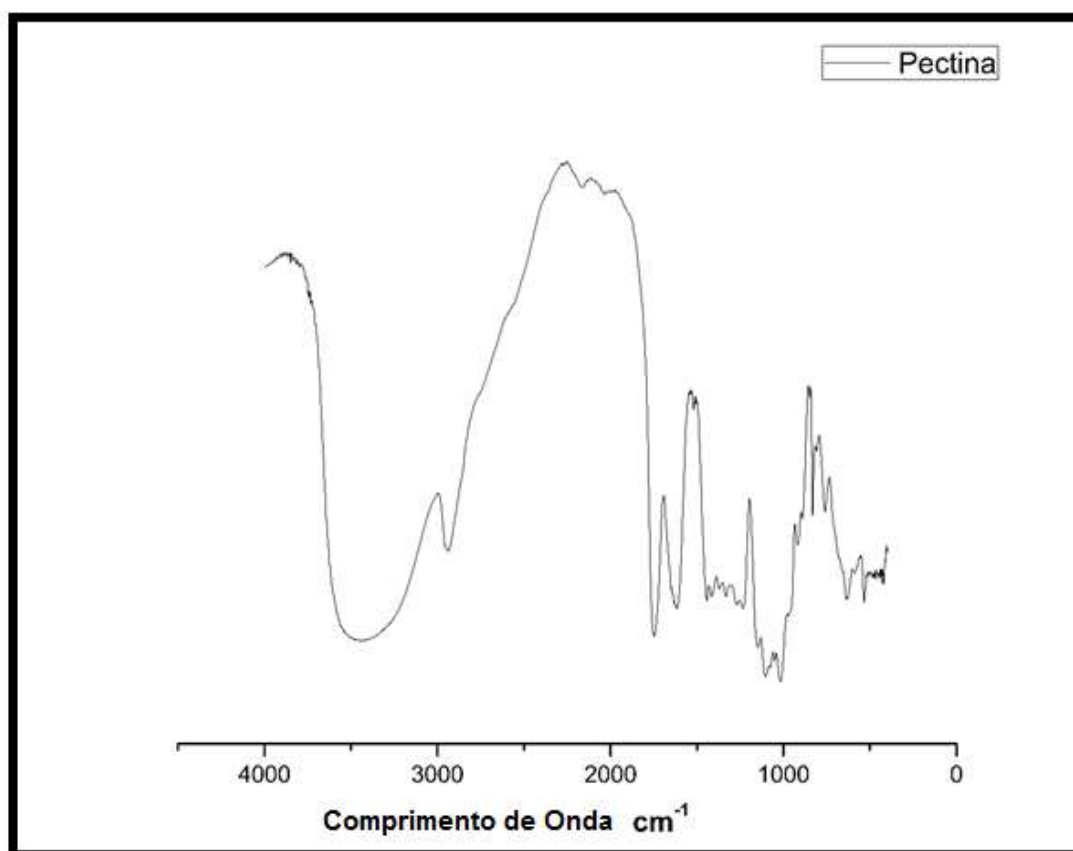
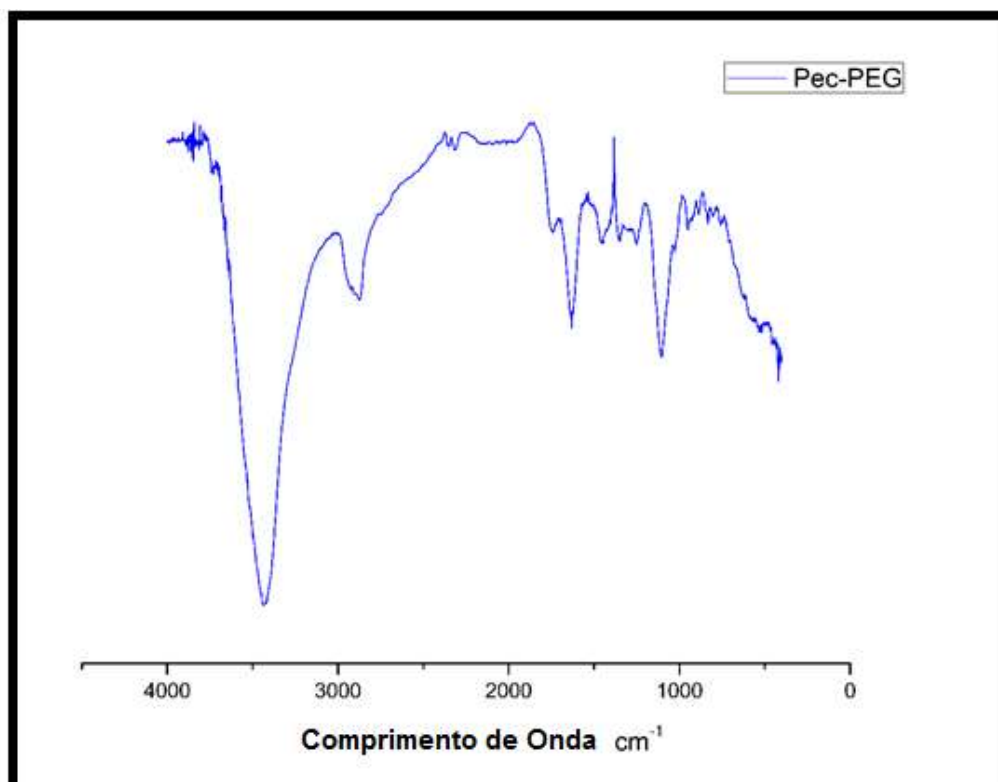


FIGURA 2



**FIGURA 3**

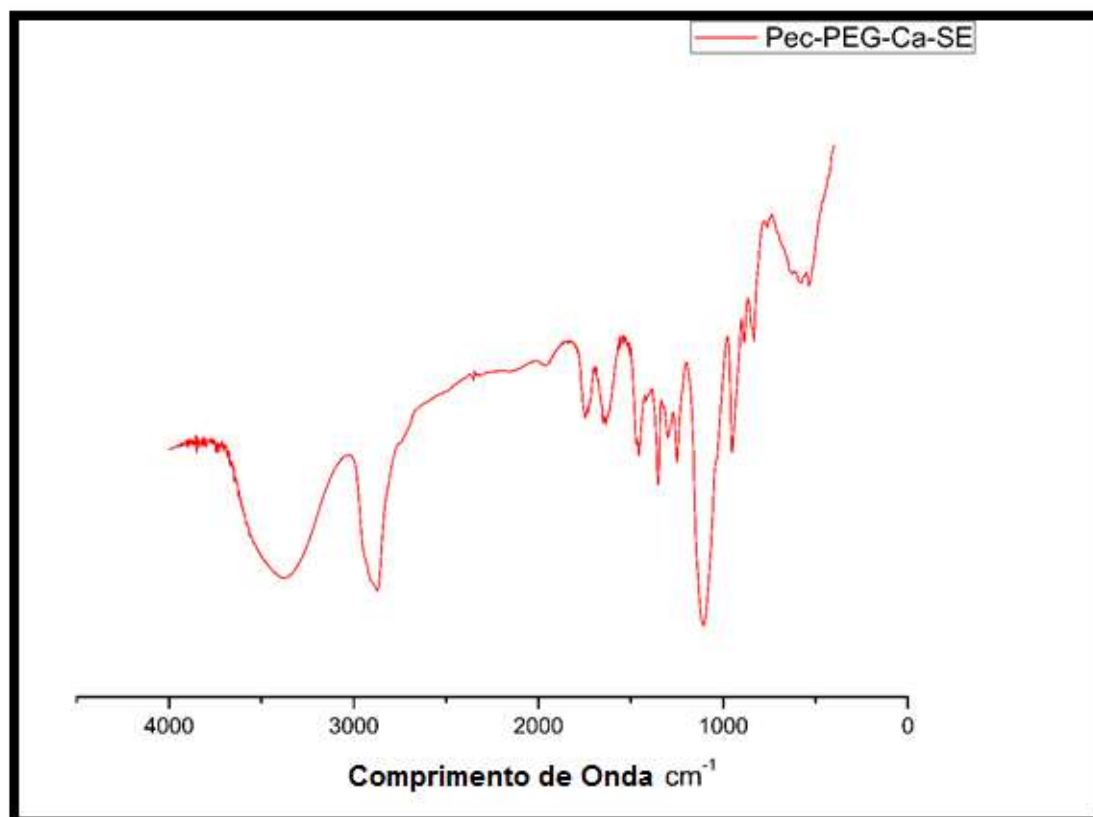
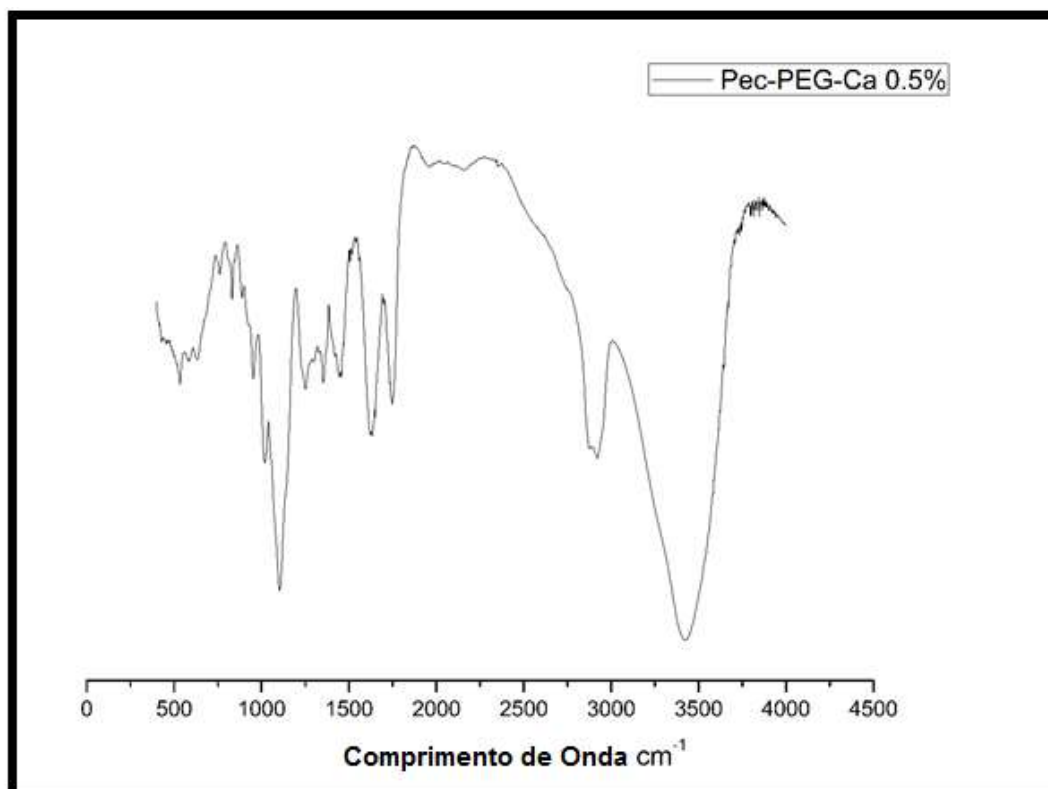
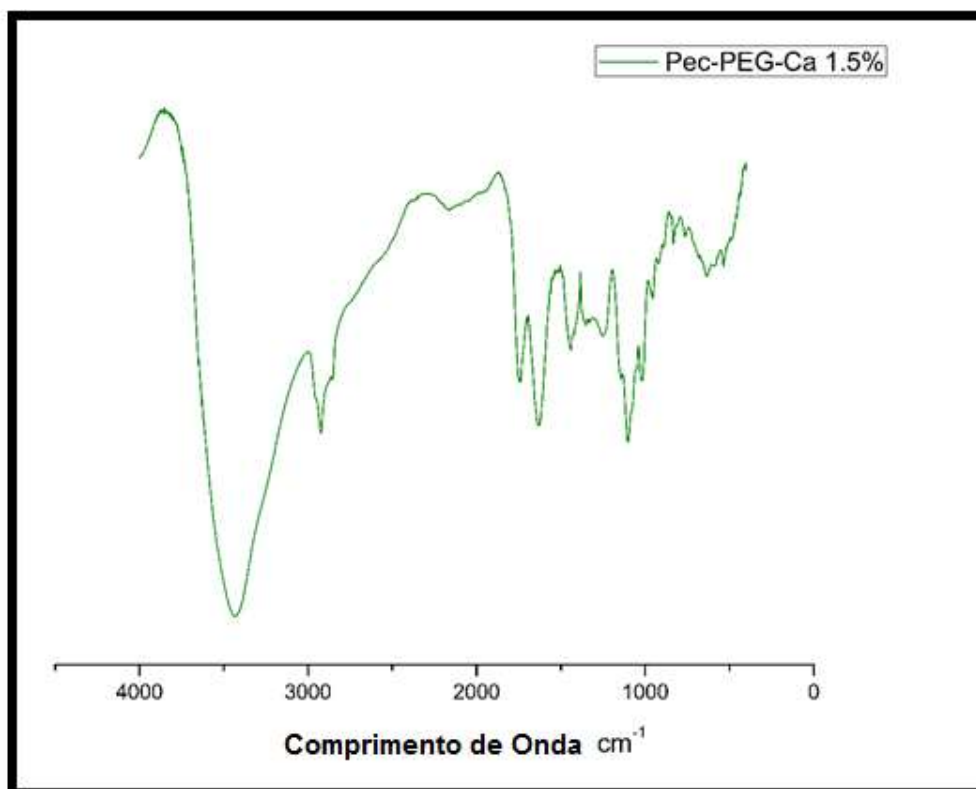


FIGURA 4



**FIGURA 5**



**FIGURA 6**

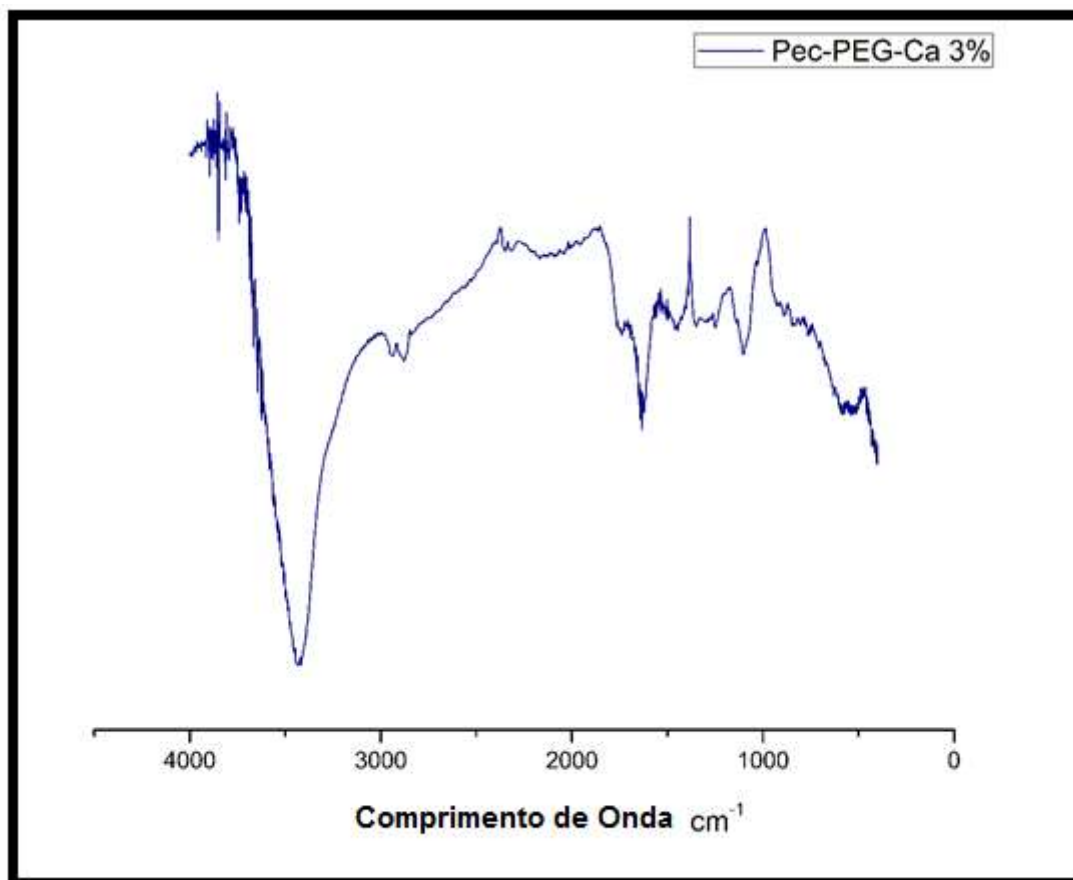
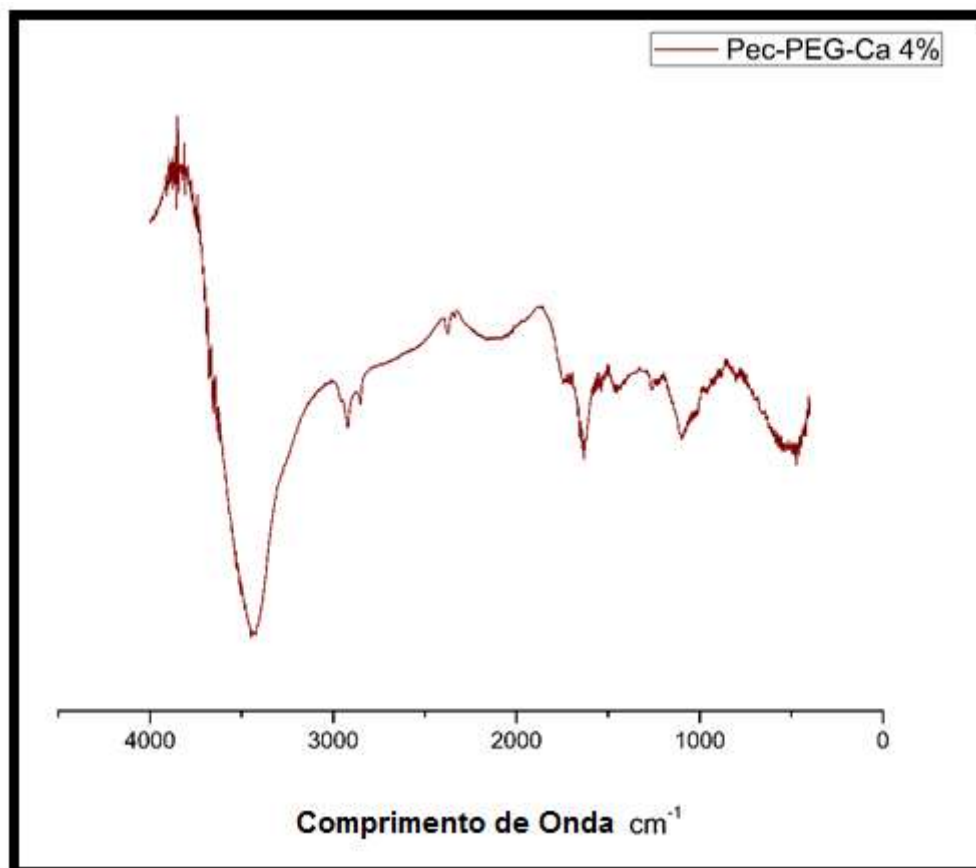
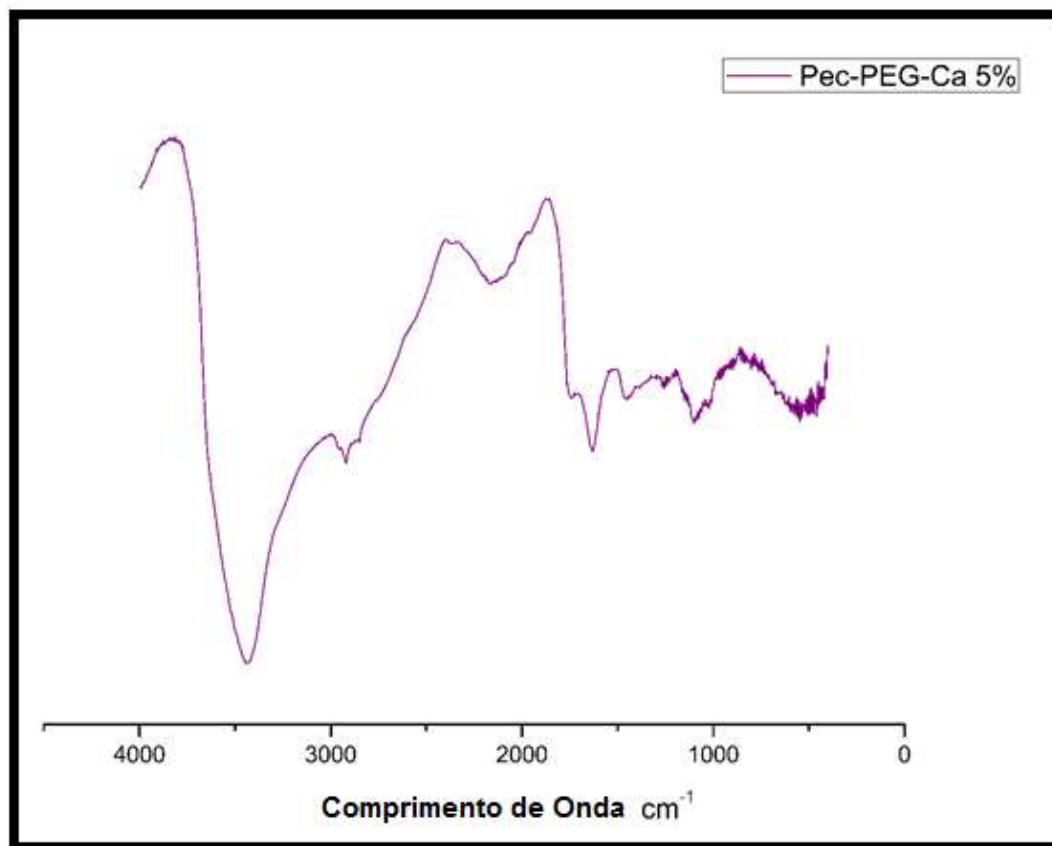


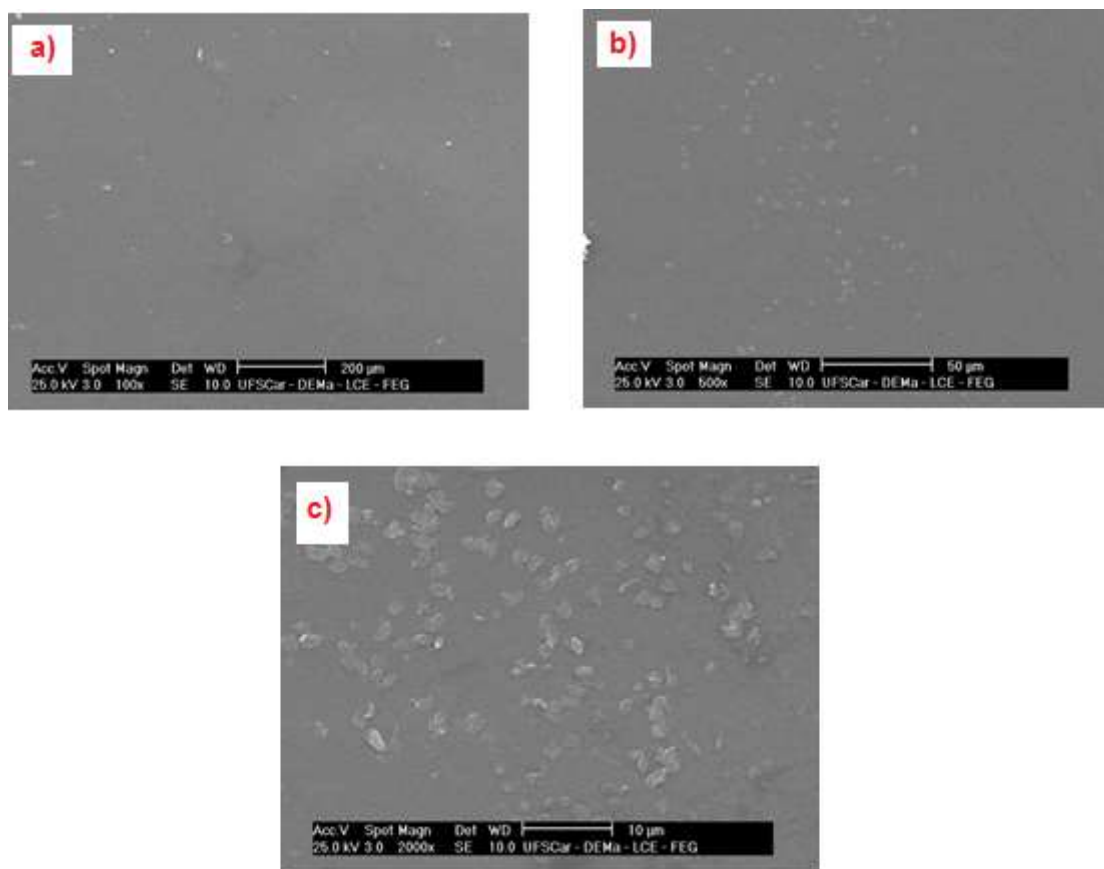
FIGURA 7



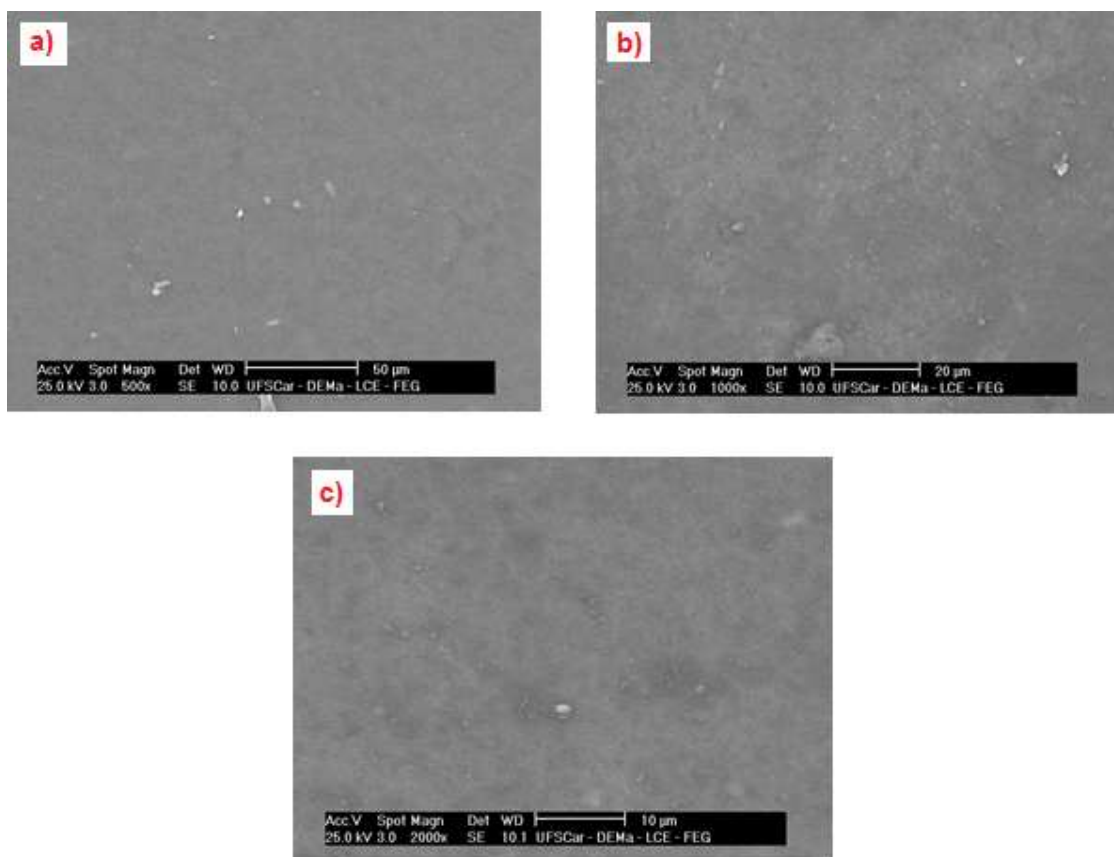
**FIGURA 8**



**FIGURA 9**



**FIGURA 10**



**FIGURA 11**

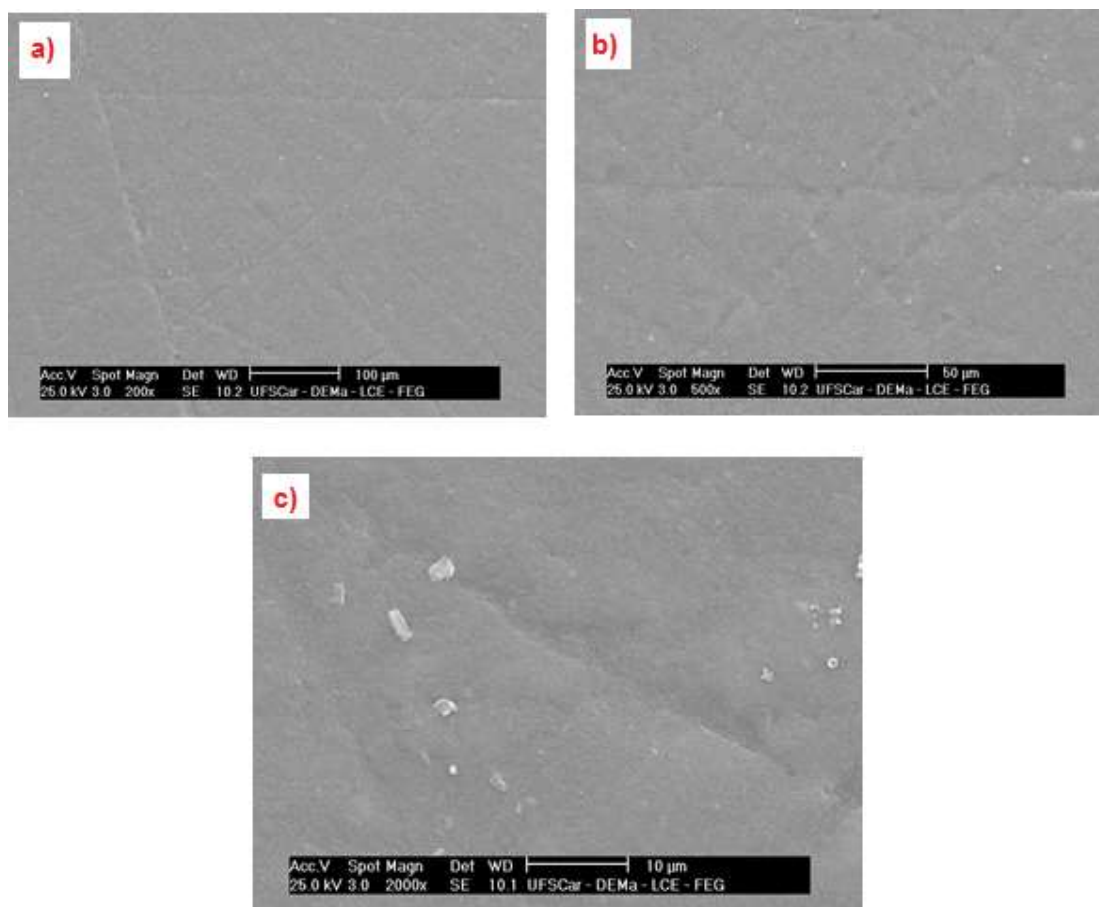
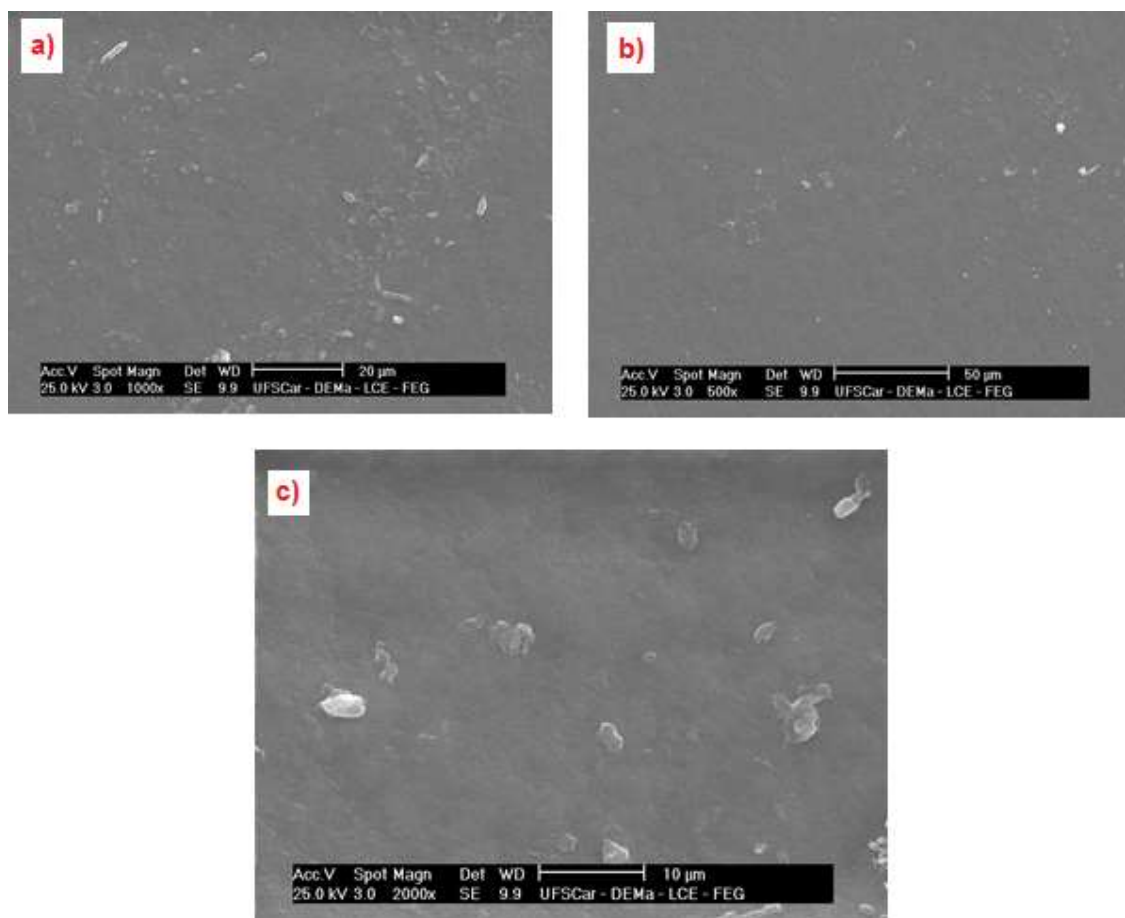
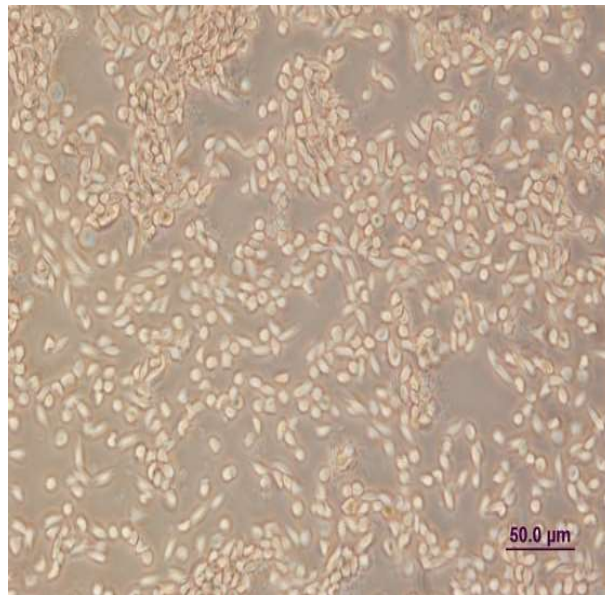


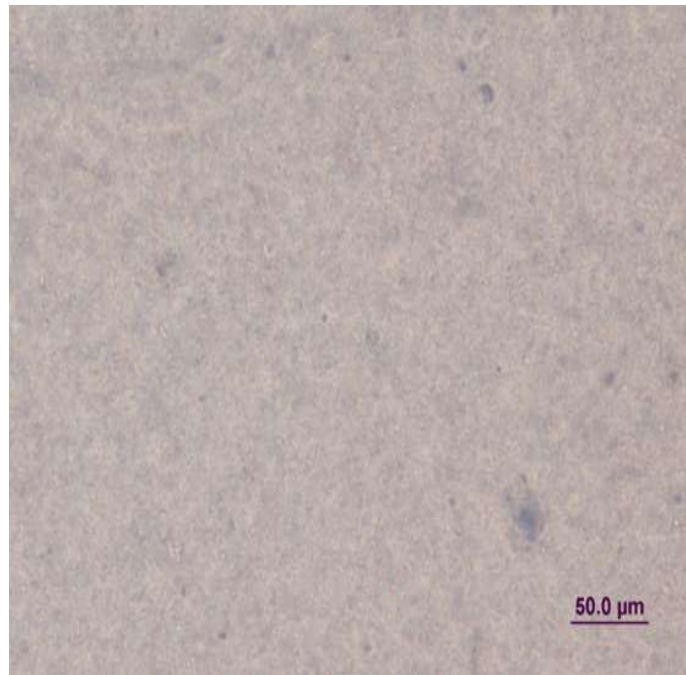
FIGURA 12



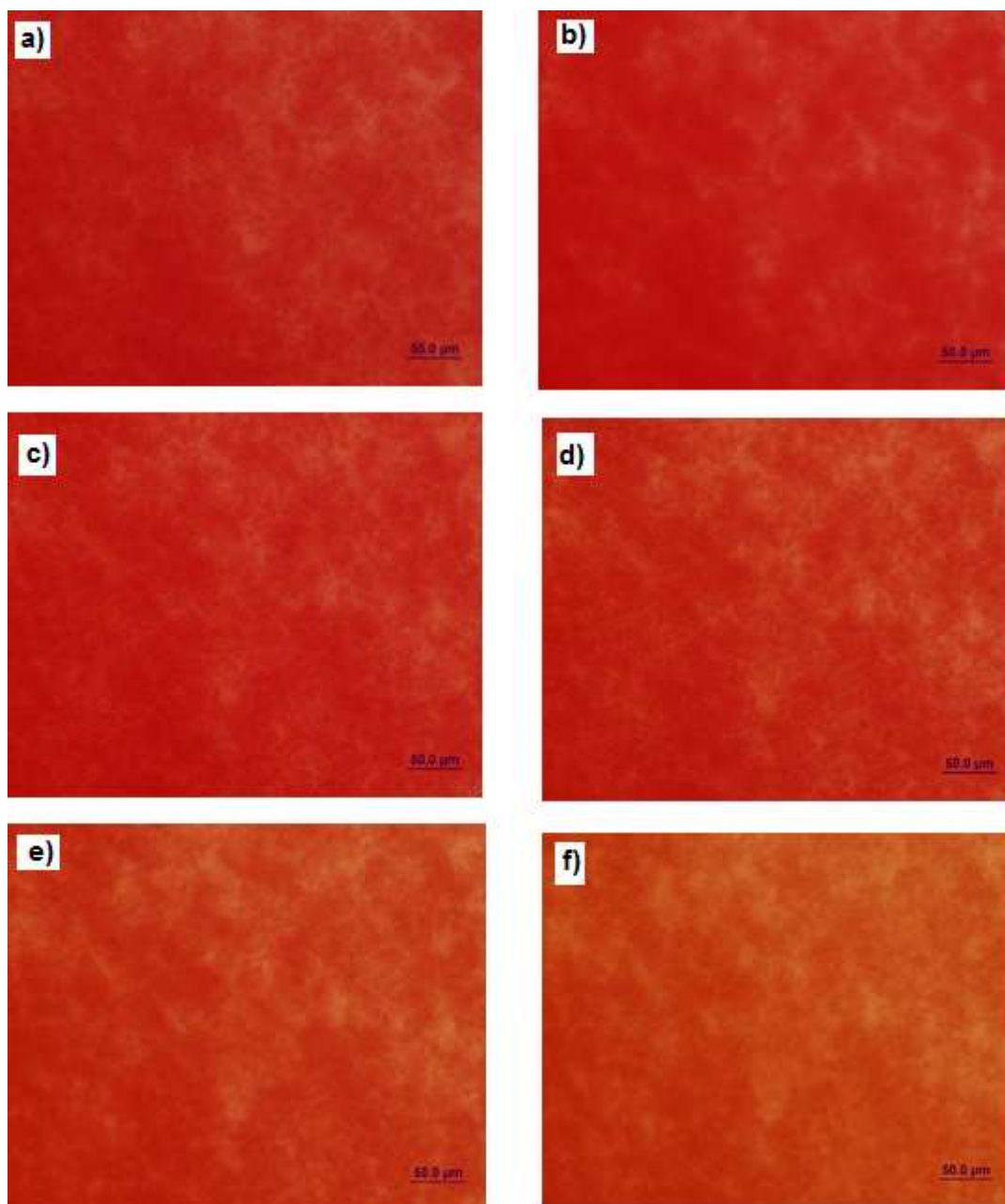
**FIGURA 13**



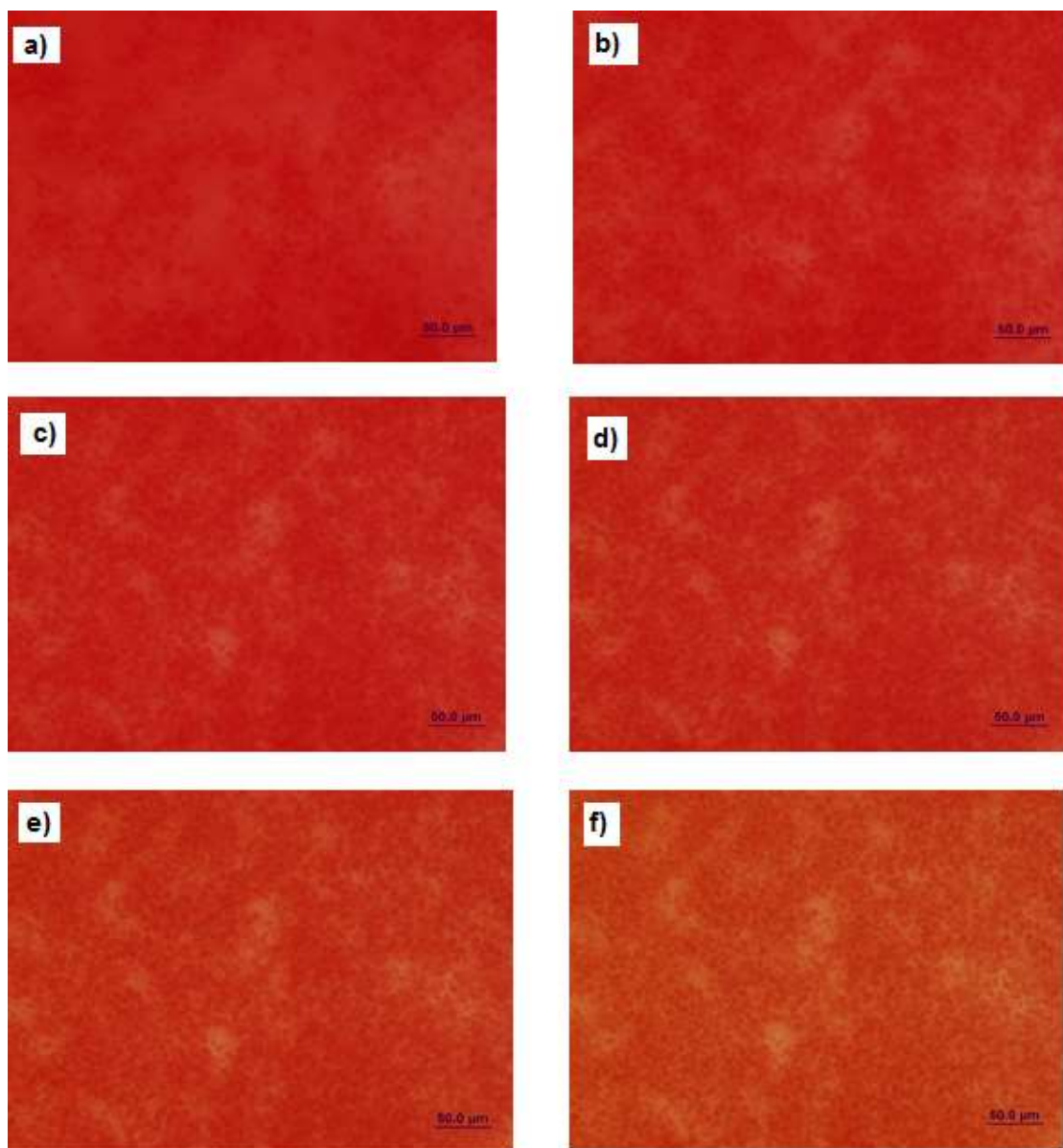
**FIGURA 14**



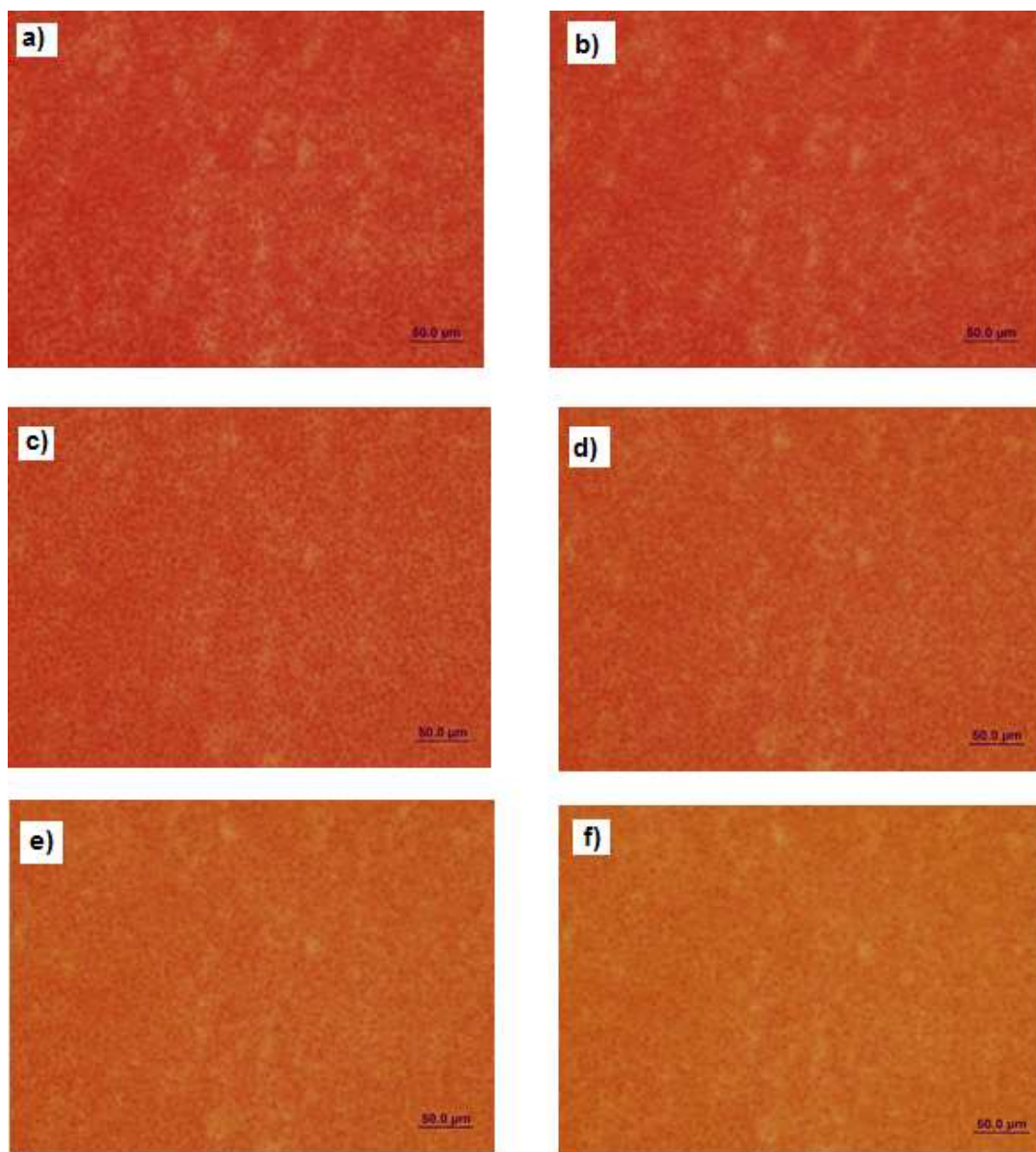
**FIGURA 15**



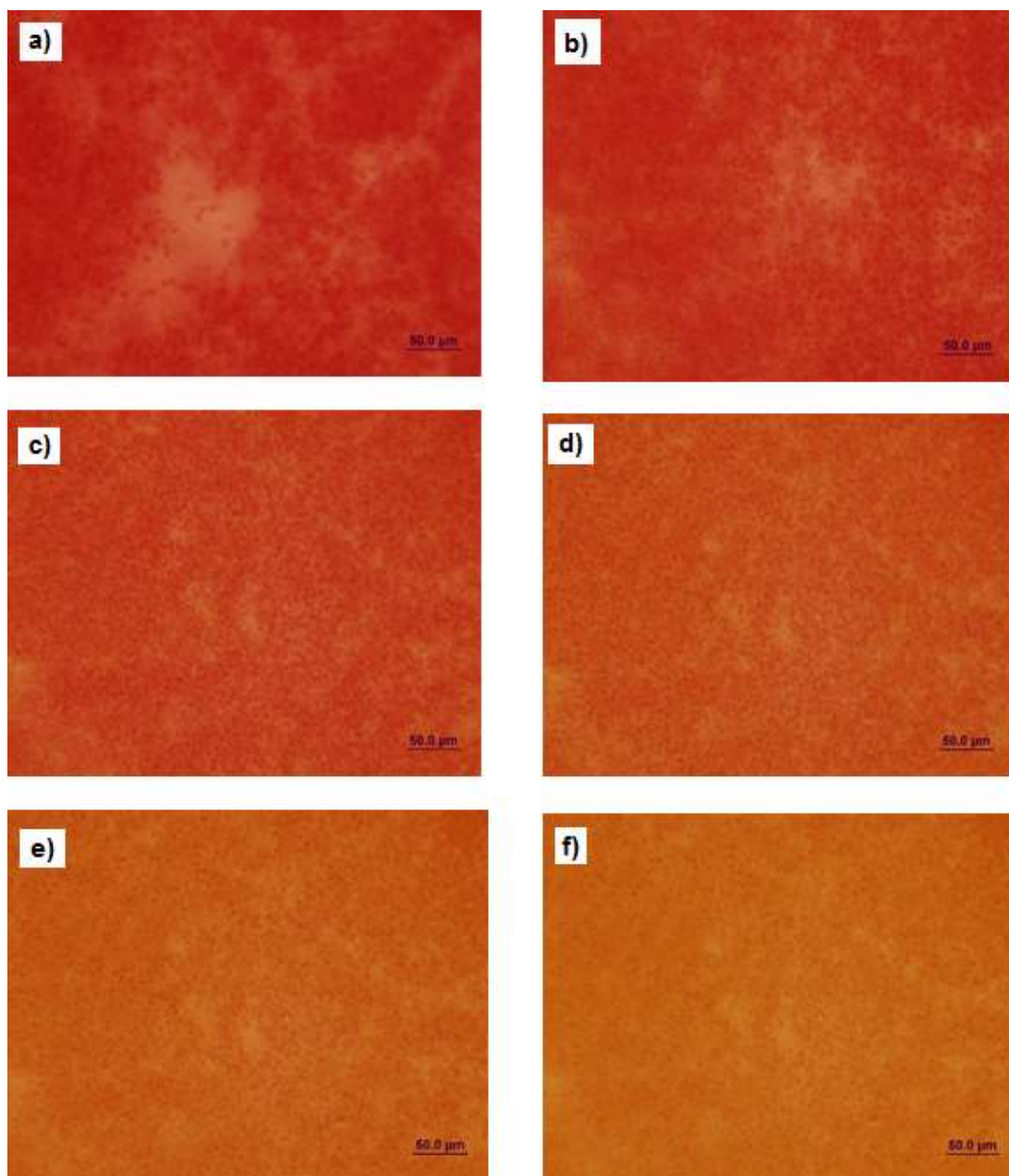
**FIGURA 16**



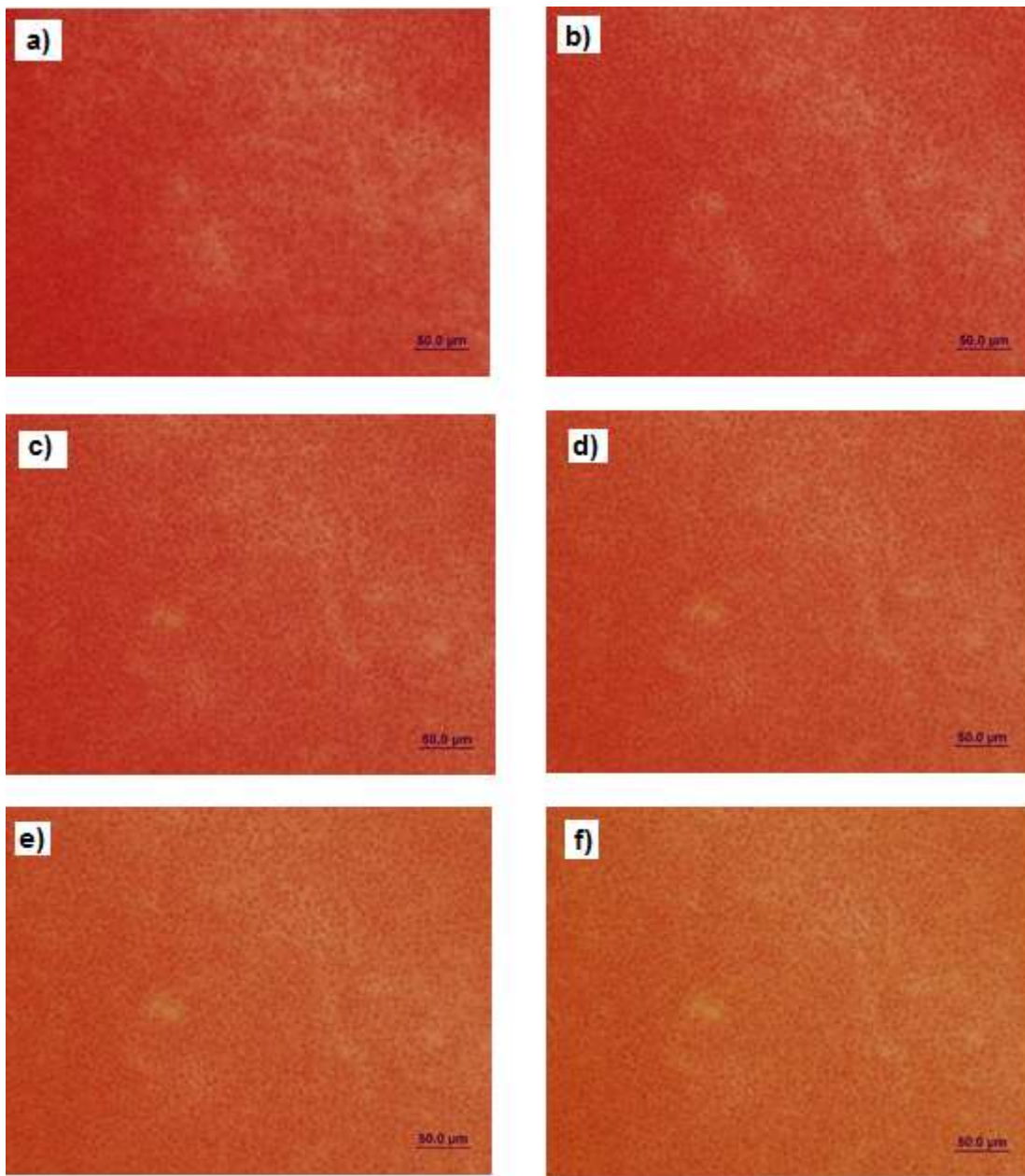
**FIGURA 17**



**FIGURA 18**



**FIGURA 19**



**FIGURA 20**

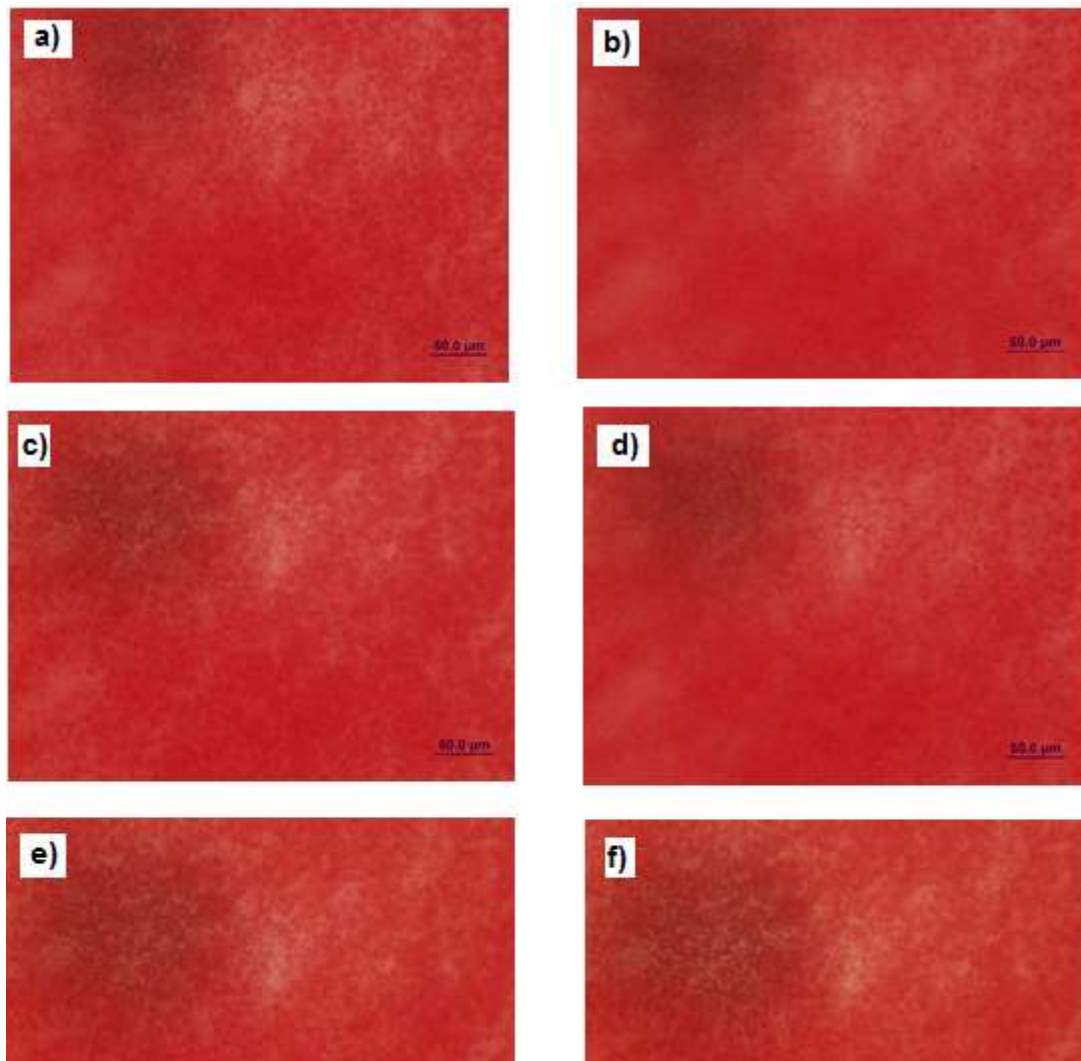


FIGURA 21

## RESUMO

**MÉTODO DE PREPARAÇÃO DE AGENTES HEMOSTÁTICOS E ANTI-HEMORRÁGICOS A BASE DE PECTINAS; AGENTES HEMOSTÁTICOS E ANTI-HEMORRÁGICOS A BASE DE PECTINAS E SEU USO**

O presente pedido de patente de invenção refere-se a uma nova tecnologia que consiste no método de preparação de agentes hemostáticos e anti-hemorragicos a base de pectinas, assim como o biopolímero de pectina e seus derivados como agentes hemostáticos para uso em aplicações cirúrgicas e odontológicas. Os novos agentes hemostáticos a base de pectina foram sintetizados, caracterizados por diferentes técnicas espectroscópicas, e sistematicamente modulados para atuarem com maior eficiência na cascata de coagulação. Os estudos da ação hemostática dos novos agentes derivados de pectina foram feitos *in vitro*, empregando-se para isso análises tromboelastográficas, comparadas à ação de agentes hemostáticos comerciais à base de quitosana, celulose e materiais inorgânicos e sua ação foi superior aos dos agentes hemostáticos comerciais. A avaliação de parâmetros tais como: a) o tempo reação para de formação de um coágulo de com tamanho de aproximadamente 2 mm, o que caracteriza o início da produção de fibrina, b) o tempo de formação de um coágulo firme de 20 mm e a taxa de geração de trombina e a conversão de fibrinogênio em fibrina, c) propriedade elástica da fibrina formada e adesão plaquetária.