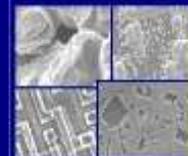




PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia
Faculdade de Física
Faculdade de Química



PGETEMA

CONFECÇÃO DE ESTRUTURAS TUBULARES PERMEÁVEIS DE PLGA

MARIANE GIACOMINI SCHARDOSIM

QUÍMICA INDUSTRIAL

LICENCIADA EM QUÍMICA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM
ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

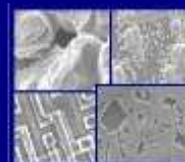
2012



PUCRS

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Faculdade de Engenharia
Faculdade de Física
Faculdade de Química



PGETEMA

CONFECÇÃO DE ESTRUTURAS TUBULARES PERMEÁVEIS DE PLGA

MARIANE GIACOMINI SCHARDOSIM

QUÍMICA INDUSTRIAL

LICENCIADA EM QUÍMICA

ORIENTADOR: PROF. DR. ROBERTO HUBLER

CO-ORIENTADOR: PROF DR. JEFFERSON BRAGA SILVA

Dissertação de Mestrado realizada no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre/Doutor em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

**Porto Alegre
2012**

*“Temos o destino que merecemos.
O nosso destino está de acordo com os nossos méritos.”*

Albert Einstein

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação aos meus exemplos de vida, Eliane Maria Giacomini e Diomar Elemar Schardosim, que sempre me possibilitaram realizar os meus sonhos e objetivos. Estas duas pessoas com muito carinho, discernimento, confiança e dedicação estiveram ao meu lado, me encorajando nas horas difíceis e me aplaudindo nos momentos de glória. Obrigada por serem meus pais, seres extremamente corretos e competentes, fonte de inspiração, apoio e ensino diário.

AGRADECIMENTOS

Os meus agradecimentos:

Ao professor doutor Roberto Hübler pela orientação durante os dois anos de iniciação científica e um ano de mestrado. Por sempre me estimular a crescer científica e pessoalmente, pelas inúmeras trocas de impressões, correções e comentários essenciais ao desenvolvimento deste trabalho. Agradeço principalmente por acreditar no meu potencial e no projeto desenvolvido.

Ao professor doutor Jefferson Braga Silva pelas orientações e conversas durante reuniões, além de se por a disposição para questionamentos ao longo deste projeto.

À professora doutora Rosane Ligabue por disponibilizar a realização da caracterização de cromatografia de permeação em gel e por fazer parte da banca avaliadora

À Gabriela e a Jéssica pela disponibilidade, compromisso e dedicação no desenvolvimento deste trabalho, além da amizade construída.

Aos colegas e amigos do GEPSI, Paula, Renata, André, Gabriela, Jéssica, Fabiana, pelo companheirismo e todas as conversas e cafés.

Aos amigos sempre presentes, Andrieli, Rúbia, Fernanda, Felipe, Luciano, pelo apoio ao longo deste ultimo ano.

À CAPES pela bolsa no Programa de Pós-Graduação.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS.....	5
SUMÁRIO	6
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	13
RESUMO.....	14
ABSTRACT.....	15
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos Específicos.....	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1. Biomateriais.....	21
3.1.1. PLGA.....	23
3.2. Engenharia de tecidos.....	27
3.3. Nervos periféricos.....	29
3.3.1 Sutura.....	30
3.3.2 Transplantes.....	31
3.3.3 Estruturas tubulares.....	31
3.3.3.1 Liberação de fatores de crescimento	32
3.3.3.2 Nanofuncionalização.....	34
3.4. Técnicas de caracterização.....	34
3.4.1 Microscopia Eletrônica de Varredura e Espectroscopia de Energia Dispersa.....	35
3.4.2 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier.....	35
3.4.3 Cromatografia de permeação em gel	36
3.4.4 Ângulo de contato.....	36

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
4.1. Preparação das estruturas poliméricas	38
4.1.1 Membranas.....	38
4.1.1.1 Tratamento químico.....	39
4.1.2 Estruturas tubulares.....	40
4.1.2.1 Tratamento químico.....	41
4.2. Degradação hidrolítica <i>in vitro</i>.....	41
4.3. Impregnação/liberação de amido	42
4.3.1. Impregnação de amido	42
4.3.2. Liberação de amido	43
4.4. Preparação das amostras para realização das caracterizações	44
5. RESULTADOS PRÉVIOS E DISCUSSÕES.....	47
5.1. Caracterização das membranas	47
5.1.1. Difração de raios X	47
5.1.2. Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier	48
5.1.3. Morfologia superficial.....	51
5.1.4. Ângulo de contato.....	54
5.2. Caracterização das estruturas tubulares	56
5.2.1 Morfologia	56
5.2.2 FTIR.....	60
5.2.3 Degradação <i>in vitro</i>	62
5.2.3 GPC.....	68
5.2.4 Impregnação de amido	70
5.2.5 Liberação de amido.....	72
6. CONCLUSÕES.....	78
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	81
8. REFERÊNCIAS	82

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Hidrólise da ligação éster do PLGA.....	17
Figura 2. Fragmento de mandíbula do povo Maia encontrada na <i>Playa de los Muertos</i> em 1931.....	21
Figura 3. Estrutura química do PLGA (x se refere às unidades de ácido láctico e y às unidades de ácido glicólico).....	25
Figura 4. Período de degradação em razão das diferentes concentrações de ácido láctico e glicólico.....	26
Figura 5. Técnica utilizada pela Engenharia de tecidos.....	27
Figura 6. Pintura de Fra Angelica, "Healing of Justinian".....	28
Figura 7. Estrutura interna de um nervo periférico.....	30
Figura 8. Relação entre ângulo de contato e molhabilidade. Imagem adaptada.....	37
Figura 9. (a) Porta amostra 1 e (b) Porta amostra 2, sendo utilizados na caracterização de FTIR, para membranas e tubos respectivamente.....	45
Figura 10. Difratoograma da amostra M2 mostrando uma amorfização em 2θ entre 11° e 25°	47
Figura 11. Difratoograma das amostras M3 e M3a mostrando uma amorfização em 2θ entre 11° e 25°	48

Figura 12. Difração de raios X obtida para a amostra M3e.....	49
Figura 13. FTIR da amostra M2 antes (a) e depois (b) do processo de vácuo.....	49
Figura 14. FTIR das amostras M3 (a) e M3a (b).....	50
Figura 15. FTIR das membranas M3b (a) e M3e (b) mostrando o surgimento de uma banda característica a ligações O-H.....	51
Figura 16. Micrografias da amostra M1 em magnificações de 250x (a) e 10000x(b).....	52
Figura 17. Micrografias da amostra superficialmente porosa com magnificações de 250x (a) e 1000x (b) respectivamente. Imagens obtidas no modo SE.....	52
Figura 18. Micrografias obtidas no modo SE da amostra M3 em magnificações de 250x (a) e 40000x (b), respectivamente.....	53
Figura 19. Micrografias obtidas no modo SE da amostra M3c em magnificações de 500x (a) e 20000x (b) respectivamente.....	53
Figura 20. Micrografias obtidas no modo SE da amostra M3e em magnificações de 1000x (a) e 2000x (b) respectivamente.....	54
Figura 21. Imagens das gotas de agua sobre as amostras M2a (a), M2b (b), M2c (c) e M2d (d) M2e (e).....	55
Figura 22. Variação do ângulo de contato nas membranas conforme o tratamento químico sofrido.....	56
Figura 23. Tubo confeccionado a partir de uma membrana superficialmente porosa em magnificação de 75x.....	57

Figura 24. Micrografias do tubo T1 mostrando a solda (a) e a secção do suporte (b).....	58
Figura 25. Micrografias do exterior do tubo com proteção de PLGA com magnificações de 2000x (a) e 5000x (b) respectivamente.....	58
Figura 26. Detalhe dos poros formados no interior do tubo de PLGA em magnificação de 500x (a) e 2000 (b).....	59
Figura 27. Micrografia da secção transversal do tubo T2 em magnificações de 45x (a) e 250x (b).....	60
Figura 28. Micrografias das amostras T2a (a), T2b (b) e T2c (c) em aumentos de 250x, 500x e 200x respectivamente.....	61
Figura 29. FTIR das amostras T2a (a) e T2c (b).....	62
Figura 30. Porcentagem mássica de PBS absorvido após três dias de degradação.....	63
Figura 31. Perda mássica dos tubos de PLGA ao longo do período de degradação.....	64
Figura 32. Imagem da amostra T2c após 45 dias de degradação.....	65
Figura 33. Imagens de microscopia das amostras T2 (a, b); T2a (c, d); e T2c (e, f) em aumentos de 50 e 300X respectivamente após 72h de degradação eletrolítica.....	66
Figura 34. imagens das amostras T2 (a,b), T2a (c,d) e T2c (e,f) após 60 dias de degradação.....	68

Figura 35. Massa molar ponderal das amostras T2, T2a e T2c antes do processo de degradação.....	69
Figura 36. Massa molar média ponderal das amostras T2, T2a e T2c ao longo do processo de degradação hidrolítica até o período de 28 dias.....	70
Figura 37. Quantidade de amido inserido em estruturas porosas tubulares (T2, T2a e T2c) em porcentagem com relação à massa inicial do tubo em 3 diferentes concentrações.....	71
Figura 38. Gráfico normalizado da inserção de amido em 3 concentrações diferentes mostrando a eficiência obtida.....	71
Figura 39. Micrografias das amostras T2 e T2e após inserção de amido (12,5mg/mL).....	72
Figura 40. Micrografias das amostras T2 e T2e após inserção de amido (37,5 mg/mL).....	73
Figura 41. Perda mássica das estruturas tubulares com amido em 3 concentrações.....	74
Figura 42. Micrografias das amostras T2, T2a e T2c com concentração de 75mg/mL de amido.....	75
Figura 43. Amostra T2a com concentração de 75mg/mL de amido após 28 dias de degradação.....	76
Figura 44. Micrografia da amostra T2 após 28 dias de degradação (75mg/mL).....	76

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: classificação dos grupos de membranas, de acordo com os procedimentos utilizados para confecção e tratamentos realizados.....40

Quadro 2: classificação dos grupos de tubos, de acordo com os procedimentos utilizados para confecção e tratamentos realizados.....41

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

g	Gramma
mg	miligrama
L	Litro
h	Hora
nm	Nanômetro
mm	milímetro
mL	mililitro
Pa	Pascal
kV	Quilovolt
At%	Porcentagem atômica
cm	Centímetro
m	Metro
θ	Theta
λ	Lambda
$K\alpha\text{Cu}$	Energia de irradiação do cobre
PLGA	Ácido poli (<i>glicólico-co-lático</i>)
PLLA	Ácido poli (L-lático)
PLA	Ácido poli (lático)
PGA	Ácido poli (glicólico)
PBS	Tampão fosfato-salino

RESUMO

SCHARDOSIM, Mariane Giacomini. **Confecção de estruturas tubulares permeáveis de PLGA para regeneração nervosa**. Porto Alegre. 2012. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Danos a nervos periféricos são formas comuns de lesões que podem causar perda de mobilidade e diminuir a qualidade de vida. Apesar dos avanços no campo biomédico, existem poucos casos em que há recuperação funcional completa de um nervo danificado. A aplicação de polímeros biodegradáveis tais como PLGA, apresenta uma alternativa viável no tratamento de lesões de nervos periféricos por possuir resistência mecânica, biocompatibilidade e degradação controlada. Uma matriz de PLGA deve apresentar poros na ordem de micrômetros e nanômetros, oferecendo a possibilidade de inclusão de fatores de crescimento e possivelmente promovendo uma libertação constante destas estruturas biológicas. O objetivo desta pesquisa é produzir matrizes porosas de PLGA. Isto foi realizado através da dissolução do polímero em clorofórmio, seguida da adição de um composto porogênico. Uma haste de titânio com 2mm de diâmetro foi imersa na suspensão obtida e quando retirada, foi seca em capela, obtendo uma camada de PLGA/agente porogênico na superfície da haste. Na sequência, a haste foi imersa em uma solução de PLGA com clorofórmio. Após seca durante 2h em capela, as hastes de titânio foram submersas em água deionizada durante 48h, durante as quais, a água foi trocada a cada 8h, para remoção do agente porogênico. Após este processo, as estruturas tubulares formadas são facilmente removidas das hastes. Finalmente, os tubos confeccionados foram divididos em grupos, e tratados com diferentes concentrações de hidróxido de sódio, para criação de poros na ordem de nanômetros, sendo, subsequentemente, secos em forno a vácuo durante 48h. As estruturas obtidas foram caracterizadas por XRD, FTIR, MEV e a degradação in vitro foi acompanhada por GPC.

Palavras-Chaves: PLGA, estrutura tubular, nanoestrutura, nervos periféricos.

ABSTRACT

SCHARDOSIM, Mariane Giacomini. **Confection of permeable tubular scaffolds of PLGA for nerve regeneration.** Porto Alegre. 2012. Master. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Peripheral nerve injury accident is a common type of lesion that can cause loss of mobility and decrease the quality of life. Despite advances in the biomedical area, there are few cases where there is complete functional recovery of a damaged nerve. The application of biodegradable polymers such as poly(lactide-co-glycolide) (PLGA), shows a viable alternative of treatment in peripheral nerves injuries for presenting mechanical strength, biocompatibility and controlled degradation, being also an excellent material for drug delivery. A PLGA scaffold should be porous with pore sizes on the order of micro-and nanometer, which offers the possibility to insert growth factors, promoting a constant release of these biological structures. The aim of this research is to produce porous scaffolds of PLGA. This was achieved by dissolving the polymer in chloroform, adding a porogenic compound. A titanium rod with 2mm in diameter was deeped in the suspension obtained and dried in a hood, obtaining a layer of PLGA / porogen agent on the surface of the rod. In sequence, the rod was immersed in a solution of PLGA with chloroform. After dried for 2 hours in a hood, the titanium rods were submerged in deionized water for 48 hours, during which the water was changed every 8 hours in order to remove the porogenic agent. After this process, the tubular structures formed were easily removed from the rods. Finally, the prepared tubes were divided into groups and treated with different concentrations of sodium hydroxide, to create pores in the order of nanometers, and subsequently vacuum dried for 48 hours. The structures obtained were characterized by XRD, FTIR, SEM and the in vitro degradation was monitored by GPC.

Keywords: PLGA, scaffold, nanostructure, peripheral nerves.

1. INTRODUÇÃO

Danos a nervos periféricos são formas comuns de traumas causados por acidentes de tráfego, remoções de tumores, efeito colateral de diversos tipos de cirurgias, incluindo intervenções ortopédicas e cirurgias cosméticas faciais, entre outros. Traumas a nervos periféricos complicam cerca de 5% dos ferimentos nas extremidades causados por esportes ou acidentes, podendo levar a perda completa ou parcial da função do nervo [1]. A forma mais comum de tratamento consiste em suturar as duas pontas do nervo [2]. Entretanto, em casos críticos em que as duas pontas do nervo estão distantes, esta técnica não pode ser aplicada. Nestes casos, enxertos autólogos oferecem bons resultados na regeneração nervosa. No entanto, existem desvantagens óbvias na utilização desta técnica, como a perda de função no sítio doador, formação de neuromas potencialmente dolorosos e a falta de material para enxerto, são somente algumas das desvantagens reportadas [3, 4]. Uma alternativa é a utilização de enxertos poliméricos que viabilizem a recuperação do nervo rompido fornecendo sustentação durante a regeneração nervosa [1].

Silicone foi o primeiro material sintético a ser utilizado em rompimentos de nervos por ser inerte e elástico. Porém, estudos mostram que se acumulam fatores neurotróficos e células inflamatórias no interior dos mesmos, o que indica reações imunológicas, levando a um segundo procedimento para a remoção da prótese. Enxertos bioabsorvíveis apresentam vantagens significativas sobre implantes permanentes, uma vez que as chances de inflamações crônicas são reduzidas e uma nova cirurgia para remoção da prótese não se faz necessária. Além disso, em próteses poliméricas sintéticas ou naturais é possível incorporar medicamentos, células-tronco, fatores de crescimento entre outras moléculas bioativas para a liberação durante a degradação do material polimérico. Esse processo permite

biodisponibilidade prolongada do fármaco durante o processo de regeneração nervosa [5].

O PLGA, copolímero sintético constituído de PLLA e PGA, tem sido o polímero sintético mais utilizado para liberação controlada de fármacos [6, 7, 8]. A utilização deste material como um guia, em associação a liberação de fármacos, para regeneração nervosa em substituição ao silicone tem sido amplamente reportada [1, 2, 7, 8,]. Para esta finalidade uma matriz deve apresentar algumas características indispensáveis:

1) Apresentar degradação controlada [9]; Quando materiais são implantados em tecidos vivos, uma reação a estes materiais é iniciada. Esta resposta pode ser útil para integração do implante a princípio, porém, implantes perpétuos podem levar a inflamações crônicas, perdendo assim, sua função. Quando são utilizados materiais degradáveis, a resposta imunológica é afetada ainda pelos produtos gerados durante a degradação [10]. O PLGA é degradado através de hidrólise gerando como produtos o ácido lático e o ácido glicólico, ambos metabolitos naturais [8, 11, 12]. O mecanismo de degradação hidrolítica da ligação éster presente no PLGA pode ser observado na figura 1.

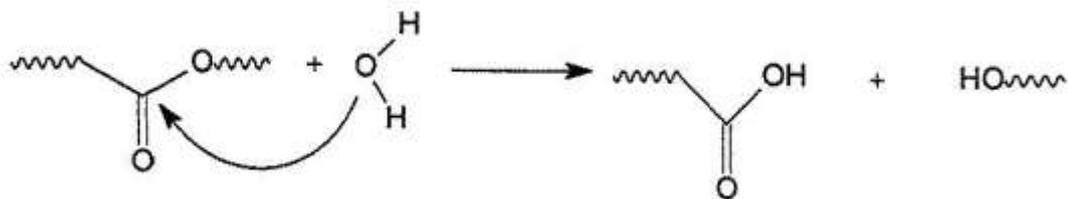


Figura 1. Hidrólise da ligação éster do PLGA [13].

O tempo de permanência do implante no corpo pode ser controlado, para que ocorra na mesma velocidade em que o nervo se regenera, simplesmente variando as frações de seus monômeros durante a copolimerização [14]. Se o biomaterial não for totalmente reabsorvido, forma-se um tecido fibroso no seu interior, o que prejudica ainda mais a maturação do nervo regenerado. Já a degradação rápida

pode provocar sofrimento mecânico ou danos bioquímicos aos axônios regenerados [14].

II) Apresentar estrutura porosa, com alta interconectividade entre os poros, conferindo características de semipermeabilidade; Troca controlada de fluidos, difusão de nutrientes, transferência de produtos da degradação do polímero do interior para o exterior do suporte são características importantes devido à propriedade autocatalítica do PLGA, que torna a degradação do polímero mais rápida por estar em contato com os produtos da degradação [15]. Estas características também são significativamente relevantes para a ampla regeneração do nervo. Além disso, estruturas porosas na ordem de micrômetros e nanômetros facilitam uma infiltração rápida de células, promovendo assim uma difusão constante dessas estruturas biológicas [5,10,16].

Já foi reportado por Rossela et al [17] que o tamanho dos poros determina a adesão celular no suporte, além de ser inversamente proporcional à área superficial do implante. Em seu trabalho, reportou a utilização de cloreto de sódio como agente porogênico em matrizes de PLGA para aplicações na engenharia de tecidos e obteve estruturas poliméricas com alto grau de porosidade. A utilização deste agente gerou mudanças nas propriedades mecânicas do material, tendo sido relatado um aumento na resiliência do polímero, além de resultar em uma matriz com maior resistência a deformação [18].

III) Apresentar composição química e morfologia da superfície adequada; As propriedades superficiais do implante devem favorecer a adesão e diferenciação celular [5, 19]. Como a topografia natural de tecidos do corpo humano resulta de proteínas (tendo nanômetros de comprimento e largura) [20], os suportes desenvolvidos a partir de materiais poliméricos devem incorporar características rugosas na superfície [21]. Além disso, grande parte dos polímeros sintéticos apresenta caráter hidrofóbico, fator que não favorece a adesão celular [22]. Espera-se que um material biocompatível, que mimetiza a topografia nanométrica dos tecidos, aumente a reposta celular, levando a uma melhor integração *in vivo*. Com esta finalidade, é possível nanofuncionalizar a matriz polimérica, através de tratamentos químicos (hidróxido de sódio), aumentando assim a área superficial e a

hidrofilicidade do implante de PLGA por meio da hidrólise dos grupos éster na superfície do implante [19, 22]. A quebra da cadeia polimérica através de tratamento químico acarreta a formação de ácido carboxílico e grupos hidroxila na superfície polimérica. A literatura relata apoio a esta alegação e demonstra que as superfícies nanotexturizadas reforçam as funções celulares [22].

IV) Possuir estrutura tubular tridimensional; Orientação física é um fator crítico durante a recuperação eficiente de um nervo danificado, portanto uma matriz tubular deve prover sustentação adequada para regeneração axonal [1]; O tubo deve proporcionar uma sustentação adequada para a regeneração do nervo danificado. É amplamente aceito que a orientação física dos axônios é fundamental para uma eficiente reparação de nervos periféricos. Se um tubo utilizado para ligar dois pontos de um nervo rompido não apresentar boas propriedades mecânicas, é possível que ocorra uma ruptura, devido à pressão exercida pelos tecidos circundantes. Em contra partida, se o tubo for pouco maleável, danos a tecidos próximos, como vasos sanguíneos, podem ocorrer [1].

Assim sendo, o objetivo deste trabalho é desenvolver e caracterizar estruturas tubulares de PLGA para aplicação na regeneração nervosa e administração de medicamentos que apresentem as características citadas anteriormente. Por consequência, este dispositivo seria ideal para completa regeneração de nervos periféricos.

2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver membranas e estruturas tubulares dotadas de micro e nanoporosidades para aplicação na engenharia de tecidos.

2.1. Objetivos Específicos

- Desenvolver matrizes tubulares superficialmente porosas através das técnicas de evaporação de solvente e solda das extremidades para utilização em lesões de nervos periféricos;

- Desenvolver matrizes porosas tubulares através da técnica de adição de partículas de cloreto de sódio para sustentação de lesões em nervos periféricos e liberação controlada de fármacos e moléculas bioativas;

- Avaliar a morfologia e a composição das estruturas formadas;

- Avaliar as modificações sofridas pelo polímero ao longo de sua degradação, *in vitro*, assim como o seu potencial para utilização na liberação de fármacos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Biomateriais

A utilização de biomateriais como se conhece hoje teve início na década de 60's e, desde então, tem-se observado grandes evoluções nas áreas médica, odontológica e biomédica [23]. Existem exemplos da tolerância do corpo humano a implantes desde a pré-história, ainda de forma não intencional. Restos mortais datados de 9000 anos continham a ponta de uma lança incorporada no quadril [24], aparentemente curado e não impedindo a sua locomoção.

Os etruscos, povo que habitou a península itálica entre 1200 e 700 a.C. desenvolveram um método para substituição de dentes perdidos por pontes feitas com ossos de boi esculpido [25]. Em 600 a.C. a integração óssea foi alcançada a partir de conchas do mar, pelo povo maia, (figura 2) e, em 200 a.C. utilizando ferro, ambos como implantes odontológicos. Amálgamas dentárias foram utilizadas pela primeira vez em 659 d.C. pelos chineses com o objetivo de reparar dentes deteriorados. Contudo, grande parte dos implantes produzidos falhava devido à falta de conhecimento a respeito da toxicidade dos materiais utilizados [24].



Figura 2. Fragmento de mandíbula do povo Maia encontrada na *Playa de los Muertos* em 1931 [25].

Evidências históricas indicam a utilização de suturas há 32000 anos, quando feridas já eram fechadas por meio de sutura ou cauterização. No Egito antigo a realização de suturas era feita utilizando linho, e na Europa, durante a idade média se utilizava catagute (Fio animal, geralmente de intestino de carneiro ou gato, usado em cirurgias como suturas). Relatos encontrados na literatura grega descrevem a utilização de fios de ouro para suturas entre 130-200 d.C. e em 1816 Philip Physick sugeriu a utilização de fios de chumbo, notando porém, reações adversas [24].

Estudos a respeito da bioreatividade de ouro, prata, chumbo e platina começaram a ser realizados em 1829 em cachorros, por H. S. Levert, obtendo resultados favoráveis na utilização de platina. [24]. Zierold publicou em 1924 um estudo referente a testes de diversos materiais, também em cachorros, concluindo que, entre todos os materiais testados, ouro, prata, chumbo e alumínio são os únicos tolerados pelo organismo, porém não apresentam as propriedades mecânicas necessárias para aplicação.

A ineficiência de alguns biomateriais se deve principalmente a sua capacidade de resposta, comparando a tecidos naturais e órgãos, em relação à flexibilidade e a reatividade [24]. Com base neste argumento, Larry Hench desenvolveu no início de 1960 implantes contendo fosfato de cálcio e obteve bons resultados com relação à integração óssea. Estes materiais não cumprem perfeitamente as funções mecânicas de ossos, mas são estudados até os dias de hoje devido a sua habilidade de desencadear a formação óssea. [24]

Os primeiros relatos da utilização de polímeros na área biomédica surgiram em 1939 com celofane sendo aplicado como invólucro para vasos sanguíneos, provocando reações fibróticas e, nos anos subsequentes fios de nylon e poli(metil metacrilato) foram utilizados como suturas. Ingrahan *et al* descreveram em 1947 a utilização de polietileno como implante de material sintético, obtendo bons resultados quanto às reações imunológicas a corpo estranho, que foram caracterizadas como leves. Em 1954 foram publicados estudos toxicológicos realizados com silicone, sendo titulado como inofensivo por não apresentar toxicidade [23]. Akutsu *et al* exploraram as possíveis utilizações de poliuretano, principalmente como válvulas cardíacas, em 1959 [24].

Kulkarni *et al* publicaram o primeiro estudo referente à utilização de ácido poli (lático) pela medicina em 1966. Os autores demonstraram em animais de pequeno porte (ratos e porquinhos da Índia) que a degradação do polímero ocorre lentamente após ser implantado e, ainda é tolerado pelo organismo. Gester *et al* foram os primeiros pesquisadores a utilizarem PLA em cirurgia e traumatologia buco-maxilo-facial, em 1972. Os autores utilizaram placas de PLA para fixação interna de fragmentos ósseos, concluindo que este polímero produz reações inflamatórias tardias, bem como formação de cápsula fibrosa [26]. Placas de PLLA de alto peso molecular foram colocadas em dez pacientes para redução de fraturas isoladas do osso zigomático em 1993, por Bergsma *et al*. Em um período de acompanhamento de três anos, dois destes pacientes submeteram-se a uma nova cirurgia para remoção das placas, sendo constatada presença de material fibroso, facilmente separado do tecido adjacente e de consistência firme. Foram encontradas partículas de PLLA neste material, demonstrando que a aplicação de PLLA como implante pode gerar inflamações em decorrência provavelmente de sua cristalização, se mantendo no corpo mais tempo do que o necessário. Este efeito é descrito na literatura e se deve a semicristalinidade do polímero. A princípio, a água em contato com o polímero degrada a região amorfa, gerando um aumento percentual na porção cristalina devido ao rearranjo das cadeias originadas no processo de degradação [27, 28]. Em contrapartida, algumas décadas atrás o ácido poli (glicólico) (PGA) foi desenvolvido. A primeira aplicação deste polímero foi em suturas por apresentar baixa resistência mecânica quando comparado a outros polímeros e alta taxa de degradação.

3.1.1. PLGA

A descoberta de polímeros derivados de ácido lático e glicólico de baixo peso molecular ocorreu há algumas décadas, sendo utilizados principalmente como suturas [29]. A grande aceitação deste material devido a sua excelente biocompatibilidade, propriedades mecânicas adequadas e biodegradabilidade acabou por torná-lo atraente para outras aplicações [30]. PLGA é considerado o melhor biomaterial disponível para aplicações na liberação controlada de fármacos. Este copolímero pode ser processado gerando quase qualquer forma desejada, é

solúvel em diversos solventes, e em contato com água é degradado através de hidrólise de ligações éster.

Bryan *et al* em 2000 produziu um conduto poroso deste polímero e reportou o sucesso na regeneração do nervo ciático de ratos com espaço de 10 mm após doze semanas da aplicação *in vivo*. Em 2003 os mesmos autores publicaram a sequência do estudo, salientando a importância da infiltração celular no material polimérico, que foi mantido na região subcutânea durante sete dias antes de ser implantado, obtendo melhores resultados quando comparados aos suportes implantados imediatamente após a lesão [4].

Em 2002, Dorta *et al* publicaram a aplicação de filmes de PLGA em liberação de medicamentos *in vitro*, salientando que estas estruturas poderiam ser utilizadas para liberar agentes farmacêuticos de diversos tipos como hormônios, proteínas, peptídeos, antibióticos entre outros. Os filmes foram construídos a partir de três membranas prensadas juntas, das quais somente a do meio possuía o medicamento. Os resultados apresentados mostram uma liberação vigorosa no início, sendo liberado cerca de 20% da quantidade de medicamento colocado no filme, seguido de uma liberação gradual ao longo de 20 dias [8].

A preparação de um compósito tubular poroso de PLGA para aplicações na engenharia de tecidos foi reportada por Boccaccini *et al* em 2005. Filmes de polímero com biovidro foram preparados utilizando a metodologia de separação sólido-líquido induzido por nitrogênio líquido. Os filmes formados foram enrolados e soldados com clorofórmio na forma de tubos, gerando um ponto de fragilidade e redução na quantidade de poros. Este efeito pode vir a comprometer a integridade estrutural do suporte antes do desejado além de reduzir a infiltração de células e fluidos necessários nesta região [31].

Fatores que influenciam o período de degradação do PLGA

Existem fatores que afetam o período de degradação do polímero, entre os principais se encontram:

Vascularização do local do implante – Segundo Hollinger et al (1986) a localização do implante, e portanto a vascularização do local é determinante para o tempo de degradação de um implante, ocorrendo de forma mais rápida num local com alta vascularização. Em contrapartida, trabalhos mais recentes indicam que devido à propriedade autocatalítica do PLGA, a concentração dos produtos da degradação hidrolítica (ácido lático e ácido glicólico) em contato com o polímero acelera a degradação [13].

Razão entre ácido glicólico e ácido lático – PGA é um polímero com alto grau de cristalinidade em relação ao PLA por não conter grupos metila ligados à cadeia principal, como pode ser observado na figura 3 [13].

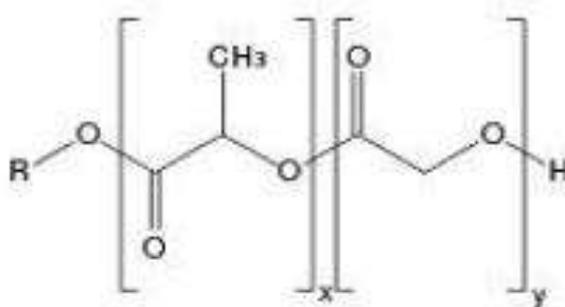


Figura 3. Estrutura química do PLGA (x se refere às unidades de ácido lático e y às unidades de ácido glicólico) [32].

A presença do grupo metila no PLA, além de influenciar a cristalinidade, o torna mais hidrofóbico em relação ao PGA. Portanto, copolímeros ricos em PLA apresentam caráter menos hidrofílico, o que diminui a quantidade de água absorvida, tornando o período de degradação mais longo. Além disso, as estruturas de PLGA 50:50 apresentam o menor período de degradação. Este dado está relacionado à cristalinidade do material. A relação entre composição e meia vida do polímero pode ser observada na figura 4 [32].

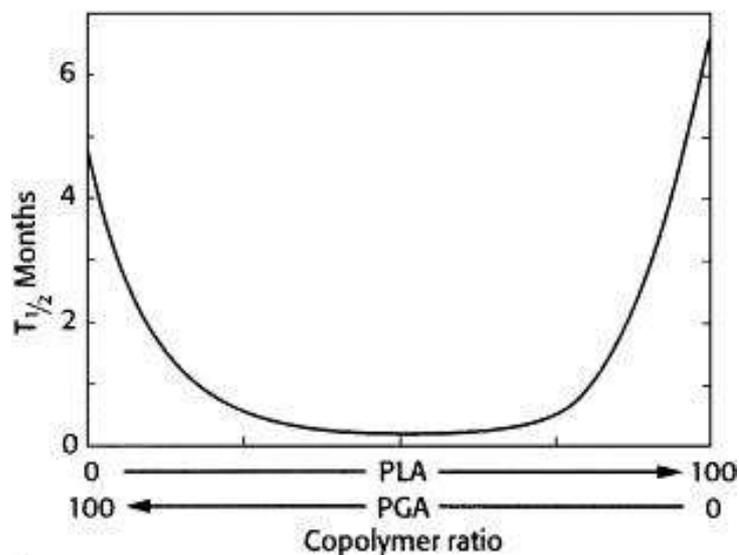


Figura 4. Período de degradação em razão das diferentes concentrações de ácido láctico e glicólico [13].

Composição química da superfície do implante – A composição química da superfície do implante tem grande influência na hidrofiliabilidade do mesmo. Este fator, como já foi mencionado, altera a quantidade de água absorvida pelo polímero, afetando assim o tempo de degradação [13].

Morfologia do implante – A influência da morfologia do suporte polimérico é relatada como um fator determinante no tempo de degradação do implante. Implantes densos, que não apresentam porosidade, sofrem degradação devido ao efeito autocatalítico do PLGA, enquanto implantes com alto grau de porosidade não apresentam este problema pois os poros existentes são responsáveis pela difusão dos produtos de degradação. Barbanti realizou em 2001 estudos referentes a degradação hidrolítica de PLLA e PLGA em membranas densas, membranas porosas (com adição de cloreto de sódio) e suportes esféricos (não porosos). Não foram encontradas diferenças no comportamento de degradação das membranas densas em relação aos suportes esféricos, sendo que estes sofreram uma degradação mais acentuada quando comparados às membranas porosas devido ao efeito autocatalítico. Este efeito também é descrito como sendo relativo a espessura da parede dos poros [13].

3.2. Engenharia de tecidos

Nas últimas décadas pesquisadores na área de biomateriais tem voltado a sua atenção a uma nova técnica para desenvolvimento e substituição de tecidos danificados. O desenvolvimento de tecidos pertencentes ao próprio paciente, produzidos fora do organismo através da coleta de células saudáveis que são cultivadas sobre estruturas poliméricas bioreabsorvíveis, é chamado de engenharia de tecidos [33]. É válido lembrar que células isoladas não formam tecidos ou órgãos, por isso é necessária a utilização de uma matriz como suporte para o crescimento celular [24], [34]. É estudada ainda a utilização de células-tronco e fatores de crescimento nesta técnica. A engenharia de tecidos apresenta vantagens também na área de transplantes de órgãos devido à possibilidade de expansão celular *in vitro*. Desta forma, somente algumas células precisariam ser retiradas do doador, para diferenciação e formação de um novo órgão sobre um material polimérico, sendo evitada a necessidade de doação de um órgão [13].

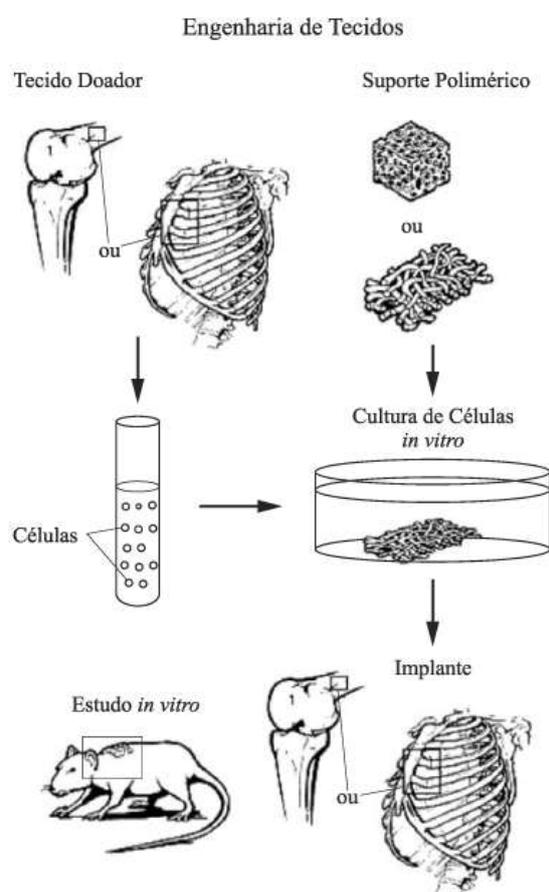


Figura 5. Técnica utilizada pela Engenharia de tecidos [35].

A figura 5 ilustra os procedimentos básicos realizados pela engenharia de tecidos para o desenvolvimento de novos tecidos.

Os primeiros relatos alusivos à aplicação da engenharia de tecidos bem sucedidos foram publicados em 1980. Contudo, a primeira referência histórica a esta técnica data de 1440, pela pintura de Fra Angelico, "Healing of Justinian", figura 6, na qual são representados os Santos Cosme e Damião implantando um membro em um soldado ferido [36].



Figura 6. Pintura de Fra Angelico, "Healing of Justinian" [37].

Ensaio relacionados à engenharia de tecidos foram realizados no início de 1970 pelo médico e pesquisador W. T. Green que tinha como objetivo criar uma nova cartilagem a partir da inserção de condrócitos em espículas de ossos e na sequência implantá-la em ratos [36]. Apesar de seu fracasso neste experimento, o autor concluiu que, com o desenvolvimento de novos biomateriais e avanço da ciência, novos tecidos e órgãos poderiam ser criados utilizando esta técnica.

Polímeros naturais biodegradáveis como soro albumina bovino (BSA), gelatina, colágeno, soro albumina humano (HSA) foram estudados para aplicações na engenharia de tecidos. Entretanto, estes materiais apresentam pureza questionável, o que limita o seu uso, assim como os altos preços [38], [39]. No final da década de 1990, células-tronco começaram a ser pesquisadas pelo doutor Una

Chen na Alemanha, porém existem questões éticas que devem ser levadas em consideração na utilização destas.

Vacanti e Langer, em 1999, procuraram desenvolver matrizes equivalentes a tecidos naturais específicas para inserção de moléculas bioativas e adesão celular, a partir de uma gama de polímeros sintéticos biocompatíveis e biodegradáveis [30].

Um polímero sintético foi implantado pela primeira vez em 1991 em um paciente com malformação congênita do tórax e ausência de esterno, devido a uma síndrome. A matriz confeccionada a partir deste polímero sintético passou pelo processo de inserção de células condrócitas autólogas (do próprio paciente) sendo implantada para formar o esterno [36].

3.3. Nervos periféricos

Nervos periféricos são responsáveis pelas funções sensitiva e motora das extremidades, portanto, lesões causadas por acidentes de tráfego, ressecção de tumores, efeitos colaterais de diversos tipos de cirurgias, entre outros [23], podem gerar perda parcial ou completa de função.

Augustus Waller descreveu a degeneração nervosa que ocorre após uma lesão em 1850 trabalhando com sapos. O seu estudo mostrou a degeneração do axônio distal e também o processo de regeneração nervosa, que é mais rápida em sapos jovens. Este pesquisador foi de tal importância para a compreensão deste fenômeno que a degeneração axonal ficou conhecida como degeneração walleriana [40].

Brown (1972) descreveu os principais fatores influentes na regeneração nervosa: a formação de neuromas; a idade do paciente; a extensão da lesão; o “gap” nervoso; os fatores tróficos e a técnica empregada para reparação nervosa [40].

Seddon classificou em 1943 as lesões nervosas em 3 tipos: neurapraxia, axonotmese e neurotmese [41].

Neurapraxia é caracterizada por uma lesão na bainha de mielina do nervo, mantendo o restante de sua estrutura intacta. Este tipo de lesão provoca perda temporária da função motora do nervo, porém não ocorre degeneração walleriana.

Axonotmese é caracterizada pela interrupção do axônio, mantendo a membrana epineural (bainhas conectivas) intacta. Estes danos a nervos periféricos provocam degeneração walleriana provocando um bloqueio na condução nervosa.

Neurotmese é caracterizada pelo bloqueio da condução nervosa. Neste tipo de lesão todo o nervo e suas estruturas estão danificados e a única forma de reparação é através de cirurgia [41].

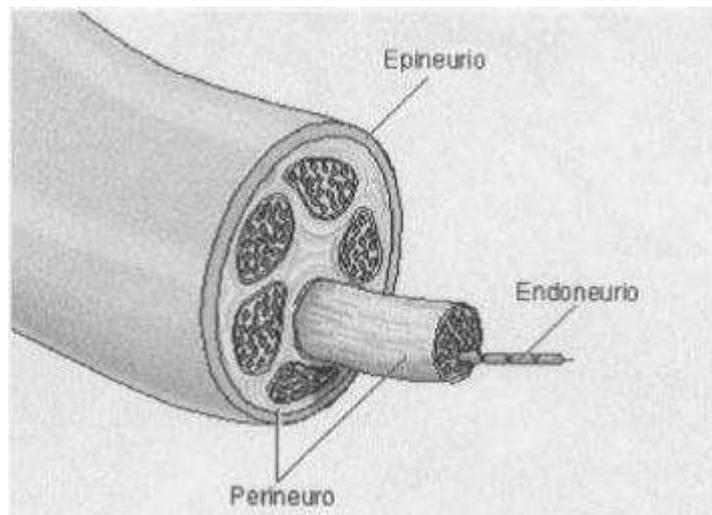


Figura 7. Estrutura interna de um nervo periférico [42].

O objetivo desta seção é apresentar a evolução nos processos utilizados para reparação de nervos periféricos e suas falhas.

3.3.1 Sutura

Os primeiros relatos que indicam a recuperação de lesões em nervos periféricos datam de 1393 por Chauliac, porém a utilização de sutura para reparação de rompimentos de nervos periféricos não foi aceita até 1850. Em 1847, Paget descreveu a utilização de sutura em uma lesão no nervo mediano em um paciente de 11 anos [42].

As principais técnicas de sutura utilizadas são: epineural, na qual a sutura passa através do epineuro; e fascicular, quando a sutura é realizada através do perineuro de cada fascículo [43, 44, 45, 46].

Tupper *et al* realizaram em 1988 um estudo comparativo entre as duas técnicas de sutura, concluindo, junto a outros pesquisadores, que a técnica de reparação epineural, tem vantagens sobre a fascicular por promover potencialmente um alinhamento axonal, obtendo melhores resultados em relação à regeneração nervosa [46]. Apesar disso, a recuperação sensorial e motora nunca é completa [47].

3.3.2 Transplantes

Em 1964, Smith introduziu as técnicas microcirúrgicas no reparo de nervos periféricos, representando o início de grandes avanços na área. O objetivo destas técnicas é realinhar o nervo, favorecendo a regeneração, com o menor trauma possível [48].

Utilizando estas técnicas, Millesi [49] demonstrou em 1967 ser possível realizar enxertos interfasciculares com nervos cutâneos autólogos. Este tipo de transplante é uma das práticas mais utilizadas hoje em dia, sendo conhecida como o padrão ouro da cirurgia reconstrutiva. Apesar disso, na maior parte das lesões em que este tipo de tratamento é aplicado, parte das funções não é recuperada, gerando incapacidades. Ademais, existem desvantagens óbvias na utilização de materiais autólogos em implantes, devidas principalmente a mudança na posição de determinado tecido, que pode produzir mudanças biológicas devido às novas interações deste material no local implantado e a perda de função no sítio doador [23, 50].

3.3.3 Estruturas tubulares

Para suprir as deficiências dos enxertos autólogos, nas últimas décadas houve o desenvolvimento de materiais artificiais como alternativa [23]. Baldini *et al* analisaram em 1984 novos métodos para a regeneração nervosa. Entre os principais métodos avaliados estão os condutos nervosos artificiais.

Heath *et al* apresentaram, em 1998, uma revisão sobre o desenvolvimento de enxertos artificiais para regeneração nervosa, por possibilitarem a concentração e liberação controlada de fatores neurotróficos, quando utilizados enxertos biodegradáveis, além de prevenirem a formação de neuromas [51]. Vasconcelos (1999) concluiu que a utilização de enxerto em rupturas nervosas é recomendada quando existe perda significativa da substância [52].

Ijkema-Paasen *et al.* (2004) descreveram a utilização de diferentes técnicas tradicionais no reparo de nervos, assim como, o uso de tubulização biológica, sintética, biodegradável e não biodegradável. Foi possível então concluir, a superioridade dos enxertos degradáveis quando comparados aos enxertos autógenos em relação à velocidade de regeneração. No entanto, não foi observada recuperação funcional completa, sugerindo ainda, que possivelmente sejam atingidos melhores resultados com a utilização de fatores neurotróficos associados aos enxertos biodegradáveis [53].

Em 2005, Boccaccine *et al* desenvolveram um suporte tubular de PLGA a partir de filmes porosos do polímero enrolados e soldados. Os resultados obtidos demonstram fragilidade e diminuição na porosidade do ponto da solda, além de redução na espessura, podendo comprometer a integridade do suporte prematuramente durante a degradação [31].

3.3.3.1 Liberação de fatores de crescimento

Fatores de crescimento são de extrema importância ao longo da regeneração nervosa por aumentar significativamente a viabilidade de neurônios motores. A sua administração em grande quantidade quando ocorre a lesão não é indicada, pois ocorreria uma difusão rápida destes fatores do alvo, assim como a perda da bioatividade [55]. Além disso, a liberação controlada de moléculas bioativas por um período prolongado é necessária para recuperação do tecido danificado, guiando a sua regeneração quando associadas a um suporte reabsorvível [55]. O período considerado crítico para administração de fatores de crescimento é durante a

primeira semana após a lesão, sendo estendido por quatro ou até mesmo oito semanas dependendo da gravidade da lesão [47].

Os fatores de crescimento são liberados pela combinação entre difusão das moléculas e degradação do polímero. Para retardar este processo, pode-se imobilizar as moléculas bioativas no suporte, tornando a degradação do suporte determinante na liberação destas. Este efeito pode ser atingido com a utilização de compostos químicos para adesão dos fatores de crescimento ao suporte como a heparina, ou através de uma modificação química na superfície, possivelmente gerando ligações covalentes entre o suporte e os fatores [55]. Levando em consideração que um suporte polimérico tubular poroso constituído de PLGA, utilizado como matriz para regeneração nervosa e liberação de fatores de crescimento sofre degradação hidrolítica tanto na superfície interna como na externa, a liberação destes fatores ocorre tanto na direção do nervo rompido ou lesionado quanto para os tecidos circundantes. Neste caso, seria interessante a aplicação de uma proteção na parte externa do tubo, quando o mesmo é extremamente poroso, para diminuir o efeito de difusão para o meio externo [54].

Lee *et al*, em 2004, publicaram a utilização de fatores de crescimento na regeneração de lesões em nervos ciáticos de ratos. Com os resultados obtidos foi possível concluir que a adição destes fatores a suportes biodegradáveis produz resultados melhores com relação à regeneração nervosa, quando comparado ao tubo sem fatores, sendo dependente da dosagem inserida [55].

Em 2008, Savignat *et al* avaliaram a regeneração de um nervo lesionado por esmagamento em ratos utilizando membranas poliméricas funcionalizadas com fatores de crescimento nervoso. Com este estudo os autores puderam concluir que a administração de fatores de crescimento melhorou a regeneração do nervo danificado com relação ao grupo controle. Todos os neurônios sensores foram regenerados um mês após a lesão no grupo que recebeu o tratamento com fatores de crescimento [47].

3.3.3.2 Nanofuncionalização

Alguns materiais podem vir a falhar quando utilizados como suporte *in vivo* por não apresentarem características similares às biológicas, não favorecendo a proliferação celular [22, 56]. A topografia natural de tecidos biológicos resulta de proteínas (tendo nanômetros de comprimento e largura), portanto, para melhorar a interação entre suporte e células, um tratamento químico com hidróxido de sódio pode ser realizado, tornando a topografia do polímero mais rugosa, e com poros na ordem de nanômetros [22]. Esta textura nanométrica é criada através da hidrólise das ligações éster na superfície, expondo assim grupos funcionais de ácido carboxílico e hidroxila, gerando também um aumento no caráter hidrofílico do polímero. É esperado que este tratamento químico funcione também para imobilizar moléculas bioativas inicialmente solúveis, como os fatores de crescimento, conforme descrito na seção 3.3.3.1.

Thapa *et al* publicaram em 2003 um estudo referente à aplicação de polímeros bioreabsorvíveis em substituição a tecido da bexiga. Seus resultados mostraram que as membranas poliméricas tratadas quimicamente com maiores concentrações de hidróxido de sódio apresentaram nanotextura e rugosidade na superfície. Como resultado a este tratamento químico, as membranas tratadas quimicamente apresentaram um número de células aderidas até 109% maior do que nas membranas sem tratamento [22].

3.4 Técnicas de caracterização

Analisar a estrutura dos implantes formados, a composição final e a morfologia da superfície é de extrema importância para prever a interação do implante com o organismo. Portanto, esta seção descreverá a importância da realização das técnicas empregadas, descrevendo o princípio de funcionamento de cada uma.

3.4.1 Difração de raios X

Difração de raios X (XRD) é uma técnica versátil, não destrutiva que revela informações referentes à composição química e estrutura cristalina de materiais naturais e sintéticos. A estrutura cristalina é uma distribuição regular de átomos no espaço. Estes são dispostas de modo a formarem uma série de planos paralelos. Esta técnica baseia-se na emissão de raios X na superfície da amostra, seguido da detecção dos fótons difratados [57].

Esta técnica foi utilizada em 2003 por Boccaccini para caracterização de membranas de PLGA com biovidro [5].

3.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

O princípio físico de operação de um microscópio eletrônico de varredura é baseado na emissão de elétrons por um filamento em alto vácuo, varrendo a superfície da amostra. A interação da superfície da amostra com o feixe de elétrons provoca modificações no sinal destes elétrons de acordo com as modificações da superfície da amostra. Desta forma, são emitidos elétrons secundários, elétrons retroespalhados, fótons, raios X característicos, elétrons Auger, etc. para formação da imagem detalhada da topografia da amostra são detectados os elétrons secundários, enquanto para determinar a composição, são detectados os retroespalhados [57].

Quando amostras condutoras são analisadas não é requerido nenhum tipo de preparação ou tratamento prévio. Entretanto, no caso de amostras isolantes se faz necessária à cobertura da superfície da amostra com uma fina camada de ouro ou outros metais [57].

Esta técnica foi utilizada por Boccaccini et al para identificar a formação de estrutura porosa no interior de membranas de PLGA e posteriormente para análise de estruturas tubulares confeccionadas a partir destas membranas [5].

3.4.3 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

O objetivo desta técnica é a identificação dos grupos funcionais presentes em determinada amostra. Diferentes tipos de ligações absorvem frequências

características de radiação infravermelha. Os átomos unidos em uma molécula podem realizar três tipos de movimento: translação, rotação e vibração molecular. Quando radiação infravermelha atinge a amostra, a energia absorvida é transformada nestes tipos de movimentação. Estas energias são quantizadas e geram um espectro onde as ligações presentes no composto analisado podem ser identificadas [57, 58].

Além de fornecer informações qualitativas, a análise pode ser utilizada para obter informações quantitativas, avaliando a intensidade e o formato dos picos no espectro. A largura dos picos é uma função da homogeneidade da ligação química [57].

Esta caracterização foi utilizada por Jayasuriya em 2006 para identificação de ligações químicas presentes no PLGA assim como as mudanças causadas pela adição de um componente [59].

3.4.4 Cromatografia de permeação em gel

A cromatografia de permeação a gel é uma das técnicas mais utilizadas para determinação da massa molar de polímeros, sendo relativamente rápida e segura. Esta técnica permite a separação de componentes de uma mistura através de fracionamento em coluna por tamanho das moléculas em solução. A solução contendo o material a ser analisado percola por um leito estacionário poroso, onde as moléculas são fixadas conforme a sua massa molar. Desta forma, as primeiras moléculas a serem eluídas são as de maior tamanho, que não são fixadas nos poros da coluna. As moléculas menores são retidas por períodos de tempo progressivamente maiores por ficarem detidas em poros cada vez menores, sendo carregados em frações consecutivas de tamanhos decrescentes [60, 61].

Desai publicou em 2007 um estudo referente a degradação de estruturas de PLGA. A cinética de degradação deste material foi acompanhada por cromatografia de permeação em gel [62].

3.4.5 Ângulo de contato

A análise de ângulo de contato pode ser realizada utilizando um goniômetro para medir o ângulo de contato do material desejado com um determinado fluido. Esta técnica foi utilizada por Croll em 2004 para avaliação de variações na molhabilidade do polímero durante a degradação [63]. Este dado é obtido através da observação do perfil de uma gota do fluido em contato com o material a ser analisado, medindo posteriormente o ângulo de contato. Quanto menor o ângulo de contato medido entre a superfície do material sólido e o líquido maior a molhabilidade, ou seja, mais o líquido molha esta superfície, conforme é mostrado na figura 8.

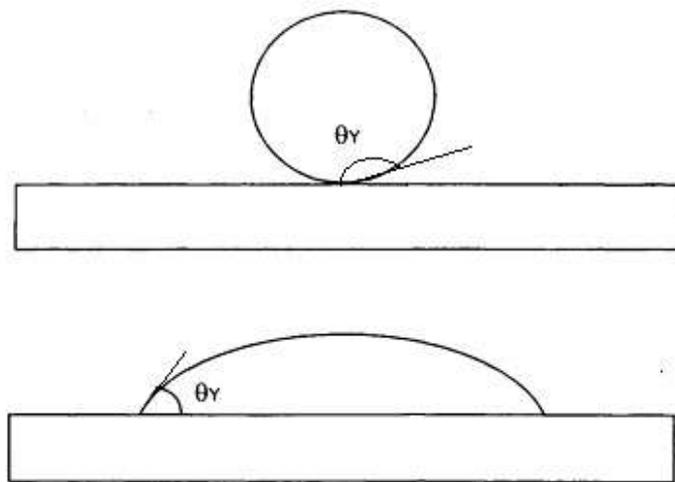


Figura 8. Relação entre ângulo de contato e molhabilidade. Imagem adaptada [64].

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão abordadas as metodologias de preparação das estruturas poliméricas e as técnicas de caracterização utilizadas.

4.1. Preparação das estruturas poliméricas

O PLGA utilizado para confecção das amostras foi adquirido da empresa PURAC (LACTOSORB[®] 8218 contendo 82% de PLLA e 18% de PGA) na forma de pellets.

4.1.1 Membranas

Primeiramente, foram preparadas membranas com o objetivo de enrolá-las formando tubos através da soldagem das pontas. Além disso, pôde-se analisar suas propriedades como porosidade e cristalinidade, antes mesmo de serem confeccionados os tubos.

Membranas lisas: Estas membranas foram preparadas através da metodologia de evaporação de solvente sem fluxo de ar. Rapidamente o polímero foi dissolvido em ultrassom de 40 kHz (Unique, modelo USC-1600) à temperatura ambiente utilizando clorofórmio (Merck) como solvente. A solução foi vertida em placas de Petri e o solvente evaporado em capela sem fluxo de ar por aproximadamente 2h.

Membranas superficialmente porosas: Estas membranas foram preparadas através da metodologia de evaporação de solvente com fluxo de ar. As membranas foram confeccionadas de maneira análoga as membranas lisas, porém, durante o período de evaporação de solvente, a placa contendo a solução de PLGA em

clorofórmio foi mantida em capela com fluxo de ar durante duas horas, viabilizando assim a formação de poros na superfície da membrana.

Membranas porosas: Estas membranas foram preparadas através da metodologia de adição de cloreto de sódio e posterior lixiviação. Após a completa dissolução do polímero, foi adicionado cloreto de sódio triturado (Merck) com granulometria final entre 2-50 micrômetros, como agente porogênico na proporção mássica de 1:16 (polímero/cloreto de sódio). Essa suspensão foi então colocada em uma placa de Petri em capela com fluxo de ar para completa evaporação do solvente durante 2 horas. As membranas confeccionadas foram colocadas em água deionizada por um período de 48h em ultrassom, sendo que, a água foi trocada a cada 8h.

4.1.1.1 Tratamento químico

Foram realizados tratamentos químicos com soluções aquosas com hidróxido de sódio (Merck) em diferentes concentrações (entre 0,1 e 1M), de forma similar ao realizado por Thapa et al [20], para nanofuncionalização das membranas porosas, durante cinco minutos. Após este processo, as membranas foram lavadas com água destilada até que o efluente apresentasse pH próximo à 6,0. As membranas ainda foram mantidas durante 1h em ultrassom para remoção de qualquer resíduo da solução de hidróxido de sódio. Ainda, as membranas confeccionadas foram mantidas durante 48h em um forno a vácuo com pressão reduzida de 10 Pa para remoção do solvente residual.

O quadro 1 apresenta os processos utilizados na confecção de cada membrana e a denominação recebida, além dos tratamentos realizados.

Quadro 1: Classificação dos grupos de membranas, de acordo com os procedimentos utilizados para confecção e tratamentos realizados.

Grupo	Confecção e tratamentos realizados
M1	Membranas lisas
M2	Membranas superficialmente porosas
M3	Membranas porosas
M3a	Membranas porosas com tratamento químico (0,1M)
M3b	Membranas porosas com tratamento químico (0,3M)
M3c	Membranas porosas com tratamento químico (0,5M)
M3d	Membranas porosas com tratamento químico (0,7M)
M3e	Membranas porosas com tratamento químico (1M)

4.1.2 Estruturas tubulares

Foram preparados tubos de PLGA a partir de diferentes metodologias, seguindo alguns dos padrões já utilizados na confecção das membranas.

Primeiro processo: Os tubos foram confeccionados partindo das membranas M1. As membranas foram enroladas e uma haste de titânio com 2 mm de diâmetro, e tiveram suas extremidades sobrepostas e dissolvidas superficialmente utilizando uma segunda haste umedecida com clorofórmio, de forma similar a metodologia descrita por Boccaccini et al [5]. Após a evaporação do solvente, as duas extremidades dissolvidas juntas ficaram soldadas, resultando em uma estrutura tubular com 2 mm de diâmetro interno.

Segundo processo: Os tubos porosos de PLGA foram preparados pela dissolução do copolímero em clorofórmio e adição de microcristais de NaCl (análogo a metodologia utilizada na confecção das membranas M3). A fim de obter

uma estrutura tridimensional, foi utilizada como base, novamente, uma haste de titânio com diâmetro de 2mm, que foi mergulhada na suspensão. Estas hastes com polímero e NaCl depositados foram, ainda, mergulhadas em uma solução de PLGA/Clorofórmio sem adição de NaCl para obter uma cobertura protetora na superfície para evitar a difusão rápida de medicamento inseridos na parte porosa para o exterior da estrutura tubular. Após a evaporação do solvente à temperatura ambiente, as hastes foram submersas em água deionizada para remoção dos cristais de NaCl durante 48 horas. A água foi trocada a cada oito horas e o sistema foi mantido em ultrassom. Após este período, os tubos foram removidos das hastes e parte deles foram separados e tratados com uma solução de NaOH, seguindo os mesmos padrões utilizados para as membranas porosas com ataque químico.

4.1.2.1 Tratamento químico

Os tubos confeccionados a partir do segundo processo foram tratados de forma análoga às membranas. Após os procedimentos citados serem realizados, todos os tubos foram submetidas a secagem em forno a vácuo durante 48 h, a uma pressão reduzida de 10 Pa para a remoção de solvente residual.

O quadro 2 mostra os processos utilizados na confecção de cada tubo e a denominação recebida, além dos tratamentos realizados.

Quadro 2: classificação dos grupos de tubos, de acordo com os procedimentos utilizados para confecção e tratamentos realizados.

Grupo	Confecção e tratamentos realizados
T1	Primeiro processo
T2	Segundo processo
T2a	Segundo processo com tratamento químico (0,1M)
T2b	Segundo processo com tratamento químico (0,3M)
T2c	Segundo processo com tratamento químico (0,5M)
T2d	Segundo processo com tratamento químico (0,7M)
T2e	Segundo processo com tratamento químico (1M)

4.2. Degradação hidrolítica

A degradação dos tubos T2, T2a e T2c foi realizada *in vitro*, seguindo a metodologia utilizada por Li et al [65], norma ASTM F1635 (2010), para avaliar a influência do tratamento químico realizado durante os primeiros 2 meses de degradação. Primeiramente, os tubos de PLGA com 5 mm de comprimento foram separados em triplicatas por período avaliado. Os tubos foram pesados e acondicionados em frascos de polipropileno contendo 4mL de PBS, preparado com reagentes de alta pureza, funcionando como um tampão para degradação do polímero em estufa a 37°C. Após os períodos de 3, 7, 14, 28, 45 e 60 dias as amostras foram lavadas com água deionizada e secas em forno a vácuo durante 48h. Após este período, os tubos foram pesados novamente. Os parâmetros avaliados nos tempos definidos foram: massa de água absorvida no período inicial, perda mássica, variação da massa molar ponderal média, e mudanças na topografia.

4.3. Impregnação/liberação de amido

Com o objetivo de avaliar a influência dos tratamentos químicos realizados na quantidade mássica de um determinado produto que as estruturas poliméricas conseguem carregar e liberar durante o processo de degradação foi realizada a inserção de amido nos tubos confeccionados a partir do segundo processo, em diferentes concentrações em suspensão com água para posterior pesagem e liberação *in vitro*. O amido foi escolhido para estes testes por não ser solúvel em água, sendo possível, portanto, analisar a liberação que ocorre devido à degradação do polímero e difusão do mesmo no meio.

4.3.1. Impregnação de amido

Este teste foi realizado com o objetivo de simular a quantidade de um determinado medicamento insolúvel em água ou fixado a matriz polimérica que as estruturas poliméricas são capazes de carregar. Também é possível avaliar através

desta metodologia, se a realização de tratamentos químicos com diferentes concentrações afeta de alguma forma estas quantidades.

Foram preparadas 3 suspensões de amido em água deionizada com diferentes concentrações (12,5mg/mL; 37,5mg/mL; 75mg/mL). As amostras testadas (T2, T2a, T2b, T2c, T2d, e T2e) foram pesadas e colocadas individualmente em contato com as suspensões de amido com agitação constante durante duas horas. Após este processo, os tubos foram individualmente secos em forno a vácuo durante 48 horas e pesados novamente. A quantidade percentual de amido aprisionado nos tubos foi calculada a partir da fórmula:

$$Pa = [(Pt-P0)/P0] \times 100$$

Onde Pa é o percentual de amido aprisionado, Pt é a massa do tubo com amido e P0 é a massa inicial do tubo.

4.3.2. Liberação de amido

O ensaio de liberação de amido foi realizado para simular a liberação de medicamentos, fatores de crescimento ou outras moléculas bioativas insolúveis ou fixadas ao suporte, em PBS, durante as primeiras semanas de degradação das estruturas tubulares porosas.

Foram escolhidos 3 tipos de tubos para realização deste teste, sendo elas T2, T2a e T2c para avaliar possíveis diferenças no comportamento de liberação com relação ao tratamento químico sofrido. A inserção de amido nestes tubos foi realizada conforme metodologia descrita na seção 4.3.1., sendo na sequência pesados em balança analítica e colocados individualmente em tubos de polipropileno contendo 4mL de PBS em estufa a 37°C, em triplicatas. Ao final de períodos predefinidos (3, 7, 14, 21, 28, 45 e 60 dias) os tubos foram retirados do PBS, que é descartado, lavados com água deionizada, e colocados em forno a vácuo para secagem durante 48 horas. Os tubos foram então pesados novamente individualmente e colocados em 4mL de PBS mais uma vez para dar sequência ao processo de liberação de amido. A porcentagem de amido liberado foi calculada

levando em consideração a massa de amido Impregnada e a massa final do tubo conforme a seguinte fórmula apresentada:

$$PI = [MI / Mi] \times 100$$

Onde PI é a porcentagem de amido liberado, MI é a massa de amido liberado em cada período da degradação e Mi é a massa inicial de amido.

4.4. Preparação das amostras para realização das caracterizações

Para análise de DRX as membranas foram confeccionadas diretamente sobre uma bolacha de silício com duas polegadas de diâmetro utilizando a metodologia descrita na seção 4.1.1. As cinco concentrações de tratamento químico também descritas acima foram realizadas nos filmes obtidos, sem que eles fosse removidos da superfície de silício. A caracterização foi feita utilizando radiação $K\alpha_{Cu}$ com $\lambda = 0,15406$ nm com uma geometria Bragg-Brentano variando em 2θ entre 3° e 50° com passo de $0,02^\circ$ e 1 s por ponto em um equipamento Shimadzu XRD 7000.

Para analisar as ligações químicas das estruturas formadas (membranas e tubos) por FTIR, foram construídos 2 porta amostras, com as medidas indicadas na figura 8, que serviram de suporte para as amostras durante a análise. Amostras de membranas medindo 2 x 2 cm foram presas no porta amostras 1, enquanto os tubos, medindo 5mm de comprimento e 2mm de diâmetro interno, foram seccionados somente de um lado, formando filmes de 5mm x 6,3mm, sendo analisados no porta amostras 2. O espectro foi obtido através de 100 varreduras variando em $1/\lambda$ desde 450 até 4000 cm^{-1} .

As análises de XRD e FTIR foram realizadas no grupo de estudos de superfícies e interfaces localizado no prédio 96-A do TECNOPUC.

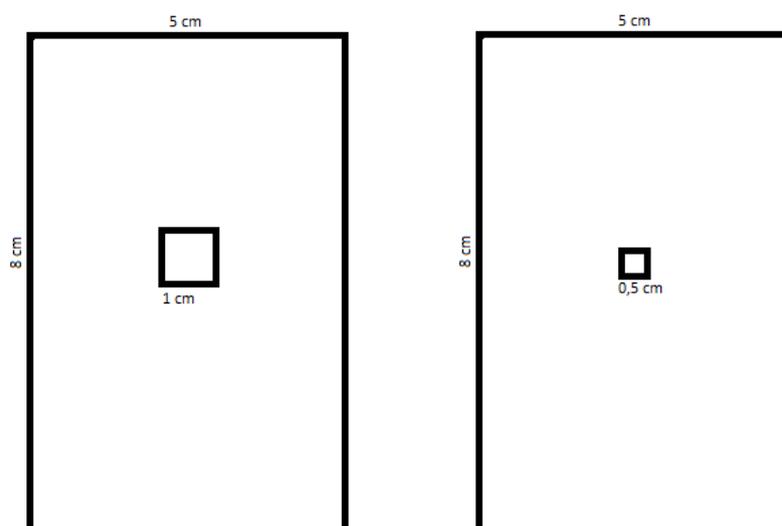


Figura 9. (a) Porta amostra 1 e (b) Porta amostra 2, sendo utilizados na caracterização de FTIR, para membranas e tubos respectivamente.

As análises de microscopia eletrônica de varredura das membranas e das estruturas tubulares foram realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise – CEMM – da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, em um equipamento marca Phillips, modelo XL 30. Antes da realização das análises, as amostras tubulares foram mantidas durante três minutos em nitrogênio líquido para manter a integridade estrutural durante a fratura para análise da secção transversal. Por se tratar de implantes confeccionados a partir de material polimérico, foi necessária a deposição de ouro antes das análises na superfície das amostras.

A variação na massa molar do polímero foi acompanhada por cromatografia de permeação em gel ao longo do processo de degradação *in vitro*. Para tanto, as estruturas tubulares submetidas ao processo de degradação, foram dissolvidas em clorofórmio e na sequência, a solução obtida foi ainda, diluída com THF até 2 mL obtendo a concentração de 15 mg/mL, para posterior injeção no cromatógrafo HPLC pump-1515 isocrático utilizando detector de índice de refração Waters Instruments 2412 e THF como eluente. Esta análise foi realizada no laboratório de cromatografia na Faculdade de Química da PUCRS.

Para a realização da análise de ângulo de contato foi utilizado um goniômetro. As membranas poliméricas com ataque químico foram seccionadas para obtenção

de amostras com área igual a 1 cm^2 , e mantidas em dessecador até a realização da análise.

5. RESULTADOS PRÉVIOS E DISCUSSÕES

5.1. Caracterização das membranas

5.1.1. Difração de raios X

Foram realizadas análises de difração de raios X para avaliar possíveis mudanças ocorridas na estrutura do polímero durante o processamento e tratamento químico. A análise de DRX realizada na amostra M2 (figura 10) mostrou, mesmo após o processamento sofrido, uma amorfização entre os ângulos 2θ igual a 11° e 16° referente aos picos característicos do ácido glicólico. Este resultado indica que o polímero não sofreu mudanças na sua estrutura.

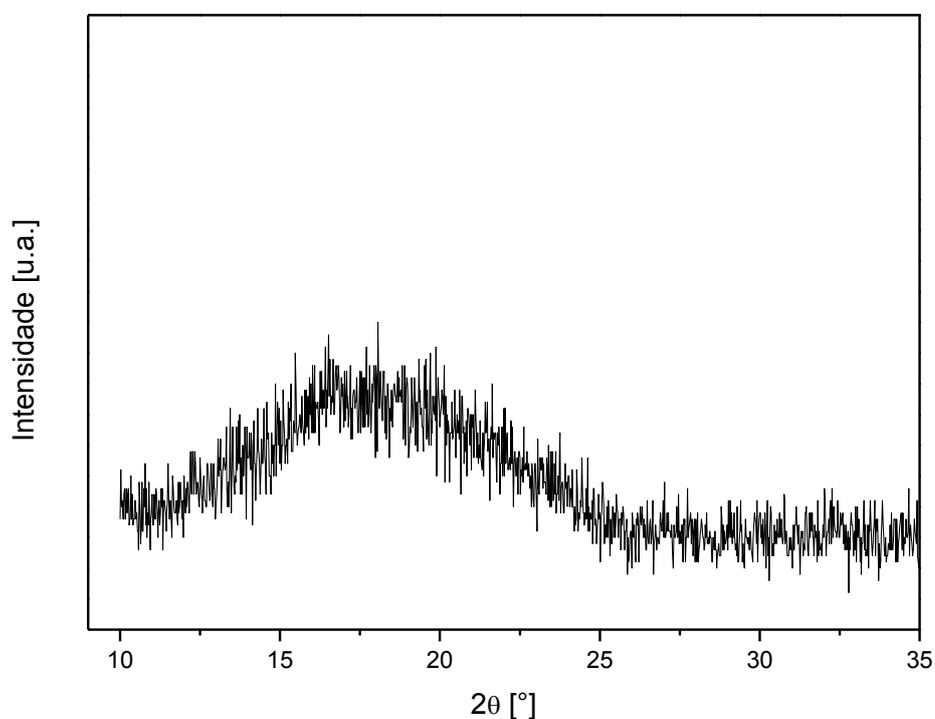


Figura 10. Difratograma da amostra M2 mostrando uma amorfização em 2θ entre 11° e 25° .

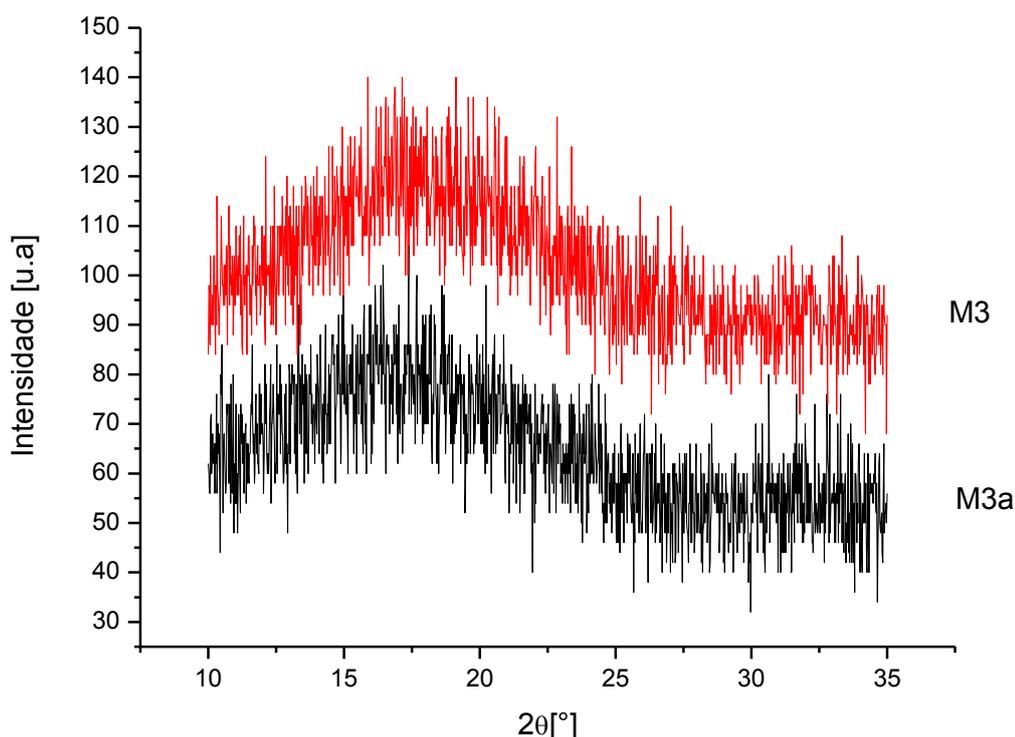


Figura 11. Difratograma das amostras M3 e M3a mostrando uma amorfização em 2θ entre 11° e 25° .

A figura 11 mostra difratogramas das amostras M3 e M3a. É possível observar uma amorfização entre 11 e 25° , característica ao PLGA. Estes resultados indicam que não ocorre degradação do polímero após o tratamento químico com menor concentração de hidróxido de sódio sofrido.

5.1.2. Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

A realização da análise de FTIR teve como objetivos principais detectar a presença de solvente residual, ou ainda, mudanças na estrutura química do polímero quando realizado tratamento químico em diferentes concentrações e utilizado NaCl como agente porogênico. É possível observar nos espectros de FTIR apresentadas na figura 12, bandas de éster presentes no filme entre 1100 - 1300 cm^{-1} e em 1700 cm^{-1} , e entre 1340 - 1460 cm^{-1} e em 2870 cm^{-1} e 2980 cm^{-1} as bandas da metila. Entre 540 e 760 cm^{-1} é possível observar uma redução na quantidade de ligações entre carbono e cloro, o que indica uma redução na quantidade residual de clorofórmio durante as 48h em vácuo.

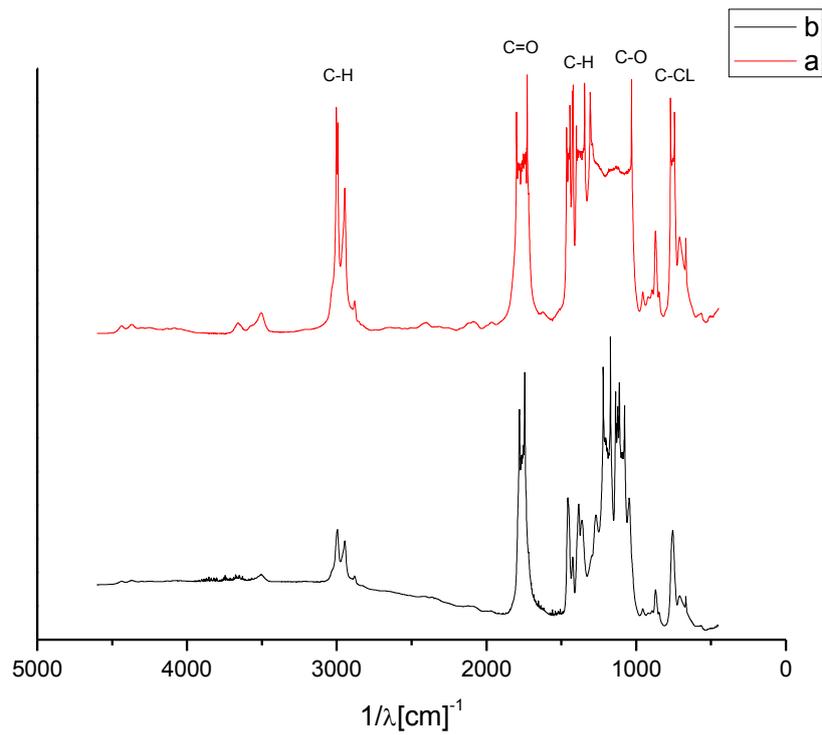


Figura 12. Espectro de FTIR da amostra M2 antes (a) e depois (b) do processo de vácuo.

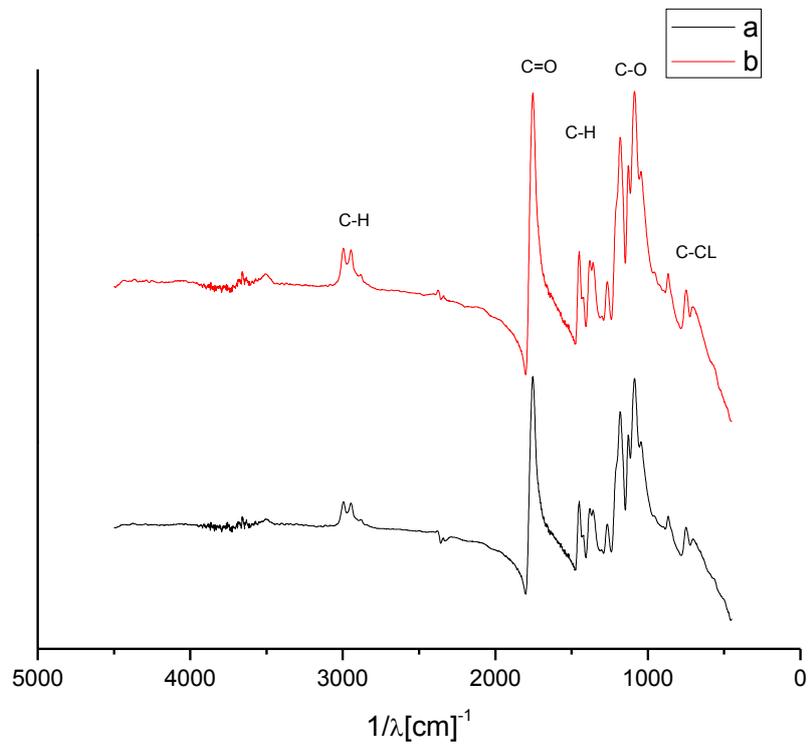


Figura 13. Espectro de FTIR das amostras M3 (a) e M3a (b).

Na figura 13 são mostrados espectros obtidos por FTIR das amostras M3 e M3a. As bandas características de éster são encontradas, porém é possível notar um alargamento nos picos com relação aos espectros apresentados na figura 13, provavelmente devido a maior espessura das membranas, com elevada porosidade. Entre os espectros a e b, não são observadas diferenças conclusivas com relação à mudanças químicas provocadas pelo tratamento com hidróxido de sódio, possivelmente por se tratar do tratamento químico com menor concentração. Não são observadas também variações nas bandas referentes a presença de ligações entre cloro e carbono.

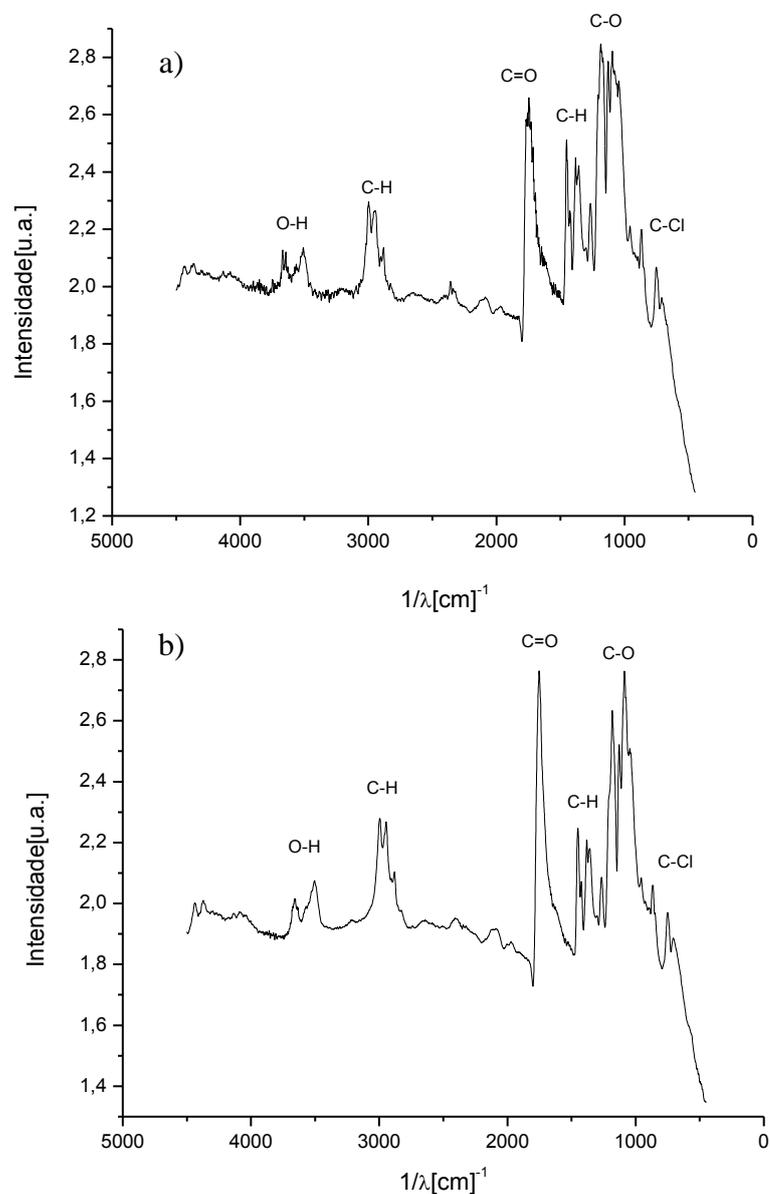


Figura 14. FTIR das membranas M3b (a) e M3e (b) mostrando o surgimento de uma banda característica a ligações O-H.

Na figura 14 é possível observar uma banda mais pronunciada referente a hidroxila gerada pelo rompimento da ligação éster pertencente ao PLGA. Esta é uma indicação da eficiência do tratamento químico realizado com hidróxido de sódio em amostras tratadas com soluções de NaOH em concentrações superiores a 0,3 M.

5.1.3. Morfologia superficial

As amostras confeccionadas sem a utilização de fluxo controlado de ar apresentam-se como membranas densas, sem porosidade superficial, como pode ser observado na figura 15.

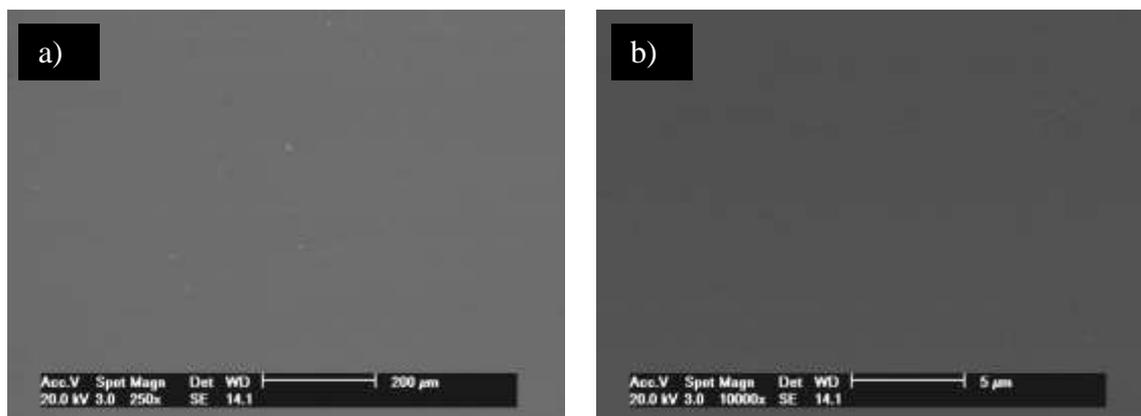


Figura 15. Micrografias da amostra M1 em magnificações de 250x (a) e 10000x(b).

As micrografias realizadas mostraram diferenças significativas na estrutura da membrana superficialmente porosa em relação à membrana porosa, conforme o esperado.

As amostras superficialmente porosas apresentam poros somente na superfície formados pela evaporação do solvente em fluxo de capela, não apresentando interconectividade entre os poros.

As micrografias obtidas por MEV da amostra superficialmente porosa (figura 16) mostram grau elevado de porosidade e distribuição homogênea. Em magnificações maiores é possível observar poros na ordem de poucos micrômetros.

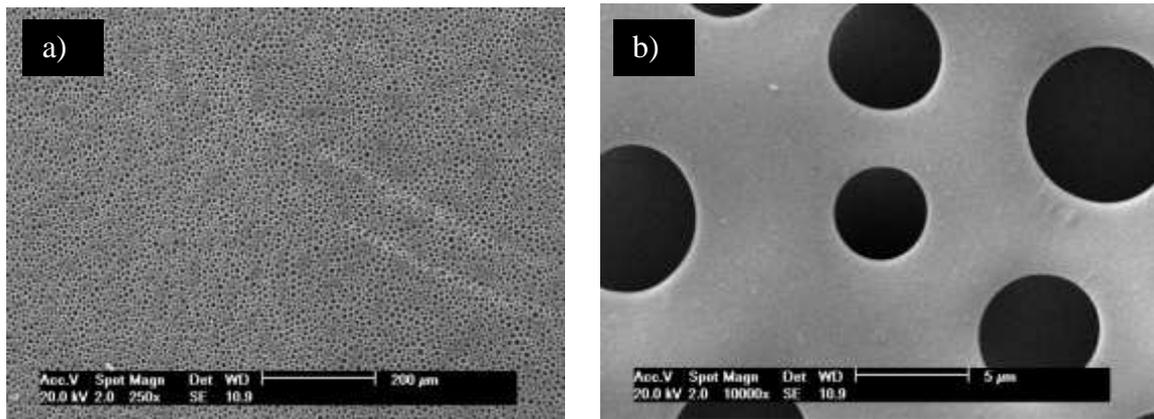


Figura 16. Micrografias obtidas no modo SE da amostra M3c em magnificações de 500x (a) e 20000x (b) respectivamente.

As membranas confeccionadas com adição de agente porogênico apresentam alta interconectividade entre os poros, conforme é possível observar na figura 17.

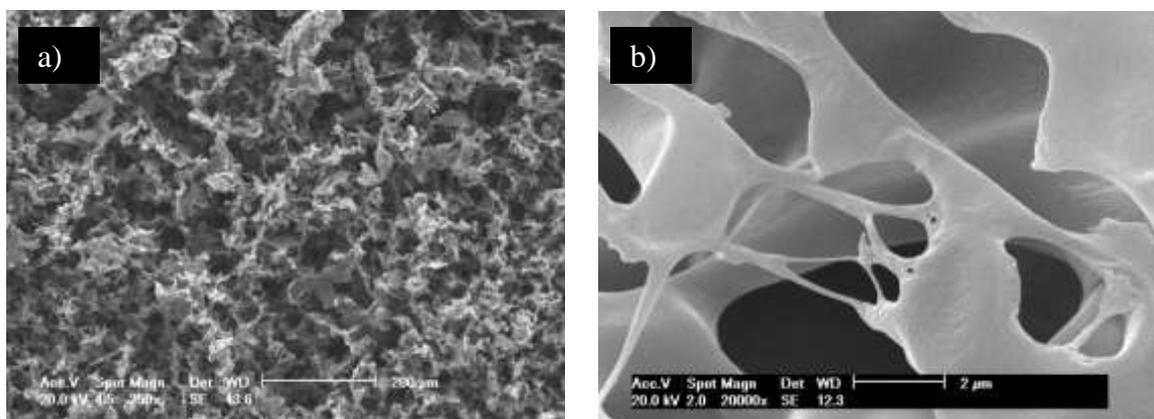


Figura 17. Micrografias obtidas no modo SE da amostra M3 em magnificações de 250x (a) e 20000x (b), respectivamente.

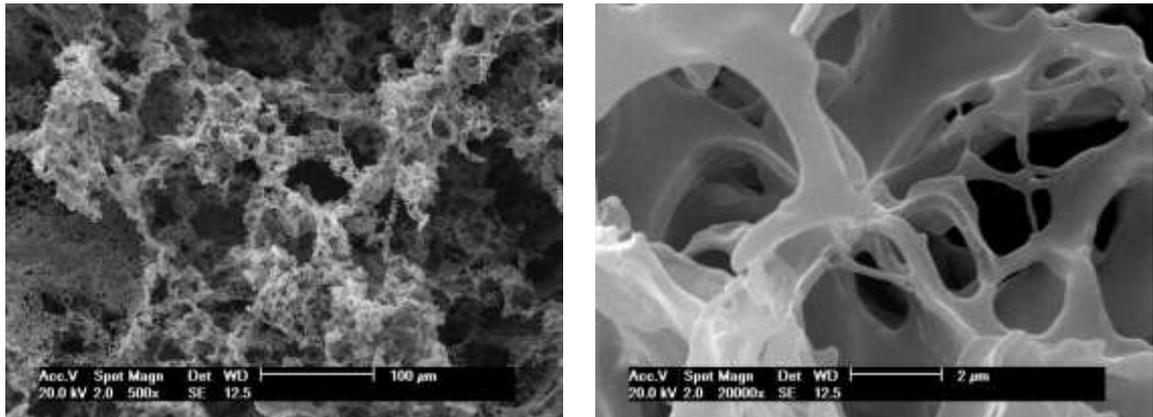


Figura 18. Micrografias obtidas no modo SE da amostra M3c em magnificações de 500x (a) e 20000x (b) respectivamente.

Ambas as amostras analisadas por MEV, e mostradas nas figuras 17 e 18, M3 e M3c respectivamente, apresentam elevado grau de porosidade. É possível observar a formação de poros na ordem de nanômetros na membrana M3c, gerados através do tratamento químico realizado. Com a formação de poros em nano escala, se obtém uma membrana mais próxima à topografia dos tecidos naturais, com maior área superficial, favorecendo assim a inserção de fármacos e fatores de crescimento, além de possibilitar uma maior adesão celular. Na figura 19 é possível observar a topografia da membrana M3e.

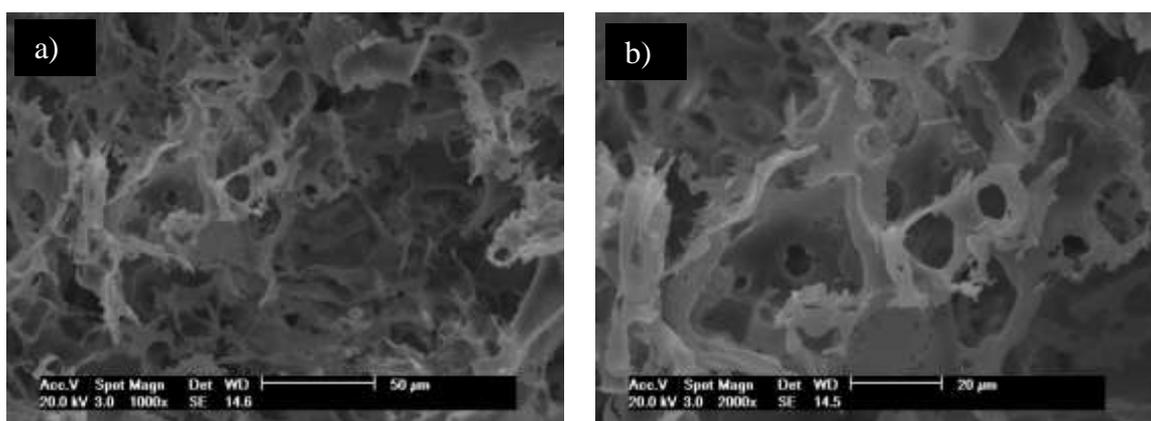


Figura 19. Micrografias obtidas no modo SE da amostra M3e em magnificações de 1000x (a) e 2000x (b) respectivamente.

5.1.4. Ângulo de contato

A análise de ângulo de contato foi realizada nas membranas poliméricas porosas com diferentes tratamentos químicos através da mensuração do ângulo de contato com o objetivo de avaliar a influência do ataque químico na hidrofiliicidade do polímero.

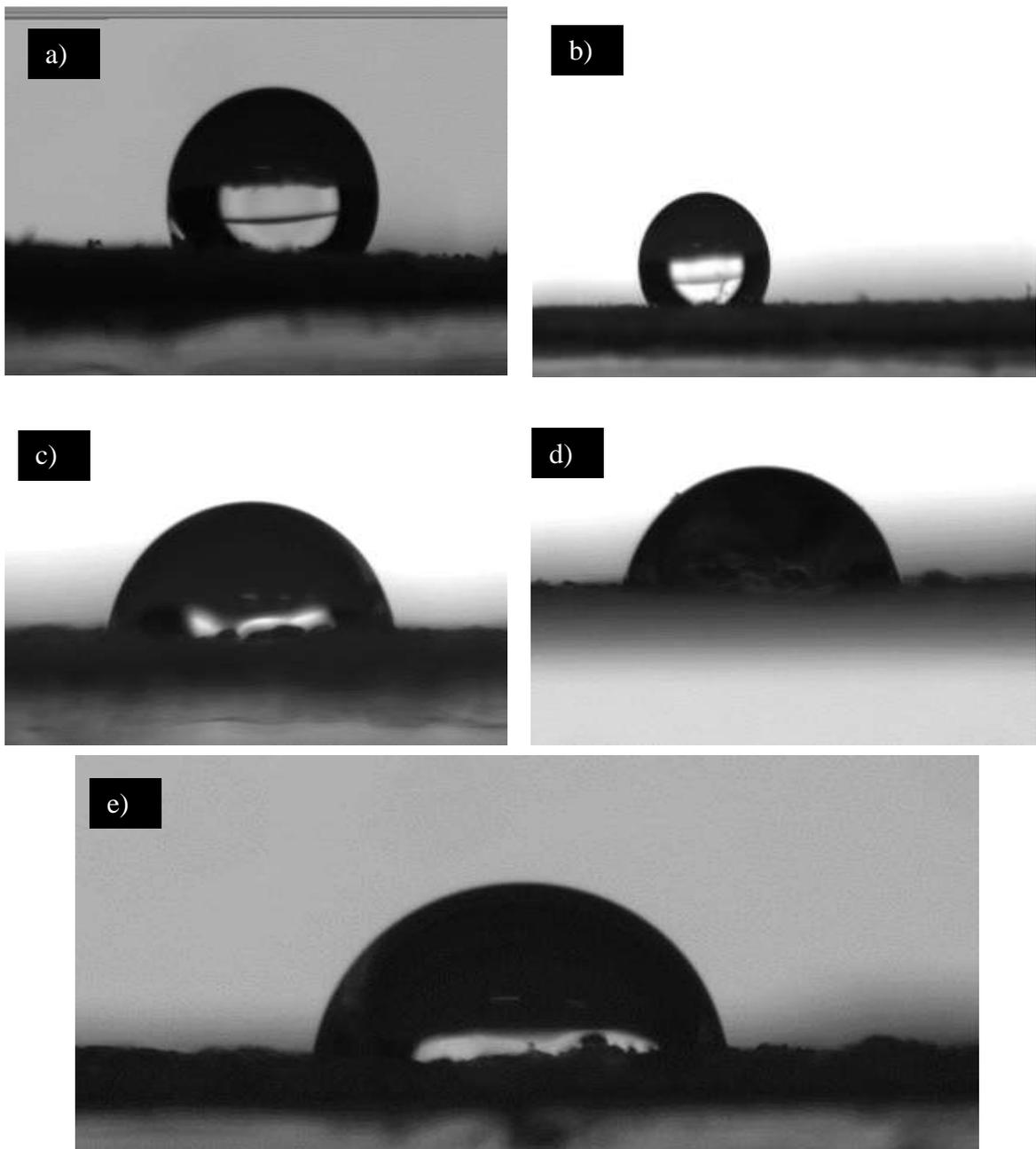


Figura 20. Imagens das gotas de água sobre as amostras M3a (a), M3b (b), M3c (c), M3d (d) e M3e.

A figura 20 exibe a forma como a gota de água interage com a superfície do polímero mostrando maior espalhamento, logo, menor ângulo de contato nas membranas tratadas com maiores concentrações de hidróxido de sódio. Este efeito indica eficiência do tratamento químico realizado com o objetivo de aumentar a hidrofiliabilidade do polímero.

O gráfico mostrado na figura 21 exibe o ângulo médio de contato entre as amostras e as gotas de líquido. Esta média foi obtida a partir de 12 análises em cada membrana. é possível observar a redução no ângulo de contato com o aumento da concentração do tratamento químico utilizado. Isto é válido entre as amostras M2a e M2d, apesar de não ser linear. A amostra M2e, que sofreu o tratamento químico com a maior concentração utilizada não segue esta tendência, provavelmente devido as modificações topográficas sofridas durante o tratamento químico que gera uma alta degradação nestas membranas.

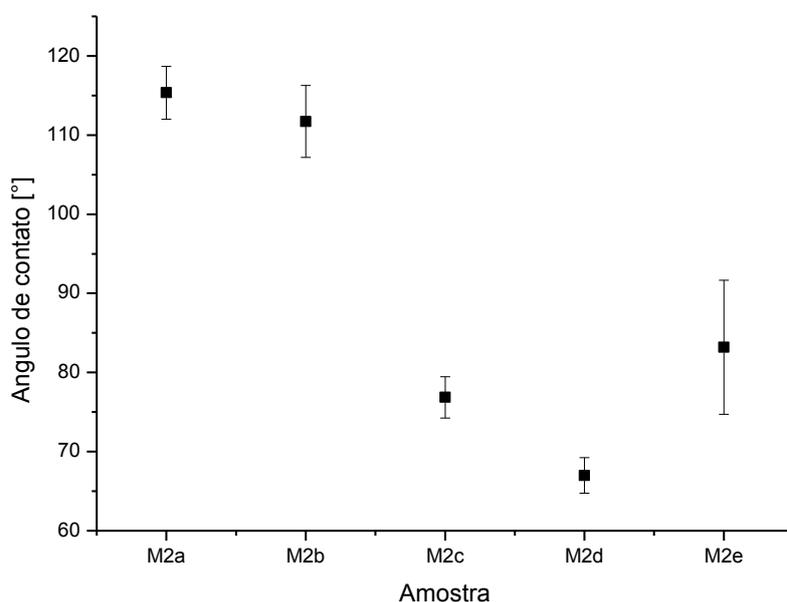


Figura 21. Variação do ângulo de contato nas membranas conforme o tratamento químico sofrido.

A figura 21 mostra também que a eficiência do tratamento realizado é dependente da concentração da solução básica utilizada, já que o período de

exposição foi o mesmo para todas as amostras. Além do aumento na hidroflicidade do material provocado pelo rompimento de ligações éster gerando grupos funcionais menos hidrofóbicos na superfície do polímero, o tratamento químico utilizado em diferentes concentrações altera a topografia das membranas. Este fator pode contribuir para as diferenças de ângulos de contato encontradas em amostras com diferentes concentrações de tratamento com hidróxido de sódio.

5.2. Caracterização das estruturas tubulares

5.2.1 Morfologia

As micrografias realizadas nos tubos confeccionados com solda, figuras 22 e 23, mostram eficiência na realização da solda com clorofórmio no filme superficialmente poroso (amostra M1). O reprocessamento deste ponto do tubo pode vir a reduzir a sua capacidade de liberação de fármacos no local, devido à possível diminuição da porosidade no ponto da solda, além de criar um ponto de fragilidade.

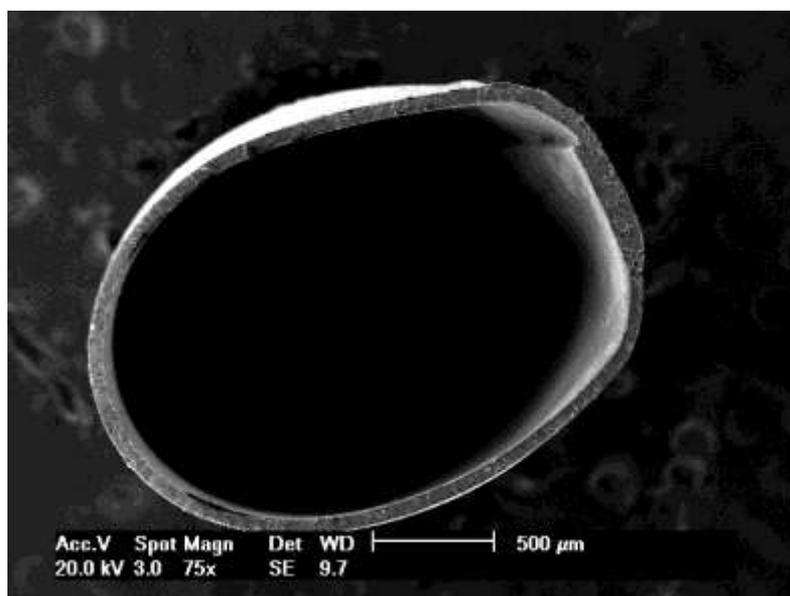


Figura 22. Tubo confeccionado a partir de uma membrana superficialmente porosa em magnificação de 75x.

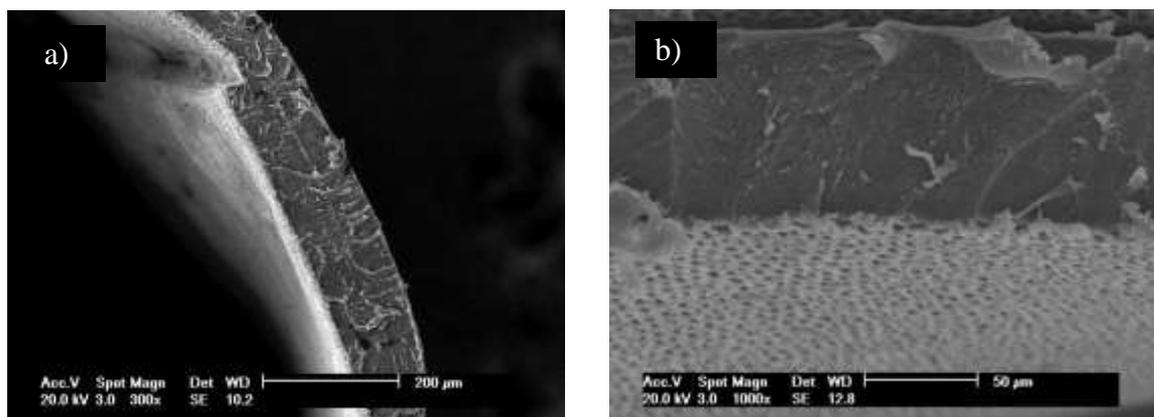


Figura 23. Micrografias do tubo T1 mostrando a solda (a) e a secção do suporte (b).

Estas estruturas são comparáveis às obtidas por Boccaccini et al em 2005 utilizando a metodologia de liofilização do polímero com biovidro na forma de membrana, para posteriormente realizar a solda de forma análoga a realizada neste trabalho. Foi relatado por este autor que a solda é um ponto de fragilidade e redução de poros, o que pode comprometer a integridade estrutural do suporte ao longo da degradação.

Esta característica foi minimizada nos condutos superficialmente porosos obtidos neste trabalho conforme pode ser observado na figura 23 (a). É possível observar ainda que a porosidade é restrita a superfície da amostra, apresentando a parte inferior da membrana e portanto, o exterior do tubo de forma lisa e regular, sem a existência de poros. Este efeito é gerado pelo contato entre o plímero e a placa de petri. A imagem da secção da estrutura tubular indica ainda a ausência de interconectividade, o que poderia comprometer a adesão celular e a infiltração de nutrientes para o interior do nervo.

Os tubos obtidos com NaCl em haste de titânio, por outro lado, não apresentam necessidade de solda, não sendo observado, portanto, nenhum ponto de fragilidade ou com redução na porosidade. Além disso, a interconectividade entre os poros obtidos com a utilização de cloreto de sódio como agente porogênico é favorecida.

Com o objetivo de evitar a difusão de fármacos ou fatores de crescimento para o exterior do tubo, região não lesionada, devido à grande interconectividade entre os poros, foi criada uma camada de polímero na superfície do implante. Desta forma, a superfície do tubo apresenta as mesmas características dos filmes superficialmente porosos (figura 24).

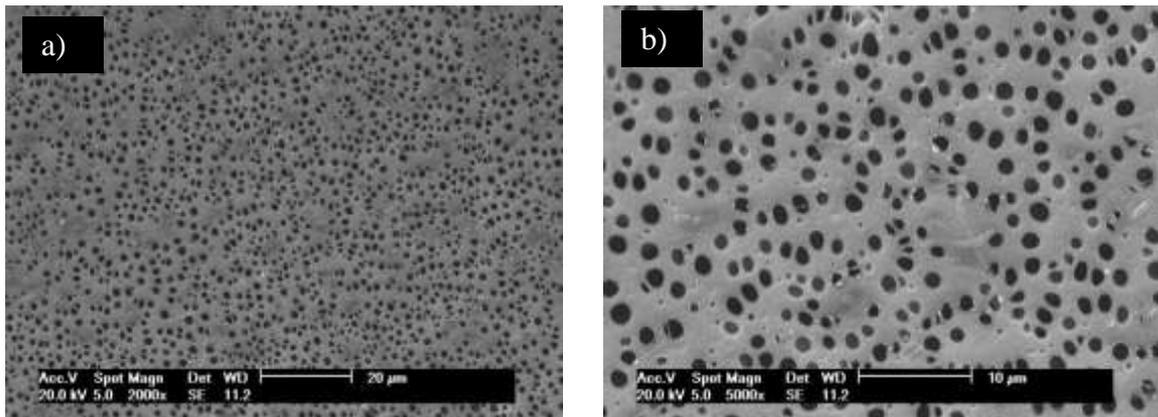


Figura 24. Micrografias do exterior do tubo T2 com proteção de PLGA com magnificações de 2000x (a) e 5000x (b) respectivamente.

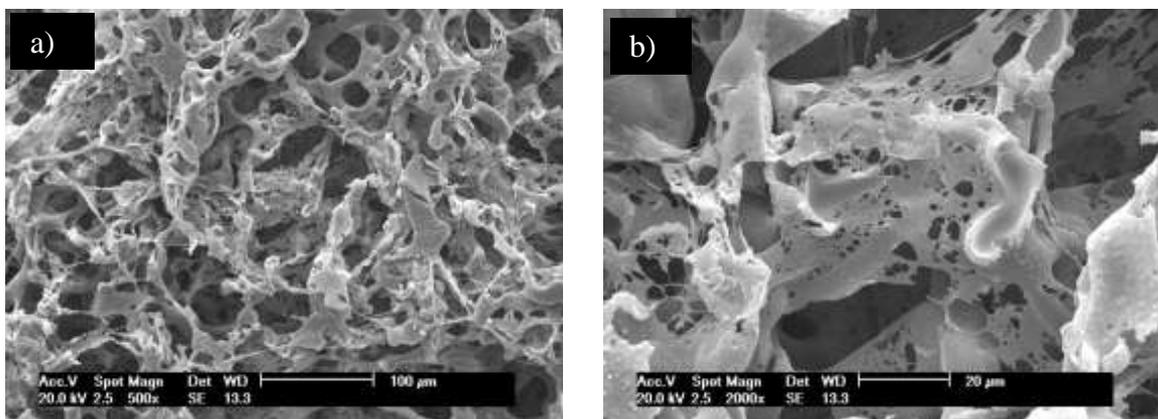


Figura 25. Detalhe dos poros formados no interior do tubo T2 de PLGA em magnificação de 500x (a) e 2000 (b).

A figura 25 mostra alto grau de porosidade e interconectividade no interior da amostra T2. Os poros estão distribuídos de forma assimétrica, característica que possivelmente favorece a regeneração nervosa [66]. A figura 26 mostra secção transversal do tubo T2, evidenciando a interconectividade entre os poros, gerada

pela adição de agente porogênico nas proporções adequadas. Na superfície externa da estrutura tubular é mostrado o revestimento aplicado às amostras.

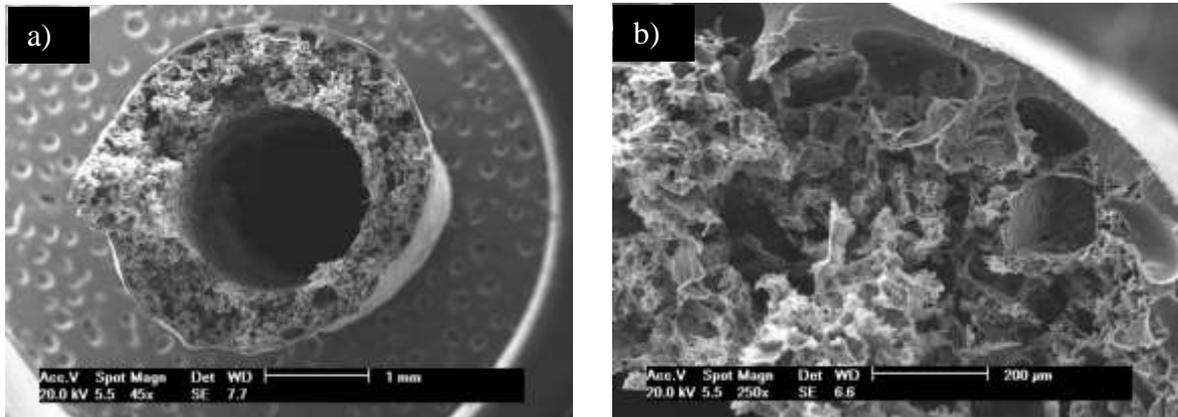
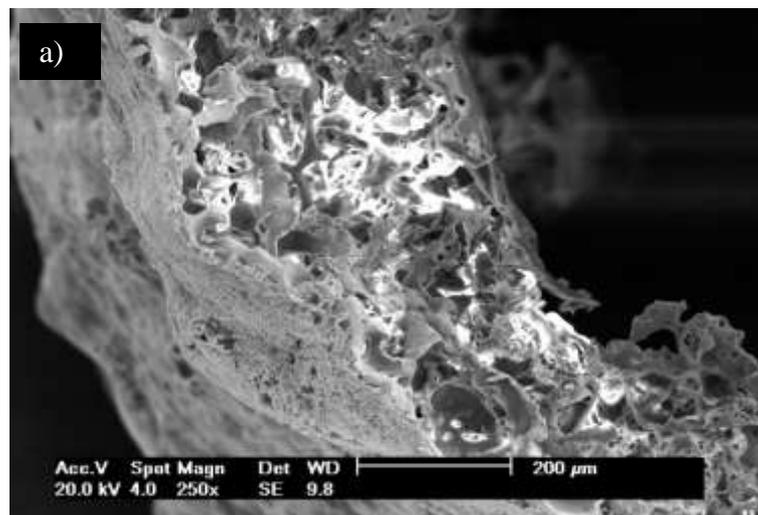


Figura 26. Micrografia da secção transversal do tubo T2 em magnificações de 45x (a) e 250x (b).

O processo utilizado para confecção do tubo analisado por microscopia eletrônica de varredura foi eficiente em criar interconectividade entre os poros no interior do suporte e uma cobertura superficialmente porosa no exterior. Estas características são encontradas também nos suportes com tratamento químico, como pode ser observado na figura 27.



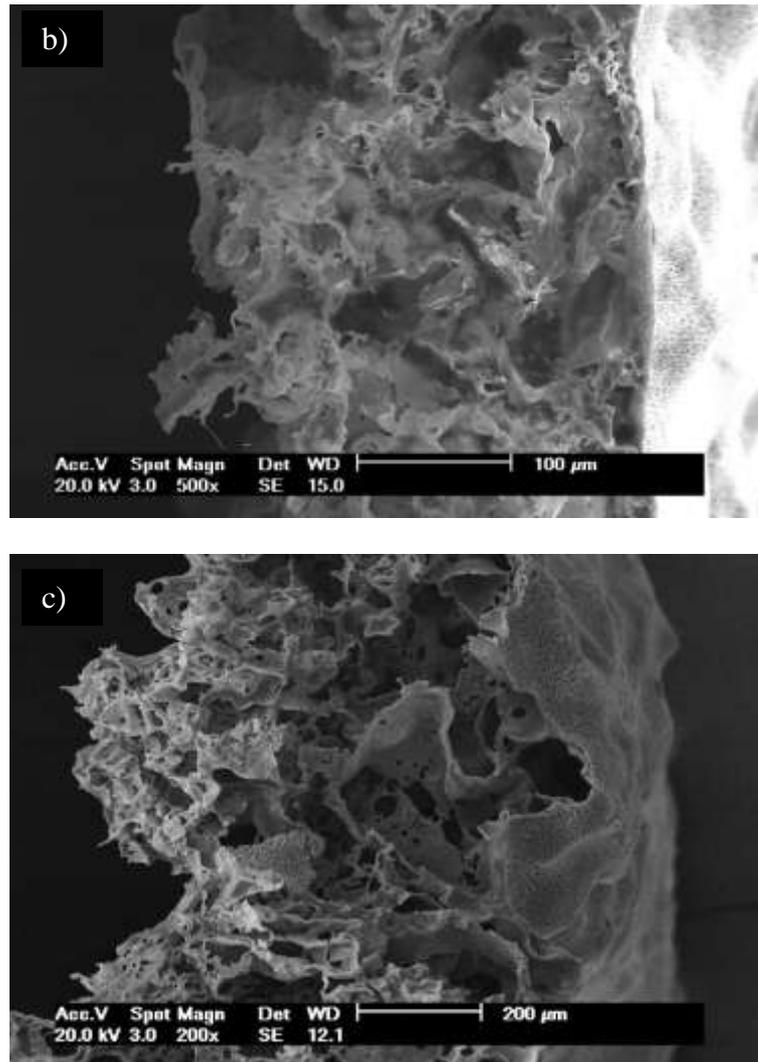


Figura 27. Micrografias das amostras T2a (a), T2b (b) e T2c (c) em aumentos de 250x, 500x e 200x respectivamente.

5.2.2 Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier

Na figura 28 são apresentados os espectros referentes às amostras T2a e T2c, que apresentam bandas bastante evidentes indicando a existência de hidroxilas na estrutura do polímero. Esta característica corrobora o aumento da hidrofiliidade constatado em amostras poliméricas tratadas com solução de hidróxido de sódio.

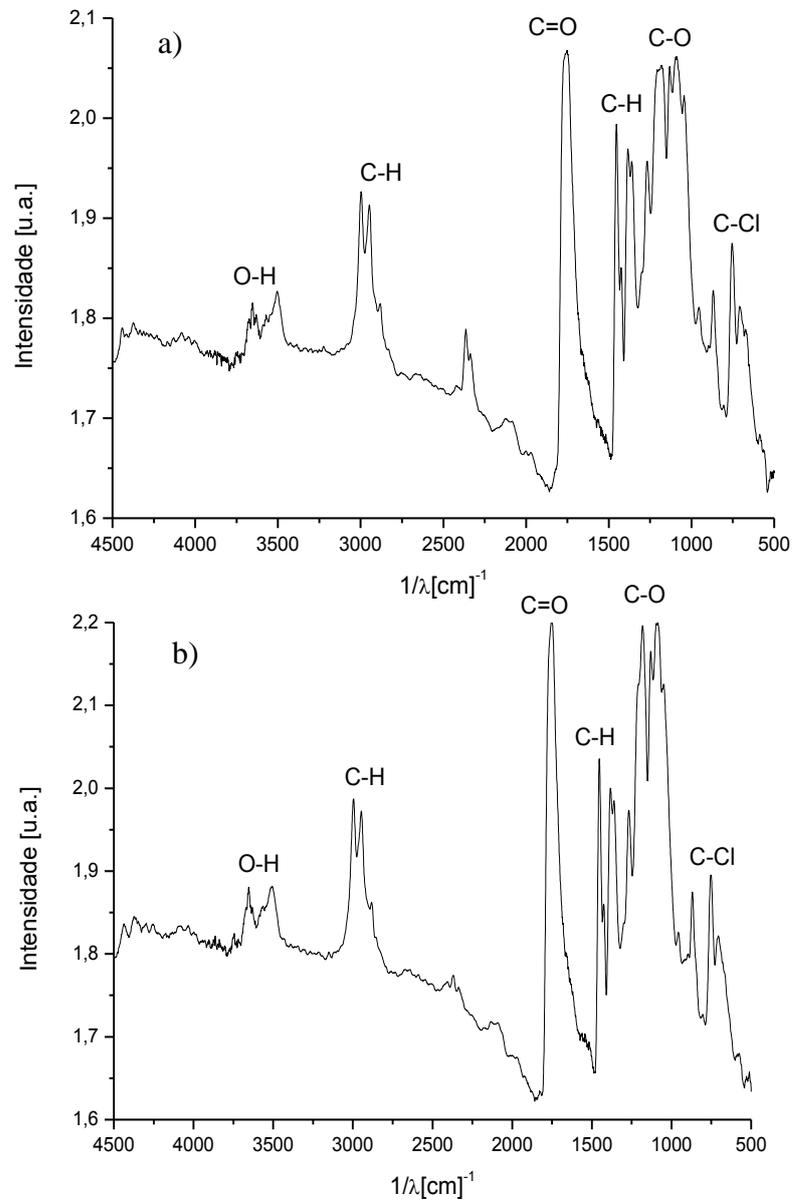


Figura 28. FTIR das amostras T2a (a) e T2c (b).

É importante ainda ressaltar que estes espectros são gerados a partir das amostras confeccionadas, sendo que, estas apresentam diferentes de porosidade e outras características físicas como a espessura.

5.2.3 Degradação *in vitro*

No primeiro período de degradação (3 dias) as amostras foram pesadas logo após serem retiradas do PBS para que fosse avaliada a quantidade de PBS absorvida por cada estrutura tubular com diferentes tratamentos químicos. A figura 29 mostra os resultados obtidos em porcentagem de PBS absorvido com relação a massa inicial do suporte.

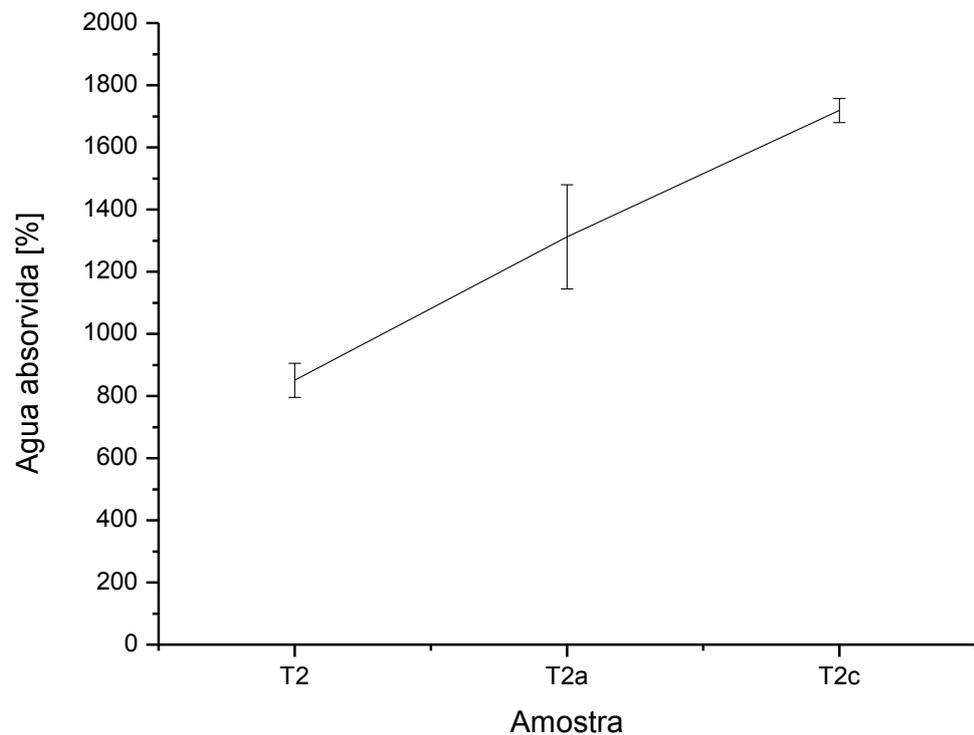


Figura 29. Porcentagem mássica de PBS absorvido após três dias de degradação.

Em cada período de degradação, foram secas e pesadas amostras em triplicata. A porcentagem de perda mássica foi calculada utilizando a fórmula já citada e os valores médios, assim como o desvio padrão de cada amostra em cada período de tempo são exibidos na figura 30.

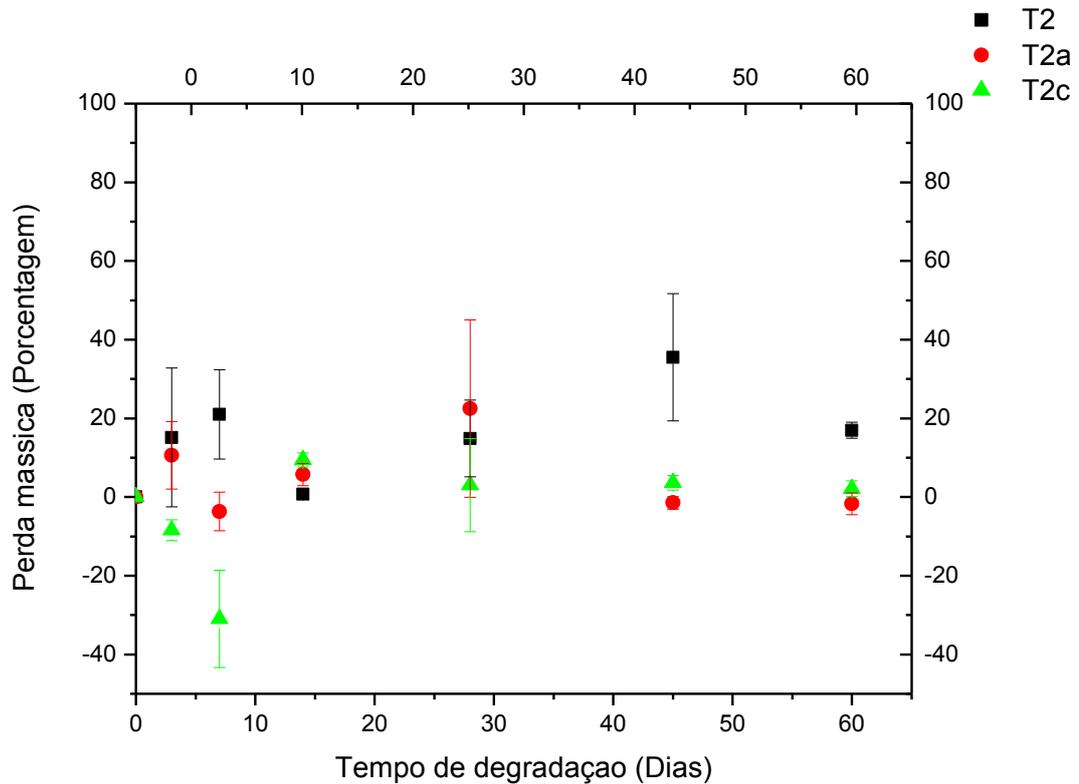


Figura 30. Perda mássica dos tubos de PLGA ao longo do período de degradação.

É possível observar na figura 30, a falta de linearidade na redução da massa ao longo da degradação até 60 dias. Na amostra T2 ocorre uma perda mássica de aproximadamente 20% na primeira semana, enquanto nas amostras T2a e T2c é constatado um ganho de massa em 7 dias de degradação. Este efeito se deve ao intumescimento que ocorre normalmente durante a degradação hidrolítica de um poliéster.

Analisando o período inicial de degradação das estruturas tubulares porosas nota-se um aumento de aproximadamente 30% em massa nas amostras T2c, com tratamento químico em maior concentração, em 7 dias de degradação, algo que ocorre com menor intensidade nas amostras T2a e não ocorreu nas amostras sem tratamento químico. Isto se deve provavelmente às diferenças de hidrofiliicidade das estruturas com diferentes tratamentos químicos [32].

Após cada período de degradação a integridade estrutural das amostras foi analisada por microscopia eletrônica de varredura. A figura 31 mostra as amostras T2, T2a e T2c após o primeiro período de degradação hidrolítica (3 dias).

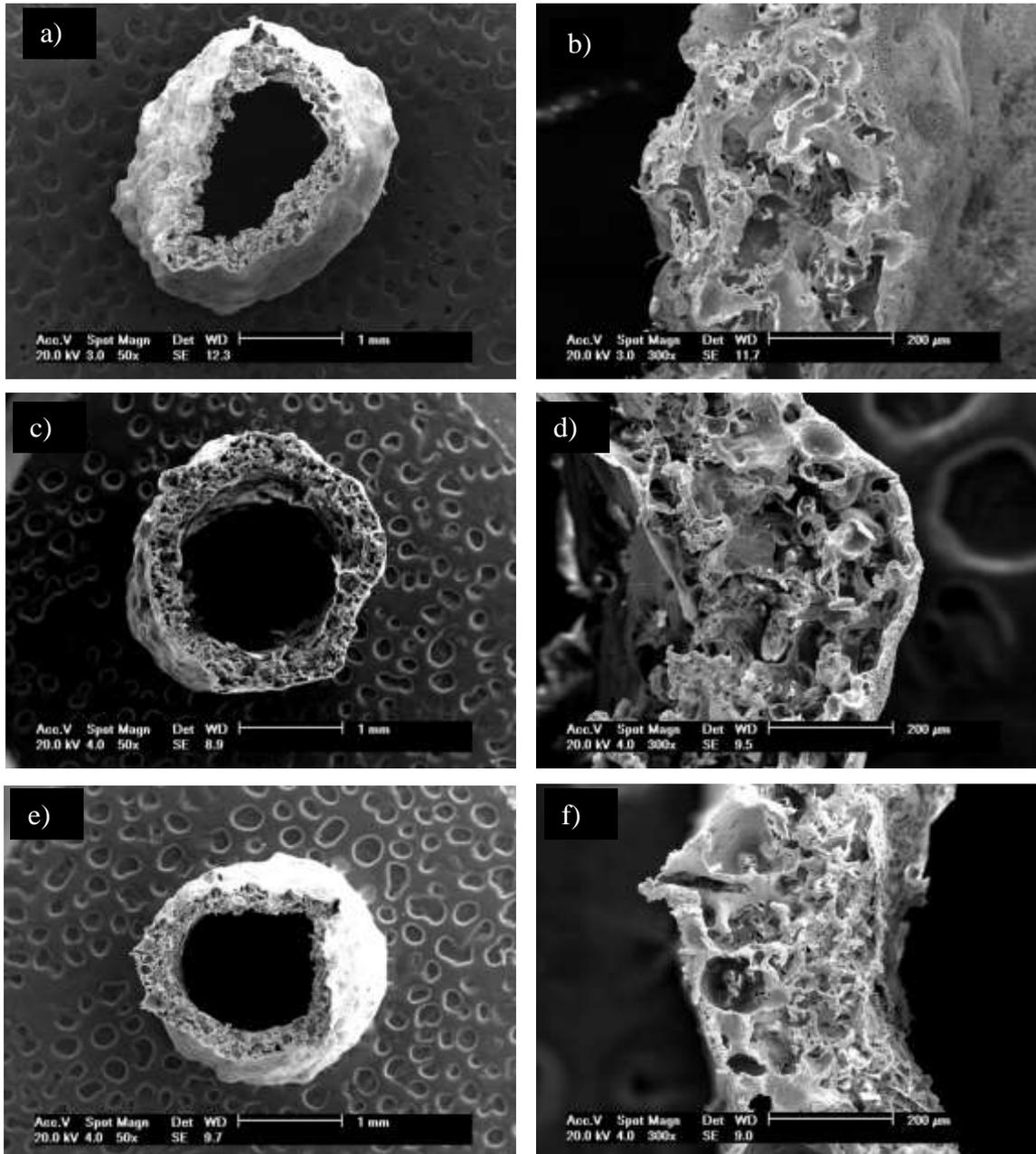


Figura 31. Imagens de microscopia das amostras T2 (a, b); T2a (c, d); e T2c (e, f) em aumentos de 50 e 300X respectivamente após 72h de degradação eletrolítica.

Conforme é possível observar na imagem 31, não são observadas mudanças estruturais nas estruturas tubulares após 3 dias de degradação, apresentando

elevada porosidade, independentemente do tratamento químico sofrido. Estas características são observadas nas amostras degradadas até 28 dias.

Já em amostras retiradas do meio de degradação após 45 dias, é possível observar redução na porosidade micrométrica, e formação de bordas irregulares no interior das paredes em estruturas tubulares, como é possível observar na figura 32.

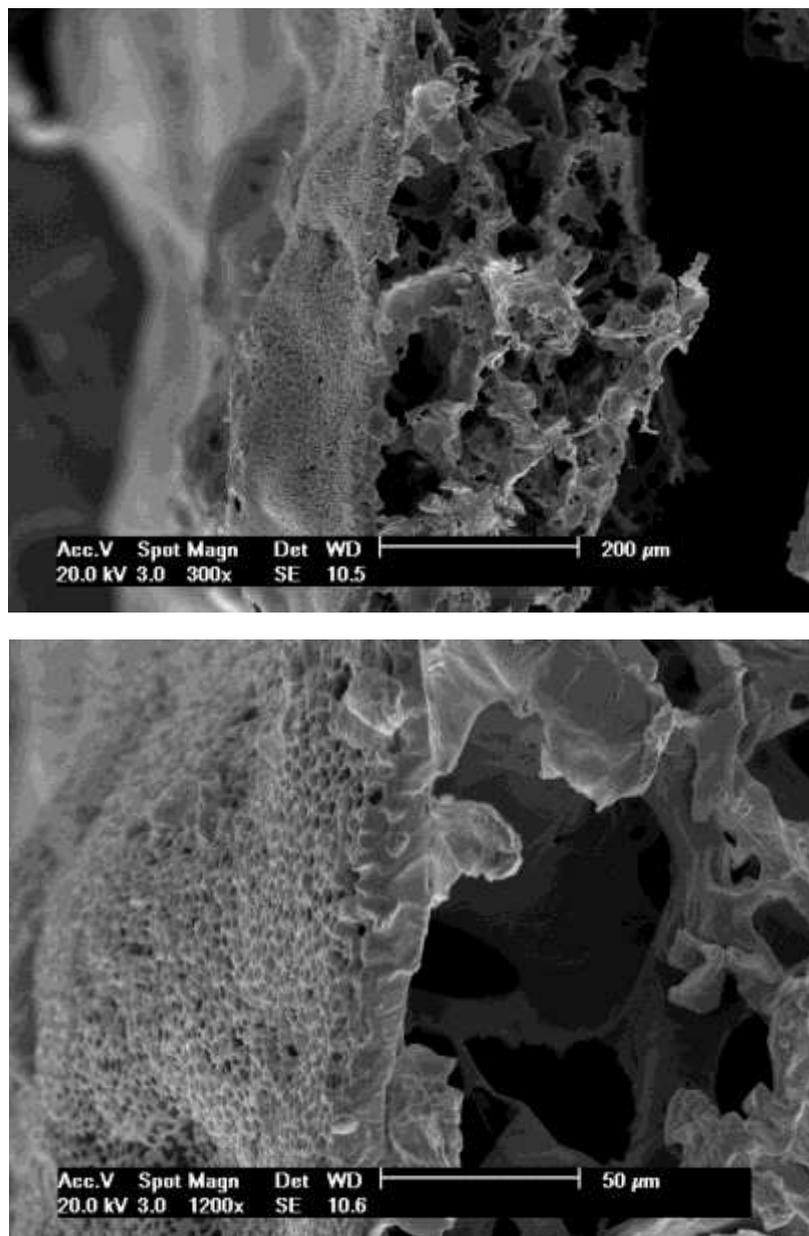


Figura 32. Imagem da amostra T2c após 45 dias de degradação.

É possível observar na figura 33 imagens das estruturas tubulares porosas após 60 dias de degradação.

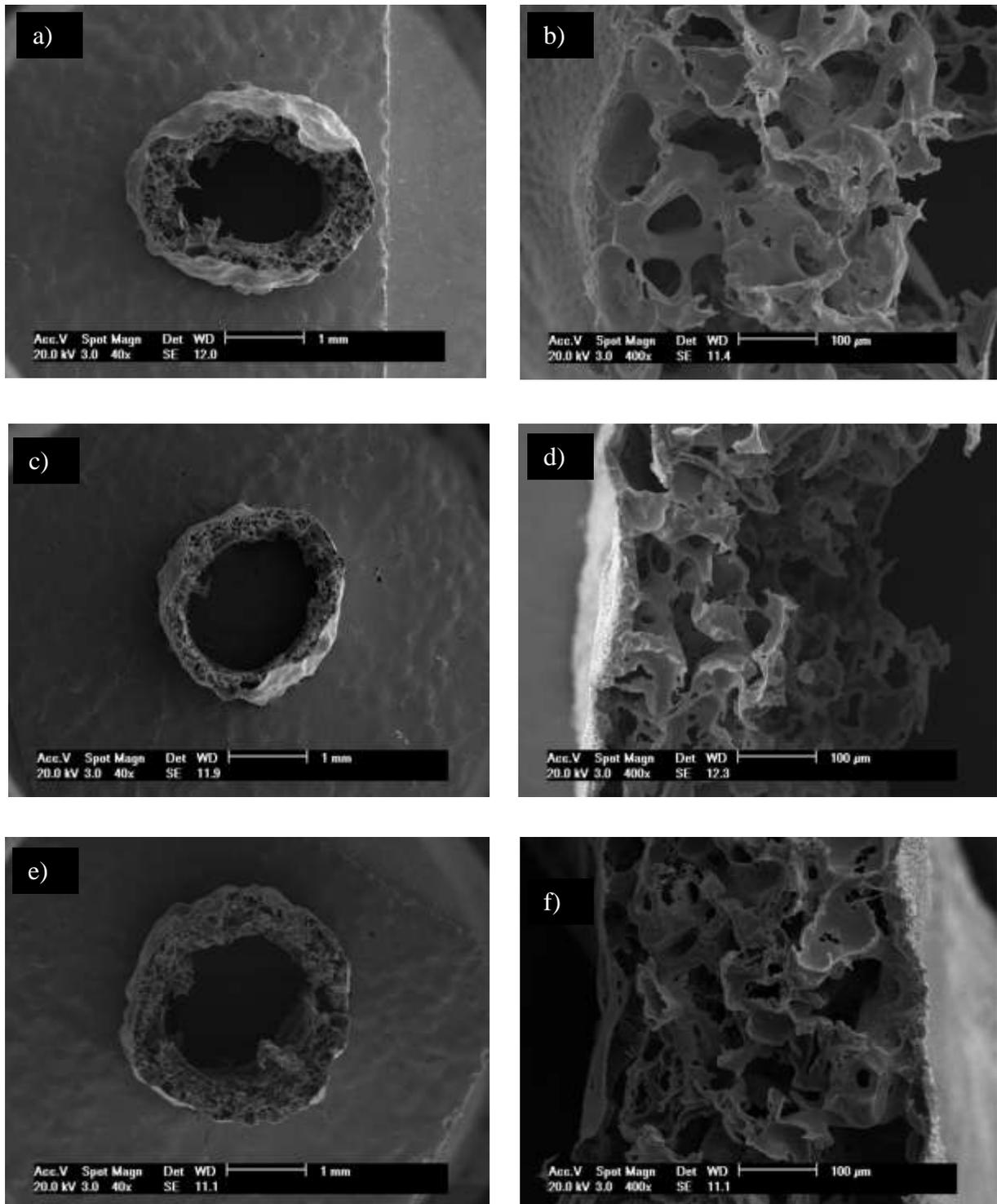


Figura 33. Imagens das amostras T2 (a,b), T2a (c,d) e T2c (e,f) após 60 dias de degradação.

As figuras x e 33 exibem micrografias de estruturas tubulares porosas d PLGA após 45 e 60 dias de degradação em PBS respectivamente. É possível constatar que nestes períodos, nenhuma fragilização significativa é observada, não ocorrendo falhas ou mudanças significativas, não apresentando, portanto, comprometimento como suporte.

Após 45 dias de degradação é possível observar, no entanto, o surgimento de uma textura de fibra, já descrita por outros autores durante a degradação do PLGA. Esta textura é criada pela erosão sofrida pelo polímero durante este período é pode ser identificada no interior dos poros e também na camada de proteção externa.

Já quando analisadas as imagens de degradação de 60 dias, é possível constatar uma redução na microporosidade, criada pelo desaparecimento de algumas paredes de poros ao longo do suporte. Este efeito é observado em todas as estruturas degradadas até este período, não havendo diferenças relevantes quando diferentes concentrações de tratamento químico são utilizadas.

Wu et al descreveram em 2004 a degradação de uma estrutura porosa de PLGA durante 24 semanas. Neste trabalho foi demonstrado que a degradação do PLGA ocorre de forma lenta, sem mudanças morfológicas significativas, nas primeiras 14 semanas, porém após este período o processo ocorre de forma mais acelerada. Estes autores ainda dividiram o processo de degradação em três etapas de acordo com as propriedades apresentadas pelo polímero durante a sua degradação. A nomenclatura utilizada, portanto, para cada estágio foi: fase quase estável para o estágio I, fase de redução de propriedades mecânicas para o estágio II e fase de perda de massa e ruptura do suporte como estágio III.

O primeiro estágio de degradação inclui duas fases, I-1 e I-2. I-1 caracteriza-se por uma diminuição das dimensões das estruturas porosas, e um aumento nas propriedades mecânicas, enquanto que o peso se manteve constante. De acordo com os autores isto ocorre pois uma redução nas dimensões do suporte tende a deixa-lo mais denso, favorecendo assim as propriedades mecânicas. Na fase I-2, todas as propriedades mantem-se constantes, exceto o peso molecular. Esta fase é caracterizada por uma diminuição nas propriedades mecânicas e o surgimento de mais de 1 pico em análises de peso molecular, demonstrando a criação de produtos de baixo peso molecular durante esta etapa da degradação. A fase III é

caracterizada por perda de peso e possível rompimento da matriz polimérica. Esta redução de peso gera uma redução pronunciada no pH da solução de PBS.

5.2.3 GPC

Através da análise de cromatografia por permeação em gel realizada nas amostras antes do processo de degradação é possível constatar uma redução na massa molar ponderal média após o tratamento químico. Isto ocorre devido ruptura de ligações éster na superfície do polímero, gerando monômeros e oligômeros. Estas mudanças são pouco significativas e o erro do equipamento gera um desvio padrão elevado, indicando somente uma tendência, conforme pode ser observado na figura 34.

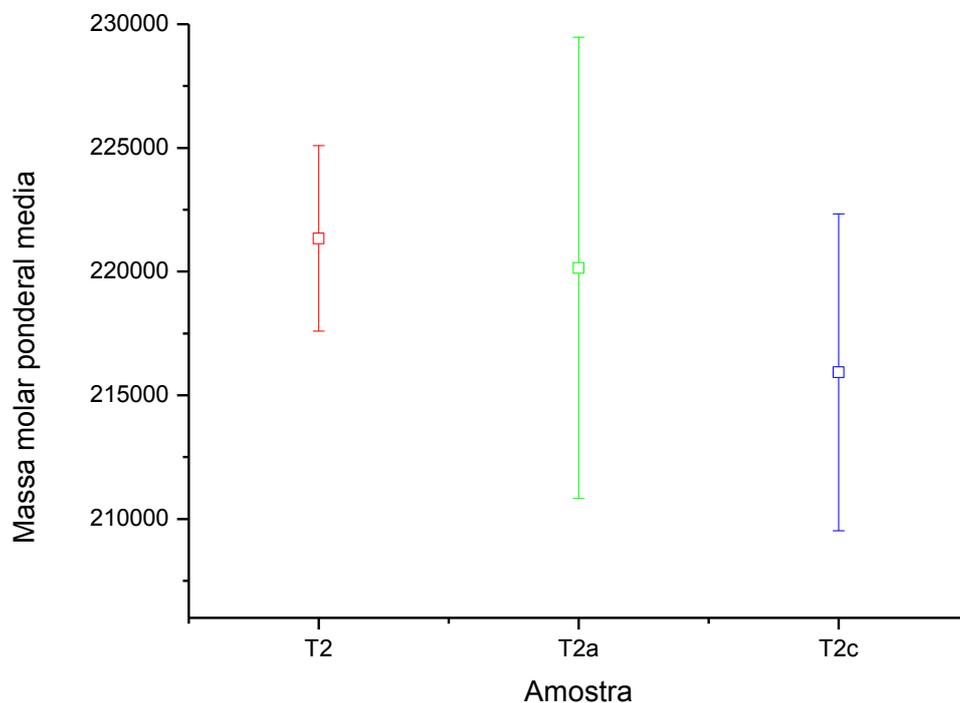


Figura 34. Massa molar ponderal das amostras T2, T2a e T2c antes do processo de degradação.

Este resultado já era esperado devido ao efeito causado pelo hidróxido de sódio utilizado no tratamento químico. A figura 35 mostra a redução na massa molar sofrida pelo polímero durante o processo de degradação até 28 dias.

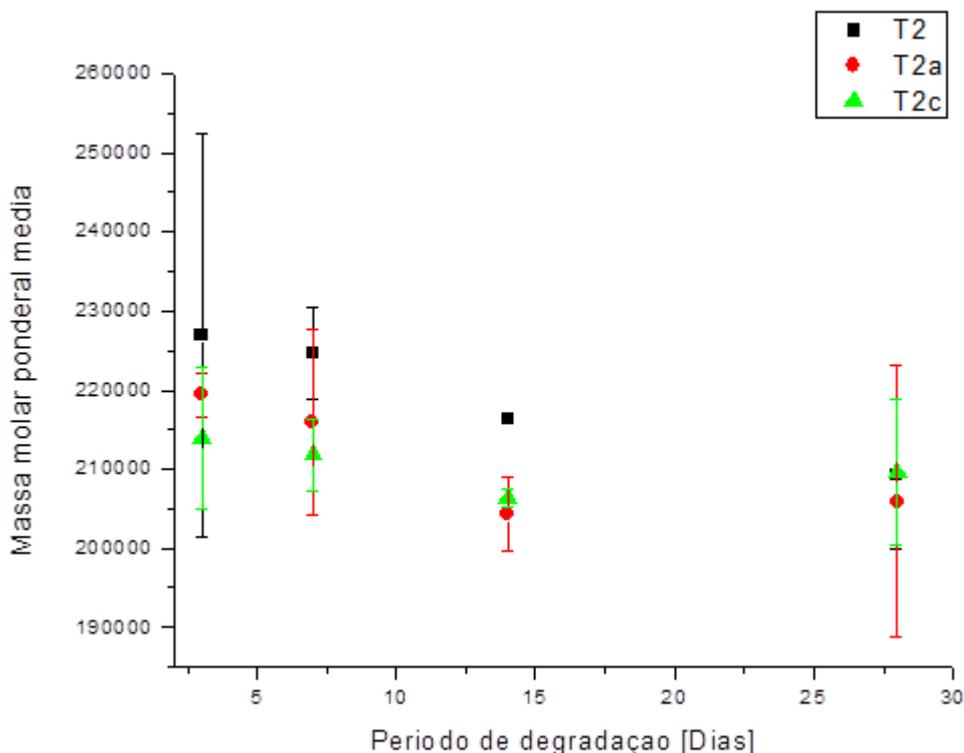


Figura 35. Massa molar média ponderal das amostras T2, T2a e T2c ao longo do processo de degradação hidrolítica até o período de 28 dias.

Nos primeiros períodos de degradação (3 e 7 dias) a diferença na massa molar das amostras tratadas para as não tratadas se mantém, sendo que, o polímero sem tratamento químico apresenta massa molar mais elevada quando comparada às estruturas poliméricas tratadas. Essa característica é observada também entre as amostras com tratamentos químicos em diferentes concentrações. Quando analisados os resultados obtidos para 14 dias, porém, nota-se uma aproximação entre os valores de massa molar das amostras T2a e T2c e em 28 dias as massas molar das estruturas com e sem tratamento químico se encontram bastante próximas. Esta mudança no comportamento do polímero se deve, provavelmente, à maior infiltração de solução tampão nos poros dos tubos com maior tratamento químico com relação ao não tratado, que gera uma difusão mais rápida dos produtos de degradação. Quando os produtos da degradação do PLGA

são mantidos em contato com a matriz polimérica, ocorre o efeito auto catalítico, no qual os ácidos glicólico e lático aceleram o rompimento das ligações éster, reduzindo a massa molar. Este efeito é minimizado quando há uma difusão mais eficiente dos produtos de degradação do interior para o exterior do tubo [32].

5.2.4 Inserção de amido

A inserção de amido em 3 diferentes concentrações foi realizada para avaliar a quantidade de um medicamento insolúvel em água é possível inserir nos suportes para posterior liberação, obtendo assim informações referentes à localização do fármaco no suporte, assim como a possível influência do tratamento químico neste fator, que pode ser observado na figura 36.

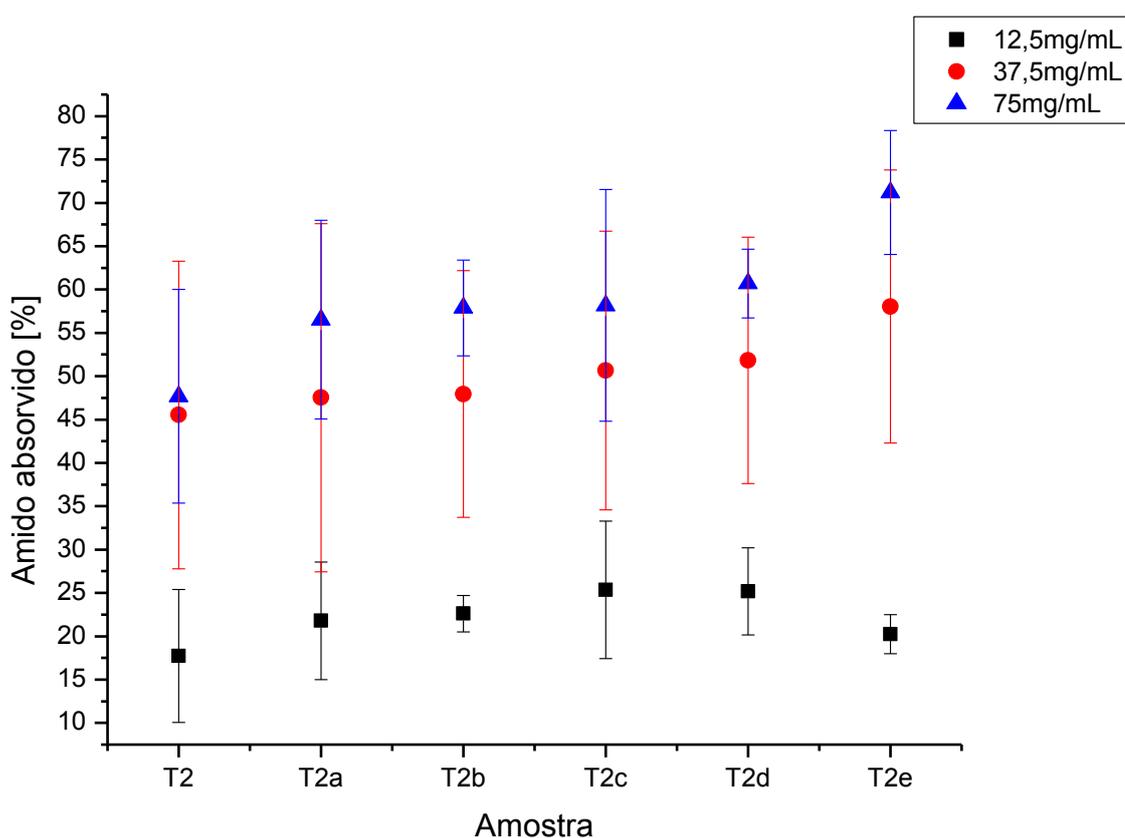


Figura 36. Quantidade de amido inserido em estruturas porosas tubulares (T2, T2a e T2c) em porcentagem com relação à massa inicial do tubo em 3 diferentes concentrações.

O gráfico apresentado pela figura 37 mostra a eficiência de impregnação de amido nas estruturas tubulares porosas através da normalização das massas de

amido. É possível concluir que esta eficiência é inversamente proporcional à concentração de amido utilizada em suspensão. Este cálculo foi realizado através da divisão da massa de amido impregnada pela concentração utilizada.

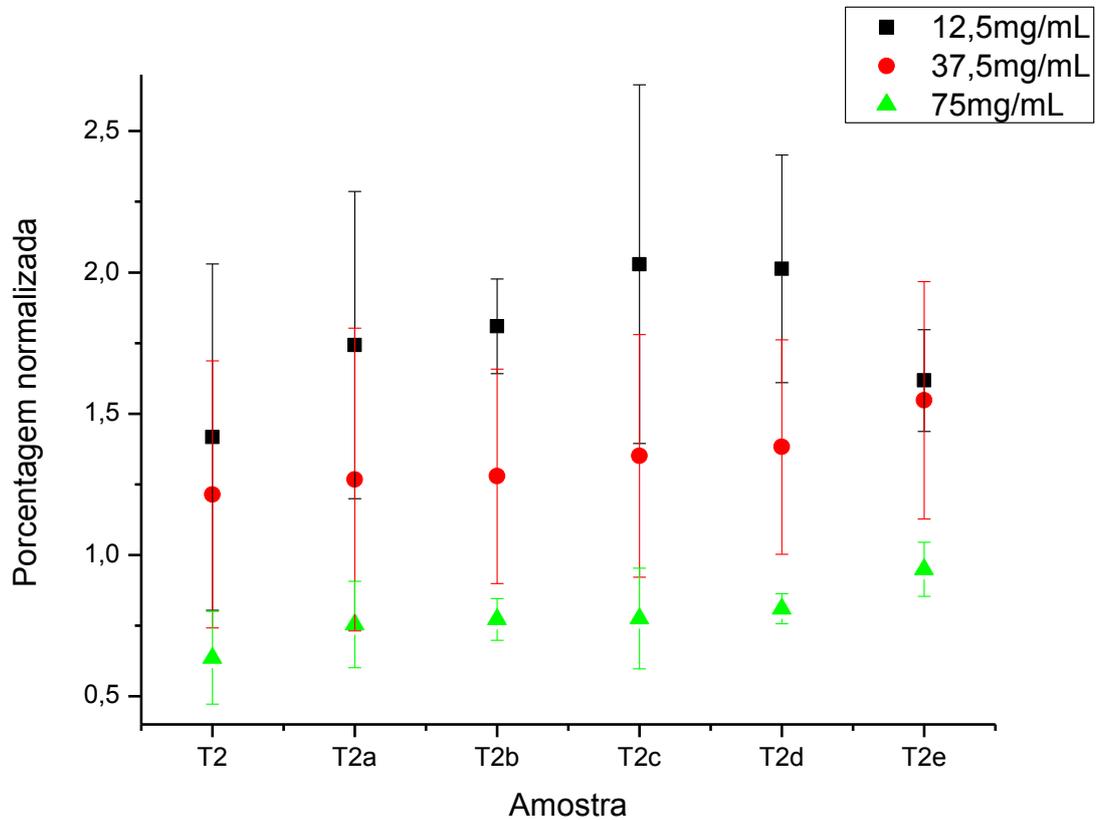


Figura 37. Gráfico normalizado da inserção de amido em 3 concentrações diferentes mostrando a eficiência obtida.

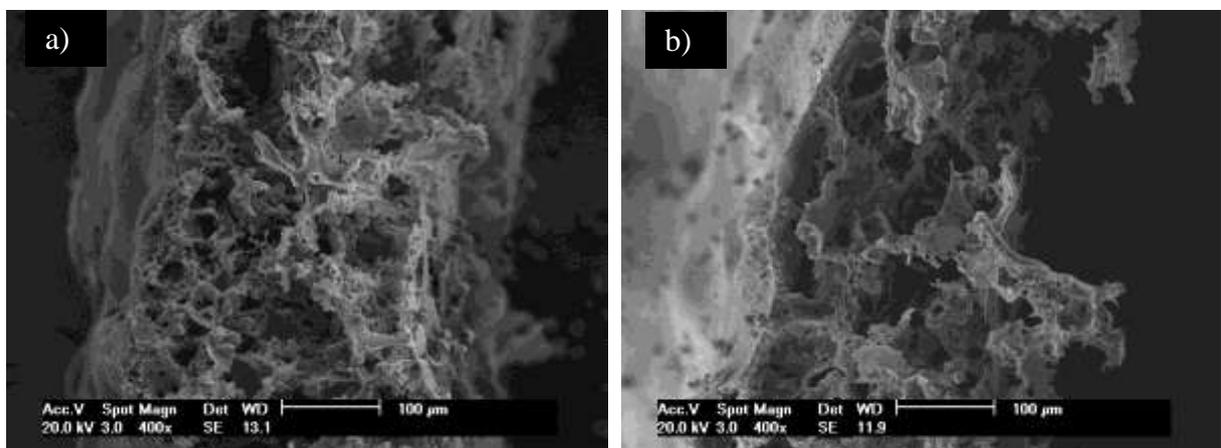


Figura 38. Micrografias das amostras T2(a) e T2e(b) após inserção de amido (12,5mg/mL).

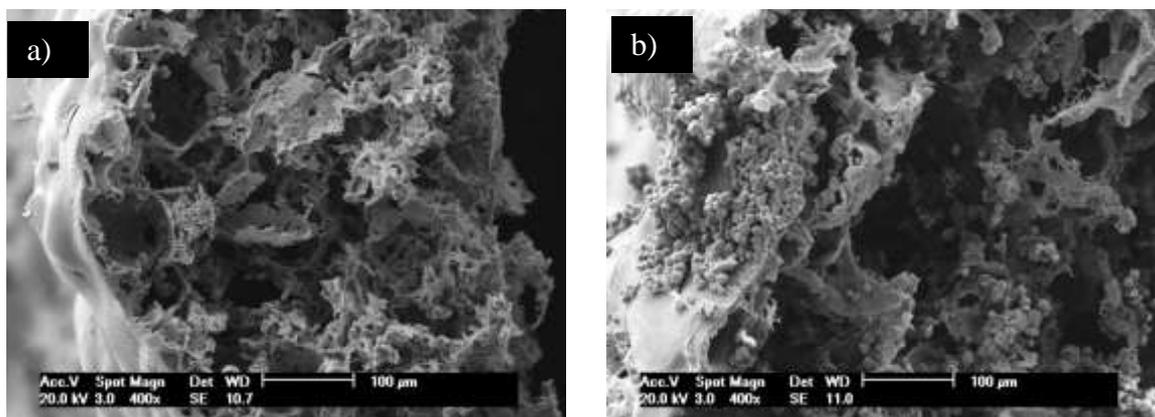


Figura 39. Micrografias das amostras T2 e T2e após inserção de amido (37,5 mg/mL).

As figuras 38 e 39 apresentam imagens dos tubos T2 e T2e após a inserção de 2 concentrações diferentes de amido. É possível observar nas imagens referentes à amostra T2e a presença de amido no centro da parede do tubo, indicando um maior contato entre o polímero e a suspensão de amido durante o processo de inserção quando comparado à amostra T2, provavelmente devido a maior hidrofiliabilidade do polímero com tratamento químico.

5.2.5 Liberação de amido

Amido foi inserido nas estruturas tubulares com o objetivo de simular o comportamento de um fármaco insolúvel em água durante a degradação hidrolítica do suporte polimérico.

A figura 40 exibe os gráficos de redução mássica durante a degradação das estruturas poliméricas com diferentes tratamentos químicos expostos a diferentes concentrações de amido. Nas três concentrações de amido analisadas é possível observar que há uma redução na massa, logo liberação de amido, mais intensa no período inicial. Além disso, também é observado nos gráficos apresentados, diferenças no comportamento de liberação de amido quando comparadas amostras com e sem tratamento químico (hidróxido de sódio).

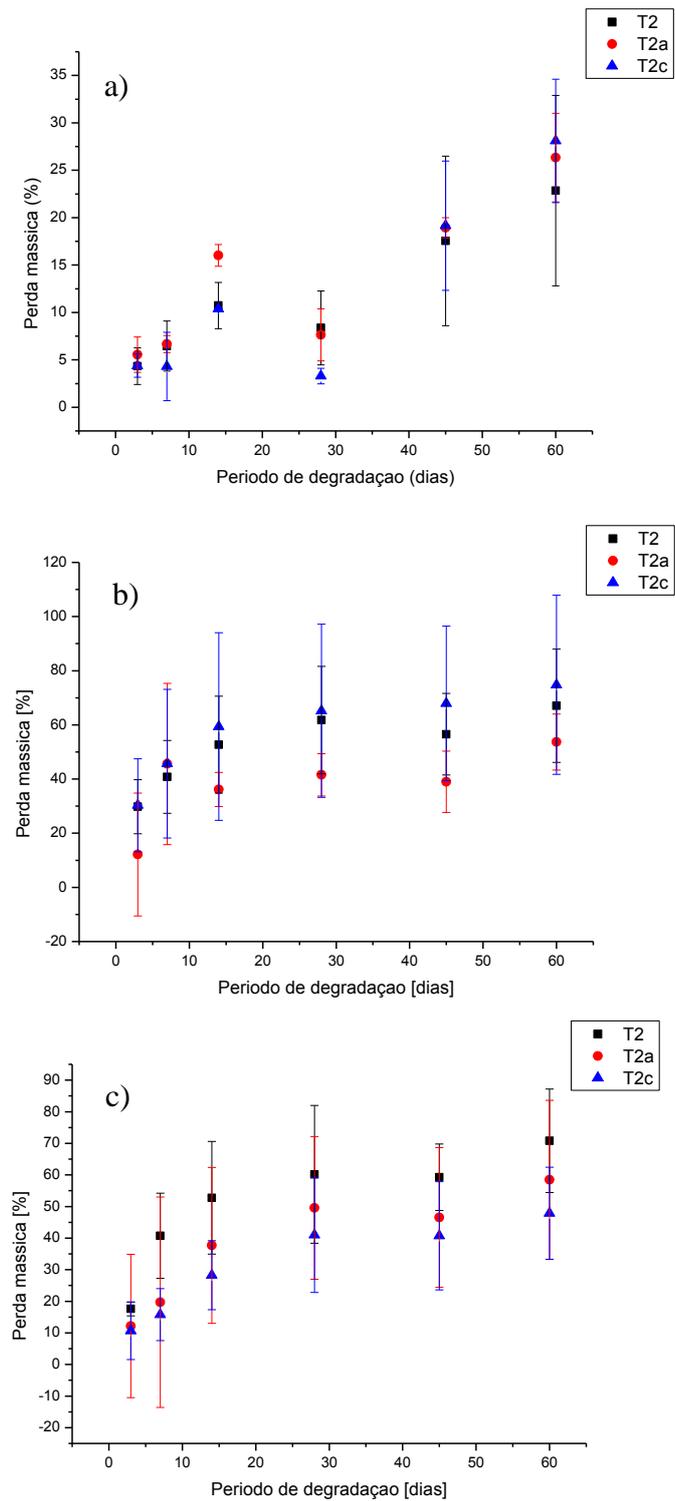


Figura 40. Perda mássica das estruturas tubulares com amido em 3 concentrações, 12,5mg/mL(a); 37,5 mg/mL(b); 75 mg/mL(c).

Nas duas menores concentrações de amido utilizadas as amostras com maior tratamento químico utilizou perdeu massa mais rapidamente em comparação com as amostras não tratadas quimicamente. Este comportamento pode ser atribuído ao aumento da hidrofiliabilidade das estruturas tubulares poliméricas através do tratamento químico, que gera, portanto uma difusão maior de PBS no interior dos suportes. Quando utilizada uma concentração maior de amido, as estruturas não tratadas quimicamente sofrem redução de massa com maior velocidade em relação às estruturas tratadas. É possível que este efeito seja observado devido à maior degradação das estruturas tubulares sem tratamento químico devido à característica autocatalítica exibida pelo polímero.

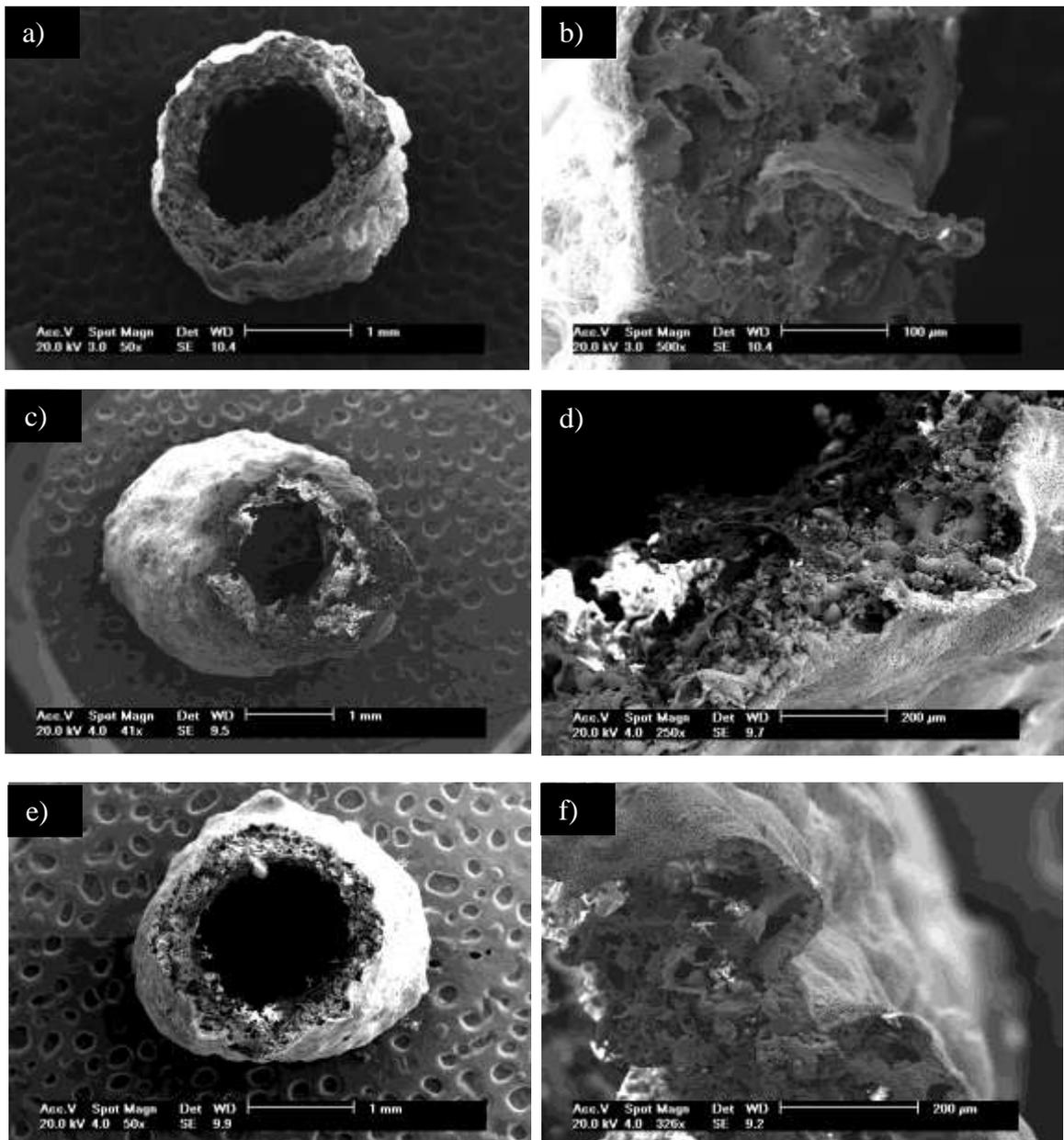


Figura 41. Micrografias das amostras T2, T2a e T2c com concentração de 75mg/mL de amido após 7 dias de degradação.

A figura 41 exibe micrografias das amostras T2, T2a e T2c com 7 concentrações de amido utilizadas. É possível constatar a eficiência dos poros no suporte em reter o amido. Na figura 42, referente a amostras com amido após 14 dias de degradação, é possível identificar a presença de amido retido nos poros das estruturas poliméricas.

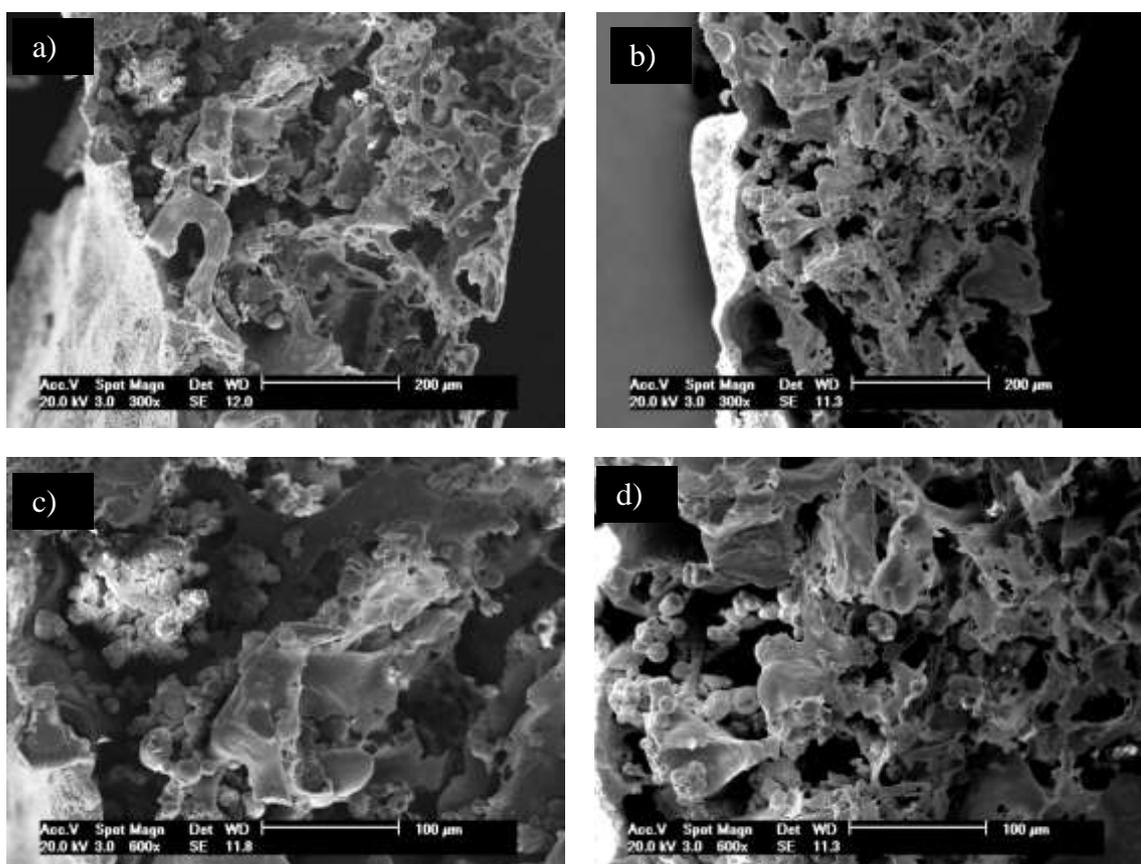


Figura 42. Micrografias das amostras T2 (a,c) e T2a (b,d) após 14 dias de degradação (75mg/mL).

Nas figuras 43 e 44 são apresentadas micrografias da amostra T2a com a maior concentração de amido utilizada. É mostrada a presença de amido na amostra T2a após 28 dias em contato com uma solução de PBS a 37°C no estudo de degradação. Este resultado indica que estruturas ou fármacos insolúveis em água ou fixados ao suporte são liberados gradativamente ao longo do processo de

degradação, sendo dependente da difusão dos mesmos e da degradação do suporte [32].

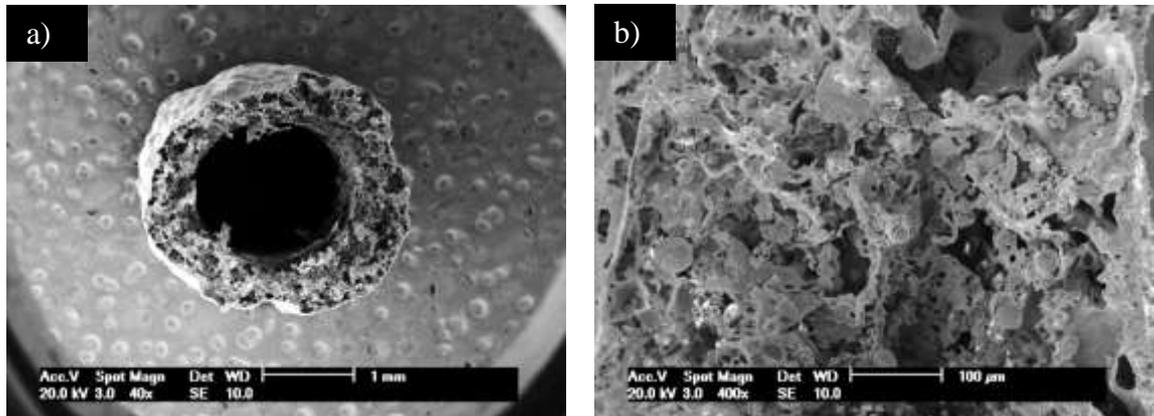


Figura 43. Amostra T2a com concentração de 75mg/mL de amido após 28 dias de degradação.

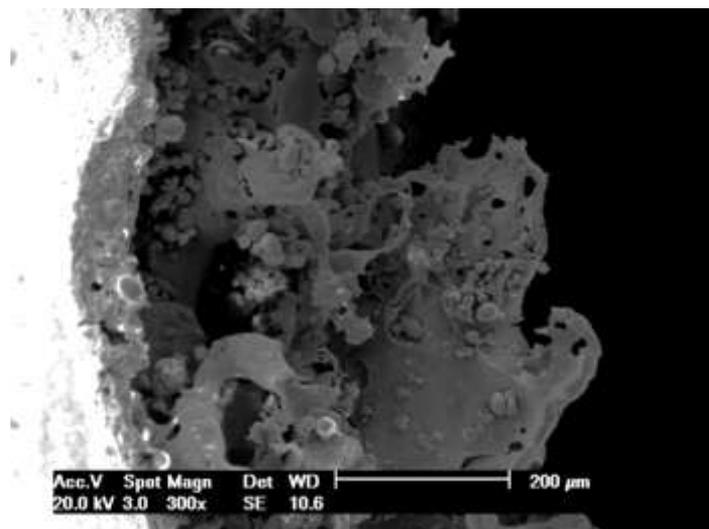


Figura 44. Micrografia da amostra T2 após 28 dias de degradação (75mg/mL).

O aumento na concentração de fatores de crescimento após uma lesão pode ter a capacidade de manter a regeneração de axônios que sofreram um desligamento. Portanto, a liberação prolongada de fatores de crescimento exógenos diretamente na lesão, pode sustentar a regeneração do nervo em períodos que fatores de crescimento endógenos não são o suficiente. Contudo, a liberação contínua destas moléculas bioativas ainda é um desafio devido a meia-vida

extremamente curta dos fatores de crescimento quando liberados, exigindo um grande número de aplicações contínuas para atingir a dose terapêutica eficiente. A fixação destes fatores ao suporte pode representar uma forma eficiente de liberação, quando os suportes utilizados forem porosos e eficientes na retenção de fármacos.

Foi demonstrado por Tannemaat et al em 2008, utilizando ratos, que a liberação de fatores de crescimento em um nervo ciático rompido por pelo menos 4 semanas favorece a regeneração nervosa, mostrando ainda que animais tratados com fatores de crescimento nervoso (NGF) obtiveram uma recuperação mais rápida, respondendo à estimulações nervosas, um efeito que não é geralmente observado durante a primeira semana após a lesão [67].

6. CONCLUSÕES

Foram confeccionadas membranas lisas, superficialmente porosas e com alto grau de porosidade. As membranas porosas passaram por tratamentos químicos em diferentes concentrações, apresentando mudanças morfológicas, como menor espessura de parede e químicas, indicativas de eficiência da nanofuncionalização.

As membranas tratadas com hidróxido de sódio apresentam maior hidrofiliabilidade quando comparadas às sem tratamento. A relação entre molhabilidade e tratamento químico é proporcional, exceto para amostra tratada com a maior concentração de hidróxido de sódio.

A partir de membranas superficialmente porosas foram confeccionadas estruturas tubulares utilizando o processo de solda com clorofórmio. Estas estruturas apresentaram aumento na espessura da parede do tubo no local da solda, porém não foi constatada uma perda significativa de porosidade na superfície interna do tubo.

Estruturas tubulares altamente porosas revestidas externamente por uma camada superficialmente porosa de PLGA foram confeccionados com sucesso. Tratamentos químicos com hidróxido de sódio em diferentes concentrações foram realizados, obtendo mudanças semelhantes às sofridas pelas membranas na estrutura química do polímero. Estas mudanças químicas caracterizadas pelo aparecimento e maior pronunciamento de bandas indicativas da presença de ligações O-H tendem a aumentar a hidrofiliabilidade do polímero. Nos tubos tratados com concentrações mais altas de hidróxido de sódio a absorvidade é maior, apresentando-se de forma linear em relação ao tratamento sofrido, comprovando assim um aumento na hidrofiliabilidade do polímero após o tratamento químico.

Foi realizado um teste in vitro de degradação com duração de 60 dias, e a perda mássica sofrida pelas estruturas tubulares porosas com 2 tipos de tratamento químico e sem tratamento foi analisada. A perda de massa destas estruturas não ocorre de forma linear com o período de degradação devido ao intumescimento do polímero. As amostras com tratamento químico prévio sofreram um maior intumescimento quando comparadas as amostras sem tratamento devido a maior hidrofiliçidade.

As amostras utilizadas na degradação in vitro foram caracterizadas por GPC antes do teste e em cada período de degradação. Foi possível constatar que o tratamento químico realizado reduziu a massa molar ponderal média do polímero antes do estudo de degradação iniciar. Durante as primeiras duas semanas do processo de degradação esta relação foi mantida, porém após este período a massa molar ponderal média das estruturas poliméricas tornou-se próxima, indicando uma aceleração na degradação das estruturas sem tratamento químico, devido possivelmente à infiltração de PBS nos poros do tubo, o que aconteceu em menor período de tempo nas amostras com tratamento químico.

Analisando os resultados obtidos através do teste realizado com diferentes concentrações de amido em amostras tubulares porosas com diferentes tratamentos, é possível concluir que a dose de amido inserida nas estruturas tubulares pode ser alterada variando a concentração do mesmo em suspensão, porém a eficiência de inserção é inversamente proporcional à concentração de amido utilizada.

A liberação de amido ocorre de forma mais lenta em amostras tratadas com hidróxido de sódio quando a mais alta concentração de amido é avaliada. Isto ocorre possivelmente devido a maior hidrofiliçidade exibida pelo PLGA após sofrer tratamento químico com hidróxido de sódio, o que gerou uma maior absorção de PBS ao longo da degradação, facilitando a difusão dos produtos de degradação para o exterior do suporte. Quando avaliada a degradação de amostras com menores quantidades de amido, o mesmo não é observado, provavelmente devido à maior

absorção de PBS pelas amostras tratadas quimicamente, gerando assim maior difusão de amido para o exterior do suporte.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

- Analisar a degradação das estruturas porosas tubulares por maiores períodos de tempo.
- Avaliar quantitativamente a porosidade e a área superficial das membranas porosas com diferentes tratamentos químicos.
- Avaliar a adesão celular às membranas e identificar a sua relação com a porosidade e o tratamento químico sofrido.
- Realizar a inserção de fatores de crescimento nos suportes utilizando heparina e tratamentos químicos para ligação dos fatores a matriz para posteriormente avaliar a liberação in vitro e in vivo.
- Avaliar a regeneração nervosa in vivo obtida utilizando as diferentes estruturas tubulares propostas neste trabalho.

8. REFERÊNCIAS

- 1 - ICHIHARA, S.; *et al.* Artificial nerve tubes and their application for repair of Peripheral nerve injury: an update of current concepts. **Injury, Int. J. Care Injured** , 39S4, p.29–39, 2008.
- 2 - YU, H.; *et al.* Improvement of peripheral nerve regeneration in acellular nerve grafts with local release of nerve growth factor. **Microsurgery**, v.29, p.330-336, 2009.
- 3 - PANSERI, S.; *et al.* Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. **BMC Biotechnol**, v.8, p. 8-39, 2008.
- 4 - JIANG, X.; *et al.* Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits. **Experimental neurology**, v.223, p.86-101, 2010.
- 5 - BOCCACCINI, A. R.; *et al.* Bioresorbable and bioactive polymer/bioglass composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. **Composites Science and Technology**, v.63, p.2417-2429, 2003.
- 6 - BARRÉRE, F.; *et al.* Advanced biomaterials for skeletal tissue regeneration: instructive and smart functions. **Materials science and engineering**, v.59, p.38-71, 2008.
- 7 - SHUM, A.W.T.; *et al.* Fabrication and structural characterization of porous biodegradable poly(DL-lactic-co-glycolic acid) scaffolds with controlled range of pore sizes. **Polymer Degradation and Stability**, v.87, p.487-493, 2004.

8 - DORTA, M. J.; *et al.* Potential applications of PLGA film-implants in modulating in vitro drugs release. **International Journal of Pharmaceutics**, V.248, p.149-/156, 2002.

9 - CALANDRELLI, L.; *et al.* Preparation and characterization of composites based on biodegradable polymers for “in vivo” application. **Polymer**, v.41, p.8027-8033, 2000.

10 - FRANZ, S.; *et al.* Immune responses to implants e a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. **Biomaterials**, v.32, p.6692-6709, 2011.

11 - MONTES DE OCA, W.; *et al.* Structure and mechanical properties of PGA crystals and fibers. **Polymer**, v.47, p.7070-7077, 2006.

12 - SARDELA, G.; *et al.* Plasma microstructuring of polymers for contact guidance of cells. **International Conference on Advances of Biomaterials for Reconstructive Medicine**, P.74-75, 2002.

13 – BARBANTI, S. H.; Morfologia de polímeros reabsorvíveis como suporte para cultura de osteoblastos. São Paulo. 2001. Dissertação de mestrado. p. 94. Engenharia mecânica. Universidade estadual de campinas. Brasil.

14 - WENK, E.; *et al.* Microporous silk fibroin scaffolds embedding PLGA microparticles for controlled growth factor delivery in tissue engineering. **Biomaterials**, p.2571-2581, 2009.

15 - LU, I.; *et al.* In vitro degradation of porous poly(L-lactic acid) foams. **Biomaterials**. V.21, p. 1595-1605, 2000.

16 - WANG, X.; *et al.* Silk coatings on PLGA and alginate microspheres for protein delivery. **Biomaterials**, v.28, p.4161-4169, 2007.

17 - Dorati, R.; *et al.* Effect of porogen on the physico-chemical properties and degradation performance of PLGA scaffolds. **Polymer Degradation and**

Stability, v. 95, p. 694-701,2010

18 – LEE, S.; *et al.* Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.339–359, 2007.

19 - GAO, J.; *et al.* Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells. **Biomed Mater Res**, v.42, p.417–424, 1998.

20 - THAPA, A.; *et al.* Nano-structured polymers enhance bladder smooth muscle cell function. **Biomaterials**, v.24, p.2915–2926, 2003.

21 - LUO, Y. *et al.* Three-Dimensional Scaffolds. Principles of Tissue Engineering **Elsevier**, 3ª edição, 2007.

22 - KHORASANI, M. T.; *et al.* Plasma surface modification of poly (L-lactic acid) and poly(lactic-co-glycolic acid) films for improvement of nerve cells adhesion. **Radiation Physics and Chemistry**, v.77, p.280–287, 2008.

23 - BRASH, J. L.; Biomaterials in Canada: The first four decades. **Biomaterials**, v.26, p.7209–7220, 2005.

24 - BUDDY, D. R.; Biomaterials science: an introduction to materials in medicine. **Elsevier**, 2004.

25 - CESCHIN, J. R.; O implante na reabilitação bucal. **Pamed Editorial**, p.21-56, 1984.

26 - GESTER, L. *et al.*; A biodegradable intraosseous appliance in the treatment of mandibular fractures. **Oral Surg**, v.30, p.344-348, 1972.

27 - BERGSMA, E. J.; *et al.* Foreign body reactions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. **J. Oral Maxillofac Surg**, v.51, p.666-70, 1993.

28 - MOTTA, A. C.; *et al.* Síntese, caracterização e degradação "in vitro" do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**, v.11, p.340–350, 2006.

29 - JAIN, A. R.; The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glicolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**, v.21, p.2475-2490,2000.

30 - VACANTI, J. P.; *et al.* Tissue engineering: the design and fabrication of living replacement devices for surgical reconstruction and transplantation. **The lancet**, v.354, p. S32-S34, 2004.

31 - BOCCACCINI, A. R.; *et al.* Preparation and characterization of poly(lactide-co-glicolide)PLGA and PLGA/bioglass composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications. **Materials science and engineering**, v. 25, p.23-31, 2005.

32 – Makadia, H. K.; *et al.* Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**. v. 3, p.1377-1397,2011.

33 - KNESER, U.; *et al.* Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeons' point of view. **J. Cell. Mol. Med**, v.10, p.7-19, 2006.

34 - LIEBERMAN, J. R.; *et al.* Bone Joint. **Surg. Am.** v.84-A, p.1032, 2002.

35 - BARBANTI, S. H.; *et al.* Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros**, v.15, p.13-21, 2005.

36 - VACANTI, C.A.; The history of tissue engineering. **J. Cell. Mol. Med.**, v.10, n.3, p. 569-576, 2006.

37 - BORDIN, G. *et al.*; Medicine in Art, publicado por. The J. Paul Getty Museum, **Mandadori electa S.P.A.Milan**, 2010.

38 - JAIN, R. A.; *et al.* The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. **Biomaterials**. V.21, P.2475-2490, 2000.

39 - NIXON, J. R. *et al.*; Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparative techniques and release properties. **J. Microencapsul**, v.7, p.297-325, 1990.

40 - BROWN, P. W. Factores que influyen en el buen éxito de la reparación quirúrgica de nervios periféricos. **Bogdanoff BM**, p.1137-55, 1972.

41 - SEDDON, H. J. – Three types of nerve injury. **Brain**, P. 63-237. 1943.

42 - DOURADO, E.; *et al.* Técnicas microcirúrgicas de reparacão nervosa: procedimentos convencionais e alternativos. **Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac**, v. 3, n. 2, p. 49-54, 2003.

43 - GRABB, W. C. *et al.*; Comparison of methods of peripheral nerve suturing in monkeys. **Plast. Reconst. Surg.** v.46, p.31-8, 1970.

44 - LEVINTHAL, R. *et al.* Comparison of fascicular, interfascicular and epineurial suture techniques in the repair of simple nerve lacerations. **J. Neurosurg**. v.47, p.744-50, 1977.

45 - TUPPER, J. W. *et al.*; Fascicular nerve repairs: a comparative study of epineurial and fascicular (perineurial) techniques. **Orthopedic Clinics of North America**. v.19, n. 1, p. 57-69, 1988.

46 - URBANIAK, J. R. *et al.*; Fascicular nerve suture. **Clinical Orthopaedics and related research**. v. 163, p. 57-64, 1982.

47 - SAVIGNAT, M. *et al.*; Evaluation of Early Nerve Regeneration Using a Polymeric Membrane Functionalized With Nerve Growth Factor (NGF) After a Crush Lesion of the Rat Mental Nerve. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 66, p.711-717, 2008.

48 - DOURADO, E. Reparación microquirúrgica del nervio facial de conejo. Estudio comparativo de la sutura epineural y el sistema adhesivo de fibrina. Tese apresentada ao Departamento de Ciencias Morfológicas y Odontoestomatología da Universidade de Barcelona, para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial 255p, 2002.

49 - MILLESI, H.; Nerve grafting. **Clinics in Plastic Surgery**, v.11, p. 105-13, 1984.

50 - BATTISTON, B.; *et al.* Nerve repair by means of tubulization: literature review and personal clinical experience comparing biological and synthetic conduits for sensory nerve repair. **Microsurgery**, v. 25, p. 258-67, 2005.

51 - HEATH, C. A.; *et al.* The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. **Trends Biotechnol**, v.16, p. 163-68, 1998.

52 - VASCONCELOS, B. C. E.; Reparación Microquirúrgica del nervio facial de conejo mediante conductos nerviosos artificiales. Estudio comparativo de conductos reabsorbibles y no reabsorbibles. Tese apresentada ao Departamento de Ciencias Morfológicas y Odontoestomatología da Universidad de Barcelona, para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Cirurgia e Traumatologia Bucocomaxilofacial. 371p, 1999.

- 53 - LJKEMA-PAASEN, J.; *et al.* Transection of peripheral nerves, bridging strategies and effect evaluation. **Biomaterials**, v. 25, p. 1583-92, 2004.
- 54 - BIONDI, M.; *et al.* Controlled drug delivery in tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, p.229-242, 2008.
- 55 - LEE, A. C.; *et al.* Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. **Experimental neurology**, v.184, p.295-303, 2003.
- 56 - PATTIISON, M. A.; *et al.* Three-dimensional, nano-structured PLGA scaffolds for bladder tissue replacement applications. **Biomaterials**, v.26, p. 2491-2500, 2005.
- 57 - BRUNDLE, C.R.; *et al.* Encyclopedia of Materials Characterization. **Stoneham: Butterworth-Heinemann**, 1992.
- 58 – HSU, C. P. S. Infrared spectroscopy. **Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry**. Ed. Prentice hall. p.247-283, 1997.
- 59 – JAYASURIYA, A. C.; *et al.* Dissolution behavior of biomimetic minerals on 3D PLGA scaffold. **Surface and Coatings Technology**, v.200, p.6336–6339, 2006.
- 60 - AKCELRUD, L.; Fundamentos da ciência dos polímeros. São Paulo, ed. Manole, 2007.
- 61 - MOREIRA, J. C.; *et al.* Determinação das Constantes K e α da Equação de Mark-Houwink de Poli(p-acetóxiestireno). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 14, p. 80-82, 2004.
- 62 – DESAI, K. G.; *et al.* Formulation and characterization of injectable poly(DL-lactide-co-glycolide) implants loaded with N-acetylcysteine, a MMP inhibitor. **Pharm Res**, v.25, p.586-597, 2008

63 – CROLL, T. I.; et al. Controllable Surface Modification of Poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by Hydrolysis or Aminolysis I: Physical, Chemical, and Theoretical Aspects. **Biomacromolecules**, v.5, p.463-473, 2004.

64 – EUSTATHOPOULOS, N.; et al. Wettability at High Temperatures. **Elsevier Science**, 1999.

65 – Li, H.; et al. pH-compensation effect of bioactive inorganic fillers on the degradation of PLGA. **Composites science and technology**, v. 65, p. 2226-2232, 2005.

66 – OH, S. H.; et al. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. **Biomaterials**, v.29, p.1601-1609, 2008.

67 – DEUMENS, R.; et al. Repairing injured peripheral nerves: Bridging the gap. **Progress in Neurobiology**, v. 92, p.245–276, 2010.