



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**CONDUTOS POLIMÉRICOS MICROESTRUTURADOS
LONGITUDINALMENTE PARA O REPARO DO NERVO PERIFÉRICO**

GIOVANNA RAMOS GARCEZ

LICENCIADA EM QUÍMICA

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

Porto Alegre

Agosto, 2015



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

CONDUTOS POLIMÉRICOS MICROESTRUTURADOS LONGITUDINALMENTE PARA O REPARO DO NERVO PERIFÉRICO

GIOVANNA RAMOS GARCEZ

LICENCIADA EM QUÍMICA

ORIENTADOR: PROF(a). DR(a). Nara Regina de Souza Basso

CO-ORIENTADOR: Prof. Dr. Ricardo Meurer Papaléo

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.

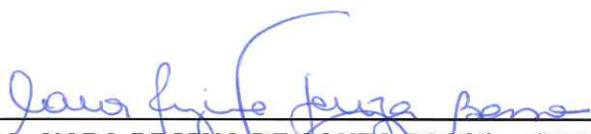
**Porto Alegre
Agosto, 2015**



CONDUTOS POLIMÉRICOS MICROESTRUTURADOS LONGITUDINALMENTE PARA O REPARO DO NERVO PERIFÉRICO

CANDIDATA: GIOVANNA RAMOS GARCEZ

Esta Dissertação de Mestrado foi julgada para obtenção do título de MESTRE EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

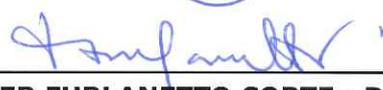


DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - ORIENTADORA

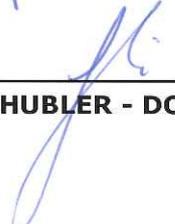


DR. RICARDO MEURER PAPALÉO - CO-ORIENTADOR

BANCA EXAMINADORA



DRA. TEMIS WEBER FURLANETTO CORTE - DA FACULDADE DE FARMÁCIA - PUCRS



DR. ROBERTO HUBLER - DO PGETEMA - FENG - PUCRS

*É preciso força pra sonhar
e perceber que a estrada vai além
do que se vê.*

(Los Hermanos)

DEDICATÓRIA

A minha mãe, Marlene Ramos Garcez, pelos esforços durante esses anos de estudo e pesquisa, aos demais familiares, pelo carinho e apoio.

AGRADECIMENTOS

A minha família, aos amigos mais próximos da época da faculdade pelos momentos de distração, à Gabriela pelas correções e companheirismo durante os últimos anos, aos membros do grupo de pesquisa pela parceria, em especial à Cristhiane pelas ajudas de última hora. Aos demais colegas do laboratório pelos cafés. Aos funcionários da Faculdade de Química e do PGETEMA pela disponibilidade. Aos meus orientadores, aos professores Nara e Papaléo, pela paciência, ensinamentos e confiança, mesmo nos momentos que eu duvidava.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	4
AGRADECIMENTOS.....	5
SUMÁRIO	6
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS.....	11
LISTA DE QUADROS	12
LISTA DE SÍMBOLOS.....	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivos Específicos	20
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1. Sistema nervoso periférico	21
3.1.1. Nervo periférico.....	22
3.2. Lesões dos nervos periféricos.....	23
3.2.1. Degeneração periférica.....	24
3.2.2. Tipos de tratamento	25
3.3. Engenharia de tecidos	27
3.4. Biomateriais.....	30
3.4.1. Polidimetilsiloxano.....	31
3.4.2. Policaprolactona.....	33
3.4.3. PLGA - Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico).....	34
3.4.4. Preparação de blendas de PCL/PLGA e aplicações.....	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1. Materiais.....	38
4.2. Métodos.....	38
4.2.1. Molde microestruturado	38
4.2.2. Preparação dos filmes de PDMS	39
4.2.3. Preparação dos filmes de PCL e PCL/PLGA microestruturados e lisos ...	39

4.2.4. Ensaio de degradação hidrolítica	40
4.3. Técnicas de caracterização	41
4.3.1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	41
4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	42
4.3.3. Análise Termogravimétrica	42
4.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	42
4.3.5. Microscopia de força atômica (AFM)	43
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
5.1. Preparação e caracterização dos filmes de PDMS	44
5.2. Preparação e caracterização dos filmes de PCL/PLGA	46
5.3. Ensaio de degradação	55
6. CONCLUSÕES	69
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	70
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
ANEXOS	78
APÊNDICES	80

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Anatomia do corte transversal do nervo periférico. Adaptado de LEE; WOLFE, 1999.....	22
Figura 3.2. Classificação das lesões periféricas (COLLI, 1993).....	24
Figura 3.3. Degeneração e regeneração do nervo periférico. Adaptado de LEE; WOLFE, 1999.....	25
Figura 3.4. Tipos de tratamento: a) Sutura epineural externa; b) Sutura epineural interna; c) Sutura perineural; d) Reconstrução com enxertos de nervo interfasciculares. Adaptado de MATTAR JR., 2000.	27
Figura 3.5. Diagrama com sugestões de modificações em <i>scaffold</i> neural. Adaptado de GU, 2014.....	28
Figura 3.7. Estrutura do polidimetilsiloxano (COLAS; CURTIS, 2004).....	32
Figura 3.8. Cadeia principal da policaprolactona (TAVARES, 2011).....	33
Figura 3.9. Esquema da hidrólise do poliéster.	34
Figura 3.10. Estrutura do PLGA (BARBANTI, 2005).....	35
Figura 4.1. Molde de silício microestruturado.....	39
Figura 4.2 Fluxograma de tipos de filmes preparados a partir de misturas de PCL/PLGA.....	40
Figura 5.1. Filme de PDMS com microestruturas de diferentes tamanhos de canais.....	44
Figura 5.2. Imagens de MEV de filmes de PDMS com microestruturas obtidas a partir de moldes com diferentes tamanhos de canais do molde: a) 5 μm ; b) 10 μm ; c) 15 μm e d) 20 μm	45
Figura 5.3. Imagens de MEV dos cortes laterais dos filmes de PDMS com microestruturas obtidas a partir de diferentes tamanhos de canais do molde: a) 5 μm ; b) 10 μm ; c) 15 μm e d) 20 μm	46
Figura 5.4. Filmes de PCL e PCL/PLGA: a) filmes produzidos em molde microestruturado e b) filme produzido em placa de petri (liso).....	47

Figura 5.5. Imagens de MEV mostrando as larguras dos canais em filmes de PCL produzidos com molde de silício microestruturado: a) 5 μm ; b) 10 μm ; c) 15 μm e d) 20 μm	48
Figura 5.6. Imagens de MEV mostrando a estrutura dos esferulitos em filmes de PCL: a) e b) mostram a formação dos domínios nos filmes lisos enquanto c) e d) nos filmes microesturados.....	49
Figura 5.7. Microscopia óptica comparando filmes de PCL/PLGA: a) PCL puro; b) PCL/PLGA 80:20.....	50
Figura 5.8. Imagens de MEV comparando filmes de PCL/PLGA: a) PCL puro; b) PCL/PLGA 90:10; c) PCL/PLGA 80:20; d) PCL/PLGA 70:30.....	51
Figura 5.9. Comparação entre Filmes de PCL/PLGA por AFM: a) PCL puro; b) PCL/PLGA 90:10; c) PCL/PLGA 70:30.	52
Figura 5.10. Imagem de AFM de amostra de PCL/PLGA 70:30.....	52
Figura 5.11. DTGA dos sistemas poliméricos.	53
Figura 5.12. Gráfico do comportamento de perda de massa em função do tempo de filmes de PCL.....	57
Figura 5.13. Gráfico do comportamento de perda de massa em função do tempo de filmes de PCL/PLGA 90:10.....	58
Figura 5.14. Gráfico do comportamento de perda de massa em função do tempo de filmes de PCL/PLGA 80:20.....	59
Figura 5.15. Gráfico do comportamento de perda de massa em função do tempo de filmes de PCL/PLGA 70:30.....	60
Figura 5.16. Gráfico do comportamento geral de perda de massa em função do tempo de filmes de PCL/PLGA.....	61
Figura 5.17. Imagem de MEV de filme de PCL/PLGA 90:10 após tempo de degradação de 90 dias em que se observa acúmulo de sais após lavagem.....	62
Figura 5.18. Espectro dos filmes de PCL e blendas de PCL/PLGA.	63
Figura 5.19. Imagens de MEV de filmes microestruturados em molde com canais de 5 μm : a) PCL puro antes da degradação, b) e c) PCL puro após degradação de 90 dias.....	64

- Figura 5.20. Imagens de MEV de filmes de PCL/PLGA 90:10 microestruturados em molde com canais: a) antes da degradação, b) e c) após degradação de 90 dias..... 65
- Figura 5.21. Imagens de MEV comparando amostras de PCL/PLGA 80: 20 antes e após degradação de 90 dias: a) antes do ensaio, b) e c) pós degradação. 66
- Figura 5.22. Imagens de MEV comparando amostras de PCL/PLGA 70:30 antes e após degradação de 90 dias: a) antes do ensaio, b) e c) pós degradação. 67
- Figura 5.23. Imagens de AFM comparando amostras de PCL puro antes e após degradação de 90 dias: a) antes do ensaio, b) pós degradação..... 68

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1.Medidas de rugosidade das blendas de PCL/PLGA.....	53
Tabela 5.2.Dados calorimétricos das blendas de PCL/PLGA.	55
Tabela 5.3.Medidas de espessura das blendas de PCL/PLGA.....	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Alguns dispositivos aprovados pelo governo norte americano disponíveis para comercialização. Adaptado de GU, 2014.	31
Quadro 4.1. Reagentes utilizados.	38

LISTA DE SÍMBOLOS

%	percentual	
μm	Micrometro	
ΔH_m	Entalpia de fusão	J.g^{-1}
ΔH_{m0}	Entalpia de fusão padrão	J.g^{-1}
$\%X_c$	Grau de cristalinidade	
AFM	“Atomic Force Microscopy” - Microscopia de força atômica	
$^{\circ}\text{C}$	grau Celsius	
CIRIMAT	Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie de Matériaux	
cm	Centímetro	
d	Diâmetro	
DSC	“Differential Scanning Calorimetry” - Calorimetria exploratória diferencial	
ECM	Componentes da matriz extracelular	
EDS	Espectrômetro de Raios-X por Energia Dispersa	
EPFL	Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne	
FAQUI	Faculdade de Química	
FDA	U. S. Food and Drug Administration	
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	
IV	Infravermelho	
L	Largura	
LabCEMM	Laboratório Central de Microscopia e Microanálise	
LAMAT	Laboratório Multiusuário de Análise Térmica	
LOR	Laboratório de Organometálicos	
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por emissão de campo	
mL	mililitro	
mm	milímetro	
PBS	Solução tampão fosfato salino	
PCL	Policaprolactona	
PDMS	Polidimetilsiloxano	
PGA	Poli(ácido glicólico)	
pH	Potencial hidrogeniônico	
PLA	Poli(ácido lático)	

PLGA	Poli (ácido láctico – co- glicólico)	
PUCRS	Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul	
PVA	Acetato de polivinila	
R _a	Rugosidade média	nm
RIE	Corrosão iônica reativa	
RNA	Ácido ribonucleico	
R _q	Rugosidade quadrática média	nm
rpm	Rotações por minuto	
SE	Elétrons secundários	
SN	Sistema nervoso	
SNC	Sistema nervoso central	
SNP	Sistema nervoso periférico	
T _g	Temperatura de transição vítrea	°C
TGA	Análise termogravimétrica	
T _m	Temperatura de fusão	°C
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul	
UV	Ultravioleta	

RESUMO

RAMOS GARCEZ, Giovanna. **Condutores poliméricos microestruturados longitudinalmente para o reparo do nervo periférico**. Porto Alegre. 2015. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Lesões no nervo periférico são um problema clínico comum e a construção de novos dispositivos para auxiliar no seu reparo tem se mostrado uma área em crescimento. A utilização de condutos microestruturados vem sendo investigada, com o objetivo de promover um crescimento celular guiado, auxiliando na recuperação do tecido lesado. Materiais biocompatíveis e biodegradáveis podem ser aplicados para a construção destes dispositivos eliminando a necessidade de um segundo procedimento para remoção do implante. Este trabalho propõe a preparação de filmes microestruturados com canais longitudinalmente alinhados de polidimetilsiloxano (PDMS) e blendas de policaprolactona (PCL) e poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) para potencial aplicação em regeneração de nervo periférico. Filmes de PDMS foram preparados pelo método de mistura da solução base de oligômeros com agente de cura. Blendas de PCL ($M_n = 80,00$) e PLGA (85:15) com diferentes razões de PCL/PLGA (100/0, 90/10, 80/20 e 70/30) foram preparadas pelo método de evaporação do solvente. O molde utilizado para produzir os filmes era constituído de canais com diferentes larguras (5, 10, 15 e 20 μm) e altura constante (25 μm). Os materiais foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (ATR/FT-IR), Análise termogravimétrica (TGA), Microscopia de Força Atômica (AFM). Para verificar o tempo de degradação dos filmes foi realizado ensaio de degradação *in vitro* das blendas de PCL e PCL/PLGA, observando-se perda de massa de 0,4-9,9 % até o período de 90 dias de ensaio. Constatou-se que a adição de PLGA ao PCL é uma forma efetiva de controlar a taxa de degradação das blendas e que não há diferença significativa entre a degradação dos filmes lisos e microestruturados.

Palavras-Chaves: nervo periférico, canais microestruturados, policaprolactona, poli(ácido láctico-co-glicólico), polidimetilsiloxano.

ABSTRACT

RAMOS GARCEZ, Giovanna. **Longitudinally microstructured polymers for peripheral nerve repair.** . Porto Alegre. 2015. Master. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Peripheral nerve injuries are a common clinical problem and the development of new approaches to assist in its repair has been shown to be a growth area. The use of microstructured channels has been investigated, in order to promote cell growth guided by assisting in the damaged tissue recovery. Biocompatible and biodegradable materials can be applied for the construction of these devices by eliminating the need for a second procedure to remove the implant. This work proposes the preparation of microstructured film along channels aligned with polydimethylsiloxane (PDMS) and blends of polycaprolactone (PCL) and poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) for potential application in peripheral nerve regeneration. PDMS films were prepared by the method of mixing the solution with oligomers based curing agent. Blends of PCL ($M_n = 80.00$) and PLGA (85:15) with different ratios of PCL / PLGA (100/0, 90/10, 80/20 and 70/30) were prepared by the solvent evaporation method. The mold used to produce the films consisted of channels with different widths (5, 10, 15 and 20 μm) and constant height (25 μm). The materials were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Infrared Spectroscopy Fourier Transform (ATR / FT-IR), thermal gravimetric analysis (TGA), Atomic Force Microscopy (AFM). To evaluate the degradation time of the films was carried out *in vitro* degradation test of PCL blends and PCL / PLGA observing weight loss 0.4 to 9.9% until 90 days testing. It was found that the addition of the PLGA PCL is an effective way to control the degradation rate of the blend and there is no significant difference in the degradation of flat and microstructured films.

Key-words: peripheral nerve, microstructured channels, polycaprolactone, poly (lactic-co-glycolic acid), polydimethylsiloxane.

1. INTRODUÇÃO

O ferimento no nervo periférico é um problema clínico comum que afeta de forma significativa a qualidade de vida dos pacientes. Embora o sistema nervoso periférico tenha uma maior capacidade de regeneração axonal que o sistema nervoso central, o reparo espontâneo do nervo periférico é quase sempre incompleto, com pobre recuperação de função, principalmente se o *gap* do ferimento for muito longo. Por isso, vários tipos de terapias médicas têm sido exploradas na tentativa de obter melhores resultados (GU et al., 2011).

O transplante de enxerto de nervo autólogo, no qual se utiliza material do próprio paciente, tem sido utilizado como tratamento em lesões de grande extensão nervosa, entretanto, esta técnica possui muitas desvantagens, incluindo a necessidade de cirurgia para a extração do nervo doador, incompatibilidade entre o nervo defeituoso e o diâmetro do enxerto, quantidade limitada do enxerto doador, perda da função do local doador, entre outros. O uso de aloenxerto, quando o implante é preparado a partir do material de um doador, como uma segunda opção terapêutica tem seus próprios complicadores, como a rejeição e o risco de transmissão de doenças (GU; DING; WILLIAMS, 2014).

O uso de enxertos sintéticos através de condutos ou tubos poliméricos biocompatíveis para a regeneração nervosa tem se mostrado uma boa alternativa para ligar os troncos defeituosos do nervo seccionado, fornecendo suporte mecânico assim como um microambiente favorável para a restauração do tecido danificado, através da combinação de uma série de fatores físicos, químicos e biológicos. O principal material utilizado para a confecção do enxerto sintético (ou conduto/tubo sintético) é o silicone, que possui a desvantagem de não ser biodegradável. Por

conta disso, polímeros da família dos materiais biodegradáveis vem sendo testados para a fabricação de novos suportes na engenharia de tecidos, como por exemplo a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) e o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (BATTISTON et al., 2005; BRAGA-SILVA, 1999; DODLA, 2007; GU et al., 2011; GU; DING; WILLIAMS, 2014).

Dentro da classe de silicones, o polidimetilsiloxano (PDMS) é bastante utilizado devido a sua estabilidade e inatividade no corpo humano, além de sua elasticidade. Estudos em ratos utilizando tubos de PDMS mostram uma recuperação de até 10 mm do nervo ciático e, quando combinado com outros materiais, como plasma e colágeno, essa recuperação pode chegar a 15 mm. Seu principal problema é o fato de não ser biodegradável, o que ocasiona a realização de uma segunda cirurgia para remoção do implante após a recuperação do tecido. Outro complicador é a alta taxa de inflamação tecidual (TSUJI et al., 2003).

A poli(ϵ -caprolactona) é um polímero biocompatível e biodegradável, de fácil preparo, com propriedades mecânicas adequadas para a fabricação de condutos para o reparo do nervo. Possui uma taxa de degradação adequada para esta finalidade, sem sofrer processos de modificação no seu formato, incluindo inchaço, além de suportar o estresse mecânico durante a implantação (KWEON et al., 2003; SOUTHGATE; CAMERON; BAKER, 2009; THI; LEE, 2010)).

O poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) é um copolímero sintético composto pelas unidades monoméricas de poli(ácido glicólico) (PGA) e poli(ácido láctico) (PLA). É um polímero biodegradável, biocompatível e bioabsorvível, conhecido pela sua elasticidade. Sua taxa de degradação é controlada pela variação das proporções de seus monômeros, que resulta em uma ampla faixa de tempo, podendo variar de dias a meses. A hidrólise do PLGA resulta na quebra de suas moléculas em seus monômeros iniciais, que são posteriormente eliminados facilmente do organismo por via metabólica (WANG, MAKITIE, 2011).

Uma alternativa para melhorar o processo de regeneração do nervo é o uso de microestruturas para guiar o crescimento do mesmo dentro do tubo. Diversas pesquisas estão sendo realizadas na tentativa de determinar o tipo de estrutura mais adequada e resultados promissores foram obtidos em estudos de suportes (*scaffolds*) com microestruturas em formato de canais (JACCHETTI et al., 2014).

Apesar dos muitos avanços tecnológicos as terapias disponíveis atualmente para a recuperação de nervos periféricos lesionados ainda são precárias e insatisfatórias, logo, uma alternativa é a busca e o desenvolvimento por enxertos sintéticos mais eficientes a fim de facilitar a recuperação total deste tipo de dano tecidual.

Nesse trabalho foram preparados filmes poliméricos com canais microestruturados de diferentes larguras, utilizando PDMS e blendas de PCL e PLGA (85:15), na busca pela combinação mais satisfatória entre estrutura e composição para potencial aplicação no reparo do nervo periférico.

2. OBJETIVOS

Preparar filmes com canais longitudinalmente orientados de diferentes matrizes: silicone (PDMS) e blendas de PCL e PLGA, para posterior aplicação como condutos microestruturados para regeneração do nervo periférico.

2.1. Objetivos Específicos

- Preparar filmes microestruturados de PDMS e de blendas de PCL/PLGA com diferentes composições;
- Variar a largura dos canais microestruturados dos filmes preparados;
- Preparar filmes lisos (sem microestruturas), dos mesmos materiais;
- Caracterizar a morfologia, estrutura e propriedades térmicas dos filmes;
- Avaliar o processo de degradação hidrolítica dos filmes produzidos com material biodegradável.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Sistema nervoso periférico

O sistema nervoso (SN) é a parte do nosso organismo responsável por coordenar ações voluntárias e involuntárias, coordenando e regulando as atividades corporais e transmitindo sinais entre as diferentes partes do nosso organismo. O SN é dividido em dois grandes grupos: o sistema nervoso central e o sistema nervoso periférico (GRAY, 1988; GUYTON, 2006; JONES et al, 2014).

O sistema nervoso periférico (SNP) inclui todo o tecido nervoso localizado fora do sistema nervoso central (SNC). Desempenha um conjunto complexo de funções que podem ser agrupadas em: sensitiva, integradora e motora. As fibras nervosas que o constituem transmitem sinais entre o SNC e os efetores em todas as partes do corpo (GRAY, 1988; GUYTON, 2006; JONES et al, 2014).

As fibras nervosas são agrupadas em fascículos chamados nervos. O SNP contém 43 pares de nervos: 12 pares de nervos cranianos e 31 pares de nervos conectados à medula espinhal, como nervos espinais, sendo designados de acordo com a posição da vértebra de origem (cervical, torácica, lombar, sacral e coccígea) (GUYTON, 2006).

O SN consiste apenas de dois tipos de células: neurônios e neuroglia. Os neurônios são as unidades básicas do processamento da informação, sendo especializados na condução de impulsos nervosos. A neuroglia sustenta, nutre e protege os neurônios e mantém a homeostase no líquido intersticial que banha os neurônios (GUYTON, 2006).

3.1.1. Nervo periférico

Consiste num feixe ou feixes de fibras nervosas formadas pelo axônio e bainhas conjuntivas que o envolvem (o endoneuro). Essa bainha de colágeno protege o corpo celular do neurônio de traumas mecânicos, permanecendo viável, na maioria das lesões. A união de várias fibras nervosas de diferentes tamanhos é chamada de fascículo (GRAY, 1988; GUYTON, 2006; JONES et al, 2014).

Os fascículos são envolvidos por uma camada forte e densa que protege de traumas e compressões externas, chamado perineuro, que tem como funções: manter a pressão intrafascicular auxiliar na manutenção do fluxo endoplasmático, proteger as fibras nervosas e formar uma barreira entre elas e os demais tecidos. Na maioria das vezes estão organizados dentro do nervo envoltos por um tecido conjuntivo denominado epineuro interno (GRAY, 1988; GUYTON, 2006; JONES et al, 2014). Essa estrutura é apresentada na figura 3.1.

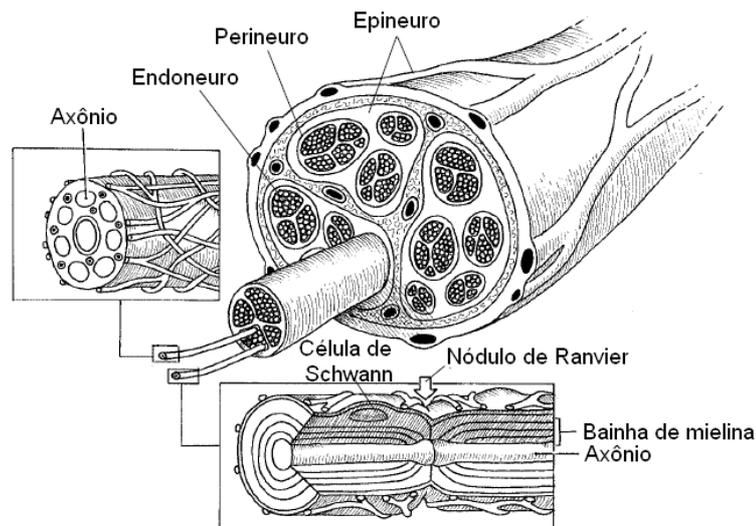


Figura 3.1. Anatomia do corte transversal do nervo periférico. Adaptado de LEE; WOLFE, 1999.

3.2. Lesões dos nervos periféricos

O primeiro relato de recuperação de função completa de nervo periférico e tendões foi feito por Chauliac em 1393. Porém, até o século XIX o mecanismo desse reparo manteve-se desconhecido. Em 1850, Augustus Waller apresentou seu trabalho sobre a degeneração nervosa observada em sapos, onde concluiu que a regeneração era mais rápida nos jovens e que a estimulação elétrica galvânica não alterava a sua velocidade. Seu trabalho teve tanta importância que foi dado o nome de degeneração walleriana ao conjunto de fenômenos que ocorrem no axônio distal após uma lesão (AZZE; MATTAR JR., 2000).

Posteriormente, os trabalhos publicados em 1914 e 1928 por Ramon e Cajal viriam a revolucionar os estudos na área, com a determinação de que as fibras nervosas viáveis, em um nervo periférico degenerado, tem origem e crescem a partir do coto proximal e não através de auto-regeneração da porção distal regenerada. Os principais avanços no estudo das lesões do nervo periférico se deram nos períodos de guerra. Weir Mitchell escreveu, durante a guerra civil americana, sobre lesões causadas por armas de fogo e descreveu, pela primeira vez, em artigo publicado no ano de 1864, sobre a causalgia (AZZE; MATTAR JR.,2000).

Seddon e Woodhall estudaram as cirurgias realizando enxertos de ponte em lesões nervosas periféricas e, após a Segunda Guerra Mundial, Sunderland resumiu a anatomia interna detalhada dos nervos. Em 1975 Seddon classificou as lesões, apresentadas na figura 3,2, em: a) neuropraxias – lesão leve, com perda motora e sensitiva, sem alteração estrutural, b) axonotmeses – comum em lesões por esmagamento, estiramento ou percussão, há perda de continuidade axonal e subsequente degeneração walleriana do segmento distal e c) neurotmeses – separação completa do nervo, com interrupção do crescimento axonal. Essas classificações são utilizadas até hoje para avaliar os ferimentos (SIQUEIRA, 2007).

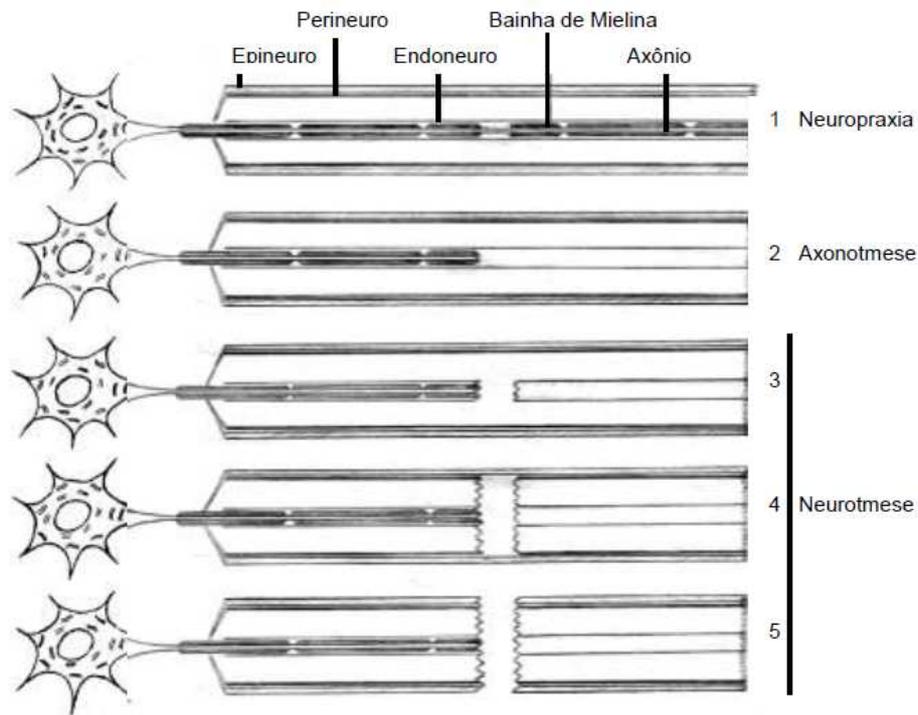


Figura 3.2. Classificação das lesões periféricas (COLLI, 1993).

3.2.1. Degeração periférica

Quando ocorre uma lesão no nervo periférico, inicia-se o processo conhecido como degeneração (Figura 3.3), no qual a porção do coto proximal do axônio degenera de maneira retrógrada até chegar ao próximo nóculo de Ranvier do local da lesão. Após a transecção, o corpo celular morre e ocorre uma mudança de metabolismo, priorizando a produção de materiais necessários para o reparo e crescimento do axônio, como RNA, lipídios, actina, tubulina, e proteínas associadas ao crescimento (COLLI, 1993; SIQUEIRA, 2007).

A degeneração walleriana se inicia de 48 a 96 horas após a transecção, com a deteriorização da mielina e desorganização do axônio. As células de Schwann se proliferam e fagocitam os resíduos de mielina e do axônio. Posteriormente elas se alinham longitudinalmente, criando colunas chamadas bandas de Bungner. A velocidade da degeneração varia de acordo com a gravidade da lesão, sendo mais rápida nas lesões completas, podendo chegar a 2 semanas para se completar no caso de lesões incompletas como as compressões. Todo esse processo visa a

preparação do ambiente para que ocorra a regeneração, que tem velocidade em humanos, de cerca de 1 a 2 milímetros de tecido recuperado por dia (COLLI, 1993; SIQUEIRA, 2007).

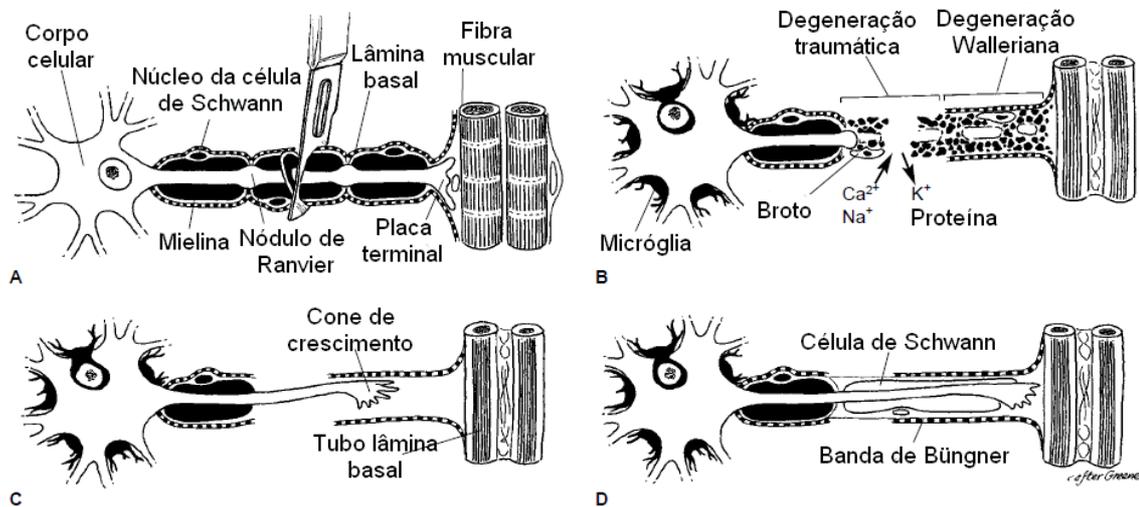


Figura 3.3. Degeneração e regeneração do nervo periférico. Adaptado de LEE; WOLFE, 1999.

Os brotos axonais tem papel fundamental na regeneração nervosa. Formados nos primeiros dias após a lesão, eles são prolongamentos protoplasmáticos que surgem nos cotos proximais dos axônios e atravessam o segmento lesado através de tubos formados por células de Schwann. Chamados bandas de Bungner, na fase aguda da lesão ficam responsáveis pela digestão da mielina. Os brotos axonais caminham por esses canais, atingem os tubos do endoneuro do segmento distal e posterior a fibra muscular. Cada axônio de coto proximal origina até 30 brotos, mas somente alguns, de 1 a 4, irão encontrar o caminho correto até o tubo endoneural. Apenas os brotos que alcançarem o receptor distal e o reinervarem irão desenvolver-se e sofrer a mielinização. No caso dos axônios regenerados não encontrarem os canais formados pelas bandas de Bungner no período de 3 a 4 meses, esses canais se degeneram e são substituídos por tecido cicatricial (COLLI, 1993).

3.2.2. Tipos de tratamento

O tratamento escolhido dependerá da lesão que ocorreu. Normalmente, ferimentos causados por trauma mecânico com elemento cortante são de

diagnóstico mais simples e devem ser tratados com intervenção cirúrgica. Lesões causadas por arma de fogo de baixo calibre necessitam de um período de avaliação, que pode chegar a 60 dias para estabelecer a necessidade ou não de cirurgia. Outros tipos de lesão, como aquelas causadas por frio, calor, compressão, tumores ou até imobilização inadequada também necessitam de avaliação (COLLI, 1993).

A reconstrução cirúrgica pode ser dividida em três fases de acordo com Robinson: imediata (um mês), demorada (3 a 6 meses) e tardia (1 a 2 anos ou mais). Normalmente não é necessária a utilização de enxertos em lesões com menos de 1,5 cm de espaço entre os cotos. Em humanos, os enxertos são sempre indicados nos espaços entre cotos maiores que 5 cm (SIQUEIRA, 2007).

O método clássico para reparo cirúrgico é a sutura, que pode ser reparo epineural, reparo de grupos fasciculares, reparo fascicular ou uma mistura desses métodos (Figura 3.4), sendo o epineural mais utilizado, pela facilidade, porém ele não garante bom reparo devido ao mau alinhamento das estruturas fasciculares internas. Quando a sutura do nervo não for possível devido às tensões, os enxertos são utilizados (LUNDBORG, 1987). Seus tipos mais comuns são os obtidos da mesma pessoa (autoenxerto), de outro ser humano (aloenxerto), ou ainda de outra espécie (xenoenxerto). O nervo mais utilizado para enxerto é o nervo sural, localizado na parte inferior da panturrilha. Os enxertos são ligados aos fascículos correspondentes e posteriormente suturados. Ainda é possível a utilização de cola de fibrina para diminuição das suturas minimizando traumas. Há vários tipos de enxerto de nervos (cabos, tronco, vascularizado, livre e interfascicular), e ainda possibilidade do enxerto muscular, entretanto esta técnica sofre desvantagem devido ao local fornecedor de tecido e necessita de uma combinação de outros procedimentos para ser realizada (LEE, 1999).

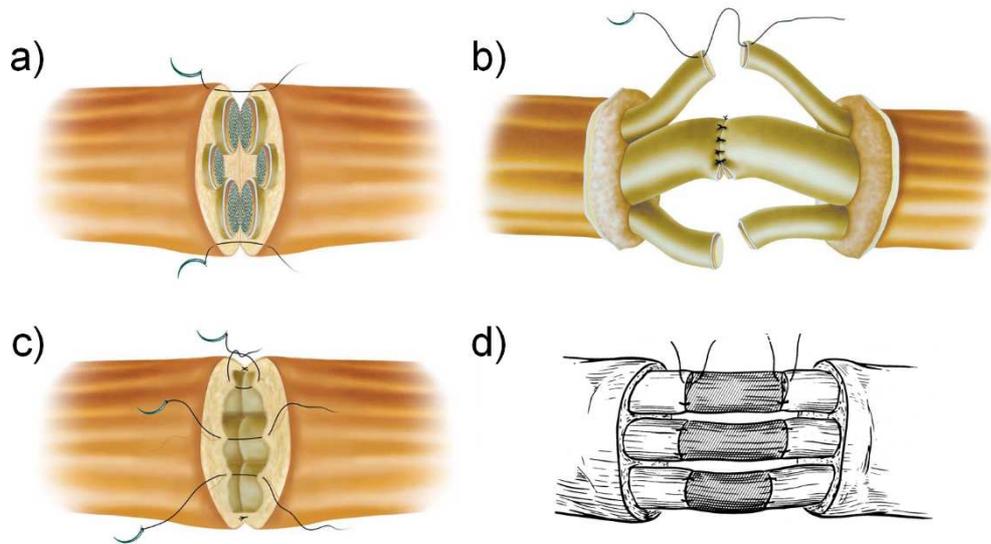


Figura 3.4. Tipos de tratamento: a) Sutura epineural externa; b) Sutura epineural interna; c) Sutura perineural; d) Reconstrução com enxertos de nervo interfasciculares. Adaptado de MATTAR JR., 2000.

Atualmente o uso de enxertos sintéticos é uma alternativa bastante utilizada em casos onde a extensão da lesão impossibilita a simples união dos cotos. Tubos de silicone hoje em dia são vastamente empregados através de procedimento cirúrgico em que os cotos nervosos seccionados são introduzidos e fixados dentro da prótese tubular. O objetivo é propiciar um ambiente favorável à regeneração do nervo, assim como o direcionamento do crescimento nervoso das extremidades rompidas ou seccionadas, protegendo as fibras nervosas do tecido cicatricial e evitando a formação de neuroma. Essa técnica de tubulização ou reparo tubular, apesar de ser a melhor alternativa para alguns casos, tem o inconveniente da necessidade de uma segunda cirurgia para a retirada do implante no final do tratamento (SEBBEN, ET AL.,2011).

3.3. Engenharia de tecidos

A engenharia de tecidos é a criação de novos tecidos para reconstrução terapêutica do corpo humano pela estimulação deliberada e controlada de células alvo selecionadas através de uma combinação sistemática de sinais moleculares e mecânicos, que deve ser realizada na forma de um veículo que controle esses sinais no tempo e espaço com precisão. Usualmente esses veículos têm sido descritos

como *scaffolds*, uma estrutura inerte que auxilia na construção de objetos inanimados, não influenciando nas características finais do produto. Outro termo empregado atualmente é *template*, que incorpora a ideia de uma estrutura ativa. A figura 3.5 resume os elementos que podem ser incorporados a um *scaffold* neural ideal, com sugestões de formatos e modificações biológicas e físicas (GU, 2014).

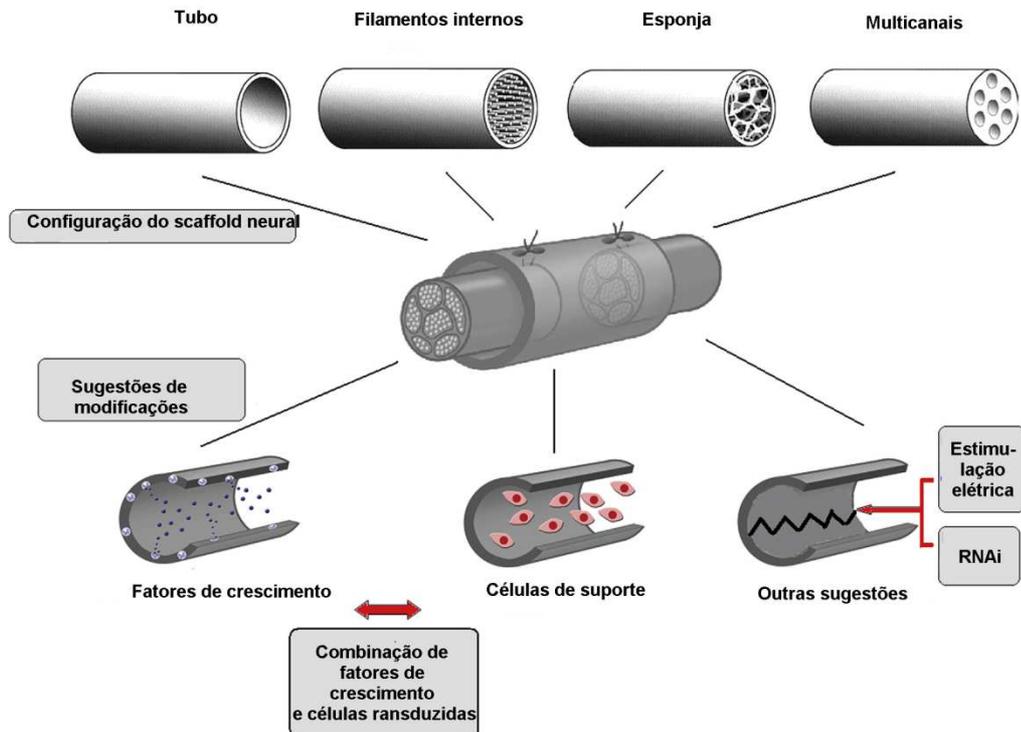


Figura 3.5. Diagrama com sugestões de modificações em *scaffold* neural. Adaptado de GU, 2014.

Uma das possibilidades promissoras é a construção de um *scaffold* em formato de tubo com canais alinhados na sua superfície interna. Esta técnica baseia-se na teoria de que as células tendem a alinhar-se em áreas de descontinuidade, chamadas orientações por contato, e este mecanismo influencia diretamente o alinhamento e a proliferação celular em superfícies canalizadas (MOBASSERI, 2013). O material utilizado para construção do tubo é produzido em formato de filme sob um molde de silício ou resina epóxi. O molde é fabricado por litografia de UV e corrosão iônica reativa (RIE), no qual se usa luz para transferir um padrão geométrico de uma fotomáscara para um fotorresiste (polímero fotossensível à luz ultra-violeta) sobre o substrato. Além de reagir à exposição da radiação, o fotorresiste deve proteger o substrato durante o processo de corrosão. Após a

gravação do padrão uma camada antiadesiva é aplicada para facilitar a remoção da réplica polimérica (GRISCOM et al., 2001).

De acordo com estudos realizados até o presente momento, o sucesso desta técnica de construção de microcanais irá depender da natureza do polímero utilizado para fabricação do filme, altura e largura e formato dos canais da microestruturação. Filmes de PDMS produzidos com microestruturas de largura de 10-20 μm mostraram-se uma alternativa promissora, pois este tamanho assemelha-se ao tamanho médio do corpo das células. Quando tamanhos inferiores foram testados a adesão celular diminui em função da plasticidade das células não se adaptarem a estas dimensões inferiores. A altura do canal também influencia no processo, sendo 1,5 μm o valor mínimo necessário para obter um guiamento efetivo. (BÉDUER et al., 2011; MOBASSERI, 2013; JACCHETTI et al., 2014; MOBASSERI et al., 2015).

Técnicas de engenharia tecidual vêm sendo desenvolvidas para substituir os implantes já existentes. Entre os requisitos iniciais desejados para um novo material a ser desenvolvido estão o suporte à proliferação axonal, baixa antigenicidade (capacidade de formar anticorpos), suporte à vascularização, porosidade para permissão da difusão do oxigênio, e que ele não se comprima a longo prazo. Além disso, o material deve ser de fácil preparo e esterilização e simples para realizar o implante.

A biocompatibilidade de um composto refere-se à habilidade do mesmo servir como substrato que suporta o comportamento celular apropriado, incluindo a promoção de sistemas sinalizadores moleculares e mecânicos auxiliando na regeneração do nervo, sem evocar qualquer efeito indesejado em células neurais e tecidos, ou induzir qualquer reposta local ou sistêmica no eventual hospedeiro. A biocompatibilidade de *scaffolds* neurais pode ser avaliada a partir de três aspectos: sanguíneo, histológico e mecânico. Ao entrar em contato com o sangue, o *scaffold* não deve induzir hemólise, destruir componentes do mesmo, ou levar a formação de coágulos e trombos. Histocompatibilidade refere-se ao não ocasionamento de efeitos tóxicos nos tecidos em contato com o material, especialmente teratogênese, sem

também que os tecidos induzam corrosão ou efeitos de rejeição imune no *scaffold* (GU, 2011).

Além da biocompatibilidade o *scaffold* ideal deve possuir a habilidade de controlar a sua degradação in vivo. Materiais não degradáveis, como silicone e polietileno, foram empregados para esta finalidade, o que permitiu resultados satisfatórios até certo ponto, com eventual aparecimento de efeitos tóxicos e constrição do remodelamento do nervo. Atualmente, pesquisadores tem voltado a sua atenção para a utilização de materiais degradáveis e reabsorvíveis para eliminar a necessidade de uma segunda cirurgia. Entretanto essa taxa de degradação deve ser compatível coma velocidade de regeneração do tecido, pois uma taxa muito acelerada ocasionaria numa falta de proteção aos axônios regenerados, enquanto uma velocidade muito lenta contribuiria para compressão. Portanto o *scaffold* ideal deve permanecer intacto pelo tempo necessário para que os axônios se regenerem ao longo do espaço entre os cotos e se degradem gradualmente sem ocasionar a reação de um corpo estranho (GU, 2011).

3.4. Biomateriais

Por definição, biomaterial é qualquer substância ou combinação de substâncias, naturais ou não, que não sejam drogas ou fármacos, utilizadas em aplicações biomédicas e que interagem com sistemas biológicos, que tratam, aumentam ou substituem quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (VON RECUM; LABERGE, 1995; GIL; FERREIRA, 2006).

Materiais naturais, tais como veias, fibras musculares e tendões são utilizados para construir *scaffolds*. Eles são úteis por estimular a adesão, migração, crescimento e proliferação das células, e ao mesmo tempo, inibem efeitos tóxicos devido a boa biocompatibilidade. Entretanto, podem apresentar problemas mecânicos devido a tensões criadas na região do implante, por serem materiais muito sensíveis.

Outro grupo de materiais com aplicação nesta área são os derivados de biopolímeros naturais, como colágeno, quitina e quitosona. Além destes, polímeros sintéticos biodegradáveis, como o ácido poliglicólico (PGA) e a policaprolactona (PCL), foram empregados na fabricação de *scaffolds* em engenharia de tecidos. O quadro 3.1 resume os produtos comercialmente disponíveis para o reparo do nervo periférico já aprovados.

Quadro 3.1. Alguns dispositivos aprovados pelo governo norte americano disponíveis para comercialização. Adaptado de GU, 2014.

Produto	Biomaterial	Diâmetro (d) e comprimento (L)	Tempo de degradação
Neurotube®	PGA (Ácido poliglicólico)	d = 2,3-8 mm L = 2-4 cm	6 a 12 meses
NeuraGen®	Colágeno tipo I	d = 1,5-7 mm L = 2-3 cm	36 a 48 meses
NeuroFlex™	Colágeno tipo I	d = 2-6 mm L = 2,5 cm	4 a 8 meses
NeuroMax™	Colágeno tipo I	d = 2-6 mm L = 2,5 cm	4 a 8 meses
Neurolac®	PCL	d = 1,5-10 mm L = 3 cm	16 meses
NeuroWrap™	Colágeno tipo I	d = 3-10 mm L = 2-4 cm	36 a 48 meses
NeuroMend™	Colágeno tipo I	d = 4-12 mm L = 2,5-5 cm	4 a 8 meses
Avance® Nerve Graft	ECM descelularizado derivado de nervo de cadáver doado	d = 1-5 mm L = 1,5-7 cm	N/A
Salubridge™ Nerve Cuff	PVA (Acetato de polivinila)	d = 2-10 mm L = 6,35 cm	Não degradável
AxoGuard™ Nerve Connector	Submucosa de intestino delgado porcina	d = 1,5-7 mm L = 4 cm	N/A
SaluTunnel™ Nerve Connector	PVA	d = 2-10 mm L = 6,35 cm	Não degradável

3.4.1. Polidimetilsiloxano

Tipo mais comum da categoria de polímeros sintéticos conhecidos como silicone, o polidimetilsiloxano (figura 3.7) é um elastômero biocompatível utilizado em

tratamentos médicos devido, principalmente, a sua estabilidade e inatividade no corpo humano. Além disso possui propriedades físico-químicas interessantes como transparência, permeabilidade gasosa, não toxicidade, superfície que permite funcionalização. Suas propriedades elastoméricas e rugosidade superficial podem ser controladas variando o método de polimerização (BÉDUER et al., 2012; GRISCOM et al., 2001, 2002; TSUJI et al., 2003). O primeiro relato de silicone utilizado como implante em humanos vem de abril de 1946, quando o médico Frank Lahey aplicou o material para reparar o duto biliar (COLAS; CURTIS, 2005).

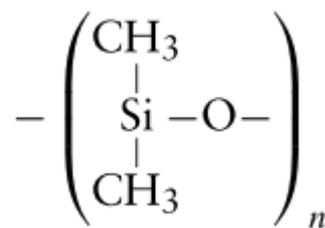


Figura 3.7. Estrutura do polidimetilsiloxano (COLAS; CURTIS, 2004).

Diversos trabalhos reportam sucesso no uso do silicone em formato de tubo para reparação do nervo, sem causar interferência no tecido adjacente. Lundborg et al publicou relato, em 1994, recuperação de função motora mais rápida e significativa em lesões de 3 a 5 mm em nervo mediano ou ulnar. Embora condutos de silicone tenham sido empregados em lesões de até 30 mm de interrupção de tecido, os melhores resultados foram obtidos com distâncias menores, com recuperação comparável ao reparo microcirúrgico de rotina. Uma preocupação recorrente no uso deste material como implante é o aparecimento de complicações devido a fibrose, causada pelo material implantado e pela compressão. Embora problemas deste gênero tenham sido relatos, estudos com procedimentos cirúrgicos exploratórios em pacientes que tiveram tubos de silicone implantados demonstraram sinais limitados de reações aos implantes (BATTISTON et al., 2005; BRAGA-SILVA, 1999; GU et al., 2011).

Na tentativa de obter resultados positivos em ferimentos com maior perda de tecido, estudos recentes têm voltado seus esforços na combinação de diferentes técnicas a utilização do silicone para reparo do nervo. Filmes com poliamida orientada longitudinalmente foram capazes de recuperar 15 mm de tecido de nervo

ciático de ratos de forma mais eficiente quando comparado a tubos de silicone sem melhoria. Outras combinações testadas, como preenchimento com solução salina com fatores de crescimento, colágeno, também obtiveram bons resultados (Gu et al, 2011). Em um desses estudos, um grupo de 30 pacientes com ferimentos no pulso ou antebraço, com idade de 12 a 72 anos que tiveram ferimentos de 3-5 mm tratados com tubo de silicone ou sutura, foram acompanhados pelo período de um ano, sem diferença estatística constatada entre os dois tipos de tratamento adotados (LUNDBORG et al, 2004).

3.4.2. Policaprolactona

Um dos polímeros sintéticos promissores e mais investigados para aplicações em implantes, a ϵ -Policaprolactona, material aprovado pela *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para uso desde em regeneração de tecido ósseo até regeneração do tecido nervoso, é um poliéster semicristalino, com baixa temperatura de transição vítrea ($T_g = -60^\circ\text{C}$), ponto de fusão de 60°C , e temperatura de decomposição de 350°C (MARIANI, 2005). Estas propriedades devem-se ao fato de possuir cadeias de carbono muito extensas e de pouca mobilidade, o que confere ao PCL propriedades mecânicas que lhe permite o uso como um bom copolímero, possuindo uma enorme elasticidade (SUN; DOWNES, 2009). Sua principal vantagem em relação ao silicone é o fato de ser biodegradável, eliminando a necessidade de uma segunda cirurgia para remoção do implante. A cadeia principal da caprolactona está apresentada na figura 3.8.

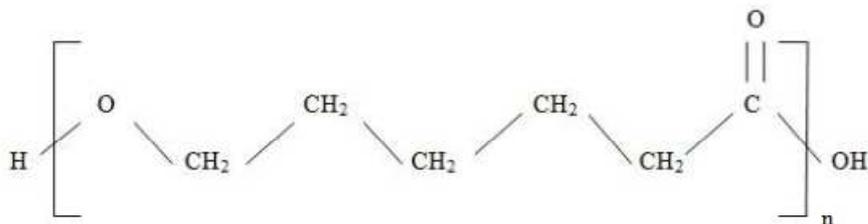


Figura 3.8. Cadeia principal da policaprolactona (TAVARES, 2011).

O PCL é suscetível a hidrólise *in vivo*, como mostrado na figura 3.9, e os produtos da degradação podem ser metabolizados via ciclo de Krebs ou eliminados diretamente por secreção renal. Esse processo ocorre, basicamente, em três etapas.

A primeira consiste na quebra da cadeia polimérica por hidrólise, que ocorre nas ligações ésteres num processo que não envolve enzimas, no entanto a hidrólise pode dar-se também devido à atuação de enzimas catalisadoras tais como a esterase e a lipase. Na segunda etapa, formam-se cadeias curtas de oligômeros, o que resulta numa perda de massa molecular do PCL; a terceira etapa implica a fagocitose do PCL pelos macrófagos. Embora a taxa de degradação dependa do tamanho, peso molecular e cristalinidade do *scaffold*, é um material de lenta degradação, levando cerca de 24 meses para se romper, por isso é indicado para implantes de longa duração (Salgado, 2011).



Figura 3.9. Esquema da hidrólise do poliéster.

Sua forma comercial aprovada pelo FDA, o Neurolac®, um copolímero com o poli(ácido láctico), é o único material transparente para implante, com recuperação de lesões de 1,5-3 mm em sua primeira versão liberada em 2003, e de 4-10 mm na liberação de 2005. A combinação dos dois materiais acelera o processo de degradação do implante e minimiza os efeitos dos ácidos produzidos na degradação do PLA, que poderiam gerar processos inflamatórios. Nos estudos conduzidos durante seu processo de aprovação, obteve resultados semelhantes aos das técnicas tradicionais para ferimentos com *gap* de até 20 mm. Além disso, é o implante com maior número de informações disponíveis sobre os testes pré-clínicos entre todos os materiais aprovados para uso no reparo do nervo (KEHOE et al, 2012).

3.4.3. PLGA - Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)

O PLGA é um copolímero sintético composto das unidades monoméricas de Poli(ácido glicólico) (PGA) e poli(ácido láctico) (PLA). É um polímero biodegradável, biocompatível e bioabsorvível. Devido a essas características, esses polímeros estão bastante presentes nas pesquisas de liberação controlada de fármacos, como agentes transportadores de proteínas e até mesmo no transporte de moléculas de

DNA. Seus componentes PGA e PLA são os materiais mais preferidos na fabricação de substratos para o transplante de células na engenharia de tecidos.

O PLGA pode ser processado em várias formas e tamanhos, sendo solúvel numa vasta quantidade de solventes, incluindo os clorados, tetrahidrofurano, acetona ou acetato de etila. A presença de grupos metil no PLA o tornam mais hidrofóbico que o PGA, tornando copolímeros de PLGA ricos em PLA menos hidrofílicos, absorvendo uma quantidade menor de água e degradando mais lentamente. Devido a esse processo de hidrólise, parâmetros como a temperatura de transição vítrea e peso molecular podem se modificar com o tempo (MAKADIA; SIEGEL, 2011). Por exemplo, a diminuição da T_g (68-58°C) e da T_m (160-141°C) de copolímeros de PLGA ocorre com a redução da porção de PLA de 90 para 70% (AURAS, 2011).

A Figura 3.10 ilustra o copolímero PLGA constituído pelas suas unidades monoméricas de Poli (ácido glicólico) (PGA) e (poli(ácido láctico) (PLA). O ácido láctico apresenta maior hidrofobicidade que o ácido glicólico, como consequência os copolímeros de PLGA ricos em ácido láctico são menos hidrofílicos, absorvem menos água, e, conseqüentemente, degradam-se mais lentamente.

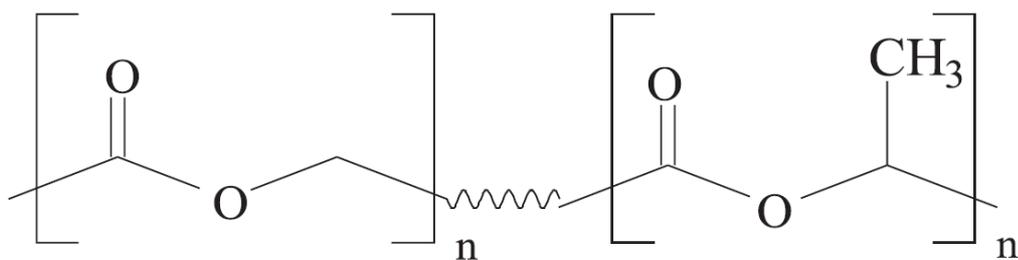


Figura 3.10. Estrutura do PLGA (BARBANTI, 2005).

A degradação do PLGA também ocorre por meio da hidrólise. A vantagem deste biopolímero está no controle da variação das proporções dos seus monômeros, pois proporções diferentes irão resultar em tempos de degradação diferentes, assim pode se escolher a proporção adequada para cada tipo de aplicação específica. Durante a hidrólise do PLGA ocorre a quebra da molécula em suas unidades monoméricas: ácido láctico e ácido glicólico. Estes são eliminados do corpo por vias metabólicas.

Assim como o PCL, o PLGA também elimina a necessidade de procedimento para remoção do implante devido a sua biodegradabilidade, por este motivo é um dos materiais extensamente investigados para confecção de tubos para regeneração do nervo. O PLGA permite a troca de nutrientes devido a sua microporosidade, é de fácil produção, apresenta baixa resposta inflamatória. Possui propriedades mecânicas que lhe conferem uma resistência no procedimento de sutura. O tipo de PLGA utilizado varia conforme o objetivo do estudo, sendo encontrados na literatura relatos de uso 50:50 (PLA:PGA) (PIQUILLOUD et al., 2007; MADDURI et al., 2010), 75:25 (Oh et al., 2008; He et al.; 2009), 85:15 (HADLOCK et al., 1999; CHANG et al., 2005) e 90:10 (CHANG et al., 2007).

3.4.4. Preparação de blendas de PCL/PLGA e aplicações

Diferentes técnicas para preparação de filmes de PCL e PLGA foram testadas. Uma alternativa é o uso do *eletro-spinning*, que permite a obtenção de fibras finas, da ordem de alguns nanômetros, permitindo a funcionalização para diferentes aplicações, propriedades mecânicas superiores e fácil processamento. Filmes de PCL/PLGA foram produzidos através desse método, comprovando que a adição de PLGA melhora as propriedades mecânicas, pois, este é mais quebradiço enquanto o PCL mais flexível. Além disso, dependendo da proporção utilizada de ambos, verifica-se melhora na biocompatibilidade, adesão e proliferação celular (THI; LEE, 2010).

A combinação das propriedades físico-químicas do PCL e do PLGA mostra-se como uma alternativa promissora na engenharia de tecidos, com potencial para fabricar morfologias de superfícies únicas, como padrões de micropontos, relativamente hidrofílicas, melhorando a adesão celular e proliferação. Testes mostraram que células de osteoblastos humanos tem bom crescimento quando esses micropontos são formados por agregados de PLGA, que ao degradarem produzem estruturas porosas, favorecendo a deposição de proteínas e biomoléculas. A proporção de PLGA adicionado a essas blendas é uma forma eficiente de controlar a adesão das células ao material (TANG; HUNT, 2006).

Devido a todas as características apresentadas, este trabalho propõe como tema de investigação a utilização de PDMS e blendas de PCL/ PLGA na produção de filmes com microestruturas de diferentes tamanhos de largura entre canais longitudinalmente alinhados, visando possível uso como condutor para guia de regeneração nervosa. Os sistemas construídos combinariam os benefícios da técnica de guiamento do crescimento celular através da microestruturação com as propriedades inerentes a cada um dos materiais (ou combinações de materiais) empregados na confecção dos mesmos, visando criar uma alternativa para o tratamento de ferimentos do nervo periférico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

No quadro 4.1 são apresentados os reagentes utilizados na confecção dos filmes de blendas de PCL/PLGA e PDMS.

Quadro 4.1. Reagentes utilizados.

Reagentes	Marca
PLGA Comercial – PLGA (85:15 - Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)	PURAC
Policaprolactona (Mn 80,000)	Aldrich Chemistry
Clorofórmio	Synth
Solução tampão fosfato salino (PBS)	Merck
Sylgard® 184 Silicone Elastomer KIT	Sylgard

O PLGA foi armazenado em *freezer* (-8 a -15 °C) dentro de tubos *schlenks* sob atmosfera de nitrogênio.

4.2. Métodos

4.2.1. Molde microestruturado

Para confecção dos filmes microestruturados foi utilizado molde de silício (figura 4.1) fabricado pelo processo de fotolitografia no *Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux* (CIRIMAT) e cedido pela pesquisadora da *Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne* (EPFL), Dra. Amelie Bédier. Possui cerca de 8 cm de largura por 2,5 cm de comprimento e conta com quatro diferentes estruturas de canais microestruturados que variam em sua largura entre 5-20 μm , sendo que todos os canais tem 25 μm de altura. Cada uma dessas microestruturas está distribuída no formato de um retângulo de 0,9 x 1,2 mm.

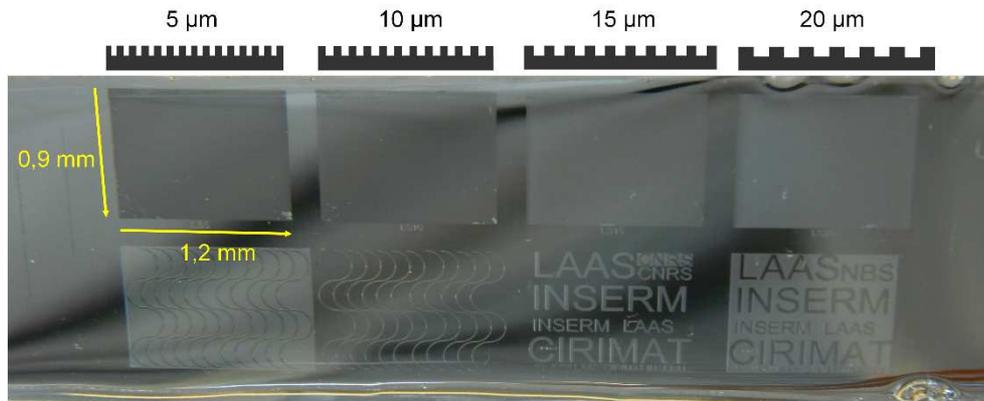


Figura 4.1. Molde de silício microestruturado.

4.2.2. Preparação dos filmes de PDMS

Os filmes de silicone foram preparados a partir da mistura da solução base de oligômeros de PDMS com o agente de cura (10:1) do KIT Sylgard® 184 Elastomer, a qual foi distribuída sobre a superfície do molde (Figura 4.1) e deixada sob ação do vácuo para remoção de eventuais bolhas. O material é, então, levado a estufa a 100°C por 30 minutos. Após resfriamento, o filme é removido do molde, com auxílio de um cortador e pinça.

4.2.3. Preparação dos filmes de PCL e PCL/PLGA microestruturados e lisos

Através da técnica da evaporação do solvente foram preparados filmes com as blendas de PCL/PLGA de diferentes razões: 100, 90/10, 80/20 e 70/30 (esquema de fluxograma da figura 4.2). Todas as misturas foram solubilizadas em clorofórmio (10% m/v), deixadas em ultrassom de 40 kHz (Unique, modelo USC-1600) à temperatura ambiente por 3 horas e posteriormente distribuídas sob a superfície do molde de silício. Após a lenta evaporação do solvente em temperatura ambiente os filmes foram removidos com auxílio de pinça. Também foram preparados filmes lisos (sem microestruturas) utilizando-se placas de petri de vidro (5,5 cm de diâmetro) como molde e com as mesmas condições entre as blendas de PCL/PLGA utilizados para a confecção dos filmes microestruturados.

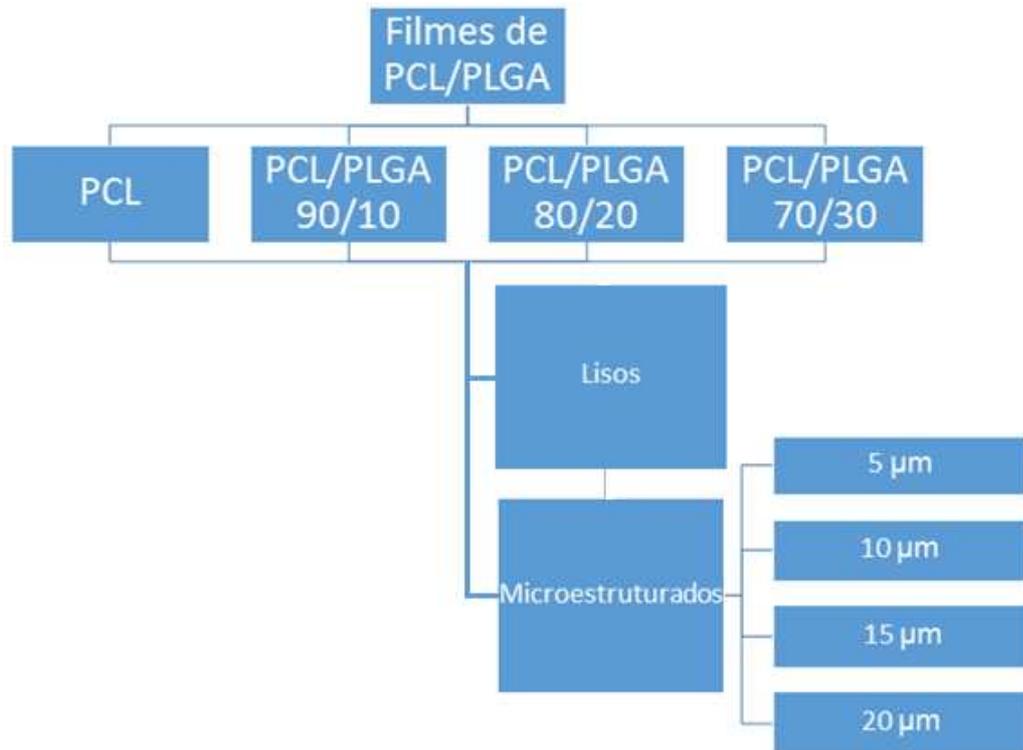


Figura 4.2 Fluxograma de tipos de filmes preparados a partir de misturas de PCL/PLGA.

4.2.4. Ensaios de degradação hidrolítica

O ensaio de degradação *in vitro* dos filmes foi realizado com base na norma ASTM F1635 - 11 (2011). Este ensaio destina-se a auxiliar a avaliação da taxa de degradação (perda de massa) e as alterações no material ou propriedades estruturais, ou ambos, de materiais poliméricos utilizados em implantes cirúrgicos que sofrem hidrólise.

Os filmes foram cortados em círculos de 0,5 cm de diâmetro e colocados em tubos falcon contendo 5 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) à 37 °C em equipamento com termostato com agitação de 60 rpm. O equipamento utilizado para realizar o ensaio de degradação é uma mesa agitadora, modelo MA-140/CF - Marconi, com controle da temperatura e níveis de agitação.

As amostras foram feitas em triplicata e retiradas após 7, 14, 28, 45 e 90 dias. Após, cada período, as amostras foram retiradas da incubadora e lavadas com água destilada para retirada de resíduos de sais. Em seguida, foram feitas a pesagem de

massa úmida. Após a secagem sob vácuo, foram pesadas novamente até obterem um valor de massa constante.

O aferimento da espessura de cada filme foi realizado antes e depois da degradação em um medidor digital de espessura (MDE), marca Hanatek, modelo nº 8020. Foram aferidas dez vezes a espessura de cada filme para a redução da incerteza estatística.

O pHmetro utilizado neste trabalho foi o de marca Digimed e modelo DM-20.

4.3. Técnicas de caracterização

As caracterizações dos filmes de PDMS e PCL/PLGA preparados foram analisadas pelas técnicas de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA), Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e microscopia de força atômica (AFM), com o intuito de verificar a morfologia, propriedades térmicas e estruturais do material obtido.

4.3.1. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As estruturas moleculares dos materiais confeccionados foram determinada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com o objetivo de verificar a obtenção do material desejado por meio da identificação das ligações químicas dos grupos funcionais presentes nos polímeros. As amostras foram analisadas utilizando um acessório de ATR (acessório de refletância atenuada). Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos em equipamento Perkin-Elmer modelo Spectrum 100 no intervalo de região de 4000 a 650 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando-se amostras em forma de filme de espessura de 200 à 300 μm .

4.3.2. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise da superfície das amostras é necessária para identificar a formação das microestruturas alinhadas longitudinalmente na superfície dos filmes de PDMS, PCL e PCL/PLGA e posteriormente para avaliação dos efeitos da degradação das estruturas confeccionadas, um dos objetivos deste trabalho.

As análises foram feitas num Microscópio Eletrônico de Varredura por emissão de campo (MEV-FEG) no modo de elétrons secundários (SE) equipado também com um equipamento FEI Inspect F50 com auxílio de Espectrômetro de Raios-X por Energia Dispersa (EDS). Todas as amostras foram preparadas na forma de filme e metalizadas com ouro. As imagens de MEV-FEG foram realizadas no Laboratório de Microscopia e Microanálises (LaCEMM da PUCRS).

4.3.3. Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas (TGA), foram realizadas para verificar a estabilidade térmica das amostras de PCL/PLGA. As análises de TGA e DSC foram feitas no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica - LAMAT na UFRGS, utilizando o aparelho SDT Q600 TA Instruments no Laboratório Multi-Usuários de Análises Térmicas (LAMAT) da UFRGS. As amostras de PCL e PCL/PLGA foram aquecidas de 20 a 600 °C com fluxo de Nitrogênio (100 ml.min⁻¹) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹.

4.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As temperaturas de fusão (T_m), cristalização (T_c) e entalpia de fusão (ΔH_f) dos materiais foram determinadas em um equipamento de DSC da TA Instruments, modelo Q20, em um intervalo de temperatura de 0° a 220°C. As análises de DSC foram realizadas em ciclos de aquecimento/resfriamento com taxa de 10°C/min. Pesou-se aproximadamente 4 mg de amostra em panela normal de alumínio. As T_m e ΔH_f foram obtidas no 2º ciclo de aquecimento e T_c em relação a etapa de resfriamento. As análises foram feitas em triplicada no LAMAT da UFRGS.

O grau de cristalinidade foi obtido através da equação 4.1 (QUENTAL et al, 2005):

$$\% \chi_c = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_{100\%}} \times 100 \quad 4.1$$

onde % χ_c é o grau de cristalinidade em porcentagem, ΔH_f é a entalpia de fusão das amostras obtidas por DSC e $\Delta H_{100\%}$ é a entalpia de fusão do PCL 100% cristalino, cujo valor é igual a 136 J/g (KESEL, et al, 1997).

4.3.5. Microscopia de força atômica (AFM)

A microscopia de força atômica auxilia na caracterização da morfologia das amostras, fornecendo detalhes da topografia, com medidas da rugosidade da superfície, do tamanho das microestruturas, além da distribuição de fases em blendas. As análises de AFM foram realizadas no modo de *tapping*, usando um Bruker Dimension Icon PT equipado com uma sonda Scanasyst-air (Bruker, frequência de ressonância de 70 kHz e uma constante de mola de 0,4 N/m). O equipamento foi calibrado antes das medições de amostras. A área varrida nas imagens foi de 10 x 10 μm^2 com uma resolução de 512 linhas por área (LabCEMM/PUCRS).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Preparação e caracterização dos filmes de PDMS

Neste trabalho, filmes de PDMS contendo canais microestruturados foram preparados. Este material foi escolhido por ser um padrão entre os implantes fabricados para reparação do nervo, possibilitando uma comparação com os produtos disponíveis na atualidade. Foram empregados moldes de silício utilizando a metodologia de mistura da solução base de oligômeros com agente de cura. A figura 5.1 mostra o aspecto dos filmes produzidos, sendo possível diferenciar visualmente as áreas com os quatro tipos diferentes de microestruturas produzidas a partir de cada filme fabricado.



Figura 5.1. Filme de PDMS com microestruturas de diferentes tamanhos de canais.

A morfologia das amostras preparadas foi analisada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) a fim de verificar a similaridade dos filmes preparados com o molde utilizado. A figura 5.2 mostra que foram obtidas estruturas

longitudinalmente alinhadas na superfície do material, com diferentes larguras entre os canais, com valores próximos aos do molde: a) 5 μm ; b) 8,84 μm ; c) 13,5 μm e d) 18,65 μm . Também é possível observar que a largura na parte mais profunda do canal é igual a largura da parte mais alta. Imagens do corte lateral dos filmes (figura 5.3) comprovam que todos possuem a mesma altura, em torno de 24 μm , independente da variação da distância entre os canais. Desta forma, apenas o efeito da largura do canal influenciará em estudos futuros para constatação de qual membrana promove um melhor crescimento celular durante o processo de regeneração.

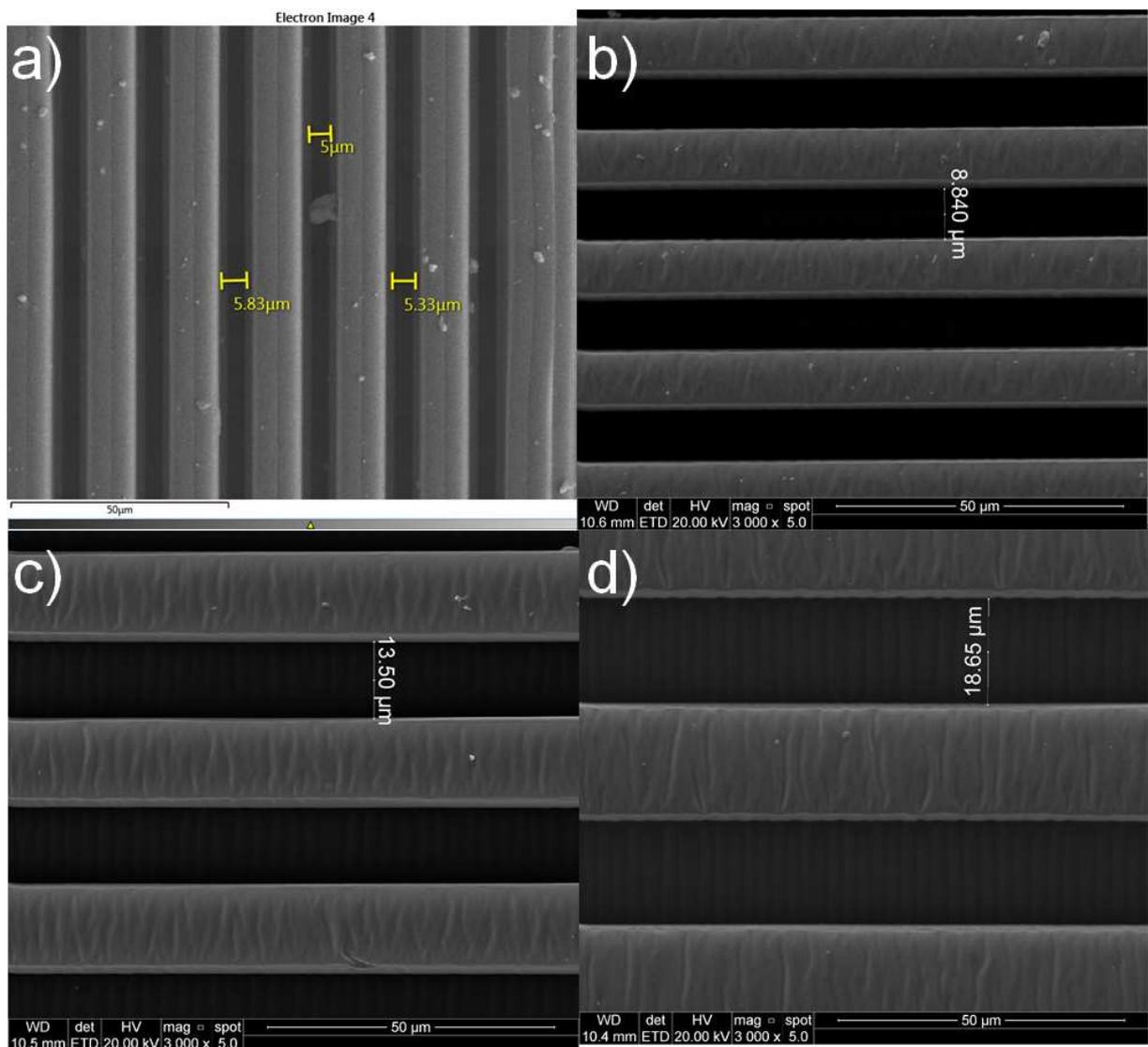


Figura 5.2. Imagens de MEV de filmes de PDMS com microestruturas obtidas a partir de moldes com diferentes tamanhos de canais do molde: a) 5 μm ; b) 10 μm ; c) 15 μm e d) 20 μm .

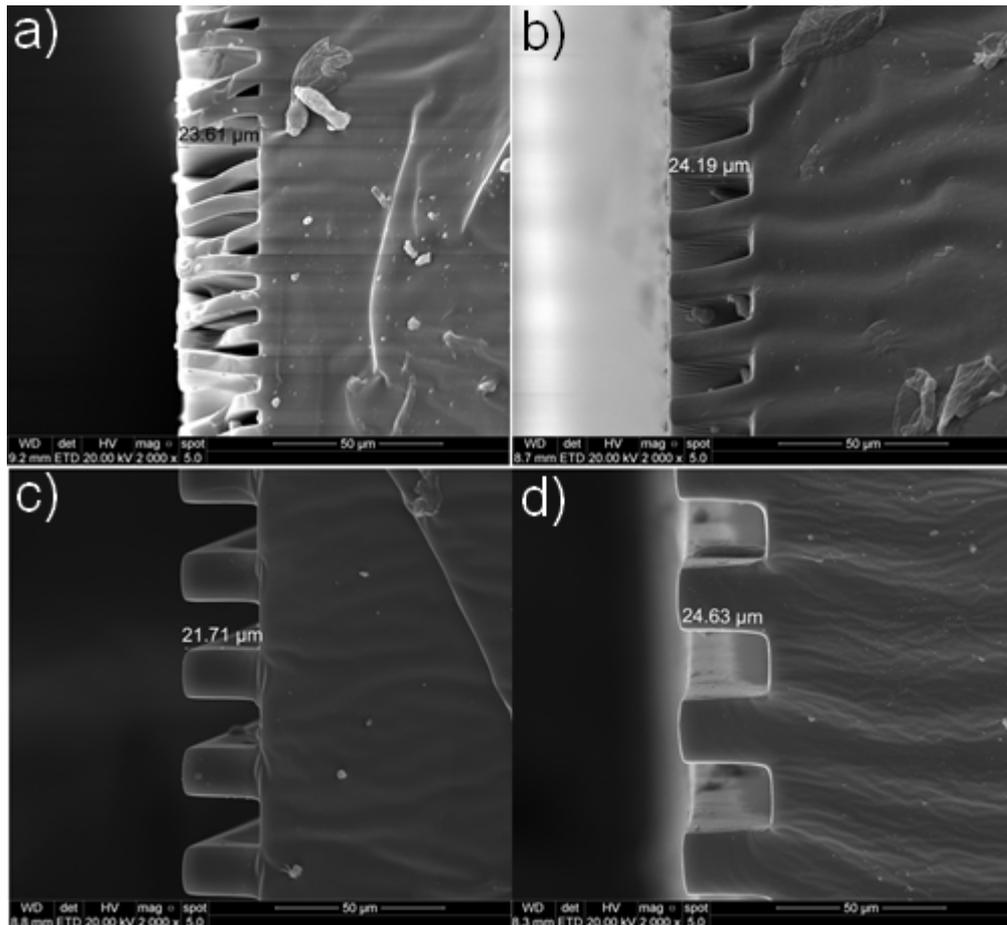


Figura 5.3. Imagens de MEV dos cortes laterais dos filmes de PDMS com microestruturas obtidas a partir de diferentes tamanhos de canais do molde: a) 5 μm ; b) 10 μm ; c) 15 μm e d) 20 μm .

Esses resultados indicam que a técnica empregada para a fabricação dos filmes se mostrou conveniente, pois é rápida, simples e de alta reprodutibilidade, resultando em filmes microestruturados numa área de aproximadamente 1 cm^2 . A espessura do filme produzido foi controlada através da pesagem da massa de mistura adicionada ao molde antes do aquecimento em estufa. Não foi verificada diferença nas estruturas dos filmes produzidos neste trabalho em comparação aos produzidos por outras técnicas, como *spin-coating* (BÉDUEUR et al., 2011; JACCHETTI et al., 2014).

5.2. Preparação e caracterização dos filmes de PCL/PLGA

Os filmes com as blendas de PCL/PLGA lisos e microestruturados foram obtidos pelo método de evaporação do solvente, conforme descrito no item 4.2.2 deste trabalho. A figura 5.4 mostra o aspecto visual dos filmes. Apesar da

opacidade do material, ainda é possível diferenciar as quatro diferentes áreas microestruturadas nas superfícies dos filmes produzidos por evaporação no molde (Figura 5.4 item a).

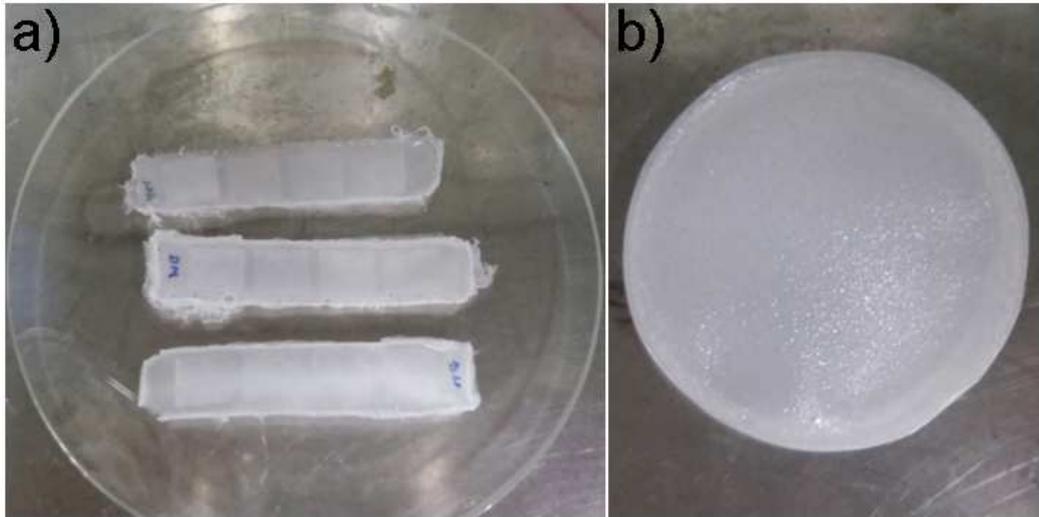


Figura 5.4. Filmes de PCL e PCL/PLGA: a) filmes produzidos em molde microestruturado e b) filme produzido em placa de petri (liso).

Assim como os filmes de PDMS, os filmes de PCL apresentaram canais com dimensões compatíveis com as do molde de silício utilizado para sua fabricação, como mostra a figura 5.5, que detalha as larguras de filmes de PCL. Através da técnica escolhida para realizar os experimentos, foram obtidos os seguintes resultados aproximados de largura dos canais: a) 5,4 μm ; b) 10 μm ; 13,9 μm e d) 20,1 μm .

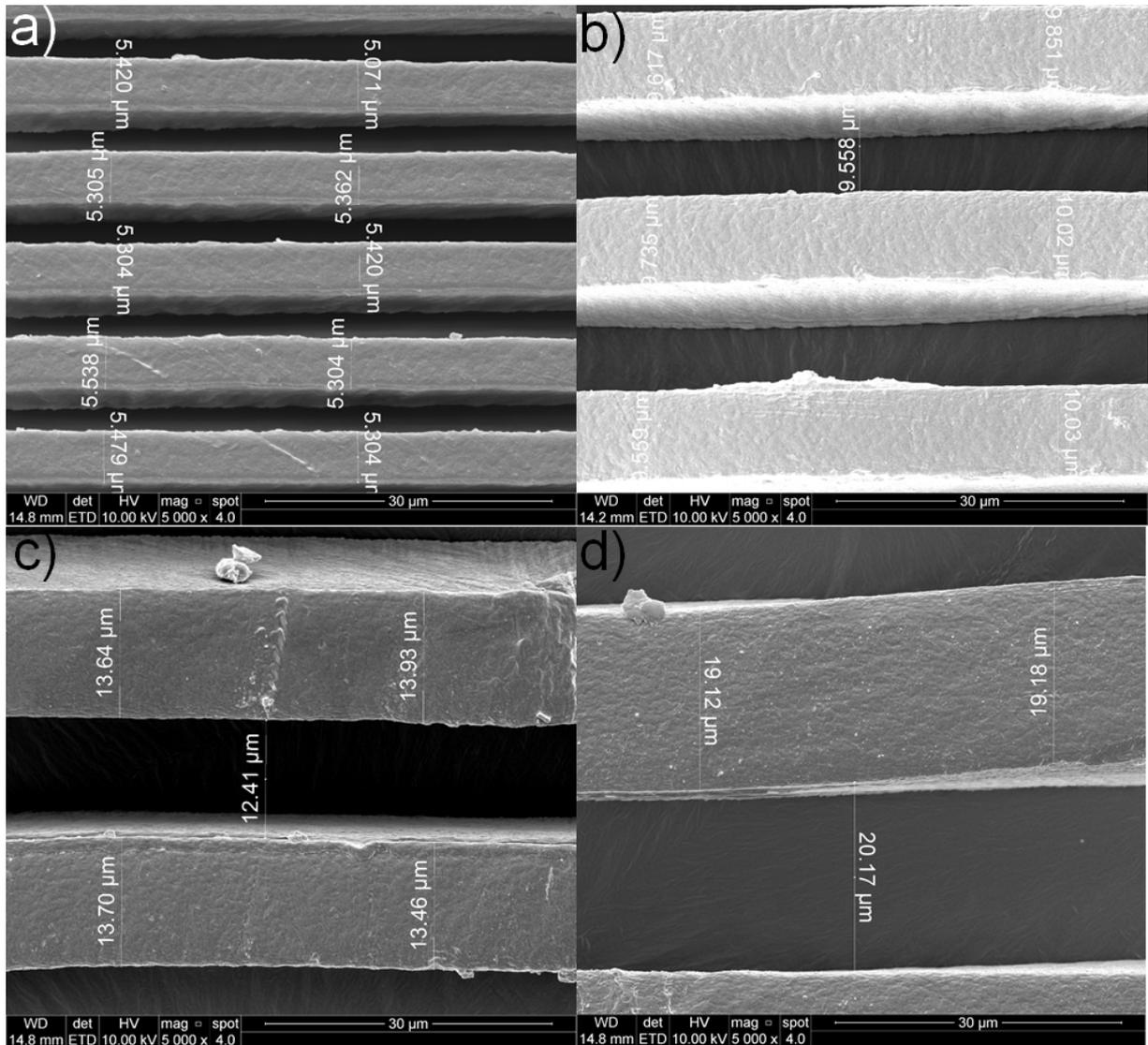


Figura 5.5. Imagens de MEV mostrando as larguras dos canais em filmes de PCL produzidos com molde de silício microestruturado: a) 5 μm ; b) 10 μm ; c) 15 μm e d) 20 μm .

Nas imagens de microscopia eletrônica de varredura foi possível observar a formação de domínios esferulíticos na superfície dos filmes lisos, como mostra a figura 5.6 itens a e b, em diferentes ampliações. Além disso, na mesma figura, é possível perceber que os filmes produzidos por evaporação no molde microestruturado, itens c e d, também apresentam tais domínios esferulíticos, portanto, a microestruturação não afeta o padrão de crescimento das fibrilas e a formação dos esferulitos.

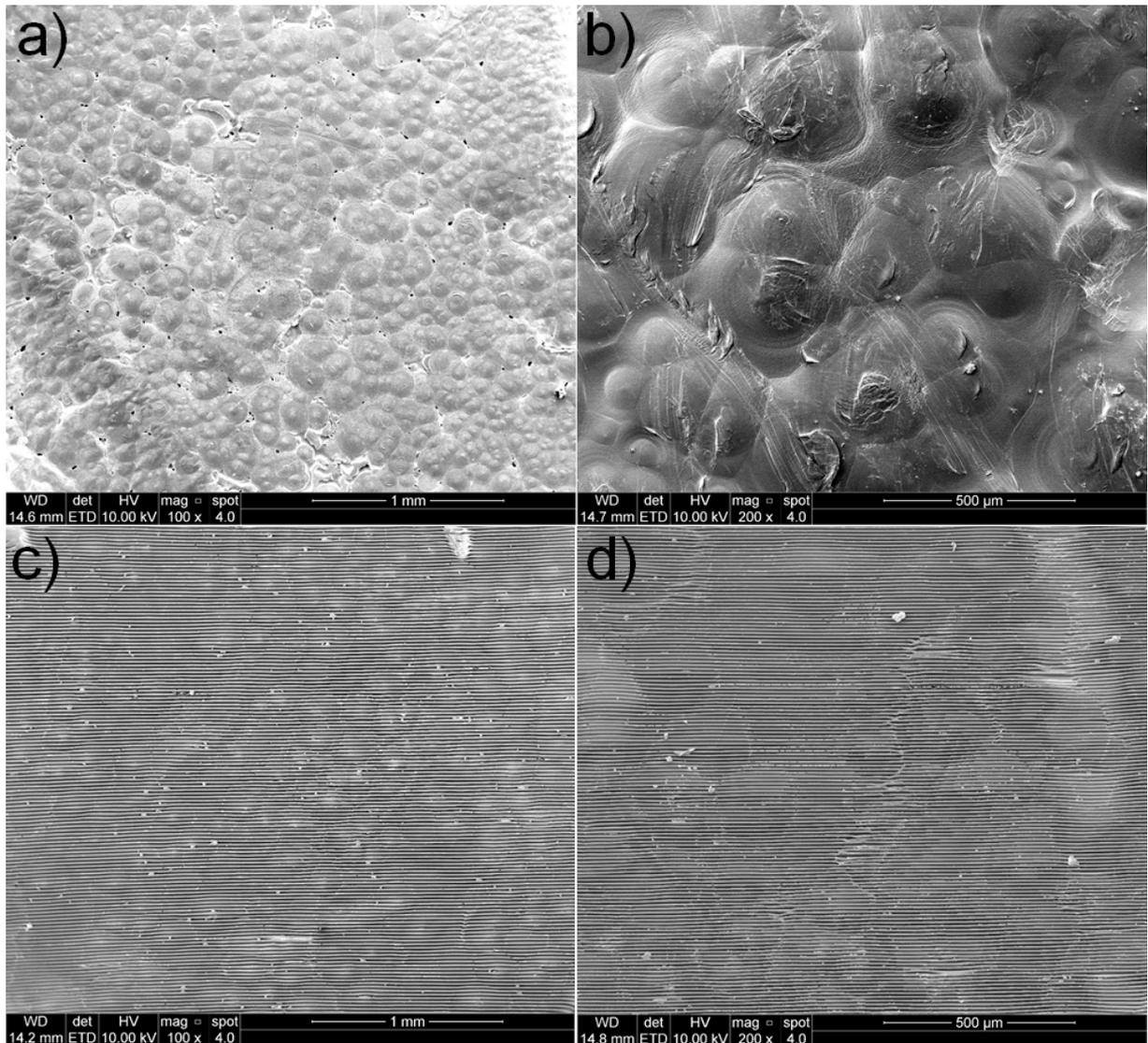


Figura 5.6. Imagens de MEV mostrando a estrutura dos esferulitos em filmes de PCL: a) e b) mostram a formação dos domínios nos filmes lisos enquanto c) e d) nos filmes microestruturados.

A morfologia dos filmes é modificada conforme a variação da razão entre as quantidades de polímeros que constituem a blenda é alterada (TANG; RHODES; HUNT, 2007). Quando apenas policaprolactona é utilizada observa-se a formação de esferulitos, estruturas típicas dos polímeros semicristalinos, nas quais as fibrilas cristalinas dos polímeros crescem radialmente em direção de um núcleo, dando origem a agregados cristalinos de formato esferoidal (ALVES, 2009).

A adição de PLGA na confecção dos filmes de matriz majoritária de PCL, independentemente da proporção utilizada, altera esse padrão de crescimento e ordenamento dos esferulitos. Isto ocasiona o desaparecimento do ordenamento

radial da microesfera formada (Figura 5.7), e aparecimento de novas estruturas de conglomerados de microesferas de formato arredondado e aparência mais lisa. Resultados similares foram observados em filmes de PCL/PLGA produzidos pelo método de evaporação utilizando PLGA 65:35, nos quais essa aparência mais lisa fica ainda mais acentuada, com o desaparecimento da ponta no centro das esferas (TANG; CALLAGHAN; HUNT, 2005).

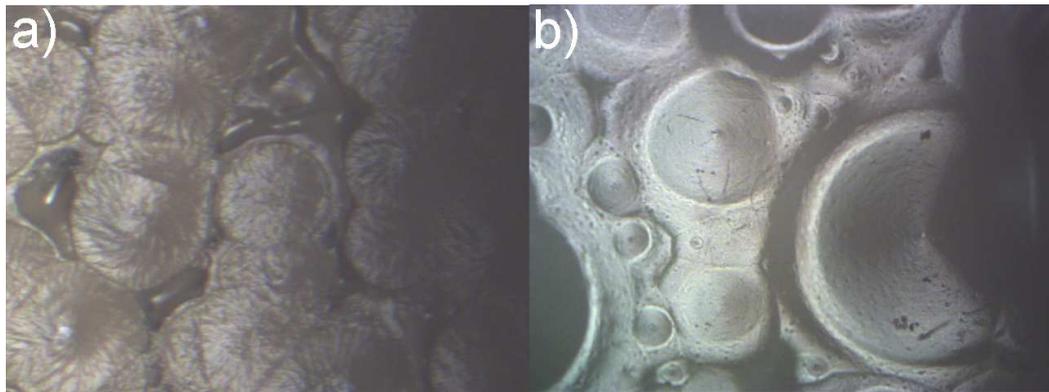


Figura 5.7. Microscopia óptica comparando filmes de PCL/PLGA: a) PCL puro; b) PCL/PLGA 80:20.

Além disso, o PLGA aparece na forma de pontos ou círculos, que ficam maiores conforme a proporção de PLGA adicionado aumenta de 10 para 20%, como mostra a figura 5.8. Isso indica uma limitação na quantidade de PLGA adicionado, que tende a formar agregados maiores ao invés de se dispersar na matriz polimérica.

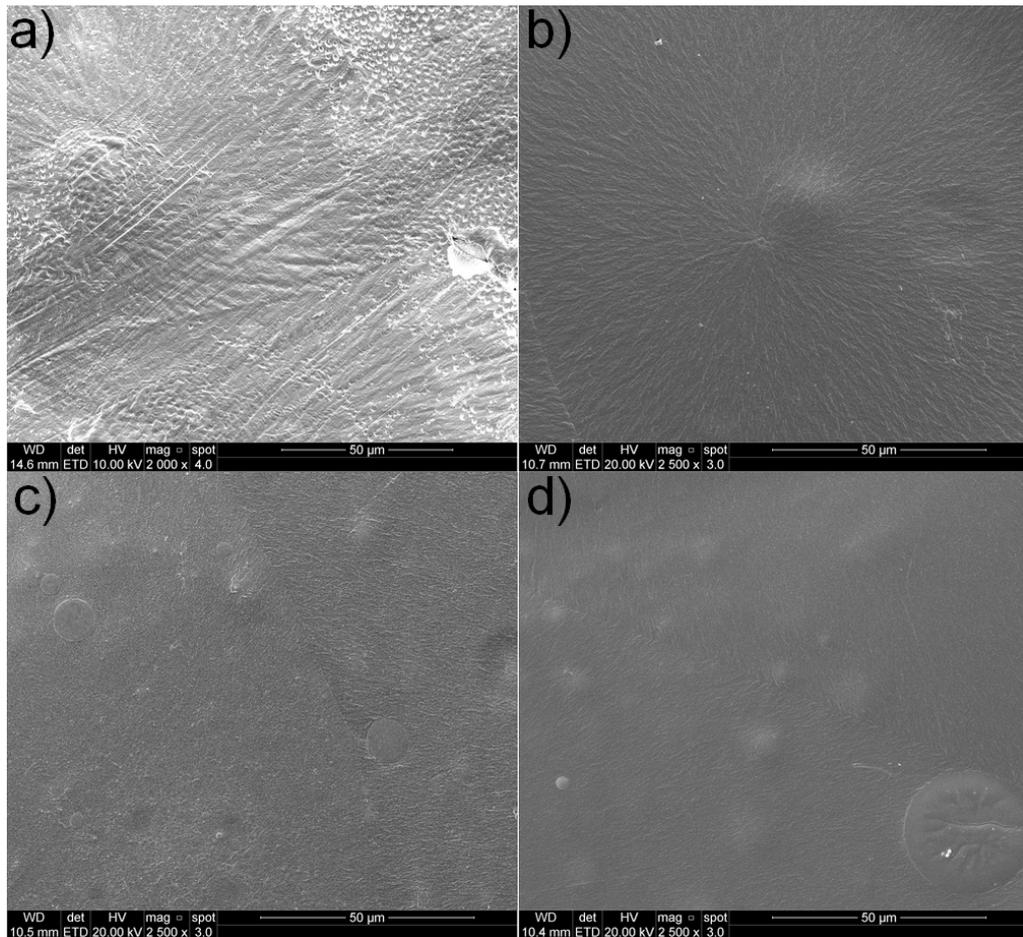


Figura 5.8. Imagens de MEV comparando filmes de PCL/PLGA: a) PCL puro; b) PCL/PLGA 90:10; c) PCL/PLGA 80:20; d) PCL/PLGA 70:30.

As imagens de AFM (figura 5.9) mostram na amostra de PCL puro o crescimento ordenado das fibrilas do polímero, que também podem ser observados na imagem de PCL/PLGA 90:10, formando reentrâncias na superfície, com pequenas ondulações. Os poros verificados na figura 5.9 item b podem ser provenientes do processo de evaporação do solvente na fabricação dos filmes. Estas estruturas se formam naturalmente, mesmo com a utilização de outros solventes, e por elas se iniciará o processo de degradação do material (SUN; DOWNES, 2009). Já na figura c realizada com amostra de PCL/PLGA 70:30 é possível identificar o aparecimento de estruturas esféricas aglomeradas, resultantes da adição de PLGA a blenda. Ao observar a figura 5.10 de AFM da mesma amostra abrangendo uma região maior, constata-se que esses aglomerados estão dispersos na matriz polimérica.

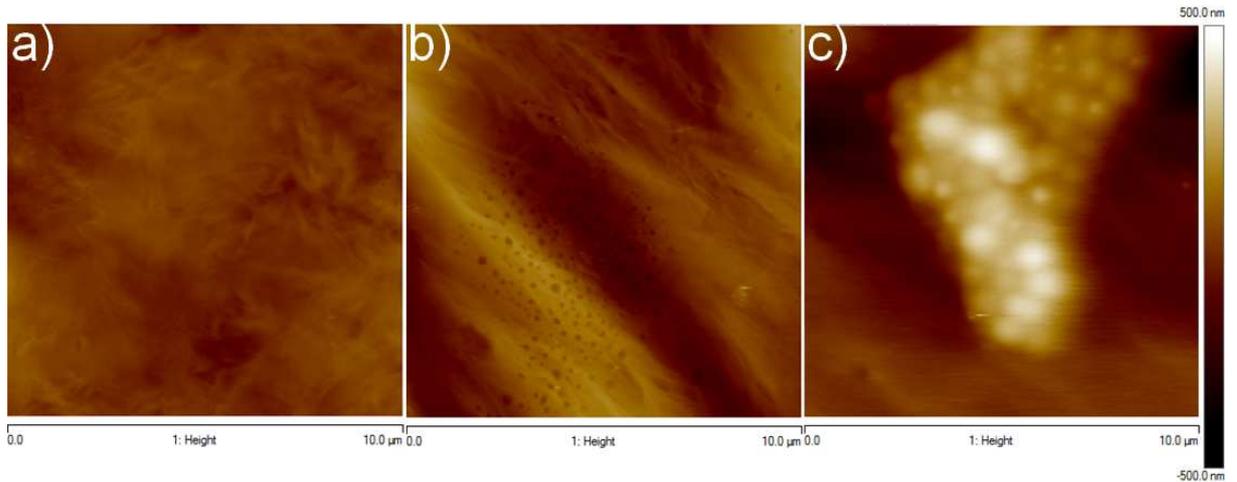


Figura 5.9. Comparação entre Filmes de PCL/PLGA por AFM: a) PCL puro; b) PCL/PLGA 90:10; c) PCL/PLGA 70:30.

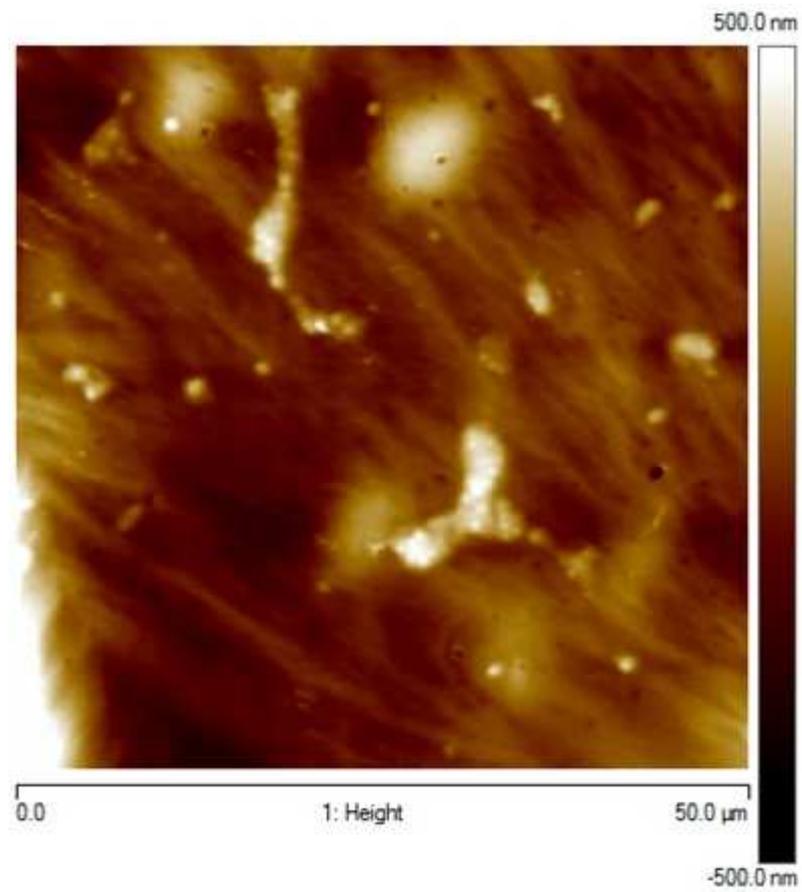


Figura 5.10. Imagem de AFM de amostra de PCL/PLGA 70:30.

Foram obtidas através da técnica de AFM os valores de rugosidade quadrática média (R_q), que acentua o efeito dos valores que se afastam da média e rugosidade média (R_a) (ALVES, 2011). A partir dos dados apresentados na tabela

5.1 é possível perceber a tendência de aumento da rugosidade com adição de PLGA à mistura. Isso se deve ao formato esférico dos agregados de PLGA que surgem na superfície da amostra.

Tabela 5.1. Medidas de rugosidade das blendas de PCL/PLGA.

Amostras	Rq (nm)	Ra (nm)
PCL 100:0	36	28
PCL/PLGA 90:10	91	76
PCL/PLGA 70:30	132	93

As propriedades térmicas dos sistemas poliméricos preparados foram avaliadas TGA. A figura 5.11 apresenta o perfil de degradação com o aumento da temperatura dos filmes de PCL e blendas de PCL/PLGA 90:10, 80:20 e 70:30.

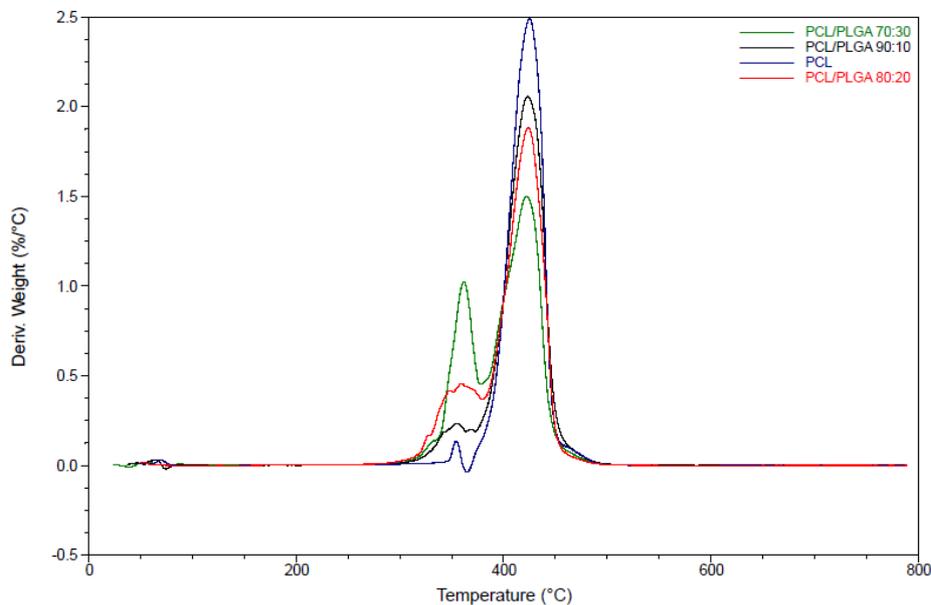


Figura 5.11. DTGA dos sistemas poliméricos.

O filme de PCL puro apresentou maior estabilidade térmica quando comparado aos sistemas em que houve adição de PLGA. Quanto maior a quantidade de PLGA adicionado às blendas, menor a estabilidade térmica, comportamento já esperado devido a menor temperatura de fusão do PLGA quando

comparado ao PCL. As curvas termogravimétricas dos materiais mostram que todos os sistemas preparados possuem boa estabilidade térmica até a temperatura de 300°C, com acentuada perda de massa entre 300 a 450 °C. Este fenômeno relaciona-se a quebra das cadeias dos polímeros, resultando em resíduos que variaram entre 0,10 e 2%.

É possível observar a ocorrência de dois eventos de degradação térmica nas amostras de blendas de PCL/PLGA, um em torno de 300°C decorrente da degradação do PLGA, que ocorre numa única etapa, e outro que inicia por volta de 370°C proveniente da degradação do PCL. No caso do PCL puro, embora estudos indiquem que a degradação do PCL ocorre em apenas uma única etapa (AOYAGI, 2002), Persenaire et al (2001) sugeriu a existência de duas etapas na degradação desse material realizando estudos de TGA de alta resolução simultaneamente acoplado a um espectrômetro de massa e FTIR. De acordo com seus resultados, a primeira etapa do mecanismo consiste na ruptura aleatória das cadeias de poliéster por reação de eliminação cis, produzindo H₂O, CO₂ e ácido 5-hexanóico. A segunda etapa consiste no processo de despolimerização no fim das cadeias com grupos hidroxila para formar a ε-caprolactona. Embora esses estudos tenham sido realizados com diferentes técnicas, ele demonstra que sinais dessa divisão de etapas podem ser encontrados em análise pela técnica convencional de TGA, dependendo das condições, como fluxo do gás e taxa de aquecimento, do experimento.

As curvas termogravimétricas dos materiais mostram que todos os sistemas preparados possuem boa estabilidade térmica até a temperatura de 300°C, com acentuada perda de massa entre 300 a 450°C. Este fenômeno relaciona-se a quebra das cadeias dos polímeros, resultando em resíduos que variaram entre 0,10 e 2%.

As análises de DSC (tabela 5.2) mostraram que não existe variação significativa na temperatura de fusão (T_m) das blendas produzidas, quando comparada a característica do PCL puro. Entretanto é possível observar a diminuição do grau de cristalinidade ($\%X_c$) das amostras conforme adição do PLGA, por este se tratar de um polímero amorfo.

Tabela 5.2.Dados calorimétricos das blendas de PCL/PLGA.

Amostras	T _m (°C)	ΔH _f (J/g)	%X _c
PCL 100:0	53	62	46
PCL/PLGA 90:10	53	59	43
PCL/PLGA 80:20	52	56	41
PCL/PLGA 70:30	53	46	34

A espessura dos filmes preparados foi aferida a fim de padronizar a confecção dos filmes preparados, para que este fator não influenciasse no processo de degradação. Foram realizadas dez medições na superfície de cada amostra para reduzir os erros eventuais. A tabela 5.3 resume os valores das médias das espessuras das amostras. O controle desse parâmetro é dificultado devido a viscosidade da solução de PCL/PLGA, ocasionando a perda de substância na troca do recipiente de preparação para o molde ou placa de petri na qual é evaporado.

Tabela 5.3.Medidas de espessura das blendas de PCL/PLGA.

Amostras	Espessura (μm)
PCL 100:0	320 ± 22
PCL/PLGA 90:10	280 ± 33
PCL/PLGA 80:20	269 ± 10
PCL/PLGA 70:30	170 ± 13

5.3. Ensaios de degradação

Foram realizados ensaios de degradação com os sistemas poliméricos PCL/PLGA. Estes ensaios tem como finalidade comparar o comportamento das diferentes blendas preparadas em relação aos tempos de degradação. Em cada

período de degradação (7, 14, 28, 45 e 90 dias) as amostras em triplicatas foram secas e pesadas até a obtenção da massa constante. A porcentagem da perda de massa foi calculada utilizando a equação 5.1. (LI; CHANG, 2005):

$$\text{Perda se massa} = \left(\frac{P_0 - P_T}{P_0} \right) \times 100 \quad (5.1)$$

Onde P_0 = peso da massa antes do teste de degradação e P_T = peso da massa seca após cada tempo de degradação.

Em ensaios de degradação, o processo de erosão do polímero pode-se dividir em erosão volumica e erosão superficial. No primeiro, a cisão da cadeia polimérica ocorre ao longo da amostra e a redução do peso molecular ocorre a partir do início do processo de degradação, enquanto que a perda de massa normalmente ocorre posteriormente. Enquanto isso, na superfície, ocorre perda de tamanho e massa desde o início, porém sem alteração de peso molecular e propriedades mecânicas. Nesse processo a taxa relativa a perda de massa é proporcional a área superficial (DE BOER, 2008). Isso indica que a perda de massa observada no início do ensaio deve-se, provavelmente, ao processo de erosão superficial.

Na comparação entre ensaios *in vivo* e *in vitro*, além do processo de degradação hidrolítica, outro fator que acarreta na perda de peso molecular é a influência dos radicais livres de oxigênio e de outras espécies geradas pelas células inflamatórias. Normalmente mais rápidos, os processos de degradação *in vivo* ainda contam com a contribuição dos transportes passivos de monômeros e oligômeros por dissolução e difusão, e ainda transporte ativo por fagócitos (DE BOER 2008).

O mecanismo de perda de massa do PCL varia de acordo com diversos fatores. Amostras de PCL com grau de cristalinidade alto apresentam menor taxa de degradação, devido a organização de suas cadeias. Outro fator importante é o tamanho e a homogeneidade dos esferulitos presentes na superfície da amostra, pois quanto maiores e mais desorganizados, mais rápido ocorre a degradação (MOCHIZUKI et al, 1995; JANG et al, 1997; CHO et al, 2003; HOU et al, 2007). Além disso, o tamanho e a espessura da amostra influenciam na quantidade de água que penetra na amostra acelerando o processo de hidrólise (BOLGEN, 2005). Isso

explica as diferenças encontradas na comparação de estudos com o mesmo material. Por exemplo, Aires (2012) não reportou perda de massa durante as primeiras 6 semanas de ensaio com filmes de PCL produzidos por eletrofição, enquanto que Tang et al (2006) constataram perda de aproximadamente 1% para filmes de PCL em ensaio de degradação de 7 dias.

A figura 5.12 apresenta o gráfico comparando o comportamento de perda de massa das matrizes lisas e microestruturadas produzidas somente com PCL que foram submetidas à degradação. É possível perceber que não há tendência de mudança significativa de comportamento entre as amostras do mesmo grupo (lisas e microestruturadas preparadas com mesma concentração) para o mesmo tempo de degradação. As variações encontradas na perda de massa entre os períodos observados podem ser explicados pela forma com PCL degrada, iniciando pela fase amorfa, seguida pela redução do tamanho da cadeia molecular e da fase cristalina antes de perder massa. Entretanto, esse grupo de amostras foi o que obteve os maiores valores de desvio padrão, dificultando a comparação entre os resultados. Uma das possíveis causas foi a obtenção da massa final das amostras a partir de medidas das amostras secas a temperatura ambiente, que mesmo após a secagem sob vácuo poderiam acumular certa umidade alterando a massa final medida.

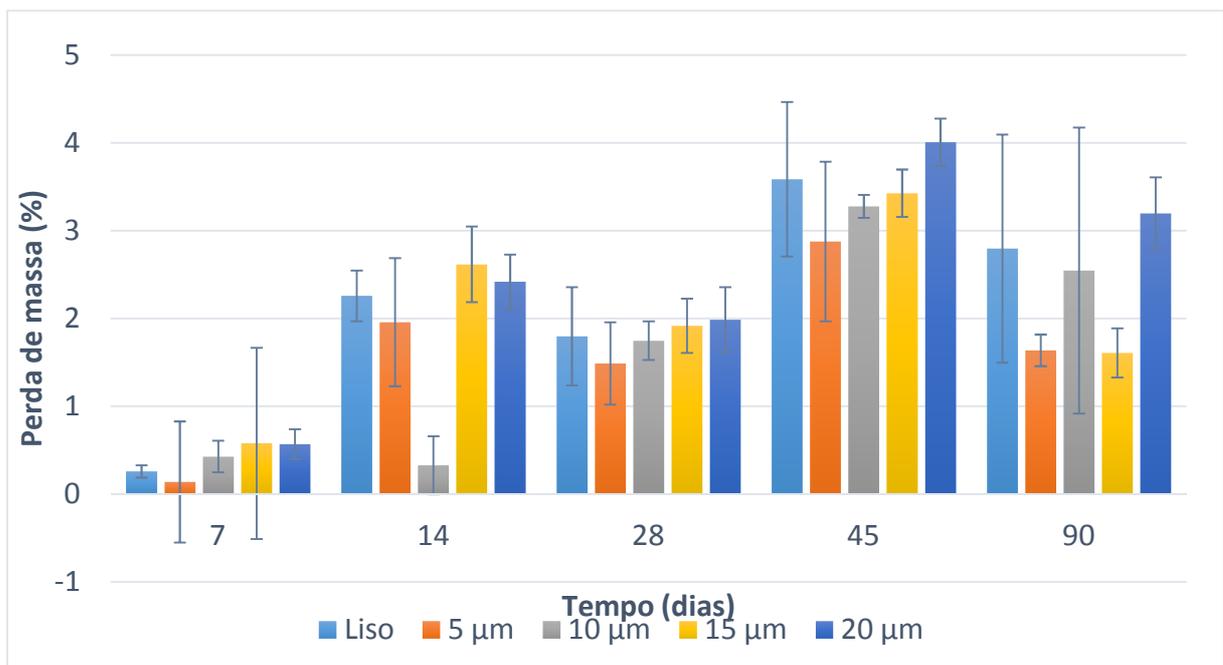


Figura 5.12. Gráfico do comportamento de perda de massa em função do tempo de filmes de PCL.

Os diferentes filmes preparados com a blenda de PCL/PLGA 90:10 (figura 5.13) apresentam a mesma tendência de não modificação da perda de massa para amostras de um mesmo tempo, entretanto os valores para os cinco tempos avaliados foram maiores em comparação com os resultados obtidos do PCL puro. Em geral, utiliza-se a proporção dos polímeros adicionados à blenda para controlar o balanço entre as propriedades hidrofílicas e hidrofóbicas e sua parte amorfa e cristalina, obtendo taxas de degradação que podem variar de meses até anos (LUCCHESI et al 2008). O PLGA (85:15) naturalmente tem maior taxa de degradação que o PCL, acelerando o processo conforme é adicionado as blends. Novamente, o tempo de 45 dias de degradação foi o que apresentou a maior perda de massa em comparação aos demais tempos estudados.

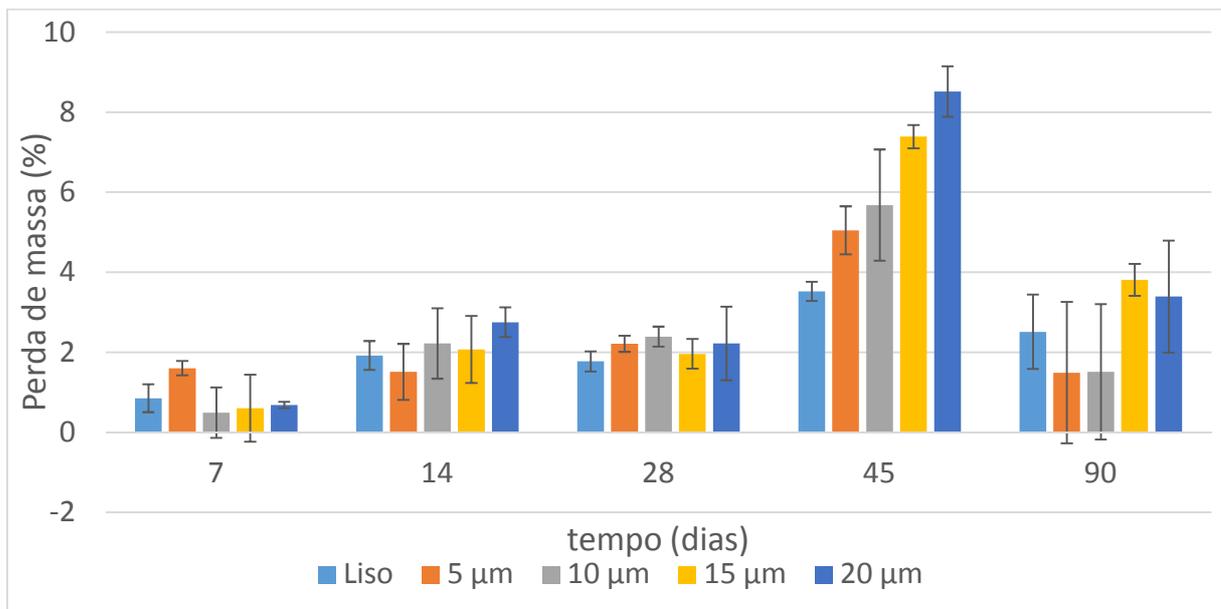


Figura 5.13. Gráfico do comportamento de perda de massa em função do tempo de filmes de PCL/PLGA 90:10.

No grupo de amostras preparadas com PCL/PLGA 80:20 um comportamento diferente foi verificado para o tempo de degradação de 14 dias, conforme dados apresentados na figura 5.14, indicando um ganho de massa ao invés de perda conforme processo de degradação. Este fato pode ser explicado pelo acúmulo de sais da solução de PBS na qual a amostra fica imersa durante o ensaio, nos poros formados durante a degradação da porção de PLGA do filme. Estes sais podem ter permanecido mesmo após processo de lavagem. Tal comportamento **já** foi verificado

em ensaios de degradação com a utilização de meio de cultura, que fornecem um ambiente complexo com a presença de proteínas e aminoácidos, entre outros componentes, que mostraram a tendência de se acumular nos primeiros dias de degradação, ocasionando um comportamento de ganho para posterior perda de massa, dentro do período de 28 dias de degradação (TANG; HUNT, 2006).

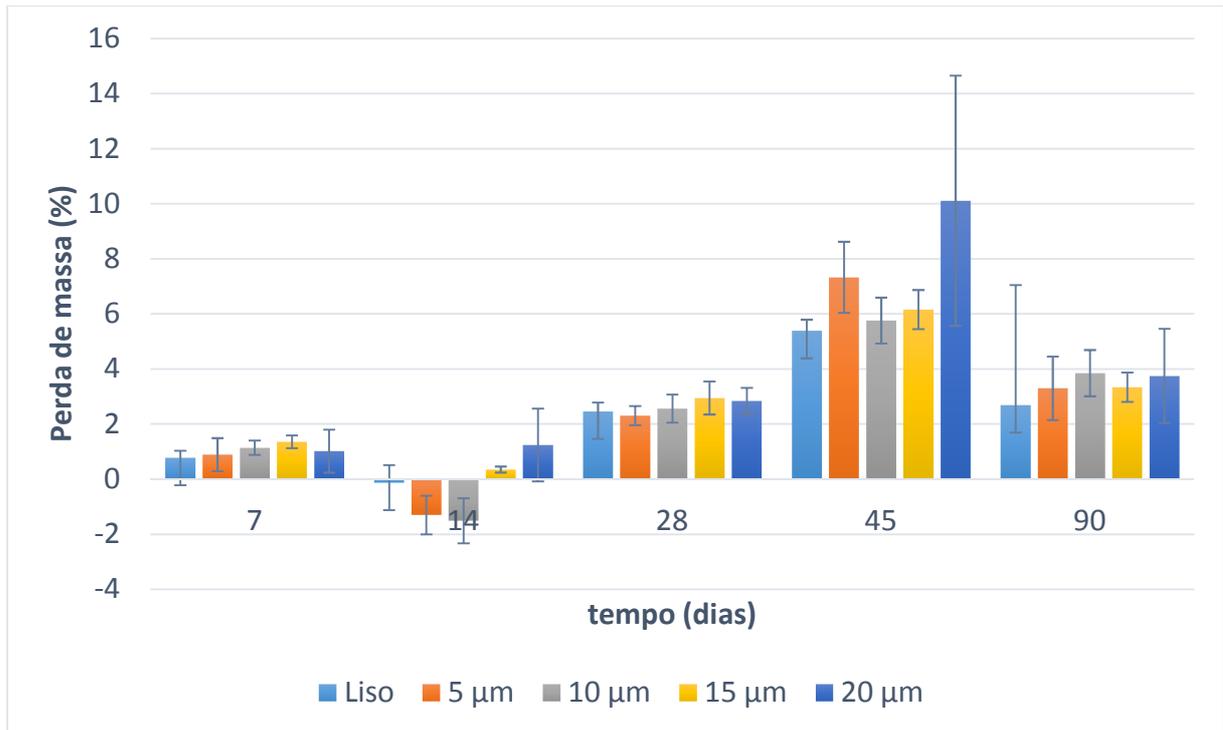


Figura 5.14. Gráfico do comportamento de perda de massa em função do tempo de filmes de PCL/PLGA 80:20.

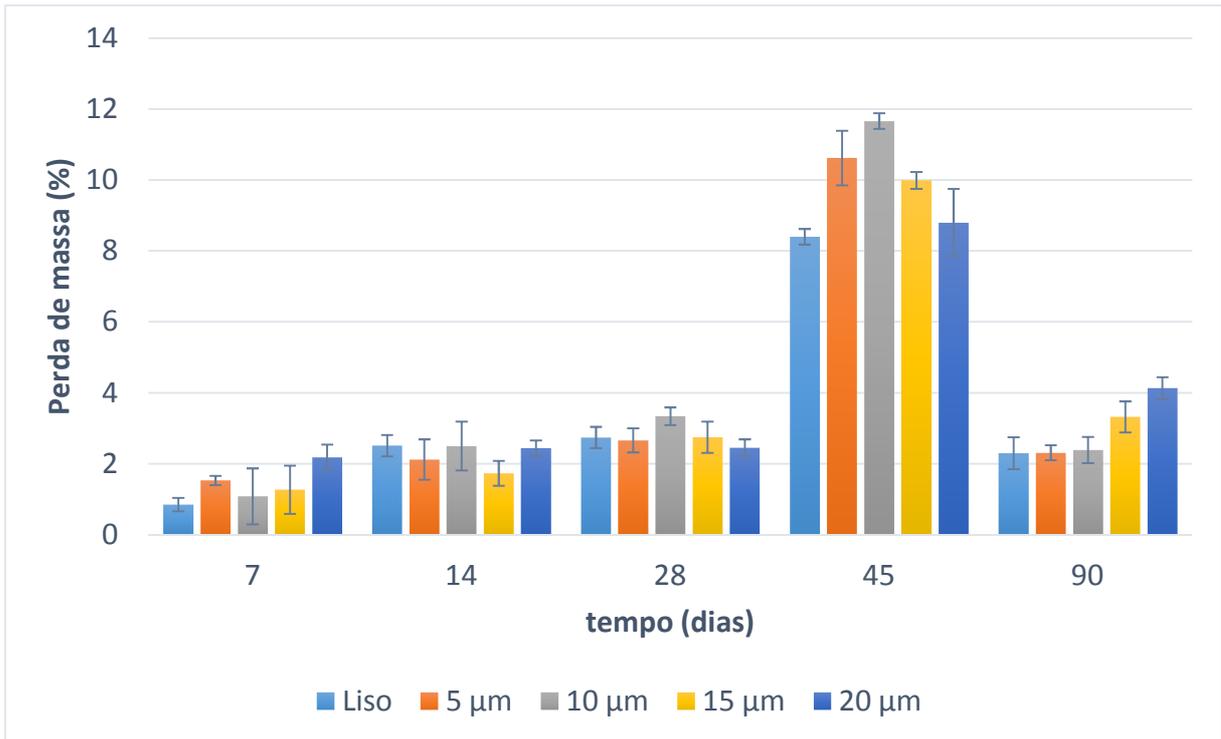


Figura 5.15. Gráfico do comportamento de perda de massa em função do tempo de filmes de PCL/PLGA 70:30.

O comportamento de perda de massa das amostras preparadas de PCL/PLGA 70:30 pode ser observado no gráfico apresentado na figura 5.15. Novamente observa-se que não existe uma tendência definida com relação a perda de massa para amostras de mesma composição e com microestruturas de diferentes tamanhos para um mesmo tempo de degradação. Ao contrário do ensaio com amostras de PCL/PLGA 80:20 não foram observados valores negativos (ou seja, ganho de massa) para as amostras de 14 dias. Novamente observa-se uma perda maior de massa nas amostras submetidas ao ensaio no tempo de 45 dias em comparação as de 90 dias, comportamento já discutido nos parágrafos anteriores.

A figura 5.16 resume o comportamento de perda de massa das amostras fazendo uma comparação apenas com relação à composição das blendas preparadas. Nela fica evidente a tendência de aumento do processo da degradação conforme o PLGA é adicionado a mistura, nos tempos de 7, 28 e 45 dias. Devido ao comportamento diferenciado de parte das amostras para o tempo de 14 dias de degradação, já discutido anteriormente, não foi possível perceber a mesma tendência para este grupo, necessitando que um novo estudo de degradação seja realizado para a mesma. Para amostras de 90 dias de ensaio, foi verificada a

mesma tendência dos ensaios anteriores, entretanto de forma não tão acentuada, como nas amostras de 45 dias.

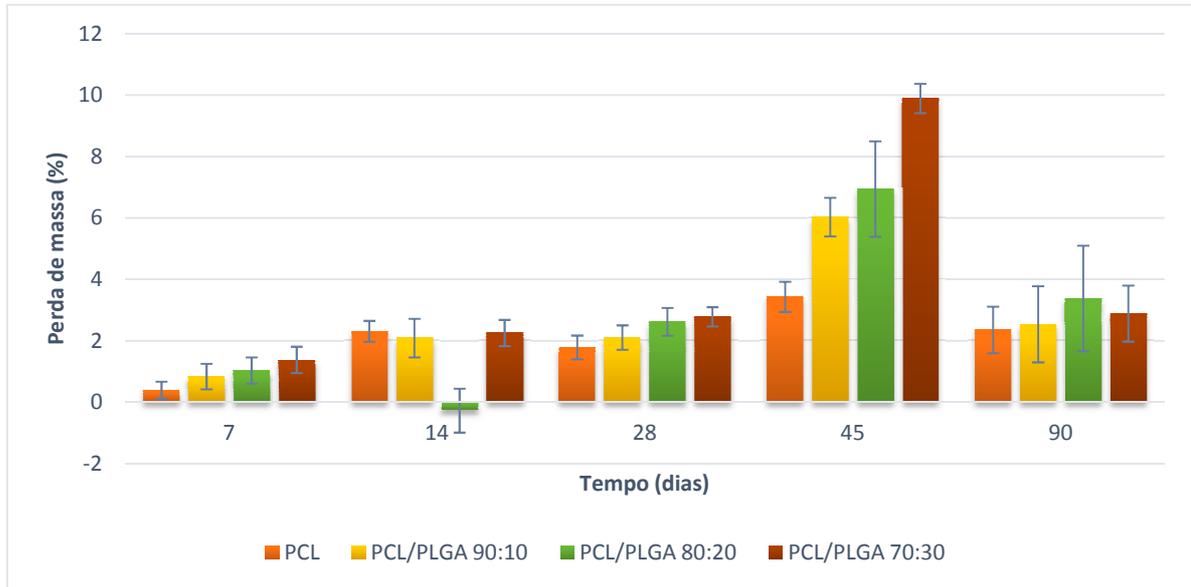


Figura 5.16. Gráfico do comportamento geral de perda de massa em função do tempo de filmes de PCL/PLGA.

Uma possível explicação para a diminuição da perda de massa das amostras no período de 90 dias quando comparadas ao grupo de 45 dias, é o acúmulo de sais nas amostras de 90 dias, mesmo após o processo de lavagem, como mostra a figura 5.17. Devido ao tempo de exposição dos filmes a solução de PBS e ao aumento da porosidade do material com o processo de degradação, essas estruturas se acumularam na superfície de alguns filmes, ocasionando num aumento da massa quando na pesagem das amostras, indicando que não houve perda de massa na comparação com o valor medido antes do ensaio.

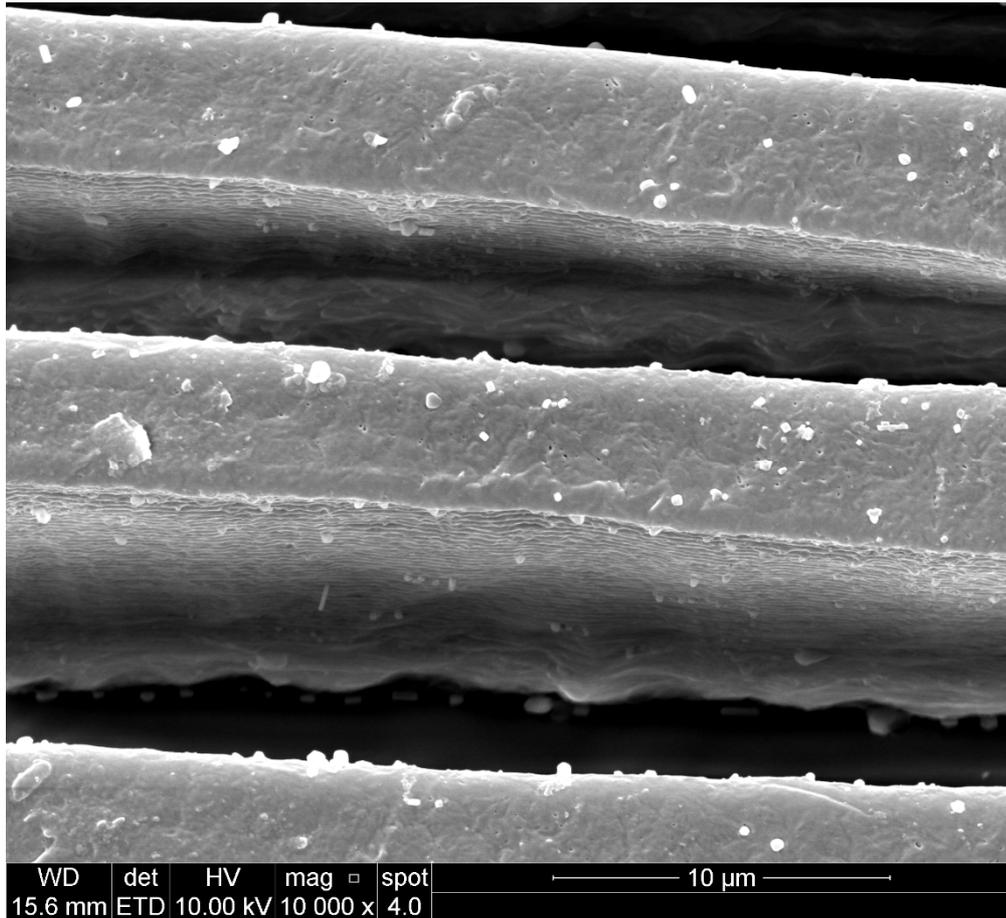


Figura 5.17. Imagem de MEV de filme de PCL/PLGA 90:10 após tempo de degradação de 90 dias em que se observa acúmulo de sais após lavagem.

Os filmes de PCL e PCL/PLGA degradados foram analisados pela técnica de ATR/FT-IR, importante ferramenta na caracterização de polímeros, fornecendo informações sobre composição, estrutura conformacional e forças interatômicas associadas às ligações de valência ou interações moleculares. Na figura 5.18 estão destacadas as principais bandas que caracterizam os polímeros utilizados.

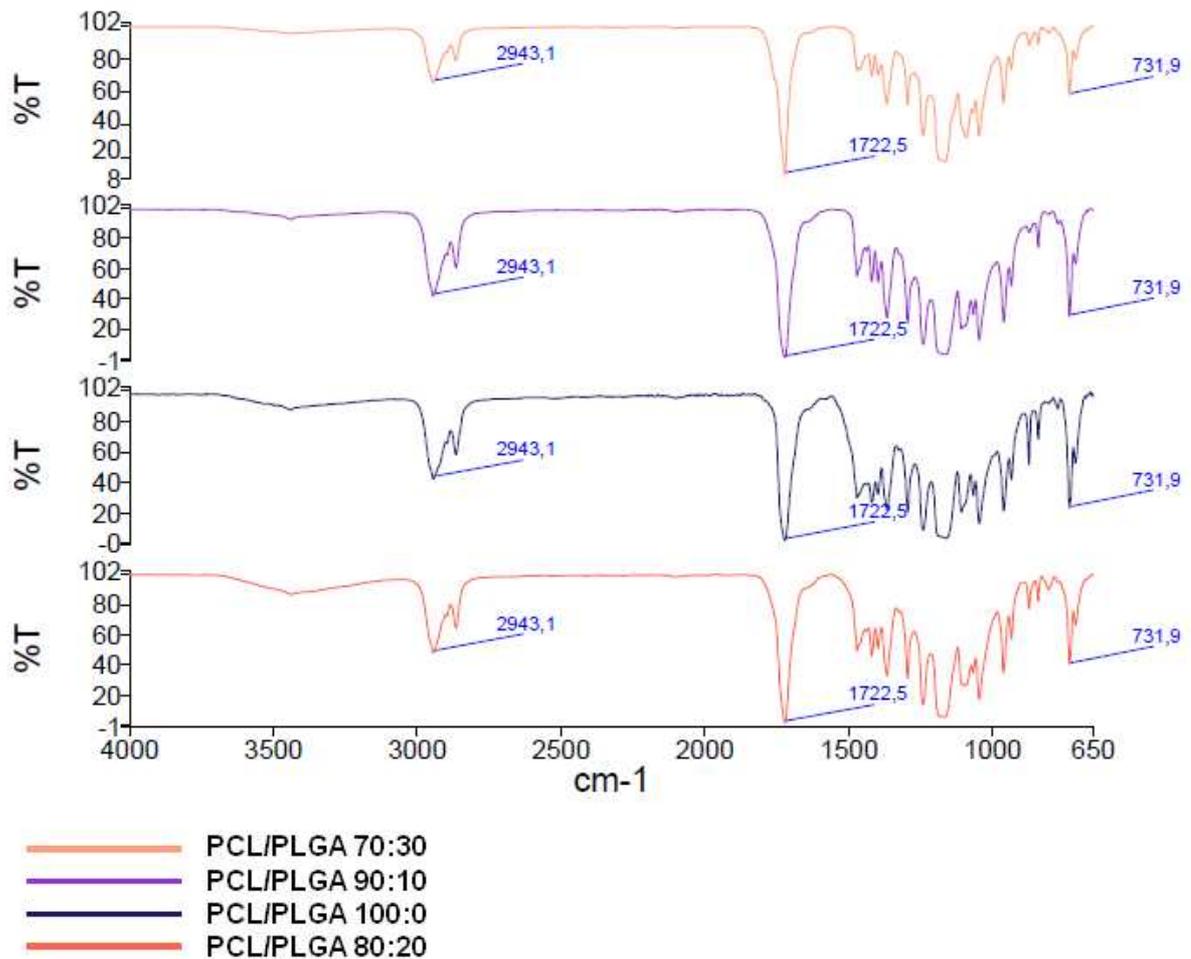


Figura 5.18. Espectro dos filmes de PCL e blendas de PCL/PLGA.

As bandas características das deformações axiais assimétricas de CH e CH₂ podem ser observadas em 2943,1 cm⁻¹, enquanto as deformações axiais simétricas podem ser observadas em 2865 cm⁻¹. Em 1722,5 cm⁻¹ é possível observar um intenso pico que corresponde a deformação axial da carbonila (C=O) do grupo éster, principal característica do PLGA e do PCL. Em 1470 cm⁻¹ observa-se a deformações angulares simétricas do plano das ligações CH e CH₂. O sinal em 1240 cm⁻¹ se refere as vibrações de deformação axial de C-O do éster, que correspondem a duas vibrações assimétricas acopladas C—C(=O)—O e O—C—C (CUNHA, 2012). O sinal por volta de 731,9 cm⁻¹ refere-se à ligação C-Cl indicando presença de clorofórmio na amostra.

É possível constatar possíveis efeitos da degradação nos filmes de PCL através da comparação entre as imagens de MEV-FEG das amostras de filmes com canais de 5 μm antes e após o ensaio de degradação, como mostra a figura 5.19.

Observa-se o surgimento de poros nas regiões da amostra destacadas ao longo da superfície do material, com eventual surgimento de alguns poros de maior diâmetro, que poderiam ser resultado do processo de degradação dos filmes.

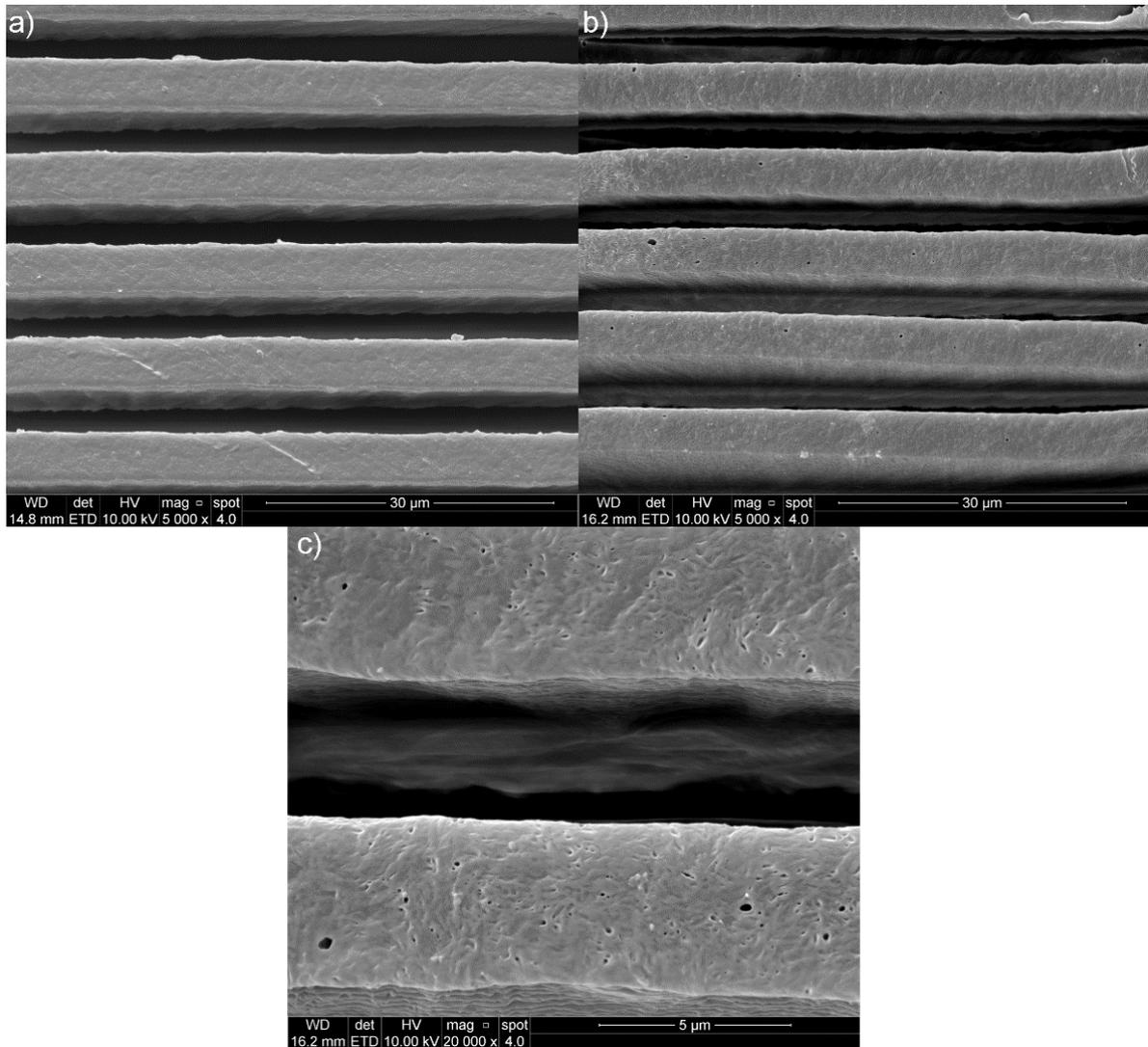


Figura 5.19. Imagens de MEV de filmes microestruturados em molde com canais de 5 µm: a) PCL puro antes da degradação, b) e c) PCL puro após degradação de 90 dias.

Imagens de micrografia eletrônica de varredura dos filmes de PCL/PLGA com diferentes concentrações (figuras 5.20, 5.21 e 5.22), comparando amostras antes da degradação e após período de 90 dias de ensaio, indicam o aparecimento de pequenos poros na matriz, que podem ser resultado do início do processo de degradação da porção de PLGA do filme. Esse processo de degradação teria início nas regiões porosas resultantes do processo de fabricação dos filmes e pontos de acúmulo de PLGA.

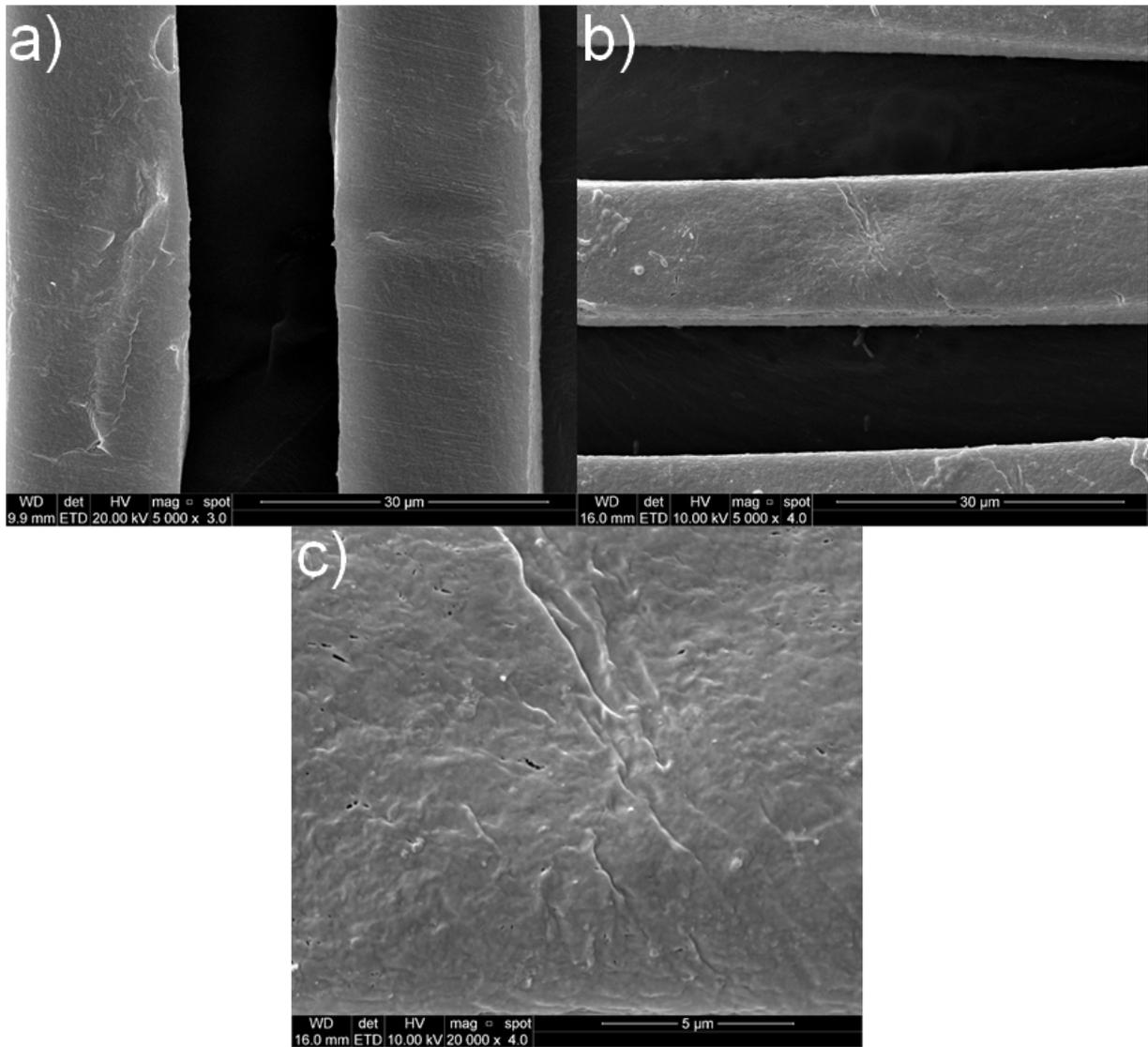


Figura 5.20. Imagens de MEV de filmes de PCL/PLGA 90:10 microestruturados em molde com canais: a) antes da degradação, b) e c) após degradação de 90 dias.

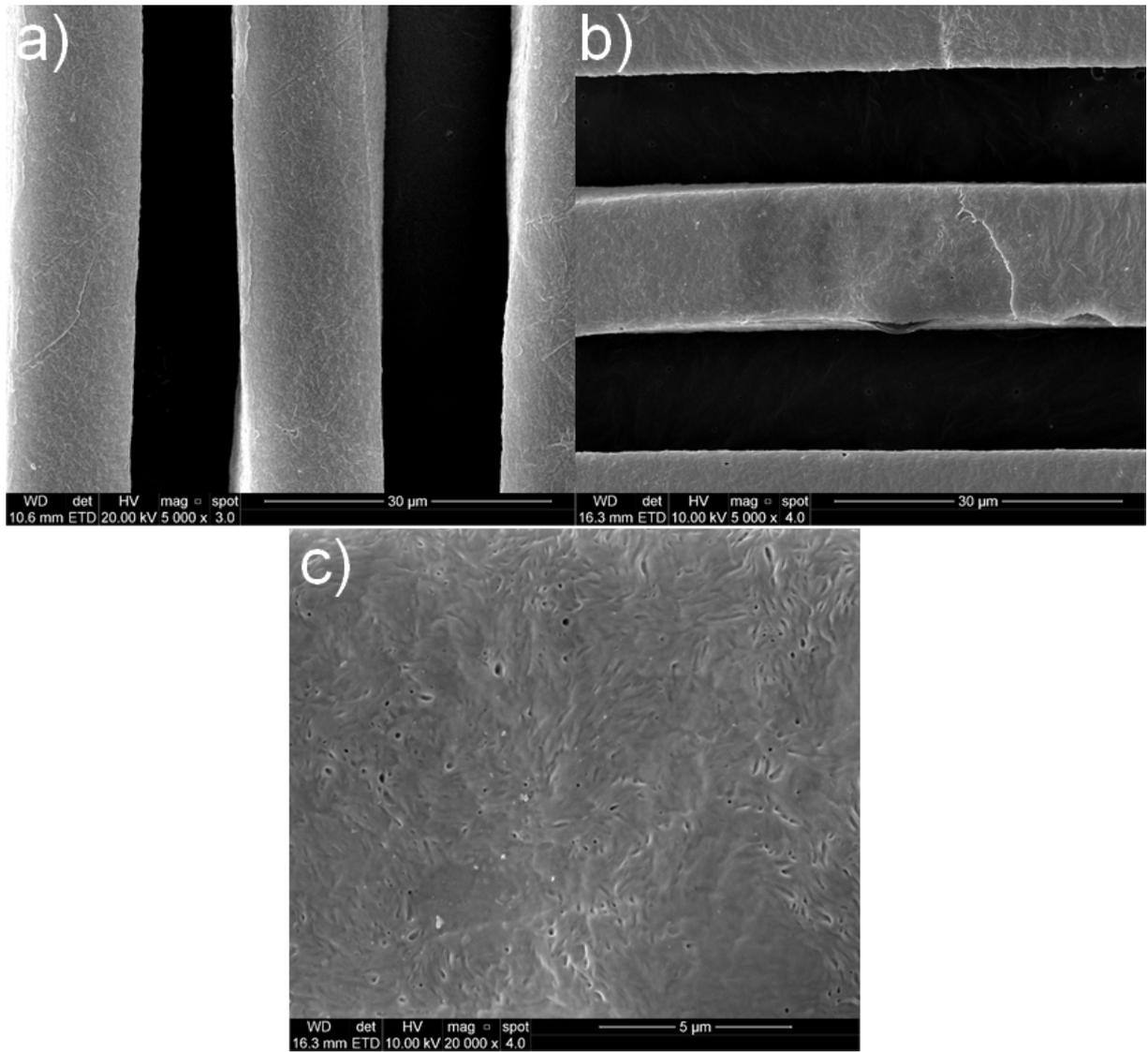


Figura 5.21. Imagens de MEV comparando amostras de PCL/PLGA 80: 20 antes e após degradação de 90 dias: a) antes do ensaio, b) e c) pós degradação.

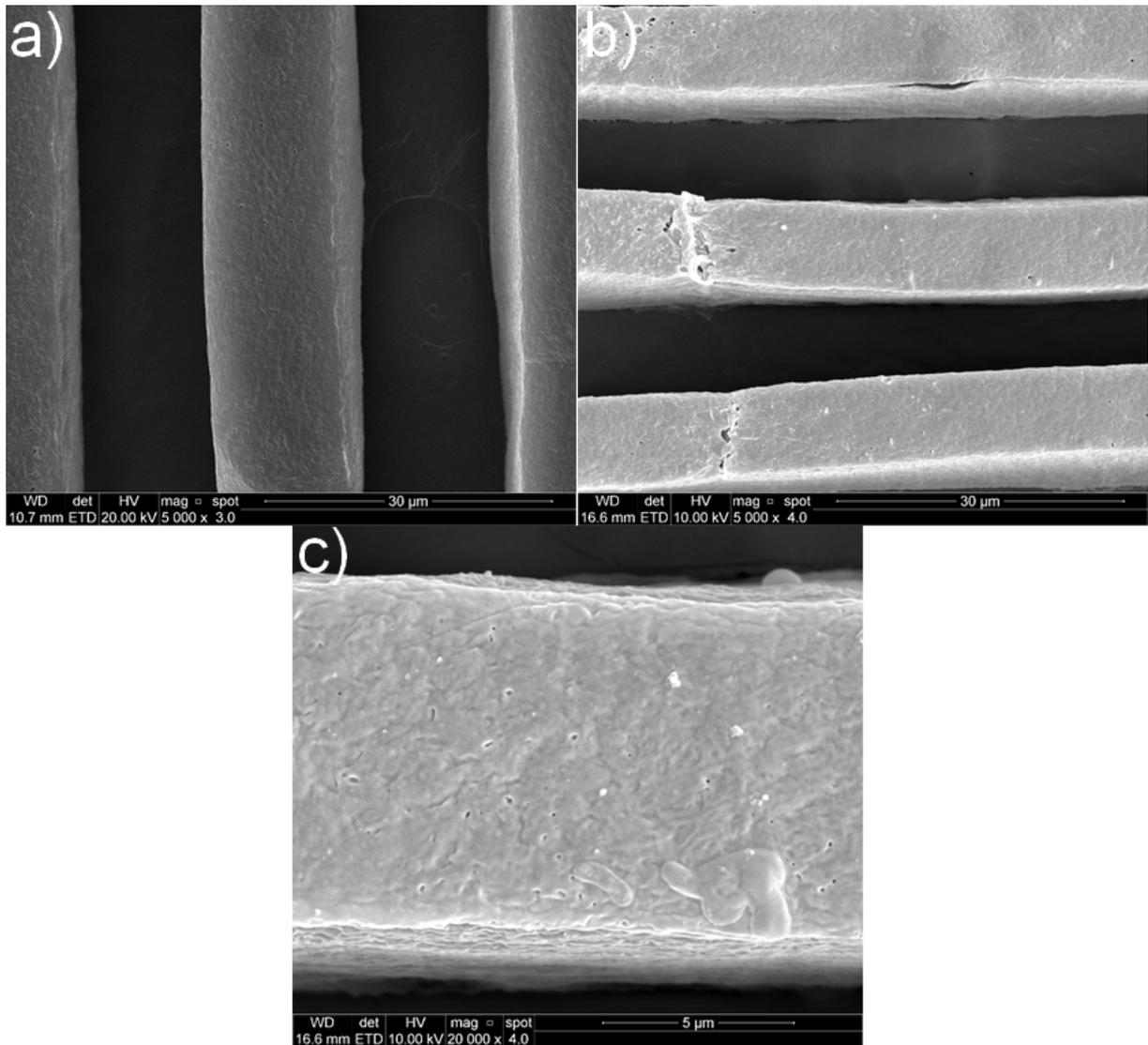


Figura 5.22. Imagens de MEV comparando amostras de PCL/PLGA 70:30 antes e após degradação de 90 dias: a) antes do ensaio, b) e c) pós degradação.

Não foi possível, através da análise das micrografias, constatar diferença no processo de degradação entre as blendas preparadas com diferentes razões de PCL/PLGA. Isso se deve a proximidade dos percentuais de perda de massa encontrados no ensaio, indicando que estudos com tempos superiores ao avaliado neste trabalho devem ser realizados com o objetivo de avaliar a influência da adição de PLGA.

Outro indicativo de aparecimento de poros na superfície das amostras após o processo de degradação é a comparação de imagens de AFM realizada entre

amostras de mesma composição (PCL/PLGA 100), antes e após o ensaio (figura 5.23). Foi possível identificar regiões com esse tipo de formação, que podem ser poros surgidos no processo de preparação, durante a evaporação do solvente, que aumentaram de tamanho devido a degradação do material.

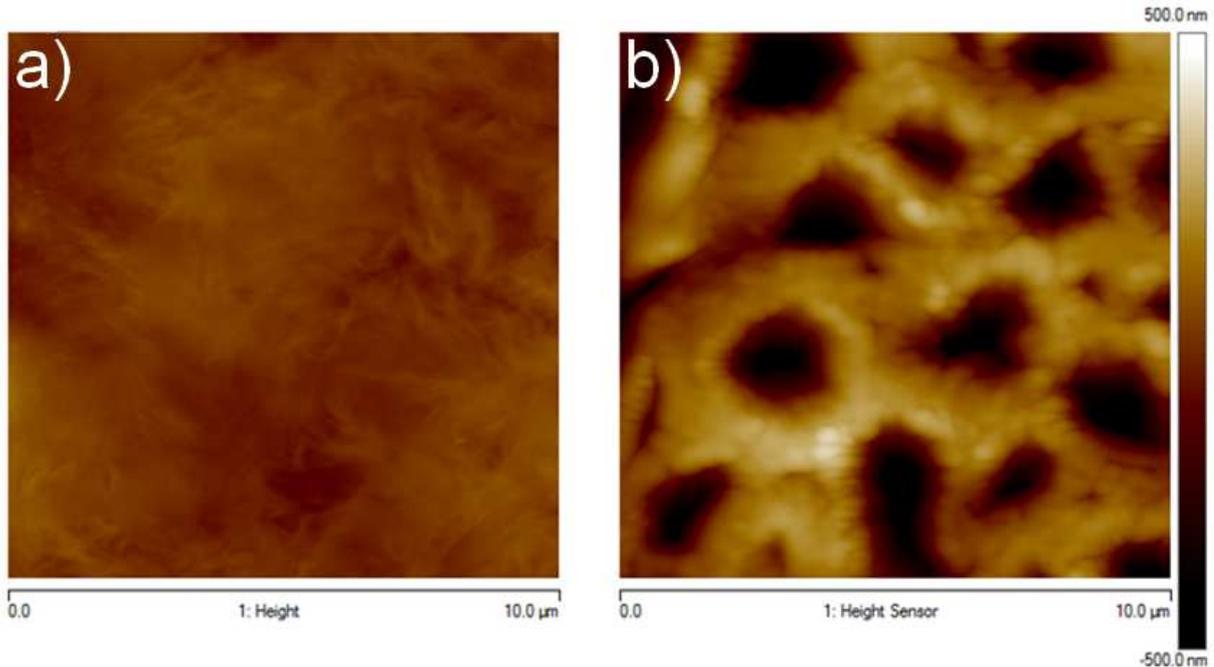


Figura 5.23. Imagens de AFM comparando amostras de PCL puro antes e após degradação de 90 dias: a) antes do ensaio, b) pós degradação.

Estudos relatam que problemas na avaliação da degradação para intervalos de tempo similares aos realizados nesse estudo são comuns, devido ao acúmulo de massa em testes realizados com poliésteres (LARRAÑAGA et al, 2014; TANG; HUNT, 2006). Estudos com PCL puro até o período de 132 dias indicaram uma tendência de perda de massa maior após o período de 76 dias, quando aumenta a quantidade de água absorvida pelo material. Com relação a estudos utilizando PLGA a variação da perda de massa no ensaio de degradação é maior, dependendo da razão de PLA:PGA utilizada, da técnica de fabricação escolhida, que podem levar a perdas de massa significativas em períodos que variam de poucos dias até meses de ensaio (MAKADIA; SIEGEL, 2011).

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que as metodologias empregadas na produção dos filmes de PDMS, PCL e blendas de PCL/PLGA foram eficientes com relação ao propósito inicial do trabalho, que era a produção dos filmes microestruturados longitudinalmente de forma simples e com reprodutibilidade.

As análises morfológicas indicaram que o PLGA se dispersou na matriz polimérica de PCL, evitando que o processo de degradação ocorra em pontos específicos da matriz, já que o PLGA tem uma taxa de degradação mais rápida que o PCL.

Os ensaios de degradação até o tempo de 90 dias indicaram que o tamanho das microestruturas não influencia no processo de degradação dos filmes de PCL e PCL/PLGA, mesmo quando comparados aos filmes lisos (sem microestruturas). Além disso, foi possível constatar através dos ensaios que a quantidade de PLGA adicionado as blendas é uma forma de controlar a taxa de degradação das blendas, possibilitando a confecção de materiais com diferentes tempos de degradação para cada uso.

As imagens de MEV-FEG indicaram que o processo de degradação pode ser acompanhado através do surgimento de poros na superfície dos filmes submetidos aos testes de degradação.

O principal desafio é encontrar uma combinação que alie os dois principais parâmetros no controle da adesão celular: a largura ideal dos canais da microestrutura e a proporção de PLGA adicionada ao PCL que irá reduzir a hidrofobicidade e controlar a taxa de degradação.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Na continuidade desse trabalho sugere-se:

Avaliar solventes diferentes do clorofórmio capazes de solubilizar ambos polímeros (PCL e PLGA), a fim de testar a rugosidade do material produzido;

Utilizar PLGA com diferentes razões entre PLA:PGA, modificando a degradação das blendas;

Realizar ensaios de molhabilidade para verificar a capacidade do PLGA adicionado as blendas de alterar a hidrofobicidade do material;

Avaliar a degradação do material em sistemas mais dinâmicos, como meios de cultura, com a presença de proteínas;

Avaliar da adesão celular e citotoxicidade dos filmes;

Ampliar do período dos ensaios de degradação;

Testar outros formatos e tamanho de canais do molde de silício.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AIRES, A. M. M. Biodispositivos Electrónicos Implantáveis e Biodegradáveis: nano/microfibras de poli(ϵ -caprolactona) (PCL). Lisboa. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). Faculdade de Ciências e Tecnologia. Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

ALVES, E. A. S. Desenvolvimento e caracterização de blendas de polímeros biodegradáveis e polipirrol. São Paulo. 2009. 107 f. Tese (Doutorado em ciências). Instituto de Física, Universidade de São Paulo, Brasil.

ALVES, M. L. Reconhecimento da rugosidade em imagens monocromáticas por meio de análise de textura. Niterói. 2011. 197 f. Tese (Doutorado em engenharia mecânica). Escolha de engenharia, Universidade Federal Fluminense, Brasil.

AURAS, A. R., et al. Poly(lactic acid): Synthesis, Structures, Properties, Processing and Applications. 1 ed. John Wiley & Sons. 2011. 528 p.

AZZE, R.J.; MATTAR JR., R. Atualização em traumatologia do aparelho locomotor. **Lesão dos nervos periféricos**. 3rd ed. Belo Horizonte: Medsi, 2000.

BARBANTI, S. H.; ZAVAGLIA; C. A. C.; DUEK, E. A. R. Polímeros Bioreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, nº 1, p. 13-21, 2005.

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. 258–267, 2005.

- BÉDUER, A. et al. Multi-scale engineering for neuronal cell growth and differentiation. **Microelectronic Engineering**, v. 88, p. 1668–1671, 2011.
- BÉDUER, A. et al. Engineering of adult human neural stem cells differentiation through surface micropatterning. **Biomaterials**, v. 33, n. 2, p. 504–514, 2012.
- BOLGEN, N. et al., In vitro and in vivo degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions, **J. Biomater. Sci. Polymer**, v 16(12), p. 1537-1555, 2005.
- BRAGA-SILVA, J. The use of silicone tubing in the late repair of the median and ulnar nerves in the forearm. **Journal of hand surgery (Edinburgh, Scotland)**, v. 24, p. 703–706, 1999.
- CHANG, C. J. et al. Effects of unidirectional permeability in asymmetric poly(DL-lactic acid-co-glycolic acid) conduits on peripheral nerve regeneration: an in vitro and in vivo study. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 83, n. 1, p. 206-15, Oct 2007.
- CHANG, C. J. et al. Low-intensity-ultrasound-accelerated nerve regeneration using cell-seeded poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) conduits: an in vivo and in vitro study. **J Biomed Mater Res B Appl Biomater**, v. 75, n. 1, p. 99-107, Oct 2005.
- CHO, D. K.; PARK, J. W.; KIM, S. H.; KIM, Y. H.; IM, S. S. Effect of molecular orientation on biodegradability of poly(glycolide-co- ϵ -caprolactone). **Polymer Degradation and Stability**. v. 80, p. 223-232, 2002.
- COLAS, A.; CURTIS, J. Silicone Biomaterials: History and Chemistry. *Biomaterials Science: an introduction to materials in medicine*, 2 nd Edition, Elsevier Academic Press; p. 80-85; 2004.
- COLLI, B. O. Aspectos Gerais das Lesões Traumáticas Agudas dos Nervos Periféricos. **Arq Bras Neurocirurg**. p. 1–18, 1993.
- CUNHA, T. F. Aplicação do poli(ϵ -caprolactona) com estrutura estrelada para obtenção de microesferas biorreabsorvíveis. São Paulo. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Ciências). Instituto de pesquisas energéticas e nucleares, Universidade de São Paulo, Brasil.

DE BOER, J.; et al. Tissue Engineering, 1ª edição, Elsevier Inc., p.760, (2008)

DODLA, M.C. Bioengineered Scaffolds For Peripheral Nerve Regeneration. Georgia. 2007. 159 f. Dissertation (Doctor of Philosophy in the School of Bioengineering). Department of Biomedical Engineering. Georgia Institute of Technology, Estados Unidos.

GIL, M.H; FERREIRA, P. Polissacarídeos como biomateriais. **Boletim Sociedade Portuguesa de Química**. v. 100, p.72-74, 2006.

GRAY, H. Anatomina. 29ª ed. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara, 1988. 1147 p.

GRISCOM, L. et al. Cell placement and neural guidance using a three-dimensional microfluidic array. **Japanese Journal of Applied Physics, Part 1: Regular Papers and Short Notes and Review Papers**, v. 40, p. 5485–5490, 2001.

GRISCOM, L. et al. Techniques for patterning and guidance of primary culture neurons on micro-electrode arrays. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 83, p. 15–21, 2002.

GU, X. et al. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 93, n. 2, p. 204–230, 2011.

GU, X.; DING, F.; WILLIAMS, D. F. Biomaterials Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6143–6156, 2014.

GUYTON, A. C. Tratado de fisiologia médica. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1115 p.

HADLOCK, T. et al. A novel, biodegradable polymer conduit delivers neurotrophins and promotes nerve regeneration. **Laryngoscope**, v. 109, n. 9, p. 1412-6, Sep 1999

HE, L. et al. Manufacture of PLGA multiple-channel conduits with precise hierarchical pore architectures and in vitro/vivo evaluation for spinal cord injury. **Tissue Eng Part C Methods**, v. 15, n. 2, p. 243-55, Jun 2009.

HOU, Y.; CHEN, J.; SUN, P.; GAN, Z.; ZHANG, G. In situ investigations on enzymatic degradation of poly(ϵ -caprolactone). **Polymer**. v. 48, 6348-6353, 2007

JACCHETTI, E. et al. Microstructured polydimethylsiloxane membranes for peripheral nerve regeneration. **Microelectronic Engineering**, v. 124, p. 26–29, 2014.

JANG, S. P.; LEE, K. H.; KIM, M. N. Biodegradability of aliphatic copolyester blown films. **Polymers for Advanced Technologies**. v. 8, p. 146-151, 1997.

JONES, H. R. et al. Sistema nervoso. 2ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 2 v.

KEHOE, S.; ZHANG, X. F.; BOYD, D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy. **Injury**, v. 43, n. 5, p. 553–572, 2012.

KESEL, C. de; VANDER WAUVEN, C.; DAVID, C. Biodegradation of polycaprolactone and its blends with poly(vinylalcohol) by micro-organisms from a compost of house-hold refuse. **Polymer Degradation and Stability**. V. 55 (1), January 1997, p. 107–113.

KWEON, H. et al. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials**. v. 24, p. 801–808, 2003.

LARRAÑAGA, A. et al. Hydrolytic degradation and bioactivity of lactide and caprolactone based sponge-like scaffolds loaded with bioactive glass particles. **Polymer Degradation and Stability**, vol. 110, pag. 121-128, 2014.

LEE, S. K.; WOLFE, S. W. Peripheral nerve injury and repair. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 8, n. 4, p. 243–252, 1999.

LI, H.; Chang, J. pH-compensation effect of bioactive inorganic fillers on the degradation of PLGA. **Composites Science and Technology**, v. 65, p. 2226-2232, 2005.

LUCCHESI, C. et al. Cell Culture on PCL/PLGA Blends. **Journal of Applied Polymer Science**. v.115, p. 2609–2615 (2010).

LUNDBORG, G. Nerve regeneration and repair. **Acta Orthop Scand**. v. 58, p. 145-69, 1987.

LUNDBORG, G., Rosen, B., Dahlin, L., Holmberg, J., Rosen, I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. **J. Hand Surg**. v. 29, p. 100–107, 2003.

MADDURI, S. et al. Collagen nerve conduits releasing the neurotrophic factors GDNF and NGF. **J Control Release**, v. 143, n. 2, p. 168-74, Apr 2010.

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers (Basel)**. 2011 September 1; 3(3), p. 1377–1397.

MARIANI, P. D. S. C. Estudo da biodegradação da blenda de poli (ϵ -caprolactona) e amido modificado em meios sólido e líquido. Campinas. 2005. 79 f. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. Brasil.

MOBASSERI, A. et al. Micro-structural geometry of thin films intended for the inner lumen of nerve conduits affects nerve repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. v. 24. p. 1639–1647, 2013.

MOBASSERI, A. et al. Polymer Scaffolds with Preferential Parallel Grooves Enhance Nerve Regeneration. **Tissue Engineering**. v. 21, p. 1152–1162, 2015.

MOCHIZUKI, M.; HIRANO, M.; KANMURI, Y.; KUDO, K.; TOKIWA, Y. Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: effects of draw ratio on enzymatic degradation. **Journal of Applied Polymer Science**. v. 55, p. 289-296, 1995.

OH, S. H. et al. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA/Pluronic F127 nerve guide conduit. **Biomaterials**, v. 29, n. 11, p. 1601-9, Apr 2008.

PERSENAIRE, O; et al. Mechanisms and Kinetics of Thermal Degradation of Poly(ϵ -caprolactone). **Biomacromolecules**. v. 2, p. 288-294, 2001.

PIQUILLOUD, G. et al. Variations in glial cell line-derived neurotrophic factor release from biodegradable nerve conduits modify the rate of functional motor recovery after rat primary nerve repairs. **Eur J Neurosci**, v. 26, n. 5, p. 1109-17, Sep 2007.

QUENTAL, A.C.; HANAMOTO, L.S.; FELISBERTI, M.I. Caracterização de polietilenos lineares de baixa densidade II. Fracionamento por cristalização isotérmica a partir do estado fundido. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 15, nº 4, p. 281-288, 2005.

ROBINSON, L.R. Traumatic injury to peripheral nerves. **Muscle Nerve**. 2000; v. 23, p. 863-73.

SEBBEN, A. D. et al. Efeitos de fatores neurotróficos sobre o reparo de nervo periférico. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 21, n. 2, p. 81-89, abr./jun. 2011.

SIQUEIRA, R. Lesões nervosas periféricas: uma revisão. **Revista Neurociências**, v. 15, p. 226–233, 2007.

SOUTHGATE, J.; CAMERON, N. R.; BAKER, S. C. Biomaterials The relationship between the mechanical properties and cell behaviour on PLGA and PCL scaffolds for bladder tissue engineering. **Biomaterials**. v. 30, p. 1321–1328, 2009.

SUN, M.; DOWNES, S. Physicochemical characterisation of novel ultra-thin biodegradable scaffolds for peripheral nerve repair. **J Mater Sci Mater Med**. p. 1181–1192, 2009.

TANG, Z. G.; CALLAGHAN, J. T.; HUNT, J. A. The physical properties and response of osteoblasts to solution cast films of PLGA doped polycaprolactone. **Biomaterials**. v. 26, p. 6618–6624, 2005.

TANG, Z. G.; RHODES, N. P.; HUNT, J. A. Control of the Domain Microstructures of PLGA and PCL Binary Systems: Importance of Morphology in Controlled Drug Release. **Chemical Engineering Research and Design**. v. 85, p. 1044–1050, 2007.

TANG, Z. G.; HUNT, J. A. The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation in vitro. **Biomaterials**, v. 27, p. 4409–4418, 2006.

TAVARES, V. A. C. D. B. Matrizes de Policaprolactona e Quitosano para aplicação em Engenharia de Tecidos. Lisboa. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica), Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal.

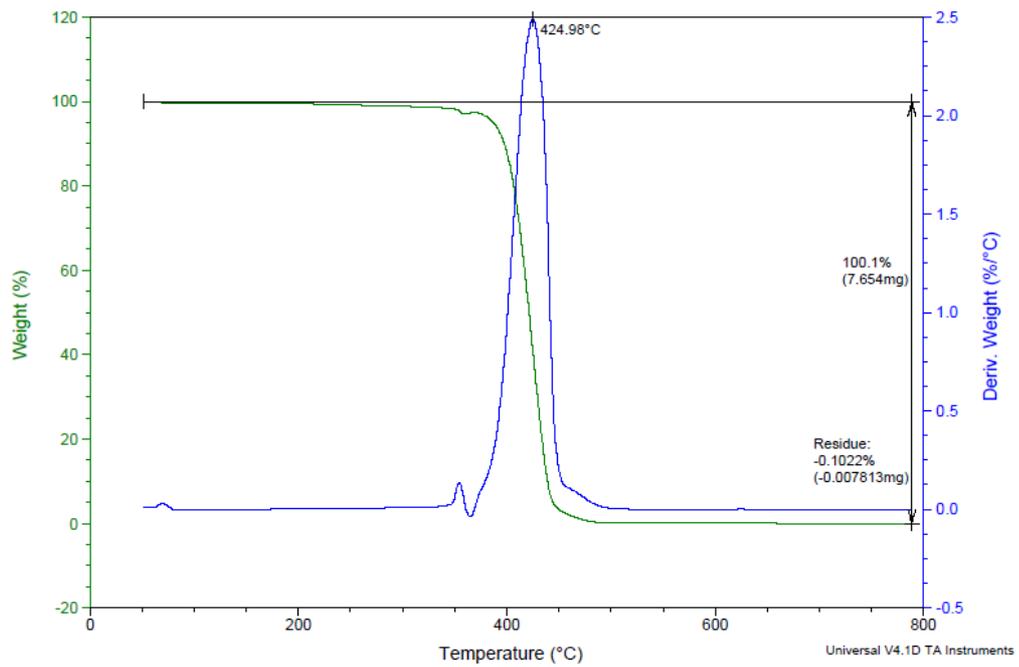
THI, N.; LEE, H. B. Electro-spinning of PLGA / PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. **J Mater Sci Mater Med**. p. 1969–1978, 2010.

TSUJI, H. et al. Improvement of polydimethylsiloxane guide tube for nerve regeneration treatment by carbon negative-ion implantation. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research, Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms**, v. 206, p. 507–511, 2003.

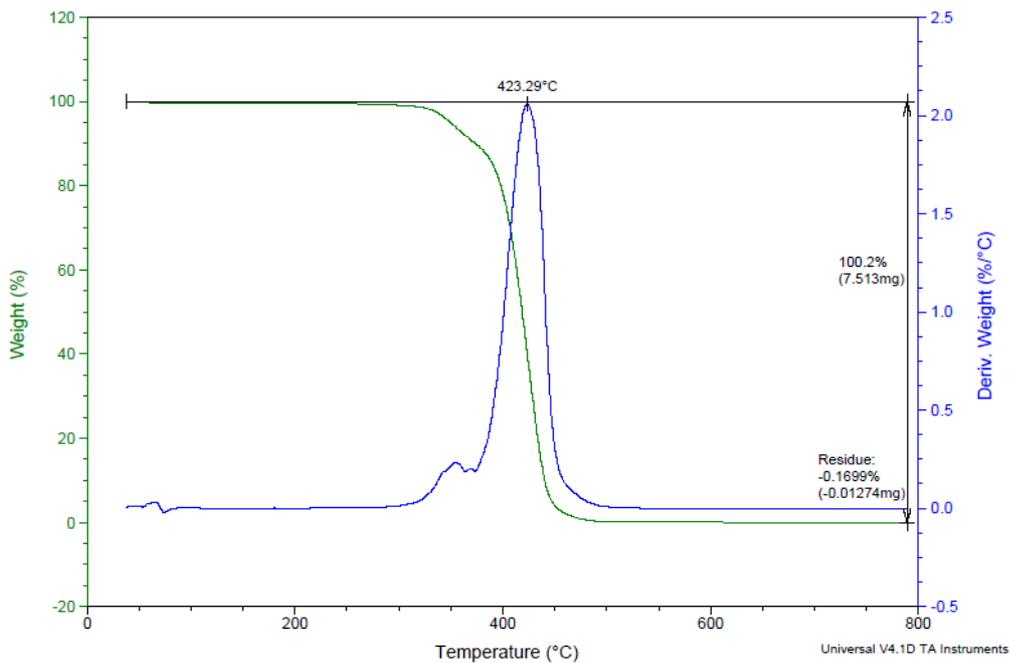
VON RECUM, A.F.; LABERGE, M. Educational goals for biomaterials science and engineering:perspective view. **J. Appl. Biomater.**, v.6, p.137-144, 1995.

WANG, X.; Makitie, A. A.; Paloheimo, K.; Tuomi, J.; Paloheimo, M. A Tubular PLGA-Sandwiched Cell/Hydrogel Fabrication Technique Based on a Step-by-Step Mold/Extraction Process. **Advances in Polymer Technology**. V. 30, No. 3, p. 163–173, 2011.

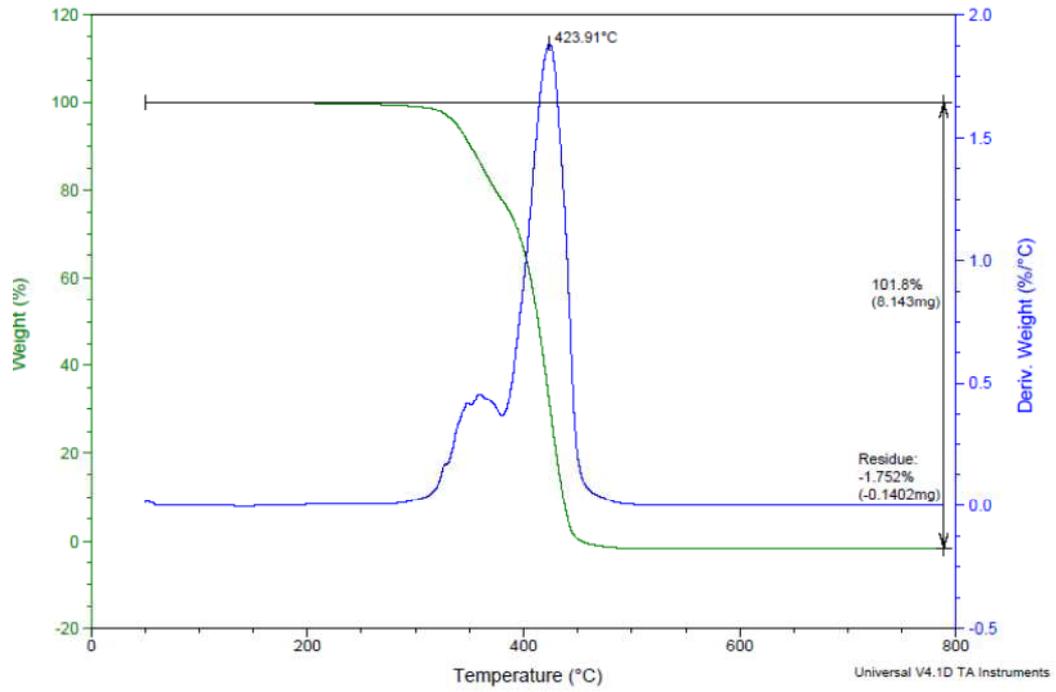
ANEXOS



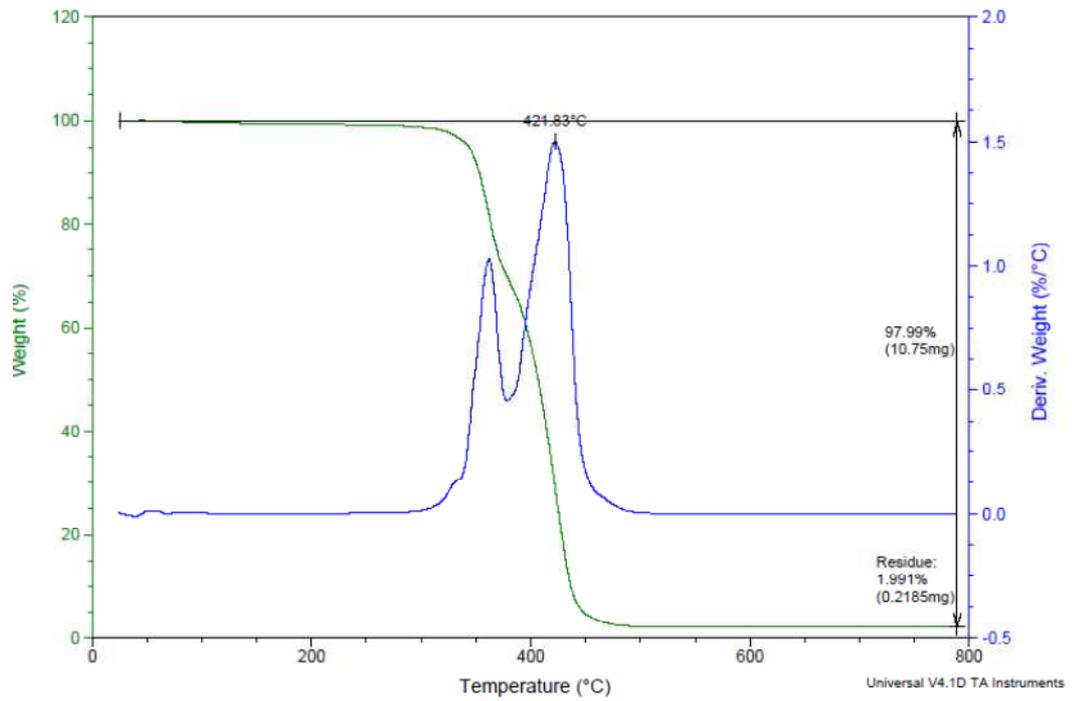
Termograma e DTGA amostra PCL



Termograma e DTGA amostra PCL/PLGA 90:10



Termograma e DTGA amostra PCL/PLGA 80:20.



Termograma e DTGA amostra PCL/PLGA 70:30

APÊNDICES

