



DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) PARA
APLICAÇÃO COMO CONDUÍTE DE GUIA NEURAL

Rui Carlos Castro Domingues

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Cristiano Piacsek Borges

Rio de Janeiro
Dezembro de 2017

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLI(ÁCIDO LÁCTICO) PARA
APLICAÇÃO COMO CONDUÍTE DE GUIA NEURAL

Rui Carlos Castro Domingues

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO ALBERTO LUIZ
COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE ENGENHARIA (COPPE) DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:



Prof. Cristiano Piasek Borges, D.Sc



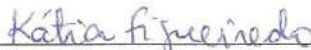
Dra. Cristina Cardoso Pereira, D.Sc.



Prof. Marcos Lopes Dias, D.Sc.



Profa. Fernanda Martins de Almeida, D.Sc.



Profa. Katia Cecilia de Souza Figueiredo, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL
DEZEMBRO DE 2017

Domingues, Rui Carlos Castro

Desenvolvimento membranas de poli(ácido lático) para aplicação com Conduíte de Guia Neural / Rui Carlos Castro Domingues. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017. XX, 160 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: Cristiano Piacsek Borges

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 150-160.

1. Processos de Separação por Membranas. 2. Fibras Ocas. 3. Poli(ácido lático). 4. Conduíte de Guia Neural I. Borges, Cristiano Piacsek. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

Dedicatória

A meus pais Márcia e Rui

Agradecimentos

A Deus e a todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

Mais especificamente:

Aos orientadores Cristina Pereira e Cristiano Piacsek pelo suporte e ensinamentos

Aos amigos do PAM por toda experiência e aprendizado. Gisele, Nicolas e Dilson (sala 26 - versão 2016, apenas a diretoria); Thaís, Bob, Bete e Cátia por todo suporte técnico e psicológico; Alana por compartilhar as conquistas do Palmeiras no período; Marcela e Carol por serem tão boas colegas; Amanda e Pedro pelo talento e palas mitagens; Paola por ser uma linda namorada companheira na reta final do trabalho.

Agradecimentos especiais ao grupo do BONDE, que forneceu sempre suporte, apoio, entretenimento e compreensão mútua entre os membros envolvidos, em todos os momentos de alegrias e aflições. A Nate, Marrcos (Bruna Salomão), Hudson, Mari Carvalho, Mari Galassi, Ioná, Sara, Flavinha e Juliana (que vivenciou e participou de forma importante em grande parte desta história). A Lucas Pires, Paty, Dani Cordeiro e Daniel Engelbrecht que também estavam sempre quando se precisava.

Agradeço finalmente à COPPE e ao Rio cidade maravilhosa por me proporcionar vários dos melhores momentos da minha vida.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO) PARA
APLICAÇÃO COMO CONDUÍTE DE GUIA NEURAL

Rui Carlos Castro Domingues

Dezembro/2017

Orientador: Cristiano Piacsek Borges

Programa: Engenharia Química

A tecnologia de membranas vem sendo utilizada para a confecção de implantes auxiliares para o tratamento de lesões em nervos periféricos, conhecidos como Conduítes de Guia Neural (CGN). O objetivo deste trabalho foi desenvolver membranas de poli(ácido lático) na forma de fibras ocas para serem utilizadas como CGN, e avaliar o seu desempenho em testes de recuperação funcional *in vivo*. Através do estudo das condições de síntese e uso de diferentes solventes e aditivos, foi possível sintetizar fibras ocas com morfologias com macrovazios digitiformes e espongiiformes, capazes de rejeitar 100% de BSA (67 kDa) e com rejeições de 83 a 100% para lisozima (17 kDa), com permeabilidades hidráulicas variando de 0 a 9,38 L/m² h bar. Os resultados em testes funcionais *in vivo* foram capazes de ampliar o conhecimento sobre a influência da porosidade dos CGN durante o tratamento, sendo observados na mesma ordem ou superiores a resultados reportados na literatura, principalmente no tocante à recuperação da sensibilidade das regiões afetadas pela lesão no nervo. Fibras ocas não porosas resultaram em recuperações mais rápidas em testes de analgesímetro, com resultados de recuperação sensorial plena após 2 semanas de tratamento, enquanto fibras ocas porosas apresentaram recuperações similares após 5 semanas.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DEVELOPMENT OF POLY(LACTIC ACID) MEMBRANES FOR NEURAL GUIDE
CONDUIT APPLICATION

Rui Carlos Castro Domingues

December/2017

Advisor: Cristiano Piacsek Borges

Department: Chemical Engineering

Membrane technology has been studied for preparing artificial transplants for peripheral nerve injury, also known as Neural Guide Conduits (NGC). The purpose of this work was to develop poly(D,L-lactic acid) (PDLLA) hollow fibers as NGC, and evaluate their performance on *in vivo* functional recovery. The development of the hollow fibers brought a wider understanding on kinetics and thermodynamic aspects during PLA membrane synthesis, allowing better control of its transport properties and morphology. The study of preparing conditions and investigation of different solvents and additives allowed the production of hollow fibers with both fingerlike and spongelike morphologies, with rejections of 100% of BSA (67 kDa) and 83 to 100% of lysozyme (17 kDa), with water permeabilities from 0 to 9.38 /m² h bar. *In vivo* functional evaluation was able to elucidate questions about the influence of porosity of NGC during the treatment. Results showed that the functional recovery of the synthesized membranes in this work were equal or superior compared to values reported in the open literature, mostly regarded to sensorial evaluation. Nonporous hollow fibers showed faster sensorial recovery (2 weeks) while full recovery after 5 weeks was observed with porous membranes.

“Se fui mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes”
Isaac Newton

Sumário

1	Introdução.....	1
2	Objetivos	4
2.1	Objetivo geral.....	4
2.2	Objetivos específicos.....	4
3	Implantes para regeneração neural	6
3.1	Biomateriais - aspectos gerais	6
3.2	Sistema nervoso humano.....	9
3.3	Lesão de nervo periférico	10
3.4	Tratamentos para regeneração de nervo periférico	10
3.4.1	Tratamentos convencionais	10
3.4.2	Conduíte de Guia Neural (CGN).....	12
3.5	Mecanismo de regeneração de nervos periféricos com CGNs.....	16
3.6	Regeneração de nervos periféricos com CGN - Estado da arte	18
4	Poli(ácido lático) – PLA.....	22
4.1	Síntese	22
4.2	Solubilidade.....	25
4.3	Propriedades térmicas e cristalinidade	26
4.4	Propriedades mecânicas	27
4.5	Misturas de PLA com outros polímeros e aditivos	29
4.5.1	Polivinilpolipirrolidona (PVP) e Polietilenoglicol (PEG).....	29
4.5.2	Outros aditivos	30
4.6	Degradação	31
4.7	Adesão celular	33
5	Síntese de membranas poliméricas.....	34
5.1	Técnicas de síntese de membranas poliméricas	34
5.2	Inversão de fases	36

5.2.1	Termodinâmica de sistemas poliméricos binários.....	36
5.2.1.1	Entropia de mistura	37
5.2.1.2	Entalpia de mistura.....	38
5.2.2	Inversão de fases em sistemas binários	39
5.3	Inversão de fases por imersão-precipitação.....	42
5.4	Formação de membranas – trajetórias de precipitação e morfologias	44
5.4.1	Formação de filmes densos e isotrópicos – Trajetória A-B	46
5.4.2	Precipitação com atraso – Trajetória A-C	46
5.4.3	Separação espinodal - Trajetória A-F.....	49
5.4.4	Precipitação instantânea – Trajetória A-E.....	51
5.4.5	Formação de macrovazios – trajetória A-D	52
5.4.6	Formação de látex – trajetória A-G.....	54
5.4.7	Morfologias típicas de membranas de PLA	56
5.5	Fatores que influenciam a morfologia durante preparo de membranas	58
5.5.1	Escolha do par S/NS.....	59
5.5.2	Concentração da solução polimérica.....	61
5.5.3	Composição do banho de imersão.....	62
5.5.4	Composição da solução polimérica.....	63
5.5.5	Tempo de exposição da solução polimérica antes da imersão	65
5.5.6	Secagem	66
5.5.7	Mecanismo de solidificação da fase concentrada em polímero	66
5.6	Síntese de fibras ocas por inversão de fase	70
5.7	Trabalhos sobre síntese fibras ocas de PLA.....	72
6	Materiais e métodos.....	79
6.1	Materiais utilizados	79
6.2	Determinação de diagramas ternários	79
6.3	Preparo de membranas planas por espalhamento.....	80

6.4	Síntese de fibras ocas	81
6.5	Técnicas de caracterização	82
6.5.1	Viscosidade de solução polimérica	82
6.5.2	Velocidade de precipitação	82
6.5.3	Análise térmica.....	82
6.5.4	Propriedades de transporte	83
6.5.4.1	Testes de permeabilidade em fibras ocas	83
6.5.4.2	Testes de diálise.....	84
6.5.4.3	Testes de Osmose direta.....	84
6.5.5	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	85
6.5.6	Propriedades mecânicas	85
7	Efeito da estereoisomeria do poli(ácido lático) na síntese de fibras ocas	87
7.1	Resultados e discussão	89
7.1.1	Análise térmica.....	89
7.1.2	Viscosidade de soluções poliméricas	89
7.1.3	Velocidade de precipitação	90
7.1.4	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	91
7.1.5	Propriedades mecânicas	93
7.1.6	Conclusões parciais	95
8	Avaliação do efeito de variáveis durante síntese de membranas de PDLLA... 97	
8.1.1	Delineamento experimental.....	98
8.2	Resultados e discussão	99
8.2.1	Efeito da temperatura do banho de imersão e da solução polimérica	99
8.2.2	Efeito da concentração polimérica	101
8.2.3	Efeito da composição do banho de imersão	104
8.2.4	Efeito da utilização de aditivos poliméricos geradores de poros	106
8.2.4.1	Efeito da adição de PEG.....	106

8.2.4.2	Efeito da adição de PVP	107
8.2.5	Conclusões parciais	110
9	Controle da morfologia e propriedades de fibras ocas de PDLLA	111
9.1	Resultados e discussão	112
9.1.1	Viscosidade de soluções poliméricas	112
9.1.2	Velocidade de precipitação e diagramas ternários	113
9.1.3	Síntese de fibras ocas	116
9.1.4	Teste de degradação in vitro.....	121
9.1.5	Testes de diálise e osmose direta.....	125
9.1.6	Propriedades mecânicas	126
9.2	Conclusões parciais	129
10	Avaliação funcional in vivo	131
10.1.1	Animais	132
10.1.2	Procedimento cirúrgico	132
10.1.3	Teste de pressão crescente na pata de camundongos - Analgesímetro	134
10.1.4	Índice de função do isquiático (IFC) – Teste de marcha.....	134
10.1.5	Eletroneuromiografia.....	136
10.1.6	Perfusão	136
10.1.7	Morfometria - Número de fibras mielínicas.....	136
10.1.8	Análise estatística.....	137
10.2	Resultados e discussão	137
10.2.1	Teste de pressão crescente na pata de camundongos - Analgesímetro	137
10.2.2	Índice de função do isquiático (IFC) - Teste de marcha	139
10.2.3	Eletroneuromiografia.....	140
10.2.4	Morfometria - Número de fibras mielínicas.....	141
10.3	Conclusões parciais	142
11	Conclusões e sugestões para trabalhos futuros.....	145

11.1	Conclusões.....	145
11.2	Sugestões para trabalhos futuros	149
12	Referências bibliográficas	150

Lista de Figuras

Figura 1 - Abordagens para o projeto de suportes celulares (scaffolds). (a) top down ou in vitro; (b) bottom up ou in vivo. Adaptado de [10].....	8
Figura 2 - Representação da divisão do sistema nervoso humano. Adaptado de (DANTAS JUNIOR, 2014)	9
Figura 3 - Ilustração da técnica de neurografia. Adaptado de Junior (2014) [23].....	11
Figura 4 - Fases regenerativas ocorridas em implante de canais cilíndricos. Adaptado de Daly et al., (2012) [19]	18
Figura 5 - Diagrama esquemático de estratégias para otimização de canais tubulares. Adaptado de, Daly et al. (2012) [19] e de Ruiter et al. (2009) [28].	19
Figura 6 - Diagrama esquemático de CGN com guias intraluminais como suportes para crescimento Células de Schwann e direcionamento do crescimento de axônios. Adaptado de Gu, Ding & Williams (2014) [5].	20
Figura 7- ciclo do PLA	23
Figura 8 - Rotas para síntese de PLA de alta massa molar. Adaptado de Lim, Auras & Rubino (2008) [39].	24
Figura 9 - isômeros de polilactídeos	25
Figura 10 - Sistema típico de formação de filme de solução polimérica utilizando uma faca de espalhamento. (a) a (c): espalhamento da solução polimérica e formação de filme. (d): imersão em banho de NS. J_s : Fluxo de saída de solvente da solução polimérica. J_{NS} : Fluxo de entrada de NS na solução polimérica. Fonte:[74].	35
Figura 11 - Diagrama esquemático de uma extrusora simples. (a) secção transversal da extrusora; (b) sentido dos fluxos de transferência de massa.. Adaptado de Mermier (2012) [74].	36
Figura 12 - Representação esquemática de misturas a) binária composta por 2 componentes de baixa massa molecular; b) solução polimérica; c) mistura polimérica binária. Fonte: [77].	37
Figura 13 - Energia livre de mistura em função da composição de um sistema binário. (a) mistura binária ideal ($\Delta H_m = 0$); (b) mistura binária não ideal ($\Delta H_m > 0$). Adaptado de [72].	39
Figura 14 - Diagrama esquemático da construção de curva binodal e espinodal em sistema binário. $T_3 > T_2 > T_1 > T_c$ Adaptado de Mermier (2012) [74]	40
Figura 15 - Representação gráfica das curvas de ΔG_m , primeira e segunda derivada de ΔG_m em função da composição de um sistema binário polímero-solvente. Adaptado de Mulder (1997) [72].	41
Figura 16 - Diagrama esquemático da energia livre de mistura (ΔG_m) em função da composição de um sistema ternário polímero-solvente-não-solvente. Adaptado de Mulder (1997) [72].	42
Figura 17 - Diagrama esquemático de região de miscibilidade de sistema ternário. Fonte: [72]	43
Figura 18 - Diagrama esquemático de possíveis caminhos de variação de composição da solução polimérica durante a inversão de fases, incluindo Regiões de gelificação, cristalização e vitrificação. B: filme denso isotrópico; C: estrutura porosa anisotrópica; D: estrutura porosa	

com macrovazios; E: estruturas nodulares; F: separação espinodal; G: formação de estrutura similar a um látex. Adaptado de Mermier (2012) [74].	45
Figura 19 - Processo de precipitação com atraso: Ponto t_2 representa o instante de consolidação da estrutura da membrana. Adaptado de van de Witte et al.,(1996b) [80].	46
Figura 20 - Processo de precipitação com atraso: Ponto t_0 representa o instante de precipitação ímero. Adaptado de van de Witte et al.,(1996b) [80].	47
Figura 21 - Morfologia esponjosa: (a) poros abertas, (b) poros fechados, (c) estrutura de rede. Adaptado de van de Witte et al.,(1996b) [80].	48
Figura 22 - (a) Descrição esquemática do processo de nucleação e crescimento (separação binodal. (b) Descrição das flutuações de concentração durante a separação espinodal. ϕ' e ϕ'' = composições em equilíbrio da binodal; ϕ_0 = concentração polimérica inicial. Fonte: Mulder (1997) [72].	49
Figura 23 - Processo de separação espinodal: Ponto t_3 representa o instante de precipitação. Razão mássica entre as fases $x=1$. Adaptado de van de Witte et al.,(1996b) [80].	50
Figura 24 - Morfologia típica de membrana sintetizada por separação espinodal. Fonte: [82].	50
Figura 25 - Processo de precipitação instantânea . Razão mássica $x < 1$. Adaptado de van de Witte et al.,(1996b) [80].	51
Figura 26 - Estruturas nodulares presentes na base de membrana de PLLA. Fonte: [31].	52
Figura 27 - Estruturas de macrovazios. Esquerda: Macrovazios cilíndrico ou fingerlike. Direita: Macrovazio em forma de gota. Fontes: [63] e [85].	53
Figura 28 - Processo de nucleação da fase rica em polímero: Ponto t_2 representa o instante de precipitação. razão mássica entre as fases $x < 1$. Adaptado de van de Witte et al.,(1996b) [80].	54
Figura 29 - Representação esquemática de diferentes trajetórias de cinética de precipitação entre a superfície e uma subcamada da membrana. Adaptado de Mermier (2012) [74].	55
Figura 30 - Morfologias de membranas de PLLA de trabalhos encontrados na literatura.	57
Figura 31 - Curvas bimodais de diagramas ternários: a: sistema N/S altamente solúvel; b: sistema S/NS pouco solúvel. Adaptado de Mulder (1997) [72].	60
Figura 32- Diagramas de fase a 25 °C: (a) PLLA/clorofórmio/metanol, (b) PLLA/dioxano/água, (c) PLLA/dioxano/metanol. Adaptado de Kimmerle e Strathmann (1990) [79].	60
Figura 33 - Diagrama ternário de dois caminhos de composição. a) solução polimérica a 10%; b) solução polimérica a 20%. Adaptado de Mulder (1997) [72].	61
Figura 34 - Caminhos de composição para sistema variando o teor de NS na solução polimérica. Adaptado de Mulder (1997) [72].	63
Figura 35 - Secção transversal de fibras ocas de PLLA resultantes de diferentes mecanismos de separação de fases. Esquerda: separação líquido-líquido (macrovazios digitiformes); Direita: separação sólido-líquido (aglomerados esferulíticos).Fonte: [31].	67
Figura 36 - Diagrama ternário comparativo das curvas de miscibilidade dos sistemas PLLA e PDLLA-clorofórmio-metanol. Fonte: [87].	69

Figura 37 - Diagrama ternário para sistema P-S-NS incluindo regiões de transição de fases de não equilíbrio. L1: fase pobre em polímero; L2 fase rica em polímero; C: fase cristalina. 1, 2 e 3: Caminhos hipotéticos de variação de composição. Adaptado de Karode & Kumer (2001) [87].	70
Figura 38 - Efeito da composição do líquido interno. A: água, C: DMSO. b = secção transversal, c = superfície interna. Fonte: [31]......	73
Figura 39 - Efeito da adição de PEG na solução do líquido interno. A = 5%, B = 10%, C = 15%. b = secção transversal, c = superfície interna. Adaptado de Moriya et al. (2009) [31].	73
Figura 40 Frasco encamisado utilizado nos testes de turbidez	80
Figura 41 - Diagrama esquemático do sistema de fiação utilizado.....	81
Figura 42 - Representação esquemática do sistema utilizado nos testes de velocidade de precipitação	82
Figura 43 Ddecaimento de transmitância luminosa durante imersão dos filmes espalhados de PLLA e PDLLA	90
Figura 44 Diagramas ternários dos sistemas PLLA-água-NMP e PDLLA-água-NMP a 60°C	90
Figura 45 Imagens de MEV dos filmes poliméricos. 1 = PLLA; 2 = PDLLA; A = Secção transversal; B = detalhe da secção transversal; C = superfície externa superior	92
Figura 46 Imagens de MEV das fibras ocas. 1 = PLLA; 2 = PDLLA; A = secção transversal; B = detalhe da secção transversal; C = detalhe da formação de estruturas resultantes dos mecanismos L-L e S-L de separação de fases; D = superfície externa	93
Figura 47 detalhe do teste de sutura. Esquerda: PDLLA; Direita: PLLA	94
Figura 48 tempos de atraso na precipitação e permeabilidade hidráulica dos experimentos para análise do efeito da temperatura do banho de imersão e da solução polimérica. Concentração de PDLLA = 20% (m/m)	100
Figura 49 - tempos de atraso na precipitação e permeabilidade hidráulica dos experimentos para avaliação do efeito da concentração polimérica. Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C.....	101
Figura 50 Imagens de MEV dos filmes de PDLLA sintetizados para avaliação do efeito da concentração polimérica. ST = secção transversal; SE = superfície externa; SI = superfície interna.....	103
Figura 51 - Imagens de MEV dos filmes de PDLLA sintetizados para análise do efeito da composição do banho de imersão. ST = secção transversal; SE = superfície externa; SI = superfície interna	105
Figura 52 Detalhe da secção transversal da amostra P-50: formação de estruturas com morfologia esponjiforme	105
Figura 53 - Imagens de MEV dos filmes de PDLLA sintetizados para análise do efeito da adição de PEG. ST = secção transversal; SE = superfície externa; SI = superfície interna	107
Figura 54 - Tempos de atraso na precipitação e permeabilidade hidráulica dos experimentos para avaliação do efeito da adição de PVP. Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C; Concentração de PDLLA = 20% (m/m).	108

Figura 55 - Imagens de MEV dos filmes de PDLLA sintetizados para análise do efeito da adição de PVP. ST = secção transversal; SE = superfície externa; SI = superfície interna	109
Figura 56 -Representação gráfica bidimensional dos parâmetros de solubilidade de Hansen para o PDLLA, NMP, DIO e DMSO.....	113
Figura 57 Curvas de queda de transmitância luminosa durante imersão de filmes de PDLLA nos solventes NMP, DIO e DMSO.....	115
Figura 58 - Pontos dos diagramas ternários dos sistemas PDLLA-água-NMP, PDLLA-água-DIO e PDLLA-água-DMSO	115
Figura 59 Fibras ocas com área externa aderida, como consequência de tempos de precipitação muito lentos durante fiação.....	117
Figura 60- Imagens de MEV das fibras ocas preparadas HF-NMP, HF-DIO e HF-DMSO. (A) = secção transversal; (B) = detalhe da secção transversal; (C) = superfície externa; (D) superfície interna; (i) = sem adição de PVP; (ii) = com adição de 5% (m/m) de PVP	118
Figura 61 -Imagens de MEV dos detalhes da secção transversal das fibras ocas HF-MDSO (esquerda) e HF-DMSO-PVP (direita).....	121
Figura 62 -Variação das massas molares em função do tempo de incubação das fibras ocas. Esquerda Massa molar média (M_n); direita massa molar média ponderada (M_w).....	122
Figura 63 - Variação da porosidade das superfícies externas das fibras ocas HF-DIO e HF-DMSO após 15, 60 e 150 dias após incubação	123
Figura 64 -Imagens de MEV da variação da porosidade externa das superfícies externas das fibras ocas HF-DIO e HF-DMSO após 15, 60 e 150 dias	124
Figura 65 Curvas de tensão vs deformação das fibras ocas produzidas.....	128
Figura 66 - Aparelho esteriotáxico para realização dos procedimentos cirúrgicos	133
Figura 67 - Sequência do procedimento cirúrgico para inserção de fibra oca de no nervo isquiático de um camundongo com os cotos proximal e distal suturados.(A) Nervos isquiático exposto,(B) Secção do nervo,(C) fixação do tubo nas extremidades do nervo. Adaptado de Junior (2014) [17].....	133
Figura 68 teste de pressão crescente na pata de ratos. A aparelho analgesímetro; B animal posicionado no aparato com tela para aquisição dos valores do peso aplicado na pata do animal até sua retirada.	134
Figura 69 imagem ilustrativa das pegadas de um animal após teste de marcha. Esquerda pegada normal (sem lesão); direita pegada da pata com lesão. TS = toe spread; PL = print length	135
Figura 70 - Resultados de testes de pressão crescente em pata de camundongos com fibra oca HF-DIO-PVP. (* = valores com diferença significativa entre pata esquerda e direita em teste análise de variância a $p=5\%$)	138
Figura 71 - Resultados de testes de pressão crescente em pata de camundongos com fibra oca HF-DMSO. (* = valores com diferença significativa entre pata esquerda e direita em teste análise de variância a $p=5\%$).....	138
Figura 72 Índice de função do isquiático entre os grupos tratados com as fibras ocas HF-DIO-PVP e HF-DMSO.	139

Figura 73 -Eletroneuromiografias dos grupos tratados com as fibras ocas HF-Dio-PVP, HF-DMSO e sem lesão (normal), após 8 semanas de tratamento.....	140
Figura 74 - Eletromicrografia (amplitude) dos grupos tratados com as fibras ocas HF-DIO-PVP, HF-DMSO e grupo sem lesão (normal), a estímulo de 10 V após 8 semanas de tratamento. . (* = valores com diferença significativa entre pata esquerda e direita em teste análise de variância a p=1%).....	140
Figura 75 - Eletromicrografia (latência) dos grupos tratados com as fibras ocas HF-DIO-PVP, HF-DMSO e grupo sem lesão (normal), a estímulo de 10 V após 8 semanas de tratamento	141
Figura 76 - Imagens de cortes semi-finos de nervo isquiático após 8 semanas de regeneração utilizando como conduítes de guia neural as fibras ocas HF-DIO-OVO e HF-DMSO.....	141
Figura 77 contagem do número total de fibras mielínicas (esquerda) e número total de vasos sanguíneos (direita) após 8 semanas de tratamento utilizando com conduítes de guia neural as fibras ocas HF-DIO-PVP e HF-DMSO. (* = valores com diferença significativa entre pata esquerda e direita em teste análise de variância a p=5%).....	142

Lista de Tabelas

Tabela 1 - CGN clinicamente aprovados pela FDA e disponíveis comercialmente	14
Tabela 2 - Parâmetros de solubilidade do PLA, solventes, não-solventes comumente utilizados.....	26
Tabela 3 - Temperaturas de transição térmica em função do grau de copolimerização do PLA	27
Tabela 4 - Valores típicos reportados na literatura para propriedades mecânicas e tempo de degradação para PLAs e outros biomateriais. Adaptado de Chen, Liang Thouas (2013) [6].	28
Tabela 5 - Propriedades mecânicas de nervos reportadas na literatura.....	29
Tabela 6 - Propriedades mecânicas de misturas de PLA com plastificantes	30
Tabela 7 - Valores médios de tempo de degradação do PLA e polímeros utilizados como biomateriais. Adaptado de [6].....	33
Tabela 8 - Influência de parâmetros presentes na transferência de massa sobre a velocidade de precipitação e concentração polimérica na interface durante o processo de inversão de fases. Fonte: [87].....	59
Tabela 9 - Características de sistemas de síntese de membranas de PLA na literatura.....	76
Tabela 10 Referências de parâmetros operacionais na técnica de fiação em trabalhos da literatura	78
Tabela 11 Principais materiais utilizados neste trabalho.....	79
Tabela 12 temperaturas de transição e entalpias de fusão cristalina das amostras de PLLA e PDLLA analisadas	89
Tabela 13 - Viscosidades das soluções poliméricas de PLLA e PDLLA em NMP como solvente, a 20% (m/m) e 60 °C	89
Tabela 14 Comparativo entre propriedades mecânicas de fibras ocas sintetizadas com PLA na literatura e com nervo humano.....	94
Tabela 15 delineamento experimental para análise do efeito da temperatura do banho de imersão e da solução polimérica. Concentração polimérica = 20% (m/m).....	98
Tabela 16 - delineamento experimental para análise do efeito da concentração polimérica. Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C	98
Tabela 17 - delineamento experimental para análise do efeito da composição do banho de imersão. Concentração polimérica = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C	99
Tabela 18 - delineamento experimental para análise do efeito da massa molar de PEG na solução polimérica. Concentração PDLLA = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C.....	99
Tabela 19 - delineamento experimental para análise do efeito da concentração de PVP na solução polimérica. Concentração PDLLA = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C.....	99
Tabela 20 resultados do delineamento experimental para efeito da temperatura do banho de imersão e da solução polimérica. Concentração polimérica = 20% (m/m)	100

Tabela 21	resultados do delineamento experimental para análise do efeito da concentração polimérica. Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C	101
Tabela 22	- resultados do delineamento experimental para análise do efeito da composição do banho de imersão. Concentração polimérica = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C	104
Tabela 23	- delineamento experimental para análise do efeito da massa molar de PEG na solução polimérica. Concentração PDLLA = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C; Composição do banho de imersão = 100% água	106
Tabela 24	resultados do delineamento experimental para análise do efeito da concentração de PVP na solução polimérica. Concentração PDLLA = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C; Composição do banho de imersão = 100% água	108
Tabela 25	-Viscosidades das soluções poliméricas de PDLLA (20 % m/m). Temperatura = 60 °C	112
Tabela 26	-Parâmetros de interação de Flory-Huggins e de Hansen e Hildebrandt para PDLLA, água e solventes utilizados neste trabalho	112
Tabela 27	-Influência de parâmetros presentes na transferência de massa sobre a velocidade de precipitação e concentração polimérica na interface durante o processo de inversão de fases.	114
Tabela 28	-Condições de fiação das fibras ocas de PDLLA	117
Tabela 29	-Diâmetros médios de poros (dP), diâmetro máximo de poro ($dP_{m\acute{a}x}$) e permeabilidades hidráulicas das fibras ocas preparadas	119
Tabela 30	- Massas molares média (Mn) e média ponderada (MW) iniciais das amostras submetidas ao teste de degradação in vitro	121
Tabela 31	- Valores de rejeição de BSA e lisozima	125
Tabela 32	fluxos de água e NaCl em testes de osmose direta	126
Tabela 33	-propriedades mecânicas das fibras ocas produzidas	127
Tabela 34	propriedades de transporte das fibras ocas utilizadas para testes de avaliação funcional	131
Tabela 35	- Resultados de testes de pressão crescente em pata de camundongos com fibra ocas HF-DIO-PVP e HF-DMSO	137
Tabela 36	Resultados de Índice de função isquiático obtidos nos testes de marcha após cada semana pós-lesão	139

1 Introdução

Polímeros biocompatíveis, biodegradáveis e bioreabsorvíveis vêm atraindo grande atenção no desenvolvimento de biomateriais para aplicações biomédicas. A engenharia de tecidos é uma área de conhecimento multidisciplinar, que busca o desenvolvimento de materiais que tenham o objetivo de restaurar, manter ou melhorar as funções de um tecido ou órgão danificado.

A lesão em nervo periférico afeta milhões de pessoas anualmente, podendo provocar sequelas e incapacidade física permanente. A tecnologia de membranas vem sendo utilizada para a confecção de implantes auxiliares para o tratamento de lesões em nervos periféricos como Conduítes de Guia Neural (CGN), sendo uma alternativa a tratamentos convencionais de autoenxerto.

A técnica de preparo de membranas por inversão de fases possibilita a formação e o controle de materiais microporosos em diferentes geometrias. Em particular, o processo de fiação por imersão-precipitação possibilita a obtenção de fibras ocas com dimensões variadas e controle do tamanho de poros e porosidade.

Polímeros como o poli(ácido lático) (PLA) apresentam propriedades adequadas para a sua aplicação como CGN. Entretanto, a técnica de síntese de membranas na forma de fibra oca por inversão de fases tem sido pouco utilizada para a obtenção de CGN a partir de PLA, principalmente pela dificuldade no controle das condições de precipitação que propiciem obtenção das características adequadas para a aplicação.

Neste trabalho são levantados pontos que merecem esclarecimento dentre as características desejadas para a aplicação de membranas de PLA como CGN. Um deles é o diâmetro médio de poros: são reportadas na literatura faixas ótimas de diâmetros médio de poros entre 5 a 20 μm para este tipo de aplicação. Embora seja uma característica recorrentemente reportada como um atributo desejável, há de se verificar se nutrientes ou gases como oxigênio não são capazes de migrar para a região intraluminal por difusão, mesmo em membranas mais fechadas. Além disso, há trabalhos na literatura que reportam efeitos de inchamento e comprometimento de propriedades mecânicas com a indução de porosidade em CGN comerciais [1], além de conclusões divergentes sobre a contribuição da porosidade sobre a eficácia do tratamento com CGN sintetizados a partir de diferentes

materiais [2–4]. Diante disso, uma investigação sobre o efeito comparativo de CGN sintetizados a partir do PLA com diferentes porosidades se faz necessária.

Apesar de existirem diversas abordagens e concepções no projeto de CGN, não há consenso na literatura científica sobre qual configuração ou procedimentos são os mais efetivos para o tratamento [5]. O desenvolvimento dos CGN ainda carece de estudos comparativos e metodologias que simulem ou apliquem estas abordagens de tratamento *in vitro* e *in vivo*.

A abordagem utilizada neste trabalho é a síntese de CGN cilíndricos, e não há estudos que demonstrem sistematicamente a influência da morfologia e porosidade de CGN sintetizados à base de PLA na eficácia do tratamento. Deve ser investigado como a morfologia com poros interconectados e a ocorrência de macrovazios afeta as propriedades mecânicas, a cinética de degradação e as propriedades de transporte do CGN, bem como sua influência durante a recuperação em testes de avaliação funcional *in vivo*.

O trabalho foi dividido em capítulos, estruturados e justificados da seguinte forma:

Os objetivos gerais e específicos são apresentados no capítulo 2.

Os capítulos 3, 4 e 5 apresentam uma revisão bibliográfica, buscando a concentração de informações referentes a biomateriais, estrutura básica do sistema nervoso humano e o estado da arte dos tratamentos utilizados para lesão em nervo periférico, incluindo a abordagem de utilização de CGN e os principais aspectos e limitações relacionadas a essa abordagem de tratamento. Também foi efetuada uma revisão sobre as principais propriedades e utilizações do poli(ácido lático) como biomaterial, e também sobre a teoria envolvida na técnica de síntese de membranas poliméricas por inversão de fases. Finalmente, um levantamento sobre os estudos mais recentes sobre aplicações e síntese de fibras ocas de PLA na literatura foi efetuado, buscando melhor contextualizar o trabalho.

O Capítulo 6 apresenta os materiais, técnicas, procedimentos e métodos utilizados para a síntese e caracterização das membranas no desenvolvimento da tese, e a apresentação dos resultados obtidos está dividida entre os Capítulos 7, 8, 9 e 10, que ilustram as etapas executadas.

No Capítulo 7, é apresentado um estudo comparativo do efeito da estereoisomeria do PLA na síntese de fibras ocas, comparando-se os isômeros poli(L- ácido lático)

(PLLA) e poli(D,L- ácido lático) (PDLLA). Após a análise de características das soluções poliméricas, análise térmica dos polímeros, aspectos relacionados à síntese, resistência mecânica e morfologia das membranas produzidas, foi possível se definir o PDLLA como polímero a ser utilizado no desenvolvimento do trabalho.

O Capítulo 8 apresenta um estudo dos efeitos das principais variáveis durante a síntese de filmes de PDLLA. Temperatura e concentração da solução polimérica, temperatura e composição e do banho de precipitação foram avaliados, bem como o efeito de aditivos poliméricos, como polietilenoglicol (PEG) e polivinilpirrolidona (PVP).

No Capítulo 9, são apresentados os resultados do estudo do controle das propriedades das fibras ocas produzidas para utilização como CGN. Foi avaliada nesta etapa a influência do uso de diferentes solventes (N-metil-pirrolidona, dimetilsulfóxido e dioxano) sobre a viscosidade das soluções poliméricas, velocidade de precipitação e sobre a dimensão dos diagramas ternários para cada sistema, utilizando água como não-solvente. Foi possível efetuar a confecção de fibras ocas com diferentes morfologias e propriedades de transporte. Por fim, foi avaliada a influência da morfologia das fibras ocas de PDLLA sobre a resistência mecânica e sua degradação *in vitro*.

O Capítulo 10 descreve os métodos de análise e resultados da avaliação de fibras ocas com diferentes propriedades de transporte e morfologias em testes de recuperação funcional *in vivo*, sendo que as membranas selecionadas foram utilizadas como CGN em lesões de nervo isquiático em camundongos. Esta etapa foi realizada com o suporte do Laboratório de Neurodegeneração e Reparo, localizado no Cento de Ciências e Saúde (CCS) da UFRJ. Após os procedimentos cirúrgicos, o desempenho das fibras ocas como implantes foi avaliado em testes de pressão crescente na pata de camundongos, testes de marcha e eletroneuromiografia. Os nervos tratados também foram analisados por morfometria, através da contagem de fibras neurais e vasos sanguíneos regenerados em cada grupo tratado.

Nos Capítulos 11 e 12, são apresentadas as principais conclusões do trabalho, bem como sugestões para trabalhos futuros, e as referências bibliográficas utilizadas.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é o desenvolvimento de membranas de PLA na geometria de fibra oca para serem utilizadas como implantes para tratamento de lesão em nervos periféricos, materiais também conhecidos como Conduítes de Guia Neural (CGN).

2.2 Objetivos específicos

Busca-se realizar um estudo sistemático sobre a síntese de fibras ocas de PLA, através do processo de inversão de fases por imersão-precipitação, técnica ainda pouco explorada neste tipo de aplicação. Os materiais produzidos serão caracterizados e avaliados em testes funcionais *in vivo*, para avaliar aspectos como morfologia e propriedades de transporte da fibra produzida na eficácia do tratamento. Desta forma, procura-se contribuir com o aumento da eficácia da aplicação de CGN tendo em vista as limitações ainda existentes frente à técnica convencional de autoenxerto.

Desta forma, os objetivos específicos deste trabalho são:

- Comparar e as variedades de isômeros do PLA (PLLA e PDLLA) e verificar as viabilidades para síntese e aplicação;
- Estudar o efeito de variáveis operacionais envolvidas na síntese de fibras ocas e ampliar o entendimento do efeito destas variáveis nas propriedades dos materiais sintetizados;
- Avaliar a influência de aditivos às soluções poliméricas durante a síntese de fibras ocas;
- Avaliar os sistemas PLA-solvente-não solvente-aditivos no processo de inversão de fases por imersão-precipitação para a síntese de membranas microporosas;
- Avaliar as propriedades mecânicas das fibras ocas produzidas, buscando atingir propriedades similares as de nervos periféricos;
- Verificar a influência da morfologia e porosidade das fibras ocas de PLA nas suas propriedades de transporte, cinética de degradação e na eficácia em testes funcionais *in vivo*.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3 Implantes para regeneração neural

Devido às características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e bioabsorção, membranas poliméricas sintéticas têm sido utilizadas na engenharia de tecidos com perspectivas promissoras. Este item apresenta o estado da arte da utilização de membranas como biomateriais e, em especial, as inovações e estado da arte no tratamento de lesão de nervo periférico, comentando-se suas respectivas limitações e vantagens.

3.1 Biomateriais - aspectos gerais

Biomateriais são projetados para o uso em contato direto com organismos, sendo essencial que o mesmo não cause danos ou efeitos fisiológicos adversos ao hospedeiro, ou seja, apresente biocompatibilidade. Os requisitos de biocompatibilidade são complexos e variam conforme a aplicação médica. Por exemplo, segundo Chen et al. (2013) [6] um biomaterial com desempenho satisfatório para uma aplicação ortopédica pode ser inapropriado para aplicações cardiovasculares devido a propriedades trombogênicas. A biocompatibilidade é classificada de acordo com sua capacidade de induzir ou causar morte de tecidos ou células (citotoxicidade), induzir a formação de câncer (carcinogenicidade), danificar genes (mutagenicidade), induzir respostas imunológicas (alergenicidade) ou indução de coagulação sanguínea (trombogenicidade).

A longo prazo a biocompatibilidade está associada principalmente à composição química do material e a natureza dos produtos gerados em sua degradação. A curto prazo, está associada a suas propriedades químicas e de superfície. Usualmente propriedades de superfície são modificadas para aumentar a interação do material com o paciente, visando suprimir sua resposta imunológica. A hidrofiliabilidade e a presença de grupos iônicos na superfície são características bastante observadas, uma vez que interferem diretamente na adesão de células sobre os biomateriais [6].

A introdução de biomateriais não deve ocasionar qualquer tipo de infecção, resposta imunológica, coagulação ou qualquer reação biológica que possa afetar as propriedades dos fluidos em contato e, conseqüentemente, a integridade do paciente. Para isso, é importante o acompanhamento da resposta do organismo associada à inflamação, fibrose e coagulação. Por exemplo, no contato do material com o sangue, a biocompatibilidade é associada com a coagulação sanguínea, adesão de plaquetas,

adsorção de proteínas e taxa de hemólise [7]. A resposta do material ao contato com o organismo também deve ser avaliada e, usualmente, é associada à fratura, corrosão, dissolução, degradação e inchamento.

A biodegradabilidade é um fator chave para os materiais usados em implantes para aplicações intracorpóreas. O inchamento e a lixiviação do biomaterial podem comprometer a sua integridade mecânica e química, alterando sua eficiência. Da mesma forma, o arraste de componentes lixiviados do biomaterial para a fase fluida do meio pode causar reações biológicas ao paciente. No caso de materiais poliméricos, a dissolução, lixiviação e difusão de componentes dependem principalmente da hidrofobicidade do polímero utilizado. Os mecanismos de degradação variam conforme a composição do material, mas a hidrólise de grupos funcionais é bastante recorrente em polímeros sintéticos.

A engenharia de tecidos é uma alternativa ao implante direto de órgãos ou substituição de tecidos danificados. Para isto, é necessário conhecimento interdisciplinar, aplicando-se princípios e métodos da engenharia em ciências biomédicas, com o objetivo de desenvolver materiais que propiciem a mimetização do ambiente fisiológico, físico e topográfico dos tecidos. Desta forma, procura-se permitir a adesão e a proliferação de material celular proveniente do próprio paciente para obter a restauração, manutenção ou melhoramento de órgãos ou tecidos [6, 8–10].

Embora materiais cerâmicos e metais também sejam empregados como biomateriais, polímeros sintéticos ou naturais são os mais utilizados na engenharia de tecidos, principalmente devido à sua versatilidade para mimetizar características estruturais de tecidos e a possibilidade de biodegradabilidade. Os biomateriais poliméricos mais utilizados são poliésteres alifáticos como o poli(ácido lático) (PLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e a policaprolactona (PCL), assim como suas misturas e copolímeros [6]. Tal fato é associado principalmente à biodegradabilidade, uma vez que são usualmente degradados através de hidrólise dos grupos éster, gerando produtos que podem ser expelidos pelo sistema excretor humano.

O projeto da morfologia dos suportes de células (*scaffolds*) é um dos principais desafios na engenharia de tecidos. Uma das estratégias é denominada “*top-down*” ou *in vitro*, na qual o suporte é produzido como uma estrutura tridimensional que serve como suporte temporário para células. Células isoladas são incubadas em condições adequadas para sua proliferação e formação de uma matriz extra-celular (MEC), se assemelhando ao

tecido nativo, que posteriormente pode ser transplantado ao paciente. Após a degradação e bioreabsorção do suporte polimérico, apenas o tecido transplantado permanece no organismo. Outra estratégia é denominada “*bottom up*” ou *in vivo* e consiste na confecção de materiais que possam ser diretamente acoplados a lesões no organismo, mimetizando a estrutura dos tecidos ou órgãos tratados através do crescimento, adesão e direcionamento celular sobre os suportes [6, 7, 10, 11]. A Figura 1 ilustra estas duas estratégias utilizadas na engenharia de tecidos.

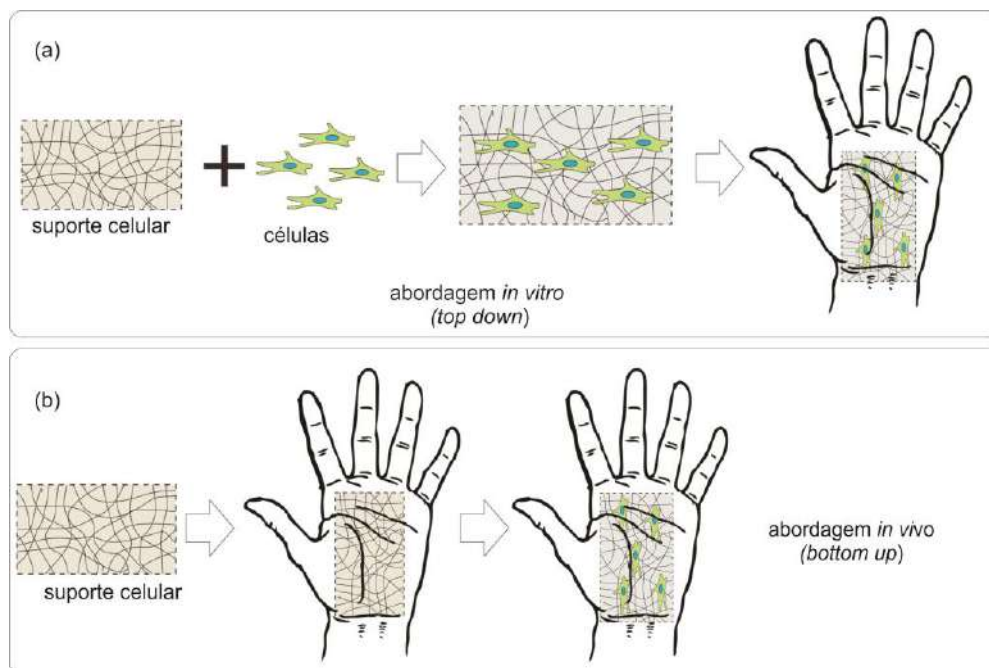


Figura 1 - Abordagens para o projeto de suportes celulares (scaffolds). (a) top down ou in vitro; (b) bottom up ou in vivo. Adaptado de [10]

Membranas poliméricas são amplamente utilizadas na medicina para fins terapêuticos. Em 1943, Willem Johan Kolff tratou um paciente com o primeiro dialisador com membranas, criando a concepção de “rim artificial” [12]. Atualmente, a tecnologia de membranas é estabelecida para tratamentos clínicos como hemodiálise, hemofiltração, hemodiafiltração, aférese terapêutica e oxigenação de sangue. A hemodiálise é o tratamento mais comumente utilizado em casos de doenças renais crônicas, sendo que no final de 2012, o número de pacientes tratados no mundo era de cerca de 2,4 milhões com estimativa de crescimento anual de 7% [13]. Atualmente, a produção e o mercado de membranas poliméricas para aplicações biomédicas iguala ou supera a soma de todas as demais aplicações dos processos de separação por membranas (PSM) [7].

O interesse da utilização da tecnologia de membranas vem sendo intensificado pela aplicabilidade na engenharia de tecidos, como em tratamentos como dispositivos de liberação controlada de medicamentos [14], implantes vasculares [15] e, mais recentemente, como implantes auxiliares em tratamentos para regeneração de nervos [16]. Nesta última aplicação, membranas porosas são utilizadas como guias auxiliares para a regeneração de nervos, sendo uma alternativa a tratamentos convencionais de autoenxerto.

3.2 Sistema nervoso humano

O sistema nervoso é responsável pela maioria das funções de controle de um organismo, coordenando e regulando as atividades corporais, sendo o neurônio a sua unidade fundamental. O sistema nervoso humano é dividido estruturalmente em parte central (SNC) e parte periférica (SNP), conforme visualizado na Figura 2.

As fibras nervosas são as responsáveis pela condução dos impulsos nervosos dos órgãos dos sentidos e dos receptores sensitivos de várias partes do corpo para o SNC, e também pela condução de impulsos nervosos do SNC para os órgãos efetadores (músculos e glândulas) [17].

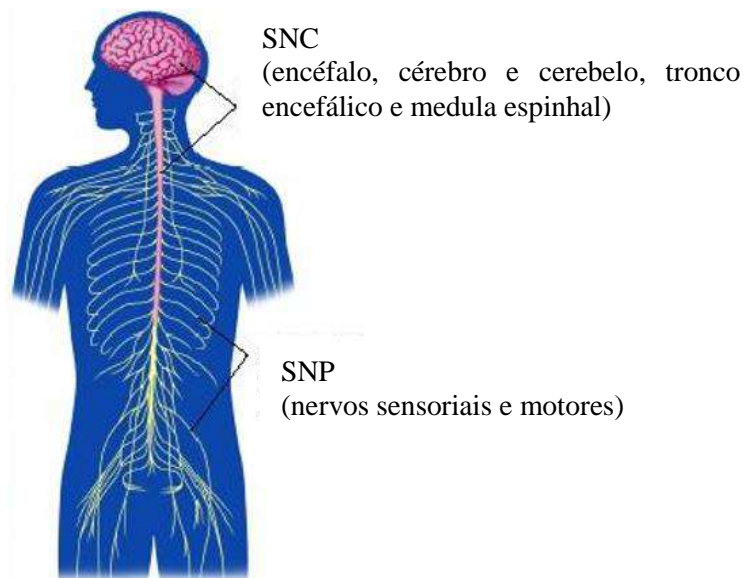


Figura 2 - Representação da divisão do sistema nervoso humano. Adaptado de (DANTAS JUNIOR, 2014)

Nervos sensitivos e motores são cordões formados por feixes de axônios reforçados por tecido conjuntivo conhecidos como endoneuro, epineuro e perineuro. Sua principal função é conduzir impulsos nervosos do SNC para a periferia e da periferia para

o SNC, possibilitando a interação do indivíduo com o ambiente [17]. Os nervos periféricos são extensões do SNC e responsáveis pela integração das atividades das extremidades, em suas funções sensitiva e motora.

Os axônios são usualmente revestidos por envoltórios de mielina, que é um material lipoproteico com função isolante, formando bainhas de mielina. A bainha de mielina está diretamente ligada à velocidade da condução dos impulsos nervosos.

3.3 Lesão de nervo periférico

A lesão no nervo periférico é um problema em larga escala que afeta milhões de pessoas, podendo provocar sequelas e, em alguns casos, incapacidade física permanente [18–20]. Lesões em nervos periféricos resultam em um significativo problema de saúde ocupacional gerando cerca de 5 milhões de dias de afastamento a cada ano [21] e, aproximadamente, 200.000 procedimentos de reparo de nervos periféricos são executados anualmente nos Estados Unidos [21].

Tais lesões podem ser causadas por traumas, esmagamento, compressão, estiramento, secção parcial ou total que causem a interrupção dos impulsos nervosos e a diminuição ou perda da sensibilidade e motricidade da região inervada [19]. Após a lesão do nervo periférico ocorre a degeneração e fragmentação de seu segmento distal (afastado do SNC), acompanhado de sua bainha de mielina, constituindo a degeneração Walleriana [5, 17]. Nestes casos, se inicia um complexo processo de crescimento das fibras da extremidade proximal (conectado ao SNC), dando origem a numerosos brotamentos que procuram alcançar a extremidade distal do nervo lesionado.

A regeneração no SNC é muito limitada, mas a literatura indica que os axônios lesionados do SNP possuem alta capacidade de regeneração, podendo voltar a se conectar com o órgão-alvo [5]. Entretanto, recuperações funcionais espontâneas efetivas ocorrem apenas excepcionalmente, uma vez que o crescimento das fibras do tecido nervoso provenientes do coto proximal ocorre de forma desorganizada, tornando a possibilidade do nervo regenerado encontrar o órgão alvo muito remota. Para se obter resultados clínicos satisfatórios, tratamentos e intervenções cirúrgicas são usualmente utilizadas.

3.4 Tratamentos para regeneração de nervo periférico

3.4.1 Tratamentos convencionais

Sobre lesões com espaçamentos (“gaps”) relativamente curtas entre as extremidades do nervo periférico lesionado, a regeneração natural e espontânea pode ocorrer. Entretanto, em casos onde há perda de tecido neural reparo microcirúrgico é requerido. O procedimento padrão é a neurorrafia, ilustrada na Figura 3, que consiste no reparo através da junção direta das extremidades proximal e distal seccionadas, também conhecido como sutura ponta-a-ponta, sendo limitado a lesões com espaçamentos curtos, de no máximo de 5 mm, devido a necessidade de ausência de tensão nas suturas no ponto do tratamento [20, 22]. Além disso, para otimizar o processo regenerativo, as terminações nervosas devem estar devidamente alinhadas e ligadas com o menor número possível de suturas visando a minimização de danos ao tecido, e a conexão apropriada entre fibras sensitivas e motoras.

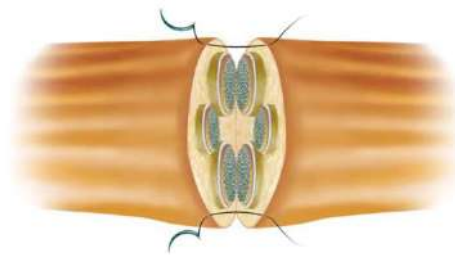


Figura 3 - Ilustração da técnica de neurorrafia. Adaptado de Junior (2014) [23]

A técnica de autotransplante ou autoenxerto é atualmente considerada como o melhor procedimento (“gold standard”) para o tratamento de lesões em nervos periféricos [5, 19, 20, 24]. Em geral, nervos sensitivos, como o nervo sural, são extraídos do próprio paciente e utilizados como enxerto. Entretanto, o tratamento apresenta uma taxa de sucesso na faixa de 50% [20]. Além disso, segundo Marquardt & Sakiyama-Elbert [25] menos de 25% dos pacientes recuperam significativamente funções motoras e menos de 3% recuperam sensibilidade.

As principais restrições e desvantagens inerentes deste tratamento podem ser destacadas [19, 21, 26]:

- Descontinuações morfológicas e dimensionais (tamanho, calibre e alinhamento) entre o nervo submetido ao tratamento e o utilizado para o enxerto. Fibras neurais motoras possuem dimensões distintas de fibras sensitivas, logo a utilização de enxertos de nervos sensitivos para o tratamento de lesões motoras gera grande potencial de incompatibilidade, limitando a eficiência do tratamento.

- Necessidade de duas intervenções cirúrgicas (uma para a inserção e outra para a retirada do enxerto), aumentando tempo de recuperação e custos operacionais;
- Suprimento limitado de enxerto;
- Alto índice de morbidade na região doadora, como sequelas sensoriais, dores e formação de neuromas;
- Limitação a aplicação em lesões com espaçamentos superiores a 5 cm.

3.4.2 Conduíte de Guia Neural (CGN)

O conceito de canais ou conduítes tubulares como guias de regeneração de nervos foi originalmente proposto em 1881, com sua primeira aplicação bem sucedida relatada em 1882, em que um tubo oco de osso foi utilizado em um cão como canal em uma lesão com defeito de 30 mm [19]. Atualmente, o desenvolvimento de conduítes tubulares sintéticos vem sendo estudado como alternativa ao tratamento de autoenxerto, sendo denominados de Conduítes de Guia Neural (CGN).

As principais vantagens da utilização de CGN em relação aos tratamentos convencionais são a redução da taxa de morbidade e necessidade de apenas uma intervenção cirúrgica, o que levam a maior comodidade ao paciente. Além disso, possibilita a conexão das extremidades proximal e distal com espaçamentos superiores a 5 cm, ampliando as possibilidades de tratamento.

Entretanto, as aplicações de CGN ainda não atingem o nível de sucesso do procedimento de autoenxerto, mostrando baixa recuperação funcional [19, 20, 22, 25]. Kehoe et al. [21] apresentam uma ampla revisão comparando os resultados clínicos em humanos e animais após os tratamentos convencionais e a utilização de diversos CGN comerciais. Os autores observaram que apenas em alguns casos a utilização de CGN foi comparável ao tratamento convencional.

Para a síntese de CGN, existem diversos materiais biocompatíveis e biodegradáveis licenciados pela agência norte americana *Food and Drugs Administration* (FDA). Dentre eles destacam-se os polímeros sintéticos policaprolactona (PCL), o polihidroxibutirato (PHB), o poli(ácido láctico) (PLA), o poli(ácido glicólico) (PGA) e o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA). Dentre os materiais não sintéticos, quitosana, alginato, queratina e colágeno são utilizados.

Kehoe et al. (2012) [21] discorrem sobre a eficácia de materiais utilizados como CGN aprovados pela FDA e lista as principais companhias produtoras, juntamente com a especificação dos materiais utilizados em sua fabricação, as dimensões e tempo médio de degradação. Entre 1995 a 2014, observa-se 17 produtos licenciados pela FDA como CGN. A Tabela 1 relaciona os produtos, fabricantes e materiais utilizados.

Tabela 1 - CGN clinicamente aprovados pela FDA e disponíveis comercialmente

Produto	Empresa	Material	Tempo de degradação	Distância de lesão máxima recomendada
Neurotube®	Synovis Micro Companyes	PGA ¹	6 a 12 meses	3 cm
Neurolac®	Polyganics Inc.	PLCL ²	2 a 3 anos	3 cm
Neuragen®	Integra Neurosciences	Colágeno	4 anos	3 cm
NeuraWrap®		Colágeno	4 anos	4 cm
Neuromax®	Collagen Matrix Inc.	Colágeno	4 a 8 meses	2,5 cm
Neuromend®				
Neuromatrix®				
Neuroflex ®				
Salubridge®	Salumedica LLC	PVA ³	Não biodegradável	6,35 cm
Hydrosheat®				
Salutunnel®				
Surgisis Nerve Cuff®	Cook Biotech Products	MSIS ⁴	-	4 cm
AxonScarf®		PHB ⁵	-	-
CellScarf®				-
StemScarf®				-
Axoguard®	Cook Biotech Products	PHB		0,5 a 7 cm
Avance®	Axogen	ECM ⁶		-

Adaptado de [5, 19, 22, 26, 27]

1 – Poli(ácido glicólico)

2 – Poli(ácido DL-lático-co-ε-caprolactona)

3 - Poli(álcool vinílico)

4 - Matriz submucosa intestinal suína

5 – Polihidroxibutirato

6 – Matriz extra celular extraída de nervo cadavérico

Dentre os CGN sintéticos, destaca-se a Neurotube®, marca considerada como a mais utilizada em procedimentos de reparo de nervos periféricos e cranianos, devido a vantagens como comprimento, preço e dados clínicos disponíveis, sendo mais indicado para lesões em nervos palmares com espaçamentos de até 3 cm [21]. A Neurotube® produz CGN à base de poli(ácido glicólico), que possui boas propriedades mecânicas, porém alta taxa de degradação e subprodutos de degradação com características ácida, que conferem desvantagens em termos de desempenho e bioreabsorção.

O Neurolac® é um CGN sintético produzido a partir do poli(D,L lático-co-ε-caprolactona). Resultados clínicos de recuperação funcional promissores foram relatados, sendo comparáveis aos de autoenxertos em lesões com espaçamentos de 20 mm. Porém,

ainda apresenta problemas mecânicos associados à sua alta rigidez, o que, em alguns casos, desfavorece o crescimento celular intraluminal e o procedimento de sutura [21].

Verifica-se que não existem produtos comerciais registrados como CGN sintetizados a partir de PLA, bem como nenhuma patente depositada. Isto demonstra um grande potencial de mercado.

A confecção de um CGN deve atender requisitos de ordem física e mecânica, possuir biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de promover adesão celular. Estas características são necessárias para se aumentar o número, velocidade de crescimento e comprimento dos axônios regenerados. Dentre estas características, são reportadas na literatura [5, 15, 17–21, 24–26, 28–31]:

- Estrutura tubular oca para permitir o confinamento de material celular em seu interior, apoiando a sua migração e guiando o crescimento axonal;
- Diâmetro intraluminal e espessura de parede adequados para a aplicação, acomodando o nervo e evitando sua compressão;
- Síntese a partir de material que possua baixo grau de inchamento, evitando compressão do tecido neural;
- Permeabilidade que promova o transporte de oxigênio e nutrientes para o interior do canal, e de resíduos endógenos para fora do mesmo, evitando também aumento de pressão devido à retenção de líquido celular. Também deve ser capaz de reter células na região interna do condúite e reter a entrada de fibroblastos. Diâmetros de poro entre 5 a 20 μm e porosidade de 60 a 80% são recomendados;
- Resistência mecânica e flexibilidade durante o implante (sutura e manipulação) e durante o tratamento (movimento do paciente). Propriedades mecânicas similares aos do nervo humano: Módulos de elasticidade entre 8 a 16 MPa, tensão de ruptura entre 6,5 a 8,5 MPa e alongamento de ruptura entre 0,6 a 1,6 mm/mm;
- Biocompatibilidade para evitar rejeição e morbidade;
- Biodegradabilidade adequada para o tempo de aplicação;
- Bioreabsorção para eliminar a necessidade de um segundo procedimento cirúrgico;

- Propriedades de superfície que possibilitem adesão durante a proliferação celular;
- Atendimento a requisitos técnicos de produção, esterilização e estocagem.

A importância do diâmetro médio de poros e da porosidade do CGN é reportada, sendo relatada a sua influência no número de axônios mielinizados [28]. Vale ressaltar que a necessidade da alta porosidade do CGN deve manter a restrição ao tamanho máximo dos poros para garantir o isolamento da área intraluminal ao meio externo.

Alguns autores consideram que poros menores que $5 \mu\text{m}$ inibirão o crescimento celular devido ao baixo fluxo de nutrientes, enquanto poros maiores que $30 \mu\text{m}$ propiciarão excessiva entrada de células inflamatórias e também a infiltração de fibroblastos [21, 26].

Entretanto, diversos estudos na transferência de massa em membranas porosas demonstram que poros com tamanhos inferiores a $5 \mu\text{m}$ não são restritivos a difusão das moléculas com baixa massa molar, como ocorre na hemodiálise e na oxigenação de sangue. Heath & Rutkowski [32] relataram que membranas de colágeno, apresentando retenção nominal de massa molar de 50 kDa, foram capazes de facilitar o transporte difusional de nutrientes e outras moléculas, prevenindo ao mesmo tempo a entrada de células no interior da estrutura do canal. Ruitter et al. (2009) [28] relatam que é possível se aumentar o fluxo de nutrientes para a região intraluminal sem a necessidade do aumento do tamanho de poros através do controle das características hidrofílicas no material do CGN.

A biodegradabilidade e estabilidade mecânica são também fatores chave para o sucesso da aplicação dos CGN. O canal deve permanecer intacto e manter suas propriedades mecânicas e de transporte durante o processo de crescimento dos axônios, mesmo ocorrendo sua degradação gradual. O processo de degradação não deve ocasionar inchamento significativo do material e os produtos de sua degradação não devem provocar reação corpórea.

3.5 Mecanismo de regeneração de nervos periféricos com CGNs

O processo regenerativo do tecido nervoso pode ser resumidamente descrito em 5 fases [19, 21, 25], conforme apresentado na Figura 4. Cada fase é caracterizada

considerando os intervalos de tempo observados utilizando como padrão o tratamento de lesões não críticas em nervos de camundongos com espaçamentos de 10 mm [19].

- (i) **fase fluida:** ocorre acúmulo de plasma proveniente das extremidades proximal e distal do nervo seccionado. Este plasma é composto de fatores neurotróficos e moléculas precursoras de matriz extracelular (MEC), cuja concentração atinge um máximo entre 3 a 6 h;
- (ii) **fase matriz:** Formação de filamentos acelulares de fibrina a partir das moléculas precursoras da MEC entre as extremidades proximal e distal. Essa formação ocorre após 1 semana do implante do canal;
- (iii) **fase de migração celular:** Após a segunda semana de regeneração, células de Schwann provenientes das extremidades distal e proximal migram através dos filamentos de fibrina, bem como células endoteliais e fibroblastos do meio, formando filamentos celulares. Os filamentos celulares, substituem os filamentos de fibrina, que se decompõem após 2 semanas de sua formação;
- (iv) **fase axonal:** Entre a segunda e a quarta semana as células de Schwann proliferam, se alinhando para formar filamentos com características tróficas e topográficas adequadas para o crescimento efetivo de neurônios, chamadas de Bandas de Büngner. Durante essa fase, há proliferação de brotos de axônios, guiados entre as extremidades do nervo pelas bandas de Büngner;
- (v) **fase de mielinização:** Entre a sexta e a décima sexta semana, as células de Schwann com fenótipo específico envolvem os axônios formando bainhas de mielina. A partir da formação de axônios mielinizados se observa efetivamente o reparo das fibras nervosas. Esta última fase é considerada a partir de valores estimados com base em lesões neurais com espaçamentos de 4 cm para humanos e lesões de 1,5 cm em nervo ciático de camundongos.

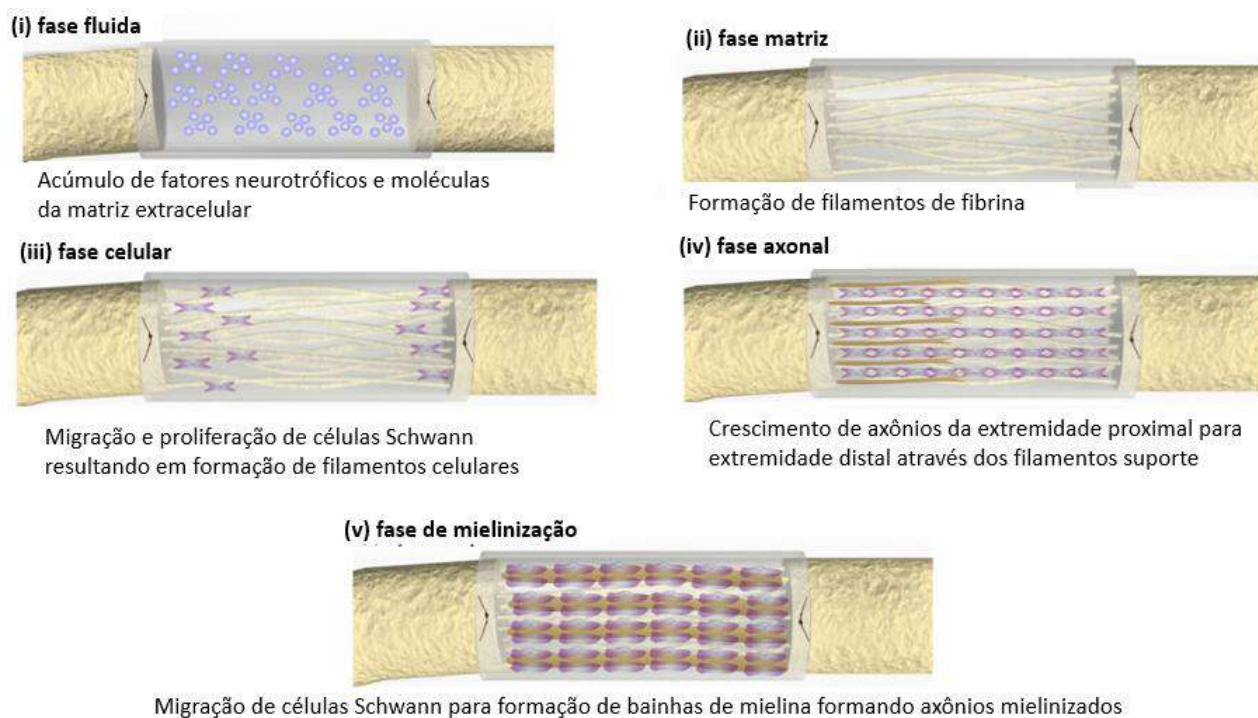


Figura 4 - Fases regenerativas ocorridas em implante de canais cilíndricos. Adaptado de Daly et al., (2012) [19]

3.6 Regeneração de nervos periféricos com CGN - Estado da arte

A principal limitação na eficiência de regeneração de nervos com a utilização de canais tubulares é atribuída à formação inadequada das Bandas de Büngner durante os estágios iniciais do tratamento [19, 25]. Alinhamento incorreto e condições morfológicas/topográficas desfavoráveis na fase matriz (ii) proporcionará más condições de proliferação celular para as fases posteriores de migração axonal e para a formação de bainha de mielina.

Diversas abordagens são utilizadas na síntese dos CGN para propiciar um ambiente favorável para a formação adequada dos filamentos de fibrina e para a posterior migração celular sobre estes (Figura 5). Independentemente da abordagem utilizada, o canal cilíndrico deve proporcionar facilidade de adesão, suporte e distribuição do nervo lesionado tridimensionalmente. As principais abordagens e suas combinações são [5, 21 25, 28]:

- Inserção de estruturas guias como suportes auxiliares ao crescimento e adesão celular;
- Modificação da estrutura/topografia da superfície do canal;

- Adição de sistemas de liberação controlada de fatores indutores de crescimento celular;
- Funcionalização de superfície interna;
- Inserção funcionalidades que facilitem a estimulação externa ao ambiente no interior do canal.

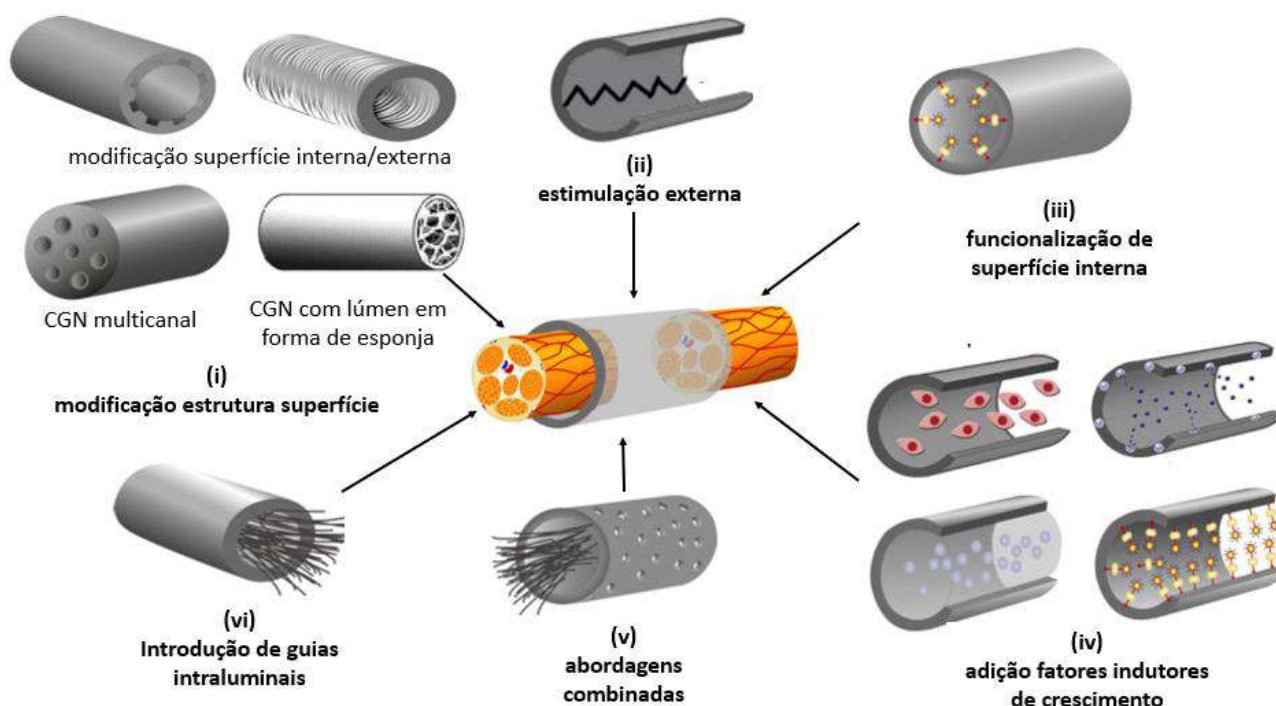


Figura 5 - Diagrama esquemático de estratégias para otimização de canais tubulares. Adaptado de, Daly et al. (2012) [19] e de Ruiter et al. (2009) [28].

A primeira e mais simples concepção de CGN foi a construção de cilindros com o espaço interno (lúmen) vazio. No intuito de se otimizar o tratamento, configurações mais complexas vêm sendo estudadas, alterando a topografia da superfície interna ou externa dos CGN, sua microestrutura e composição. Exemplos de modificações são a utilização de lúmen distribuído em multicanais e lúmen contendo estrutura porosa.

A inserção de guias intraluminais tem como intuito mimetizar a arquitetura dos filamentos de fibrina e direcionar a regeneração dos axônios no lúmen do CGN, conforme ilustrado na Figura 6. Sua funcionalidade consiste em fornecer suporte para o crescimento das Células de Schwann, auxiliando o direcionamento do crescimento axonal. Vale ressaltar que a porosidade dos guias intraluminais contribui para a regeneração axonal rumo à extremidade distal do nervo seccionado [25, 33].

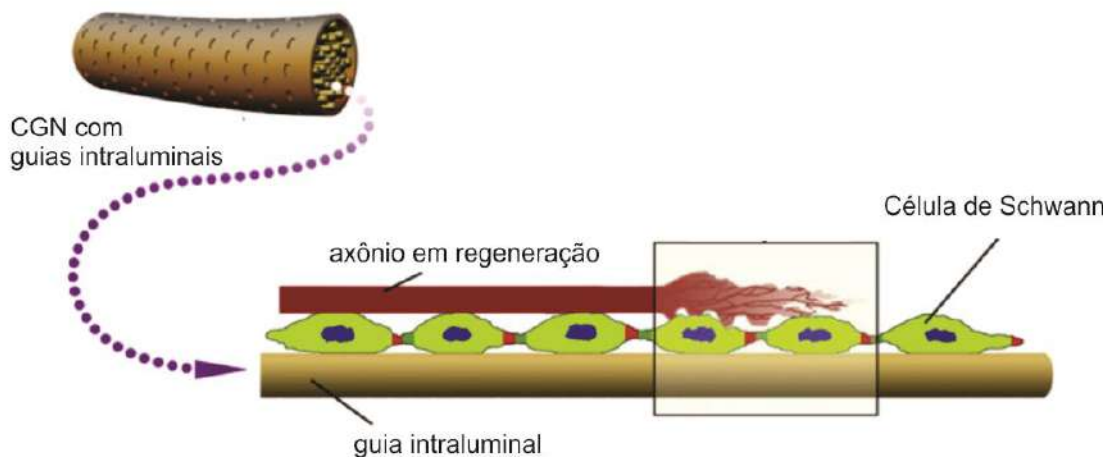


Figura 6 - Diagrama esquemático de CGN com guias intraluminais como suportes para crescimento Células de Schwann e direcionamento do crescimento de axônios. Adaptado de Gu, Ding & Williams (2014) [5].

A introdução de células-tronco no lúmen de CGN, em substituição as Células de Schwann, também vem atraindo recente interesse no campo da engenharia de tecidos face a maior facilidade de obtenção [5, 24, 34]. Outras células com propriedades neurotróficas baseadas em células precursoras da ME também vêm sendo investigadas.

A funcionalização da superfície interna do CGN é considerada para melhorar a adesão celular. Relata-se que a interação entre células nervosas e biomateriais contendo grupos iônicos promovem aumento da adsorção pela interação eletrostática entre as superfícies [5].

É também relatado aumento na taxa de crescimento celular quando guias intraluminais constituídos de materiais condutores são estimulados com impulsos elétricos [25, 35]. Materiais como polianilina, politiofeno e poliacetileno são investigados para a aplicação deste princípio. A baixa biodegradabilidade destes materiais condutores é uma limitação para esta abordagem, e diante disso, a mistura dos mesmos com outros materiais biodegradáveis vêm sendo investigada [36].

Outra concepção de projeto de CGN consiste na inserção de componentes que aceleram o crescimento celular, como neurotrofinas, compostos extraídos de células gliais, mediadores anti-inflamatórios, peptídeos bioativos e agentes antioxidantes. Estes componentes podem encontrar-se adsorvidos na superfície interna do CGN, presentes em microesferas para liberação controlada, imersos em géis ou incorporados na matriz do CGN [5].

A combinação dentre as abordagens descritas vem também sendo estudada. Chwalek et al., (2016) [37] estudam a utilização de guias intraluminais com diferentes geometrias (redondas e triangulares) funcionalizadas com proteínas em sua superfície. É reportado que a diferença entre os formatos dos guias intraluminais foram pouco relevantes para o crescimento axonal, porém o crescimento é afetado pela quantidade de proteína que reveste a superfície dos guias.

4 Poli(ácido láctico) PLA

Polímeros biodegradáveis vêm despertando grande interesse em inúmeras aplicações industriais nos setores alimentícios, de embalagens e biomédicos devido a sua biocompatibilidade e capacidade de degradação em temperaturas moderadas, gerando resíduos não tóxicos, o que facilita a bioreabsorção [38–40].

Dentre os polímeros biodegradáveis, o poli(ácido láctico) (PLA) vem sendo intensivamente investigado para aplicações biomédicas, como na engenharia de tecidos [18, 41–44], na hemodiálise [45, 46], em sistemas de liberação controlada de medicamentos [7, 14, 47, 48] e em implantes dentários e ortopédicos [49, 50].

Por suas características de biodegradabilidade e bioreabsorção, o PLA se apresenta como uma opção atrativa para a síntese de CGN. O PLA pertence à família de poliésteres alifáticos, sendo termoplástico com considerável amplitude de propriedades mecânicas, óticas e físicas [39]. Possui taxas de degradabilidade compatíveis com tratamentos de lesão em nervos periféricos e sua bioreabsorção é adequada pela geração de subprodutos facilmente expelidos pelo organismo. O PLA é produzido por empresas como Cargill Dow Polymers, Shimadzu Corp, Mitsui Chemicals, Musashino Co. principalmente para o mercado de embalagens, filmes, fibras têxteis e produtos farmacêuticos.

O isômero poli(L-ácido láctico) (PLLA) é amplamente utilizado na indústria biomédica devido a propriedades mecânicas adequadas para aplicações como cirurgias ortopédicas, suturas cirúrgicas, implantes para fixação óssea, sistemas de liberação controlada de medicamentos e engenharia de tecidos [51]. Devido à sua facilidade de processamento e solubilização, o PLLA se mostra como um material com potencial a ser utilizado para a síntese de membranas na forma de fibras ocas a fim de serem aplicadas como CGN.

4.1 Síntese

O monômero ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropanoico) pode ser sintetizado via métodos químicos e bioquímicos, sendo o segundo o mais usual [38]. Sua síntese é baseada na fermentação de amido e outros polissacarídeos disponíveis em matérias-primas abundantes e baratas como milho, beterraba, cana-de-açúcar, batata e outras biomassas. O ciclo do PLA é ilustrado na Figura 7:

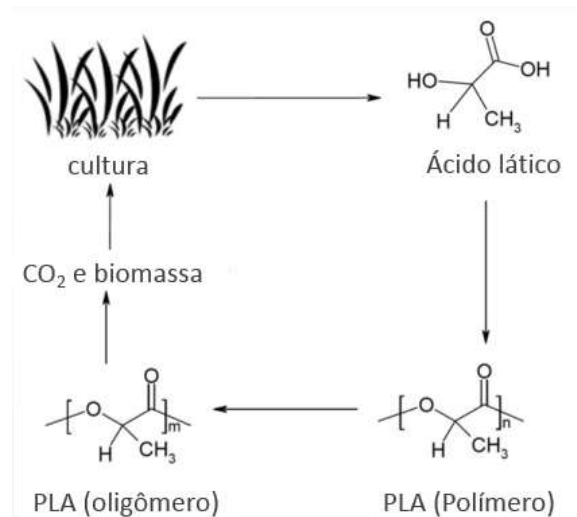


Figura 7- ciclo do PLA

O ácido láctico possui isomeria ótica, sendo ambos enantiômeros D- e L- produzidos pela seleção de microrganismos adequados para a fermentação [38]. O isômero L-ácido láctico é produzido em humanos e outros mamíferos, enquanto ambos os enantiômeros L- e D- são produzidos em sistemas bacterianos. Alguns dos microrganismos mais utilizados para a produção do L-ácido láctico são: *Lactobacilli amylophilus*, *L. bavaricus*, *L. casei*, *L. maltaromicus* e *L. Salivarius*. Para a produção de ambos os enantiômeros L- e D-ácido láctico utiliza-se *L. delbrueckii*, *L. jensenii* e *L. acidophilus* [52].

Embora haja certa divergência na literatura, a nomenclatura do PLA é usualmente determinada pelas diferentes rotas de polimerização do ácido láctico: polímeros derivados de policondensação são usualmente referidos como poli(ácido láctico), enquanto polímeros derivados da polimerização por abertura de anel são referidos como polilactídeos. Ambos, entretanto, são comumente mencionados como PLA.

A síntese através de policondensação possui restrições como baixas massas molares (1.000 a 5.000 Dalton), dificuldade para controle da estereoregularidade e das propriedades mecânicas [38, 39]. Entretanto, técnicas como polimerização em estado sólido, policondensação azeotrópica ou policondensação com a adição de agentes extensores de cadeia permitam a síntese de materiais com massas molares superiores a 100.000 Dalton.

O método de polimerização por abertura de anel, desenvolvido por Carothers et al. em 1932 e aprimorada por Dupont em 1954 possibilita a síntese de PLA com maiores

massas molares e alto grau de estereoregularidade, aumentando o campo de aplicação destes materiais [38, 52].

As técnicas de polimerização por abertura de anel se classificam em quatro mecanismos possíveis, em função do tipo de iniciador utilizado: polimerização aniônica, polimerização catiônica e mecanismos de coordenação-iniciação. A Figura 8 apresenta um diagrama simplificado das possíveis rotas de síntese de PLA.

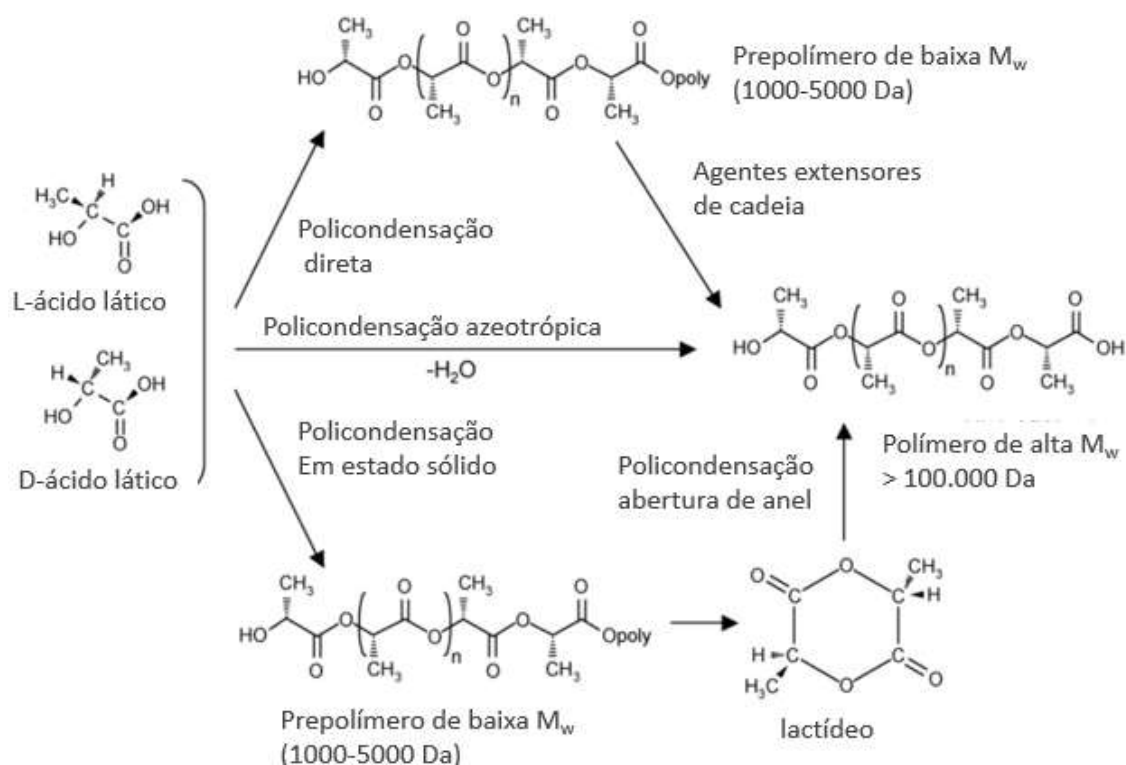


Figura 8 - Rotas para síntese de PLA de alta massa molar. Adaptado de Lim, Auras & Rubino (2008) [39].

As propriedades dos polilactídeos podem variar significativamente em função de sua estereoisomeria. A presença de um grupo metila pendente sobre o carbono quiral define a existência dos isômeros L- e D-. Os PLA disponíveis comercialmente são o poli(L-ácido láctico), poli(D-ácido láctico) (PDLA), copolímeros poli(ácido L-co-D,L láctico) (PLDLA) e a mistura de isômeros poli(D,L-ácido láctico) (PDLLA) (Figura 9). Propriedades como taxa de degradação, propriedades físicas, mecânicas e térmicas, densidade e solubilidade dependem da massa molar e de sua pureza óptica.

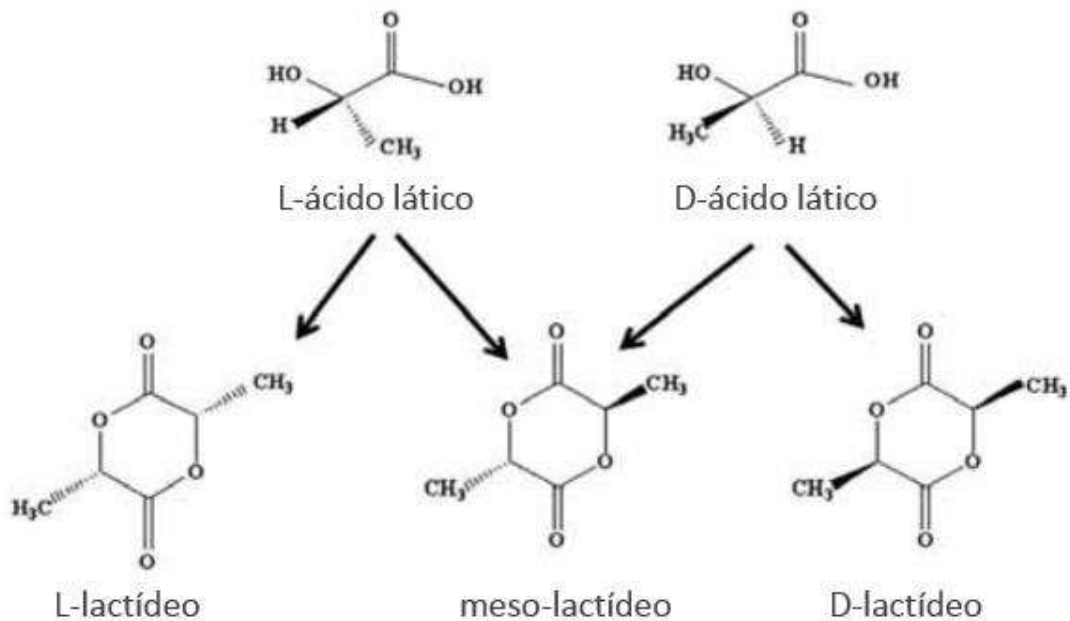


Figura 9 - isômeros de polilactídeos

4.2 Solubilidade

A solubilidade do PLA é altamente afetada pela sua massa molar, grau de cristalinidade e estereoisomeria. Segundo Gupta & Kumar (2007) [38], bons solventes para PLLA enantiomericamente puros são solventes orgânicos clorados e fluorados, dioxano, dioxolano e furano. Para PDLA, além dos previamente mencionados, pode se incluir acetona, piridina, lactato de etila, tetrahydrofurano, xileno, acetato de etila, dimetilsulfóxido (DMSO), N,N-dimetilformamida, N-metil-2-pirrolidona (NMP) e metil cetona. Não-solventes típicos para polímeros baseados em polilactídeos são água, álcoois como metanol, etanol, propilenoglicol e hidrocarbonetos não substituídos como hexano e heptano.

Garlotta (2001) [52] relata que PLA amorfos são solúveis na maioria dos solventes orgânicos como tetrahydrofurano, solventes clorados, benzeno, acetonitrila e dioxano. Enquanto, PLA semicristalinos são solúveis em solventes clorados e benzeno a temperaturas elevadas. A Tabela 2 apresenta valores de parâmetros de solubilidade do PLA e de alguns de seus solventes e não-solventes.

Tabela 2 - Parâmetros de solubilidade do PLA, solventes, não-solventes comumente utilizados.

Material	δ (MPa ^{0,5})
PLLA	20,5 – 21,1
PDLLA	20,0 – 21,1
DMSO	29,7
H ₂ O	47,9
1,4-dioxano	20,4
NMP	25,9
Clorofórmio	19,1

Fontes: [38, 51–55].

4.3 Propriedades térmicas e cristalinidade

Características físicas como densidade, capacidade térmica, propriedades mecânicas e reológicas são dependentes das temperaturas de transição do polímero. Urayama et al. (2003) [54] apresentam um estudo detalhado sobre a influência da estereoisomeria do PLA sobre as faixas de transição térmica, concluindo que a temperatura de transição vítrea (T_g) aumenta com a pureza óptica do material devido à maior frequência de estruturas helicoidais. Estas estruturas também justificam o aumento da cristalinidade e a maior densidade.

As temperaturas de fusão cristalina (T_m) e a T_g aumentam com o teor de isômeros L- [51, 54]. A Tabela 3 apresenta valores das temperaturas de transição térmica de copolímeros PLA reportados na literatura.

A relativamente baixa temperatura de transição vítrea dos PLA é tida como uma desvantagem por limitar a sua utilização em algumas aplicações [56]. Entretanto, considerando-se a temperatura corporal humana, não há restrição para seu uso como CGN.

Tabela 3 - Temperaturas de transição térmica em função do grau de copolimerização do PLA

Razão de copolímeros (L- / L,D-)	T_g (°C)	T_m (°C)
100/0	63	178
95/5	59	164
90/10	56	150
85/15	56	140
80/20	56	125

Fontes: [39, 52]

A estereoisomeria, massa molar e história térmica têm influência direta na cristalinidade do PLA. Materiais com teor de L- superiores a 90% tendem a ser semicristalinos, enquanto materiais com pureza óptica menos elevada tendem a ser amorfos [39]. Desta forma, PLLA e PDLA são materiais tipicamente semicristalinos, enquanto PDLLA é amorfo [38, 51, 54]. O PDLLA somente pode ser semicristalino quando as unidades D- e L- são sequencialmente alternadas, gerando o polímero poli(*meso* lactídeo).

4.4 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas do PLA como módulo de elasticidade, módulo flexural, tensão de ruptura e alongamento de ruptura podem variar significativamente, sendo afetadas principalmente pela massa molar e diferença de cristalinidade [18, 39, 40, 56–58]. Perego et al. (1996) [59] apresentam um estudo detalhado sobre a influência da massa molar e pureza óptica, relatando que o incremento da massa molar afeta as propriedades mecânicas do PLLA até o limite de aproximado de $\bar{M}_v = 55.000$. Devido a diferença de cristalinidade, PLLA possui estrutura mais ordenada e compacta, tendo melhores propriedades mecânicas do que PDLLA com mesma massa molar. A Tabela 4 apresenta algumas características mecânicas do PLA.

Tabela 4 - Valores típicos reportados na literatura para propriedades mecânicas e tempo de degradação para PLAs e outros biomateriais. Adaptado de Chen, Liang Thouas (2013) [6].

Polímero	Geometria	Resistência à tração (MPa)	Resistência compressão* (MPa)	Módulo de elasticidade (GPa)	Alongamento de ruptura (%)
PDLLA	Pellet	35	150		0,5 a 8
	Filme	29	35	1,9 a 2,4	5 a 6
PLLA	Pellet	40	120		2 a 10
	Filme	28	50	1,2 a 3	2 a 6
	Fibra	870	2300	10 a 16	

Verifica-se que o PLLA tem boas propriedades mecânicas como alta resistência à tração e módulo de elasticidade, porém apresenta baixa capacidade de alongamento e considerável friabilidade, o que se tornam limitações para sua aplicação como CGN. Técnicas para se aumentar a flexibilidade mecânica do PLLA são utilizadas, como misturas com outros polímeros, plastificação ou copolimerização [40].

Sawalha et al. (2008) [40] relatam que as propriedades mecânicas de filmes de PLLA são afetadas pela presença de microporosidade. Além disso, a dimensão dos poros também influencia propriedades como a ductilidade das membranas: para um material com mesma porosidade, um número maior de poros pequenos torna o material mais dúctil do que um número menor de poros maiores, que por sua vez é mais flexível e dúctil que um filme denso. Gao et al. (2015) [60] e van de Witte et al. (1996) [61] relatam que as membranas microporosas de PLLA com poros interconectados tipo esponja exibem maior flexibilidade do que membranas com macroporos do tipo digitiforme (“*fingerlike*”).

Para utilização do PLA como CGN, a resistência mecânica para sutura e manipulação devem ser equilibradas com a flexibilidade necessária para manter sua integridade durante o tratamento e após seu implante. Têm-se como referência que o CGN tenha propriedades mecânicas próximas, o máximo possível, às propriedades do nervo periférico a ser tratado. Chiono e Tonda-Turo (2015) [26] apresentam valores de referência para propriedades mecânicas de nervos periféricos, conforme verificado na Tabela 5.

Tabela 5 - Propriedades mecânicas de nervos reportadas na literatura

Nervo	Módulo de elasticidade (MPa)	Tensão de ruptura (MPa)	Alongamento de ruptura (mm/mm)
Nervo ciático (rato)	7,00	-	-
Nervo tibial (rato)	-	11,70 ± 0,7	0,39 ± 0,002
Nervo humano intacto	15,87 ± 2,21	6,78 ± 0,57	0,61 ± 0,02
Nervo humano extraído	8,19 ± 7,27	8,54 ± 3,37	1,64 ± 0,34

Adaptado de Chiono e Tonda-Turo (2015) [26].

4.5 Misturas de PLA com outros polímeros e aditivos

A característica quebradiça do PLA é um dos principais fatores limitantes de sua utilização em diversas aplicações [57]. Além disso, suas propriedades mecânicas são afetadas pelo processo de degradação, o qual é função da aplicação e do meio em que o material está inserido. Neste sentido, a aplicação do PLA pode ser limitada devido à dificuldade de controle das taxas de hidrólise, baixa hidrofiliabilidade, bem como rigidez e cristalinidade [38]. Para se contornar essas limitações, várias misturas de PLA e outros polímeros como amido, quitosana, polietilenoglicol (PEG), poli(óxido de etileno) (PEO) e policaprolactona (PCL) vêm sendo estudadas.

4.5.1 Polivinilpirrolidona (PVP) e Polietilenoglicol (PEG)

Polivinilpirrolidona (PVP) e polietilenoglicol (PEG) são relatados na literatura como agentes formadores de poros e controladores de morfologia durante a formação de membranas poliméricas via inversão de fases, sendo recorrentemente utilizados em trabalhos de síntese de membranas de PLLA [15, 47, 55, 60, 62, 63]. O PEG possui grande utilização na área biomédica, em aplicações em liberação controlada de medicamentos e engenharia de tecidos, por ser um polímero atóxico e biocompatível.

O aumento da interconectividade dos poros pode ocorrer devido à lixiviação do PVP disperso na matriz polimérica após o processo de inversão de fases. A adição de PVP também tem como efeito o aumento da hidrofiliabilidade das membranas de PLA, sendo este fenômeno previamente relatado por Zereshki et al. (2010) [62].

Gao et al. (2015) [46] relatam que mesmo a baixas concentrações de PEG e PVP, os mecanismos de inversão de fase podem ser controlados em função da massa molar do aditivo utilizado. A transição da formação de macrovazios digitiformes para poros em forma de esponja ocorre em função da concentração do aditivo utilizado. A extração do

aditivo remanescente na matriz do PLA após a formação das membranas foi capaz ainda de aumentar a porosidade de sua superfície.

Deng et al. (2002) [64] também relatam que PEG pode ser adicionado para se atenuar as limitações impostas devido à hidrofobicidade característica do PLA e aumentar sua biocompatibilidade. Os autores observaram que a introdução de PEG (MM = 6 kDa) foi capaz de acelerar expressivamente a degradação de microesferas de PLA.

4.5.2 Outros aditivos

Najafi et al. (2012) [65] verificaram que a incorporação de agentes extensores de cadeia como tris(nonilfenil)fosfito e policarbodiimida, influenciam as taxas de degradação nanocompósitos de PLA.

Misturas de PLLA com compostos de amido foram citadas na revisão de Garlotta (2001) [52]. Nestes trabalhos, é verificada a influência do teor e tipo de compostos de amido nas propriedades mecânicas e térmicas, efeitos na formação de cristais e morfologia de materiais. As propriedades mecânicas e térmicas de misturas com amido e outros plastificantes são apresentadas na Tabela 6

Tabela 6 - Propriedades mecânicas de misturas de PLA com plastificantes

Mistura PLA	Resistência à tração (MPa)	Alongamento de ruptura (%)	Módulo de elasticidade (GPa)	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_f (J/g)
PLLA (100%)	60,0	3,1	2,5	-	-	-
80:20 PLLA/amido	48,0 (20%)	2,5 (19%)	2,8 (-12%)	59,0	172,1	43,4
+ 5% PCL	40 (33%)	3,1 (-)	2,0 (20%)	55,7	171,1	31,6
+ 5% PEG400	30,8 (49%)	3,0 (3%)	1,1 (56%)	49,4	169,2	39,3
+ 5% glicerol	30,3 (50%)	4,7 (-52%)	0,7 (72%)	49,9	168,8	44,7
+ 5% álcool laurílico	20,5 (66%)	1,5 (52%)	1,3 (48%)	47,0	169,0	45,1

Valores entre parênteses: desvio do valor referente a PLLA (100%)
Adaptado de Garlotta (2001) [52].

Analisando a Tabela 6, verifica-se que todos os plastificantes foram capazes de diminuir a resistência à tração, aumentando sua flexibilidade se comparado ao PLLA puro. A maioria dos plastificantes diminuiu o alongamento de ruptura do PLLA, o que significa que o material se tornou mais quebradiço ou menos dúctil, com exceção da PCL, que não apresentou nenhum efeito, e do glicerol, que foi capaz de aumentar o alongamento de ruptura em 52%. Após a adição de amido, o módulo de elasticidade foi

aumentado, o que é um indicativo de que o amido tornou o material mais rígido e quebradiço, enquanto as adições de PEG400, glicerol e álcool laurílico tiveram o efeito de tornar o PLLA mais flexível e dúctil reduzindo o seu módulo de elasticidade em 56, 72 e 48%, respectivamente.

A alteração nas propriedades mecânicas do PLA em misturas com amido também foram relatadas por Sarazin et al. (2008) [66], onde composições de mistura de PLA/PCL/amido de 40/10/50 foram capazes de aumentar a ductilidade do PLA em até 55%.

4.6 Degradação

O sucesso da utilização do PLA em aplicações biomédicas está intimamente relacionado ao seu tempo de degradação, sendo este afetado por diversos fatores como cristalinidade, massa molar, hidrofiliicidade e também a presença de aditivos como os descritos na seção anterior [40]. A perda de massa sofrida devido à degradação do PLA é determinante em aplicações de liberação controlada de medicamentos e engenharia de tecidos, como a regeneração de nervos periféricos.

O estudo da taxa de degradação do CGN é necessário para garantir que o implante possua propriedades de transporte e mecânicas apropriadas durante o tempo adequado para o tratamento. Taxas de degradação muito rápidas podem induzir à falhas mecânicas e alteração nas propriedades de transporte, enquanto taxas muito lentas podem gerar resíduos do CGN capazes de causar reações inflamatórias [6, 46]. Em ambos os casos a eficácia do tratamento será comprometida.

O PLLA devido, principalmente, à semicristalinidade, é indicado para tratamentos que requerem longos tempos para recuperação como a regeneração de tendões e ligamentos [51].

A degradação térmica do PLA ocorre a temperaturas acima de 200°C, via hidrólise, cisão oxidativa de cadeia e transesterificação intra/intermolecular [52, 67]. Em temperaturas inferiores à da degradação térmica, o PLA é degradado a partir da hidrólise dos grupos éster da cadeia principal, gerando como produtos água e CO₂, substâncias facilmente metabolizadas pelo organismo [18, 38, 51].

PLA é insolúvel em água quando possui massa molar suficientemente alta. Entretanto, quando sujeito à degradação, cadeias poliméricas longas são convertidas em cadeias mais curtas, chegando a produzir oligômeros solúveis.

A degradação do PLA ocorre em dois estágios: no primeiro, a degradação consiste na penetração e difusão de água nas regiões amorfas, causando a hidrólise dos grupos ésteres das cadeias poliméricas; a segunda etapa ocorre no centro dos domínios cristalinos, que se degradam mais lentamente, o que pode causar respostas inflamatórias ao corpo. Dessa forma, misturas de seus isômeros são utilizadas para se acelerar essas taxas, uma vez que a degradação do PLDLA é consideravelmente mais rápida do que a do PLLA [51]. A presença de grupos hidrofílicos como $-NH$, $-COOH$, $-OH$ e $-NCO$ também auxiliam o processo de degradação [30].

O avanço da degradação causa o aumento do número de terminações carboxílicas nas cadeias, o que induz o fenômeno de autocatálise da hidrólise dos grupos éster. Conforme o tempo de degradação avança, oligômeros solúveis próximos à superfície podem ser carreados pelo meio aquoso antes de sua total degradação, enquanto os que permanecem retidos na matriz polimérica contribuem para o efeito autocatalítico.

O comportamento e mecanismos de hidrólise do PLA são afetados por uma série de fatores, incluindo a natureza do material e o meio de hidrólise. A difusão dos oligômeros solúveis formados no processo de degradação pela matriz polimérica dependem da distribuição de massa molar do PLA, grau de inchamento, estereoquímica, mobilidade segmental, hidrofiliçidade, cristalinidade e morfologia [38, 51]. Fatores relacionados ao meio como pH, força iônica e temperatura também influenciam na solubilidade de oligômeros com terminações carboxílicas, afetando o processo de biodegradabilidade [38].

Lopes et al. (2012) [51] ressaltam que o tempo de degradação total do PLA pode variar de 10 meses a 4 anos, de acordo com variações microestruturais como porosidade e cristalinidade.

Estudos sobre a degradação de PLA são apresentados na literatura em diversos meios, como culturas microbianas de *Pseudomonas putida*; água oceânica; tampão a pH 6,5; degradação enzimática; entre outros. A degradação hidrolítica do PLA foi avaliada por diversos autores [18, 47, 64, 68, 69]. A técnica mais comumente utilizado para avaliação da biodegradabilidade de PLA para aplicações biomédicas é o método

gravimétrico, mantendo a amostra imersa em solução salina contendo tampão fosfato a 37 °C [38].

A Tabela 7 apresenta alguns valores típicos dos tempos de degradação médios de alguns polímeros utilizados como biomateriais.

Tabela 7 - Valores médios de tempo de degradação do PLA e polímeros utilizados como biomateriais. Adaptado de [6]

Polímero	Tempo de degradação (meses)
PDLLA (amorfo)	12 – 16
PLLA (amorfo)	>24
PCL (semicristalino)	>24

4.7 Adesão celular

Devido à sua característica hidrofóbica, materiais biológicos como células, proteínas, microrganismos e enzimas são facilmente aderidas à superfície do PLA [45]. Este fato é, usualmente, uma limitação em processos hemodiálise devido à ocorrência de *biofouling*, mas para materiais constituintes dos CGN esta é uma característica desejável.

A morfologia e estrutura da superfície do CGN são fatores determinantes na adesão e proliferação celular. Para implantes ortopédicos, Gugala & Gogolewski (2004) [70] relataram índices de adesão e crescimento celular superiores em suporte celulares porosos de PLLA, quando comparados com suportes celulares não porosos.

5 Síntese de membranas poliméricas

A técnica de precipitação por imersão foi introduzida por Loeb e Sourirajan em 1962, possibilitando a síntese de membranas anisotrópicas de osmose inversa [71]. Desde então, diversos estudos foram desenvolvidos para a síntese de membranas com diferentes morfologias e propriedades para várias aplicações, desde membranas com pele densa para pervaporação e permeação de gases a membranas altamente porosas para microfiltração. Dentre as técnicas conhecidas, a técnica de inversão de fases por imersão-precipitação é a mais utilizada até o momento.

Nesta seção, serão discutidos os principais aspectos termodinâmicos e cinéticos da formação de membranas a partir da técnica de imersão-precipitação, comentando a abordagem das trajetórias de composição em diagramas ternários, bem como sua influência nas morfologias resultantes em membranas de PLA.

5.1 Técnicas de síntese de membranas poliméricas

Membranas poliméricas podem ser preparadas por diversos métodos que podem ser divididos em duas categorias: técnicas que não envolvem separação de fases como sinterização, estiramento, gravação (*track etching*), lixiviação (*template leaching*), recobrimento e polimerização interfacial [71, 72] e técnicas que envolvem separação de fases, como evaporação de solvente, exposição à atmosfera de vapores, precipitação por resfriamento e precipitação em banho de não-solvente (imersão-precipitação) [57, 72, 73].

Os processos de inversão de fase consistem na provocação de uma perturbação em uma solução termodinamicamente estável até que a mesma seja sujeita a uma condição de instabilidade, gerando a separação de fases no sistema. Esta perturbação pode ser feita através da variação da composição ou da temperatura. Desta forma, a descrição do fenômeno de solubilidade de sistemas poliméricos se torna importante para o entendimento do processo de síntese de membranas.

Diante da grande flexibilidade operacional e a possibilidade de se confeccionar membranas com ampla variedade de morfologias, o método de imersão-precipitação é o mais empregado na síntese de membranas poliméricas.

O processo se inicia com a solubilização de um polímero (P) em um solvente (S) e posterior imersão em um banho de não-solvente (NS). A transferência de massa entre o

S e o NS altera a composição da solução polimérica induzindo a uma condição termodinamicamente favorável à separação de fases. Ocorre então a formação de duas fases em equilíbrio: uma fase pobre e uma fase rica em polímero. Esta última se solidificará dando origem à membrana.

O procedimento mais simples para a síntese de membranas planas em escala laboratorial é o espalhamento da solução polimérica por uma superfície plana e lisa (geralmente uma placa de vidro) com o auxílio de uma faca de espalhamento, conforme ilustrado na Figura 10. A placa contendo o filme espalhado é imersa em um banho de precipitação contendo NS. Após a imersão, ocorrerá o fluxo de massa de NS do banho para o interior da solução polimérica (J_{NS}) e o fluxo de S da solução polimérica para o banho de precipitação (J_S).

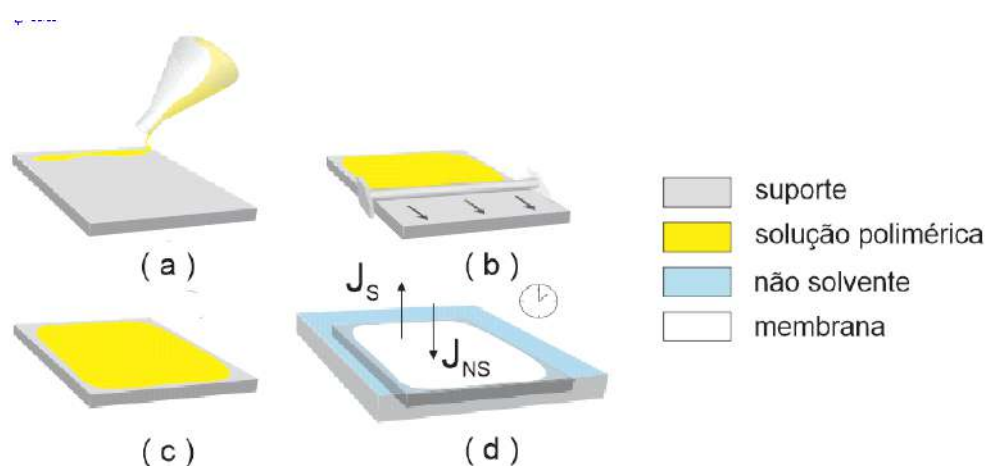


Figura 10 - Sistema típico de formação de filme de solução polimérica utilizando uma faca de espalhamento. (a) a (c): espalhamento da solução polimérica e formação de filme. (d): imersão em banho de NS. J_S : Fluxo de saída de solvente da solução polimérica. J_{NS} : Fluxo de entrada de NS na solução polimérica. Fonte:[74].

A técnica de síntese de fibras ocas é mais complexa do que a síntese de filmes planos, dado o maior número de variáveis envolvidas no processo. Nesta técnica, a solução polimérica e uma corrente de líquido interno escoam coaxialmente pelos canais de uma extrusora (*spinneret*) onde são imersos simultaneamente em um banho de precipitação. A corrente de líquido interno (que também atua como um banho de precipitação constituído principalmente de um NS) é responsável pelo espaço luminal da fibra.

A Figura 11 ilustra uma extrusora em sua configuração mais simples. A solução polimérica poderá permanecer exposta ao ambiente por um período curto de tempo antes

da imersão. Este tempo é usualmente estabelecido em função da distância entre a extrusora e o banho de precipitação (DEB).

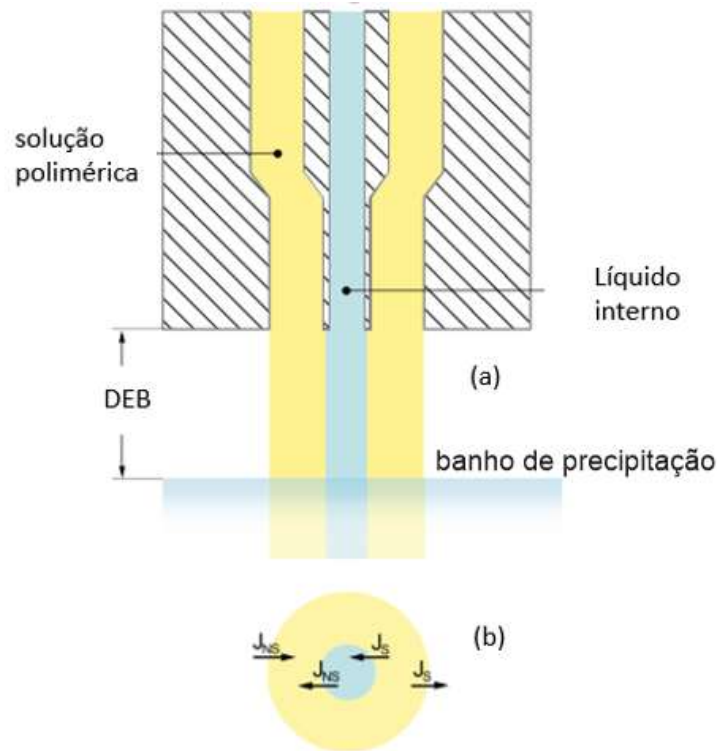


Figura 11 - Diagrama esquemático de uma extrusora simples. (a) seção transversal da extrusora; (b) sentido dos fluxos de transferência de massa.. Adaptado de Mermier (2012) [74].

5.2 Inversão de fases

5.2.1 Termodinâmica de sistemas poliméricos binários

O estado de um sistema pode ser descrito por variáveis de estado como a energia interna (U), entalpia (H), entropia (S) e energia livre de Gibbs (G) [75]. A energia livre de Gibbs é um parâmetro termodinâmico utilizado como critério de equilíbrio à temperatura e pressão constantes em um sistema. Dessa forma, a miscibilidade entre polímeros e solventes, ou mesmo a possibilidade de mistura de polímeros formando uma mistura monofásica é dependente da variação da energia livre de mistura de dois componentes (ΔG_m). A dada temperatura (T) e pressão (P) constantes é válida a relação termodinâmica:

$$\Delta G_m = \Delta H_m - T\Delta S_m \quad (1)$$

Onde ΔH_m é a entalpia de mistura e ΔS_m a entropia de mistura de um sistema. Um sistema será espontaneamente solúvel se $\Delta G_m < 0$. Caso $\Delta G_m > 0$, o sistema apresentará duas fases, cada uma contendo predominantemente um dos componentes.

5.2.1.1 Entropia de mistura

A entropia de mistura de um sistema polímero-solvente pode ser entendida através do modelo de teoria de rede para descrever o comportamento de solubilidade de macromoléculas em solução [76]. Neste modelo, verifica-se que a entropia de um sistema contendo macromoléculas em solução possui baixa degenerescência em relação a um sistema contendo dois componentes de baixa massa molecular, conforme ilustrado esquematicamente na Figura 12:

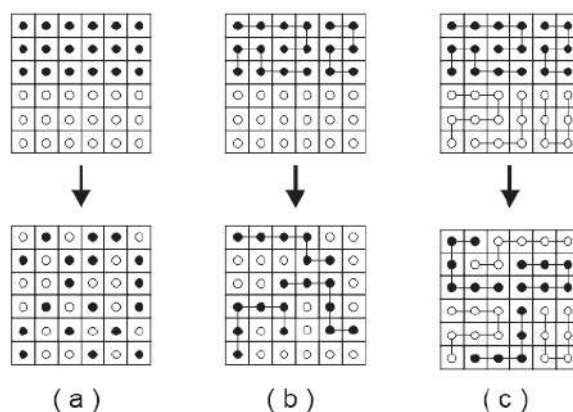


Figura 12 - Representação esquemática de misturas a) binária composta por 2 componentes de baixa massa molecular; b) solução polimérica; c) mistura polimérica binária. Fonte: [77].

Se tratando de macromoléculas, admite-se que um espaço na malha é ocupado por um segmento da cadeia polimérica ilustrada. Admitindo-se ainda que solvente e segmentos de cadeia possuam mesma dimensão, verifica-se que o número de maneiras de possíveis arranjos das moléculas em uma mistura com dois componentes de baixa massa molecular (Figura 12a) é consideravelmente maior do que a de uma solução contendo cadeias poliméricas (Figura 12b) que por sua vez possui mais possibilidades de rearranjo do que uma mistura contendo apenas macromoléculas (Figura 12c).

Uma vez que que a entropia de mistura de um sistema contendo macromoléculas é baixa, e que o valor da entropia de mistura é sempre positivo ($\Delta S_m > 0$), conclui-se que o termo de entalpia de mistura ΔH_m se torna o fator determinante para o critério de solubilidade de um sistema polímero-solvente [77].

5.2.1.2 Entalpia de mistura

A entalpia de mistura ΔH_m pode ser determinada para solventes apolares de baixa massa molar pelo modelo proposto por Hildebrand & Scott (1949) [76, 78]:

$$\Delta H_m = V_m \left[\left(\frac{\Delta E_1}{V_1} \right)^{0,5} - \left(\frac{\Delta E_2}{V_2} \right)^{0,5} \right]^2 \phi_1 \phi_2 \quad (2)$$

Onde V_m , V_1 e V_2 são os volumes molares da mistura e dos componentes 1 (solvente) e 2 (polímero); ϕ_1 e ϕ_2 as frações volumétricas dos componentes e ΔE_1 e ΔE_2 as energias de vaporização. O termo $\Delta E/V$ é conhecido como a densidade de energia coesiva (DEC). A DEC pode ser entendida como a energia necessária para se remover uma molécula de um sistema por evaporação. Sua raiz quadrada determina o parâmetro de solubilidade δ :

$$\delta = \left(\frac{\Delta E}{V} \right)^{0,5} \quad (3)$$

Desta forma a equação 2 se torna

$$\Delta H_m = V_m (\delta_1 - \delta_2)^2 \phi_1 \phi_2 \quad (4)$$

Verifica-se que para $\delta_1 = \delta_2$, o valor de $\Delta H_m = 0$, e conforme pode ser verificado pela equação 1, $\Delta G_m < 0$ e o sistema será sempre miscível. A diferença entre os parâmetros de solubilidade é entendida como a afinidade entre um polímero e um solvente. Quanto mais próximos os valores dos parâmetros de solubilidade de dois componentes, maior sua afinidade e mais miscíveis estes componentes serão entre si.

O parâmetro de solubilidade δ pode ser representado pela influência de três diferentes componentes, definidos como parâmetros de solubilidade de Hansen (HSP):

$$\delta^2 = \delta_d^2 + \delta_p^2 + \delta_h^2 \quad (5)$$

Onde

δ_d = parâmetro de solubilidade devido a forças de dispersão;

δ_p = parâmetro de solubilidade devido a forças polares;

δ_h = parâmetro de interação devido a pontes de hidrogênio.

O conceito de mistura ideal compreende que a entalpia de mistura ΔH_m seja sempre nula. Nestes casos, representados por misturas de moléculas de baixa massa molar, ou soluções poliméricas atérmicas, a separação de fases ocorrerá apenas na

presença de um termo entálpico de interação positivo $\Delta H_m > 0$. Para um sistema binário não ideal a energia livre de mistura ΔG_m é dada por

$$\Delta G_m = RT(n_1 \ln \phi_1 + n_2 \ln \phi_2 + n_1 \phi_2 \chi) \quad (6)$$

Onde o termo contendo o parâmetro de interação de Flory-Huggins χ representa a contribuição entálpica. Este termo é considerado como um parâmetro de excesso contendo a não idealidade do sistema [76].

5.2.2 Inversão de fases em sistemas binários

A Figura 13 apresenta a representação gráfica da energia livre de mistura ΔG_m em função das possíveis composições de um sistema binário ideal e não ideal:

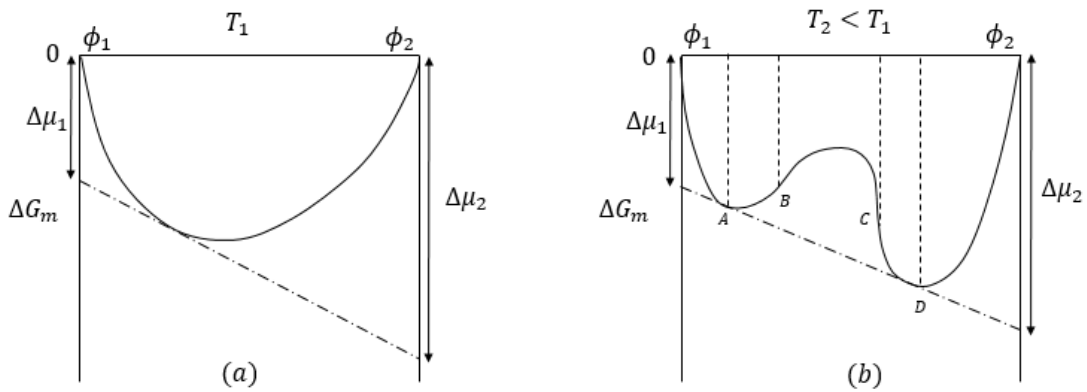


Figura 13 - Energia livre de mistura em função da composição de um sistema binário. (a) mistura binária ideal ($\Delta H_m = 0$); (b) mistura binária não ideal ($\Delta H_m > 0$). Adaptado de [72].

O potencial químico de um componente i em uma fase de uma mistura é definido como a variação da energia livre do sistema em relação a este componente a T , P e $n_{j \neq i}$ constantes. Esta definição pode ser aplicada à energia livre de mistura:

$$\left(\frac{\partial \Delta G_m}{\partial n_1} \right)_{T, P, n_2} = \Delta \mu_1 \quad (7)$$

Logo verifica-se que à temperatura T_1 (Figura 13a) o sistema é completamente miscível em toda a faixa de composições, e linha tangente à curva ΔG_m pode ser traçada para qualquer composição. Em temperaturas abaixo da temperatura crítica do sistema T_c (Figura 13b), a curva de ΔG_m apresenta dois pontos de mínimo localizados nas composições A e D . Estes pontos se encontram sob uma mesma tangente, logo possuem

mesma derivada, indicando que os potenciais químicos dos componentes na mistura são idênticos. Tal situação caracteriza o equilíbrio de duas fases com composições A e D.

O ponto crítico da Figura 13a se caracteriza pela condição da nulidade das derivadas primeira, segunda e terceira da variação da energia livre de mistura em relação à fração molar (equação 8). Os pontos de inflexão B e C na Figura 13b são caracterizados por $\frac{\partial^2 \Delta G_m}{\partial \phi_i^2} = 0$.

$$\frac{\partial \Delta G_m}{\partial \phi_i} = \frac{\partial^2 \Delta G_m}{\partial \phi_i^2} = \frac{\partial^3 \Delta G_m}{\partial \phi_i^3} = 0 \quad (8)$$

Pela representação dos pontos de mínimo e de inflexão das curvas geradas em função da temperatura, obtém-se as curvas binodal e espinodal respectivamente, conforme ilustrado na Figura 14:

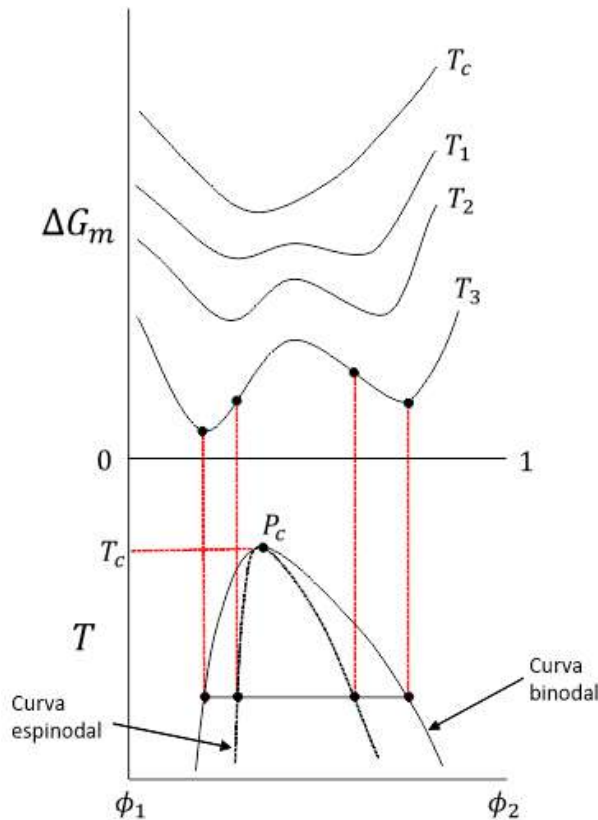


Figura 14 - Diagrama esquemático da construção de curva binodal e espinodal em sistema binário. $T_3 > T_2 > T_1 > T_c$
Adaptado de Mermier (2012) [74]

A curva binodal delimita o intervalo de miscibilidade do sistema. Pontos localizados fora da curva binodal constituem misturas monofásicas estáveis, enquanto que em pontos localizados dentro do intervalo, a separação de fases ocorrerá. A região

delimitada entre as curvas binodal e espinodal delimitam a região de meta-estabilidade do sistema.

O processo de síntese de membranas por inversão de fases se inicia no preparo de uma solução polimérica termodinamicamente estável, onde uma perturbação (comumente em sua temperatura ou composição) torne o sistema instável, forçando-o a uma nova configuração (separação de fases) para se minimizar sua energia livre de mistura. Os critérios para minimização de energia livre e para sua estabilidade termodinâmica são dados pelas equações 9 e 10:

$$(\Delta G_m)_{duas\ fases} < (\Delta G_m)_{uma\ fase} \quad (9)$$

$$\left(\frac{\partial^2 \Delta G_m}{\partial n_i^2} \right)_{T,P,n_{i \neq j}} > 0 \quad (10)$$

Com base nesta afirmação, é possível se verificar na Figura 15, três regiões distintas em função das condições termodinâmicas de estabilidade.

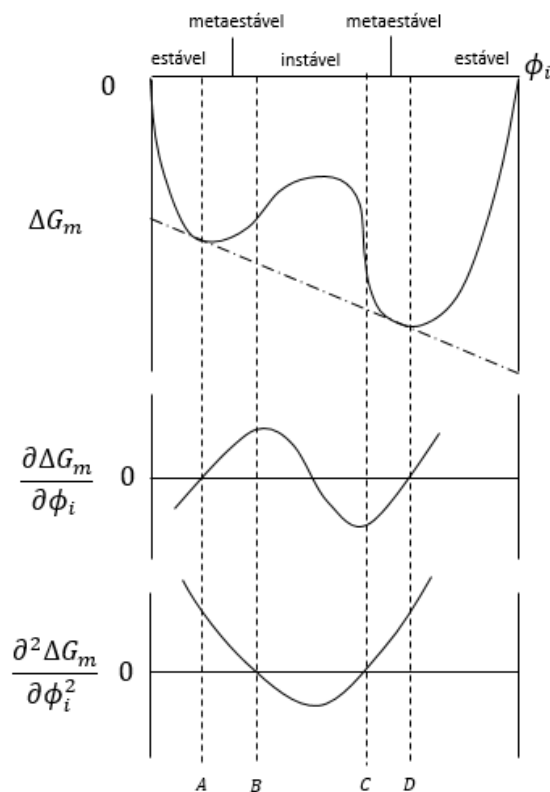


Figura 15 - Representação gráfica das curvas de ΔG_m , primeira e segunda derivada de ΔG_m em função da composição de um sistema binário polímero-solvente. Adaptado de Mulder (1997) [72].

No intervalo $B < \phi_i < C$ a derivada segunda é negativa, não satisfazendo o critério de estabilidade local. Logo esta região compreende a faixa de instabilidade do sistema, e

em qualquer mistura nestas condições haverá separação espontânea de duas fases com composições A e D. Os intervalos $A < \phi_i < B$ e $C < \phi_i < D$ apesar de satisfazerem o critério de estabilidade, não representam pontos de minimização de energia livre de mistura. Estas regiões são consideradas metaestáveis, apresentando condições favoráveis para a separação de fases. As soluções com composições $\phi_i > A$ e $\phi_i > B$ satisfazem todas as condições de estabilidade, sendo consideradas como regiões estáveis.

5.3 Inversão de fases por imersão-precipitação

A técnica de preparo de membranas poliméricas através da inversão de fases via precipitação por imersão em banho de não-solvente é mais complexa do que a inversão de fases por resfriamento, uma vez que existe um processo difusional entre três componentes envolvidos, bem como um complexo processo convectivo [71]. Nas próximas seções, as principais implicações relacionadas às morfologias e propriedades de membranas formadas por essa técnica serão comentadas.

Uma outra forma de induzir a instabilidade e separação de fases de um sistema polímero-solvente é através da alteração da composição da mistura através da adição de um terceiro componente, no caso não-solvente ao polímero. Nestas circunstâncias os sistemas também serão caracterizados por diagramas de equilíbrio ternário que representam a região de miscibilidade, conforme pode ser visto na Figura 16:

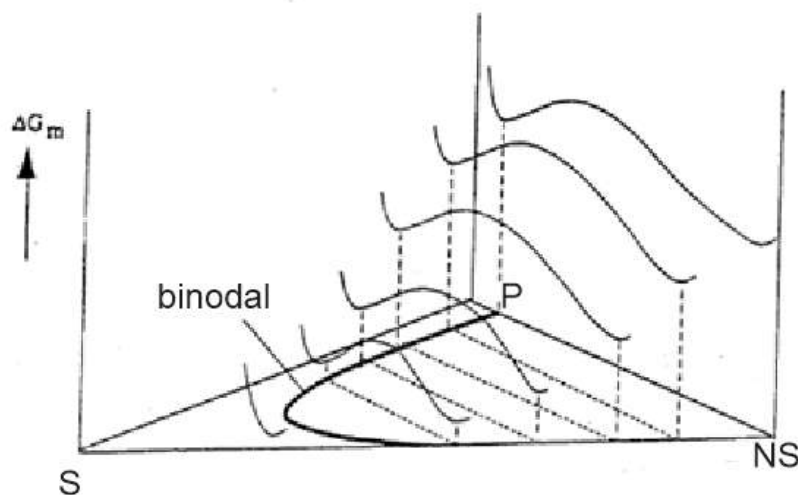


Figura 16 - Diagrama esquemático da energia livre de mistura (ΔG_m) em função da composição de um sistema ternário polímero-solvente-não-solvente. Adaptado de Mulder (1997) [72].

Neste tipo de diagrama, conforme já explicado, a região de miscibilidade é delimitada pela curva binodal, onde existe uma faixa de composições metaestáveis onde a energia livre do sistema pode ser minimizada através da separação em duas fases. A curva espinodal novamente representa a região de instabilidade e toca a curva binodal no ponto crítico (Figura 17).

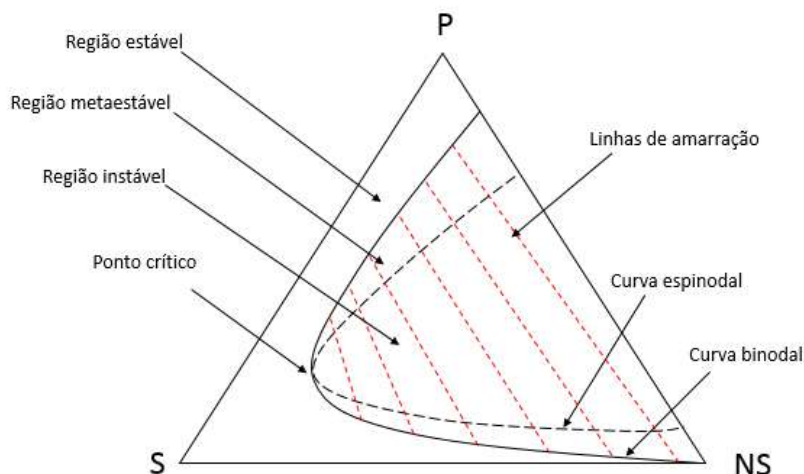


Figura 17 - Diagrama esquemático de região de miscibilidade de sistema ternário. Fonte: [72]

As curvas pontilhadas representam as linhas de amarração, que ligam os pontos que representam as composições de equilíbrio do sistema (fase rica em polímero e fase pobre em polímero). Os vértices do diagrama representam composições de 100% para polímero (P), solvente (S) e não-solvente (NS), pontos situados sobre os vértices representam misturas binárias e pontos localizados dentro do diagrama representam misturas ternárias.

Segundo a descrição do comportamento de soluções poliméricas proposta por Flory-Huggins, a extensão e formato da curva binodal dependerá dos volumes molares dos componentes, dos parâmetros de interação entre polímero-solvente ($\chi_{P/S}$), polímero-não-solvente ($\chi_{P/NS}$) e solvente-não-solvente ($\chi_{S/NS}$).

O parâmetro de interação $\chi_{P/S}$ pode ser determinado experimentalmente por osmometria, $\chi_{P/NS}$ através de testes de inchamento do polímero e $\chi_{S/NS}$ através de dados de energia livre de Gibbs em excesso.

Quanto à influência qualitativa dos parâmetros de interação com as curvas de miscibilidade nos diagramas ternários, é possível interpretá-los de forma resumida:

- Baixas interações entre P e NS (alto $\chi_{P/NS}$) implicam em maiores regiões de instabilidade;
- Polímeros e solventes com baixa afinidade (alto $\chi_{P/S}$) aumentam a magnitude da região instável;
- Baixas compatibilidades entre S e NS (alto $\chi_{S/NS}$) também aumentam a magnitude da região instável;
- Pequenas variações nas massas e volumes molares são negligenciadas frente aos parâmetros de interação.

Trechos dos diagramas ternários são comumente determinados experimentalmente através da determinação de pontos de turbidez ou *cloud points*. A determinação das composições onde ocorre a separação de fases é determinada através de titulometria (adição de NS ao sistema) ou resfriamento. Para sistemas contendo PLLA e PDLLA, boas correlações experimentais foram obtidas por van de Witte et al. (1996) [79], que determinaram os limites de solubilidade e faixas de transição teórica e experimental para diversos sistemas S/NS.

Para melhor compreender os fenômenos de vitrificação, gelificação e cristalização durante a síntese de membranas, diagramas ternários mais complexos, com regiões de transição de fases de não equilíbrio são representados, conforme na Figura 18 apresentada na próxima seção.

5.4 Formação de membranas trajetórias de precipitação e morfologias

Para se representar a mudança de composição da solução polimérica durante o processo de imersão-precipitação, trajetórias de variação de composição podem ser traçadas nos diagramas ternários. Durante a inversão de fases, a solução polimérica se empobrece em solvente e se enriquece em NS, por isso a trajetória destes caminhos tende a atingir o eixo P-NS.

Em linhas gerais, as trajetórias de precipitação são variações temporais hipotéticas da composição do sistema durante a imersão, e servem para se interpretar a influência de condições de síntese e sua influência na morfologia das membranas preparadas. A Figura 18 ilustra diferentes trajetórias possíveis durante o processo de imersão-precipitação e as morfologias típicas obtidas em cada caso.

As trajetórias de precipitação são o resultado da combinação entre as taxas de transferência de massa dos componentes P/S/NS e a velocidade/mecanismo de solidificação da fase rica em polímero (vitriificação, gelificação e cristalização). Estes fatores serão discutidos na seção 5.5.

De acordo com Kimmerle & Strathmann (1990) [80] e van de Witte et al. (1996) [61], cinco principais tipos de morfologias porosas são verificadas em fenômenos de inversão de fases:

- Estruturas esponjosas;
 - poros fechados;
 - poros abertos;
 - estrutura de rede;
- Estruturas granulares;
- Estruturas bicontínuas;
- Estruturas não conectadas (látex);
- Estruturas com macrovazios.

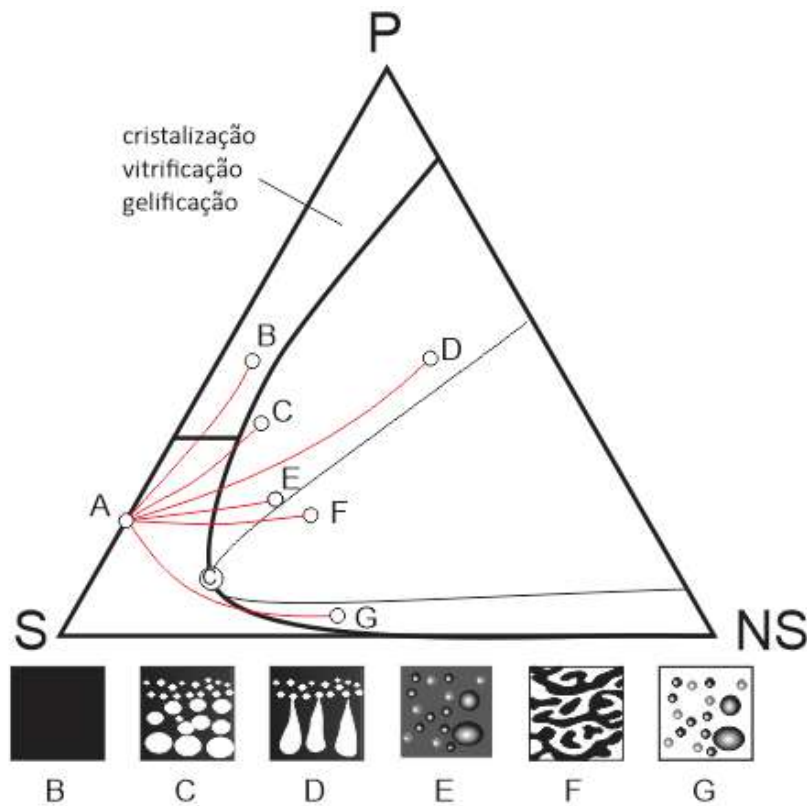


Figura 18 - Diagrama esquemático de possíveis caminhos de variação de composição da solução polimérica durante a inversão de fases, incluindo Regiões de gelificação, cristalização e vitriificação. B: filme denso isotrópico; C: estrutura porosa anisotrópica; D: estrutura porosa com macrovazios; E: estruturas nodulares; F: separação espinodal; G: formação de estrutura similar a um látex. Adaptado de Mermier (2012) [74].

5.4.1 Formação de filmes densos e isotrópicos Trajetória A-B

Este tipo de trajetória (Figura 19) caracteriza a precipitação lenta, resultando em membranas densas isotrópicas. Tal trajetória pode ser induzida pela evaporação de solvente na solução polimérica, de modo que seja pouco relevante a entrada de NS. Dessa forma, a concentração polimérica tenderá a aumentar até que se forme um gel. Outra possibilidade é a ocorrência de baixos fluxos de transferência de massa entre S e NS durante a imersão, causando a consolidação da membrana principalmente devido a efeitos viscosos sem cruzar, ou apenas tangenciando a curva binodal.

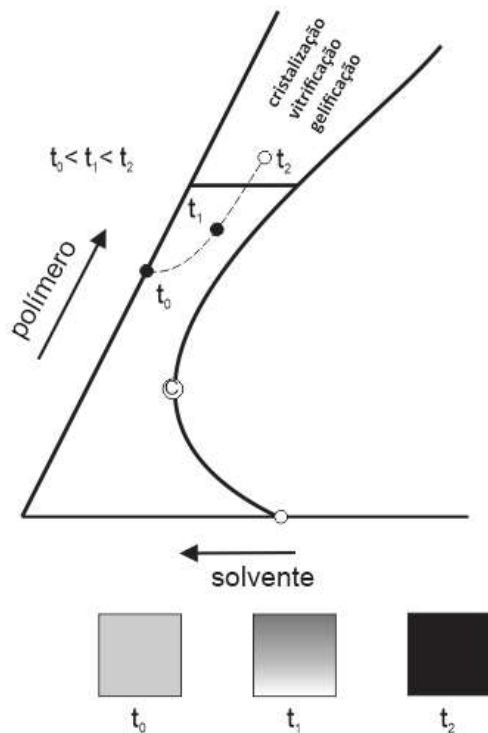


Figura 19 - Processo de precipitação com atraso: Ponto t_2 representa o instante de consolidação da estrutura da membrana. Adaptado de van de Witte et al., (1996b) [80].

5.4.2 Precipitação com atraso Trajetória A-C

Neste tipo de trajetória de precipitação, a solução polimérica permanece por um período de tempo (segundos) sobre a região homogênea do diagrama ternário. Neste período, a solução polimérica gradualmente aumenta sua concentração de NS até atingir a curva binodal. Este tempo é referido como tempo de atraso, sendo um dos parâmetros mais importantes para o entendimento das morfologias resultantes de processos de precipitação por imersão.

Em processos de precipitação com atraso a consolidação da fase sólida da membrana acontece em um ponto hipotético próximo à intersecção com a binodal. Imediatamente antes da separação de fases, este ponto no diagrama ternário se encontrará muito próximo ao ponto superior associado à linha de amarração (círculos brancos da Figura 20) indicando que a razão entre as massas rica em polímero (m') e pobre em polímero (m'') é muito superior à unidade. Nestas condições uma condição metaestável é atingida, na qual o mecanismo de separação de fases líquido-líquido por nucleação e crescimento é favorecido: Inicia-se a formação de uma fase dispersa composta por pequenos núcleos da fase pobre em polímero e, visando a minimização da energia livre de superfície do sistema, tendem a coalescer. A separação de fases pelo mecanismo de nucleação da fase pobre em polímero ocorrerá somente quando a região metaestável for atingida acima do ponto crítico.

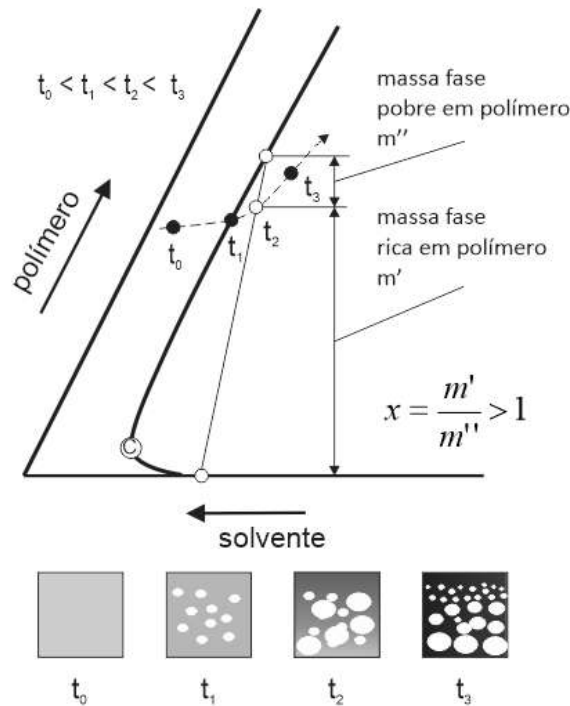


Figura 20 - Processo de precipitação com atraso: Ponto t_0 representa o instante de precipitação (próximo à binodal) razão mássica entre as fases $x > 1$. m' = massa da fase rica em polímero; m'' = massa da fase pobre em polímero. Adaptado de van de Witte et al., (1996b) [80]

Após a nucleação, haverá ainda transferência de massa entre os núcleos de fase pobre em polímero e a solução circundante, fazendo com que os mesmos cresçam até que a fase contínua rica, cada vez mais concentrada em polímero se solidifique via cristalização, gelificação ou vitrificação. A cristalização é usualmente um processo mais lento do que o processo de inversão de fases, entretanto em alguns sistemas a cristalização

ocorre mais rapidamente do que a separação líquido-líquido, principalmente em sistemas com altas concentrações poliméricas. Esta tendência é verificada durante a formação de membranas de PLLA e será discutida na seção 4.5.

O tempo decorrido até que a fase rica em polímero se solidifique definirá a dimensão dos poros, os quais são formados pelo volume ocupado pelos núcleos da fase pobre em polímero. No caso destes núcleos formarem esferas que se sobreponham parcialmente, estruturas esponjosas de poros abertos são obtidas, e caso contrário, a estrutura resultante é esponjosa de poros fechados. Quando os poros são altamente interpenetrados por outros poros, a tendência é a de formação de uma estrutura de rede (Figura 21).

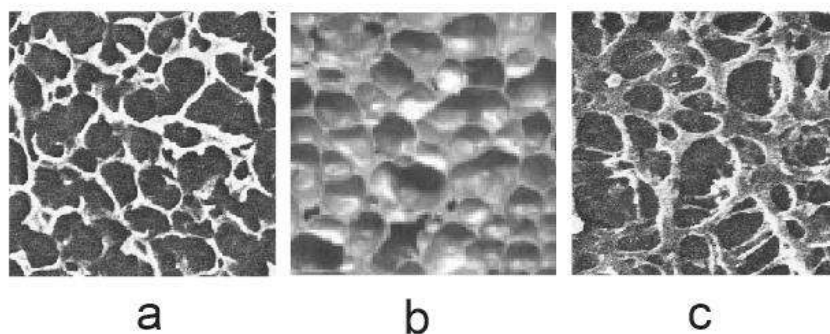


Figura 21 - Morfologia esponjosa: (a) poros abertos, (b) poros fechados, (c) estrutura de rede. Adaptado de van de Witte et al.,(1996b) [80]

As estruturas de poros fechados ou abertos são resultantes de precipitação com pequeno atraso se comparadas à estrutura de rede. Os mecanismos, efeitos e técnicas utilizadas para se controlar a velocidade de precipitação durante a inversão de fases serão discutidos na seção 5.5.

É comum, ao ocorrer a inversão de fases, regiões próximas à superfície concentrada se precipitem instantaneamente, criando uma pele fina densa, porém com subcamadas porosas. Essa camada densa gera uma resistência à transferência de massa entre a solução e o banho, o que resultará em precipitações mais lentas nas subcamadas, tornando-as porosas. Esta é o principal mecanismo de formação de membranas anisotrópicas desenvolvidas por Loeb e Sourirajan em 1962.

5.4.3 Separação espinodal - Trajetória A-F

Ocorrem em processos onde seja possível que a trajetória de precipitação se adentre profundamente à região de instabilidade de modo que atinja regiões interiores à curva espinodal antes da separação de fases.

Soluções que possuam composições que se encontrem dentro do limite termodinamicamente instável da espinodal, pequenas flutuações na composição resultarão em um decréscimo da energia livre do sistema, sendo a amplitude destas flutuações aumentada gradualmente devido ao movimento das moléculas de ambos os componentes para regiões de alta para regiões de baixa concentração (Figura 22). O comprimento de onda quando suficientemente alto gerará a separação de fases espinodal.

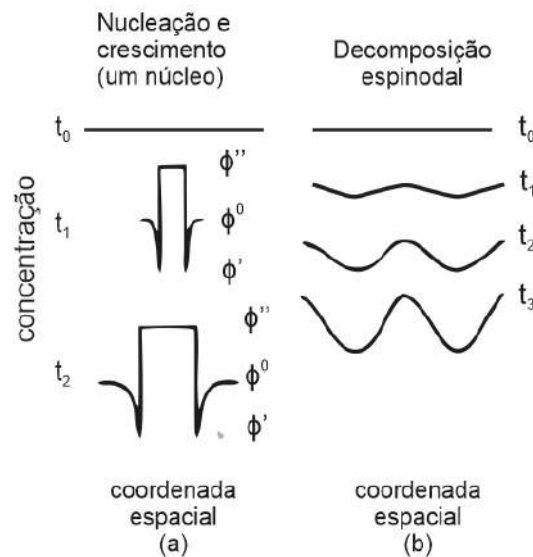


Figura 22 - (a) Descrição esquemática do processo de nucleação e crescimento (separação binodal). (b) Descrição das flutuações de concentração durante a separação espinodal. ϕ' e ϕ'' = composições em equilíbrio da binodal; ϕ^0 = concentração polimérica inicial. Fonte: Mulder (1997) [72].

Quando a separação de fases ocorre, as fases rica e pobre em polímero estarão aproximadamente igualmente distribuídas no sistema, ou seja $m' \cong m''$ (Figura 23), gerando uma separação geometricamente similar entre as fases.

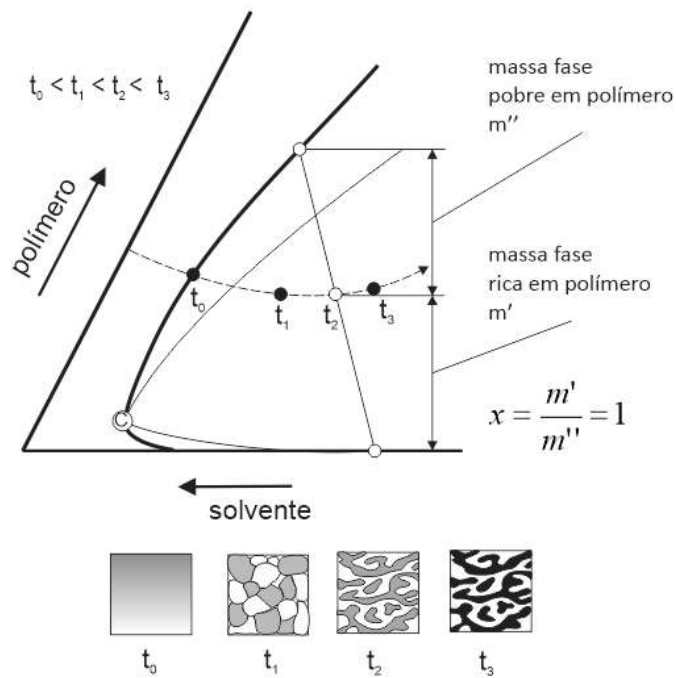


Figura 23 - Processo de separação espinodal: Ponto t_3 representa o instante de precipitação. Razão mássica entre as fases $x=1$. Adaptado de van de Witte et al.,(1996b) [80]

Neste caso, a formação de núcleos é desfavorecida e ocorre a segregação espontânea de duas fases, resultando em uma estrutura tridimensionalmente contínua e interconectada, conforme ilustrado na Figura 24.

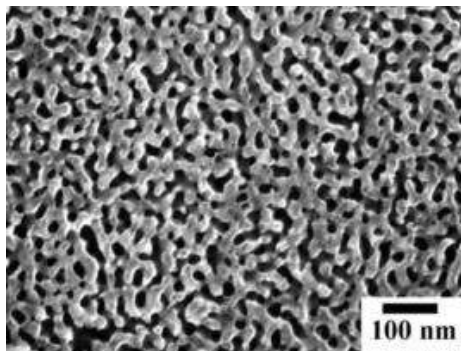


Figura 24 - Morfologia típica de membrana sintetizada por separação espinodal. Fonte: [82]

Em processos difusionais a separação espinodal é usualmente desfavorecida, sendo mesma considerada improvável [48]. A aplicação de altas taxas de resfriamento pode prevenir a nucleação e induzir a separação espinodal, caso a trajetória de precipitação passe pelo ponto crítico [83]. Em todos os outros casos, a solução passará primeiramente pela região metaestável do diagrama.

5.4.4 Precipitação instantânea Trajetória A-E

Para sistemas que apresentam precipitação instantânea, a trajetória de composição cruza a binodal imediatamente após a imersão, ou seja, o tempo de atraso é nulo [83, 84].

Nestes casos, a trajetória de precipitação adentra a região binodal mais profundamente do que processos de precipitação com atraso, porém ainda sem cruzar a curva espínodal. A separação de fases ocorre em um ponto hipotético, no qual a razão mássica $x < 1$ (Figura 25). Nestes casos, estruturas nodulares são encontradas, como resultado da nucleação da fase rica em polímero.

Estruturas nodulares de 25 a 20 nm são comumente encontradas sobre a pele de membranas resultantes de precipitação instantânea. A formação de estruturas nodulares está associada à tendência do polímero de minimizar sua superfície durante a inversão de fases [80, 81].

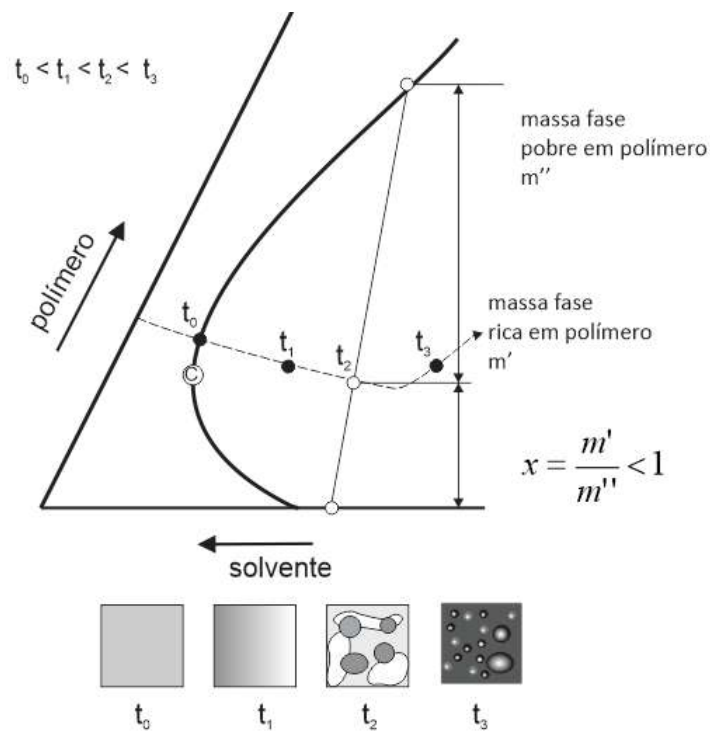


Figura 25 - Processo de precipitação instantânea. Razão mássica $x < 1$. Adaptado de van de Witte et al., (1996b) [80]

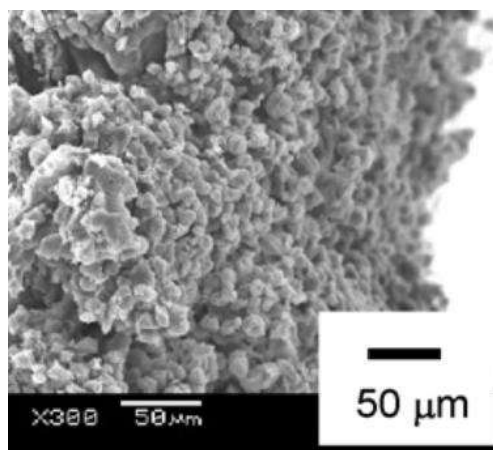


Figura 26 - Estruturas nodulares presentes na base de membrana de PLLA. Fonte: [31]

A natureza da ocorrência de estruturas nodulares é tratada com certa divergência na literatura, mas a teoria mais aceita é a da nucleação e crescimento da fase rica em polímero, usualmente ocorrida em soluções poliméricas diluídas. A sua ocorrência em soluções concentradas está usualmente associada à precipitação instantânea ou à cristalinidade do polímero.

5.4.5 Formação de macrovazios trajetória A-D

A precipitação instantânea pode também, por outro lado gerar a formação de macrovazios, que são poros grandes e alongados que podem se estender por toda espessura da membrana.

A explicação para a formação de macrovazios na literatura é ainda controversa. Uma teoria consistente, porém não comprovada é proposta por Smolders et al. (1992) [85], onde a formação de macrovazios está principalmente relacionada com a cinética de crescimento dos núcleos da fase pobre em polímero. Entretanto, observações experimentais apontam alguns dos seguintes critérios para sua ocorrência [81]:

- Estudos de microscopia mostram que em geral os macrovazios se formam mais rapidamente que a frente de precipitação;
- Macrovazios são associados a precipitações instantâneas. Sua ocorrência é recorrente em sistemas S/NS com alta afinidade como NMP/água e DMSO/água;
- A maioria das técnicas que induzem ao atraso da precipitação tenderão a suprimir a presença de macrovazios.

- Usualmente as paredes dos macrovazios também são porosas, o que indica que a coalescência de núcleos de fase pobre em polímero afeta o processo;
- Quando poucos macrovazios estão presentes, usualmente possuem forma de gota, enquanto quando vários macrovazios são formados, possuem forma alongada cilíndrica ou digitiforme (“*fingerlike*”), Figura 27.

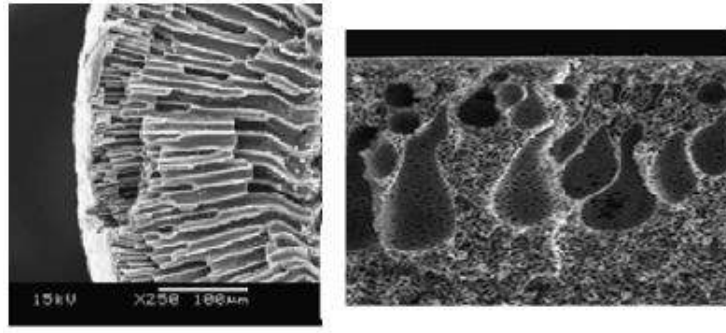


Figura 27 - Estruturas de macrovazios. Esquerda: Macrovazios cilíndrico ou *fingerlike*. Direita: Macrovazio em forma de gota. Fontes: [63] e [85]

5.4.6 Formação de látex trajetória A-G

Em imersões com soluções poliméricas muito diluídas, trajetórias de precipitação podem ser induzidas de modo que o cruzamento do limite binodal ocorra abaixo do ponto crítico. A nucleação da fase rica em polímero irá ocorrer na fase contínua pobre em polímero. A morfologia resultante é a de estruturas desconectadas e sem resistência mecânica, com o aspecto de um látex (Figura 28).

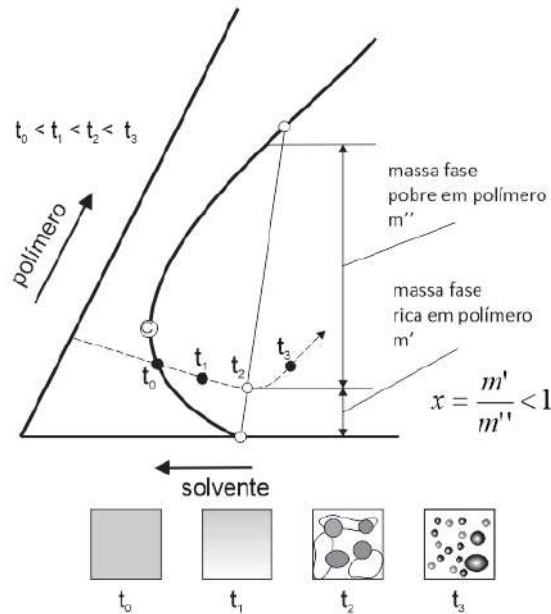


Figura 28 - Processo de nucleação da fase rica em polímero: Ponto t_2 representa o instante de precipitação. razão mássica entre as fases $x < 1$. Adaptado de van de Witte et al., (1996b) [80]

Efetivamente as velocidades de precipitação e as trajetórias de composição do sistema variam através da secção da membrana. Desse modo pode se considerar o conceito de uma frente de precipitação que avança sobre sua secção durante a inversão de fases. A variação dos fluxos mássicos resultante das variações de concentração causadas pelo avanço da frente de precipitação possibilita que diferentes velocidades de precipitação ocorram em pontos distintos da membrana, explicando a existência da anisotropia ou mesmo a incidência de mecanismos distintos sobre a secção transversal.

Este conceito, desenvolvido por Reuvers & Smolders, onde um possível caminho de precipitação é ilustrado na Figura 29.

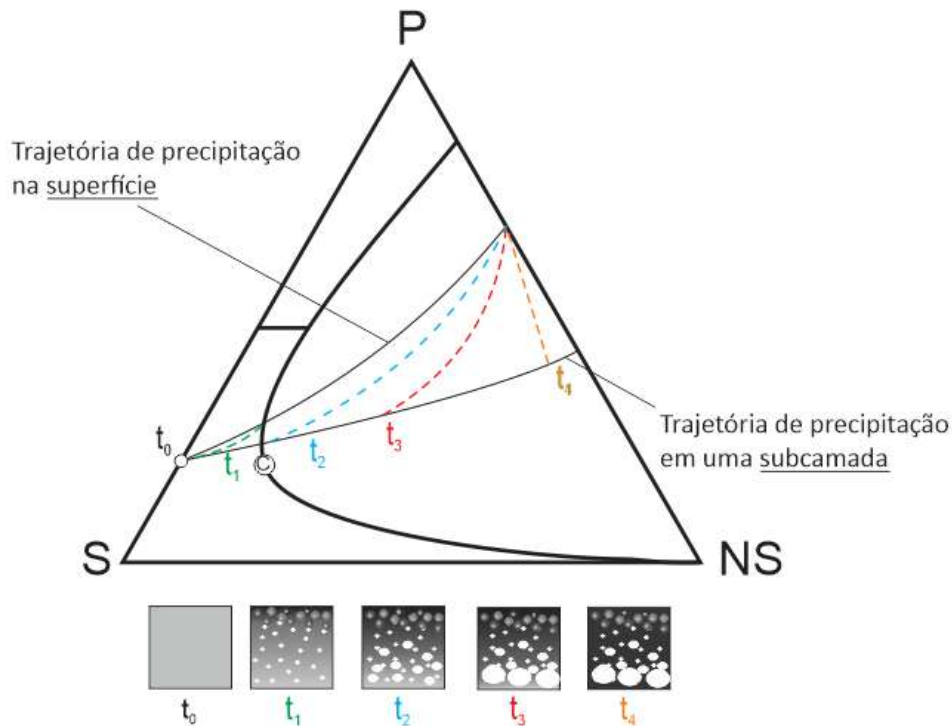


Figura 29 - Representação esquemática de diferentes trajetórias de cinética de precipitação entre a superfície e uma subcamada da membrana. Adaptado de Mermier (2012) [74]

Observa-se que a pele da membrana é rapidamente formada (precipitação instantânea), formando uma pele densa com formação de estruturas nodulares, enquanto as subcamadas são progressivamente consolidadas após um certo tempo de atraso (de t_0 a t_4).

A ocorrência de mecanismos simultâneos de separação de fases sólido-líquido e líquido-líquido, como consequência da existência de fluxo de S e NS através da secção da membrana, é relatada durante a formação de membranas de PLLA [31, 40, 86, 87].

Entretanto, a análise quantitativa deste processo é complexa e, ainda, não completamente compreendida. A variação com o tempo da composição local dificulta a determinação dos perfis de composição devido à baixa espessura do filme (na ordem de micrômetros), bem como devido à precipitação quase instantânea do filme polimérico em alguns casos. Existem modelos teóricos na literatura utilizados para o auxílio da determinação local e temporal das concentrações, sendo que estes modelos permitem a obtenção de estimativas da influência de parâmetros sobre a estrutura da membrana formada.

O conhecimento sobre a fenomenologia e modelagem da transferência de massa durante a inversão de fases é amplamente influenciada pelos trabalhos de Reuvers & Smolders [84], sendo algumas de suas publicações referências nesta área de conhecimento [83, 85]. Outro estudo de referência é a revisão publicada por van de Witte (1996) [79], em que são discutidos aspectos dos processos de inversão de fases por indução térmica e imersão-precipitação, os mecanismos e técnicas de formação de membranas poliméricas, sua relação com a morfologia, distribuição e formato de poros.

Mais recentemente algoritmos e modelos fenomenológicos para o melhor entendimento do processo de transferência de massa durante a inversão de fases em diversos sistemas vêm sendo propostos [79, 88–90].

5.4.7 Morfologias típicas de membranas de PLA

As membranas de PLA sintetizadas a partir da técnica de inversão de fases na literatura apresentam recorrentemente estruturas resultantes de nucleação e crescimento, variando-se entre morfologias do tipo esponja e morfologias com a presença de macrovazios (usualmente com formato cilíndrico ou digitiformes). Em alguns trabalhos, sob certas condições aglomerações esferulíticas características de nucleação e crescimento da fase rica em polímero são observadas, porém tais morfologias estão principalmente associadas ao processo de separação sólido-líquido induzido pela característica semicristalina do PLLA, conforme será discutido na seção 5.5.7 e na Figura 35. Outra morfologia apresentada para membranas de PLLA foram estruturas similares a folhas ou *leaflike*, provavelmente também associada ao fenômeno de cristalização e separação líquido-líquido simultâneas.

As diferentes morfologias encontradas em membranas de PLA estão, principalmente, associadas aos mecanismos de transição de fases durante o processo de precipitação. As faixas de transição vítrea e cristalina, bem como as faixas de miscibilidade de sistemas ternários contendo PLLA e PDLLA foram estudadas por van de Witte et al. (1996) [61]. Algumas micrografias de seções transversais de membranas de PLA podem ser visualizadas na Figura 30.

[91]

[73]

[92]

[47]

[86]

[15]

[45]

[93]

[17]

[31]

[46]

[94]

[49]

[48]

[95]

Figura 30 - Morfologias de membranas de PLLA de trabalhos encontrados na literatura

5.5 Fatores que influenciam a morfologia durante preparo de membranas

Aspectos termodinâmicos e cinéticos são determinantes durante o processo de formação de membranas pela técnica de inversão de fases, o que inclui diversos parâmetros e variáveis que afetam os processos de difusão e separação de fases, determinando a morfologia da membrana formada pelo processo de inversão de fase por imersão-precipitação. Alguns destes parâmetros e variáveis são:

- Escolha do par S/NS;
- Composição e temperatura da solução polimérica;
- Composição e temperatura do banho de precipitação;
- Tempo de exposição da solução polimérica antes da imersão;
- Secagem;
- Mecanismo de solidificação da fase concentrada em polímero.

A Tabela 8 apresenta a influência de alguns parâmetros relativos à transferência de massa sobre o tempo de atraso e a velocidade de precipitação durante o processo de inversão de fases:

Tabela 8 - Influência de parâmetros presentes na transferência de massa sobre a velocidade de precipitação e concentração polimérica na interface durante o processo de inversão de fases. Fonte: [87].

Parâmetro	Espessura ^a	$\uparrow \chi_{S/NS}$	$\uparrow \chi_{P/S}$	$\uparrow \chi_{P/NS}$	$\uparrow \frac{V_{NS}}{V_P}$	$\uparrow \frac{V_{NS}}{V_S}$	$\uparrow \phi_{NS}$ ^c	$\uparrow \phi_P$ ^c	$\uparrow \phi_S$ ^d
Tempo de atraso para precipitação	\uparrow	\uparrow	—	\downarrow	-	-	\downarrow	\uparrow	\uparrow^e
Concentração polimérica na interface ^b	-	\downarrow	\uparrow	\uparrow	-	-	- ou \downarrow	\uparrow	\downarrow

\uparrow = aumento do parâmetro; \downarrow = diminuição do parâmetro; - = influência desprezível; ϕ_i = fração volumétrica do componente i; V_i = volume molar do componente i

^a Espessura inicial do filme polimérico

^b concentração polimérica no filme próximo à interface no início da inversão de fases

^c em solução

^d no banho de imersão

^e usualmente

Van de Witte et al. realizaram uma série de estudos visando compreender o comportamento de diversos sistemas sobre a morfologia de membranas à base de PLA, incluindo os sistemas PLLA-clorofórmio-metanol, PDLLA-clorofórmio-metanol, PLLA-dioxano-metanol, PLLA-dioxano-água, PLLA-NMP-água, PDLLA-dioxano-metanol, PDLLA-dioxano-água e PDLLA-NMP-água [61, 79, 81, 87]. Nestes trabalhos, diversos dos parâmetros mencionados são analisados, sendo as principais referências para o entendimento dos mecanismos de formação de membranas de PLA.

5.5.1 Escolha do par S/NS

Conforme já mencionado em seções anteriores, a afinidade e miscibilidade entre materiais é função dos parâmetros de solubilidade devido a forças de dispersão, a forças polares e a pontes de hidrogênio, e em função da não idealidade do sistema, a entalpia de mistura deve ser considerada. No caso de misturas ideais, a entalpia de mistura é desprezada e a mistura é considerada ideal. Os desvios da idealidade contidos na mistura S/NS são significativos na relação de equilíbrio de fases do sistema ternário.

Para a síntese de membranas por inversão de fases, é desejável que o par S/NS seja miscível e possua alta afinidade. Em um diagrama ternário, verifica-se que as linhas de amarração na região instável se tornam mais inclinadas conforme se diminui a afinidade do par S/NS. Além disso, a região de miscibilidade de um sistema S/NS com

alta afinidade será menor do que a de um sistema ternário contendo um par S/NS com baixa afinidade [72].

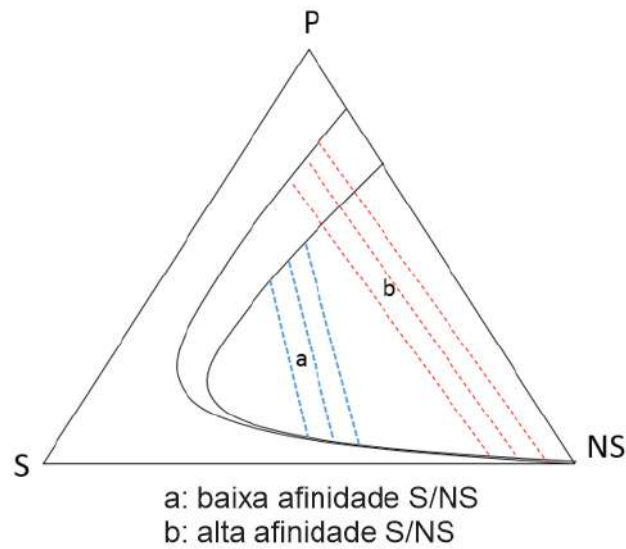


Figura 31 - Curvas bimodais de diagramas ternários: a: sistema N/S altamente solúvel; b: sistema S/NS pouco solúvel. Adaptado de Mulder (1997) [72].

O efeito da afinidade do par S/NS também pode ser verificado no mecanismo de separação de fases durante a imersão. Pares S/NS com elevada afinidade tendem a promover altos fluxos de transferência de massa, resultando em precipitações instantâneas. Conforme se diminui a afinidade dos pares S/NS, os fluxos de transferência de massa tendem a diminuir, induzindo em precipitações com maior atraso.

A Figura 32 ilustra a influência de diferentes pares S/NS em sistemas ternários contendo PLLA, onde as faixas de miscibilidade e transição são amplamente afetadas.

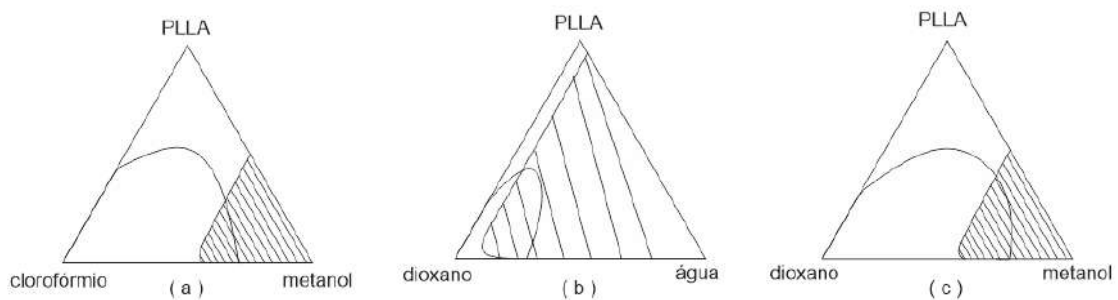


Figura 32- Diagramas de fase a 25 °C: (a) PLLA/clorofórmio/metanol, (b) PLLA/dioxano/água, (c) PLLA/dioxano/metanol. Adaptado de Kimmerle e Strathmann (1990) [79].

5.5.2 Concentração da solução polimérica

O aumento da concentração polimérica na solução precursora induz a uma maior concentração de polímero na interface com o banho de precipitação. Este fato implica em uma maior fração volumétrica de polímero e conseqüentemente em uma menor porosidade. Pode se associar a concentração polimérica com o aumento da viscosidade da solução, ocasionando uma maior resistência aos fluxos de S e NS durante a imersão. Esta condição favorece atraso para o início da precipitação. A Figura 33 mostra em um diagrama ternário os caminhos de composição durante a precipitação de soluções poliméricas com concentrações diferentes. Verifica-se que no caso, ambas as soluções poliméricas apresentaram precipitação instantânea, porém no caso de maior concentração polimérica, verifica-se uma maior concentração também na interface, o que favorece uma morfologia com poros menores.

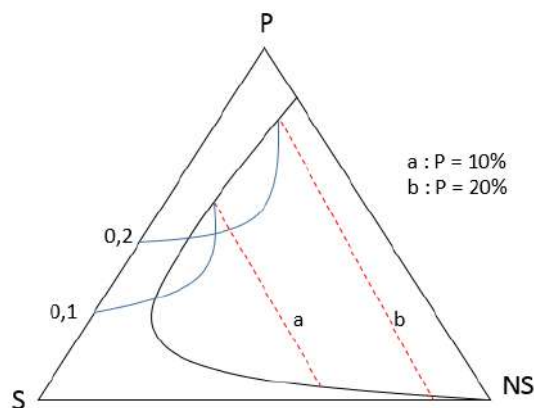


Figura 33 - Diagrama ternário de dois caminhos de composição. a) solução polimérica a 10%; b) solução polimérica a 20%. Adaptado de Mulder (1997) [72].

No caso de membranas sintetizadas a partir de sistemas S/NS com pouca afinidade, o que favorece a formação de membranas densas, a espessura da pele da membrana é também afetada pela concentração polimérica da solução precursora. O aumento da concentração polimérica induz ao aumento da espessura da camada densa.

Eenink et al. (1987) [47] relataram em seu estudo sobre a síntese de fibras ocas de PLLA ($M_v = 1,3 \cdot 10^5$), que faixas de viscosidades de 20 a 100 Pa · s são adequadas para o processamento. Sem a presença de aditivos, concentrações poliméricas de 15 % foram os mínimos necessários para se obter estes valores de viscosidade.

5.5.3 Composição do banho de imersão

A afinidade entre os componentes presentes no banho de imersão e na solução polimérica influenciarão na difusão destes componentes durante o processo de inversão de fases. Um procedimento frequente é a adição de solvente ao banho de precipitação, induzindo ao decréscimo do gradiente de potencial químico do solvente entre a solução polimérica e o banho. Dessa forma, o fluxo de saída de NS da solução polimérica é reduzido, provocando atraso na precipitação.

A influência da composição do banho de precipitação na síntese de membranas de PLLA é relatada em diversos trabalhos na literatura [47, 73, 81, 86, 91].

Xing et al. (2013) [57], Gao et al. (2015) [46], Bettahalli et al. (2011) [15] e Minbu et al. (2012) [42] mostram que a morfologia e a cristalinidade de membranas de PLLA podem ser controladas através da composição do banho de precipitação. No trabalho de Xing et al. [57] dois banhos de precipitação (etanol/água e etanol/dioxano) foram avaliados em diferentes proporções. No primeiro caso (etanol/água), foi verificado que as membranas imersas em banho com até 60% de água apresentaram morfologia porosa do tipo esponja com relativa simetria em sua seção transversal. Segundo os autores, tal morfologia é associada a fluxos similares na transferência de massa entre S e NS através da seção transversal da membrana durante o processo de inversão de fases. Teores de água superiores a 60% resultaram em morfologias assimétricas com regiões compostas de macrovazios digitiformes, densa e tipo esponja, sendo que a estrutura de macrovazios predomina em membranas imersas em banhos contendo apenas água. Isso constata o efeito dos fluxos durante a transferência de massa dos componentes no processo de inversão de fases: a maior concentração de água no banho de imersão induz a maiores fluxos iniciais de entrada de NS na solução polimérica, criando uma resistência à transferência de massa gerada pela precipitação de camadas superiores. Em consequência há uma variação no fluxo da transferência de massa entre S e NS através da seção. Além disso, o fluxo hidrodinâmico de NS durante a formação dos poros induz à formação de macroporos no formato digitiforme. A cristalinidade das membranas formadas foi reduzida gradualmente em banhos de imersão contendo mais de 4% de água, o que foi atribuído ao aumento da taxa de transferência de massa induzida nestes casos. Precipitação rápida leva a uma redução no tempo para a organização das cadeias poliméricas durante a formação das regiões cristalinas.

No caso das misturas de etanol e dioxano, verificou-se que o tamanho de poros aumenta gradualmente com o aumento da concentração de dioxano, mantendo a morfologia das membranas simétricas em toda a faixa analisada (soluções contendo concentrações de dioxano inferiores a 30%). Tal fenômeno foi associado ao maior tempo disponível para a formação de núcleos de fase pobre em polímero durante a separação de fases, como consequência da redução no fluxo durante a transferência de massa causada pela presença de solvente no banho de imersão. O aumento do teor de dioxano aumentou a cristalinidade das membranas, seguindo a mesma hipótese anterior: o atraso na precipitação induz a maiores intervalos de tempo para precipitação, possibilitando a organização de regiões cristalinas.

5.5.4 Composição da solução polimérica

A adição de NS, outros polímeros ou aditivos na solução polimérica pode também afetar a morfologia da membrana formada no processo de inversão de fases. A quantidade de NS adicionada está limitada à região de estabilidade do sistema, ou seja, após a adição o sistema deve permanecer em uma composição localizada na região de estabilidade, onde P, S e NS são totalmente miscíveis entre si. A adição de NS na solução polimérica induz a uma maior proximidade da região de instabilidade no diagrama ternário, conforme pode ser verificado na Figura 34. A adição de NS na solução polimérica tende a acelerar a precipitação do sistema, resultando em morfologias mais porosas.

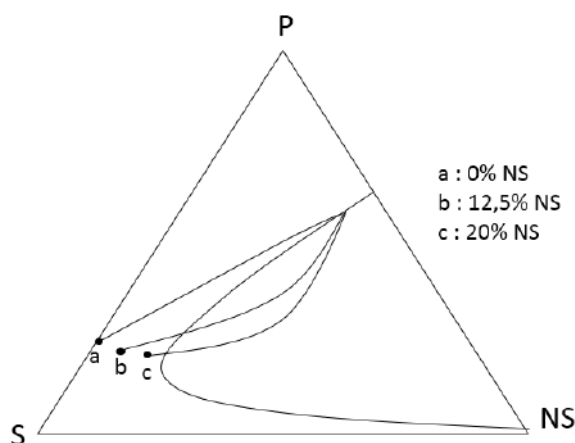


Figura 34 - Caminhos de composição para sistema variando o teor de NS na solução polimérica. Adaptado de Mulder (1997) [72].

Outra abordagem para a utilização de aditivos na síntese de membranas poliméricas é a utilização de complexos formados pela associação de um NS presente na solução polimérica (ácido de Lewis) com o solvente (base de Lewis). Na formação de

complexos ácido-base de Lewis (ABL) uma base fornece um par de elétrons enquanto o ácido contribui com um orbital vazio. A formação de complexos ABL é reportada como uma técnica para o aumento da viscosidade das soluções poliméricas, devido à redução da quantidade de solvente disponível para a solubilização do polímero. Nestes sistemas, a imersão em um banho com alta constante dielétrica como a água ocasiona a dissociação do complexo formado, liberando o aditivo e induzindo a precipitações instantâneas do polímero, afetando as propriedades das membranas sintetizadas.

Pereira, (1999) [96] investigou o efeito da adição de ácido acético, ácido propiônico, ácido n-capróico e ácido adípico na formação de complexo ABL com o solvente NMP na síntese de membranas de polietersulfona. É relatado um aumento considerável na viscosidade da solução polimérica, sendo o mesmo associado ao tamanho da molécula do complexo formado. A presença dos aditivos também afetou a solubilidade dos sistemas ternários resultantes.

Papenburg et al. (2010) [95] sintetizaram filmes a partir de PLLA com altas massas molares ($5,7 \cdot 10^5$ g/mol) a partir de soluções poliméricas com baixas concentrações (2% m/m), produzindo membranas com morfologia diferenciada, consistindo de fibras nanoestruturadas similares às obtidas classicamente pela técnica de eletrofição, porém usando a técnica de inversão de fases. Os autores consideram que as nanofibras são resultantes do alto volume livre em solução devido à baixa concentração, juntamente com o alto nível de emaranhamento das cadeias poliméricas devido à sua altíssima massa molar. Os filmes apresentaram boa adesão, proliferação e alinhamento celular em testes *in vitro*, sendo a biocompatibilidade associada principalmente à topografia resultante da morfologia nano-fibrosa, a qual mimetizaria de forma o meio de crescimento celular (espaçamento médio de 50 – 500 nm entre fibras).

Minbu et al. (2015) [42] estudaram o efeito da adição de surfactantes na solução polimérica durante a formação de filmes de PLLA via inversão de fases. A adição de água na solução polimérica foi comparada com a adição do surfactante Tween 80, ambos atuando como não-solventes, visando o aumento da porosidade das membranas. A adição do surfactante resultou em membranas com menos defeitos, menor assimetria na secção transversal e menor encolhimento após imersão.

Sawalha et al., (2008) [40] utilizaram dodecano como aditivo para formação de poros em filmes de PLLA. Verificou-se que a presença de dodecano nas soluções

poliméricas foi capaz de transformar filmes densos em estruturas altamente porosas e organizadas com poros interconectados do tipo esponja durante inversão de fases por evaporação de solvente. A alteração da morfologia está associada à formação de gotículas de dodecano durante a inversão de fases, sendo estas precursoras dos poros formados.

Xing et al. (2013) [57] estudaram o efeito da mistura de PLLA com poliuretano (PU) na formação de membranas planas. Foi observado que a presença de PU não alterou o fenômeno de cristalização durante a formação dos filmes na inversão de fases, porém foi capaz de aumentar o tamanho médio de poros. O aumento foi associado à penetração preferencial do não-solvente nas interfaces entre o PLLA e PU, promovendo uma nucleação e crescimento de núcleos maiores durante a inversão de fases.

5.5.5 Tempo de exposição da solução polimérica antes da imersão

Durante o preparo de membranas pela técnica de imersão em banho de não-solvente, pode ser executada uma etapa intermediária entre o espalhamento e a imersão. Esta etapa intermediária compreende a exposição da solução polimérica ao ambiente, no intuito de permitir a parcial evaporação do solvente da solução polimérica ou mesmo a absorção de NS da atmosfera ambiente pela solução polimérica. Tais condições geram efeitos opostos na estrutura da membrana formada, sendo função principalmente da volatilidade do solvente utilizado.

No caso de a solução polimérica conter um S volátil, o fluxo de saída de S da fase polimérica será determinante sobre o fluxo de entrada de NS. Assim, a saída de S induz ao aumento da concentração de polímero na interface filme/atmosfera, causando atraso na precipitação. A evaporação do S promove uma distribuição assimétrica na concentração de polímero ao longo do filme, podendo inclusive formar uma pele densa antes da imersão da solução no banho de imersão. Dessa forma, o tempo de exposição promove a formação de membranas tipicamente densas de permeação gasosa/pervaporação.

No caso da utilização de solvente não volátil, a exposição da solução ao ambiente permite que haja um fluxo de entrada NS na fase polimérica (significativamente maior do que o fluxo de saída de S). Assim, pode ocorrer a absorção de NS pela solução polimérica de forma a se promover uma aceleração no processo de precipitação.

5.5.6 Secagem

A influência da combinação dos parâmetros mencionados nos itens anteriores é amplamente discutida na literatura, estabelecendo-se as hipóteses mais prováveis sobre a influência dos parâmetros envolvidos na morfologia da membrana durante o processo de inversão de fases. Entretanto aspectos relacionados ao procedimento de troca de solvente e secagem das membranas após a síntese ainda carecem de estudos sistemáticos, sendo muitas vezes negligenciados.

Habert et al. (2006) [71] relatam que o procedimento de secagem é importante no intuito de se evitar o colapso dos poros menores devido a forças capilares. A técnica mais simples é substituir sequencialmente o líquido utilizado como banho de imersão por líquidos com tensão interfacial menos elevadas [97]. A escolha dos líquidos depende do polímero utilizado, uma vez que o líquido não deve inchá-lo. Em geral, para os polímeros de uso mais corrente como polissulfona, polietersulfona, polieterimida e policarbonato, substitui-se a água pelo etanol e este pelo hexano, o qual, devido à baixa tensão superficial e alta volatilidade evapora dos poros sem deformá-los.

Montesanto et al. (2015) [86] relata que durante a remoção de solvente residual ainda há uma variação na composição do sistema, o que afetará ainda a morfologia da membrana. Neste estudo, é mostrado que a umidade do ambiente de secagem de membranas em sistemas PLLA-dioxano-água afeta a porosidade da camada externa dos filmes, enquanto a estrutura interna é influenciada exclusivamente pela composição do banho de precipitação. A secagem em ambientes úmidos leva à formação de superfícies com maiores poros, devido à menor taxa de remoção de água, o que estende o tempo para o crescimento de núcleos de separação de fases. A secagem em ambiente seco por sua vez induz a formação de peles mais fechadas, pois a rápida saída de água da membrana nascente induzirá a cristalização.

van de Witte et al. (1996) [48] relatam que filmes de PDLLA com seções transversais porosas e assimétricas têm os poros suprimidos quando mantidas por 1 dia em metanol após seu preparo.

5.5.7 Mecanismo de solidificação da fase concentrada em polímero

Os mecanismos de precipitação sólido-líquido e líquido-líquido e a formação da membrana devido à solidificação da fase rica em polímero via vitrificação, gelificação ou

cristalização são importantes objetos de estudo, pois afetam diretamente a morfologia das membranas formadas.

De forma geral, no processo de inversão de fases, quando a solução polimérica atinge composições que propiciam a separação de fases pelo mecanismo de separação líquido-líquido, ocorre a formação de núcleos da fase pobre em polímero e posterior vitrificação da fase rica em polímero. Em função do tempo disponível para o crescimento e coalescência dos núcleos da fase pobre em polímero podem ser formadas morfologias com poros circulares ou macrovazios. O processo de crescimento e coalescência dos núcleos da fase pobre é interrompido por fenômenos que levam a solidificação da fase rica em polímero, como a cristalização, gelificação e transição vítrea. No caso de membranas de PLLA, a coalescência de núcleos poliméricos em formatos esferulíticos ou axiáticos, geralmente está associada à cristalização rápida da fase polimérica [61].

A Figura 35 apresenta fotomicrografias de fibras ocas de PLLA formadas com predominância dos mecanismos de separação por nucleação e crescimento da fase pobre em polímero (líquido-líquido) e por nucleação e cristalização da fase rica em polímero (sólido-líquido).

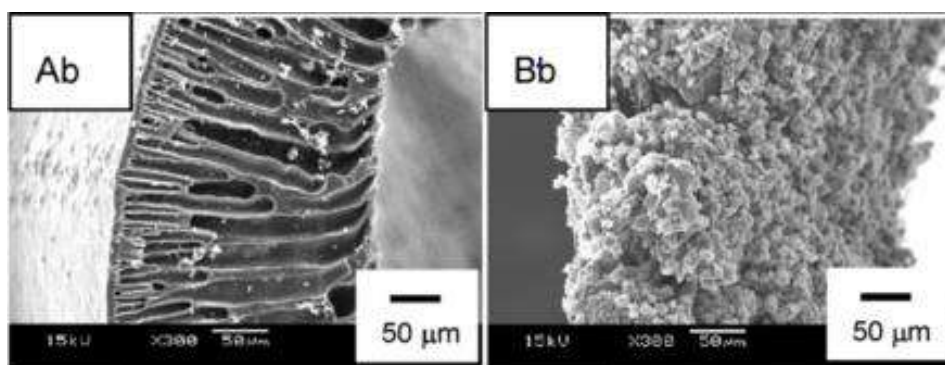


Figura 35 - Secção transversal de fibras ocas de PLLA resultantes de diferentes mecanismos de separação de fases. Esquerda: separação líquido-líquido (macro vazios digitiformes); Direita: separação sólido-líquido (aglomerados esferulíticos). Fonte: [31]

Os principais mecanismos de solidificação, gelificação, vitrificação e cristalização, e sua influência nos mecanismos de separação de fases são discutidos a seguir.

A gelificação pode ser definida como a formação de uma rede tridimensional, devido a reticulações físicas ou químicas, capaz de reter certa quantidade de solvente em sua estrutura. Vários tipos de interação intermolecular podem gerar géis, como

microcristalitos, interações iônicas e pontes de hidrogênio. Quando a gelificação ocorre, a solução polimérica passa a compor um sistema com viscosidade infinita.

Polímeros que não apresentam capacidade de gelificação ou cristalização, têm a imobilização da fase rica em polímero pelo processo de vitrificação. O estado vítreo é definido como o estado energético no qual as cadeias poliméricas possuem baixa mobilidade segmental. Na formação de membranas, a vitrificação leva ao aumento da viscosidade da solução até que haja supressão dos movimentos segmentais das cadeias poliméricas.

Em polímeros semicristalinos a cristalização pode ocorrer se a temperatura da solução polimérica é reduzida abaixo de sua temperatura de fusão cristalina. Nestas condições, a solução polimérica pode não apresentar condições para separação líquido-líquido, e a energia livre de mistura pode, então, ser minimizada pela separação sólido-líquido.

O processo de formação de cristais é induzido por condições termodinâmicas favoráveis, mas pode ser definido pelas condições cinéticas. Devido ao tempo de relaxamento das cadeias poliméricas, o tempo para rearranjo e alinhamento das mesmas é fundamental para a formação dos núcleos cristalinos [98]. Como o processo de formação de membranas é muito rápido, apenas materiais com cristalização rápida como polipropileno, polietileno e poliamidas aromáticas são capazes de apresentar um teor apreciável de cristalinidade.

O fenômeno de cristalização durante a síntese de membranas de PLLA pelo processo de inversão de fases é relatado em diversos trabalhos [31, 40, 73, 81, 86]. Em certas condições a cristalização do PLLA se torna o principal mecanismo de solidificação da fase rica em polímero. Montesanto et al. (2015) [86] considera que a cristalinidade de membranas de PLLA podem ser controladas pelo tempo de residência e composição do banho de precipitação.

O diagrama ternário apresentado na Figura 36 mostra as curvas de miscibilidade dos sistemas PLLA e PDLLA com clorofórmio e metanol. Observando o comportamento dos pontos de turbidez, pode-se inferir que a separação de fases ocorre através dos mecanismos de separação sólido-líquido para PLLA e líquido-líquido para PDLLA.

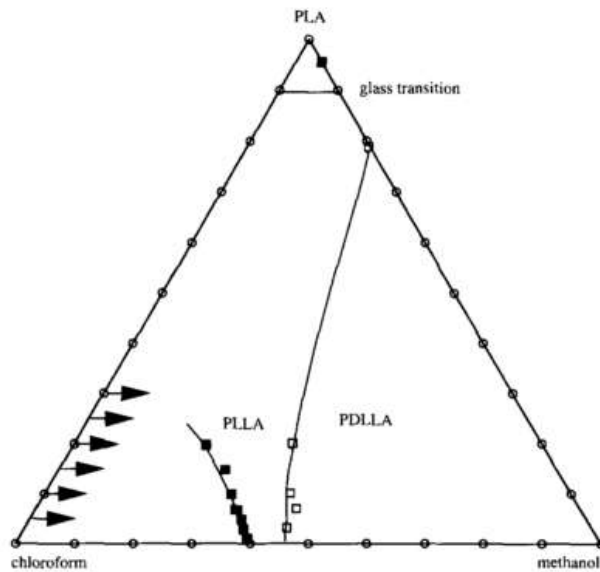


Figura 36 - Diagrama ternário comparativo das curvas de miscibilidade dos sistemas PLLA e PDLLA-clorofórmio-metanol. Fonte: [87].

Processos de separação de fases distintos podem ocorrer simultaneamente. Segundo van de Witte et al. (1996) [79], em sistemas contendo PLLA podem ser identificadas regiões no diagrama de fases onde são favorecidos o equilíbrio sólido-líquido e o equilíbrio líquido-líquido. Entretanto, há regiões onde ocorrem fenômenos de transição como a cristalização. Isto possibilita a existência de caminhos no diagrama de fases que correspondem a uma sucessão de fenômenos relacionados à separação de fases e imobilização da fase concentrada em polímeros, conforme ilustrado na Figura 37.

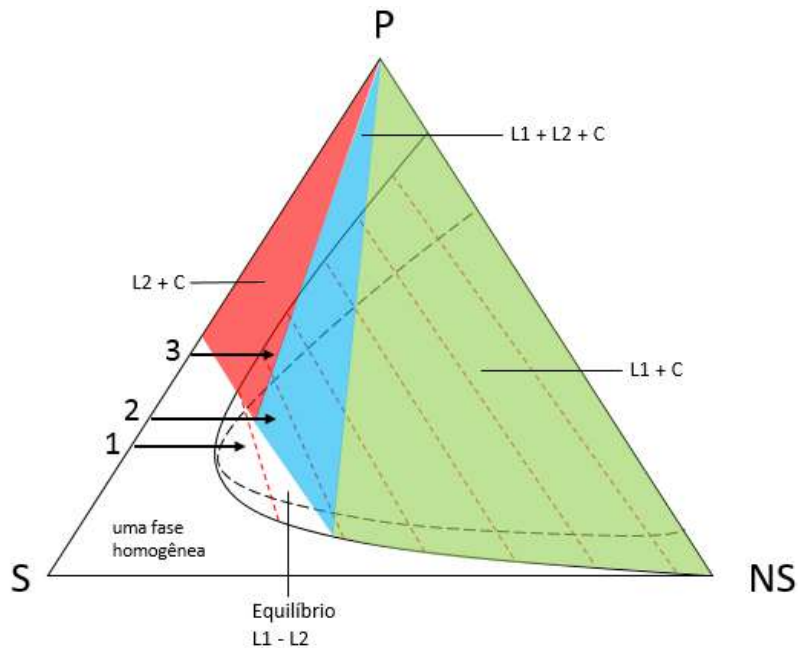


Figura 37 - Diagrama ternário para sistema P-S-NS incluindo regiões de transição de fases de não equilíbrio. L1: fase pobre em polímero; L2 fase rica em polímero; C: fase cristalina. 1, 2 e 3: Caminhos hipotéticos de variação de composição. Adaptado de Karode & Kumer (2001) [87].

As setas 1, 2 e 3 da Figura 37 representam caminhos hipotéticos do processo de inversão de fases, os quais podem justificar o comportamento observado em sistemas com PLA. No caminho 1 a região de separação líquido-líquido é alcançada e, posteriormente, a região de cristalização da fase rica em polímero é atingida. No caminho 2 a região de separação líquido-líquido é ultrapassada sem que inicie o processo de separação, possibilitando a cristalização simultânea à nucleação e crescimento. O caminho 3 por sua vez ilustra a separação sólido-líquido resultante do processo de cristalização prévia à separação líquido-líquido das fases L1 e L2.

5.6 Síntese de fibras ocas por inversão de fase

A síntese de membrana na forma de fibras ocas por fiação úmida (*spinning*) é uma das técnicas mais utilizadas para a obtenção de membranas poliméricas na geometria cilíndrica. Assim como na síntese de membranas na geometria plana, a técnica de fiação consiste na imersão de uma solução polimérica em um banho de NS. Entretanto, a solução polimérica escoava simultaneamente com uma solução de NS através de um orifício coaxial em uma extrusora. O líquido interno é responsável pela formação do lúmen da fibra, conforme apresentado na Figura 11 (ver item 5.1).

Conforme já mencionado, a morfologia e propriedades de transporte de fibras ocas serão influenciadas por fatores que afetam os fluxos durante a transferência de massa entre as fases. Entretanto, fatores adicionais são considerados na técnica de fiação. Uma vez que haverá fluxos de solvente e não-solvente nas superfícies interna e externa da fibra oca (Figura 11b), ocorrerá a existência de uma frente dupla de precipitação. A precipitação da camada interna ocorrerá após o contato da solução polimérica com o líquido interno contendo NS, logo após a saída da extrusora. A precipitação das camadas externas dependerá da distância entre a extrusora e o banho de precipitação (DEB) e da afinidade entre os componentes durante a imersão neste banho.

Segundo Mermier (2012) [74], no processo de separação de fases um termo entrópico adicional $\Delta S^{extra}/RT$ deve ser considerado devido às tensões externas presentes durante a precipitação. Estas tensões incluem o cisalhamento dentro dos canais da extrusora (1); a tensão axial induzida pelo próprio peso da fibra (2); e a tensão induzida pelo sistema mecânico para remoção da fibra de dentro do banho de precipitação (3).

Outro fato a ser considerado durante a síntese de fibras ocas é a expansão viscoelástica sofrida pela solução ao sair da extrusora, podendo afetar principalmente o diâmetro interno da fibra. Esta deformação é conhecida como *die-swell*.

O controle da transferência de massa nas camadas externas pode ser aperfeiçoado através da utilização de extrusoras triplas ou quádruplas, pelas quais é possível se escoar soluções contendo NS pela camada externa antes da imersão das fibras no banho de precipitação, ou mesmo o escoamento de mais de uma solução polimérica, possibilitando a confecção de membranas compostas. Extrusoras com estas configurações foram desenvolvidas e utilizadas nos trabalhos de Pereira (1999) [96], Bertoldo (2005) [99], Carvalho (2005) [100] e Mermier (2012) [74].

Parâmetros operacionais como vazões de líquido interno e da solução polimérica, devem ser controlados. O cisalhamento provocado pelo ângulo de saída dos orifícios das extrusoras também é capaz de alterar a morfologia e as dimensões das fibras produzidas, chegando eventualmente a suprimir a presença de macrovazios [74, 100, 101].

O efeito das condições de extrusão durante a fiação de membranas de PLLA é mostrado no trabalho de Eenink et al. (1987) [47]. As dimensões das fibras ocas resultantes foram avaliadas em função das vazões da solução de líquido interno e da solução polimérica, da DEB e da velocidade de recolhimento.

5.7 Trabalhos sobre síntese fibras ocas de PLA

Membranas na forma de fibras ocas vêm sendo estudadas para utilização de membranas de PLA em aplicações biomédicas como a liberação controlada de medicamentos, hemodiálise, CGN, suporte celulares para tratamentos vasculares e purificação de biocompostos.

Os estudos pioneiros sobre a síntese de fibras ocas de PLLA na literatura são publicados a partir de 1987 pelo *Department of Chemical Technology* da *Twente University* (Holanda), com o intuito de produzir fibras ocas para serem utilizadas em dispositivos de liberação controlada de medicamentos [47]. Entre 1993 a 1996, diversos trabalhos sobre o comportamento de sistemas ternários e procedimentos de síntese de membranas de PLA foram publicados por van de Witte et al. [48, 61, 79, 81, 87].

Após um hiato, em 2005 novos trabalhos sobre síntese de fibras ocas de PLA são publicados [15, 31, 35, 46, 63, 93, 102, 103], impulsionados pelo crescente interesse de estudos em engenharia de tecidos e aplicações biomédicas do PLA.

Nos trabalhos de van de Witte et al. (1993) e Eenink et al., (1987) os aspectos relacionados ao comportamento dos sistemas ternário envolvendo diversos solventes e não-solventes para o PLLA são discutidos. Destaca-se nestes trabalhos a investigação das condições operacionais durante a fiação e seus efeitos nas propriedades e, principalmente, nas dimensões das fibras. Detalhes sobre estes estudos foram previamente apresentados em outras seções deste texto.

Moriya et al. (2009) [31] relatam que a viscosidade das soluções de PLLA em diclorometano ou clorofórmio na concentração polimérica utilizada (20% m/m) e na temperatura ambiente é muito alta, dificultado sua utilização pelo processo de inversão de fases. Desta forma, NMP e DMSO foram selecionados como solvente e seu efeito na morfologia da membrana foi investigado. A composição do líquido interno, a adição de PEG como aditivo na solução polimérica e as dimensões da extrusora também foram avaliadas. Alterando o líquido interno de água para uma solução de água e DMSO, o mecanismo de separação próximo à superfície interna mudou de L-L para S-L (Figura 38). O aumento da concentração de PEG na solução polimérica também mudou o mecanismo de separação de fases de L-L (macrovações digitiformes) para S-L (estruturas sólidas esferulíticas) e, subsequentemente, de S-L para L-L (morfologia esponjosa aberta) Figura 39.

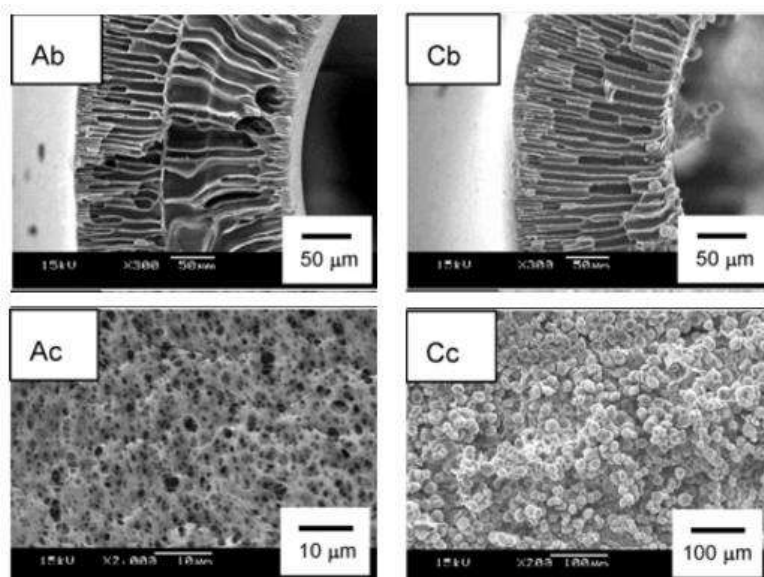


Figura 38 - Efeito da composição do líquido interno. A: água, C: DMSO. b = seção transversal, c = superfície interna. Fonte: [31].

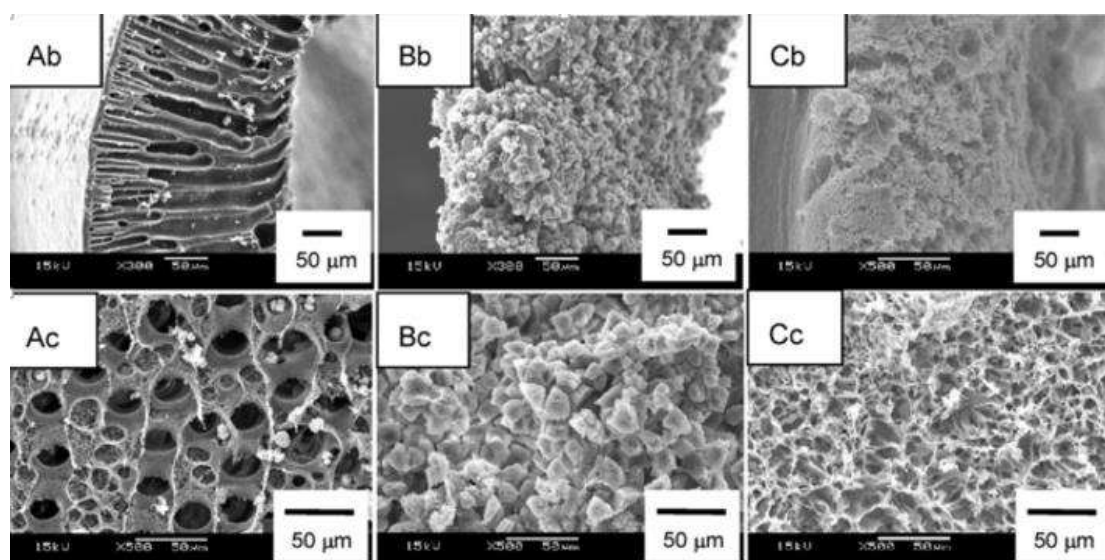


Figura 39 - Efeito da adição de PEG na solução do líquido interno. A = 5%, B = 10%, C = 15%. b = seção transversal, c = superfície interna. Adaptado de Moriya et al. (2009) [31].

As mudanças de mecanismos de separação de fases estão principalmente associadas às variações de viscosidade e cristalização do PLLA frente às alterações efetuadas. A adição de PEG foi capaz de triplicar o fluxo de permeado das membranas, enquanto houve uma diminuição de propriedades mecânicas e rejeição para albumina de soro bovino (BSA). Isso pode ser explicado pela maior abertura dos poros, pois cerca de 90% do PEG adicionado é removido da matriz polimérica do PLLA, resultando em maior incidência de poros.

Bettahalli et al. (2011) [15] relataram que a utilização de 1,4 dioxano como S e etanol como NS proporcionaram as melhores características mecânicas, quando comparado com os solventes n-metil-2-pirrolidona (NMP) e clorofórmio (CHCl_3). O solvente NMP foi utilizado apenas para solubilizar o aditivo polivinilpirrolidona (PVP) na solução polimérica, e hipoclorito de sódio (NaOCl) foi utilizado como pós-tratamento para extrair o PVP residual da matriz polimérica, aumentando a interconectividade dos poros. Somente através da adição de 1% de NS na solução polimérica foi possível se obter membranas com alta porosidade contendo poros interconectadas do tipo esponja. Foi observada permeabilidade hidráulica de $1963 \text{ L/m}^2 \text{ h bar}$, mas uma baixa rejeição de BSA (10%). Boa adesão e proliferação celular foi observada em testes estáticos e dinâmicos *in vitro*, indicando ausência de risco biológico relativos ao S e NS utilizados.

Moriya et al. (2012) [63] e Shen et al. (2013) [93] utilizaram terpolímeros em bloco PLA/PEG/PLA com diferentes tamanhos do segmento de PEG (600 a 20.000 Dalton) como aditivos durante a síntese de fibras ocas de PLLA. Os autores verificaram maior hidrofiliabilidade das membranas apenas com o aumento do comprimento de cadeia do segmento de PEG no terpolímero. As membranas apresentaram rejeição de BSA entre 80 a 97%, assim como verificou-se que a adição do copolímero foi capaz de diminuir a queda de fluxo das membranas nos testes de permeação com BSA, o que foi atribuído a redução do *fouling*. Entretanto, as membranas contendo apenas PLLA foram as que apresentaram as maiores permeabilidades em testes com água pura, com valores de $300 \text{ L/m}^2 \text{ h bar}$. Desta forma, os autores concluíram que o principal efeito do aditivo foi a redução da adsorção de proteínas, devido ao aumento na hidrofiliabilidade das membranas.

Fibras ocas de PLA foram sintetizadas pelo processo de inversão de fases para utilização como CGN nos trabalhos de Dantas Junior (2014) [17] e Goulart et al., (2016) [24]. Resultados de testes *in vivo* foram promissores, indicando que as fibras ocas de PLA sintetizadas foram mais efetivas em testes de recuperação funcional do que membranas comerciais de PCL.

Domingues et al., (2017) [104] sintetizaram fibras ocas de PLA utilizando diferentes solventes e avaliaram a influência destes solventes na morfologia e propriedades durante a síntese. Foi também avaliado o efeito de diferentes morfologias (macrovações digitiformes e estruturas espongiiformes) nas características mecânicas e na degradação *in vitro* das membranas. Estes resultados estão detalhadamente apresentados nos resultados desta tese.

A Tabela 9 apresenta um levantamento dos principais trabalhos na síntese de membranas de PLA pelo processo de inversão de fase, ressaltando as características dos materiais, os sistemas ternários e aditivos envolvidos, as técnicas e condições operacionais utilizadas. A Tabela 10 apresenta os principais trabalhos sobre o preparo de fibras ocas de PLA, destacando alguns parâmetros operacionais do processo.

Tabela 9 - Características de sistemas de síntese de membranas de PLA na literatura

Autor (ano)	Aplicação	Geometria	Cristalinidade PLA	Mn // Mw (KDa)	Concentração P (%m/m)	Solvente	Banho precipitação	Aditivo
Eenink et al.,(1987) [47]	Liberação Controlada de Medicamentos	Fibra oca	N.E.	95 // 150	10 --- 20	1,4 dioxano	Água (25°C)	PVP / L-lactídeo
						NMP	Água (25°C)	
						Clorofórmio	Metanol (25°C)	PVP
van de Witte et al., (1993) [48]	Liberação Controlada de Medicamentos	Fibra oca	Semicristalino		10 ---18	1,4 dioxano	água	
						Clorofórmio	Tolueno	
						Clorofórmio	Tolueno	
van de Witte et al., 1996b [87]	Liberação Controlada de Medicamentos	Filme	Amorfo e semicristalino		15 --- 30	Clorofórmio	Metanol	
Zoppi et al., (1999) [91]	Engenharia de Tecidos	Filme	N.E.	- // 300	2 --- 20	Clorofórmio	Etanol/Clorofórmio (25 °C)	-
Tanaka; Lloyd, (2004) [92]	Processos biotecnológicos	Filme	N.E.	78 // 187	10	1,4 dioxano	-	
Tanaka et al., (2006) [55]	Processos biotecnológicos	Filme	N.E.	122 // -	1 --- 20	1,4 dioxano	-	PCL
Sawalha; Schroen; Boom, (2007) [73] (Sawalha; Schroen; Boom, (2008) [40]	N.E.	Filme	N.E.		10	Diclorometano	Água/metanol (N.E.)	dodecano
(Moriya et al., (2009) [31]	Processos biotecnológicos	Fibra oca	N.E.	- // 150	1 a 20 (90°C)	DMSO	Água (15 °C)	PEG

Papenburg et al., (2010) [95]	Engenharia de Tecidos	Filme	N.E.	433 // 570	0,5 --- 2	1,4 dioxano	Etanol (4 °C)	-
Bethalli et al., (2011) [15]	Engenharia de tecidos - implante vascular	Fibra oca	N.E.	- // 165	20 (60 °C)	1,4 dioxano	Etanol (-6 °C)	PEG PVP
Tanaka et al., (2012) [94]	Processos biotecnológicos	Filme	N.E.	40,7 // 122	10 (80°C)	DMSO	Água (25 °C)	-
Moriya et al., (2012) [63] Shen et al., (2013) [93]	Processos biotecnológicos	Fibra oca	N.E.	- // 150	20 (90°C)	DMSO	Água (5 °C)	Copolímero PLA-PEG- PLA
Xing et al., (2013) [57]	N.E.	Filme	Semicristalino	150 // 200	10 (80°C)	1,4 dioxano	Etanol/Água e Etanol/1,4 dioxano (25°C)	Poliuretano
Gao; Liu; Xue, (2014) [46] Gao et al., (2015) [60]	Hemodiálise	Filme	Semicristalino	130 // -	18 (70 °C)	NMP	Água (25 °C)	PEG e PEO
Minbu et al., (2015) [42]	Processos biotecnológicos	Filme	N.E.	122 // 366	10 (80 °C)	1,4 dioxano	Água (25 °C)	Tween 80
Zhu et al., (2015) [45]	Hemodiafiltração	Filme	Semicristalino	N.E.	20 (85°C)	Dimetilacetamida	Água (30 °C)	PEG
Montesanto et al., (2015) [86]	N.E.				8	1,4 dioxano	Água/1,4 dioxano (30°C)	
Goulart et al., (2016) [24]	CGN	Fibra oca	N.E.	N.E.	20	NMP	Água	
Domingues; Pereira; Borges, (2017) [104]	CGN	Fibra oca	amorfo	350	20 (60 °C)	NMP, DMSO, 1,2-dioxano	Água	PVP

N.E. = não especificado

Tabela 10 – Referências de parâmetros operacionais na técnica de fiação em trabalhos da literatura

Autor (ano)	Líquido interno			Solução polimérica		De/Di extrusora (mm)	DEB (cm)	Recolhimento
		escoamento	T (°C)	escoamento	T (°C)			
Eenink et al., (1987) [47]	Água (NMP)		-		80	0,6 / 0,4		
	Água (1,4 dioxano)	10 – 80 mL/h	-	0,5 – 3 mL/min	50		1 – 10	1 – 6 m/min
	Etanol (Clorofórmio)	30 – 60 mL/h	-	1,5 – 2,4 mL/min	45		1 – 10	3 – 4 m/min
van de Witte et al., (1993) [48]	Água ou metanol	0,8 – 3 mL/min		2,5 – 5 mL/min	50 - 55	0,6 / 0,4	0 – 6,5	2 – 7,5 m/min
Bettahalli et al., (2011) [15]	Etanol	1 mL/min	25	1 bar		0,5 / 0,2	0	
Moriya et al., (2012) [63] Shen et al., (2013) [93]	DMSO	0,29 m/s	90	0,22 m/s	90	1,58 / 0,83	0,5	

De = diâmetro externo

Di = diâmetro interno

6 Materiais e métodos

Neste capítulo estão descritas as rotinas, materiais e métodos utilizados nos procedimentos e caracterizações realizadas nas etapas deste trabalho. Observações sobre detalhes experimentais particulares a determinadas etapas serão apresentados nos respectivos capítulos quando conveniente.

6.1 Materiais utilizados

A Tabela 11 apresenta os principais materiais utilizados neste trabalho.

Tabela 11 – Principais materiais utilizados neste trabalho

Polímero	Mw (kDa)	Fornecedor
PLLA(c)	115	IMA-UFRJ*
PDLLA(a)	350	IMA-UFRJ
PEG 300	0,3	Sigma-Aldrich
PEG 6000	6	Vetec
Polivinilpirrolidona PVP K90	360	Sigma-Aldrich
Albumina de soro bovino (BSA)	67	Sigma-Aldrich
Lisozima	17	Sigma-Aldrich
NMP		Vetec
1,4 dioxano		Vetec
DMSO		Vetec

*Instituto de Macromoléculas Profa Eloisa Mano, UFRJ

6.2 Determinação de diagramas ternários

Os pontos da curva que limitam a separação de fases nos diagramas ternários foram determinados pelo método titulométrico dos pontos de turbidez ou “*cloud points*” dos sistemas investigados. Soluções poliméricas com concentrações variando de 3 a 13% foram mantidas a 60°C em frascos encamisados (Figura 40). Para cada concentração referida, adicionou-se a solução polimérica NS ou mistura de S/NS com o auxílio de uma seringa. A adição ocorreu lentamente (gota a gota) até que a solução se tornasse turva, sendo visualmente verificada. Através do conhecimento da massa de não-solvente adicionada, foi possível determinar a composição do sistema, que correspondeu a um ponto no diagrama de fases.

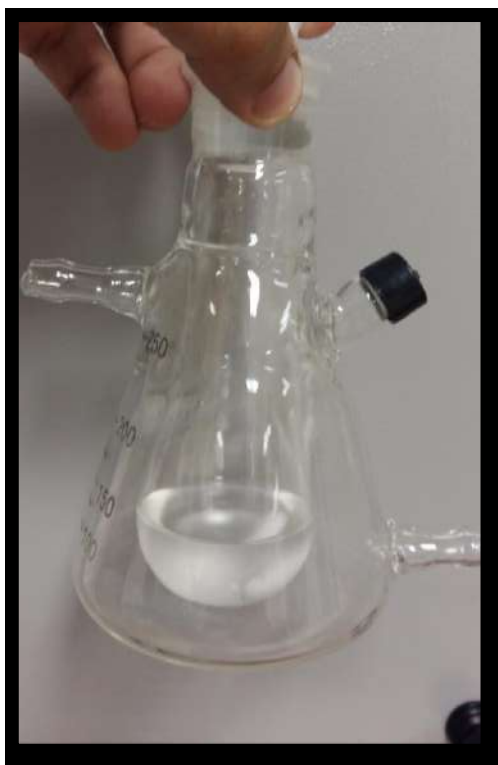


Figura 40 – Frasco encamisado utilizado nos testes de turbidez

6.3 Preparo de membranas planas por espalhamento

As membranas planas foram sintetizadas através do espalhamento simples em placas de vidro planas de 20 x 30 cm. As soluções poliméricas foram vertidas sobre as placas e espalhadas com o auxílio de uma faca de espalhamento com espessura de 150 μm . Após o espalhamento, as placas contendo o filme polimérico foram imersas no banho de precipitação. No término da precipitação, os filmes foram mantidos no banho até que se descolassem espontaneamente das placas de vidro. Os filmes foram então mantidos imersos em água por um período mínimo de 72 h para retirada de solvente residual.

6.4 Síntese de fibras ocas

A Figura 41 mostra um diagrama esquemático do sistema de fiação utilizado neste trabalho.

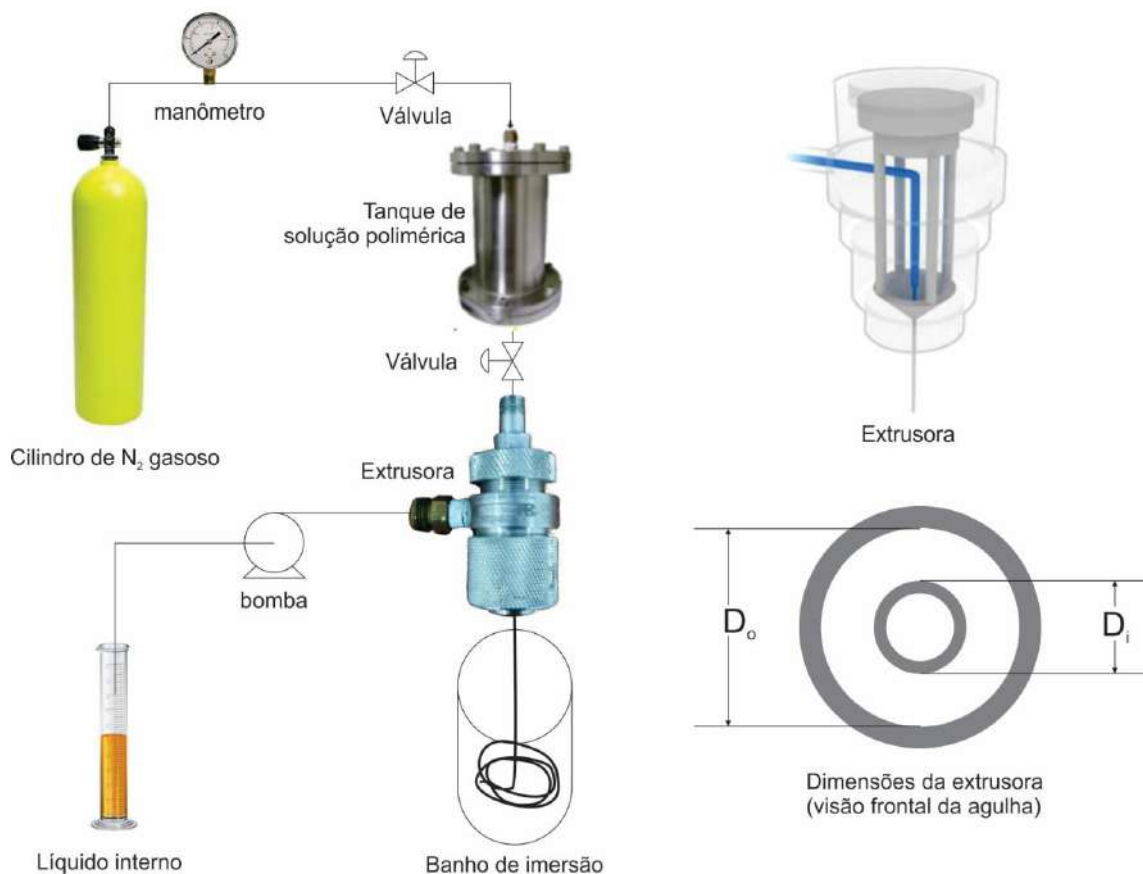


Figura 41 - Diagrama esquemático do sistema de fiação utilizado

A solução polimérica foi armazenada no tanque de estocagem, que foi mantido a temperatura constante com o auxílio de uma serpentina ou fita de aquecimento e um controlador de temperatura. A extrusora utilizada possuía diâmetros interno (D_i) e externo (D_o) 0,7 e 1,5 mm respectivamente, e foi também mantida a temperatura controlada. A solução foi pressurizada com nitrogênio para escoar em direção à extrusora, enquanto o líquido interno foi bombeado para a mesma.

A distância entre o banho de precipitação e a extrusora (DEB) foi fixada e a fibra nascente foi direcionada para o banho de imersão. As vazões de líquido interno e solução polimérica foram verificadas para controle das condições de extrusão. A fibra foi recolhida periodicamente do banho e mantida imersa em água por um período mínimo de 72 h para garantir a retirada de solvente residual.

6.5 Técnicas de caracterização

6.5.1 Viscosidade de solução polimérica

As viscosidades foram medidas em um viscosímetro de cilindros concêntricos (Brookfield) na faixa de taxa de cisalhamento de 0,084 a 79,2 s⁻¹. Os valores apresentados no decorrer deste trabalho foram expressos a 8,4 s⁻¹ (valor mínimo registrado em que todas as soluções apresentavam comportamento newtoniano).

6.5.2 Velocidade de precipitação

A velocidade de precipitação foi medida pelo acompanhamento da transmitância luminosa através do filme polimérico durante a sua precipitação. O sistema utilizado é ilustrado na Figura 42.

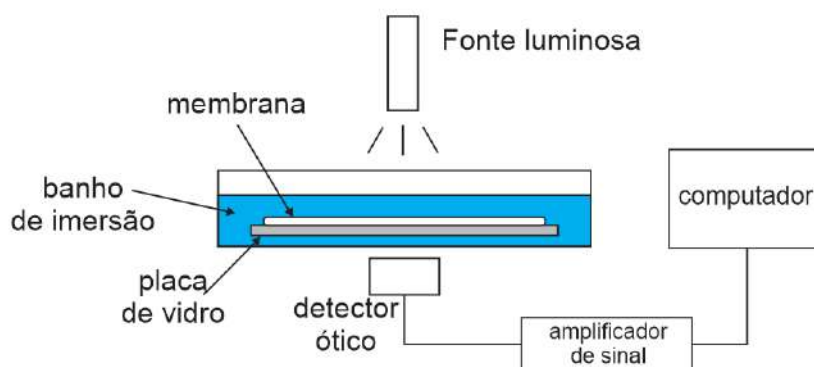


Figura 42 - Representação esquemática do sistema utilizado nos testes de velocidade de precipitação

A membrana foi posicionada entre a fonte luminosa e o detector ótico no início da imersão. A variação da intensidade luminosa é capturada pelo detector ótico e traduzida em porcentagem de transmitância relativa a intensidade inicial (anterior à formação da membrana).

6.5.3 Análise térmica

As temperaturas de transição vítrea e de fusão cristalina foram determinadas com o auxílio de um calorímetro diferencial de varredura (DSC) (Perkin Elmer, EUA). Para cada teste, 5 a 7 mg de amostras foram submetidas à taxa de aquecimento de 10 °C/min de 20 a 200°C em uma atmosfera de nitrogênio (vazão de 20 mL/min). As entalpias de

fusão cristalina foram calculadas e teor de cristalinidade das amostras foi estimado através da equação 11:

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^{100\%}} \times 100 \quad (11)$$

Onde

ΔH_m = entalpia de fusão cristalina;

$\Delta H_m^{100\%}$ = entalpia de fusão cristalina do material 100% cristalino (93.1 J/g para PLLA e PDLLA). [52]

χ_c = Cristalinidade (%)

6.5.4 Propriedades de transporte

A permeabilidade hidráulica foi obtida através do coeficiente angular da curva de pressão em função do fluxo permeado, utilizando-se água microfiltrada e desmineralizada em sistema de permeação com recirculação completa.

Durante os testes de permeação, as membranas foram previamente pressurizadas, visando considerar o efeito de compactação. Para isso, é recomendado que os testes sejam efetuados de modo a se obter valores de fluxo da maior para a menor pressão. Para garantir que compactação esteja completa, deve se considerar apenas os valores de fluxo estabilizados mantidos por um intervalo mínimo de tempo após a cada variação de pressão. Recomenda-se um intervalo de 20 minutos entre cada medição de fluxo.

6.5.4.1 Testes de permeabilidade em fibras ocas

Os experimentos realizados para a caracterização de propriedades de transporte em fibras ocas foram efetuados em módulos de PVC contendo fibras de 10 cm de comprimento. Os módulos foram construídos permitindo a circulação de fluidos pelo interior das fibras ocas e pela área externa das mesmas (através da carcaça do módulo), permitindo uma configuração de escoamento do tipo casco-tubo em contracorrente.

Os fluxos de água destilada e desmineralizada foram medidos à temperatura ambiente através da aplicação de diferença de pressão através da membrana de 0,1 a 1 bar (de fora para dentro das fibras). A faixa de pressão aplicada foi limitada a estes valores devido às limitações mecânicas impostas pelas fibras ocas, que tenderam a colapsar ao serem submetidas a pressões superiores.

6.5.4.2 Testes de diálise

Testes de diálise foram efetuados para se caracterizar as rejeições das fibras ocas sintetizadas em relação a solutos de diferentes massas molares. Para isto foram usados os solutos BSA e lisozima.

Soluções a 1,0 g/L de albumina de soro bovino (BSA) e uma solução a 0,1 g/L de lisozima foram preparadas em tampão fosfato. Para cada teste de diálise, uma das soluções foi recirculada pelo lúmen das fibras a uma vazão de 200 mL/min. Água destilada foi recirculada pela carcaça do módulo em contracorrente a 500 mL, conforme procedimento realizado no trabalho de (Gao et al., (2014) [46]. Os experimentos foram conduzidos por 6 horas, e as concentrações de soluto em ambas as correntes foi medida com um espectrofotômetro UV a 280 e 278 nm para BSA e lisozima, respectivamente.

As rejeições de BSA, lisozima foram calculadas conforme a equação 12

$$R(\%) = \left(1 - \frac{C^f}{C^0}\right) \times 100 \quad (12)$$

Onde C^f e C^0 são as concentrações das soluções no final e no início dos experimentos, respectivamente.

6.5.4.3 Testes de Osmose direta

Os testes de osmose direta foram efetuados em um aparato experimental similar ao utilizado nos testes de diálise, onde água microfiltrada e desmineralizada foi recirculada a 500 mL/min pelo casco do módulo e solução de NaCl 0,2 M (12 g/L) a 200 mL/min pelo interior das fibras.

Os testes foram realizados com duração de 24 h, e as concentrações de sal em ambas as correntes foram medidas com o auxílio de um condutivímetro de bancada (Quimis), através de uma curva de calibração para NaCl.

Os testes de osmose direta com NaCl foram avaliados em função do fluxo de sal e do fluxo de água transportado por osmose após testes de longa duração. O fluxo de água transferido por osmose direta foi calculado através da variação dos volumes das respectivas correntes ao final do experimento. Para isso, os reservatórios de solução salina e água foram vedados para evitar perdas por evaporação. Os fluxos de sal foram medidos a partir do cálculo da massa de sal em cada uma das correntes líquidas após o fim do experimento, através de sua concentração e volumes conhecidos. Para todos os cálculos

de fluxo foram consideradas a área total das fibras ocas nos módulos baseadas em sua superfície externa.

6.5.5 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a análise de seção transversal, as amostras devem ser fraturadas a baixas temperaturas através de sua imersão em nitrogênio líquido, evitando deformações mecânicas da amostra. As amostras devem ser previamente recobertas com uma fina camada de ouro em um metalizador do tipo *sputtering* (Emitech). Para a análise foi utilizado um microscópio eletrônico de varredura (FEI, modelo Quanta 200) com aceleração de voltagem de 20 keV.

6.5.6 Propriedades mecânicas

A avaliação de propriedades mecânicas das fibras ocas produzidas neste trabalho foi efetuada com o auxílio de uma máquina de testes mecânicos universal (EMIC DL 2000) com célula de carga de 20 kN. As amostras foram presas em suas extremidades com o auxílio de garras distanciadas a 10 cm, e foram submetidas a alongamento a uma taxa de 5 mm/min até ruptura, protocolo adaptado conforme medições realizadas nos trabalhos de Gao et. al., [60] e Minbu et. al., [42]. Os valores apresentados foram resultados de médias de triplicatas.

7 Efeito da estereoisomeria do poli(ácido láctico) na síntese de fibras ocas

Conforme mencionado em capítulos anteriores, a estereoisomeria do ácido láctico permite a existência de materiais distintos, como o poli(L-ácido láctico) (PLLA) e o poli(D,L- ácido láctico) (PDLLA). É reportado na literatura que estes materiais possuem significativas diferenças entre suas propriedades mecânicas, térmicas e de solubilidade.

O objetivo deste capítulo foi comparar o PLLA e o PDLLA como materiais para síntese de fibras ocas, almejando seu uso como Conduíte de Guia Neural (CGN).

Foram efetuadas análises térmicas para determinação de temperaturas de transição e cristalinidade dos polímeros analisados e comparadas as viscosidades de soluções poliméricas de PLLA e PDLLA, usando NMP como solvente. Foram medidas as velocidades de precipitação de filmes PLLA e PDLLA em água, utilizando NMP como solvente em testes de imersão em banho de não-solvente. Pontos dos diagramas ternários destes sistemas foram experimentalmente determinados, a fim de se verificar a relação entre as suas regiões de miscibilidade.

As morfologias dos filmes planos e das fibras ocas produzidas foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura e testes mecânicos de tração e sutura foram efetuados para avaliar o potencial de cada fibra oca para sua utilização como CGN.

Soluções poliméricas de PLLA e PDLLA foram produzidas com concentração de 20 % (em massa) utilizando NMP como solvente. Antes da realização dos experimentos, estas soluções foram aquecidas e estocadas em um tanque reservatório mantido a 60 °C.

Os filmes poliméricos foram produzidos através do espalhamento das soluções poliméricas em uma placa de vidro aquecida a 60 °C com uma faca de espalhamento de 150 μm . As soluções poliméricas foram previamente aquecidas a 60 °C e os filmes espalhados foram imersos em água microfiltrada a 25 °C.

Para a síntese das fibras ocas, pressão foi aplicada à corrente de nitrogênio e ajustada de modo a manter a mesma vazão entre as soluções poliméricas de PLLA e PDLLA. Água microfiltrada a 25 °C foi utilizada como líquido interno e como banho de imersão. A vazão de líquido interno variou de 4 a 6 mL/min nos experimentos, buscando a síntese de fibras com mesmo diâmetro interno. A extrusora foi mantida a 60 °C com o

auxílio de uma fita de aquecimento e mantida com espaçamento mínimo ao banho de imersão (DEB = 0 cm)

Testes de tração nas fibras ocas de PLLA e PDLLA foram efetuados conforme descrito no capítulo 6. As fibras ocas foram também submetidas a testes de sutura, onde filamentos de nylon foram suturados e amarrados a 2 mm das extremidades das fibras ocas, com o auxílio de uma agulha microcirúrgica. Os filamentos foram então tracionados manualmente, para se avaliar a integridade das fibras ocas em um procedimento cirúrgico de enxerto como CGN.

7.1 Resultados e discussão

7.1.1 Análise térmica

As entalpias de fusão cristalina, temperaturas de transição vítrea (T_g) e fusão cristalina (T_m) das amostras de PLLA e PDLLA são apresentadas na Tabela 12.

Tabela 12 – Temperaturas de transição e entalpias de fusão cristalina das amostras de PLLA e PDLLA analisadas

amostra	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH (J/g)
PLLA	65	155,5	17,41
PDLLA	67	-	-

Ambos os polímeros apresentaram valores próximos de temperaturas de transição vítrea, variando de 65 °C para PLLA e 67 °C para PDLLA. A amostra de PDLLA não apresentou temperatura de fusão cristalina por ser amorfa, enquanto a amostra de PLLA apresentou valor de entalpia de fusão cristalina de 17,41 J/g. Isso corresponde a um valor de 18,6 % de cristalinidade para este material, calculado com o auxílio da Equação 11. É reportado na literatura que variedades de poli(ácido láctico) com pureza ótica (isômeros L- ou D-) acima de 90 % são tipicamente semicristalinos, enquanto valores inferiores a 90 % constituem materiais amorfos [38, 39].

7.1.2 Viscosidade de soluções poliméricas

Os valores das viscosidades das soluções poliméricas de PLLA e PDLLA em NMP estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Viscosidades das soluções poliméricas de PLLA e PDLLA em NMP como solvente, a 20% (m/m) e 60 °C

Solução polimérica	μ (cp)
PDLLA	1150
PLLA	320

A solução polimérica de PDLLA (1150 cP) se mostrou consideravelmente mais viscosa do que a de PLLA (320 cP). Perego et al., (1996) [59] reportaram aumento da viscosidade em ambas as soluções de PLLA e PDLLA em clorofórmio com o aumento da massa molar do polímero. Porém, para soluções poliméricas de mesma massa molar,

soluções de PDLLA apresentaram viscosidades com valores menores, comparados aos obtidos para as soluções de PLLA.

Dessa forma, é assumido que a diferença entre as viscosidades das soluções poliméricas avaliadas neste trabalho está tanto associada à diferença entre as massas molares, quanto à sua estereoisomeria.

7.1.3 Velocidade de precipitação

As curvas que mostram os resultados dos testes de decaimento de transmitância luminosa durante a imersão dos filmes de PLLA e PDLLA estão expressas na Figura 43, e os diagramas ternários dos sistemas PLLA-água-NMP e PDLLA-água-NMP apresentados na Figura 44.

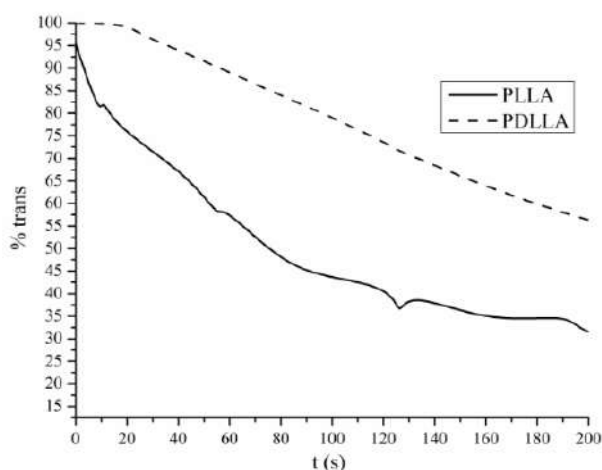


Figura 43 –Decaimento de transmitância luminosa durante imersão dos filmes espalhados de PLLA e PDLLA

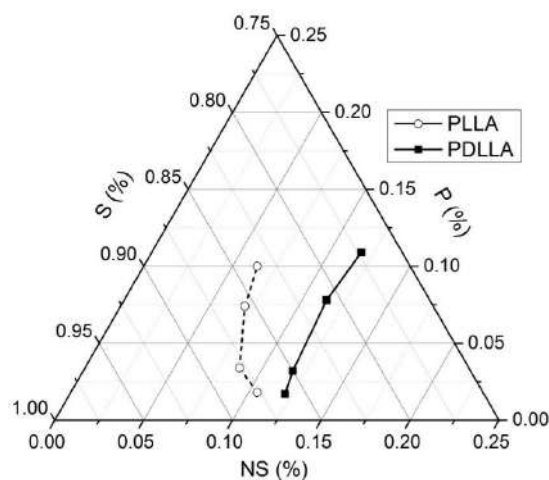


Figura 44 – Diagramas ternários dos sistemas PLLA-água-NMP e PDLLA-água-NMP a 60°C

A precipitação do filme de PLLA ocorreu instantaneamente, enquanto o filme de PDLLA apresentou atraso de 28 s na precipitação. Embora o atraso na precipitação possa ser diretamente relacionado à mais alta viscosidade da solução polimérica de PDLLA, convém efetuar uma análise conjunta deste resultado, considerando os diagramas ternários apresentados na Figura 44.

É observado que o sistema PLLA-água-NMP possui uma região de imiscibilidade consideravelmente superior, o que significa que a quantidade de não-solvente necessário para desestabilizar o sistema com PLLA é consideravelmente menor do que a quantidade necessária para desestabilizar o sistema que contém PDLLA. Isso está correlacionado à velocidade mais rápida de precipitação do filme de PLLA.

Alguns estudos na literatura apresentam pontos de diagramas ternários contendo polilactídeos [48, 57, 87, 92]. Nestes estudos, pontos de diferentes sistemas como PLLA-dioxano-etanol, PLLA-dioxano-água e PLLA-clorofórmio-metanol, o que dificulta uma comparação com os diagramas obtidos neste trabalho. Entretanto, van de Witte et al., (1996) [79] compararam pontos de turbidez de sistemas PLLA / PDLLA-clorofórmio-etanol. O sistema contendo PLLA também apresentou maior região de imiscibilidade comparada à curva do sistema contendo PDLLA.

7.1.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Ambos os filmes planos de PLLA e PDLLA apresentaram superfície externa superior com ausência de poros. Nas secções transversais, ambos os filmes apresentaram macrovazios digitiformes próximos à região superior da secção. Estas estruturas são o resultado típico de precipitações rápidas da camada superior, o que resulta em uma resistência à transferência de massa entre solvente e não-solvente no banho de precipitação. Essa camada consolidada devido à rápida precipitação permite que gotículas da fase pobre em polímero coalesçam e avancem no sentido descendente, juntamente com a frente de precipitação, formando os macrovazios. Este mecanismo é amplamente descrito em textos sobre síntese de membranas poliméricas, e é descrito em detalhes no trabalho de Machado et al., (1999) [89].

Abaixo e externamente aos macrovazios, diferentes morfologias são observadas para cada amostra. No filme de PLLA, aglomerados sólidos são formados, sendo estruturas tipicamente resultantes do mecanismo de separação sólido-líquido. Estruturas similares foram reportadas no trabalho de van de Witte et al., (1993) [48], onde foi

reportado que o processo de cristalização durante a formação das membranas de PLLA influenciou fortemente a sua estrutura.

No filme de PDLLA, é visível que a forma da estrutura esponjosa predominante nas regiões externas aos macroporos é formada por nucleação e crescimento de gotículas de fase pobre em polímero (Figura 45). Conforme discutido, a precipitação mais rápida na camada superior, proporciona a precipitação com atraso na subcamada da secção transversal, gerando os macroporos.

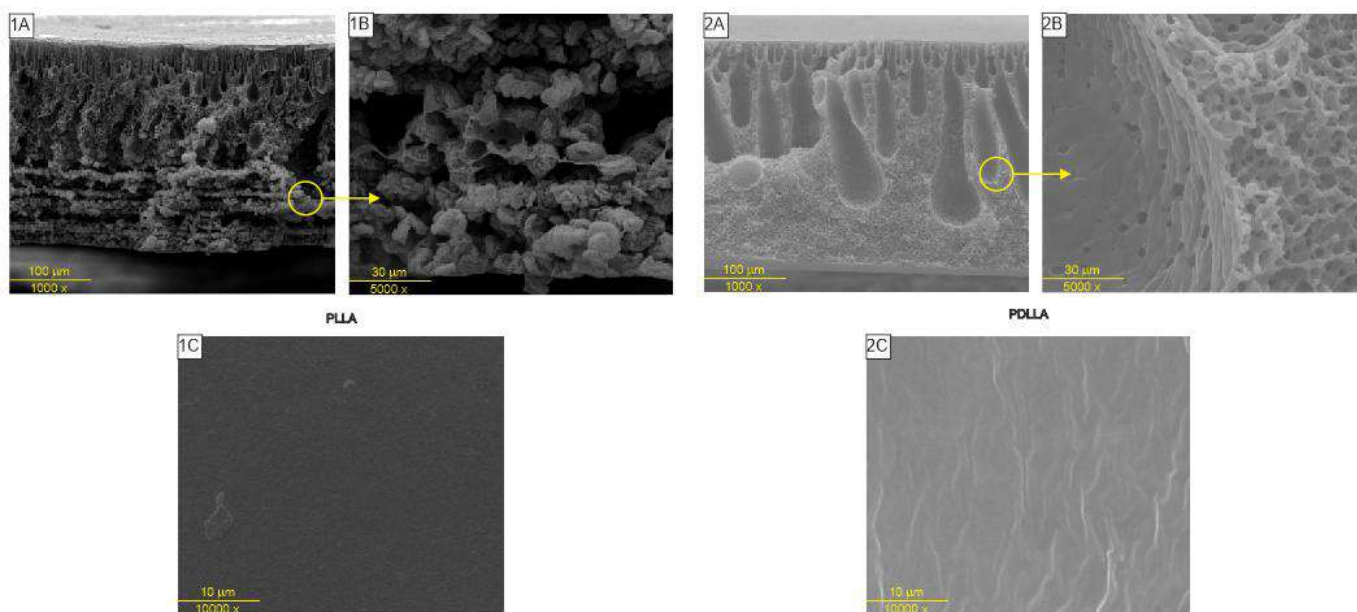


Figura 45 – Imagens de MEV dos filmes poliméricos. 1 = PLLA; 2 = PDLLA; A = Secção transversal; B = detalhe da secção transversal; C = superfície externa superior

As estruturas observadas nas fibras ocas seguem o mesmo padrão de morfologias observadas nos filmes planos, onde macroporos digitiformes são formados ortogonalmente às superfícies externas e se encontram próximas ao centro da secção transversal.

A excentricidade da fibra oca de PLLA, apesar de indesejável, revela que ao centro da região mais espessa da secção, aglomerados esferulíticos foram formados (Figura 46 – 1C), reforçando o que foi constatado nos filmes planos: em regiões mais distantes das camadas externas (onde a precipitação ocorre com maior atraso), a cristalinidade do polímero induz o processo de separação sólido-líquido. Na fibra oca de PDLLA, estruturas esponjosas resultantes do mecanismo de separação líquido-líquido são detectadas em pontos próximos ao centro da secção transversal (Figura 46 – 2C). Moriya

et al., (2009) [31] também reportaram a ocorrência da transição de macroporos digitiformes para aglomerados esponjosos, em condições de fiação onde atraso na precipitação fora induzido durante a síntese de fibras ocas de PLLA.

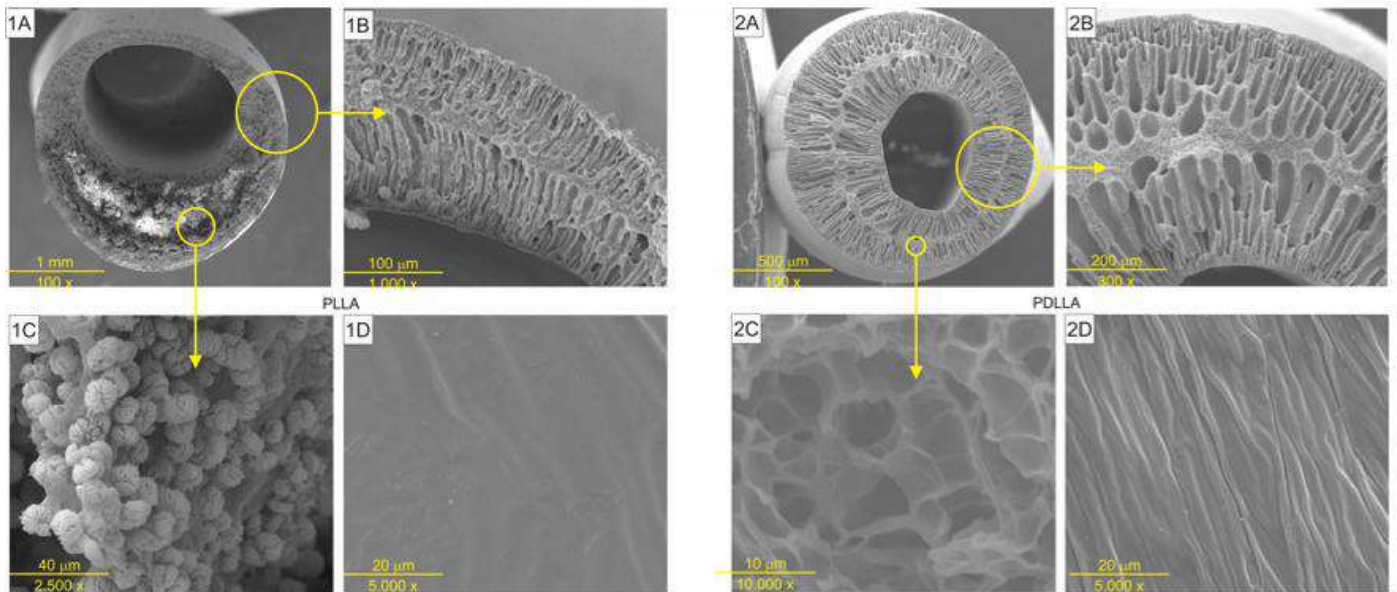


Figura 46 – Imagens de MEV das fibras ocas. 1 = PLLA; 2 = PDLLA; A = seção transversal; B = detalhe da seção transversal; C = detalhe da formação de estruturas resultantes dos mecanismos L-L e S-L de separação de fases; D = superfície externa

7.1.5 Propriedades mecânicas

As fibras ocas de PDLLA apresentaram maleabilidade e características elastoméricas, enquanto as de PLLA se mostraram bastante rígidas e quebradiças, se rompendo facilmente durante seu manuseio. Resultados dos testes de tração das fibras de PLLA não foram possíveis de se obter, pois devido à sua friabilidade, as mesmas se colapsavam imediatamente após serem presas nos pontos de apoio da máquina de testes universal. As fibras de PDLLA apresentaram módulo de elasticidade de 193,7 MPa, tensão de ruptura de 2,46 MPa e alongamento de ruptura de até 9%.

Tabela 14 – Comparativo entre propriedades mecânicas de fibras ocas sintetizadas com PLA na literatura e com nervo humano

Referência	Material	Alongamento até ruptura (%)	Módulo de elasticidade (MPa)	Tensão de ruptura (MPa)
Este trabalho	PDLLA (fibra oca)	9 (± 2)	193,7 (± 29)	2,46 (± 0.3)
Este trabalho	PLLA (fibra oca)	N.D.	N.D.	N.D.
Adamus et al., (2012)	PLLA (fibra oca)	10 (± 2)	53	3,4
Bettahalli et al., (2011)	PLLA (fibra oca)	-	335	-
Moriya et al., (2009)	PLA (fibra oca)	-	-	3,5
Chiono; Tonda-Turo (2015)	Nervo humano intacto	61 (± 2)	15,87 ($\pm 2,21$)	6,78 ($\pm 0,57$)

*N.D. = não determinado

Os valores observados para tensão de ruptura das fibras ocas de PDLLA são inferiores aos reportados em outros trabalhos na literatura, como pode ser observado na Tabela 14. O alongamento de ruptura é similar ao reportado em outros estudos, enquanto o módulo de elasticidade se encontra entre valores reportados em outros trabalhos [15, 18]. Fibras ocas utilizadas como implantes de conduítes de guia neural devem permitir seu manuseio durante o procedimento, sem rompimento ou comprometimento de suas propriedades. Comparado ao nervo humano intacto, o módulo de elasticidade da fibra oca de PDLLA é consideravelmente maior, o que significa que as fibras são mais resistentes à tração axial. Isso é desejável para este tipo de procedimento cirúrgico, uma vez que materiais muito elásticos podem ter sua porosidade e propriedades alteradas em caso de deformação durante a aplicação de tração resultante das suturas.

Durante os testes de sutura, as fibras ocas de PDLLA apresentaram boa estabilidade, resistência durante a perfuração e resistência à tração axial. As fibras ocas de PLLA, por outro lado, não puderam ser submetidas a este teste, pois se fragmentavam com a passagem da agulha cirúrgica, antes mesmo que os fios de nylon pudessem ser amarrados (Figura 47).

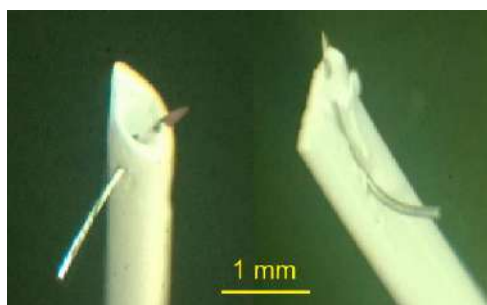


Figura 47 – detalhe do teste de sutura. Esquerda: PDLLA; Direita: PLLA

7.1.6 Conclusões parciais

A análise térmica das variedades de PLA confirmou o caráter semicristalino do PLLA, que apresentou 18,6% de cristalinidade, e PDLLA como material totalmente amorfo.

Soluções poliméricas contendo 20% de PDLLA (1150 cP) e PLLA (320 cP) em NMP apresentaram significativas diferenças entre valores de viscosidades. Viscosidades muito baixas como a verificada para a solução de PLLA são indesejáveis por trazerem limitações durante o processo de fiação. O filme polimérico que passa pela extrusora precisa possuir resistência mecânica apropriada para manter sua forma cilíndrica com a passagem do líquido interno em seu lúmen, e essa condição foi verificada como muito instável no caso da solução de PLLA. Já as soluções poliméricas de PDLLA apresentaram maior estabilidade mecânica durante a fiação, permitindo maior homogeneidade das fibras ocas produzidas.

Os filmes de PLLA apresentaram precipitação instantânea enquanto os filmes de PDLLA apresentaram atraso de 28 s. Esta diferença está associada à diferença entre as viscosidades das soluções poliméricas, sendo reforçada pela posição relativa dos pontos das curvas dos diagramas ternários: a curva dos pontos de turbidez do sistema contendo PLLA possui uma região de instabilidade consideravelmente superior à curva do sistema contendo PDLLA. Isso mostra que a precipitação dos sistemas PLLA-água-NMP ocorre com considerável menor quantidade de não-solvente do que o sistema PDLLA-água-NMP, o que justifica a precipitação mais rápida do primeiro sistema.

Tanto os filmes quanto as fibras ocas sintetizados a partir de ambos os materiais apresentaram morfologias semelhantes, com superfícies externas com ausência de poros, e secções transversais com macrovazios digitiformes. Nas membranas de PLLA foram visualizadas estruturas de aglomerados esferulíticos típicos de processos de separação de fase sólido-líquido, sendo que estas estruturas associadas ao fenômeno de cristalização do PLLA.

As fibras ocas de PLLA se mostraram bastante quebradiças e friáveis, tornando os procedimentos de testes de tração e sutura inviáveis. Desta forma, as fibras ocas de PDLLA se mostraram mecanicamente muito superiores às de PLLA. As propriedades mecânicas das fibras ocas de PDLLA como módulo de elasticidade, tensão e alongamento de ruptura se mostraram próximos aos valores recomendados para procedimentos

cirúrgicos, por serem comparáveis a valores de propriedades de nervos humanos. Estas membranas também apresentaram resistência satisfatória aos testes de sutura, permitindo uma fácil perfusão das agulhas cirúrgicas e amarração das suturas de nylon.

Como conclusão final desta etapa, o PDLLA foi avaliado como material mais apropriado para o desenvolvimento de fibras ocas para a aplicação como CGN.

8 Avaliação do efeito de variáveis durante síntese de membranas de PDLLA

Os resultados discutidos no capítulo 7 indicaram que o PDLLA é adequado ao preparo de membranas para atuarem como CGN. Desta forma, este capítulo apresenta um estudo das condições de síntese das fibras ocas de PDLLA. Os métodos de separação de fases são os mais aplicados para a síntese de fibras ocas poliméricas, sendo a imersão em banho de não-solvente o mais utilizado. Conforme mencionado no capítulo 5, a termodinâmica e cinética de precipitação têm um papel fundamental nas características das membranas sintetizadas, como morfologia, porosidade e conseqüentemente em suas propriedades de transporte.

O objetivo deste capítulo é verificar experimentalmente para o sistema PDLLA-NMP-água, os efeitos de algumas das variáveis influentes no processo de formação de membranas. Estas informações são necessárias para a pré-avaliação das condições de síntese das fibras ocas a serem sintetizadas para uso como conduíte de guia neural.

Neste capítulo foram investigadas as variáveis:

- Efeito da temperatura da solução polimérica e do banho de imersão;
- Efeito da concentração de solução polimérica de PDLLA e do banho de imersão;
- Efeito da presença de solvente no banho de imersão;
- Efeito de aditivos poliméricos reportados na literatura como geradores de poros, como polietileglicol (PEG) e polivinilpirrolidona (PVP).

Para isso, filmes poliméricos de soluções de PDLLA em NMP foram espalhados e imersos em banho de não-solvente em condições determinadas por delineamentos experimentais, verificando o efeito das variáveis descritas acima.

Como variáveis-resposta, foram analisadas as viscosidades das soluções poliméricas, o tempo de atraso na precipitação durante inversão de fases e a permeabilidade hidráulica dos filmes produzidos. Imagens de microscopia eletrônica de varredura dos filmes também foram produzidas para o auxílio da interpretação dos resultados.

Para efetuar os testes de precipitação, os filmes poliméricos foram inseridos no aparato experimental utilizado foi descrito no capítulo 6, durante a precipitação por imersão em banho de não-solvente. Os valores dos tempos de atraso de precipitação foram apresentados como média de triplicatas.

Os fluxos de permeado de água desmineralizada foram determinados em uma célula com área de membrana igual a $1,2 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2$ com recirculação total. A diferença de pressão através da membrana foi variada de 0,1 a 1 bar, e as permeabilidades foram calculadas através da inclinação das curvas de fluxo de permeado em função desta diferença de pressão. A medição dos pontos de fluxo de permeado foi também efetuada conforme descrito no capítulo 6.

8.1.1 Delineamento experimental

Nas Tabelas 15 a 19 estão expressos os delineamentos experimentais dos experimentos efetuados neste capítulo.

Tabela 15 – Delineamento experimental para análise do efeito da temperatura do banho de imersão e da solução polimérica. Concentração polimérica = 20% (m/m)

Identificação amostra	Temperatura banho de imersão (°C)	Temperatura solução polimérica (°C)
T1	60	60
T2	60	25
T3	25	60
T4	25	25

Tabela 16 - Delineamento experimental para análise do efeito da concentração polimérica. Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C

Identificação amostra	Concentração polimérica (% m/m)
C1	14
C2	16
C3	18
C4	20
C5	22

Tabela 17 - Delineamento experimental para análise do efeito da composição do banho de imersão. Concentração polimérica = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C

Identificação amostra	Composição banho de imersão água-NMP (% m/m)
P-0	100-0
P-25	75-25
P-50	50-50
P-75	25-75

Tabela 18 - Delineamento experimental para análise do efeito da massa molar de PEG na solução polimérica. Concentração PDLLA = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C

Identificação amostra	Mw PEG (Da)	Concentração PEG (% m/m)
PEG-0	-	0
PEG-15k	14.000	5%
PEG-25k	24.100	5%

Tabela 19 - Delineamento experimental para análise do efeito da concentração de PVP na solução polimérica. Concentração PDLLA = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C

Identificação amostra	Concentração PVP (% m/m)
PVP-0,5	0,5
PVP-2	2
PVP-5	5
PVP-10	10

8.2 Resultados e discussão

8.2.1 Efeito da temperatura do banho de imersão e da solução polimérica

Os resultados apresentados na Tabela 20 e na Figura 48 mostram que a temperatura da solução polimérica afeta o tempo de precipitação, sendo que temperaturas mais baixas de 25 °C induzem em maiores atrasos. A temperatura do banho de precipitação não afetou significativamente o tempo de observado para início da queda de transmitância, ou seja, para início da precipitação.

Em relação à permeabilidade hidráulica, não foi possível verificar uma tendência relacionada às temperaturas do banho de imersão e da solução polimérica. Embora a combinação de temperatura em T2 tenha resultado no menor valor de permeabilidade

hidráulica, pode se dizer não houve uma tendência clara no valor das permeabilidades em função das variáveis analisadas.

Sendo as permeabilidades pouco afetadas pelas temperaturas do banho de imersão e da solução polimérica, convém utilizar uma condição onde a precipitação possua menos atraso. Durante o procedimento de fiação, condições que induzam precipitações com grande atraso podem gerar problemas como a adesão da superfície externa das fibras no tanque de precipitação, além de deformidades mecânicas durante a precipitação. Portanto, diante dos resultados, conclui-se que T3 é a condição mais apropriada para utilização nos demais experimentos, uma vez que fornece a combinação de precipitação relativamente acelerada (próxima à verificada na condição T1), sem a necessidade do aquecimento do banho de imersão.

Tabela 20 – resultados do delineamento experimental para efeito da temperatura do banho de imersão e da solução polimérica. Concentração polimérica = 20% (m/m)

Identificação mostra	Temperatura banho de imersão (°C)	Temperatura solução polimérica (°C)	Tempo para início da queda de transmitância (s)	Permeabilidade hidráulica (L/m ² h bar)
T1	60	60	21,02 (± 7,53)	10,19
T2	60	25	60,93 (± 9,35)	7,39
T3	25	60	28,38 (±1,19)	13,71
T4	25	25	68,38 (±5,67)	12,57

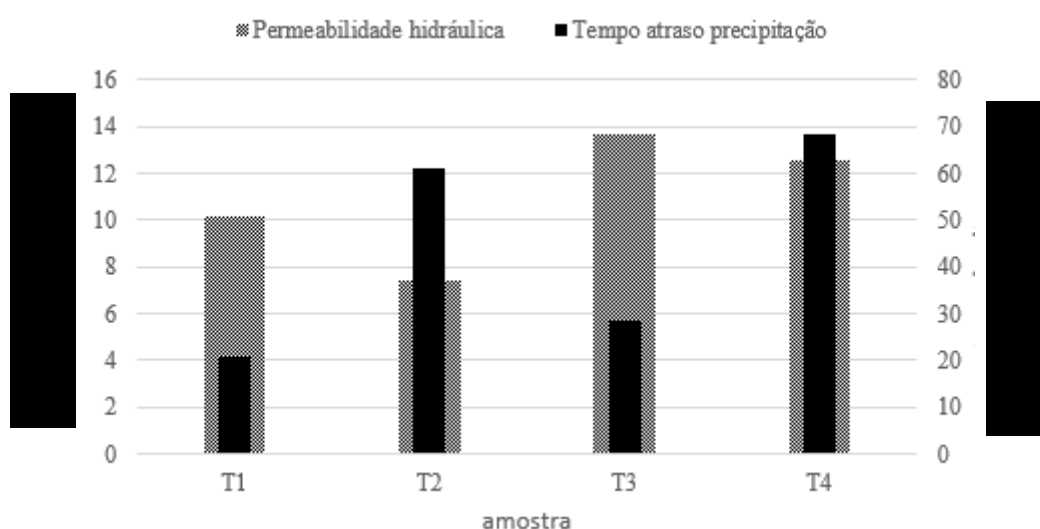


Figura 48 – tempos de atraso na precipitação e permeabilidade hidráulica dos experimentos para análise do efeito da temperatura do banho de imersão e da solução polimérica. Concentração de PDLLA = 20% (m/m)

8.2.2 Efeito da concentração polimérica

Os resultados expressos na Tabela 21 e na Figura 49 mostram que, de forma geral, a permeabilidade hidráulica tende a diminuir com o aumento da concentração polimérica, tendo uma drástica queda em concentrações de 18 e 20%. À concentração de 22%, as membranas sintetizadas não apresentaram fluxo de permeado na faixa de diferença de pressão aplicada através das membranas avaliada (0,1 a 1 bar). É também verificada tendência entre o aumento do tempo para início da queda de transmitância, indicando o atraso na precipitação com o aumento da concentração polimérica.

Tabela 21 – resultados do delineamento experimental para análise do efeito da concentração polimérica.
Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C

Concentração polimérica (% m/m)	Tempo para início da queda de transmitância (s)	Permeabilidade hidráulica (L/m ² h bar)
14	3,72 ($\pm 1,20$)	26,73
16	6,61 ($\pm 2,52$)	31,43
18	3,54 ($\pm 1,32$)	15,40
20	28,38 ($\pm 1,19$)	13,71
22	24,68 ($\pm 5,12$)	0

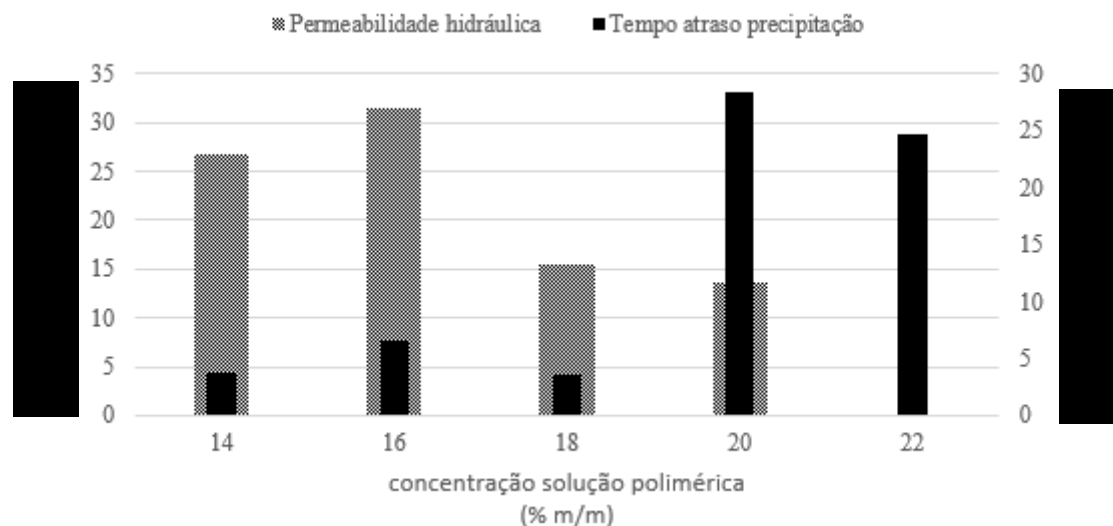


Figura 49 - tempos de atraso na precipitação e permeabilidade hidráulica dos experimentos para avaliação do efeito da concentração polimérica. Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C

As imagens de MEV apresentadas na Figura 50 mostram que não houve alteração aparente na morfologia e no diâmetro médio de poros dos filmes com a mudança na

concentração polimérica, observando-se as superfícies externas e secções transversais das mesmas. Porém, pode se notar um aumento da porosidade da superfície interna dos filmes com a diminuição da concentração polimérica, o que justifica o aumento da permeabilidade nestas condições. Através disto, é possível concluir que precipitações rápidas das camadas superiores ocorreram em todos os filmes, porém o aumento da concentração afetou significativamente a formação das subcamadas adjacentes.

Verificou-se que a concentração polimérica é uma variável possível de ser utilizada para controle da permeabilidade das membranas de PDLLA. Entretanto, verificou-se que filmes com baixas concentrações poliméricas (abaixo de 18%) formam filmes mecanicamente muito sensíveis, sendo facilmente quebrados ao simples manuseio.

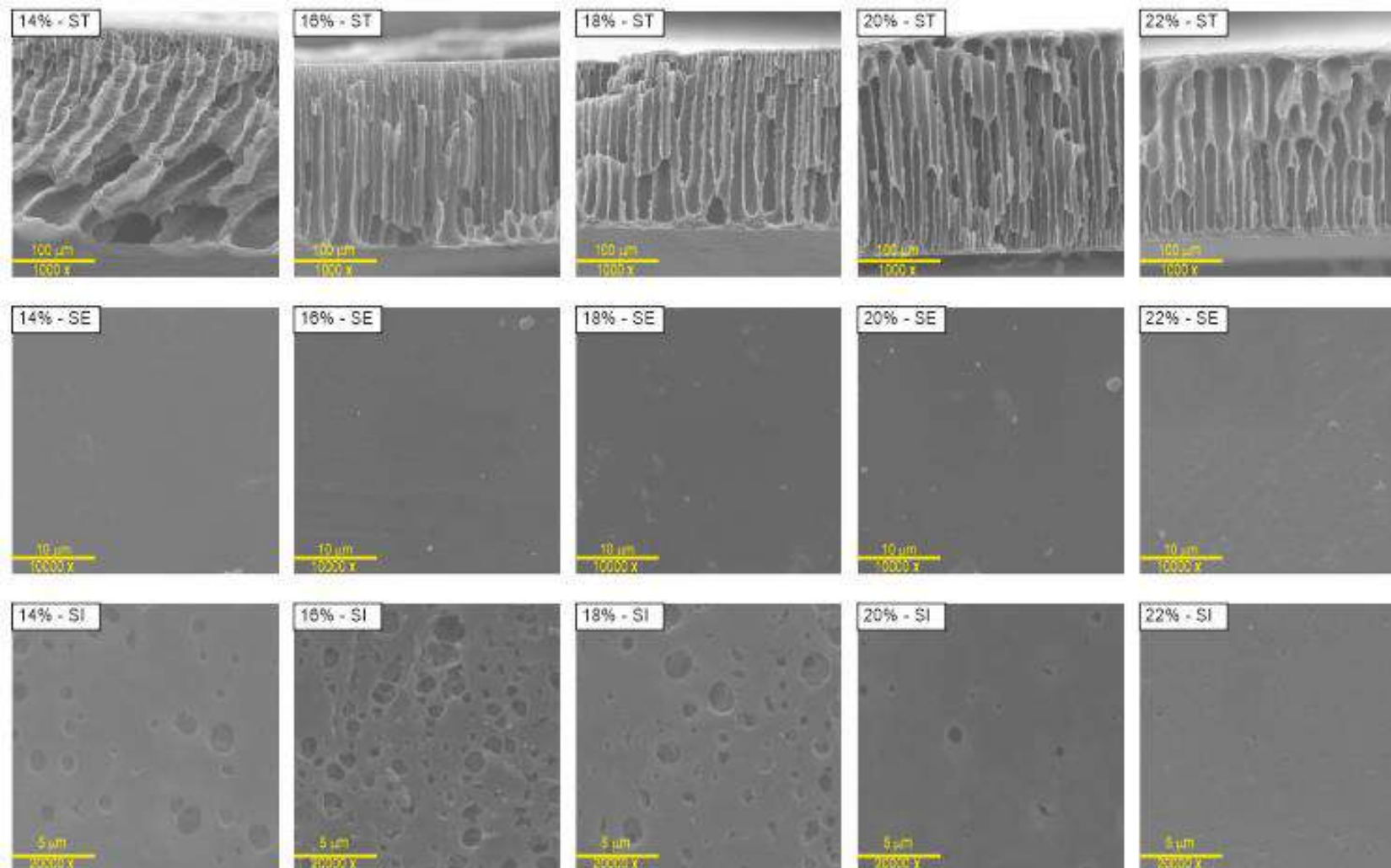


Figura 50 – Imagens de MEV dos filmes de PDLLA sintetizados para avaliação do efeito da concentração polimérica. ST = secção transversal; SE = superfície externa; SI = superfície interna

8.2.3 Efeito da composição do banho de imersão

Os resultados expressos na Tabela 22 mostram que a presença de solvente no banho de imersão induz ao aumento no atraso da precipitação.

A amostra P-75 não precipitou totalmente mesmo após 1 hora de imersão no banho contendo 75% de solvente em sua composição. Neste caso, o filme parcialmente formado foi imerso posteriormente em água para promover sua completa precipitação. Somente após este procedimento foi possível se obter um filme com estrutura sólida e estável.

Através da observação das imagens de MEV na Figura 51, verifica-se que conforme se aumenta a concentração de solvente no banho de imersão, e conseqüentemente o atraso na precipitação, a supressão dos macrovazios digitiformes ocorre nas camadas inferiores dos filmes. Na transição da amostra P-0 para P-25, nota-se que os macrovazios se tornam mais largos e se apresentam em menor quantidade nas camadas inferiores. Na amostra P-50 podem ser observados macrovazios esféricos e a presença de uma morfologia esponjiforme em sua estrutura, conforme pode ser observado em detalhe na Figura 52. Na amostra P-75, os macrovazios nas camadas inferiores são totalmente suprimidos e toda sua estrutura é formada por uma morfologia esponjiforme nessa região.

Nota-se que em todas as amostras, as camadas superiores permanecem praticamente inalteradas, com a presença de macrovazios digitiformes de menor dimensão. Isso indica que ocorre uma rápida precipitação nas camadas superiores dos filmes de PDLLA, seguida por diferentes velocidades de precipitação nas camadas inferiores, influenciadas pela composição de solvente no banho de imersão.

Tabela 22 - resultados do delineamento experimental para análise do efeito da composição do banho de imersão. Concentração polimérica = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C

Identificação amostra	Composição banho de imersão água-NMP (% m/m)	Tempo para início da queda de transmitância (s)	Permeabilidade hidráulica (L/m ² h)
P-0	100-0	28,38 (±1,19)	13,71
P-25	75-25	60,69 (±12,15)	0
P-50	50-50	154,34 (±9,02)	0
P-75	25-75	∞	0

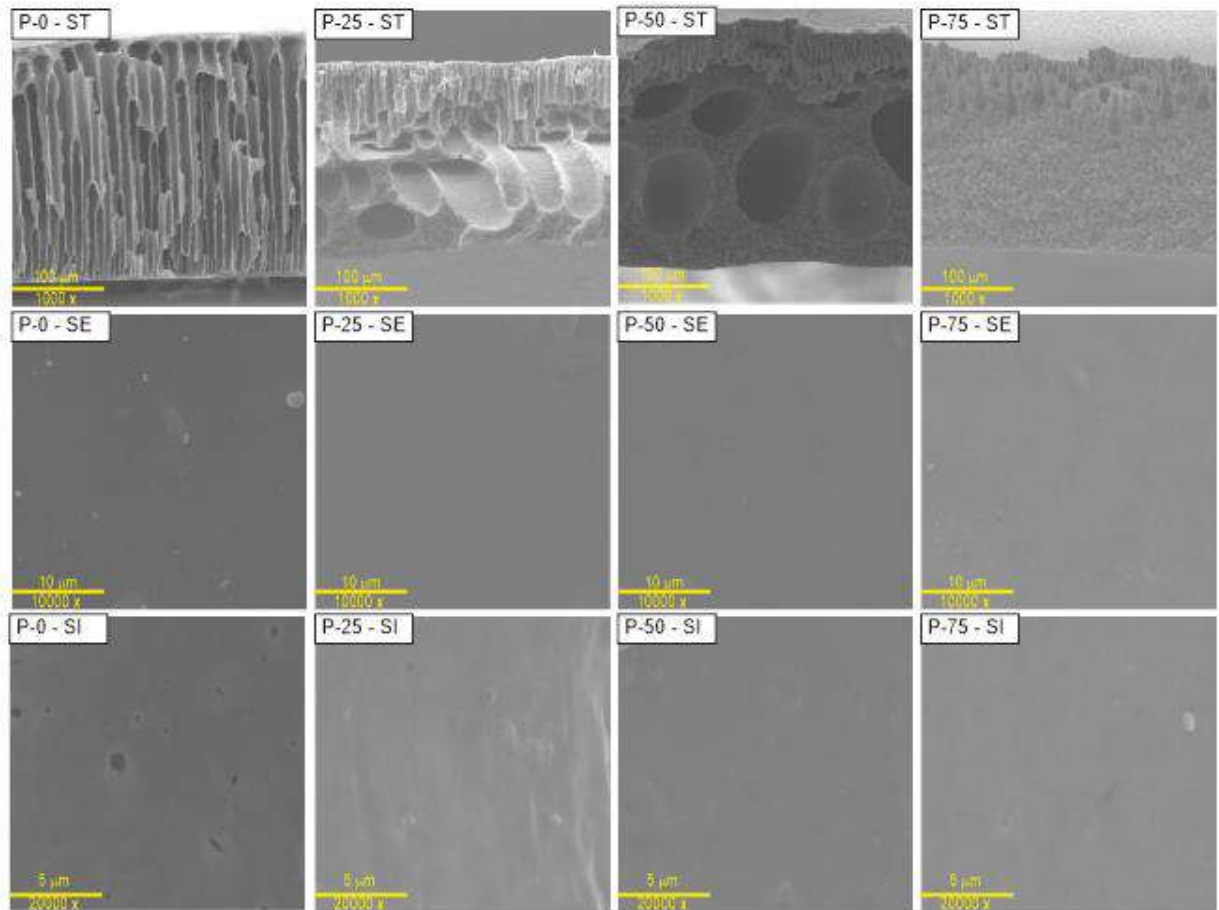


Figura 51 - Imagens de MEV dos filmes de PDLA sintetizados para análise do efeito da composição do banho de imersão. ST = secção transversal; SE = superfície externa; SI = superfície interna

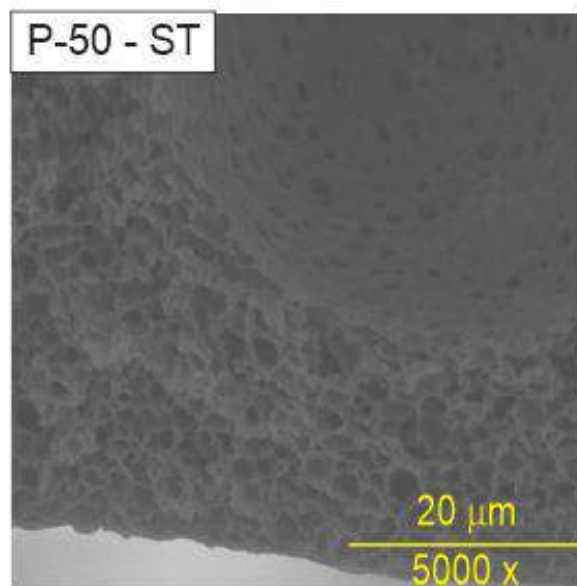


Figura 52 – Detalhe da secção transversal da amostra P-50: formação de estruturas com morfologia esponjiforme

Em todas as amostras sintetizadas com algum teor de solvente no banho de imersão, não foi verificado fluxo de permeado na faixa de pressões avaliada. Verifica-se pelas imagens presentes na Figura 51 que as superfícies interna e externa destes filmes não apresentaram poros detectáveis.

Nesta análise, verifica-se que o controle da velocidade de precipitação é um mecanismo capaz de promover a transição de morfologias durante a síntese de membranas de PDLLA. Entretanto, a inserção de grandes quantidades de solvente no banho de imersão pode trazer empecilhos técnicos e econômicos. Desta forma, outras técnicas como a utilização de solventes que possuam menor interação com o não-solvente devem ser avaliadas para se atingir o mesmo efeito de forma viável.

Uma vez que o atraso na precipitação resultou na supressão do fluxo de permeado, a utilização de aditivos que possam aumentar a porosidade também deve ser considerada.

8.2.4 Efeito da utilização de aditivos poliméricos geradores de poros

8.2.4.1 Efeito da adição de PEG

A adição de 5% (m/m) de PEG de diferentes massas molares foi capaz de alterar as viscosidades das soluções poliméricas, aumentando a viscosidade com o aumento da massa molar de PEG adicionada. Entretanto, não foi verificado aumento na porosidade ou na permeabilidade hidráulica dos filmes produzidos após estas adições. Verificou-se que a precipitação sofreu apenas o efeito do aumento da viscosidade da solução polimérica, aumentando o atraso na precipitação e tornando as superfícies das membranas fechadas, conforme pode ser observado na Figura 53.

Tabela 23 - delineamento experimental para análise do efeito da massa molar de PEG na solução polimérica. Concentração PDLLA = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C; Composição do banho de imersão = 100% água

Identificação amostra	Mw PEG (Da)	Concentração PEG (% m/m)	Viscosidade solução polimérica (cP)	Tempo para início da queda de transmitância (s)	Permeabilidade hidráulica (L/m ² h bar)
PEG-0	-	0	1150	28,38 (±1,19)	13,71
PEG-15k	14000	5%	1330	15,56 (±5,50)	0
PEG-25k	24100	5%	1800	15,77 (±3,26)	0

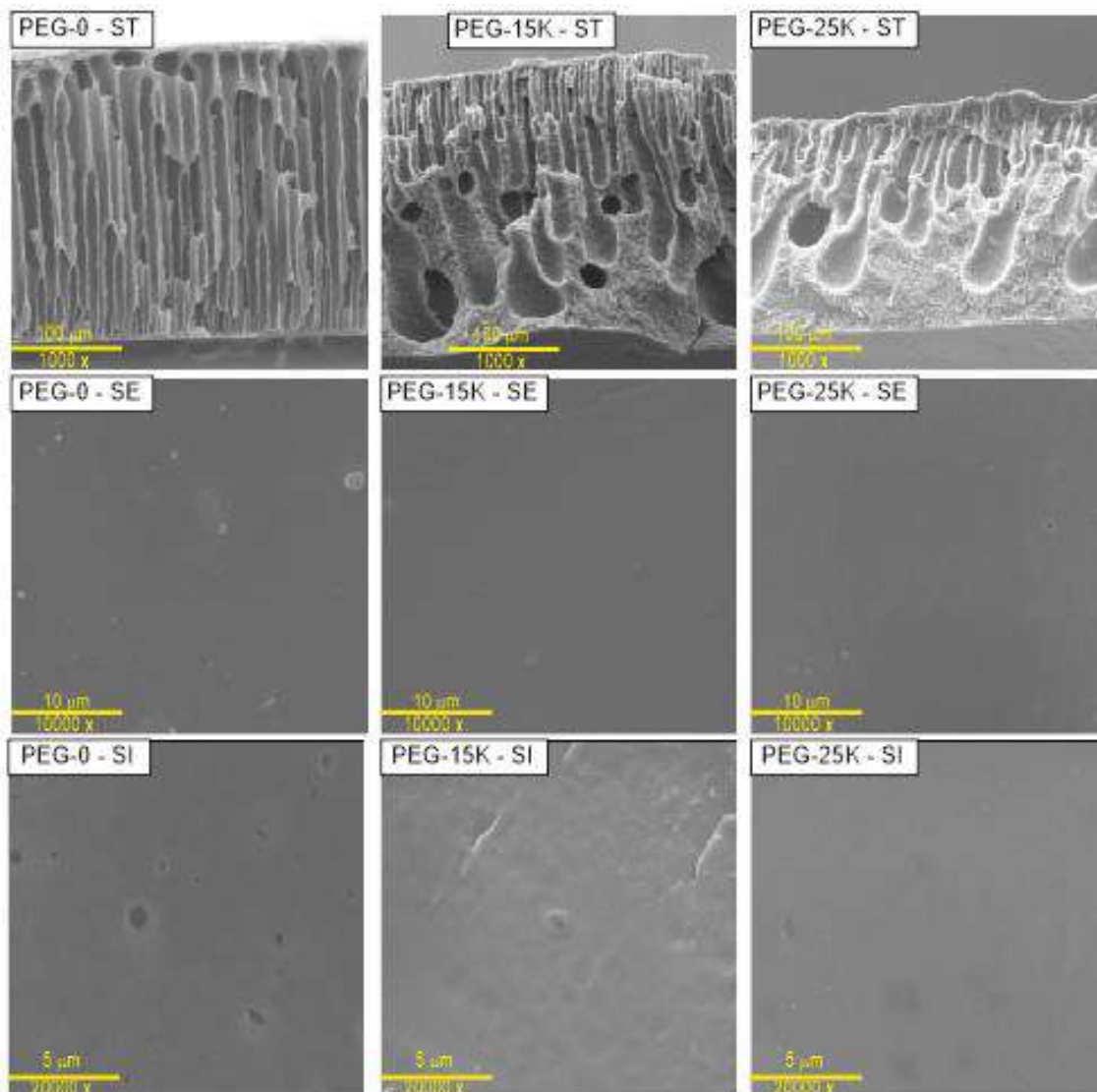


Figura 53 - Imagens de MEV dos filmes de PDLLA sintetizados para análise do efeito da adição de PEG. ST = seção transversal; SE = superfície externa; SI = superfície interna

8.2.4.2 Efeito da adição de PVP

A adição de PVP-K90 ($M_w=360$ KDa) foi capaz de aumentar significativamente a viscosidade das soluções poliméricas, mesmo após a adição de apenas 0,5% em massa do polímero. Entretanto, a viscosidade das soluções poliméricas não segue o aumento contínuo com o aumento do teor de PVP adicionado, tendo em vista que após a adição de 2%, valores em torno de 4000 cP foram estabelecidos.

As soluções poliméricas tiveram suas precipitações aceleradas, principalmente após a adição de 2% de PVP. A solução contendo 10% de PVP apresentou precipitação instantânea em todos os experimentos.

A permeabilidade hidráulica foi aumentada, principalmente após a adição de 2% de PVP, onde valores de até 55,18 L/m² h foram observados para a amostra PVP-5. Os dados ilustrados na Figura 54 sugerem uma relação entre a velocidade de precipitação com o aumento da permeabilidade hidráulica. Isto está associado ao aumento considerável de suas porosidades superficiais, verificadas nas imagens de MEV da Figura 55.

Tabela 24 – resultados do delineamento experimental para análise do efeito da concentração de PVP na solução polimérica. Concentração PDLLA = 20% (m/m); Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C; Composição do banho de imersão = 100% água

Identificação amostra	Concentração PVP (% m/m)	Viscosidade solução polimérica (cP)	Tempo para início da queda de transmitância (s)	Permeabilidade hidráulica (L/m ² h bar)
PVP-0	0	1150	28,38 (±1,19)	13,71
PVP-0,5	0,5	3424	26,44 (±4,93)	12,57
PVP-2	2	5200	14,78 (±4,93)	33,18
PVP-5	5	3950	14,81 (±5,11)	55,18
PVP-10	10	4928	0	43,84

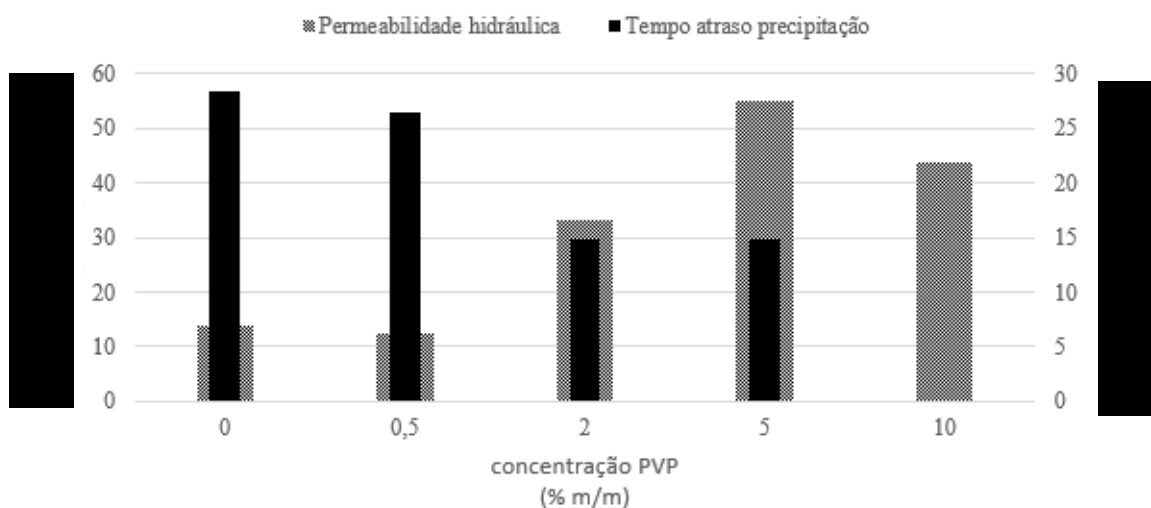


Figura 54 - Tempos de atraso na precipitação e permeabilidade hidráulica dos experimentos para avaliação do efeito da adição de PVP. Temperatura banho imersão = 25 °C; Temperatura solução polimérica = 60°C; Concentração de PDLLA = 20% (m/m).

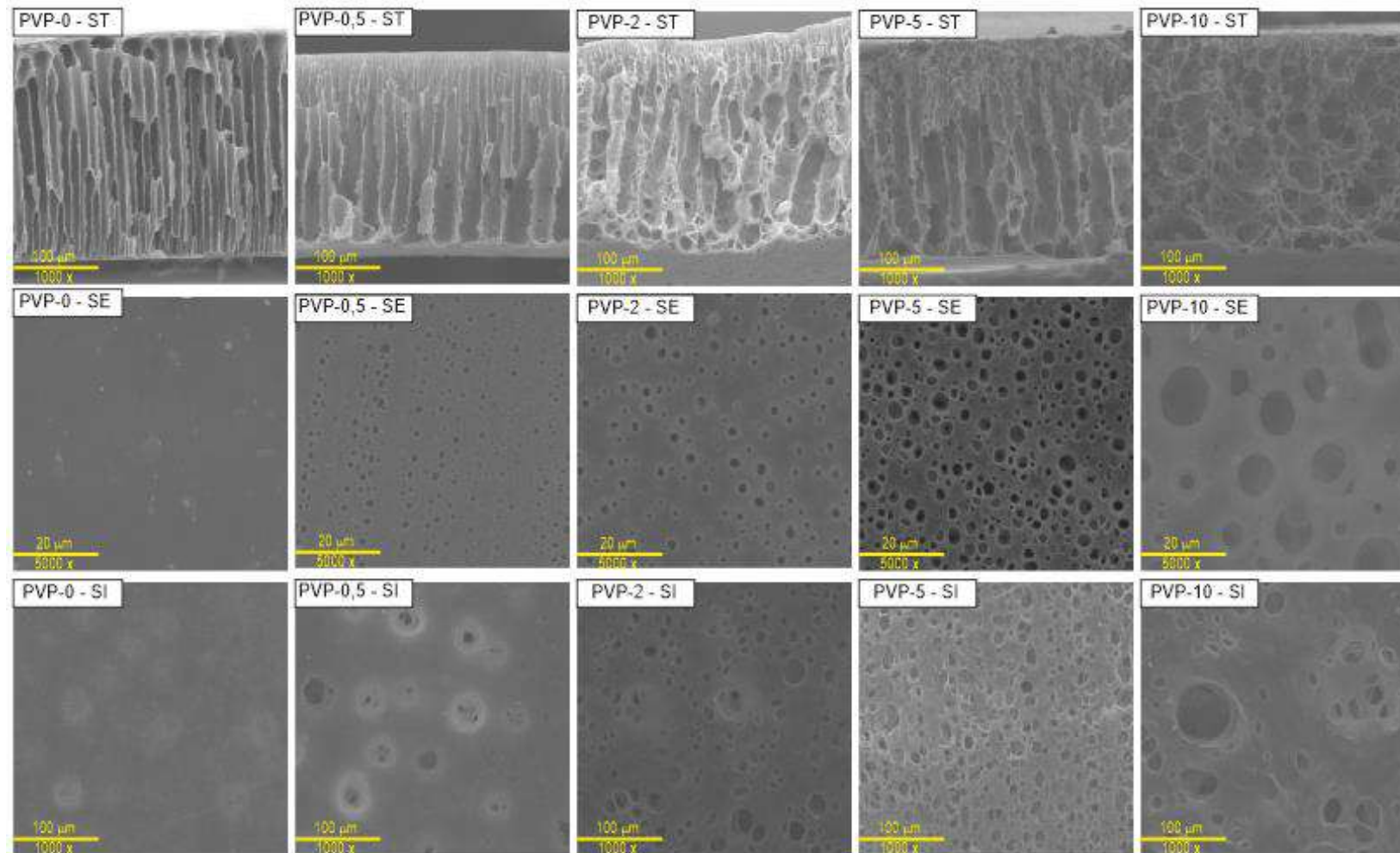


Figura 55 - Imagens de MEV dos filmes de PDLLA sintetizados para análise do efeito da adição de PVP. ST = secção transversal; SE = superfície externa; SI = superfície interna

Ao contrário da adição de PEG, que não foi efetiva para o controle das propriedades dos filmes produzidos, a adição de PVP foi capaz de aumentar a velocidade de precipitação, assim como a viscosidade da solução polimérica, resultando em valores maiores de porosidade e permeabilidade.

As soluções com 10% de PVP se encontraram muito instáveis, apresentando ao menor decréscimo de temperatura, pontos de precipitação e aglomerados de polímero. Isto torna essa condição indesejável, pois torna adversas as condições de espalhamento e bombeamento durante extrusão, podendo ocasionar entupimentos na extrusora.

8.2.5 Conclusões parciais

A partir dos resultados obtidos a partir da análise do comportamento das permeabilidades hidráulicas, tempos de atraso para o início da queda de transmitância, viscosidades das soluções poliméricas e imagens das superfícies e seções transversais dos filmes sintetizados, verificou-se:

- A temperatura do banho de imersão tem baixo efeito sobre a velocidade de precipitação e permeabilidade hidráulica;
- O aumento da temperatura da solução polimérica acelera a precipitação do filme polimérico;
- O aumento da concentração polimérica atrasa a precipitação do filme polimérico, formando membranas mais fechadas e com menor permeabilidade hidráulica;
- A presença de solvente no banho de imersão foi capaz de aumentar o atraso na precipitação, gerando filmes com superfícies externas fechadas e também a supressão de macrovazios em sua seção transversal;
- A adição de PEG foi capaz de aumentar a viscosidade das soluções poliméricas, porém não foi capaz de induzir a formação de poros nos filmes sintetizados;
- A adição de PVP foi capaz de acelerar a precipitação do filme polimérico, aumentar a viscosidade das soluções e também de aumentar a porosidade e o diâmetro médio de poros dos filmes sintetizados.

9 Controle da morfologia e propriedades de fibras ocas de PDLA

Em relação a membranas de PLA, alguns estudos na literatura utilizam processos de inversão de fases para sua síntese [15, 31, 40, 42, 46, 73, 86, 93, 94]. Observa-se que nestes trabalhos alguns sistemas polímero/não-solvente/solvente são recorrentemente utilizados. Entretanto, um estudo que relacione aspectos termodinâmicos e cinéticos com morfologia e propriedades de transporte entre membranas sintetizadas a partir destes sistemas é ainda necessário.

O objetivo desta etapa do trabalho foi investigar o processo de formação de fibras ocas de PDLA utilizando 1-4 dioxano (DIO), N-metil-pirrolidona (NMP) e dimetilsulfóxido (DMSO) como solventes e água como não-solvente. Diagramas ternários e velocidade de precipitação foram relacionados com a morfologia das membranas e suas propriedades de transporte. Os parâmetros de solubilidade de Hansen e parâmetros de interação de Flory-Huggins foram analisados para melhor compreender os fenômenos de separação de fase e morfologia resultante das membranas. Soluções poliméricas de PDLA foram produzidas utilizando-se NMP, DIO e DMSO como solventes, na concentração de 20% (m/m), a 60 °C. Nas soluções poliméricas contendo PVP, 5% (m/m) do aditivo foi adicionado. Água microfiltrada, a 25 °C, foi utilizada como banho de imersão e líquido interno em todos os experimentos de espalhamento de filmes e fiação de fibras ocas.

As propriedades de transporte das membranas produzidas foram avaliadas a fim de se estabelecer a sua capacidade de retenção de solutos através de testes de diálise. Polivinilpirrolidona (PVP) foi utilizado como aditivo para induzir porosidade nas fibras ocas. Foram realizados também testes de permeabilidade hidráulica e osmose direta para a caracterização das propriedades de rejeição de solutos, utilizando albumina de soro bovino (BSA), lisozima e NaCl.

Finalmente, buscando a melhor adequação das fibras ocas para a utilização como condúites de guia neural, foi analisada a influência das morfologias (macro vazios digitiformes e esponjiforme) nas propriedades mecânicas e em sua degradabilidade, em testes de degradação *in vitro*.

9.1 Resultados e discussão

9.1.1 Viscosidade de soluções poliméricas

As viscosidades das soluções poliméricas analisadas estão expressas na Tabela 25.

Tabela 25 -Viscosidades das soluções poliméricas de PDLLA (20 % m/m). Temperatura = 60 °C

Solvente	μ (cP)
NMP	1150
DIO	3360
DMSO	3424

Os parâmetros de solubilidade de Hildebrandt (δ) são usualmente utilizados para correlacionar interações polímero-solvente. Os parâmetros de solubilidade de Hansen (HSP), que relacionam as interações por forças de dispersão (δ_d), interações polares (δ_p) e interações por pontes de hidrogênio (δ_h) podem ser combinados como $\delta_a = (\delta_p^2 + \delta_h^2)^{1/2}$ e $\delta_v = (\delta_d^2 + \delta_p^2)^{1/2}$. Isso permite a análise destas interações em representações gráficas bidimensionais, como em diagramas δ vs δ_a ou δ vs δ_v [105].

Os parâmetros de interação de Hansen e parâmetros de interação de Flory-Huggins (χ) do PDLLA, água, NMP, DIO e DMSO estão expressos na Tabela 26.

Tabela 26 -Parâmetros de interação de Flory-Huggins e de Hansen e Hildebrandt para PDLLA, água e solventes utilizados neste trabalho

	δ_d	δ_p	δ_h	$\delta_a = (\delta_p^2 + \delta_h^2)^{1/2}$	$\delta_v = (\delta_d^2 + \delta_p^2)^{1/2}$	δ (MPa ^{1/2})	* $\chi_{P/S}$
PDLLA	17,5	9,5	7,3	12,0	19,9	21,2	
Água	15,5	16,0	42,4	45,3	22,3	47,9	
DMSO	18,4	16,4	10,2	19,3	24,6	26,7	11,6
NMP	18,0	12,3	7,2	14,3	21,8	23,0	5,64
DIO	18,0	1,8	7,4	7,6	18,1	19,5	0,36

* Estimado como $\chi_{P/S} = 0.34 + \frac{V_S}{RT}(\delta_p - \delta_S)^2$, onde V_S é o volume molar do solvente; δ_{pol} e δ_S são os parâmetros de solubilidade de Hildebrandt para o polímero e solvente [78]

As soluções poliméricas contendo DMSO e DIO apresentaram valores de viscosidade de 3360 e 3424 cP, respectivamente; os quais são valores consideravelmente

superiores a 1150 cP, correspondente à solução com NMP. Apesar da notável diferença entre os valores de viscosidade, os parâmetros de solubilidade de Hildebrandt mostram que o PDLLA possui afinidade muito similar entre NMP e DIO. A diferença de valores entre as viscosidades deve ser associada à afinidade dos componentes considerando-se os parâmetros de solubilidade de Hansen para uma melhor análise. Observando os diagramas bidimensionais de δ_a vs δ e δ_v vs δ da Figura 56, pode ser observado que a distância entre as coordenadas do PDLLA-NMP é consideravelmente menor do que PDLLA-DIO e PDLLA-DMSO, em relação ao diagrama δ_a vs δ , o que indica que as interações polares e de ponte de hidrogênio com NMP são predominantes, e determinantes para influenciar a viscosidade destas soluções.

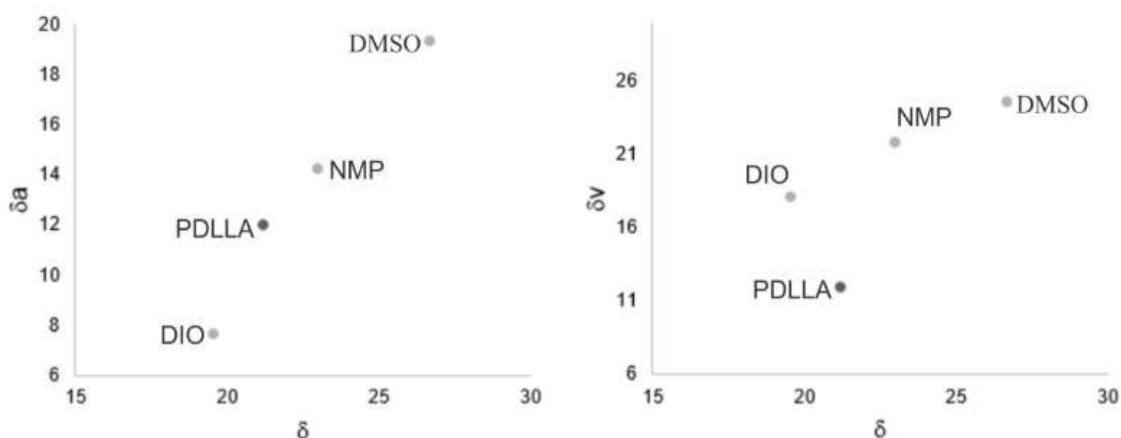


Figura 56 -Representação gráfica bidimensional dos parâmetros de solubilidade de Hansen para o PDLLA, NMP, DIO e DMSO

9.1.2 Velocidade de precipitação e diagramas ternários

Os parâmetros de interação de Flory-Huggins estão intrinsecamente relacionados ao tamanho e localização da região de miscibilidade de sistemas poliméricos ternários, sendo isto reportado em relação ao PLA no trabalho de van de Witte et al., (1996) [79]. Neste mesmo trabalho, é reportada uma relação empírica entre os parâmetros de interação com o tempo de atraso na precipitação e a concentração polimérica na interface durante o processo de inversão de fases, conforme apresentado esquematicamente na Tabela 8. Algumas destas informações estão rerepresentadas na Tabela 27, para facilitar a sua análise durante a análise dos resultados deste capítulo.

Tabela 27 -Influência de parâmetros presentes na transferência de massa sobre a velocidade de precipitação e concentração polimérica na interface durante o processo de inversão de fases.

Parâmetro	$\uparrow \chi_{S/NS}$	$\uparrow \chi_{P/S}$	$\uparrow \chi_{P/NS}$
Tempo de atraso para precipitação	\uparrow	–	\downarrow
Concentração polimérica na interface	\downarrow	\uparrow	\uparrow

*Concentração polimérica no filme próximo à interface no início da inversão de fases;
 \uparrow aumento do parâmetro; \downarrow diminuição do parâmetro; - influência desprezível.

Para efetuar os testes de precipitação, filmes poliméricos foram produzidos através do espalhamento das soluções poliméricas de PDLLA em NMP, DIO e DMSO em uma placa de vidro aquecida a 60 °C com uma faca de espalhamento de 150 μm . Os filmes espalhados foram imersos em água microfiltrada a 25 °C.

Os resultados dos testes de velocidade de precipitação das soluções poliméricas de PDLLA em NMP, DIO e DMSO estão apresentados na Figura 57. As curvas de queda de transmitância luminosa mostram que todas as soluções apresentaram início no decréscimo na transmitância que indicou atrasos na precipitação de 20, 28 e 53 s para as soluções contendo NMP, DMSO e DIO respectivamente.

O efeito da afinidade entre S/NS é verificado na solução de DMSO, uma vez que baixas afinidades entre S/NS aumentam a região de miscibilidade do sistema ternário, tendendo a gerar atraso na precipitação. Tal efeito é verificado comparando-se as soluções de DMSO e DIO, que possuem valores próximos para viscosidade, porém significativa diferença entre os tempos de atraso na precipitação. Qualitativamente, a maior interação entre DMSO-água, comparado à interação DIO-água, resulta em uma relação entre os parâmetros de interação de Flory-Huggins onde $\chi_{DMSO-água} < \chi_{DIO-água}$. Através da Tabela 27 verifica-se que a partir desta relação se espera um maior atraso na precipitação para o sistema contendo DIO.

Machado et al., (1999) [89] propuseram um modelo qualitativo para formação de membranas baseado na velocidade de precipitação durante o processo de inversão de fases, onde uma estrutura multicamadas é estabelecida. Baseado neste modelo, as inclinações iniciais das curvas de decaimento de transmitância luminosa podem ser interpretadas para explicar diferenças no avanço das frentes de precipitação em diferentes sistemas P/NS/S.

A maior inclinação inicial das curvas das soluções contendo DMSO e DIO indicam baixa resistência inicial à transferência de massa nas camadas superiores. A

inclinação menos pronunciada da curva da solução contendo NMP sugere que tenha ocorrido uma precipitação muito rápida das camadas superiores, reduzindo as taxas de transferência de massa nas subcamadas adjacentes e consequentemente gerando precipitações mais lentas nas mesmas.

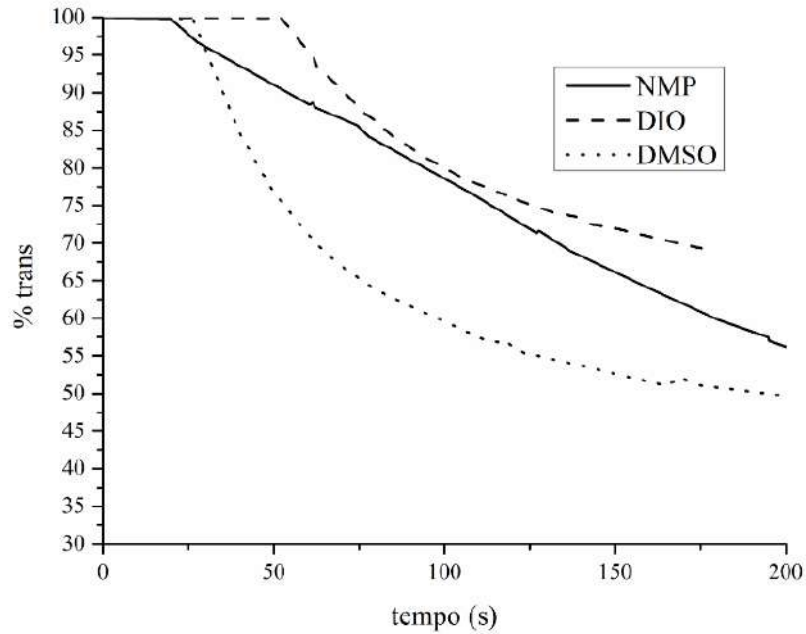


Figura 57 – Curvas de queda de transmitância luminosa durante imersão de filmes de PDLLA nos solventes NMP, DIO e DMSO.

Os pontos experimentalmente determinados dos diagramas ternários dos sistemas PDLLA-água-NMP, PDLLA-água-DIO e PDLLA-água-DMSO estão apresentados na Figura 58.

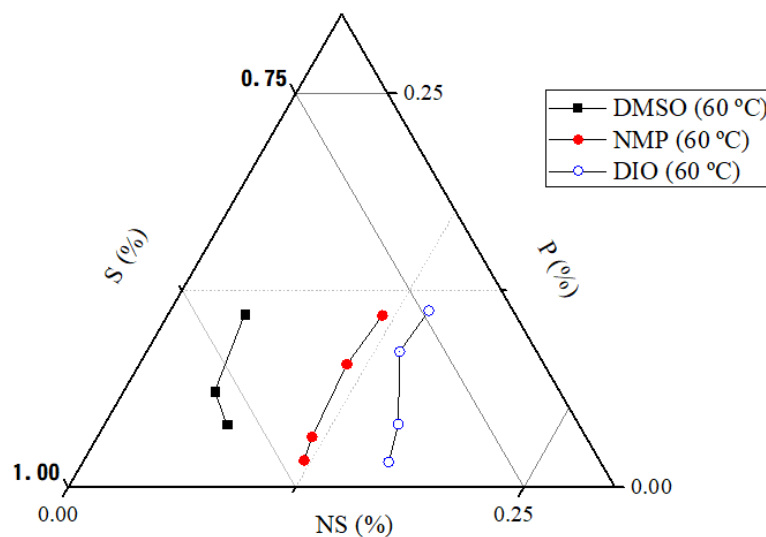


Figura 58 - Pontos dos diagramas ternários dos sistemas PDLLA-água-NMP, PDLLA-água-DIO e PDLLA-água-DMSO

O sistema PDLLA-água-DMSO apresentou a maior região de imiscibilidade, seguido dos sistemas PDLLA-água-NMP e PDLLA-água-DIO, respectivamente. A quantidade de NS necessária para desestabilizar o sistema contendo DMSO é consideravelmente inferior do que a quantidade necessária para desestabilizar os demais sistemas, o que pode ser associado à maior afinidade do DMSO com a água.

As extensões relativas das regiões de miscibilidade dos sistemas podem ser avaliadas observando os parâmetros de interação de Flory-Huggins entre polímero e solvente $\chi_{P/S}$. Através da análise dos valores expressos na Tabela 26, é possível verificar que os valores seguem a ordem $\chi_{PLA/DIO} < \chi_{PLA/NMP} < \chi_{PLA/DMSO}$. Desta forma, as dimensões dos diagramas ternários seguem a tendência prevista, com as regiões de instabilidade aumento no sentido de maiores valores de $\chi_{P/S}$.

9.1.3 Síntese de fibras ocas

As soluções poliméricas foram todas mantidas a 60 °C, por ser a temperatura mínima que permitia solubilidade de todos os sistemas ternários. Para isso tanto o tanque de estocagem quanto a extrusora foram mantidos aquecidos a esta temperatura. A pressão de gás nitrogênio usada para promover o escoamento da solução polimérica pela extrusora foi variada entre 0,5 a 1 bar, visando manter a vazão de solução polimérica em 65 g/min. A extrusora utilizada possui diâmetros interno e externo de 0,7 e 1,5 mm respectivamente, com DEB fixado em 0 cm.

Devido à diferença entre as viscosidades das soluções poliméricas utilizadas, as vazões de líquido interno também foram ajustadas para manter condições similares durante as fiações, conforme valores expressos na Tabela 28.

As imagens produzidas através de microscopia eletrônica de varredura das fibras ocas estão expressas na Figura 60.

Tabela 28 -Condições de fiação das fibras ocas de PDLLA

Identificação	Solvente	Aditivo (% m/m)	Vazão do líquido interno (mL/min)
HF-NMP	NMP	0	5
HF-Dio	DIO	Água, 7%*	2,5
HF-DMSO	DMSO	0	3
HF-NMP-PVP	NMP	PVP K-90; 5%	4
HF-Dio-PVP	DIO	PVP K-90; 5%	3
HF-DMSO-PVP	DMSO	PVP K-90; 5%	3

* O longo tempo de atraso na precipitação das soluções contendo DIO (acima de 50 s, como mencionado na Figura 57) torna a fiação das fibras ocas inviável, pois as mesmas tendem a se aderir externamente ao se tocaram antes da total precipitação ocorrer (Figura 59). Para contornar esta limitação, nas soluções poliméricas contendo dioxano, 7% (m/m) de NS (água) foi adicionado para acelerar o processo de precipitação.



Figura 59 – Fibras ocas com área externa aderida, como consequência de tempos de precipitação muito lentos durante fiação.

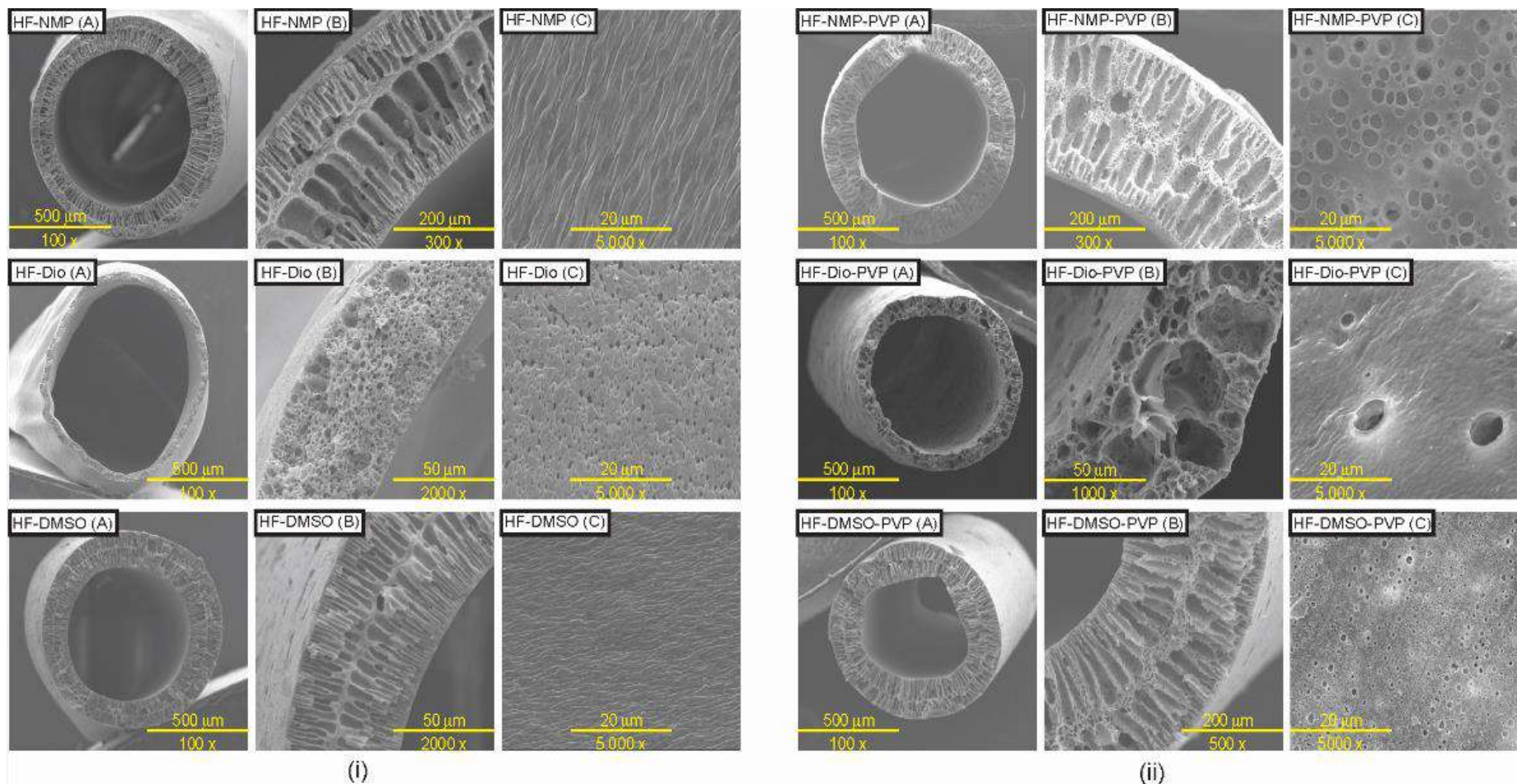


Figura 60- Imagens de MEV das fibras ocas preparadas HF-NMP, HF-DIO e HF-DMSO. (A) = secção transversal; (B) = detalhe da secção transversal; (C) = superfície externa; (D) superfície interna; (i) = sem adição de PVP; (ii) = com adição de 5% (m/m) de PVP

As membranas HF-NMP e HF-DMSO apresentaram morfologia de macrovazios digitiformes em suas secções transversais. Conforme já mencionado no capítulo anterior, esta morfologia é comumente presente em sistemas com precipitação rápida, onde a precipitação das camadas superiores cria uma resistência à transferência de massa entre solvente e não-solvente nas camadas adjacentes inferiores. Esta condição permite que os núcleos de fase pobre em polímero coalesçam e cresçam no sentido da frente de precipitação, resultando nos macrovazios digitiformes. Tal mecanismo de formação de macrovazios é reportado na literatura [72] está de acordo com o modelo proposto por Machado et al., (1999) [89].

Por outro lado, a amostra HF-DIO apresentou morfologia porosa do tipo esponjosa. Essa morfologia é associada principalmente ao aumento do atraso na precipitação. Existem diversos relatos na literatura de que a indução da precipitação com atraso tem como resultado a supressão de macrovazios, sendo isto também reportado na formação de membranas de PLA nos trabalhos de Moriya et al., (2009) [31] e Gao et al., (2015) [60].

A distribuição de tamanho de poros, diâmetro médio de poros e porosidade média das membranas foram estimadas através da análise de imagens das superfícies das fibras ocas, com o auxílio do software ImageJ (1.42q, USA). Os valores de porosidade foram calculados a partir da relação entre a área total de poros e a área total da superfície através da análise de imagens da superfície exterior das fibras ocas. O diâmetro médio de poros das superfícies externas (d_p), diâmetro máximo de poro ($d_p^{m\acute{a}x}$) e permeabilidades hidráulicas das fibras ocas preparadas estão apresentados na Tabela 29.

Tabela 29 -Diâmetros médios de poros (d_p), diâmetro máximo de poro ($d_p^{m\acute{a}x}$) e permeabilidades hidráulicas das fibras ocas preparadas

Identificação	d_p (μm)	$d_p^{m\acute{a}x}$ (μm)	Permeabilidade hidráulica ($\text{L}/\text{m}^2 \text{ h bar}$)
HF-NMP	n.d.	n.d.	n.d.
HF-DIO	0,62 (\pm 0,26)*	1,17	n.d.
HF-DMSO	n.d.	n.d.	n.d.
HF-NMP-PVP	1,38 (\pm 0,57)	3,30	3,14
HF-DIO-PVP	4,45 (\pm 2,87)	10,28	9,38
HF-DMSO-PVP	0,53 (\pm 0,29)	2,29	3,31

* n.d. – não detectado

Observou-se que todas as fibras ocas que não continham PVP em sua composição apresentaram ausência de poros na superfície externa, e também ausência de permeabilidade hidráulica na faixa de pressão transmembrana aplicada de até 1 bar. Embora poros de diâmetro médio de $0,62 \mu\text{m}$ pudessem ser observados nas fibras ocas HF-DIO, a ausência de fluxo de permeado sugere que seus poros não são interconectados. Isto foi revertido com a adição de PVP nas soluções poliméricas, onde um aumento nos valores do diâmetro médio de poros foi verificado em todas as fibras ocas, sendo possível se obter permeação de água. Isto permitiu calcular o fluxo permeado de água nas amostras HF-NMP-PVP, HF-DIO-PVP e HF-DMSO-PVP mesmo a baixas pressões transmembrana, caracterizando-as como membranas de microfiltração.

A adição de PVP teve como resultado o aumento da interconectividade e do tamanho médio dos poros internos das membranas com morfologia de macrovazios digitiformes, como mostrado em detalhe na Figura 61. Na membrana com morfologia do tipo esponja HF-DIO-PVP, a adição de PVP resultou na geração de macrovazios esféricos e altamente interconectados. As amostras HF-NMP-PVP e HF-DMSO-PVP apresentaram valores próximos de permeabilidade hidráulica ($3,14$ e $3,31 \text{ L/m}^2 \text{ h bar}$ respectivamente), enquanto HF-DIO-PVP apresentou um valor superior, de $9,38 \text{ L/m}^2 \text{ h bar}$. O diâmetro médio de poros da superfície da fibra oca HF-DIO-PVP foi significativamente superior ao das demais, e também apresentou uma distribuição de tamanho de poros mais ampla, com desvio padrão de $2,87$ e poros de até $10,28 \mu\text{m}$ de diâmetro.

Através da observação das imagens de MEV da Figura 60, verifica-se que o aumento da porosidade da superfície foi mais acentuado nas membranas com morfologias do tipo macrovazios digitiformes (HF-NMP-PVP e HF-DMSO-PVP) do que na membrana HF-DIO-PVP (com estrutura morfológica esponjiforme). Entretanto, HF-DIO-PVP apresentou o maior acréscimo em permeabilidade, diâmetro médio e máximo de poros entre as membranas que continham PVP em sua composição. Estes resultados indicam que a adição de PVP possui um efeito mais acentuado em morfologias esponjiformes do que em morfologias do tipo digitiforme, provavelmente devido à sua capacidade de se aumentar a interconectividade dos poros.

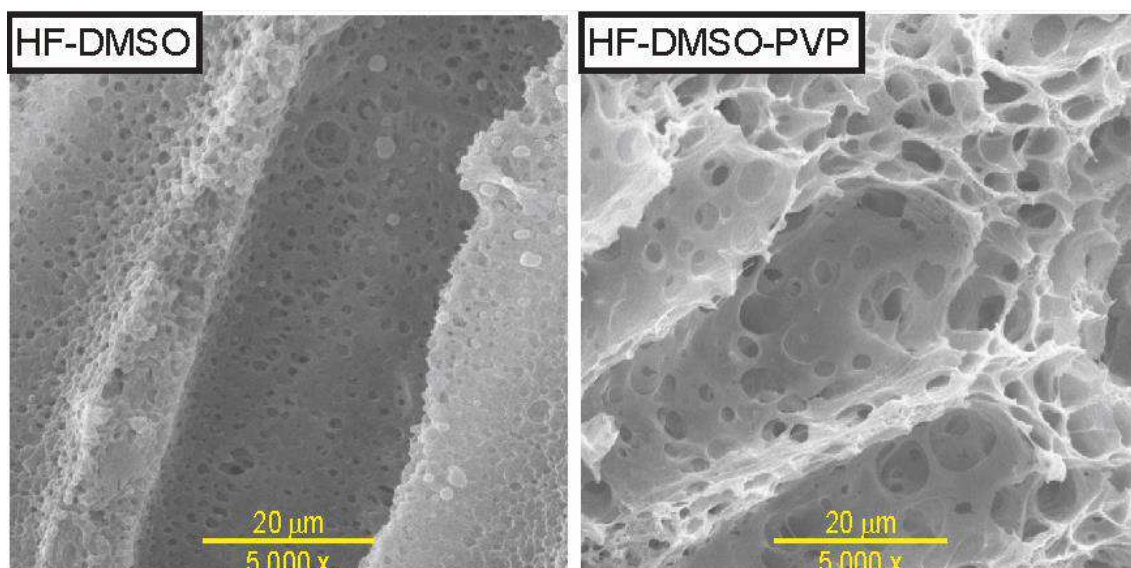


Figura 61 -Imagens de MEV dos detalhes da secção transversal das fibras ocas HF-MDSO (esquerda) e HF-DMSO-PVP (direita)

9.1.4 Teste de degradação *in vitro*

Amostras das fibras ocas HF-DIO (morfologia esponjiforme) e HF-DMSO (morfologia digitiforme) foram selecionadas para avaliar a influência da morfologia em sua degradação *in vitro*. As amostras foram imersas em tampão fosfato, mantidas sob leve agitação e a 37 °C. Em intervalos de 15, 60, 90, 210 e 240 dias, amostras foram coletadas, lavadas com água desmineralizada e secas a vácuo. Subsequentemente, as massas molares média (M_n) e média ponderada (M_w) foram medidas através de cromatografia de permeação em gel (GPC). As massas molares (média e média ponderada) iniciais das amostras submetidas aos testes de degradação *in vitro* estão expressas na Tabela 30.

Tabela 30 - Massas molares média (M_n) e média ponderada (M_w) iniciais das amostras submetidas ao teste de degradação *in vitro*

Amostra	Massa molar média M_n (kDa)	Massa molar média ponderada M_w (kDa)
HF-DMSO	104	173
HF-DIO	117	198

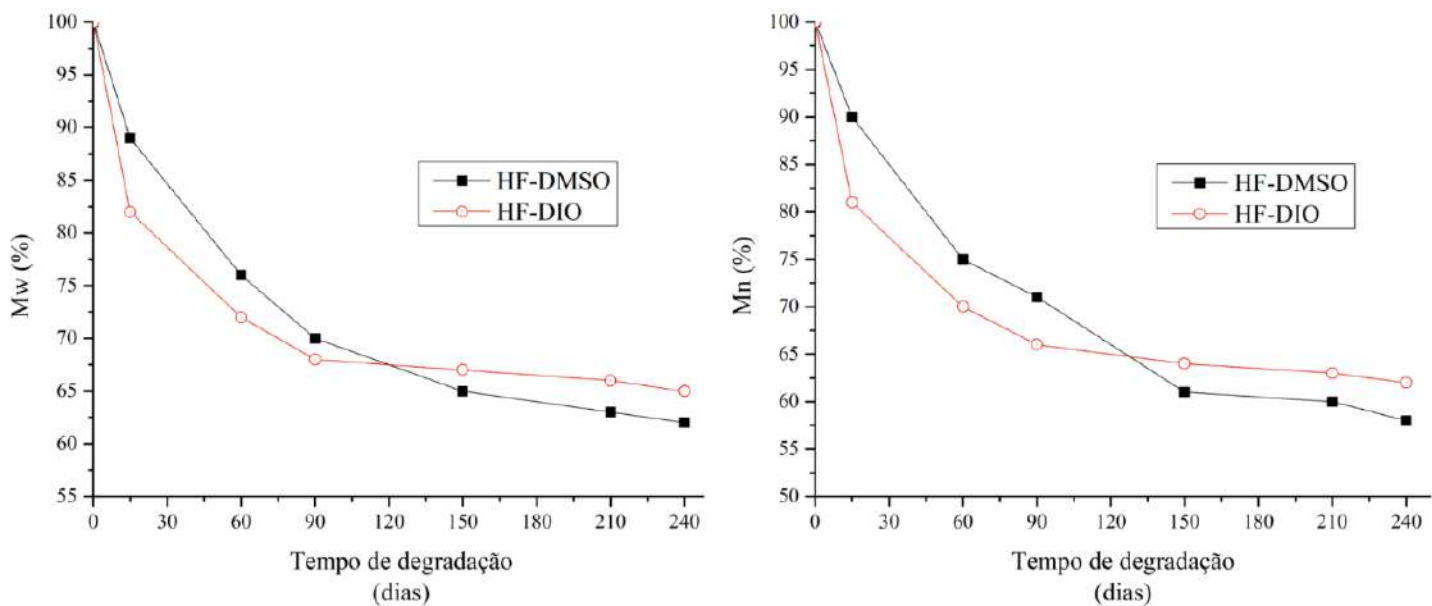


Figura 62 -Variação das massas molares em função do tempo de incubação das fibras ocas. Esquerda – Massa molar média (M_n); direita – massa molar média ponderada (M_w)

Foi observado que a perda de massa molar é consideravelmente mais acentuada durante os 60 primeiros dias para ambas as fibras ocas, com um decréscimo mais abrupto detectado na amostra com morfologia esponjiforme HF-DIO. Após 15 dias de incubação, HF-DIO e HF-DMSO apresentaram 19 e 10% de perda de massa para M_n , com 18 e 11% para M_w respectivamente.

Em relação à variação de M_n e M_w , HF-DIO foi a amostra que apresentou maior perda de massa até o dia 90. Entretanto, após 120 dias esta tendência se inverteu e a amostra HF-DMSO passou a ter maiores valores de perda de massa. Isto está relacionado ao efeito da degradação na porosidade das superfícies externas das fibras ocas. Através das curvas apresentadas na Figura 63, pode ser observado que HF-DIO apresenta um leve acréscimo de porosidade nos 150 primeiros dias de incubação, enquanto HF-DMSO apresentou um aumento muito mais pronunciado neste mesmo intervalo. A Figura 64 mostra imagens das superfícies das amostras, onde é verificada a sua degradação, induzindo o aparecimento de pequenos poros onde estão localizados os macrovazios digitiformes (até o dia 60), dando lugar a poros de até $30 \mu\text{m}$ de diâmetro após 150 dias. Esta dimensão dos poros revela que a camada mais superficial foi degradada revelando à superfície os macrovazios digitiformes internos. Portanto, conclui-se que o aumento de porosidade da amostra HF-DMSO após 100 dias de incubação está diretamente relacionado à aceleração do processo de degradação neste período. É reportado que o processo de degradação de membranas de PLA está intimamente relacionado à sua

porosidade e densidade, e que membranas porosas tendem a degradar mais rapidamente do que membranas densas [106]. Isto está relacionado ao aumento expressivo da área superficial de contato com o meio aquoso externo, uma vez que o principal mecanismo de degradação do PLA ocorre devido à hidrólise das ligações éster em sua cadeia [18, 27].

As perdas de massa nos períodos avaliados indicam um grande potencial para uso destes materiais como condútes de guia neural. Tomando-se o modelo de tratamento de lesões críticas em nervo ciático em camundongos, considera-se que as duas primeiras semanas após o implante do condúite são cruciais para o sucesso de sua aplicação, pois neste período ocorre a formação dos filamentos de fibrina que proverão suporte para o crescimento axonal (15 a 20 dias após lesão) [19]. Neste período, taxas de degradação muito rápidas podem gerar fraturas e perdas nas propriedades de transporte dos CGN, permitindo a entrada de células inflamatórias. Da mesma forma, taxas de degradação muito lentas (de 1 a 2 anos) podem causar problemas como reações inflamatórias e aumento de pressão no espaço intraluminal [43, 103, 104].

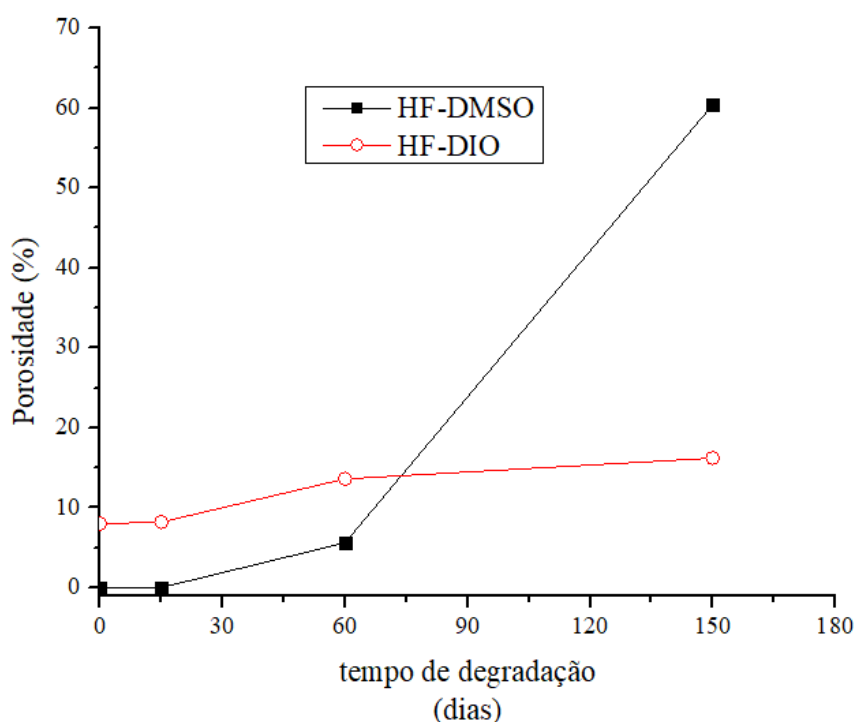


Figura 63 - Variação da porosidade das superfícies externas das fibras ocas HF-DIO e HF-DMSO após 15, 60 e 150 dias após incubação

HF-dio (15 dias)

HF-dio (60 dias)

HF-dio (150 dias)

10 μ m
10000 x

HF-DMSO (15 dias)

10 μ m
10000 x

HF-DMSO (60 dias)

10 μ m
10000 x

HF-DMSO (150 dias)

10 μ m
10000 x

10 μ m
10000 x

10 μ m
10000 x

Figura 64 -Imagens de MEV da variação da porosidade externa das superfícies externas das fibras ocas HF-DIO e HF-DMSO após 15, 60 e 150 dias

9.1.5 Testes de diálise e osmose direta

As rejeições de BSA e lisozima verificadas nos testes de diálise estão expressas na Tabela 31

Tabela 31 - Valores de rejeição de BSA e lisozima

Identificação amostra	Rejeição BSA (%)	Rejeição lisozima (%)
HF-NMP	100	100
HF-DIO	100	100
HF-DMSO	100	100
HF-NMP-PVP	99	89
HF-DIO-PVP	98	83
HF-DMSO-PVP	99	87

Nas fibras ocas sintetizadas sem a adição de PVP em sua solução polimérica (HF-NMP, HF-DIO e HF-DMSO), as concentrações de BSA e lisozima permaneceram inalteradas após os testes de diálise. Portanto, a rejeição destes solutos foi de 100%. Como foi verificado nos testes de permeabilidade que não houve fluxo de água por estas membranas, os resultados dos testes de diálise confirmam que não há difusão destes solutos pela matriz polimérica durante os testes de 6 horas de duração.

Por outro lado, as membranas com PVP em sua composição foram capazes de transportar solutos. BSA foi ainda rejeitado quase em sua totalidade, com rejeições de 98 a 99% registrados para todas as amostras, porém as rejeições de lisozima mostram que de 11 a 17% deste soluto foi capaz de ser permeado através das membranas após 6h de diálise. Conforme observado em relação à permeabilidade hidráulica, o transporte de lisozima é mais afetado pelo diâmetro médio de poro do que pela porosidade superficial das fibras ocas. A membrana com maior permeabilidade a lisozima (HF-DIO-PVP, com 83% de rejeição) possui o maior diâmetro médio de poros (4,45 μm), porém menor porosidade superficial.

Os resultados indicam que a adição de PVP foi capaz de produzir membranas porosas capazes de rejeitar moléculas com massa molar acima de 67 kDa e permitir a passagem de moléculas de 17 kDa. Tais propriedades se alinham com as propriedades recomendadas na literatura para o uso como conduítes de guia neural: a fibra oca utilizada como conduíte deve ser capaz de isolar a região intraluminal de fatores neurotróficos (130 kDa), mas permitir a passagem de oxigênio e nutrientes [16].

Para verificação da capacidade de rejeição e difusão de solutos de menor massa molar, testes de osmose direta foram efetuados com amostras HF-DMSO e HF-DMSO-PVP. Os valores dos fluxos de água e de NaCl através das fibras ocas estão expressos na Tabela 32

Tabela 32 – fluxos de água e NaCl em testes de osmose direta

Identificação amostra	Fluxo água (L/m ² h)	Fluxo NaCl (L/m ² h)
HF-DMSO	0	0
HF-DMSO-PVP	0,023	1,17

Os resultados comprovam que não há transporte de solutos por difusão através das membranas não porosas, como verificado na membrana HF-DMSO. A membrana porosa HF-DMSO-PVP, por outro lado, foi capaz de permitir a passagem de água e sais durante os testes de osmose direta, o que indica que pequenos solutos como sais, oxigênio e nutrientes podem ser transportados por difusão através dos poros.

9.1.6 Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas das amostras produzidas estão expressas na Tabela 33 e as curvas de tensão-deformação na Figura 65. A análise de variância (ANOVA) a 95% de confiança indica que não há diferença significativa entre os módulos de elasticidade (E) das fibras ocas, independentemente de sua morfologia ou adição de PVP. Entre todas as amostras, os valores do módulo de elasticidade variaram de 193,7 (± 30) para HF-DMSO, a 253,7 (± 44) para HF-DMSO-PVP.

A tensão máxima de ruptura foi pouco afetada pela adição de PVP, uma vez que apenas pequenas variações foram detectadas ao se comparar as amostras com e sem PVP. Variações de 1,4 MPa (entre HF-NMP e HF-NMP-PVP), 2,49 MPa (entre HF-DIO e HF-DIO-PVP) e 1,37 MPa (entre HF-DMSO e HF-DMSO-PVP) foram observadas. Não foi possível se estabelecer uma relação precisa entre o efeito da adição de PVP com a tensão de ruptura, pois em alguns casos (como HF-DIO e HF-DMSO) a tensão de ruptura diminui sutilmente com a adição de PVP, e no caso de HF-NMP a adição de PVP teve efeito contrário, aumentando a tensão de ruptura. Entretanto, é possível notar que as membranas com morfologia esponjiforme (entre 10,31 a 12,8 MPa) possuem tensão de ruptura superiores às membranas com morfologia de macrovazios digitiformes (entre 4,61 a 6,83 MPa).

As amostras HF-NMP, HF-DIO e HF-DMSO apresentaram alongamentos de ruptura próximos, de 52, 58 e 54% respectivamente. Amostras HF-NMP-PVP, HF-DIO-PVP e HF-DMSO-PVP apresentaram alongamentos máximos de 36, 23 e 32%. Os valores mostram que o aumento da porosidade torna as fibras ocas menos tolerantes a tração axial, sendo este efeito mais intenso na membrana espongiforme HF-DIO-PVP.

Os valores observados para tensão de ruptura estão próximos aos valores reportados na literatura para nervo humano intacto (6,78 MPa) na Tabela 14. Já os valores de módulo de elasticidade se mostraram mais altos que os do nervo humano (15,87 MPa), o que é uma característica desejável, para se evitar alongamentos durante o procedimento cirúrgico. É necessário que durante a sua utilização como CGN (principalmente nas primeiras semanas de implante), que as fibras ocas não tenham falhas, deformações ou fraturas que possam causar alteração em sua porosidade e propriedades de transporte [18, 20].

Tabela 33 -propriedades mecânicas das fibras ocas produzidas

Identificação amostra	Módulo de elasticidade (MPa)	Tensão de ruptura (MPa)	Alongamento de ruptura (%)
HF-NMP	196,9 (\pm 42)	4,61 (\pm 0,31)	52
HF-DIO	250,5 (\pm 32)	12,80 (\pm 0,15)	58
HF-DMSO	193,7 (\pm 30)	6,83 (\pm 0,25)	54
HF-NMP-PVP	224,3 (\pm 31)	6,01 (\pm 0,94)	36
HF-DIO-PVP	232,5 (\pm 39)	10,31 (\pm 1,13)	23
HF-DMSO-PVP	253,7 (\pm 44)	5,46 (\pm 0,77)	32

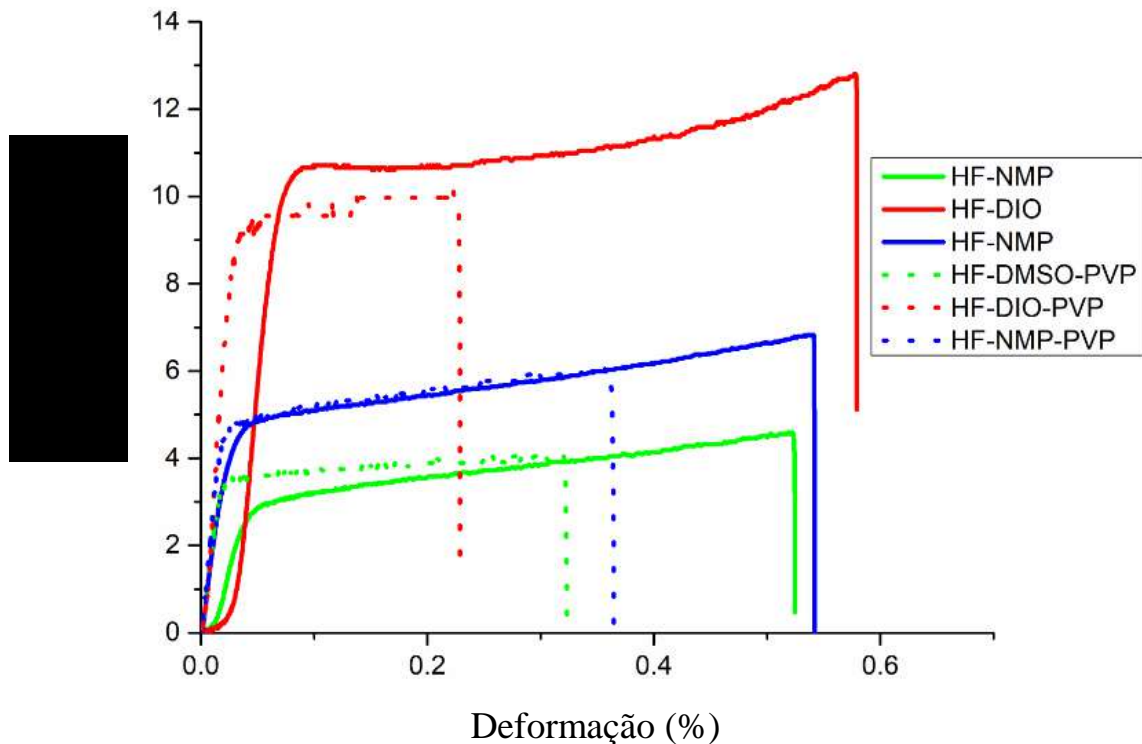


Figura 65 – Curvas de tensão vs deformação das fibras ocas produzidas

É assumido que a morfologia é a principal característica que justifica as diferenças entre os valores de alongamento de ruptura entre as amostras. Analisando dados divulgados na literatura, Bettahali et al., (2011) reportaram valores de $335,15 \pm 15$ MPa para módulo de elasticidade, 1,2 MPa para tensão de ruptura e alongamentos de até 80% para fibras ocas de PLLA com morfologia espongiiformes, enquanto Moriya et al., (2009) apresentaram valores de 3,5 MPa para tensão de ruptura em fibras ocas de PLLA com morfologia de macrovazios digitiformes. Apesar de haver uma quantidade ainda escassa para se efetuar uma comparação sistemática entre os valores encontrados na literatura, nota-se que fibras ocas com morfologias espongiiformes e com macrovazios digitiformes apresentam diferenças significativas em suas propriedades mecânicas, especialmente em relação à sua capacidade de alongamento axial. van de Witte et al. (1996) [61] também relatam que as membranas microporosas de PLLA com poros interconectados tipo esponja exibem maior flexibilidade do que membranas com macroporos do tipo digitiforme. Os resultados obtidos neste trabalho, por compararem fibras ocas sintetizadas em condições específicas, permite uma comparação direta entre estes efeitos, confirmando que a capacidade de alongamento das membranas de PLA é fortemente influenciada pela sua morfologia.

9.2 Conclusões parciais

Aspectos sobre a síntese de membranas de PDLLA utilizando os solventes NMP, DIO e DMSO foram analisados, contribuindo para o entendimento do comportamento dos sistemas ternários utilizados e também das propriedades das fibras ocas sintetizadas a partir dos mesmos.

Os parâmetros de solubilidade de Hildebrandt e Hansen foram utilizados para elucidar os efeitos da interação solvente-PDLLA, os quais foram associados às viscosidades das soluções poliméricas e aos diagramas ternários resultantes de cada sistema. Além disso, foi possível verificar para sistemas PDLLA-S-NS, relações entre interação polímero-solvente e velocidade de precipitação, conforme reportado empiricamente por van de Witte et al. (1996).

O controle da morfologia das fibras ocas de PDLLA pôde ser estabelecido, através do uso de DIO ao invés de NMP ou DMSO nas mesmas condições de fiação. A simples substituição destes solventes é suficiente para se sintetizar fibras ocas com morfologia esponjiforme ou com macrovazios digitiformes. Tal alteração na morfologia está principalmente associada à interação entre os componentes do sistema ternário P-S-NS utilizado, e ao atraso na precipitação durante imersão. A precipitação com atraso de soluções poliméricas contendo DIO como solvente resultaram em membranas com morfologias esponjiformes, enquanto as precipitações mais rápidas resultaram em membranas com morfologia contendo macrovazios digitiformes.

As fibras ocas resultantes de soluções poliméricas contendo NMP e DMSO apresentaram morfologias, características mecânicas e propriedades de transporte muito parecidas, tornando-as equivalentes para uma mesma aplicação. Porém nota-se que as soluções poliméricas de PDLLA em DMSO são mais adequadas para a síntese, por possuírem viscosidades consideravelmente mais altas. Isso possibilita uma melhor manutenção das condições de fluxo de soluções polimérica e líquido interno durante a fiação, garantindo maior estabilidade e homogeneidade em suas propriedades durante o processo.

As fibras ocas produzidas sem aditivos não apresentaram permeabilidade hidráulica a diferença de pressão através da membrana de até 1 bar. A adição de PVP nas soluções poliméricas foi capaz de aumentar a porosidade superficial e a interconectividade dos poros, induzindo permeabilidades hidráulicas de até 9,38 e 3,31

L/m² h para membranas com morfologia espongiiforme e digitiforme respectivamente. Foi observado que a adição de PVP tem um efeito mais pronunciado em membranas com morfologia espongiiforme do que em membranas com morfologia com macrovazios digitiformes.

Pelo do controle de porosidade e morfologia foi possível sintetizar fibras ocas que rejeitassem totalmente solutos como sais e moléculas com massa molar de 17 kDa como a lisozima, até membranas capazes de rejeitar 99% de BSA (67 kDa) e permitir a passagem de até 17% de lisozima em testes de diálise.

Através dos testes de degradação *in vitro*, conclui-se que a porosidade e morfologia das fibras ocas afetam seu tempo de degradação. Para todas as membranas avaliadas, a maior taxa de degradação ocorreu nos primeiros 60 dias de incubação. Entretanto, devido ao aumento da porosidade em sua superfície, a taxa de degradação das membranas com morfologia digitiforme passa a ser mais acentuadas após 120 dias.

Testes de tração mostraram que a morfologia também afeta a tensão máxima de ruptura e o alongamento de ruptura das fibras ocas. Membranas com morfologia espongiiforme apresentaram os maiores valores para tensão de ruptura (10,31 e 12,80 MPa), e a adição de PVP tornou todas as membranas menos tolerantes à tração axial: alongamentos de ruptura foram reduzidos de 58 para 23 % em membranas com morfologia espongiiforme. Os módulos de elasticidade não foram afetados pela morfologia das membranas e nem pela adição de PVP, apresentando valores em torno de 200 MPa. Estas propriedades mecânicas são apropriadas para o manuseio cirúrgico e sutura.

10 Avaliação funcional *in vivo*

Conforme mencionado no capítulo 3, a abordagem de utilização de conduítes de guia neural como forma de tratamento para lesão de nervo periférico é citada por diversos autores na literatura [19, 20, 25, 27]. Nestas referências, são usualmente mencionadas características desejáveis para os conduítes, relacionadas à propriedades mecânicas, compatibilidade e biodegradabilidade.

Dentre estas características, destaca-se a capacidade de isolamento da região intraluminal, onde o mesmo deve ser capaz de reter células de Schwann e fatores neurotróficos (aproximadamente 130 kDa) dentro no interior do lúmen da fibra, além de isolá-lo e impedir a entrada de fibroblastos (aproximadamente 10 a 15 μm). Para isto, uma ampla faixa de valores para diâmetro médio de poros é recomendada, variando de 5 a 20 μm . Embora a porosidade seja reportada como uma característica desejável para o sucesso do tratamento, trabalhos como o de Meek e Den Dunnen (2009) [109] reportam o contrário, indicando não ser essa uma regra geral: foram comparados CGN porosos e não porosos de poli(D,L-ácido lático-co-caprolactona) Neurolac® em lesão de nervo isquiático de ratos. Os CGN porosos apresentaram alto índice de inchamento e fragmentação, causando reações inflamatórias e desempenho inferior aos CGN não porosos. Desta forma, a comparação de CGN em testes funcionais com diferentes porosidades e de mesmo material se faz necessária.

Neste trabalho, foram definidas condições de síntese de fibras ocas de PDLLA que permitiram o controle de características como suas propriedades de transporte e rejeição de solutos, bem como para a síntese de fibras ocas com morfologias distintas (espongiforme a com macrovazios digitiformes) [104]. As fibras ocas referidas como HF-DMSO e HF-DIO-PVP foram selecionadas para serem utilizadas como conduítes de guia neural nesta etapa, dadas as suas características distintas, descritas na Tabela 34

Tabela 34 – propriedades de transporte das fibras ocas utilizadas para testes de avaliação funcional

amostra	d_p (μm)	Morfologia	Rejeição BSA* (67 KDa)	Rejeição lisozima* (17 KDa)
HF-DMSO	n.d.	Macrovasios digitiformes	100%	100%
HF-DIO-PVP	4,45 (\pm 2,87)	Espongiforme	99%	83%

*Em teste de diálise com 6h de duração
n.d. = não detectável

O objetivo desta etapa, é comparar o desempenho de fibras ocas com porosidades e propriedades de transporte distintas em testes de análise funcional, buscando se verificar em que aspectos estas propriedades afetam a eficiência do tratamento de lesão de nervo isquiático em camundongos, tendo como variáveis resposta índices relacionados a recuperação funcional.

Os procedimentos efetuados para a utilização das fibras ocas como conduítes de guia neural foram efetuados em parceria com o Laboratório de Neurodegeneração e Reparo, localizado no Centro de Ciência e Saúde (CCS) da UFRJ, sob a coordenação da professora Ana Maria Blanco Martinez.

Os procedimentos e técnicas utilizadas nesta etapa são descritos a seguir.

10.1.1 Animais

Foram utilizados 12 camundongos machos da linhagem C57BL-6, com peso variando entre 20 e 24g e 2 meses de idade, obtidos na Universidade Federal do Rio de Janeiro (BIORIO, RJ). Todos os procedimentos foram autorizados pela comissão de Avaliação de utilização de Animais em Pesquisa (CAUAP) do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ, e efetuados seguindo as recomendações do comitê de ética, segundo o protocolo nº DHE ICB003. Os experimentos foram executados com o máximo de esforços e planejamento para se minimizar o número de animais utilizados e seu sofrimento.

Os animais foram divididos em dois grupos, HF-DIO-PVP (n=6) e HF-DMSO (n=6), nos quais foram avaliadas e comparadas a eficácia de cada uma das fibras ocas sintetizadas no tratamento de regeneração de nervo periférico. Após os procedimentos cirúrgicos, os animais foram sacrificados após um período de 8 semanas.

10.1.2 Procedimento cirúrgico

Os procedimentos cirúrgicos foram realizados conforme procedimento reportado por Goulart et al., (2016) e Junior (2014). Todas as amostras de fibras ocas foram previamente esterilizadas utilizando etanol a 70% durante um período de três horas e lavadas em seguida em solução fisiológica. Os animais foram profundamente anestesiados com Ketamina (100mg/Kg) e Xilazina (15mg/Kg), injetados por via intraperitoneal, e depois fixado em um aparelho esteriotáxico (Figura 66). Sob condições

assépticas, a pele da região posterior da coxa foi seccionada e o nervo isquiático esquerdo foi exposto, sem secção muscular. Uma vez exposto, o nervo isquiático foi seccionado e nas extremidades dos segmentos proximal e distal foram inseridas as fibras ocas selecionadas como próteses, suturadas ao nervo com fio de sutura mononylon 10.0 traumático (Figura 67 A, B e C). O comprimento total da prótese era de cinco milímetros, e as suturas foram feitas de forma a deixar um intervalo de três milímetros entre os segmentos do nervo. Finalizado o procedimento cirúrgico, a musculatura foi devidamente reposicionada sobre o nervo e a pele foi suturada com monofilamento de nylon 6.0. Todo o procedimento cirúrgico foi realizado com auxílio de uma lupa cirúrgica utilizada com aumento de 12 e 20 vezes (Opto FI04, SP, Brasil). Após a cirurgia todos os animais foram alojados em gaiolas de plástico, em ambiente climatizado, com livre acesso a água e alimentação (ração padronizada).



Figura 66 - Aparelho esteriotático para realização dos procedimentos cirúrgicos

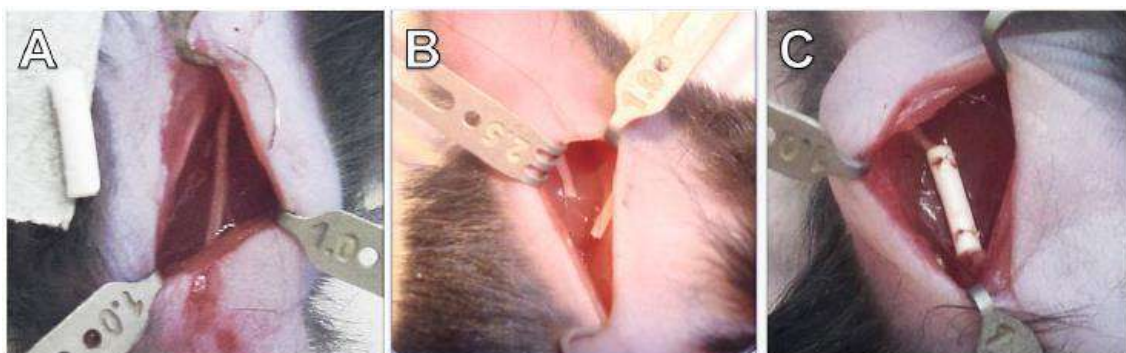


Figura 67 - Sequência do procedimento cirúrgico para inserção de fibra oca de no nervo isquiático de um camundongo com os cotos proximal e distal suturados.(A) Nervo isquiático exposto,(B) Secção do nervo,(C) fixação do tubo nas extremidades do nervo. Adaptado de Junior (2014) [17].

10.1.3 Teste de pressão crescente na pata de camundongos - Analgesímetro

Camundongos foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de malha constituída de arame não maleável de 1 mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. O teste consiste em aplicar, por entre as malhas da rede, uma força linearmente crescente no centro da planta da pata do camundongo até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”) da pata estimulada. Os estímulos são repetidos por até seis vezes, ou até o animal apresentar três medidas similares com uma clara resposta de “*flinch*” após a retirada da pata. A intensidade da força aplicada é obtida observando o valor expresso no aparelho no momento da retirada da pata.

Os experimentos são realizados com o auxílio de um anestesiómetro eletrônico (Modelo EFF 302 - Analgesímetro Digital (Von Frey), Insight Instruments), conforme ilustrado na Figura 68. O aparato consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas, com precisão de 0,1 g. O contato do transdutor de pressão à pata dos animais é realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0.5 mm de diâmetro adaptada a este. Os valores coletados são expressos em gramas, e foram expressos como média de triplicatas.

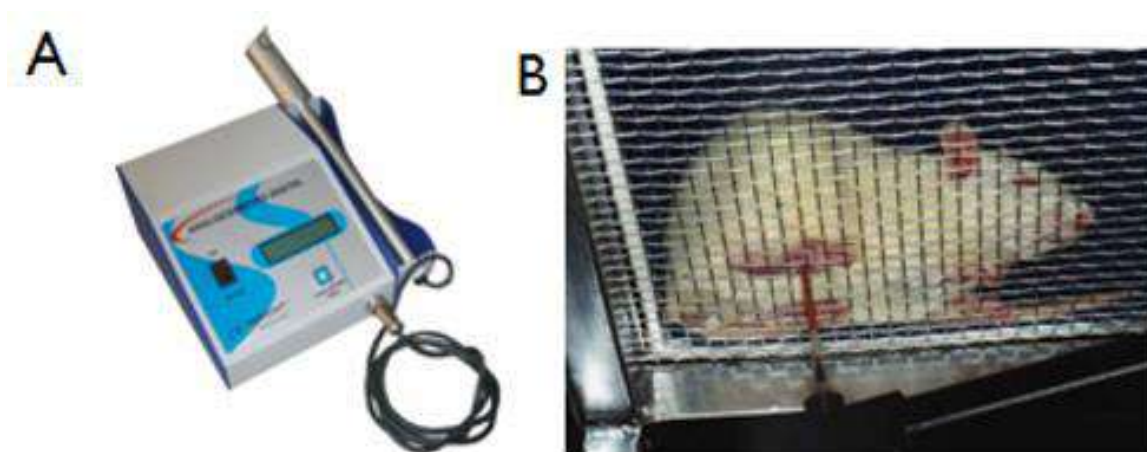


Figura 68 –teste de pressão crescente na pata de ratos. A – aparelho analgesímetro; B – animal posicionado no aparato com tela para aquisição dos valores do peso aplicado na pata do animal até sua retirada.

10.1.4 Índice de função do isquiático (IFC) Teste de marcha

Os animais foram submetidos a testes funcionais para obtenção do índice de função do isquiático (IFC). Depois de um período pós-operatório de 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49 e 56 dias, os animais realizaram um teste funcional para análise de sua marcha. Os

animais tiveram suas patas traseiras pintadas com tinta nanquim preta e, em seguida, deslocaram-se livremente ao longo de um corredor de madeira de 45 x 6,5 cm, sobre papel branco. As pegadas traseiras foram analisadas considerando a distância entre o terceiro dedo e a região posterior do calcanhar – comprimento da pegada (PL = *print lenght*), e a distância entre o primeiro e o quinto dedo – espalhamento da pegada (TS = *toe spread*)

Figura 69.

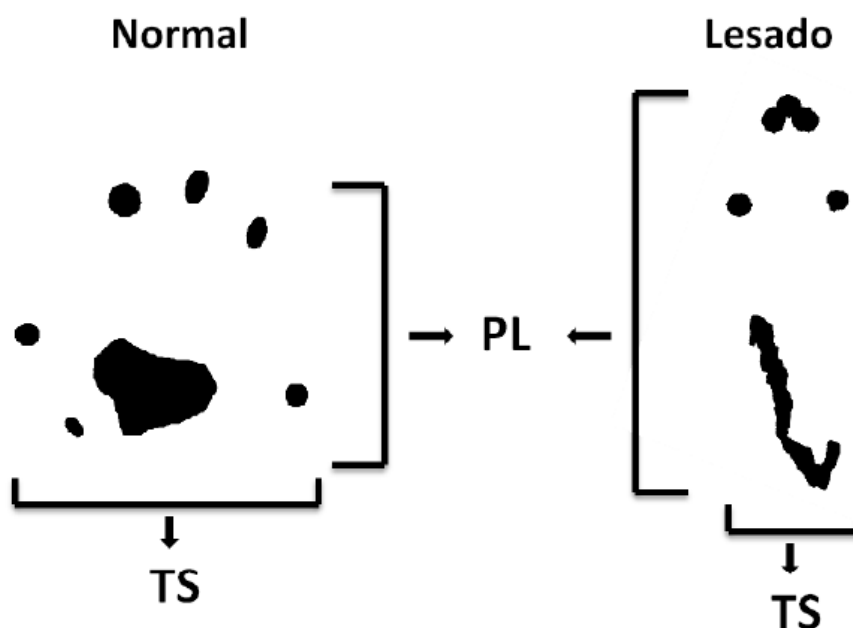


Figura 69 – imagem ilustrativa das pegadas de um animal após teste de marcha. Esquerda – pegada normal (sem lesão); direita – pegada da pata com lesão. TS = *toe spread*; PL = *print lenght*

Os valores de TS e PL foram registrados para a pata traseira normal e lesionada, e o IFC calculado através da equação 13.

$$IFC = 118,9 \left(\frac{ETS - NTS}{NTS} \right) - 51,2 \left(\frac{EPL - NPL}{NPL} \right) - 7,5 \quad (13)$$

Onde

ETS = valor do espalhamento dos dedos do lado lesado;
 NTS = valor do espalhamento dos dedos do lado normal;
 EPL = Valor do comprimento da pegada do lado lesado;
 NPL = valor do comprimento da pegada no lado normal.

Valores de IFC em torno de 0 indicam total recuperação funcional, enquanto valores próximos de -100 indicam total disfunção.

10.1.5 **Eletroneuromiografia**

Após 8 semanas de tratamento pós-lesão, os animais foram anestesiados e posteriormente o nervo isquiático e o músculo gastrocêmico foram expostos através de dissecação do tendão calcâneo. Com a utilização do aparelho Power Lab 4/35 (AD Instruments, Austrália), estímulos elétricos foram deflagrados sobre a porção proximal do nervo isquiático (anterior à lesão) através de um eletrodo bipolar em gancho, com o catodo distante 2 mm do anodo.

A reação aos estímulos elétricos à voltagem aplicada de 10 V foi quantificada em relação aos grupos tratados com as fibras ocas utilizadas, HF-DIO-PVP e HF-DMSO, e também comparada a um grupo normal saudável (sem lesão). Os parâmetros analisados foram amplitude (amplitude da resposta muscular a determinada voltagem aplicada) e latência (tempo dispendido entre o momento do estímulo até o pico da resposta muscular).

10.1.6 **Perfusão**

Após uma sobrevivência de 8 semanas, os animais foram operados sob anestesia, para realização de perfusão via intra-cardíaca. Ao fim do procedimento, os animais foram eutanasiados e dissecados, tendo os nervos isquiáticos esquerdos extraídos e analisados por microscopia ótica. O procedimento foi realizado conforme reportado no trabalho de Junior (2014).

10.1.7 **Morfometria - Número de fibras mielínicas**

Após 8 semanas de tratamento, todos os animais tiveram seus nervos isquiáticos lesionados retirados. Após perfusão, nervos foram extraídos e amostras dos nervos foram processadas para análise quantitativa do número de fibras mielínicas regeneradas. Nesta análise foram utilizados 5 segmentos de nervo de cada grupo. As amostras foram dispostas em cortes semi-finos de 500 nm corados com azul de toluidina. Para a quantificação foram utilizadas imagens de microscopia ótica geradas por um microscópio Axiovision Rel. 4.5 (Carl Zeiss Microimaging, Thornwood, NY, EUA) e aumentadas em 40 vezes, abrangendo a área total da secção transversal do nervo. As fibras mielinizadas foram contadas como auxílio do programa de edição de imagens ImageJ (1.42q, Bethesda, USA). Os valores obtidos foram comparados estatisticamente entre os grupos.

10.1.8 Análise estatística

Todas as análises foram efetuadas utilizando software GraphPad Prism 5.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). Durante a análise dos resultados de dois grupos em relação a uma única variável, como os casos dos testes de amplitude e latência dos testes de eletroneuromiografia, e também nas análises de morfometria, análise de variância (ANOVA) com significância a $P < 0,05$ foi considerada. Os resultados foram apresentados como médias de triplicatas, seguidos de seus respectivos desvios-padrão.

10.2 Resultados e discussão

10.2.1 Teste de pressão crescente na pata de camundongos - Analgesímetro

A Tabela 35 e a Figura 70 e Figura 71 apresentam os resultados dos testes de pressão crescente (analgesímetro) para as fibras ocas HF-DIO-PVP e HF-DMSO, respectivamente.

Tabela 35 - Resultados de testes de pressão crescente em pata de camundongos com fibra ocas HF-DIO-PVP e HF-DMSO

Semana	HF-DIO-PVP		HF-DMSO	
	Peso (g) pata direita (normal)	Peso (g) pata esquerda (lesada)	Peso (g) pata direita (normal)	Peso (g) pata esquerda (lesada)
1	0,35	1,13	0,35	1,3
2	0,35	1,2	0,35	0,77
3	0,34	0,95	0,34	0,35
4	0,36	0,82	0,36	0,34
5	0,37	0,67	0,37	0,34
6	0,37	0,5	0,37	0,33
7	0,37	0,41	0,37	0,33
8	0,35	0,4	0,35	0,35

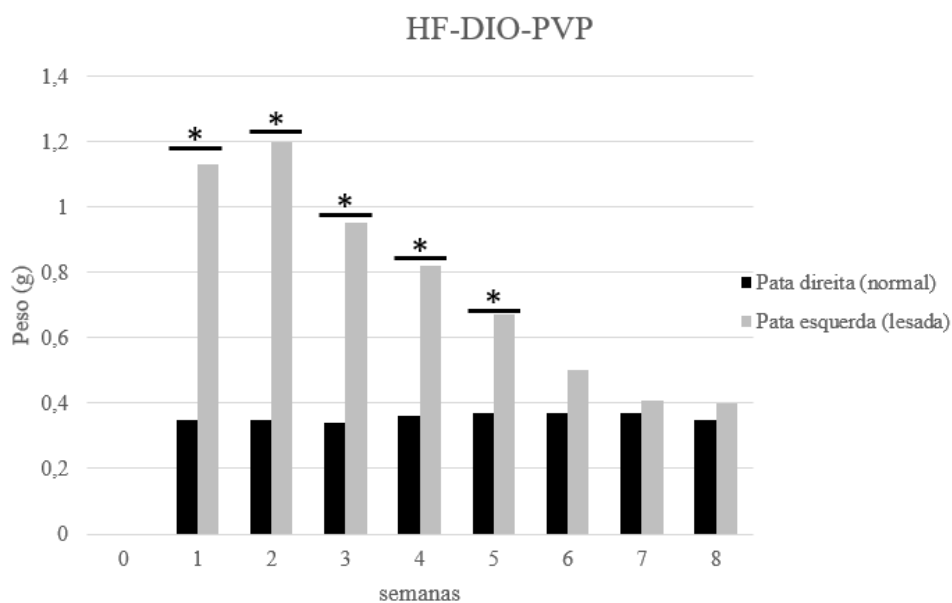


Figura 70 - Resultados de testes de pressão crescente em pata de camundongos com fibra oca HF-DIO-PVP. (* = valores com diferença significativa entre pata esquerda e direita em teste análise de variância a p=5%)

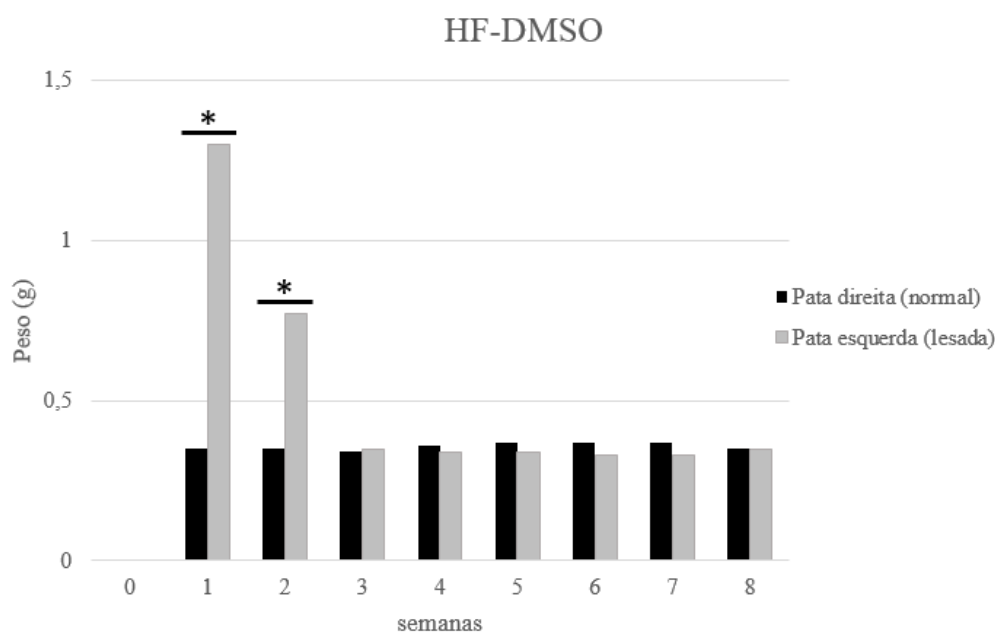


Figura 71 - Resultados de testes de pressão crescente em pata de camundongos com fibra oca HF-DMSO. (* = valores com diferença significativa entre pata esquerda e direita em teste análise de variância a p=5%)

Os dados dos gráficos ilustram o tempo de tratamento necessário para que as patas lesadas dos camundongos voltassem a responder a estímulos com a mesma sensibilidade que a pata saudável, o que é verificado quando os valores de peso aplicados em ambas as patas não possuem diferença estatística significativa.

Todos os grupos experimentais apresentaram níveis de recuperação após 7 dias de tratamento em comparação ao grupo normal. Entretanto, o grupo HF-DMSO apresentou

recuperação sensorial equiparável ao dos animais saudáveis após 2 semanas de tratamento, enquanto o grupo HF-DIO-PVP após 5 semanas apenas.

No trabalho de Varejão et al., (2003) [110], testes de reação à sensibilidade térmica foram efetuados em ratos tratados com CGN de poli(D,L-ácido lático-co-caprolactona) em lesão de nervo ciático. Nestes testes, as primeiras reações de recuperação sensorial foram observadas após 6 semanas de tratamento. Apesar de serem testes e espécies diferentes de animais, os resultados obtidos no presente trabalho podem ser indiretamente comparados, indicando recuperação sensorial de mesma ordem, ou mesmo superiores.

10.2.2 Índice de função do isquiático (IFC) - Teste de marcha

Os índices de função do ciático (IFC) dos dois grupos tratados a cada semana pós-lesão estão apresentados na Tabela 36 e ilustrados na Figura 72.

Tabela 36 – Resultados de Índice de função isquiático obtidos nos testes de marcha após cada semana pós-lesão

Semana	HF-DIO-PVP (IFC)	HF-DMSO (IFC)
1	-98 (± 6)	-93 (± 7)
2	-80,5 (± 3,5)	-89 (± 5)
3	-88 (± 6)	-90 (± 5)
4	-89 (± 2)	-92 (± 6)
5	-87 (± 4)	-80 (± 3)
6	-86 (± 4)	-87 (± 3)
7	-80 (± 3)	-82 (± 2)
8	-78 (± 3)	-83 (± 2)

Valores entre parênteses = desvio padrão

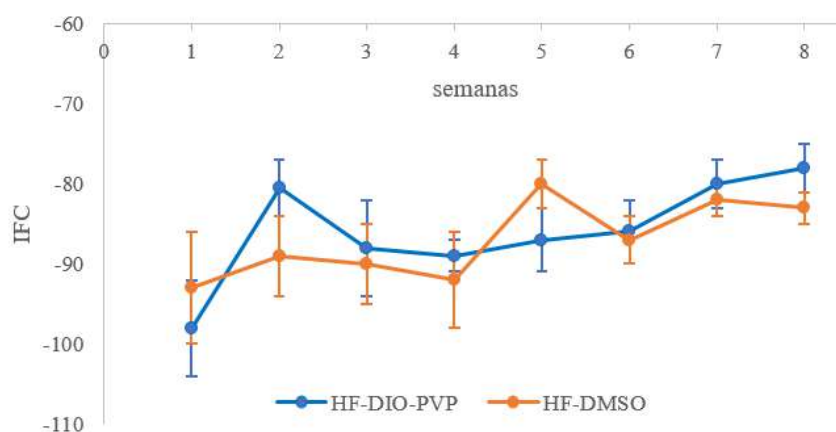


Figura 72 – Índice de função do isquiático entre os grupos tratados com as fibras ocas HF-DIO-PVP e HF-DMSO.

A análise dos resultados de IFC obtidos através dos testes de marcha, mostra que de maneira geral, todos os animais apresentaram déficits funcionais com perda da função nos primeiros 7 dias. Após as 8 semanas de tratamento, os grupos tratados com HF-DIO-PVP e HF-DMSO registraram melhoras progressivas muito similares: Não foi verificada diferença significativa ($P < 0,05$) entre os grupos nenhuma das semanas em que os testes foram realizados. Os níveis de recuperação associados ao IFC observados neste trabalho, bem como os reportados por Junior (2014) foram superiores aos resultados obtidos com CGN comerciais de PCL, também reportados no trabalho de Junior (2014).

10.2.3 Eletroneuromiografia

Os resultados dos testes eletroneuromiográficos estão expressos na Figura 73, e a análise quantitativa da amplitude e latência dos testes estão expressos na Figura 74 e na Figura 75.

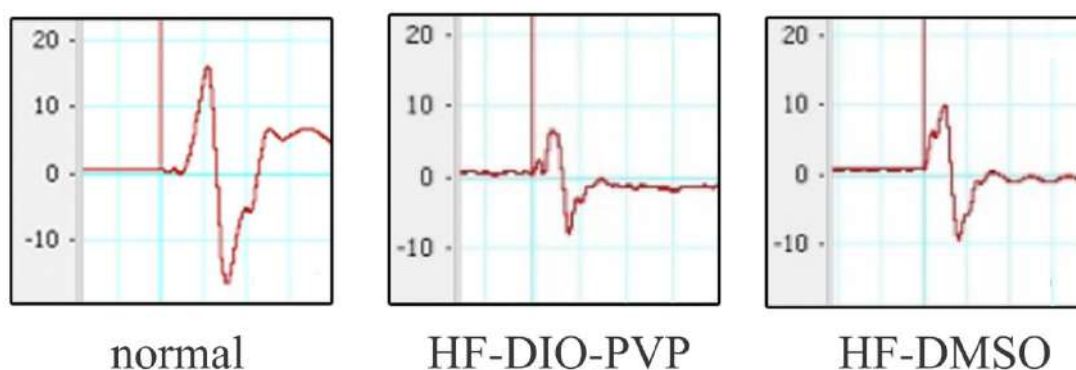


Figura 73 - Eletroneuromiografias dos grupos tratados com as fibras ocas HF-Dio-PVP, HF-DMSO e sem lesão (normal), após 8 semanas de tratamento.

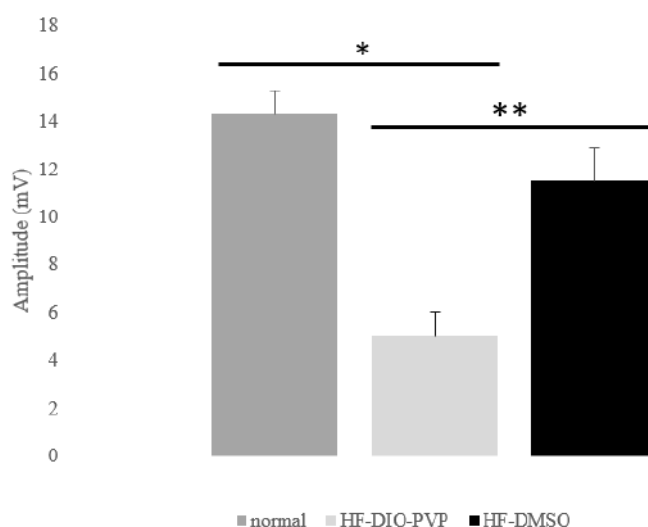


Figura 74 - Eletromiografia (amplitude) dos grupos tratados com as fibras ocas HF-DIO-PVP, HF-DMSO e grupo sem lesão (normal), a estímulo de 10 V após 8 semanas de tratamento. . (* = valores com diferença significativa entre pata esquerda e direita em teste análise de variância a $p=1\%$)

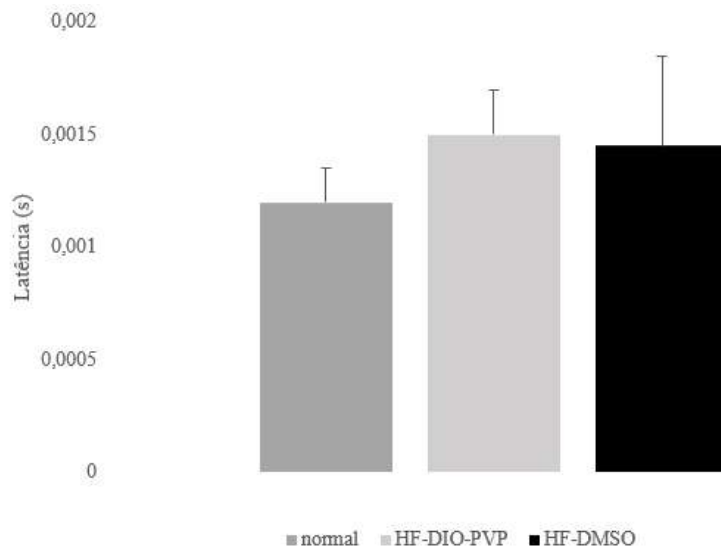


Figura 75 - Eletromicrografia (latência) dos grupos tratados com as fibras ocas HF-DIO-PVP, HF-DMSO e grupo sem lesão (normal), a estímulo de 10 V após 8 semanas de tratamento

Foi observado que a amplitude do grupo normal ($14,21 \text{ mV} \pm 1,33$) é superior à amplitude do grupo HF-DIO-PVP ($5 \text{ mV} \pm 3,17 \text{ mV}$) mas sem diferença significativa ao grupo HF-DMSO ($11,37 \text{ mV} \pm 3,78$) a $p < 0,01$.

Não foi verificada diferença significativa entre a latência do grupo sem lesão e os grupos testados: sem lesão ($0,0012 \text{ s} \pm 0,0002$), HF-DIO-PVP ($0,0015 \pm 0,0002 \text{ s}$) e HF-DMSO ($0,0014 \pm 0,0004 \text{ s}$).

10.2.4 Morfometria - Número de fibras mielínicas

A Figura 76 e Figura 77 apresentam as imagens dos nervos isquiáticos após 8 semanas de tratamento e o número total de fibras mielínicas e o número total de vasos sanguíneos respectivamente.

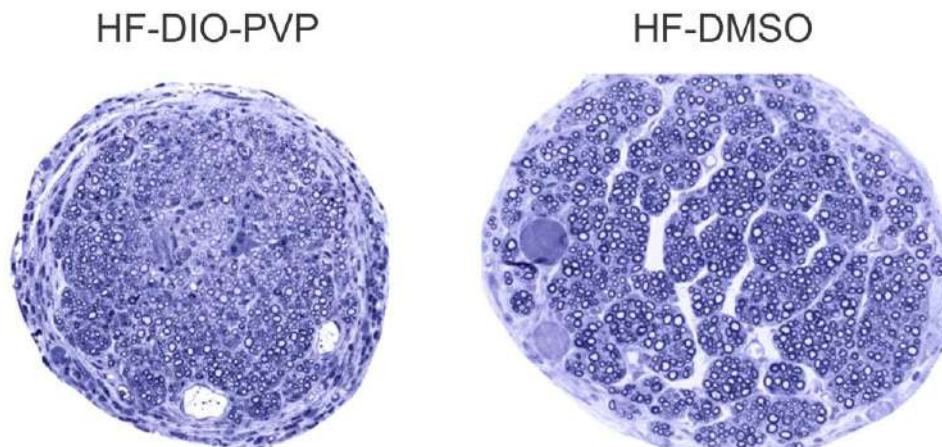


Figura 76 - Imagens de cortes semi-finos de nervo isquiático após 8 semanas de regeneração utilizando como condúites de guia neural as fibras ocas HF-DIO-OVO e HF-DMSO.

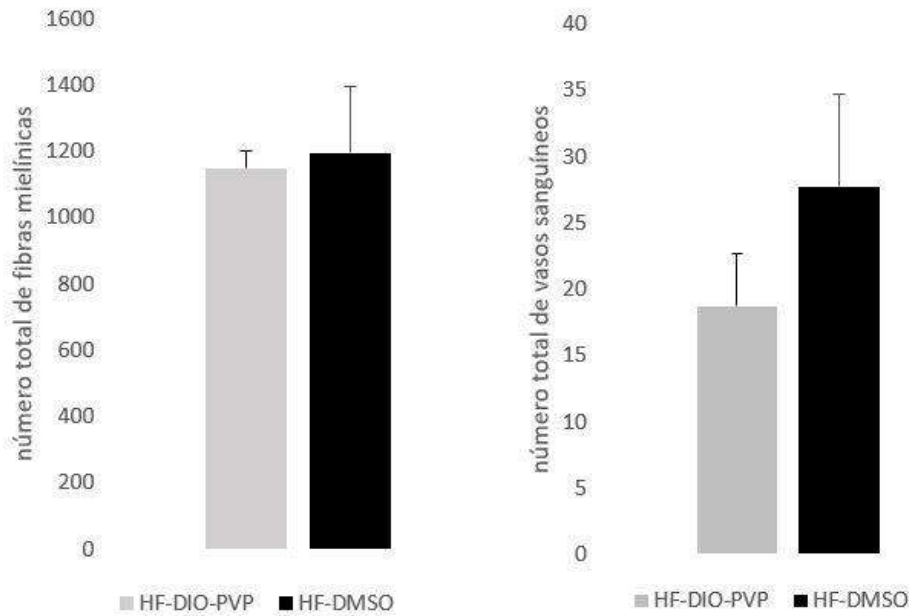


Figura 77 – contagem do número total de fibras mielínicas (esquerda) e número total de vasos sanguíneos (direita) após 8 semanas de tratamento utilizando com conduítes de guia neural as fibras ocas HF-DIO-PVP e HF-DMSO. (* = valores com diferença significativa entre pata esquerda e direita em teste análise de variância a p=5%)

A análise quantitativa do número total de fibras mielínicas regeneradas (Figura 77) mostra que apesar do grupo tratado com HF-DMSO ($1194,94 \pm 519$) possuir um número ligeiramente superior de fibras mielinizadas que o grupo tratado com HF-DIO-PVP (1148 ± 102), não houve diferença significativa entre os grupos. Estes dados são comparáveis aos valores reportados por Junior, (2014) (1379 ± 137) em tratamento de nervo isquiático de camundongos com fibras ocas de PLA. Os valores também são significativamente superiores aos reportados por Junior (2014) em grupo tratado com fibra oca comercial de PCL ($869,6 \pm 207,8$).

A mesma análise se aplica ao número total de vasos sanguíneos: O grupo tratado com HF-DMSO ($27,7 \pm 14,5$) apresentou maior número em comparação ao grupo HF-DIO-PVP ($18,7 \pm 8,6$). Porém não apresentaram diferença significância em análise de variância a $P < 0,05$.

10.3 Conclusões parciais

Verificou-se que ambos os grupos de animais tratados com as fibras ocas HF-DIO-PVP e HF-DMSO foram capazes de obter resultados positivos após 8 semanas de tratamento, em resposta a estímulos sensoriais e motores. Ambas as fibras ocas utilizadas apresentaram resistência mecânica adequada para seu manuseio e sutura durante o procedimento cirúrgico.

Embora o efeito da porosidade em CGN seja recorrentemente mencionado na literatura, os resultados ainda são controversos. Por um lado, estudos relatam que CGN porosos incrementam a capacidade de regeneração [2, 4] e por outro, alguns trabalhos falharam em demonstrar a influência da porosidade em processos regenerativos entre NGC porosos e não porosos [3]. No entanto, nestes estudos materiais poliméricos diferentes do PLA foram utilizados, resultando em diferentes comportamentos durante o contato intracorpóreo. Os resultados com CGN de PDLA neste trabalho indicaram melhores resultados de recuperação funcional com fibras ocas que possuem ausência de poros na superfície externa (HF-DMSO), em comparação a fibras ocas porosas com diâmetro médio de $4,45 \mu m$ (HF-DIO-PVP). Dentre as avaliações funcionais efetuadas, a fibra oca HF-DMSO apresentou os melhores resultados para testes de pressão crescente na pata de camundongos com analgesímetro, indicando melhor recuperação sensorial significativa após 2 semanas de tratamento, enquanto o grupo tratado com a fibra oca porosa HF-DIO-PVP obteve resultados similares após 5 semanas apenas. Isso indica que, mesmo que ambas as fibras ocas tenham alcançado recuperação sensorial satisfatória após as 8 semanas de tratamento, as fibras ocas mais fechadas foram capazes de promover recuperação sensorial plena em menor tempo. Isso é um indício de que as fibras ocas mais fechadas são capazes de promover crescimento axonal mais acelerado, e promover ambiente intraluminal mais adequado à regeneração neural durante as primeiras semanas de tratamento.

Os resultados de eletroneuromiografia também mostram que o grupo tratado com as fibras ocas fechadas HF-DMSO apresentou maior resposta a estímulos elétricos em relação à amplitude, aproximando-se de valores registrados em animais sem lesão, enquanto ambas as fibras HF-DMSO e HF-DIO-PVP apresentaram resultados similares em relação à latência.

Em termos de recuperação motora (IFC), ambos os grupos apresentaram resultados similares de recuperação em testes de marcha, sendo que após 8 semanas não houve diferença significativa entre os grupos tratados. A avaliação do número de fibras mielinizadas e vasos sanguíneos após o período de tratamento também se apresentaram estatisticamente semelhantes para ambos os grupos.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que para o caso de CGN sintetizados a partir de PDLA, o aumento do diâmetro médio de poro induz a efeitos negativos, principalmente em relação a recuperação sensorial. Entretanto, ambas as fibras ocas

testadas apresentaram resultados positivos, equiparando-se a valores reportados na literatura em testes com CGN comerciais.

Os resultados indicam que o maior isolamento da região intraluminal, apesar de não resultar em maior número de fibras mielinizadas e vasos sanguíneos, foi capaz de promover melhor recuperação funcional em termos de sensibilidade da área afetada. Uma hipótese é a de que a porosidade do CGN HF-DIO-PVP pôde afetar a retenção de nutrientes e fatores neurotróficos durante o tratamento, uma vez que a degradação de CGN porosos e com morfologia do tipo esponjosa é consideravelmente mais acelerada [104], aumentando o seu diâmetro médio de poros consideravelmente após a degradação. Isso pode levar a uma menor rejeição de solutos, ou seja, uma maior passagem de material contido na região intraluminal para o meio externo. Estudos sobre a degradação do CGN em função do tempo de tratamento *in vivo* são recomendados para maiores esclarecimentos sobre este ponto.

Em conclusão, os resultados comparativos entre as fibras ocas porosas e não porosas, indicam que o isolamento da região intraluminal seja mais sensível à eficácia do tratamento do que a permeabilidade de nutrientes para dentro do lúmen da fibra oca.

11 Conclusões e sugestões para trabalhos futuros

11.1 Conclusões

Neste trabalho, membranas de poli(ácido lático) na geometria fibra oca foram sintetizadas, caracterizadas e testadas para serem avaliadas em sua utilização como implantes auxiliares em tratamento de lesão em nervo periférico, uso também conhecido como Conduíte de Guia Neural (CGN). Buscou-se avançar no entendimento das limitações ainda existentes para este tipo de tratamento, especialmente no tocante à porosidade dos conduítes. Para isto, foram estudadas as condições para a síntese de fibras ocas com diferentes porosidades e propriedades de transporte, para que estas fossem avaliadas em função de resultados em testes cirúrgicos, através da análise de parâmetros de recuperação funcional.

O desenvolvimento do trabalho se iniciou pela avaliação e seleção da variedade de poli(ácido lático) a ser utilizada como material para a síntese das fibras ocas a serem testadas durante as etapas subsequentes do trabalho. Através da comparação da viscosidade das soluções poliméricas de PLLA (320 cP) e PDLLA (1150 cP) em NMP foi possível verificar que soluções de PDLLA fornecem mais estabilidade durante os procedimentos de espalhamento e fiação. A comparação das velocidades de precipitação utilizando água como não-solvente mostrou que os filmes de PLLA apresentam precipitações instantâneas, enquanto os filmes de PDLLA apresentaram atraso de aproximadamente 28 s. Os filmes e fibras ocas sintetizadas a partir dos materiais apresentaram características morfológicas semelhantes, com superfícies externas sem porosidade, mas com a formação de macrovazios digitiformes em sua secção transversal. A principal diferença entre as morfologias dos materiais se deu pela presença de núcleos de aglomerados sólidos resultantes de processos de separação sólido-líquido nas membranas de PLLA. Tais núcleos foram associados principalmente a capacidade de cristalização deste material. Após testes mecânicos, verificou-se que as fibras ocas de PLLA se apresentaram pouco flexíveis e muito quebradiças, enquanto as fibras ocas de PDLLA mostraram boa maleabilidade e resistência a testes de sutura, simulando procedimentos cirúrgicos. Dessa forma, o PDLLA, variedade amorfa do PLA foi selecionada para ser utilizada como polímero nas etapas subsequentes do trabalho.

A segunda etapa do trabalho consistiu na determinação de condições experimentais para a síntese das fibras ocas de PDLLA. Para isso, testes foram efetuados para se melhor entender a influência de variáveis operacionais durante o processo de precipitação em banho de não-solvente. Foram avaliados os efeitos da temperatura da solução polimérica, temperatura do banho de imersão, concentração da solução polimérica, composição do banho de imersão, e da presença de aditivos poliméricos, como polietilenoglicol (PEG) com diferentes massas molares e polivinilpirrolidona (PVP) em diferentes concentrações. Verificou-se que a temperatura do banho de imersão não afeta a velocidade de precipitação significativamente, e que para a solução polimérica a temperatura de 60 °C é capaz de acelerar a precipitação sem comprometer a permeabilidade hidráulica. O aumento da concentração polimérica é capaz de diminuir a velocidade de precipitação, porosidade e permeabilidade hidráulica, porém filmes produzidos a partir de soluções abaixo de 18% de polímero apresentaram resistência mecânica bastante comprometida. Desta forma, a concentração polimérica de 20% foi mantida como padrão, e a permeabilidade hidráulica controlada com a adição de aditivos poliméricos. A adição de 5% de PEG de diferentes massas molares (14 e 24 kDa) não foi capaz de alterar significativamente o diâmetro médio de poros, enquanto a adição de PVP foi capaz de acelerar a precipitação e aumentar a permeabilidade hidráulica, diâmetro médio de poros e interconectividade dos poros dos filmes a partir da concentração de 2%. Por fim, a adição de solvente no banho de imersão foi capaz de causar atraso na precipitação, suprimindo a permeabilidade hidráulica dos filmes. Porém foi evidenciado que o atraso causado na precipitação, resultou no início da transição de morfologia de macrovazios digitiformes para estruturas espongiiformes. Esta estratégia para controle de morfologia foi explorada na etapa posterior, através da utilização de diferentes solventes.

Na terceira etapa do trabalho, foi investigada a influência do uso de solventes que possuíssem diferentes afinidades com a água e PDLLA (NMP, dioxano e DMSO) durante a síntese de fibras ocas. Aspectos termodinâmicos e cinéticos como a extensão relativa dos diagramas ternários e a velocidade de precipitação foram avaliadas, e relacionadas à morfologia e propriedades de transporte das membranas sintetizadas. A interpretação da relação entre estas variáveis e as caracterizações efetuadas foram feitas com o auxílio dos parâmetros de interação de Flory-Huggins e de Hansen, onde concluiu-se que a transição da morfologia do tipo macrovazios digitiformes para estruturas espongiiformes pôde ser alcançada através da indução do atraso na precipitação. Este atraso foi induzido através

do uso de um solvente com menor afinidade com a água, no caso dioxano. As fibras ocas com diferentes morfologias foram sintetizadas também com a adição de PVP para induzir porosidade. Ainda nesta etapa, as fibras ocas foram caracterizadas em testes de permeabilidade hidráulica e em testes de diálise, onde verificou-se fibras ocas com rejeição de 100% a sais, e fibras ocas com rejeição de 83% a lisozima (17 kDa) e 99% a BSA (67 kDa). A influência das morfologias do tipo macrovazios digitiformes e estruturas espongiiformes foi avaliada em testes mecânicos e em testes de degradação *in vitro*. Os testes de tração confirmaram que a morfologia afeta a tensão e alongamento máximo de ruptura das fibras ocas, sendo que membranas com morfologia espongiiforme apresentaram os maiores valores (12,80 MPa e 58%). A adição de PVP foi capaz de reduzir drasticamente a tolerância das fibras ocas ao alongamento, porém sem comprometer sua capacidade de manuseio e suporte a suturas em procedimentos cirúrgicos. Finalmente, fibras ocas com morfologia de macrovazios digitiformes e espongiiformes foram submetidas à teste de *degradação in vitro*, onde verifica-se que a porosidade e morfologia da fibras ocas afetam o tempo de degradação. Após taxas de degradação similares nos primeiros 60 dias, as membranas com morfologia de macrovazios digitiformes tiveram sua porosidade e massas molares mais afetadas após a incubação. Com os resultados levantados nesta etapa, foi atingido o objetivo da produção de fibras ocas porosas e não porosas para serem avaliadas como CGN, além de acrescentar informações e conhecimento sobre a síntese de fibras ocas de PDLLA: controle de morfologia e propriedades de transporte, bem como o efeito da morfologia nas propriedades mecânicas e em seu tempo de degradação.

A partir de diferenças nas propriedades de transporte, duas fibras ocas foram selecionadas para a última etapa do trabalho, onde as mesmas foram utilizadas como CGN em lesões de nervo isquiático de camundongos. O desempenho entre os grupos de animais tratados com cada fibra oca foi comparado em termos de índices relacionados à sua recuperação motora e sensorial.

Os resultados mostraram que a fibra oca HF-DMSO (sem poros superficiais e com rejeição de 100% a lisozima – 17 kDa) foi capaz de proporcionar recuperação sensorial mais rápida (2 semanas) em comparação à fibra oca porosa HF-DIO-PVP (diâmetro médio de poro 4,45 μm e com rejeição de 83% a lisozima) (5 semanas) em testes de pressão aplicada na região afetada pela lesão do nervo. Foi também verificada diferença significativa entre os grupos em análises de estímulos a impulsos elétricos, onde a amplitude

de resposta para o grupo tratado com a fibra oca HF-DMSO ($11,37 \pm 3,78$ mV) foi superior à do grupo tratado com HF-DIO-PVP ($5 \pm 3,17$ mV), sendo que o primeiro grupo apresentou resultados comparáveis e estatisticamente semelhantes ao grupo normal (sem lesão) ($14,21 \pm 1,33$ mV). Em relação à latência, ou tempo de resposta ao estímulo elétrico, ambos os grupos apresentaram recuperação funcional semelhante. Isso indica que as fibras ocas menos porosas de PDLLA foram capazes de proporcionar melhor recuperação em termos de estímulos elétricos, em comparação às fibras ocas porosas. Tem-se como principal hipótese para explicar a diferença de desempenho entre as fibras ocas utilizadas, a maior capacidade da fibra oca sem poros de retenção de células e fatores neurotróficos na região intraluminal, principalmente durante as primeiras 3 semanas, consideradas como o período crítico para o tratamento.

A análise morfométrica mostrou que ambos os grupos apresentaram números similares de fibras mielínicas e vasos sanguíneos regenerados após 8 semanas de tratamento. Para o grupo tratado com HF-DMSO foram registrados valores $1194,94 \pm 519$ para fibras mielínicas e $27,7 \pm 14,5$ para vasos sanguíneos, ao passo que o grupo tratado com HF-DIO-PVP apresentou valores de 1148 ± 102 e $18,7 \pm 8,6$ para fibras mielínicas e vasos sanguíneos respectivamente. Estes valores estão próximos de valores previamente reportados na literatura, e superiores a valores reportados no trabalho de Junior (2014) [17] para CGN comerciais de PCL ($869,6 \pm 207,8$ para fibras mielínicas).

Em relação à recuperação motora, não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao Índice de Função do Isquiático (IFC) em testes de marcha.

Estes resultados mostraram que o desenvolvimento das fibras ocas neste trabalho foi capaz de obter resultados de recuperação funcional e motora comparáveis a valores reportados na literatura, além de avançar na compreensão do efeito e importância da porosidade dos CGN confeccionados a partir de PLA durante o tratamento em nervo periférico.

11.2 Sugestões para trabalhos futuros

- Avaliar a degradação dos CGN utilizados nos testes *in vivo*, buscando verificar se há influência significativa das diferentes taxas de degradação em função da diferença de morfologia nos resultados de recuperação funcional;
- Avaliar o efeito do diâmetro médio de poros sobre parâmetros morfométricos específicos, como fibras não mielinizadas, espessura das bainhas de mielina e área total de axônio, buscando esclarecer em que aspectos a porosidade efetivamente induz a efeitos negativos durante o tratamento: poderia haver má retenção de células durante o crescimento axonal, mesmo com CGN com porosidades nos limites inferiores aos recorrentemente sugeridos pela literatura ($5 \mu m$) ?.
- Efetuar análise morfométrica do nervo periférico regenerado após diferentes tempos após início de tratamento, buscando melhor entendimento sobre a influência de características do CGN nas etapas de regeneração;
- Estudos com a combinação de abordagens para desenvolvimento de CGN: otimização da porosidade acompanhada com a funcionalização das superfícies internas com fatores neurotróficos, ou mesmo com a adição de canais intraluminais;
- Desenvolvimento de membranas na geometria tubular para uso em tratamento de nervos periféricos de diferentes calibres.

12 Referências bibliográficas

1. Ma, M.-S., Van Dam, G., Meek, M., Boddeke, E., & Copray, S. (2009). In vivo bioluminescent imaging of Schwann cells in a poly(DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guide. *Muscle & nerve*, 40(5), 867–71.
2. Hsieh, S. C., Chang, C. J., Cheng, W. T., Tseng, T. C., & Hsu, S. H. (2016). Effect of an epineurial-like biohybrid nerve conduit on nerve regeneration. *Cell Transplantation*, 25(3), 559–574.
3. Ezra, M., Bushman, J., Shreiber, D., Schachner, M., & Kohn, J. (2014). Enhanced femoral nerve regeneration after tubulization with a tyrosine-derived polycarbonate terpolymer: effects of protein adsorption and independence of conduit porosity. *Tissue engineering. Part A*, 20(3–4), 518–28.
4. Santos, D., Wieringa, P., Moroni, L., Navarro, X., & Valle, J. Del. (2017). PEOT/PBT Guides Enhance Nerve Regeneration in Long Gap Defects. *Advanced Healthcare Materials*, 6(3).
5. Gu, X., Ding, F., & Williams, D. F. (2014). Neural tissue engineering options for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 35(24), 6143–6156.
6. Chen, Q., Liang, S., & Thouas, G. a. (2013). Progress in Polymer Science Elastomeric biomaterials for tissue engineering. *Progress in Polymer Science*, 38, 584–671.
7. Stamatialis, D. F., Papenburg, B. J., Gironés, M., Saiful, S., Bettahalli, S. N. M., Schmitmeier, S., & Wessling, M. (2008). Medical applications of membranes: Drug delivery, artificial organs and tissue engineering. *Journal of Membrane Science*, 308(1–2), 1–34.
8. Fuchs, J. R., Nasser, B. a, & Vacanti, J. P. (2001). Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction. *The Annals of Thoracic Surgery*, 72(2), 577–591.
9. Ni, H.-C., Tseng, T.-C., Chen, J.-R., Hsu, S.-H., & Chiu, I.-M. (2013). Fabrication of bioactive conduits containing the fibroblast growth factor 1 and neural stem cells for peripheral nerve regeneration across a 15 mm critical gap. *Biofabrication*, 5(3), 35010.

10. Tamayol, A., Akbari, M., Annabi, N., Paul, A., Khademhosseini, A., & Juncker, D. (2013). Fiber-based tissue engineering: Progress, challenges, and opportunities. *Biotechnology advances*, 31(5), 669–87.
11. Yuan, M., Li, X., Xiong, C., & Deng, X. (1999). Polymerization of lactides and lactones 5. Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone and dl-lactide by rare earth 2-methylphenyl samarium. *European Polymer Journal*, 35(12), 2131–2138.
12. Li, N. N., Anthony G. Fane, Ho, W. S. W., & Matsuura, T. (2008). *Advanced membrane technology and applications*. John Wiley & Sons.
13. Fresenius Medical Care. (2012). ESRD Patients in 2012 A Global Perspective. Retrieved June 11, 2015, from http://www.vision-fmc.com/files/pdf_2/ESRD_Patients_2012.pdf
14. Ma, D., & McHugh, A. J. (2010). The interplay of membrane formation and drug release in solution-cast films of polylactide polymers. *International journal of pharmaceutics*, 388(1–2), 1–12.
15. Bettahalli, N. M. S., Steg, H., Wessling, M., & Stamatialis, D. (2011). Development of poly(l-lactic acid) hollow fiber membranes for artificial vasculature in tissue engineering scaffolds. *Journal of Membrane Science*, 371(1–2), 117–126.
16. Arslantunali, D., Dursun, T., Yucel, D., Hasirci, N., & Hasirci, V. (2014). Peripheral nerve conduits: technology update. *Medical Devices: Evidence and Research*, (7), 405–424.
17. Dantas Junior, S. V. (2014). *Desenvolvimento de tubos biodegradáveis a partir do polímero poli(ácido-lático) e sua aplicação após lesão nervosa periférica em camundongos*. Tese de D.Sc., UFRJ.
18. Adamus, A., Wach, R. a., Olejnik, A. K., Dzierzawska, J., & Rosiak, J. M. (2012). Degradation of nerve guidance channels based on a poly(l-lactic acid) poly(trimethylene carbonate) biomaterial. *Polymer Degradation and Stability*, 97, 532–540.
19. Daly, W., Yao, L., Zeugolis, D., Windebank, a., & Pandit, a. (2012). A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *Journal of The Royal Society*

- Interface*, 9(67), 202–221.
20. Pabari, A., Yang, S. Y., Seifalian, A. M., & Mosahebi, A. (2010). Modern surgical management of peripheral nerve gap. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery : JPRAS*, 63(12), 1941–1948.
 21. Kehoe, S., Zhang, X. F., & Boyd, D. (2012). FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: a review of materials and efficacy. *Injury*, 43(5), 553–72.
 22. Steed, M. B., Mukhatyar, V., Valmikinathan, C., & Bellamkonda, R. V. (2011). Advances in Bioengineered Conduits for Peripheral Nerve Regeneration. *Atlas of the Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America*, 19(1), 119–130.
 23. Junior, R. M., & Azze, R. J. (1999). Lesão dos nervos periféricos. *Atualização em traumatologia do aparelho locomotor*.
 24. Goulart, C. O., Pereira Lopes, F. R., Monte, Z. O., Dantas, S. V., Souto, A., Oliveira, J. T., ... Martinez, A. M. B. (2016). Evaluation of biodegradable polymer conduits - poly(l-lactic acid) - for guiding sciatic nerve regeneration in mice. *Methods*, 99, 28–36.
 25. Marquardt, L. M., & Sakiyama-Elbert, S. E. (2013). Engineering peripheral nerve repair. *Curr Opin Biotechnol*, 24(5), 887–892.
 26. Chiono, V., & Tonda-Turo, C. (2015). Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering. *Progress in Neurobiology*, 131, 87–104.
 27. Ciardelli, G., & Chiono, V. (2006). Materials for peripheral nerve regeneration. *Macromolecular bioscience*, 6(1), 13–26.
 28. de Ruitter, G. C. W., Spinner, R. J., Yaszemski, M. J., Windebank, A. J., & Malessy, M. J. a. (2009). Nerve Tubes for Peripheral Nerve Repair. *Neurosurgery Clinics of North America*, 20(1), 91–105.
 29. Goh, Y. Q., & Ooi, C. P. (2008). Fabrication and characterization of porous poly(L-lactide) scaffolds using solid-liquid phase separation. *Journal of materials science: Materials in medicine*, 19(6), 2445–52.
 30. Lili, Z. (2007). *Síntese e caracterização do copolímero triblocoanfifílico*

biodegradável poli(L,L-lactídeo-stat-ε-caprolactona)-bloco-poli(óxido de etileno)-bloco-poli(L,L-lactídeo-stat-ε-caprolactona). Dissertação de M.Sc., Universidade de São Paulo.

31. Moriya, A., Maruyama, T., Ohmukai, Y., Sotani, T., & Matsuyama, H. (2009). Preparation of poly(lactic acid) hollow fiber membranes via phase separation methods. *Journal of Membrane Science*, 342(1–2), 307–312.
32. Heath, C. a., & Rutkowski, G. E. (1998). The development of bioartificial nerve grafts for peripheral-nerve regeneration. *Trends in Biotechnology*, 16(4), 163–168.
33. Ngo, T. B., Waggoner, P. J., Romero, A. A., Nelson, K. D., Eberhart, R. C., & Smith, G. M. (2003). Poly (L -Lactide) Microfilaments Enhance Peripheral Nerve Regeneration Across Extended Nerve Lesions, 238(August 2002), 227–238.
34. Evans, G. R. ., Brandt, K., Katz, S., Chauvin, P., Otto, L., Bogle, M., ... Patrick, C. W. (2002). Bioactive poly(l-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, 23(3), 841–848.
35. Zhang, H., Wang, K., Xing, Y., & Yu, Q. (2015). Lysine-doped polypyrrole/spider silk protein/poly(l-lactic) acid containing nerve growth factor composite fibers for neural application. *Materials Science and Engineering: C*.
36. Ghasemi-Mobarakeh, L., Prabhakaran, M. P., Morshed, M., Nasr-Esfahani, M. H., Baharvand, H., Kiani, S., ... Ramakrishna, S. (2011). Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 5(4), 524–531.
37. Chwalek, K., Dening, Y., Hinüber, C., Brünig, H., Nitschke, M., & Werner, C. (2016). Providing the right cues in nerve guidance conduits: Biofunctionalization versus fiber profile to facilitate oriented neuronal outgrowth. *Materials Science and Engineering C*, 61, 466–472.
38. Gupta, a. P., & Kumar, V. (2007). New emerging trends in synthetic biodegradable polymers – Polylactide: A critique. *European Polymer Journal*, 43(10), 4053–4074.
39. Lim, L.-T., Auras, R., & Rubino, M. (2008). Processing technologies for poly(lactic acid). *Progress in Polymer Science*, 33(8), 820–852.
40. Sawalha, H., Schroën, K., & Boom, R. (2008). Mechanical properties and porosity

- of polylactide for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 107(1), 82–93.
41. Uzun, N., Martins, T. D., Teixeira, G. M., Cunha, N. L., Oliveira, R. B., Nassar, E. J., & dos Santos, R. A. (2015). Poly(l-lactic acid) membranes: Absence of genotoxic hazard and potential for drug delivery. *Toxicology Letters*, 232(2), 513–518.
 42. Minbu, H., Ochiai, A., Kawase, T., Taniguchi, M., Lloyd, D. R., & Tanaka, T. (2015). Preparation of poly (L-lactic acid) micro fi ltration membranes by a nonsolvent-induced phase separation method with the aid of surfactants, 479, 85–94.
 43. Bell, J. H. a, & Haycock, J. W. (2012). Next generation nerve guides: materials, fabrication, growth factors, and cell delivery. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 18(2), 116–28.
 44. Nectow, A. R., Marra, K. G., & Kaplan, D. L. (2012). Biomaterials for the development of peripheral nerve guidance conduits. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 18(1), 40–50.
 45. Zhu, L.-J., Liu, F., Yu, X.-M., Gao, A.-L., & Xue, L.-X. (2015). Surface zwitterionization of hemocompatible poly(lactic acid) membranes for hemodiafiltration. *Journal of Membrane Science*, 475, 469–479.
 46. Gao, A., Liu, F., & Xue, L. (2014). Preparation and evaluation of heparin-immobilized poly (lactic acid) (PLA) membrane for hemodialysis. *Journal of Membrane Science*, 452, 390–399.
 47. Eenink, M. J. D., Feijen, J., Olijslager, J., Albers, J. H. M., Rieke, J. C., & Greidanus, P. J. (1987). Biodegradable hollow fibres for the controlled release of hormones. *Journal of Controlled Release*, 6, 225–247.
 48. van de Witte, P., Esselbrugge, H., Peters, a. M. P., Dijkstra, P. J., Feijen, J., Groenewegen, R. J. J., ... Sam, a. P. (1993). Formation of porous membranes for drug delivery systems. *Journal of Controlled Release*, 24(1–3), 61–78.
 49. Gogolewski, S. (2000). Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery. *Injury*, 31, D28–D32.
 50. Robert, P., Mauduit, J., Frank, R. M., & Vert, M. (1993). Biocompatibility and

- resorbability of a polylactic acid membrane for periodontal guided tissue regeneration. *Biomaterials*, 14(5), 353–358.
51. Lopes, M. S., Jardim, a. L., & Filho, R. M. (2012). Poly (Lactic Acid) Production for Tissue Engineering Applications. *Procedia Engineering*, 42(August), 1402–1413.
 52. Garlotta, D. (2001). A Literature Review of Poly(Lactic Acid). *Journal of Polymers and the Environment*, 9(2), 63–84.
 53. Siemann, U. (1992). The solubility parameter of poly(dl-lactic acid). *European Polymer Journal*, 28(3), 293–297.
 54. Urayama, H., Moon, S. I., & Kimura, Y. (2003). Microstructure and thermal properties of polylactides with different L- and D-unit sequences: Importance of the helical nature of the L-sequenced segments. *Macromolecular Materials and Engineering*, 288(2), 137–143.
 55. Tanaka, T., Tsuchiya, T., Takahashi, H., Taniguchi, M., & Lloyd, D. R. (2006). Microfiltration membrane of polymer blend of poly(l-lactic acid) and poly(ε-caprolactone). *Desalination*, 193(August 2005), 367–374.
 56. Saeidlou, S., Huneault, M. a., Li, H., & Park, C. B. (2012). Poly(lactic acid) crystallization. *Progress in Polymer Science*, 37(12), 1657–1677.
 57. Xing, Q., Dong, X., Li, R., Yang, H., Han, C. C., & Wang, D. (2013). Morphology and performance control of PLLA-based porous membranes by phase separation. *Polymer*, 54(21), 5965–5973.
 58. Farah, S., Anderson, D. G., & Langer, R. (2016). Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications - A comprehensive review. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 107, 367–392.
 59. Perego, G., Cella, G., & Bastioli, C. (1996). Effect of molecular weight and crystallinity on poly (lactic acid) mechanical properties. *Journal of Applied Polymer ...*, 59, 37–43.
 60. Gao, A., Liu, F., Shi, H., & Xue, L. (2015). Controllable transition from finger-like pores to inter-connected pores of PLLA membranes. *Journal of Membrane Science*, 478, 96–104.

61. van de Witte, P., Esselbrucce, H., & Berg, J. W. A. Van Den. (1996). A Morphological Study of Membranes Obtained from the Systems Polylactide-Dioxane-Methanol. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, *34*, 2569–2578.
62. Zereshki, S., Figoli, a., Madaeni, S. S., Simone, S., Jansen, J. C., Esmailinezhad, M., & Drioli, E. (2010). Poly(lactic acid)/poly(vinyl pyrrolidone) blend membranes: Effect of membrane composition on pervaporation separation of ethanol/cyclohexane mixture. *Journal of Membrane Science*, *362*(1–2), 105–112.
63. Moriya, A., Shen, P., Ohmukai, Y., Maruyama, T., & Matsuyama, H. (2012). Reduction of fouling on poly(lactic acid) hollow fiber membranes by blending with poly(lactic acid)-polyethylene glycol-poly(lactic acid) triblock copolymers. *Journal of Membrane Science*, *415–416*, 712–717.
64. Deng, X., Liu, Y., Yuan, M., Li, X., Liu, L., & Jia, W. X. (2002). Preparation and characterization of poly-DL-lactide-poly(ethylene glycol) microspheres containing λ DNA. *Journal of Applied Polymer Science*, *86*(10), 2557–2566.
65. Najafi, N., Heuzey, M. C., Carreau, P. J., & Wood-Adams, P. M. (2012). Control of thermal degradation of polylactide (PLA)-clay nanocomposites using chain extenders. *Polymer Degradation and Stability*, *97*, 554–565.
66. Sarazin, P., Li, G., Orts, W. J., & Favis, B. D. (2008). Binary and ternary blends of polylactide, polycaprolactone and thermoplastic starch. *Polymer*, *49*(2), 599–609.
67. Erwan, P., Marec, L., Ferry, L., & Quantin, J. (2014). Influence of melt processing conditions on poly (lactic acid) degradation : Molar mass distribution and crystallization. *Polymer Degradation and Stability*, *110*(10), 353–363.
68. Li, S. (2003). Bioresorbable Hydrogels Prepared Through Stereocomplexation between Poly(L-lactide) and Poly(D-lactide) Blocks Attached to Poly(ethylene glycol). *Macromolecular Bioscience*, *3*(11), 657–661.
69. Pluta, M., Galeski, a., Alexandre, M., Paul, M. a., & Dubois, P. (2002). Polylactide/montmorillonite nanocomposites and microcomposites prepared by melt blending: Structure and some physical properties. *Journal of Applied Polymer Science*, *86*(6), 1497–1506.

70. Gugala, Z., & Gogolewski, S. (2004). Protein adsorption, attachment, growth and activity of primary rat osteoblasts on polylactide membranes with defined surface characteristics. *Biomaterials*, 25(12), 2341–2351.
71. Habert, A. C., Piacsek, C., & Nobrega, R. (2006). *Processos de Separação por Membranas*. (E-papers, Ed.). Rio de Janeiro.
72. Mulder, M. (1997). *Basic principles of membrane technology* (2nd ed.). Dordrecht, Boston, London: Kluwer academic publishers.
73. Sawalha, H., Schroën, K., & Boom, R. (2007). Polylactide films formed by immersion precipitation: Effects of additives, nonsolvent, and temperature. *Journal of Applied Polymer Science*, 104(2), 959–971.
74. Mermier, N. R. J. (2012). *Sistemas para preparo de fibras ocas compostas acoplando inversão de fases e polimerização interfacial simultâneas*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil
75. Smith, J. M., Van Ness, H. C., & Abbott, M. M. (2007). *Introdução à Termodinâmica da Engenharia Química* (7ª edição.). Rio de Janeiro: LTC.
76. Flory, P. J. (1952). *Principles of Polymer Chemistry*. Ithaca: Cornell University Press.
77. Billmeyer, F. W. (1984). *Textbook of Polymer Science. Chemical And Engineering New* (3rd editio.). John Wiley & Sons.
78. Charles M. Hansen. (2007). Hansen Solubility Parameters- A user's Handbook, 547.
79. van de Witte, P., Dijkstra, P. J., van den Berg, J. W. a., & Feijen, J. (1996). Phase behavior of polylactides in Solvent-Nonsolvent mixtures. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics*, 34(15), 2553–2568.
80. Kimmerle, K., & Strathmann, H. (1990). Analysis of the structure-determining process of phase inversion membranes. *Desalination*, 79(2–3), 283–302.
81. van de Witte, P., Dijkstra, P. J. J., van den Berg, J. W. a. W. a., & Feijen, J. (1996). Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation. *Journal of Membrane Science*, 117, 1–31.
82. Kukizaki, M. (2009). Relation between salt rejection and electrokinetic properties

- on Shirasu porous glass (SPG) membranes with nano-order uniform pores. *Separation and Purification Technology*, 69(1), 87–96.
83. Reuvers, A. J., & Smolders, C. A. (1987). Formation of membranes by means of immersion precipitation part II. The mechanism of formation of membranes prepared from the system cellulose acetate-acetone-water. *Journal of Membrane Science*, 34, 67–86.
 84. Reuvers, a. J., & Smolders, C. a. (1987). Formation of membranes by means of immersion precipitation Part I. A model to describe mass transfer during immersion precipitation. *Journal of Membrane Science*, 34(1), 67–86.
 85. Smolders, C. a., Reuvers, a. J., Boom, R. M., & Wienk, I. M. (1992). Microstructures in phase-inversion membranes. Part 1. Formation of macrovoids. *Journal of Membrane Science*, 73(2–3), 259–275.
 86. Montesanto, S., Mannella, G. a., Carfi Pavia, F., La Carrubba, V., & Brucato, V. (2015). Coagulation bath composition and desiccation environment as tuning parameters to prepare skinless membranes via diffusion induced phase separation. *Journal of Applied Polymer Science*, 132(26), n/a-n/a.
 87. van de Witte, P., Esselbrugge, H., Dijkstra, P. J., Berg, J. W. A. Van Den, & Feijen, J. (1996). Phase transitions during membrane formation of polylactides . I . A morphological study of membranes obtained from the system polylactide-chloroform-metanol. *Journal of Membrane Science*, 113, 223–236.
 88. Karode, S. K., & Kumar, A. (2001). Formation of polymeric membranes by immersion precipitation: An improved algorithm for mass transfer calculations. *Journal of Membrane Science*, 187(1–2), 287–296.
 89. Machado, P. S. T., Habert, a. C., & Borges, C. P. (1999). Membrane formation mechanism based on precipitation kinetics and membrane morphology: Flat and hollow fiber polysulfone membranes. *Journal of Membrane Science*, 155, 171–183.
 90. Peng, N., Chung, T. S., & Wang, K. Y. (2008). Macrovoid evolution and critical factors to form macrovoid-free hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, 318(1–2), 363–372.
 91. Zoppi, R. A., Contant, S., Duek, E. A. R., Marques, F. R., Wada, M. L. F., &

- Nunes, S. P. (1999). Porous poly (L-lactide) films obtained by immersion precipitation process : morphology , phase separation and culture of VERO cells. *Polymer*, 40, 3275–3289.
92. Tanaka, T., & Lloyd, D. (2004). Formation of poly(l-lactic acid) microfiltration membranes via thermally induced phase separation. *Journal of Membrane Science*, 238(1–2), 65–73.
 93. Shen, P., Moriya, A., Rajabzadeh, S., Maruyama, T., & Matsuyama, H. (2013). Improvement of the antifouling properties of poly (lactic acid) hollow fiber membranes with poly (lactic acid)-polyethylene glycol-poly (lactic acid) copolymers. *Desalination*, 325, 37–39.
 94. Tanaka, T., Nishimoto, T., Tsukamoto, K., Yoshida, M., Kouya, T., Taniguchi, M., & Lloyd, D. R. (2012). Formation of depth filter microfiltration membranes of poly(l-lactic acid) via phase separation. *Journal of Membrane Science*, 396, 101–109.
 95. Papenburg, B. J., Bolhuis-Versteeg, L. a M., Grijpma, D. W., Feijen, J., Wessling, M., & Stamatialis, D. (2010). A facile method to fabricate poly(L-lactide) nano-fibrous morphologies by phase inversion. *Acta Biomaterialia*, 6(7), 2477–2483.
 96. Pereira, C. C. (1999). *Desenvolvimento de fibras ocas anisotrópicas para separação de gases* Cristina Cardoso Pereira.v Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
 97. Grunwald, I. J. J., & Gan, R. (1997). United States Patent
 98. Rodriguez, F., Cohen, C., Ober, C., & Archer, L. A. (2005). *Principles of Polymer Systems* (5th ed.). New York: Taylor & Francis.
 99. BERTOLDO, L. C. (2005). *Desenvolvimento de membranas de fibras ocas para ultrafiltração e nanofiltração utilizando imersão em banho duplo de precipitação*. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
 100. Carvalho, R. B. de. (2005). *Fibras ocas compostas para nanofiltração e osmose inversa preparadas pela técnica de precipitação por imersão de duas soluções poliméricas extrusadas simultaneamente*. Tese de D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
 101. Peng, N., & Chung, T. S. (2008). The effects of spinneret dimension and hollow

- fiber dimension on gas separation performance of ultra-thin defect-free Torlon® hollow fiber membranes. *Journal of Membrane Science*, 310(1–2), 455–465.
102. Yang, F., Murugan, R., Wang, S., & Ramakrishna, S. (2005). Electrospinning of nano/micro scale poly(l-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, 26(15), 2603–2610.
 103. Li, L., Hashaikeh, R., & Arafat, H. a. (2013). Development of eco-efficient microporous membranes via electrospinning and annealing of poly (lactic acid). *Journal of Membrane Science*, 436, 57–67.
 104. Domingues, R. C. C., Pereira, C. C., & Borges, C. P. (2017). Morphological control and properties of poly(lactic acid) hollow fibers for biomedical applications. *Journal of Applied Polymer Science*, 45494.
 105. Krevelen, D. W. Van. (1992). Properties of polymers. Their correlation with chemical structure; their numerical estimation and prediction from additive group contributions. *Endeavour*, 16(2), 97–98.
 106. Goulart, C. O., Lopes, F. R. P., Monte, Z., Júnior, S. V. D., Souto, A., Oliveira, J. T., ... Martinez, A. M. B. (2015). Evaluation of biodegradable polymer conduits – poly (L-lactic acid) – for guiding sciatic nerve regeneration in mice. *Methods*.
 107. Meek, M. F., & Jansen, K. (2009). Two years after in vivo implantation of poly(DL-lactide-epsilon-caprolactone) nerve guides: has the material finally resorbed? *Journal of biomedical materials research. Part A*, 89(3), 734–8.
 108. Hsu, S. H., Chan, S. H., Chiang, C. M., Chi-Chang Chen, C., & Jiang, C. F. (2011). Peripheral nerve regeneration using a microporous polylactic acid asymmetric conduit in a rabbit long-gap sciatic nerve transection model. *Biomaterials*, 32(15), 3764–3775.
 109. Meek, M. F., & Den Dunnen, W. F. A. (2009). Porosity of the wall of a Neurolac?? nerve conduit hampers nerve regeneration. *Microsurgery*, 29(6), 473–478.
 110. Varejão, A. S. P., Cabrita, A. M., Geuna, S., Patrício, J. a, Azevedo, H. R., Ferreira, A. J., & Meek, M. F. (2003). Functional assessment of sciatic nerve recovery: biodegradable poly (DLA-epsilon-CL) nerve guide filled with fresh skeletal muscle. *Microsurgery*, 23(4), 346–53.