



FCTUC FACULDADE DE CIÊNCIAS
E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

DEPARTAMENTO DE
ENGENHARIA MECÂNICA

Desenvolvimento de materiais de base dextrano para regeneração de nervo

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de Mestre em Engenharia de Materiais na Especialidade de Biomateriais

Autor

Dina Alexandra Ferreira de Sousa

Orientador

Doutor Jorge Fernando Jordão Coelho

Júri

Presidente

Professora Doutora Maria Teresa Freire Vieira
Professora da Universidade de Coimbra

Vogais

Professora Doutora Ana Paula da Fonseca Piedade
Professora da Universidade de Coimbra

Professor Doutor Arménio Coimbra Serra
Professor da Universidade de Coimbra

Orientadores

Professor Doutor Jorge Fernando Jordão Coelho
Professor da Universidade de Coimbra

Doutora Ana Clotilde Amaral Loureiro da Fonseca
Investigadora de Pós-Doutoramento da Universidade de Coimbra

Coimbra, Setembro, 2016

Agradecimentos

Em primeiro lugar quero agradecer à Doutora Ana Clotilde Amaral Loureiro da Fonseca e ao Professor Doutor Jorge Fernando Jordão Coelho, por toda a confiança, disponibilidade, apoio e orientação que sempre me prestaram ao longo deste trabalho.

À Mestre Engenheira Catarina Pinho que também contribui para a realização deste projeto, e me transmitiu os seus conhecimentos, o meu muito obrigada.

Quero ainda agradecer ao Grupo de Polímeros por toda a ajuda e disponibilidade que demonstraram ao longo destes meses.

Ao Tiago, por estar sempre presente e me ter acompanhado durante este percurso.

E por último, aos meus pais que me apoiaram e me proporcionaram condições para a minha formação académica.

Resumo

Este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de materiais de base dextrano para uma futura aplicação na regeneração do nervo. O trabalho realizado compreendeu três passos: (i) modificação do dextrano com ligações duplas; (ii) preparação de poliésteres-polióis de base ácido láctico (LA) e sua modificação com ligações duplas para obtenção dos reticulantes de base LA; e (iii) preparação das membranas por fotopolimerização.

O dextrano foi modificado por reação dos seus grupos $-OH$ com o metacrilato de 2-isocianoetilo (IEMA) e com o anidrido metacrílico (AM). A estrutura química do dextrano modificado foi avaliada por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier com reflectância total atenuada (FTIR-ATR) e espectroscopia de ressonância magnética nuclear de próton (1H RMN) e os resultados indicam que os materiais foram sintetizados com sucesso. A estabilidade térmica dos dextransos modificados foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA), tendo-se verificado que estes são estáveis termicamente até cerca de 280 °C. A análise de calorimetria diferencial de varrimento (DSC) revelou que os dextransos modificados são amorfos, tendo sido possível detectar a temperatura de transição vítrea ($T_g = 217$ °C) para o dextrano modificado com anidrido metacrílico (Dex-AM).

Os reticulantes de base LA foram preparados através da reação das diferentes unidades centrais dos poliésteres-polióis com o AM. As diferentes unidades centrais foram escolhidas de modo a conferir aos materiais diferentes propriedades. A estrutura química dos reticulantes de base LA foi avaliada por FTIR e 1H RMN, tendo-se verificado que estes foram obtidos com sucesso. A TGA relevou que estes materiais são estáveis até temperaturas próximas dos 195 °C. A DSC mostrou que todos os materiais são amorfos e com a T_g mostraram ser dependentes do tipo de unidade central.

As membranas de base dextrano foram obtidas por fotopolimerização dos dextransos modificados na presença dos diferentes reticulantes, usando como fotoiniciador o Irgacure2959[®]. Como referências, foram preparadas duas membranas contendo somente Dex-IEMA ou Dex-AM. As membranas obtidas foram analisadas por FTIR, tendo-se

verificado a ausência das bandas correspondentes à ligação dupla, o que indica que a fotopolimerização foi levada a cabo com sucesso. O FTIR revelou ainda que as membranas de base Dex-AM apresentavam uma banda alargada na zona dos $-OH$, o que indica a presença de água na sua constituição. Esta água mostrou ter um efeito plastificante nas membranas, uma vez que estas apresentavam T_g muito baixas (entre os 5 °C e os 36 °C) quando comparadas com as membranas de Dex-IEMA, que não apresentava esta banda no seu espectro de FTIR. A capacidade de inchaço das membranas foi avaliada em água destilada, tendo-se verificado que, de um modo geral, as membranas de Dex-IEMA tinham capacidades de inchaço inferiores às de Dex-AM. Verificou-se ainda que a introdução dos reticulantes de base LA diminui a capacidade de inchaço das membranas, provavelmente devido à hidrofobicidade dos mesmos. Foi ainda avaliada a perda de massa dos materiais em tampão fosfato (PBS, pH=7,4), a 37 ° C, tendo-se observado uma maior perda de massa para as membranas com Dex-AM. A inclusão dos reticulantes de base LA, na formulação das membranas, levou a um aumento da perda de massa das mesmas. Estes resultados indicam que as propriedades das membranas podem ser facilmente ajustadas quer pelo tipo de dextrano modificado usado, quer pelo tipo de reticulante.

Palavras-chave: Regeneração do nervo periférico, dextrano, metacrilato de 2- isocianoetilo, anidrido metacrílico, ácido láctico, capacidade de inchaço e degradação hidrolítica.

Abstract

The main goal of this work was the development of dextran based materials for application in nerve regeneration. The work comprised three steps: (i) modification of the dextran with double bonds; (ii) preparation of lactic acid (LA) based polyester polyols and their modification with double bonds to obtain the LA-based crosslinkers; and (iii) preparation of the membranes by photopolymerization.

The dextran was modified by reacting the –OH groups with 2-isocyanatoethyl methacrylate (IEMA) and methacrylic anhydride (AM). The chemical structure of the modified dextran was evaluated by attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H NMR) and the results indicate that the materials were successfully synthesized. Thermal stability of the modified dextran was evaluated by thermogravimetric analysis (TGA), and it was found that they are thermally stable until 280 °C. The differential scanning calorimetry (DSC) analysis showed that both the modified dextran are amorphous and it was possible to detect the glass transition temperature ($T_g = 217$ °C) for the dextran modified with methacrylic anhydride (Dex-AM).

The LA-based crosslinkers were prepared by reacting different LA based polyester polyols with the AM. Different central units were chosen in order to give different properties to the material. The chemical structure of LA-based crosslinkers was evaluated by FTIR and ^1H NMR, and it was found that they were successfully obtained. The TGA revealed that these materials are stable around 195 °C. The DSC showed that all materials are amorphous and the T_g is dependent on the type of central unit.

The dextran based membranes were obtained by photopolymerization of modified dextrans in the presence of the different LA crosslinkers, using Irgacure2959[®] as photoinitiator. As references, two membranes were prepared containing only Dex-IEMA or Dex-AM. The membranes obtained were analyzed by ATR-FTIR, verifying the absence of bands corresponding to double bond, which indicates that photopolymerization was carried out successfully. The ATR-FTIR spectrum of the Dex-AM based membranes also revealed

a broad band in the region of the –OH groups, indicating the presence of water. The water had a plasticizing effect on the membranes, since they showed a low T_g (between 5 °C and 36 °C) when compared with the Dex-IEMA membrane, which did not presented this band in its FTIR spectrum. The swelling capacity of the membranes was evaluated in distilled water, and it was found that, in general, the Dex-IEMA membranes had less swelling capacity than the Dex-AM. It was also found that the introduction of LA-based crosslinkers decreases the swelling capacity of the membranes, probably due to their hydrophobic nature. It was also evaluated the weight loss of materials in phosphate buffered saline solution (PBS, pH = 7.4), at 37 °C, and it was observed a higher weight loss for membranes with Dex-AM. The inclusion of LA-based crosslinkers, in the formulation of the membranes, led to an increase in mass loss. These results indicate that the properties of the membranes can be easily adjusted by either type of modified dextran used or the type of crosslinker.

Keywords Peripheral nerve regeneration, dextran, 2-isocyanatoethyl methacrylate, methacrylic anhydride, lactic acid, swelling capacity, hydrolytic degradation.

Índice

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
Simbologia e Siglas	xiv
Simbologia.....	xiv
Siglas	xiv
1. Introdução	1
1.1. Sistema Nervoso	1
1.1.1. Sistema Nervoso Periférico	1
1.1.2. Nervo	2
1.1.3. Neurónio	3
1.2. Lesão no nervo periférico	4
1.2.1. Classificação de lesões no nervo periférico.....	4
1.2.2. Degeneração Walleriana e regeneração do nervo periférico	5
1.3. Estratégias para reparação do nervo periférico	6
1.3.1. Autoenxerto	7
1.3.2. Aloenxerto	7
1.3.3. Tubos guia	7
2. Parte experimental	22
2.1. Materiais	22
2.2. Síntese.....	22
2.2.1. Modificação de Dextrano com Metacrilato de 2- Isocianoetilo (IEMA)	22
2.2.2. Modificação de Dextrano com Anidrido Metacrílico.....	23
2.2.3. Síntese do poliéster-póliol	24
2.2.4. Modificação do poliéster-póliol com anidrido metacrílico	27
2.3. Preparação de membranas	29
2.4. Caracterização	29
2.4.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	29
2.4.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR).....	30
2.4.3. Análise Termogravimétrica (TGA)	30
2.4.4. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)	30
2.4.5. Capacidade de inchaço	30
2.4.6. Testes de degradação hidrolítica <i>in vitro</i>	31
3. Resultados e discussão	32
3.1. Preparação e caracterização do dextrano modificado.....	32
3.1.1. Caracterização química do dextrano e dextrano modificado.....	32
3.1.2. Propriedades térmicas do dextrano e dextrano modificado.....	35
3.2. Preparação e caracterização dos reticulantes de base LA.....	38
3.2.1 Caracterização química dos poliésteres-polióis de base LA e reticulantes de base LA.....	38
3.2.2 Propriedades térmicas dos reticulantes de base LA.....	41

3.3. Preparação e caracterização das membranas de base dextrano	44
3.3.1. Caracterização química das membranas	44
3.3.2. Propriedades térmicas das membranas.....	45
3.4. Estudo da capacidade de inchaço da membrana.....	50
3.5. Degradação hidrolítica das membranas <i>in vitro</i>	53
4. Conclusões e trabalho futuro.....	57
5. Referências Bibliográficas	59
APÊNDICE A	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Constituição do Sistema Nervoso Periférico.	2
Figura 2: Constituição do nervo [6].....	3
Figura 3: Estrutura do neurónio [7].....	3
Figura 4: Representação esquemática da classificação de lesão do nervo [14].....	5
Figura 5: Estrutura do colagénio.	10
Figura 6: Estrutura do quitosano.	11
Figura 7: Estrutura do alginato.	12
Figura 8: Estruturas do PGA, PLA e PLGA.....	15
Figura 9: Estrutura do P(DLLA-co-CL).....	15
Figura 10: Estrutura geral dos poli (fosfoésteres).	16
Figura 11: Estrutura do poliuretano.....	16
Figura 12: Estrutura do dextrano.	21
Figura 13: Representação esquemática da síntese de modificação de Dextrano com Metacrilato de 2- Isocianoetilo (IEMA).....	23
Figura 14: Representação esquemática da síntese de modificação de Dextrano com Anidrido Metacrílico.	24
Figura 15: Representação esquemática da síntese de poliéster-poliol.....	26
Figura 16: Representação esquemática da modificação poliéster-poliol com anidrido metacrílico.	28
Figura 17: Espectro de FTIR do dextrano, Dex-IEMA e Dex-AM.....	33
Figura 18: Espectro de ¹ H RMN em DMSO-d ₆ do Dex e do Dex-IEMA.....	34
Figura 19: Espectro de ¹ H RMN em D ₂ O do Dex e do Dex-AM.....	34
Figura 20: Curvas termogravimétricas (A) e curvas da derivada da perda de massa (B) obtidos para o dextrano, Dex-IEMA e Dex-AM.....	36
Figura 21: Curvas de fluxo de calor do dextrano, Dex-IEMA e Dex-AM.....	37
Figura 22: Espectro de FTIR do PLA-PEG, PLA-PCL e PLA-PNT.	38
Figura 23: Espectro de ¹ H RMN em DMSO-d ₆ do PLA-PEG, PLA-PCL e PLA-PNT.	39
Figura 24: Espectro de FTIR do PLA-PEG-AM, PLA-PCL-AM e PLA-PNT-AM.	40
Figura 25: Espectro de ¹ H RMN em DMSO-d ₆ do PLA-PEG-AM, PLA-PCL-AM e PLA-PNT-AM.....	41
Figura 26: Traços termogravimétricos (A) e curvas da derivada da perda de massa (B) obtidos para o PLA-PEG-AM, PLA-PCL-AM e PLA-PNT-AM.	42

Figura 27: Curvas de fluxo de calor do PLA-PEG-AM, PLA-PCL-AM e PLA-PNT-AM.	43
Figura 28: Espectro de FTIR do Dex-IEMA e da Mem A (A) e do Dex-AM e da Mem H (B).	45
Figura 29: Traços termogravimétricos (A) e curvas da derivada da perda de massa (B) obtidos para as membranas de base Dex-IEMA (Mem A, Mem B, Mem C, Mem D, Mem E, Mem F e Mem G).	46
Figura 30: Traços termogravimétricos (A) e curvas da derivada da perda de massa (B) obtidos para as membranas de base Dex-AM (Mem H, Mem I, Mem J, Mem K, Mem L, Mem M e Mem N).	47
Figura 31: Curvas de fluxo de calor para as membranas de base Dex-IEMA (Mem A, Mem B, Mem C, Mem D, Mem E, Mem F e Mem G) (A) e de base Dex-AM (Mem H, Mem I, Mem J, Mem K, Mem L, Mem M e Mem N) (B).	49
Figura 32: Capacidade de inchaço das membranas constituídas por Dex-IEMA (Mem A, Mem B, Mem C, Mem D, Mem E, Mem F e Mem G) (A) e das membranas constituídas por Dex-AM (Mem H, Mem I, Mem J, Mem K, Mem L, Mem M e Mem N) (B), a 37 °C, durante 48h.	51
Figura 33: Testes de degradação das membranas constituídas por Dex-IEMA (Mem A, Mem B, Mem C, Mem D, Mem E, Mem F e Mem G) (A) e das membranas constituídas por Dex-AM (Mem H, Mem I, Mem J, Mem K, Mem L, Mem M e Mem N) (B), a 37 °C, durante 30 dias.	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Constituição anatômica do nervo [4], [5].	2
Tabela 2: Classificação da lesão do nervo periférico [5], [8].	5
Tabela 3: Tubos guia à base de materiais poliméricos naturais.	12
Tabela 4: Tubos guia à base de materiais poliméricos sintéticos.	17
Tabela 5: Tubos guia à base de materiais poliméricos naturais e poliméricos sintéticos.	19
Tabela 6: Tubos guia aprovados pela FDA [64].	20
Tabela 7: Quantidades para as sínteses de poliéster-póliol.	25
Tabela 8: Quantidades para modificações de poliéster-póliol com anidrido metacrílico.	27
Tabela 9: Formulações para a preparação de membranas.	29
Tabela 10: Temperaturas de interesse retiradas das curvas termogravimétricas: $T_{5\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 5% da massa inicial), $T_{10\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 10% da massa inicial), T_{p1} (temperatura do primeiro pico) e T_{p2} (temperatura do segundo pico).	37
Tabela 11: Temperaturas de interesse retiradas das curvas termogravimétricas: $T_{5\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 5% da massa inicial), $T_{10\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 10% da massa inicial), T_{p1} (temperatura do primeiro pico), T_{p2} (temperatura do segundo pico) e T_{p3} (temperatura do terceiro pico).	43
Tabela 12: Temperaturas de interesse retiradas das curvas termogravimétricas: $T_{5\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 5% da massa inicial), $T_{10\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 10% da massa inicial), T_{p1} (temperatura do primeiro pico) e T_{p2} (temperatura do segundo pico).	48
Tabela 13: T_g das membranas obtidas por DSC.	49
Tabela 14: Capacidade de inchaço máxima das membranas constituídas por Dex-IEMA e Dex-AM.	52
Tabela 15: Perda de massa após 30 dias das membranas constituídas por Dex-IEMA e Dex-AM.	55

SIMBOLOGIA E SIGLAS

Simbologia

T_g – Temperatura de transição vítrea

$T_{5\%}$ – Temperatura à qual o polímero perde 5% da massa inicial

$T_{10\%}$ – Temperatura à qual o polímero perde 10% da massa inicial

T_{p1} – Temperatura do primeiro pico

T_{p2} – Temperatura do segundo pico

T_{p3} – Temperatura do terceiro pico

W_f – Peso final de cada amostra

W_m – Peso molhado de cada amostra

W_s – Peso seco de cada amostra

W_0 – Peso inicial de cada amostra

Siglas

AM – Anidrido metacrílico

Dex – Dextrano

Dex-IEMA – Dextrano modificado com metacrilato de 2-isocianoetilo

Dex-AM – Dextrano modificado com anidrido metacrílico

DMAP – 4-Dimetilaminopiridina

DMF – *N, N'*-dimetilformamida

DMSO – Dimetilsulfóxido

DSC – Calorimetria Diferencial de Varrimento

D₂O – Óxido de deutério

Et₃N – Trietilamina

FDA – *Food and Drug Administration*

FTIR-ATR – Espectroscopia de Infravermelhos com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada

GDNF – Fatores neurotróficos derivados de células gliais

IEMA – Metacrilato de 2-isocianoetilo

LiCl – Cloreto de lítio

L-LA – Ácido láctico

MsC – Células estaminais mesenquimais

NGF – Fatores de crescimento do nervo

PBS – *Phosphate buffered saline*

PCL – Poli(ϵ -caprolactona)

PDLA – Poli(D-ácido láctico)

PDLLA – Poli(DL-ácido láctico)

P(DLLA-co-CL) – Poli(DL-ácido láctico-co- ϵ -caprolactona)

PEG – Poli(etileno glicol)

PEG-DA – Poli(etileno glicol) diacrilato

PGA – Poli(ácido glicólico)

PLA – Poli(ácido láctico)

PLA-PEG-AM – Poliéster-póliol de base ácido láctico e poli(etileno glicol) modificado com anidrido metacrílico

PLA-PCL-AM – Poliéster-póliol de base ácido láctico e poli (caprolactona) modificado com anidrido metacrílico

PLA-PNT-AM – Poliéster-póliol de base ácido láctico e pentaeritritol modificado com anidrido metacrílico

PLGA – Poli(ácido láctico-co-glicólico)

PLLA – Poli(L-ácido láctico)

PNT – Pentaeritritol

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

TGA – Análise Termogravimétrica

THF – Tetrahydrofurano

UV – Radiação ultravioleta

1. INTRODUÇÃO

1.1. Sistema Nervoso

O sistema nervoso controla várias atividades do corpo através da contração de músculos, secreção de glândulas, entre outros. Desta forma, recolhe informações que resultam de estímulos, analisa-as e inicia uma resposta apropriada que será enviada às diferentes partes do corpo.

As suas duas subdivisões anatómicas são o Sistema Nervoso Central (SNC) e o Sistema Nervoso Periférico (SNP). O primeiro é constituído pelo cérebro e pela medula espinal que estão protegidos pelo crânio e pela coluna vertebral, respetivamente. O segundo corresponde a toda a restante rede nervosa presente no corpo. Especial ênfase será dada a esta subdivisão, visto tratar-se do objeto de estudo deste trabalho [1].

1.1.1. Sistema Nervoso Periférico

O sistema nervoso periférico apresenta duas divisões baseadas nas suas funções: sensorial ou aferente e motor ou eferente (Figura 1).

A divisão sensorial transmite sinais de recetores sensoriais para o SNC, informando-o dos estímulos de modo a que este possa elaborar uma resposta adequada [1], [2].

A divisão motora transmite a resposta ao estímulo do SNC para as glândulas e músculos. Esta divisão subdivide-se ainda em mais dois sectores: somático e autónomo. A divisão somática controla os movimentos voluntários dos músculos, enquanto que a divisão autónoma se refere às respostas involuntárias dadas pelo SNC. A última divisão ainda se divide em sistema nervoso simpático, o qual adapta o corpo para uma determinada ação inesperada, e sistema nervoso parassimpático, que atua após uma resposta involuntária, de forma a que o corpo volte ao estado inicial [1], [3].

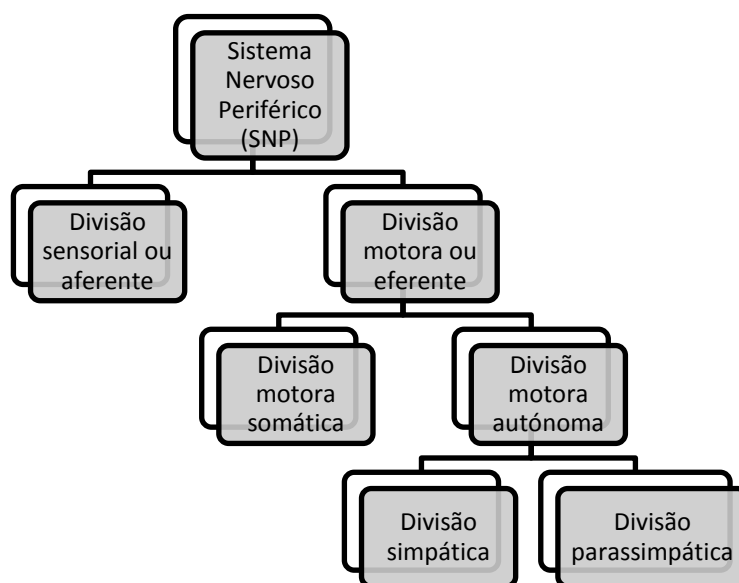


Figura 1: Constituição do Sistema Nervoso Periférico.

1.1.2. Nervo

O sistema nervoso periférico é formado por uma rede nervosa constituída por nervos [1]. Anatomicamente, o nervo é composto pelo endoneuro, perineuro e epineuro, que apresentam uma forma tubular de tecido conjuntivo (Figura 2). A Tabela 1 apresenta estas divisões com a respetiva função e constituição de cada uma.

Tabela 1: Constituição anatómica do nervo [4], [5].

	Função	Constituição
Endoneuro	<ul style="list-style-type: none"> • Revestir a fibra nervosa; • Proteger o axónio; 	<ul style="list-style-type: none"> • Colagénio do tipo I e II, fibroblastos, alguns macrófagos, mastócitos e fluido endoneural;
Perineuro	<ul style="list-style-type: none"> • Revestir um feixe de fibras nervosas, também designado por fascículos; • Nutrir e proteger os fascículos e contribuir para a resistência à tração do nervo; 	<ul style="list-style-type: none"> • Colagénio do tipo I e II e fibras elásticas;
Epineuro	<ul style="list-style-type: none"> • Revestir todos os feixes nervosos. 	<ul style="list-style-type: none"> • Colagénio do tipo I e II, fibras elásticas, fibroblastos e mastócitos.

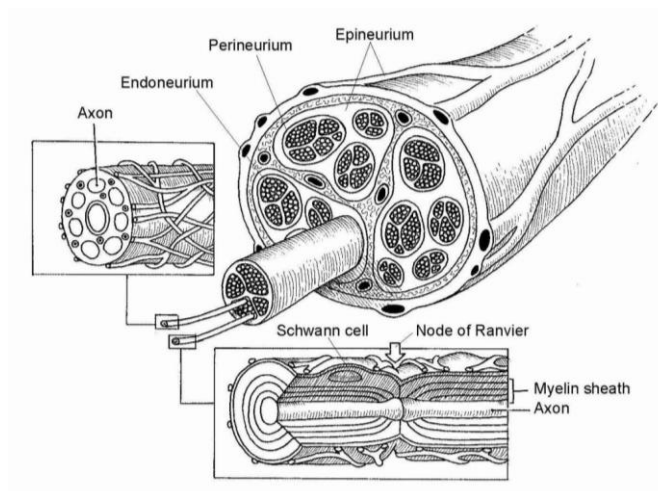


Figura 2: Constituição do nervo [6].

1.1.3. Neurónio

A unidade básica do sistema nervoso é a célula nervosa ou neurónio. Os neurónios são células especializadas e polarizadas que transmitem e recebem sinais elétricos [1].

O neurónio é constituído por três regiões distintas com diferentes funções, a saber: corpo celular, axónio e dendrites (Figura 3).

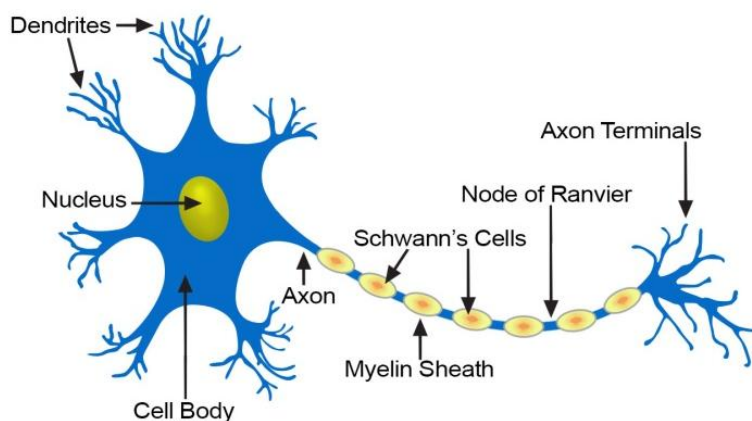


Figura 3: Estrutura do neurónio [7].

De modo a proteger a estrutura dos axónios, as células Schwann envolvem estas fibras nervosas. Quando várias camadas de células estão depositadas sobre o axónio forma-se a bainha de mielina. O comprimento do axónio abrangido por uma única célula

Schwann é designado por internódulo e, o local de contacto entre dois internódulos, é chamado de nódulo de *Ranvier* [4], [8].

Na arborização do axónio, isto é, na sua terminação, estão presentes botões terminais ou sinápticos que contêm pequenas vesículas, no seu interior. Estas vesículas, por sua vez, contêm neurotransmissores cuja função é propagar um sinal elétrico para outro neurónio. A transmissão do sinal elétrico entre a terminação do axónio e as dendrites do outro neurónio é designado por sinapse [9].

Existem três tipos de neurónios: os sensoriais ou aferentes que detetam estímulos e transmitem-nos para o SNC; os motores ou eferentes que enviam sinais do SNC para as células musculares e os autónomos ou interneurónios que recebem sinais dos neurónios sensoriais, processam-nos e enviam resposta para os neurónios motores [1], [4].

1.2. Lesão no nervo periférico

Após lesão, a capacidade regenerativa difere entre as duas divisões do sistema nervoso. Enquanto o SNC não tem capacidade regenerativa, sendo a lesão irreversível, o SNP consegue autonomamente iniciar o processo regenerativo. Consoante o tamanho e a gravidade da lesão, a recuperação funcional do nervo lesionado pode ser alcançada ou não [10], [11].

A lesão no nervo periférico afeta mais de 500.000 pacientes por ano, a nível mundial [11]. Este tipo de lesão pode ser causado por diversas situações, tais como: acidentes rodoviários, atividades desportivas ou efeitos secundários resultantes de cirurgias em que pode ocorrer compressão, tração ou laceração do nervo [5], [12].

Como consequência de lesão do nervo periférico, pode ocorrer perda total ou parcial das funções motoras ou sensoriais sendo que a regeneração e a recuperação das mesmas, estão condicionadas pelo tamanho da lesão, idade do paciente e extensão da lesão [13].

1.2.1. Classificação de lesões no nervo periférico

Atualmente existem dois modelos de classificação da lesão do nervo periférico: modelo de Seddon e modelo de Sunderland. A Tabela 2 apresenta as divisões destas classificações, bem como, as características associadas a cada divisão [5], [8]. Na Figura 4 encontram-se representadas, de forma esquemática, estas classificações [14].

Tabela 2: Classificação da lesão do nervo periférico [5], [8].

Seddon	Sunderland	Lesão
Neuropraxia	Primeiro grau	<ul style="list-style-type: none"> Bainha de mielina danificada; Apesar do axônio não sofrer descontinuidade, não há condução do impulso nervoso;
Axonotmese	Segundo grau	<ul style="list-style-type: none"> Perda da continuidade do axônio;
	Terceiro grau	<ul style="list-style-type: none"> Perda da continuidade do axônio e do endoneuro;
	Quarto grau	<ul style="list-style-type: none"> Perda da continuidade do axônio, do endoneuro e do perineuro;
Neurotmese	Quinto grau	<ul style="list-style-type: none"> Lesão total do nervo, não havendo continuidade anatômica.

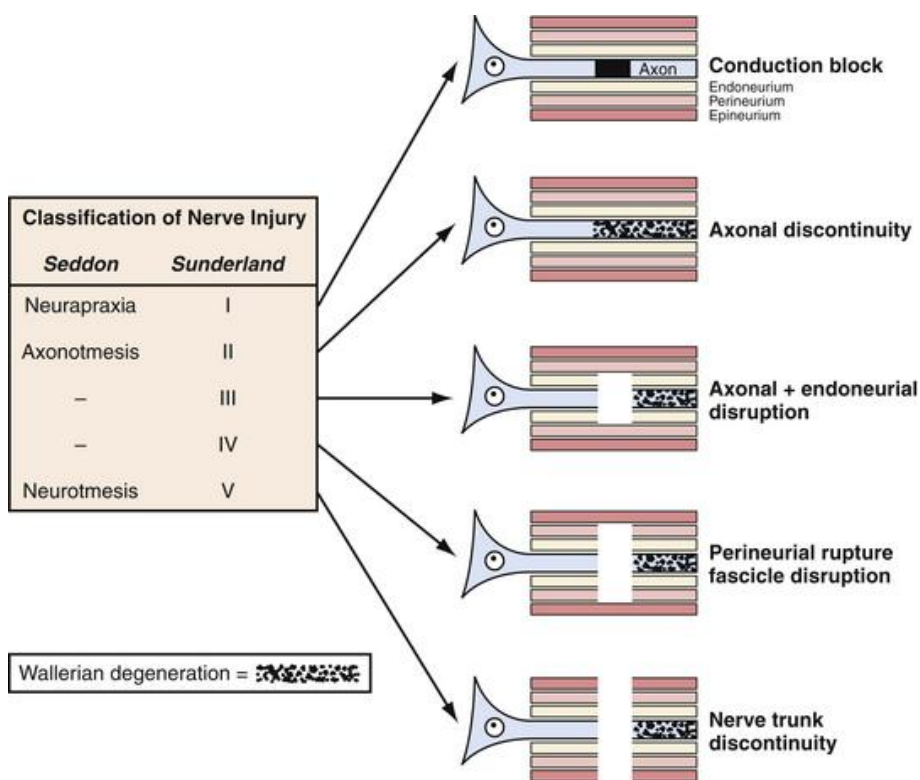


Figura 4: Representação esquemática da classificação de lesão do nervo [14].

1.2.2. Degeneração Walleriana e regeneração do nervo periférico

Após a lesão do nervo periférico, é iniciada uma sequência de eventos que são designados por degeneração Walleriana [6].

Em primeiro lugar, a bainha de mielina é degradada e os neurofilamentos, bem como os microtúbulos, são fragmentados, contribuindo para a desintegração do axónio. Os seus detritos são posteriormente fagocitados por macrófagos que são recrutados para o local da lesão [15], [16].

Para criar um ambiente favorável ao crescimento do axónio, é necessária uma alteração do metabolismo das proteínas presentes, de modo a que estas incrementem a produção de materiais que favoreçam a regeneração nervosa. Um dos sistemas biológicos que começa imediatamente a ser produzido são as células Schwann [6]. Estas migram para o local da lesão, onde se irão depositar sobre cabos de fibrina que, entretanto, se foram formando entre o segmento distal e o segmento proximal do nervo. Ao depositarem-se, as células Schwann vão alinhar-se ao longo destes cabos formando bandas designadas por bandas de Büngner. Estas estruturas servirão de guias que orientam os novos axónios, que vão aparecendo e crescendo sobre elas, de modo a que consigam fazer a ligação entre os dois segmentos do nervo [16]. Por último, as células Schwann envolvem o axónio regenerado formando a bainha de mielina que tem como função proteger o axónio [17].

O processo de crescimento dos novos axónios apresenta uma taxa de 2 a 5 mm por dia, ou seja, em lesões com maior gravidade, a duração prolonga-se ao longo de alguns meses, para a regeneração ficar completa [18].

1.3. Estratégias para reparação do nervo periférico

A reparação do nervo pode ser efetuada através de duas técnicas cirúrgicas, a epineural e a fascicular.

A técnica epineural consiste em suturas no epineuro enquanto que na técnica fascicular, as suturas são feitas no perineuro, de forma a reconstruir a continuidade dos fascículos. Estas técnicas são utilizadas quando a distância entre os segmentos é inferior a 5 mm [8], [19].

Quando o nervo lesionado não pode ser reconstruído por uma sutura, a reconstrução do nervo pode ser feita através de um enxerto de nervo, que pode ser autoenxerto ou aloenxerto, ou com a utilização de tubos guia [6].

1.3.1. Autoenxerto

A técnica para utilização de um autoenxerto consiste na recolha do comprimento necessário de um nervo saudável na própria pessoa, e suturá-lo ao nervo lesionado com suturas epineurais. Desta forma, este enxerto será conectado ao segmento distal e ao proximal [6].

A escolha do nervo a ser utilizado para enxerto depende do local da lesão. No entanto, o nervo que tem sido mais utilizado é o nervo sural, posicionado junto do tornozelo, devido à sua fácil extração.

Como desvantagens deste tipo de enxerto, são de salientar o número limitado de nervos que possam ser utilizados, o seu comprimento que nem sempre é o pretendido, a necessidade de serem efetuadas duas cirurgias e a taxa de recuperação da função motora ser inferior a 40%. Isto deve-se ao facto do nervo sural ser um nervo sensorial e não um nervo motor. Assim, visto que as características destes tipos de nervos são diferentes, a recuperação da função sensitiva é mais facilmente atingida comparativamente à função motora [12], [20].

1.3.2. Aloenxerto

Uma outra opção, é recolher o enxerto do nervo exato que é pretendido de um cadáver humano. A vantagem deste enxerto é o número ilimitado de nervos que estão disponíveis para utilização. Como desvantagem, existe a possibilidade de ocorrer rejeição imunológica ou transmissão de doenças e, para evitar que tal aconteça, é necessário efetuar imunossupressão, o que por vezes não é suficiente [6], [20].

1.3.3. Tubos guia

Devido às desvantagens do enxerto de nervo, novas abordagens para aumentar as taxas de recuperação têm sido pesquisadas. A utilização de tubos guia tem sido a que tem apresentado resultados mais promissores [12].

Os tubos guia são suturados aos dois segmentos do tecido nervoso danificado. O objetivo da sua utilização é simular a estrutura nervosa e orientar as fibras nervosas durante a regeneração do nervo, providenciando um ambiente favorável para que a regeneração seja mais rápida e eficaz [21].

Algumas das propriedades mais importantes neste tipo de dispositivos são a sua permeabilidade, biocompatibilidade e biodegradabilidade. A parede do tubo deve ser semipermeável para que ocorra difusão de nutrientes (e.g., glucose) e oxigênio, eliminação de produtos e difusão de fatores tróficos. Os poros da parede devem ser suficientemente pequenos de forma a evitar infiltração de fibroblastos que estão na origem do aparecimento de tecido fibroso (cicatrização), que não favorece a regeneração nervosa [12], [19]. A biocompatibilidade é um requisito essencial pois o tubo não deve desencadear uma resposta imunológica severa provocando inflamação e irritação de tecidos. Em termos de biodegradabilidade, o objetivo destes dispositivos é que após a regeneração estar finalizada, o tubo deve estar degradado e ser reabsorvido na sua totalidade. A velocidade de degradação deve estar de acordo com a regeneração axonal, de forma a não danificar e comprimir os axónios regenerados [12]. Não devem ainda ser tóxicos, antigénicos nem carcinogénicos [22].

O tubo deve ter um tamanho adequado para poder ser ajustado à área de secção transversal do segmento distal e proximal. Os tubos devem também apresentar resistência à compressão para suportar a pressão dos tecidos circundantes, como por exemplo, dos vasos sanguíneos, mas também devem ser flexíveis de forma a evitar danificá-los. A resistência à tracção é também uma propriedade bastante importante de modo a que sejam adaptáveis durante a intervenção cirúrgica [12], [22].

O tubo ideal deverá ainda ser transparente para facilitar a sutura, fácil de manusear e não perder as suas propriedades físicas ao ser esterilizado [10], [22]. Por forma a melhorar o desempenho dos tubos guia, algumas estratégias têm sido estudadas, nomeadamente a incorporação de células e fatores de crescimento ou neurotróficos, que contribuem significativamente para uma melhor regeneração do nervo [18].

As células mais utilizadas são as células estaminais mesenquimais (MsC) e as células Schwann. Estas células podem ser implantadas no tubo ou injetadas diretamente no mesmo [18]. As MsC são células estaminais multipotentes provenientes da medula óssea que têm a capacidade de se diferenciarem em células nervosas. As células Schwann proporcionam um substrato para a migração de axónios e promovem a formação de vasos sanguíneos. No local da lesão, produzem moléculas na matriz extracelular, por exemplo a laminina e o colagénio [22], [23] Estas células também produzem fatores neurotróficos, isto é, proteínas e peptídeos que são libertados durante a regeneração do nervo. Têm como

principais funções regular a sobrevivência, migração, proliferação e diferenciação de células nervosas e auxiliar na regeneração nervosa [18], [22]–[24].

Os fatores de crescimento podem ser adicionados quer diretamente, através de uma solução, ou por um sistema de libertação controlada, sendo que este último é o mais escolhido. A vantagem do sistema de libertação controlada face à utilização de uma solução, prende-se com o facto de que os fatores de crescimento são libertados durante um longo período de tempo e de forma controlada, algo que não acontece quando é utilizada uma solução [22]. Os fatores que mais se utilizam são os fatores de crescimento do nervo (NGF), os fatores neurotróficos derivados de células gliais (GDNF) e neurotrofina-3. Os NGF aumentam a sobrevivência neuronal e são eficazes na regeneração nervosa e na recuperação funcional do SNP [23], [24]. Os GDNF são segregados por células Schwann após a lesão do nervo, melhoram a sobrevivência dos nervos motores e sensoriais e a migração de células Schwann [23], [24]. A neurotrofina-3 auxilia na sobrevivência, crescimento e diferenciação de neurónios e estimula a formação de sinapses [18], [23]. No entanto, ainda não existe um consenso no que concerne as quantidades destes compostos que devem ser utilizados, bem como quais as combinações de células/fatores neurotróficos que obtêm melhores resultados.

1.3.3.1. Materiais utilizados em tubos guia

A escolha do material é um fator a ter em conta no desenvolvimento do tubo guia de nervo. O material pode ser biológico ou de base polimérica, com a utilização quer de polímeros naturais, quer de polímeros sintéticos.

a) *Materiais biológicos*

Dos materiais biológicos destacam-se os vasos sanguíneos, isto é, veias e artérias, o músculo e o tendão [25]–[27]. As artérias foram utilizadas, experimentalmente, como tubos guia. Quando a distância entre os segmentos lesionados é pequena, a utilização de veias também promove a regeneração nervosa. As vantagens deste material são a quantidade disponível de veias que podem ser usadas e o menor risco de transmissão de doenças comparativamente ao enxerto do nervo. A desvantagem é a possibilidade de colapsarem devido à baixa espessura das paredes [25]–[27].

O tecido muscular e o tendão são constituídos por componentes da matriz extracelular. Assim, além de proporcionarem um ambiente favorável à adesão celular,

também melhoram a regeneração nervosa. A vantagem destes materiais é o número ilimitado de locais, nos quais podem ser recolhidos. As desvantagens são a necessidade de se realizar uma segunda cirurgia e a possibilidade das fibras nervosas crescerem fora do tecido muscular, durante a regeneração nervosa [25], [27].

b) Materiais poliméricos naturais

Os materiais poliméricos naturais podem apresentar propriedades e características favoráveis a esta utilização, tais como, biocompatibilidade, degradação enzimática, baixos efeitos tóxicos e aumento da migração celular [21].

i. Colagénio

O colagénio é a proteína mais abundante no corpo humano, sendo o principal constituinte dos tecidos conjuntivos (pele, cartilagem, tendões). Esta proteína apresenta uma estrutura em tripla hélice, em que cada hélice é constituída maioritariamente por glicina, prolina e hidroxiprolina (Figura 5) [28].

As vantagens do colagénio são a capacidade de promover a proliferação celular e a cicatrização de tecido, apresenta boas propriedades biológicas para regeneração do nervo periférico e excelente biocompatibilidade [21], [23], [29]–[31]. Já existe um tubo comercialmente disponível, constituído por colagénio, denominado *NeuraGen*[®].

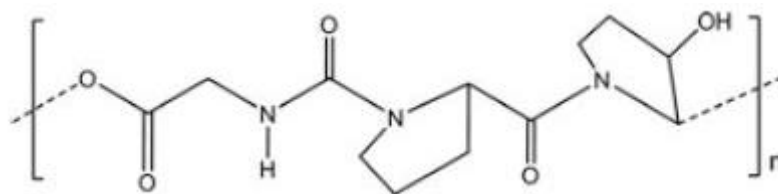


Figura 5: Estrutura do colagénio.

ii. Polissacarídeos

Os polissacarídeos também são usados como materiais para os tubos guia e, desta classe, destacam-se o quitosano e o alginato.

O quitosano é um polissacarídeo obtido pela *N*-desacetilação alcalina da quitina, um polímero natural comumente encontrado nas cascas dos crustáceos. Este polissacarídeo é constituído por unidades de $\beta(1\rightarrow4)$ -2-amido-2-deoxi-D-glucano (D-

glucosamina) e $\beta(1\rightarrow4)$ -acetoamida-2-desoxi-D-glucano (N-acetilglucosamina) (Figura 6) [32], [33] e, a razão entre a quantidade destas duas unidades estruturais na cadeia do quitosano representa o grau de desacetilação. Tipicamente, o grau de desacetilação apresenta valores entre 70 a 90 %, sendo este parâmetro que controla não só a solubilidade do quitosano, mas também a sua hidrofobicidade e capacidade de interação com polianiões. O quitosano é insolúvel em água e em solventes orgânicos, sendo, no entanto, solúvel em soluções ligeiramente ácidas. A sua insolubilidade é devida à elevada cristalinidade, que decorre das ligações por pontes de hidrogénio estabelecidas entre os grupos amina primários [34]–[36]. Apesar disto, o quitosano é amplamente usado em aplicações relacionadas com a área biomédica, devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, atividade antitumoral e antibacteriana. Também é conhecido o efeito do quitosano em acelerar a cicatrização e o crescimento do nervo [21], [29], [31].

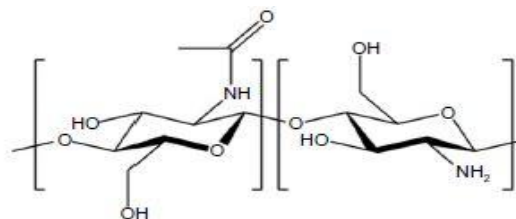


Figura 6: Estrutura do quitosano.

O alginato é obtido a partir de algas castanhas e bactérias. É um polissacarídeo linear constituído por unidades de ácido β -D-manurónico e ácido α -L-glucorónico, ligadas entre si por ligações glicosídicas do tipo $(1 \rightarrow 4)$ (Figura 7). Devido ao elevado teor de grupos ácidos ao longo da cadeia polimérica, o alginato tem a capacidade de formar géis quando em contacto com cátions divalentes (e.g., Ca^{2+}), à temperatura ambiente. A presença de grupos $-\text{COOH}$ ao longo da estrutura permite também a sua modificação química [28], [37], [38]. A biocompatibilidade, não-imunogenicidade e a biodegradabilidade são as principais características do alginato que fazem dele um material interessante para a área biomédica [21], [23].

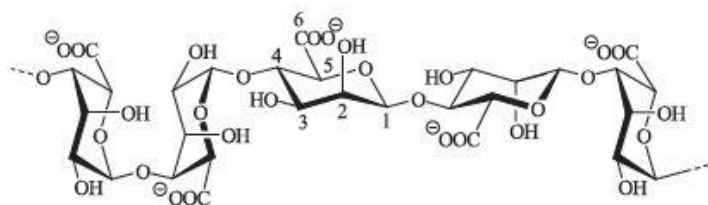


Figura 7: Estrutura do alginato.

Apesar de possuírem algumas vantagens interessantes no contexto das aplicações biomédicas, os polímeros naturais tendem a apresentar algumas desvantagens, nomeadamente fracas propriedades mecânicas, rápidas taxas de degradação e um elevado grau de entumescimento [21], [23], [29]. Para se contornarem estas desvantagens, normalmente procedem-se a modificações químicas nas estruturas dos polímeros naturais [39], [40], para que as propriedades se adequem à aplicação pretendida.

Na Tabela 3 são apresentados os principais estudos envolvendo a utilização de polímeros naturais na regeneração de nervo periférico.

Tabela 3: Tubos guia à base de materiais poliméricos naturais.

Material	Método de Produção	Principais Resultados	Referência
Colagénio	Reticulação dos filamentos de colagénio (grupos –NH ₂) com os grupos epóxido de um poli(etileno glicol) modificado, com posterior estabilização por radiação UV.	O tubo foi implantado numa lacuna de 30 mm do nervo ciático de ratos. Após 12 semanas, a média do diâmetro dos axónios regenerados foi de 2,7 µm.	[41]
Colagénio	Foi usado o tubo comercial Neuragen®.	Os tubos à base de colagénio mostram resultados promissores, quando a dimensão da lacuna não é superior a 18 mm.	[42]
Colagénio	Utilização de um processo de preparação de tubos patenteado pela Matricel GmbH.	O tubo à base de colagénio (Perimaix), foi aplicado em 20 mm do nervo ciático de ratos. Ao utilizar este tubo, a maioria dos axónios regeneraram os 20 mm, o que também se tinha verificado ao usar o autoenxerto.	[43]
Quitosano	<i>Electrospinning</i>	Foram implantados três tubos distintos: um constituído por nano/microfibras com um grau de desacetilação de 78% ou 93%, um	[44]

		<p>formado por duas camadas (a interna era composta por nano/microfibras com um grau de 78% ou 93% e, a externa, de 93%) e, o último, com um filme de grau 93%. Estes tubos foram implantados no nervo ciático de ratos, com um comprimento de 15 mm.</p> <p>Conclui-se que o tubo com propriedades mecânicas suficientes para ser utilizado como tubo guia e, com a permeabilidade adequada, foi o constituído por nano/microfibras com um grau de desacetilação de 93%.</p>	
Quitosano	Liofilização	<p>O gel liofilizado foi aplicado numa lacuna de 8 mm do nervo ciático de ratos. Após 4 dias, ocorreu regeneração de axónios. O diâmetro do nervo após 2 e 4 meses foi de 2,45 µm e 2,75 µm, respetivamente. Este pequeno aumento de diâmetro significa que o gel poderá vir a ser utilizado como enxerto para regeneração do nervo.</p>	[45]
Quitosano	Utilização de um processo de extrusão de quitina patenteado pela Medovent GmbH. Os tubos com diferentes graus de desacetilação (2%, 5%, 20%) foram obtidos por tratamento dos tubos de quitina por um processo de lavagem e hidrólise.	<p>Os tubos foram aplicados em lacunas de 10 mm, em ratos adultos. Os níveis e as taxas de degradação foram influenciados pelo grau de desacetilação; o tubo com 2% pouco se degradou e o de 20% apresentou uma rápida degradação. Assim, o tubo de 5% é o mais indicado para ser utilizado como tubo guia, além de que com este tubo, a regeneração do nervo é semelhante à observada com os autoenxertos.</p>	[46]
Quitosano	Membranas de dupla camada foram preparadas por evaporação do solvente. A camada interna foi formada por quitosano/DSP (fosfato de sódio dibásico) e foi colocada a secar ao ar. Após 48h, a camada externa formada por quitosano/GPTMS (γ -glicidoxipropiltrimetoxisil	<p>A dupla camada de membranas foi implantada numa lacuna de 10 mm do nervo mediano de ratos. Ao utilizar as duas camadas numa única membrana, a molhabilidade da superfície aumenta, o grau de inchaço torna-se intermédio ($293 \pm 67\%$ após 24h) e ocorre difusão de pequenas moléculas (do interior para o exterior da membrana), comparativamente à utilização de apenas uma camada. Após 12 semanas da implantação, os nervos já se encontram regenerados e</p>	[47]

	ano) foi aplicada diretamente em cima da camada interior, e também foi seca ao ar.	alinhados no interior do tubo.	
Alginato	Liofilização de um gel de alginato preparado por reticulação do polímero com etilenodiamina, mediada por uma carbodiimida.	O gel liofilizado foi implantado, sem suturas, numa lacuna de 7 mm do nervo ciático de ratos. Após 18 semanas, ocorreu regeneração dos nervos motores e sensoriais.	[48]

c) *Materiais poliméricos sintéticos*

Os materiais poliméricos sintéticos, face aos materiais naturais, apresentam vantagens para a sua utilização na produção de tubos. Das principais vantagens, destacam-se a possibilidade de modificar a estrutura química de acordo com o pretendido, e controlar as características dos materiais, como por exemplo, as propriedades térmicas, o desempenho mecânico, a molhabilidade e a degradação [23], [29].

Inicialmente, os tubos eram constituídos por polímeros sintéticos não biodegradáveis, como o caso do silicone. No entanto, estes tubos eram não permeáveis para certas moléculas, como por exemplo as proteínas. Para além disso, a seguir à regeneração do nervo, os materiais não degradáveis permanecem como um corpo estranho, causando a formação de tecido fibroso em excesso [21]. Deste modo, as atenções focaram-se na preparação de tubos utilizando polímeros sintéticos biodegradáveis. Estes polímeros degradam-se no corpo humano e podem incorporar fatores de crescimento, que se vão libertando à medida que ocorre a degradação do material. Dos polímeros sintéticos biodegradáveis mais utilizados destacam-se os poliésteres, os polifosfoésteres e os poliuretanos [29].

i. Poliésteres

Os poliésteres são sintetizados por policondensação e, em alguns casos, por polimerização de abertura de anel de monómeros cíclicos. Do grupo dos poliésteres alifáticos, os mais utilizados são o poli(ácido glicólico) (PGA), o poli(ácido láctico) (PLA), que pode existir na forma de três estereoisómeros, poli(L-ácido láctico) (PLLA), poli(D-ácido láctico) (PDLA) e poli(DL-ácido láctico) (PDLLA)), o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e a poli(ϵ -caprolactona) (PCL) (Figura 8). Estes materiais são

biocompatíveis, biodegradáveis e fáceis de processar. Para além disso, as suas propriedades (termomecânicas e de degradação) podem ser facilmente ajustadas por via da co-polimerização, mais concretamente, pela quantidade de cada co-monomero na estrutura final do poliéster. A sua principal desvantagem está no facto de ao degradarem *in vivo*, por cisão das ligações éster, libertarem sub-produtos ácidos que podem levar a que ocorra inflamação dos tecidos adjacentes [23], [49].

Comercialmente, estão já disponíveis dois tubos, o *Neurotube*[®] e *Neurolac*[®], feitos a partir do PGA e do copolímero poli (DL-ácido láctico-co-ε-caprolactona) (P(DLLA-co-CL)), respetivamente (Figura 8 e Figura 9) [21], [23].

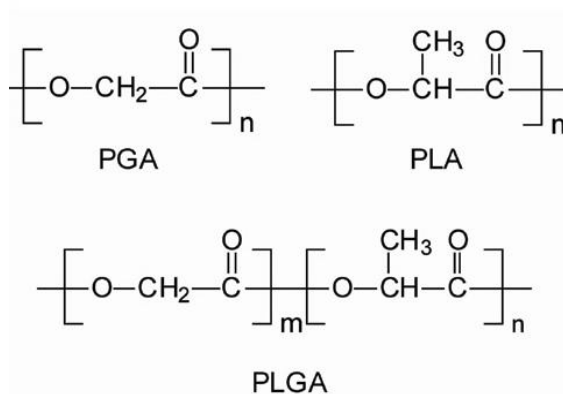


Figura 8: Estruturas do PGA, PLA e PLGA.

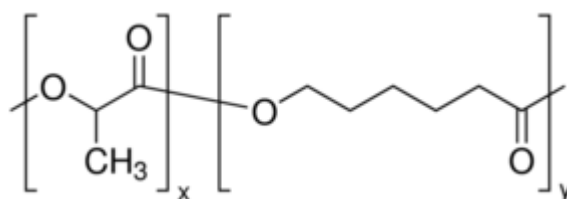


Figura 9: Estrutura do P(DLLA-co-CL).

ii. Poli(fosfoésteres)

Os poli(fosfoésteres), devido à presença da ligação fosfoéster na estrutura polimérica, são muito biocompatíveis. Estes polímeros podem ter diferentes grupos funcionais ligados ao átomo do fósforo, permitindo obter materiais com diferentes propriedades físico-químicas (Figura 10). Dependendo do grupo funcional ligado ao átomo de fósforo, estes polímeros podem ser divididos em poli(fosfitos) ($R_1=H$), poli(fosfonatos) (R_1 =grupo alquilo ou arilo) e poli(fosfatos) (R_1 =grupo oxiarilo ou oxialquilo).

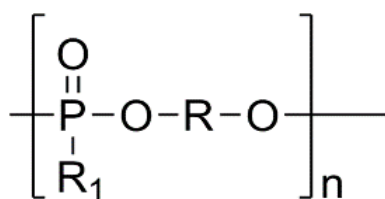


Figura 10: Estrutura geral dos poli (fosfoésteres).

No que diz respeito à síntese, é utilizada a policondensação, a polimerização por abertura do anel e a transesterificação. A biodegradabilidade é alcançada através de hidrólise, sob condições fisiológicas, não ocorrendo respostas inflamatórias exacerbadas aquando da degradação [49], [50].

Como desvantagens, este material degrada-se rapidamente e o coeficiente de intumescimento é elevado, o que leva a uma rápida deterioração das propriedades mecânicas [29].

iii. Poliuretanos

Os poliuretanos são polímeros formados por ligações uretana, que resultam da reação de diisocianatos com dióis ou polióis (Figura 11). A sua utilização em tubos guia é já reportada na literatura. Estes polímeros apresentam a rigidez necessária para resistir ao colapso após a implantação tendo, no entanto, uma flexibilidade que não é adequada para um tubo guia ideal. Para colmatar esta elevada flexibilidade, os poliuretanos têm de ser copolimerizados com um polímero (oligómero) mais rígido, de forma a manter as propriedades pretendidas [23], [29].

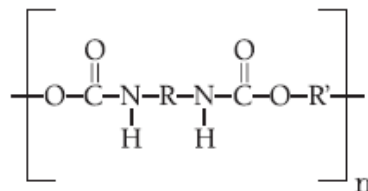


Figura 11: Estrutura do poliuretano.

A Tabela 4 apresenta os principais trabalhos em que foram usados polímeros sintéticos biodegradáveis na regeneração do nervo periférico.

Tabela 4: Tubos guia à base de materiais poliméricos sintéticos.

Material	Método de preparação	Principais Resultados	Referência
PGA	Foi usado o tubo comercial <i>Neurotube</i> [®] .	Foi implantado o <i>Neurotube</i> [®] , com um diâmetro interno de 2,3 mm para colmatar uma lacuna de 2,5 cm do nervo do polegar. Após 3 anos, a regeneração do nervo foi bem sucedida.	[51]
PGA	Foi usado o tubo comercial <i>Neurotube</i> [®] .	O tubo foi utilizado em 6 pacientes, ao longo de 7 anos, que apresentavam pequenas lesões do nervo motor. Os resultados foram promissores relativamente à função motora e sensorial.	[52]
PCL	<i>Electrospinning</i>	O tubo à base de PCL foi preenchido com uma matriz de hidrogel de fibrina. Este foi implantado em lacunas de 5 mm, em nervos ciáticos de ratos. Verificou-se que a parede do tubo apresenta elevada permeabilidade devido à estrutura ser porosa (constituída por micro e nanofibras), tendo-se observado que a regeneração do nervo, com este implante, ocorre de forma mais eficiente, comparativamente com um de silicone.	[53]
PLGA	Os tubos foram produzidos por <i>dip coating</i> a partir de soluções de PLGA em diclorometano.	Os tubos foram implantados em lacunas de 10 mm, em nervos ciáticos de ratos. Após 12 semanas, a regeneração do nervo foi observada.	[54]
PLA	Os tubos foram feitos a partir da ‘deposição’ de uma solução de PLA (10% m/v) em 1,4-dioxano, num molde de polidimetilsiloxano, seguida da imersão numa solução de etanol.	Os tubos foram aplicados em lacunas de 20 mm, em nervos ciáticos de ratos. Após 4 meses, os segmentos já se encontravam conectados pelo nervo regenerado e, após 18 meses, os tubos foram degradados completamente.	[55]

PLA	A solução polimérica (PLA em N-metil-2-pirrolidona (NMP)) foi pressurizada através da feira e, foi utilizada água microfiltrada para o interior (como líquido interno/diâmetro) e para o exterior do tubo.	A regeneração do nervo ciático de ratos é superior ao utilizar este tubo, comparativamente a tubos de PCL e autoenxertos. No que diz respeito à recuperação da função motora, os tubos de PCL têm melhores resultados.	[56]
Poli(fosfoésteres)	Os tubos foram produzidos por <i>dip coating</i> a partir de soluções de poli(fosfoésteres) em clorofórmio. Foram testados dois polímeros com pesos moleculares diferentes (14900 e 18900 g/mol).	Os tubos foram implantados em lacunas do nervo ciático de um rato, com uma dimensão de 10 mm. A regeneração foi avaliada após 3 meses e não ocorreu resposta inflamatória, apenas se formou uma cápsula fibrosa sob o tubo. Dos 12 ratos que foram implantados com o tubo de Mw=18900, 11 destes mostraram uma resposta positiva relativamente à recuperação. Os tubos com Mw=14900, apresentam uma taxa de degradação mais rápida, tornando o seu desempenho inferior.	[50]
Poliuretano à base de PCL e PEG com 1,6-hexametileno-diisocianato	Imersão de um mandril numa solução do polímero em tetrahidrofurano. Após sucessivas imersões, e quando o tubo tinha já uma espessura adequada, o mandril com o material foi colocado ao ar para se dar a cura do material.	O tubo foi aplicado numa lacuna do nervo femoral de um rato, com uma dimensão de 12 mm. Verificou-se que a taxa de degradação do polímero era mais compatível com a taxa de regeneração do nervo quando o polímero possuía PEG na sua estrutura.	[57]
Poliuretano à base de PCL e PEG e 1,6-hexametileno-diisocianato	Imersão de um mandril de aço inoxidável numa solução do polímero em DMF, com partículas de NaCl. Após 5 sucessivas imersões, o molde com o material foi colocado ao ar para se dar a cura do material.	Após 14 semanas do tubo ser implantado, o nervo regenerado apresentava uma dimensão de 10 mm. Esta regeneração deve-se à estrutura ser porosa com elevada permeabilidade, o que facilita a troca de células, nutrientes e remoção de resíduos metabólicos. A taxa de regeneração deste tubo,	[58]

		comparativamente a tubos à base de PCL, à base de silicone ou de autoenxertos é superior.	
Poliuretano à base de PCL e PEG	Imersão de um mandril de aço inoxidável numa solução do polímero em DMF, com partículas de NaCl. Após 5 sucessivas imersões, o molde com o material foi colocado ao ar para se dar a cura do material.	Após 32 semanas do tubo ser implantado, o nervo regenerado apresentava uma dimensão de 12 mm. A regeneração ocorre devido à estrutura ser porosa com elevada permeabilidade. A taxa de regeneração deste tubo, comparativamente a autoenxertos é superior.	[59]

Outra estratégia que tem vindo a ser usada inclui a utilização de misturas de polímeros (sintéticos e naturais, ou ambos sintéticos) na preparação de tubos guia para regeneração do nervo. Esta estratégia permite, de alguma forma, colmatar as desvantagens de um dos polímeros com as vantagens do outro. A Tabela 5 apresenta alguns dos estudos onde foram usadas misturas de polímeros.

Tabela 5: Tubos guia à base de materiais poliméricos naturais e poliméricos sintéticos.

Material	Método de Produção	Principais Resultados	Referência
Quitosano com PLA	Tubo obtido por pulverização de uma solução de quitosano/PLA sobre um mandril de vidro rotativo. A solidificação do tubo foi feita com recurso a raios infravermelhos.	Os tubos foram utilizados em ratos, em nervos ciáticos com dimensões de 10 mm. Para garantir boas propriedades mecânicas e uma boa biocompatibilidade, o rácio ideal de PLA e quitosano é de 1:5 (v/v). Ao aumentar a proporção de PLA, a intensidade da tração aumenta, no entanto, este aumento torna-se menos significativo a partir deste valor e, ao aumentar a proporção de PLA, o material torna-se mais biocompatível. Concluiu-se que os tubos eram biodegradáveis e permeáveis devido aos poros. Apresentam melhor desempenho relativamente aos tubos de silicone mas, comparando com autoenxertos, o seu desempenho é inferior, mais concretamente em área	[60]

		de secção transversal e número de axónios regenerados.	
Alginato com PGA	Tubo constituído por uma esponja de alginato obtida por liofilização, e que foi, posteriormente, revestida com uma rede de PGA.	A estrutura tubular foi testada numa lacuna de 50 mm, do nervo ciático de gatos. Após 8 meses, observou-se o crescimento de cabos de fibrina, apesar da bainha de mielina se tornar mais fina, comparativamente ao nervo saudável.	[61]
PLGA com um surfactante não iónico (pluronic F127)	Imersão e precipitação.	Este tubo foi implantado no nervo ciático de um rato, numa lacuna de 10 mm, e concluíram que a velocidade de regeneração é superior face à utilização de tubos apenas com PLGA.	[62]
Poliuretano/ PLLA	Tubos de dupla camada foram preparados por imersão. A camada interna era formada por um copolímero de L-LA com ϵ -caprolactona e a externa por uma mistura de poliuretano/ PLLA.	Foram implantados em lacunas com uma dimensão de 7 e 8 mm, do nervo ciático de um rato. Concluiu-se que a recuperação funcional com os tubos é superior face à utilização de autoenxertos e, assim, não se verificam cicatrizes no endoneuro, como acontecia com a aplicação destes últimos.	[63]

Apesar de muitos trabalhos serem ao nível académico, existem já alguns tubos guia de base polimérica para regeneração de nervo aprovados pela FDA (*Food and Drug Administration*) e disponíveis comercialmente. A Tabela 6 apresenta uma lista desses tubos e as suas principais características.

Tabela 6: Tubos guia aprovados pela FDA [64].

Ano	Designação	Material	Tempo de degradação	Diâmetro interno	Comprimento
1999/1995	Neurotube [®]	PGA	3 meses	2,3-8 mm	2-4 cm
2001	NeuraGen [®]	Colagénio do tipo I	36-48 meses	1,5-7 mm	2-3 cm
2001	Neuroflex [™]	Colagénio do tipo I	4-8 meses	2-6 mm	2,5 cm
2001	NeuroMatrix [™]	Colagénio do tipo I	4-8 meses	2-6 mm	2,5 cm
2003/2005	Neurolac [®]	(P(DLLA-co-CL))	16 meses	1,5-10 mm	3 cm

2004	NeuraWrap™	Colagénio do tipo I	36-48 meses	3-10 mm	2-4 cm
2006	NeuroMend™	Colagénio do tipo I	4-8 meses	4-12 mm	2,5-5 cm

Neste trabalho, o principal objetivo é o desenvolvimento de membranas de base dextrano como novos materiais para potencial aplicação na regeneração do nervo periférico. O dextrano é produzido por vários tipos de bactérias (*Leuconostoc* e *Streptococcus*), pertence à classe dos polissacarídeos e é constituído por unidades de α -D-glicose, ligadas através de ligações glicosídicas (1 \rightarrow 6), com ramificações que podem conter uma ou duas unidades de glicose (Figura 12). Este polímero é solúvel em água e pode apresentar diferentes pesos moleculares, distribuições de pesos moleculares e graus de ramificação dependendo da bactéria utilizada e das condições aplicadas para a produção deste [31], [65].

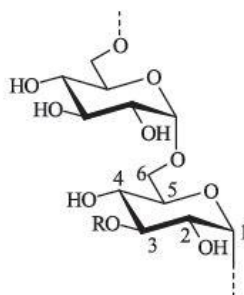


Figura 12: Estrutura do dextrano.

As principais vantagens são a elevada biocompatibilidade e a biodegradabilidade. Esta última ocorre de forma enzimática, através da ação da dextranase em órgãos do corpo humano, tais como fígado, baço, rins e cólon, e não liberta produtos tóxicos [66]. Estas características fazem dele um polímero bastante interessante para algumas aplicações biomédicas, não estando, no entanto, explorado para a aplicação em causa neste trabalho.

2. PARTE EXPERIMENTAL

2.1. Materiais

O dextrano (Dex, $M_r=70000$ g/mol), anidrido metacrílico (AM, 94%), pentaeritritol (PNT, 99%), octanotato de estanho, poli(etileno glicol) (PEG, $M_n=300$ g/mol), poli(etileno glicol) diacrilato (PEG-DA, $M_n=500$ g/mol), trietilamina (Et_3N) e pastilhas de tampão fosfato (PBS) foram adquiridos à Sigma-Aldrich. O metacrilato de 2-isocianoetilo (IEMA, >98%) e a 4-dimetilaminopiridina (DMAP, 99%) foram adquiridos à TCI Europe. O ácido láctico (LA, 90 %) foi adquirido à Acros Organics. A policaprolactona diol (PCL-diol, $M_n=550$ g/mol) foi gentilmente cedida pela Perstorp. O Irgacure 2959[®] foi gentilmente cedido pela Ciba Specialty Chemicals. A azida de sódio (NaN_3 , 99%) foi adquirida à Panreac. O dimetilsulfóxido (DMSO), *N,N'*-dimetilformamida (DMF), isopropanol, clorofórmio, tetrahidrofurano (THF) e hexano foram adquiridos à VWR. O DMSO- d_6 e a D_2O foram adquiridos à Eurisotop. Todos os reagentes foram usados como recebidos, com exceção da Et_3N que foi previamente seca e destilada.

2.2. Síntese

2.2.1. Modificação de Dextrano com Metacrilato de 2-Isocianoetilo (IEMA)

O objetivo desta síntese foi modificar a estrutura do dextrano, com ligações duplas. Para tal, fizeram-se reagir os grupos hidroxilo do dextrano com o grupo isocianato do IEMA.

Num balão de fundo redondo foram dissolvidas 2,5 g (0,0154 mol) de dextrano em 22,5 mL de DMSO, com agitação magnética, num banho a 60°C, sob atmosfera inerte de azoto. Após o dextrano estar dissolvido, foram adicionados 6,54 mL (0,0463 mol) de IEMA. A reação prosseguiu durante 24h. O produto de reação (Dex-IEMA) foi precipitado em água destilada e, de forma a eliminar os resíduos de DMSO existente, esta água foi renovada, diariamente, durante duas semanas.

Por fim, o dextrano modificado foi seco numa estufa, sob vácuo, a 40°C, durante uma semana (Adaptado de [67]). A reação é apresentada, esquematicamente, na Figura 13.

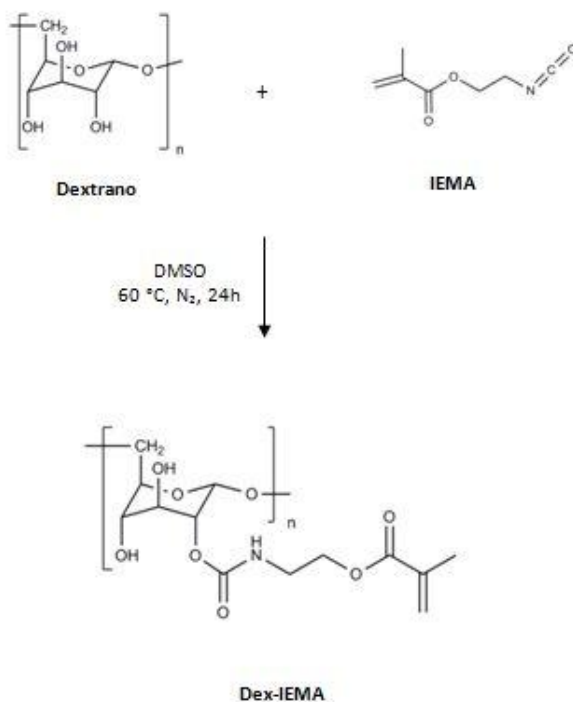


Figura 13: Representação esquemática da síntese de modificação de Dextrano com Metacrilato de 2-Isocianoetilo (IEMA).

2.2.2. Modificação de Dextrano com Anidrido Metacrílico

O objetivo desta síntese também foi modificar a estrutura do dextrano com as ligações duplas, por reação dos grupos hidroxilo do dextrano com o AM. Num balão de fundo redondo foram dissolvidas 0,9 g de cloreto de lítio (LiCl) em 10 mL de DMF, com agitação magnética, à temperatura ambiente. Após dissolução do LiCl, foram adicionadas 1,0044 g (0,0062 mol) de dextrano que ficaram a dissolver num banho, a 90°C, sob atmosfera inerte de azoto.

De seguida, a temperatura foi diminuída para 60°C e, uma vez atingida esta temperatura, foram adicionados 0,078 mL de Et₃N destilada. Decorridos 15 minutos, foram adicionados, lentamente, 2,77 mL (0,0186 mol) de AM. A reação prosseguiu durante 24 horas. O dextrano modificado (Dex-AM) foi precipitado em isopropanol, em banho de gelo e, posteriormente, filtrado. O produto de filtração foi ainda dialisado contra água destilada,

durante uma semana, sendo de seguida liofilizado (Adaptado de [68]). A reação é apresentada, esquematicamente, na Figura 14.

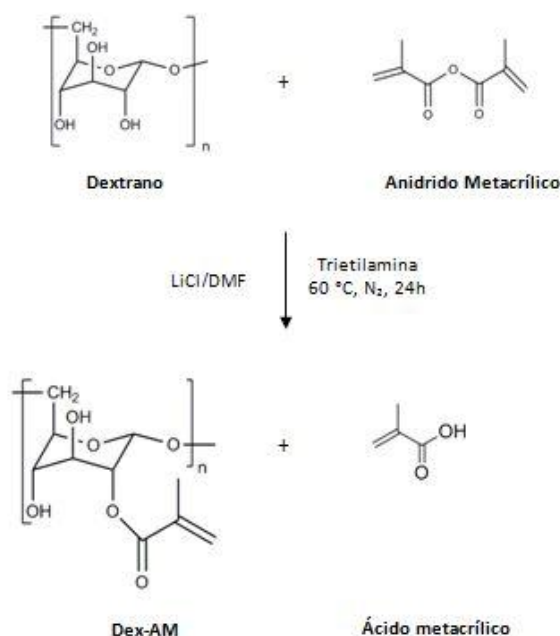


Figura 14: Representação esquemática da síntese de modificação de Dextrano com Anidrido Metacrílico.

2.2.3. Síntese do poliéster-póliol

Num reator com três tubuladuras, equipado com agitador mecânico, condensador e entrada de azoto, o diol e o LA foram colocados de acordo com as quantidades indicadas na Tabela 7. A mistura reacional foi aquecida até 120 °C, e a reação decorreu durante 5h. Após este tempo, adicionou-se Octanoato de Estanho (0,25% da soma da massa do diol com a do L-LA), que foi dissolvido em 1 mL de clorofórmio, e a temperatura de reação foi aumentada para 180 °C. A reação prosseguiu durante mais 24h. O poliéster-póliol foi depois purificado por dissolução em THF e precipitação em *n*-hexano. O excesso de solvente de purificação foi decantado e o produto resultante foi seco em estufa de vácuo a 40 °C (Adaptado de [69] e [70]). As reações são representadas, esquematicamente, na Figura 15.

Tabela 7: Quantidades para as sínteses de poliéster-póliol.

	L-LA	PEG	PCL	PNT	Octanoato de Estanho
Síntese do poliéster-póliol de base ácido láctico (LA) e poli (etileno glicol) (PEG) – PLA-PEG	100 mL (1,2 mol)	86,98 g (0,2899 mol)	--	--	0,49 g
Síntese do poliéster-póliol de base ácido láctico (LA) e poli (caprolactona) (PCL) – PLA-PCL	150 mL (1,8 mol)	--	75,19 g (0,14 mol)	--	0,59 g
Síntese do poliéster-póliol de base ácido láctico (LA) e pentaeritritol (PNT) –PLA-PNT	150 mL (1,8 mol)	--	--	38,37 g (0,28 mol)	0,50 g

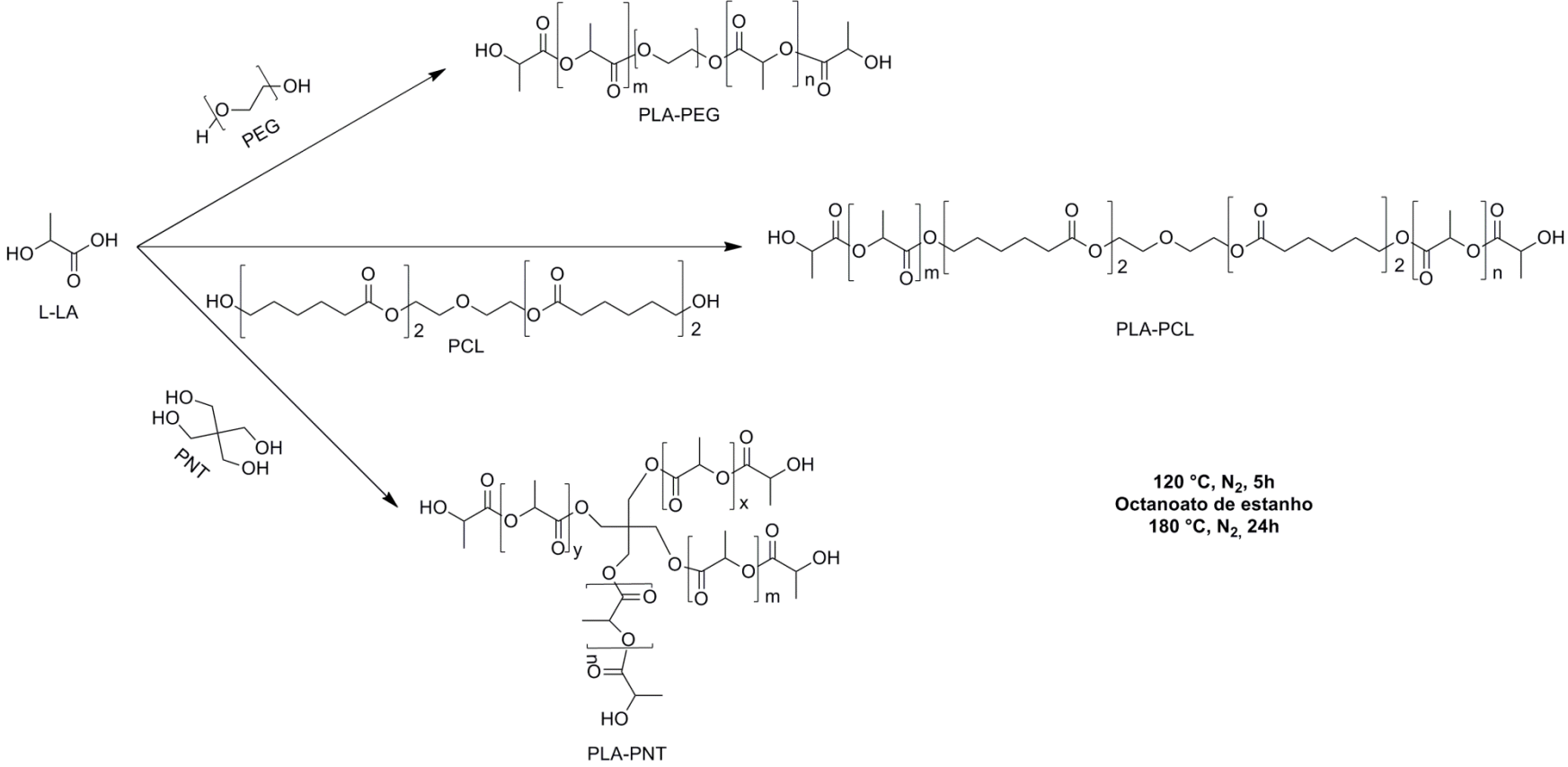


Figura 15: Representação esquemática da síntese de poliéster-poliol.

2.2.4. Modificação do poliéster-póliol com anidrido metacrílico

Num balão de fundo redondo foram dissolvidas 5 g de poliéster-póliol purificado, em 100 mL de THF, com agitação magnética, à temperatura ambiente. De seguida, foi adicionado AM, e, por último, foi adicionado o DMAP. A reação decorreu durante 24h, num banho a 60°C, sob atmosfera inerte de azoto. O produto de reação foi depois recuperado por precipitação em *n*-hexano e o excesso de solvente foi decantado. O produto resultante foi seco, sob vácuo, à temperatura ambiente¹. As respetivas quantidades, para cada modificação, estão apresentadas na Tabela 8 (Adaptado de [71]). As reações são representadas, esquematicamente, na Figura 16.

Tabela 8: Quantidades para modificações de poliéster-póliol com anidrido metacrílico.

	PLA-PEG	PLA-PCL	PLA-PNT	Anidrido metacrílico	DMAP
Modificação de PLA-PEG com anidrido metacrílico – PLA-PEG-AM	5 g (0,0115 mol)	--	--	3,44 mL (0,023 mol)	0,04 g (0,0003 mol)
Modificação de PLA-PCL com anidrido metacrílico – PLA-PCL-AM	--	5 g (0,0044 mol)	--	1,31 mL (0,0088 mol)	0,016 g (0,00013 mol)
Modificação de PLA-PNT com anidrido metacrílico – PLA-PNT-AM	--	--	5 g (0,024 mol)	7,20 mL (0,048 mol)	0,04 g (0,0004 mol)

¹ A única exceção foi na modificação de PLA-PCL com anidrido metacrílico, uma vez que o produto da reação foi recuperado por precipitação em *n*-hexano, seguido de evaporação do solvente.

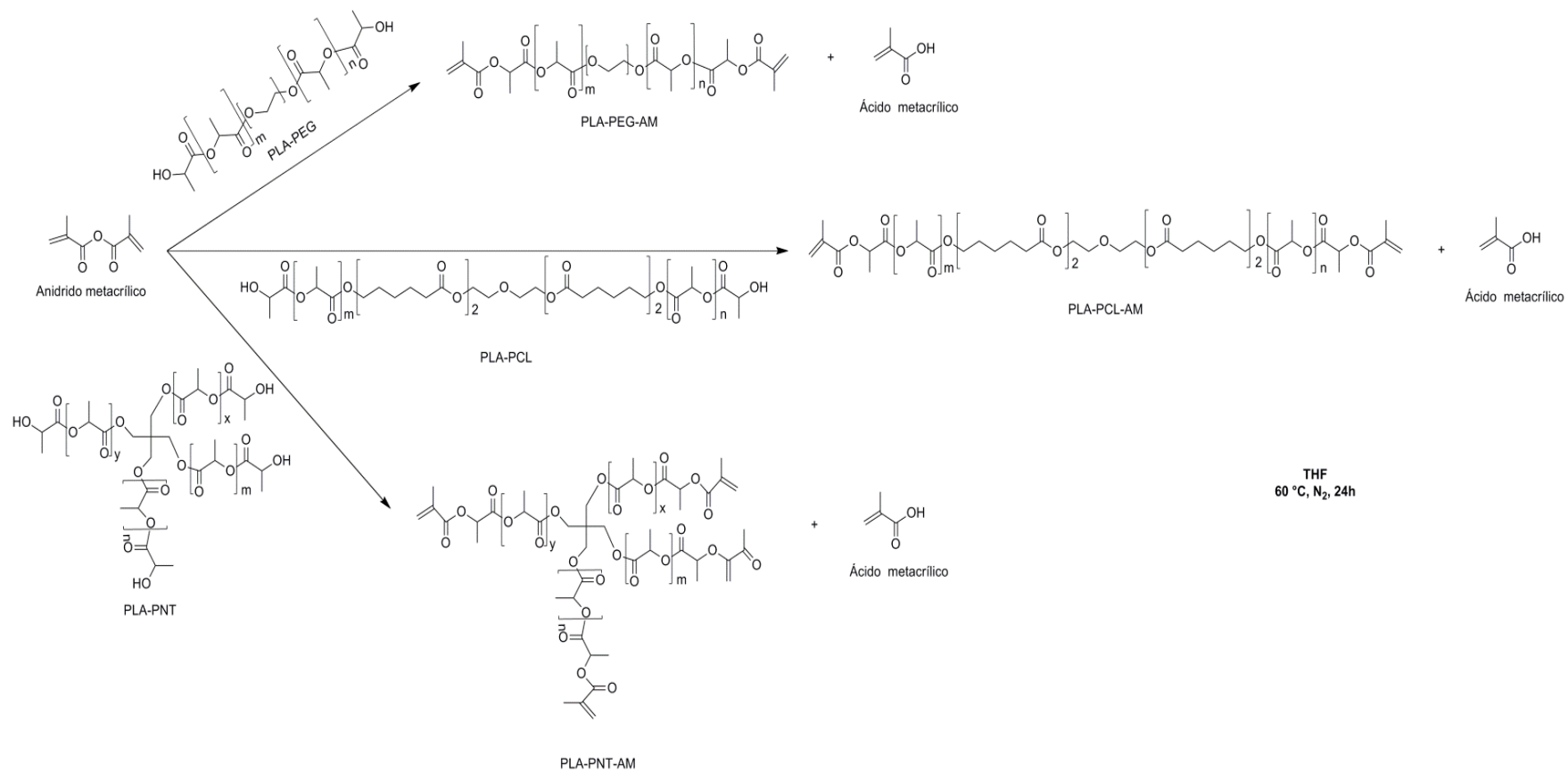


Figura 16: Representação esquemática da modificação poliéster-poliol com anidrido metacrílico.

2.3. Preparação de membranas

Dissolveram-se, em 2 mL de DMSO, o dextrano modificado e os reticulantes, de acordo com as quantidades apresentadas na Tabela 9. Após dissolução, adicionou-se o fotoiniciador (Irgacure 2959[®]), na proporção de 2 % m/m (relativamente à quantidade de dextrano modificado e reticulante). A solução foi depois vertida para uma caixa de Petri, sendo de seguida colocada numa câmara de radiação UV (Modelo BS-02, de Dr. Gröbel, UV-Electronik GmbH, com um comprimento de onda de 280 nm), para fotopolimerizar. Após três horas, a membrana foi retirada da caixa de Petri, cortada em círculos de 1,3 cm de diâmetro, que foram colocados a dialisar contra água destilada, à temperatura ambiente, durante uma semana. De seguida e, numa primeira fase, as amostras foram secas ao ar e, posteriormente, numa estufa a 50 °C.

Tabela 9: Formulações para a preparação de membranas.

Amostra	m (Dex-IEMA) (g)	m (Dex-AM) (g)	m (PLA- PEG-AM) (g)	m (PLA- PCL-AM) (g)	m (PLA- PNT-AM) (g)	m (PEG-DA) (g)
Mem A	0,50	X	X	X	X	X
Mem B	0,20	X	0,20	X	X	X
Mem C	0,20	X	0,15	X	X	0,05
Mem D	0,20	X	X	0,20	X	X
Mem E	0,20	X	X	0,15	X	0,05
Mem F	0,20	X	X	X	0,20	X
Mem G	0,20	X	X	X	0,15	0,05
Mem H	X	0,50	X	X	X	X
Mem I	X	0,20	0,20	X	X	X
Mem J	X	0,20	0,15	X	X	0,05
Mem K	X	0,20	X	0,20	X	X
Mem L	X	0,20	X	0,15	X	0,05
Mem M	X	0,20	X	X	0,20	X
Mem N	X	0,20	X	X	0,15	0,05

2.4. Caracterização

2.4.1. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de protão foram obtidos num espectrómetro Bruker Avance III 400 MHz, com uma sonda de deteção tripla TIX 5 mm. Foram usados diferentes solventes deuterados, nomeadamente óxido de deutério (D₂O) e dimetilsulfóxido deuterado (DMSO-d₆), dependendo do tipo de amostra a analisar.

Os resultados foram tratados com recurso ao *software MestRenova*.

2.4.2. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (FTIR-ATR)

A análise foi efetuada através do equipamento *Agilent Technologies Cary 630 FTIR* e os espectros foram adquiridos com o *software MicroLab FTIR*.

2.4.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise de TGA foi levada a cabo num equipamento da marca *TA Instruments modelo Q500*, num intervalo de temperatura de 25 a 600 °C e com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min sob fluxo de azoto de 50 ml/min. O *software TA Instruments version 4.2E Build 4.2.0.38* foi usado para o tratamento de dados.

2.4.4. Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

As análises de DSC foram realizadas utilizando o equipamento da marca *TA Instruments modelo Q100*, equipado com uma unidade de arrefecimento RSC90. Todas as amostras foram sujeitas a ciclos de aquecimento-arrefecimento-aquecimento, com uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, sob atmosfera de azoto. O *software TA Instruments version 4.2E Build 4.2.0.38* foi usado para o tratamento de dados. As massas de amostra utilizadas variaram entre 5 e 10 mg.

2.4.5. Capacidade de inchaço

Para determinar a capacidade de absorção de água das membranas, foram pesadas 3 amostras de cada formulação, sendo este peso denominado por peso seco (W_s). De seguida, cada membrana foi colocada num recipiente fechado, contendo 5 mL de água destilada, numa estufa a 37 °C. A tempos pré-determinados, as amostras foram pesadas (peso molhado, W_m), após a água em excesso à superfície ter sido cuidadosamente removida com papel de filtro. Depois de pesadas, as amostras foram colocadas novamente no meio.

A capacidade de inchaço foi calculada de acordo com a Equação 1:

$$\text{Capacidade de Inchaço}(\%) = \frac{W_m - W_s}{W_s} * 100 \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

W_m – peso molhado de cada amostra

W_s – peso seco de cada amostra

2.4.6. Testes de degradação hidrolítica *in vitro*

As membranas secas (W_0), numa estufa a 50 °C, foram mergulhadas em 10 mL de uma solução de tampão fosfato (PBS, pH=7,4), contendo 2% m/v de azida de sódio, e colocadas numa estufa a 37 °C. A tempos pré-determinados, as membranas foram retiradas do meio, lavadas abundantemente com água destilada e colocadas a secar numa estufa a 50 °C, até se obter peso constante (W_f). A perda de massa das membranas foi depois calculada com recurso à Equação 2.

$$\text{Perda de massa (\%)} = \frac{W_0 - W_f}{W_0} * 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

W_f – peso final de cada amostra

W_0 – peso inicial de cada amostra

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como já foi referido atrás, o objetivo do presente trabalho era a preparação de membranas de base dextrano por fotopolimerização, com vista à sua aplicação no campo da regeneração do nervo periférico. Para tal, o dextrano foi modificado com ligações duplas, pela reação dos seus grupos –OH com o IEMA ou com o AM. De modo a modelar algumas das propriedades (e.g., degradação) das membranas, foram adicionados à formulação reticulantes de base LA, uma vez que os polímeros (oligómeros) preparados a partir deste monómero são amplamente usados na área biomédica [72]. Estes reticulantes foram também preparados no decorrer do trabalho. Após preparação do dextrano modificado e dos reticulantes, seguiu-se a preparação das membranas. Desta forma, a discussão de resultados será feita em três partes: preparação e caracterização do dextrano modificado, preparação e caracterização dos reticulantes e preparação e caracterização das membranas.

3.1. Preparação e caracterização do dextrano modificado

Numa fase inicial, o dextrano foi modificado com IEMA (Dex-IEMA) e com anidrido metacrílico (Dex-AM) (ver Figura 13 e Figura 14) para se obter um dextrano com ligações duplas. O IEMA e o AM ligam-se aos grupos –OH do dextrano através de uma ligação uretana e éster, respetivamente, o que poderá conferir propriedades diferentes ao material [73].

3.1.1. Caracterização química do dextrano e dextrano modificado

O dextrano modificado foi caracterizado por FTIR. A Figura 17 faz a comparação entre os espectros do dextrano, Dex-IEMA e Dex-AM.

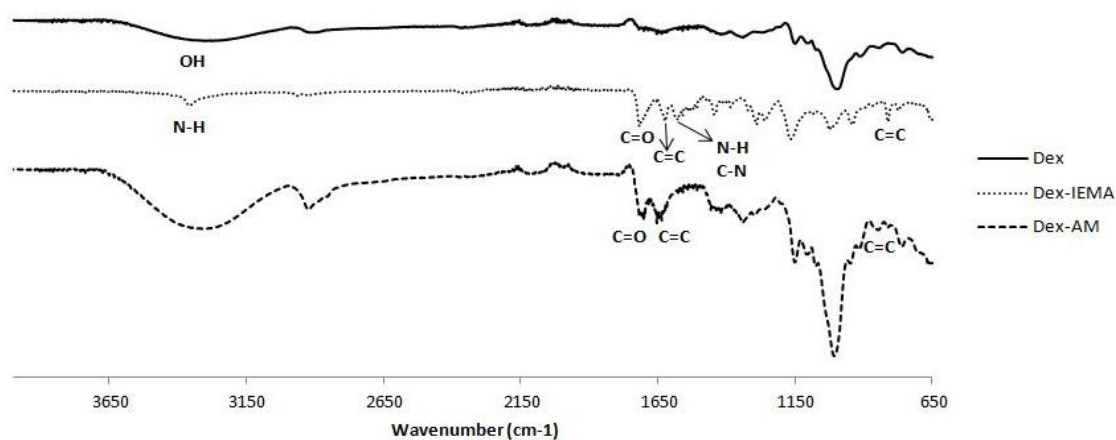


Figura 17: Espectro de FTIR do dextrano, Dex-IEMA e Dex-AM.

No espectro relativo ao dextrano, é visível uma elongação na zona dos 3000 cm^{-1} - 3800 cm^{-1} , que corresponde à vibração dos grupos -OH . Relativamente ao Dex-IEMA, é possível observar no espectro a elongação e flexão correspondentes à ligação dupla, a $\text{C}=\text{C}$, a 1640 cm^{-1} e 810 cm^{-1} , respetivamente. A *ca.* 1710 cm^{-1} é possível ver a banda correspondente à elongação do grupo carbonilo presente na ligação éster e na ligação uretana. Outras bandas características da ligação uretana podem ser vistas a 3378 cm^{-1} , correspondente à elongação da ligação N-H e a 1560 cm^{-1} , atribuída à flexão das ligações N-H e à elongação da ligação C-N . De salientar também o facto de não existir qualquer banda correspondente à elongação do grupo isocianato ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$), na zona dos 2262 cm^{-1} , o que indica que todo o IEMA usado foi consumido na reação. Assim sendo, pode dizer-se que a modificação do dextrano com IEMA foi bem sucedida.

No que diz respeito ao Dex-AM, na zona dos 1715 cm^{-1} , aparece uma banda correspondente à elongação do grupo carbonilo da ligação éster, o que comprova a efetiva ligação do AM ao dextrano. As bandas a 1656 cm^{-1} e 814 cm^{-1} correspondem à elongação e flexão da ligação dupla, respetivamente. De salientar que neste espectro aparece também uma banda alargada entre os 3000 cm^{-1} - 3800 cm^{-1} , que poderá estar associada à vibração dos grupos -OH não reagidos e também à presença de alguma água residual, que ainda possa existir no material.

O dextrano modificado foi ainda analisado por ^1H RMN. Os espectros apresentados na Figura 18 e na Figura 19, fazem a comparação entre o dextrano e o Dex-IEMA e o dextrano e o Dex-AM, respetivamente.

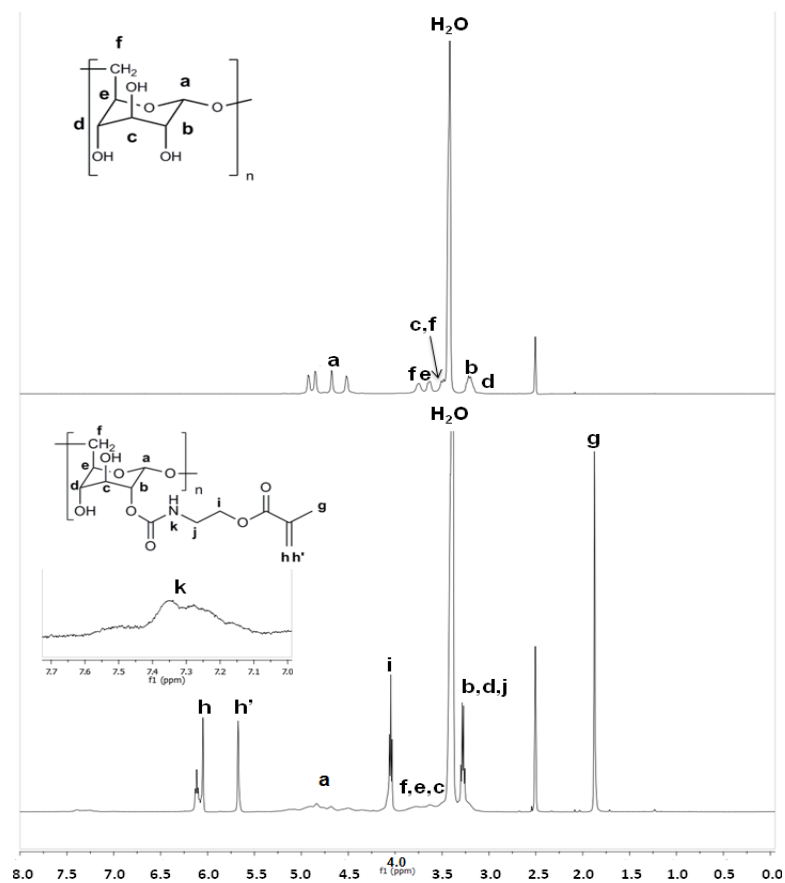


Figura 18: Espectro de ^1H RMN em DMSO-d_6 do Dex e do Dex-IEMA.

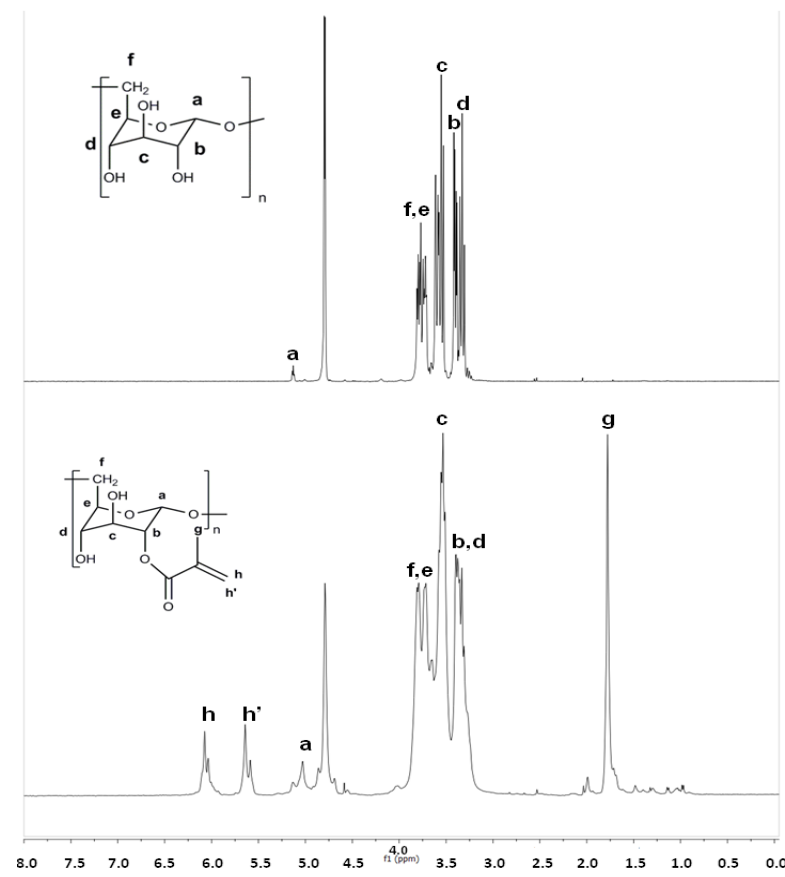


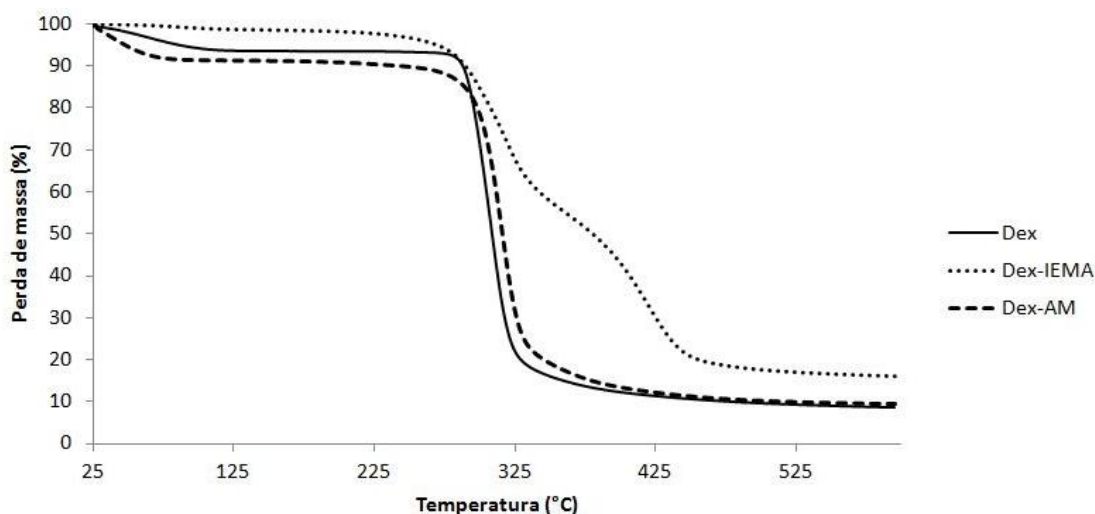
Figura 19: Espectro de ^1H RMN em D_2O do Dex e do Dex-AM.

Em ambos os espectros do dextrano modificado é possível verificar a existência de duas ressonâncias, entre 5.5 e 6.5 ppm que correspondem aos prótons da ligação dupla (**h e h'** para o Dex-IEMA e para o Dex-AM). A cerca de 1,9 ppm aparece o pico correspondente aos prótons do grupo $-CH_3$ do grupo metacrilato (**g** para Dex-IEMA e para Dex-AM). No espectro do Dex-IEMA é ainda possível observar três outras ressonâncias a ca. 4 ppm, atribuída aos prótons CH_2-OCO (**i**), a ca. 3.25 ppm, correspondente aos prótons do grupo $-CH_2$ ligado à ligação uretana $-CONHCH_2$ (**b, d e j**), e a ca. 7.3 ppm (**k**), é possível distinguir os prótons $-NH$ da ligação uretana.

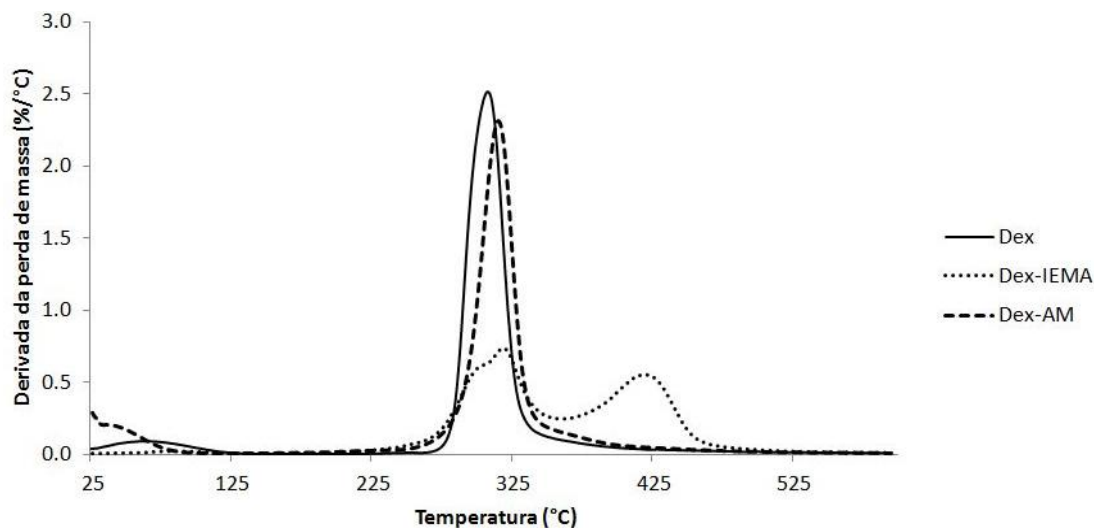
Através da análise de 1H RMN foi possível determinar a percentagem de modificação do dextrano, usando para tal os valores dos integrais que correspondiam aos prótons do polissacarídeo e aos prótons do IEMA ou do AM. As percentagens de modificação calculadas foram de 58% e de 55% para o Dex-IEMA e Dex-AM, respetivamente.

3.1.2. Propriedades térmicas do dextrano e dextrano modificado

A estabilidade térmica do dextrano, Dex-IEMA e Dex-AM foi determinada por TGA, numa gama de temperaturas entre 25 °C e 600 °C, em atmosfera de azoto. A Figura 20 apresenta as curvas termogravimétricas dos três materiais.



(A)



(B)

Figura 20: Curvas termogravimétricas (A) e curvas da derivada da perda de massa (B) obtidos para o dextrano, Dex-IEMA e Dex-AM.

É possível verificar que o Dex e o Dex-AM possuem um estágio principal de perda de massa, entre 250 °C- 350 °C, que corresponderá à degradação térmica da cadeia de polissacarídeo. É também possível observar uma pequena perda de massa para temperaturas entre os 25 °C e os 125 °C, que corresponderá à evaporação de alguma humidade residual. Estes perfis de perda de massa estão de acordo com o reportado na literatura [74]. No caso do Dex-IEMA são evidentes dois estágios de perda de massa. Em primeira análise podia atribuir-se a primeira perda de massa à degradação das ligações glicosídicas e a segunda à degradação das ligações uretana, que se formam aquando da ligação do IEMA aos grupos -OH do dextrano. No entanto, as ligações uretana degradam termicamente a uma temperatura próxima dos 330 °C, pelo que o segundo estágio de perda de massa não pode ser atribuído à degradação das mesmas [75]. Desta forma, e tendo em conta o que está descrito na literatura, não foi possível identificar a que material corresponderia esta segunda perda de massa.

A Tabela 10 apresenta as temperaturas de interesse retiradas das curvas termogravimétricas.

Tabela 10: Temperaturas de interesse retiradas das curvas termogravimétricas: $T_{5\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 5% da massa inicial), $T_{10\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 10% da massa inicial), T_{p1} (temperatura do primeiro pico) e T_{p2} (temperatura do segundo pico).

Material	$T_{5\%}$ (°C)	$T_{10\%}$ (°C)	T_{p1} (°C)	T_{p2} (°C)
Dextrano	290	294	308	n. d.
Dex-IEMA	279	293	319	420
Dex-AM	285	296	315	n. d.

Os resultados apresentados na Tabela 10 indicam que as modificações do dextrano com o IEMA e com o AM não levam a um decréscimo acentuado da sua estabilidade térmica, uma vez que os três materiais possuem $T_{5\%}$, $T_{10\%}$ muito semelhantes.

O dextrano, Dex-IEMA e Dex-AM foram analisados por DSC para estudar os eventos térmicos existentes nestas amostras, abaixo da temperatura de degradação. As curvas de degradação (correspondentes ao 2º ciclo de aquecimento) são apresentadas na Figura 21.

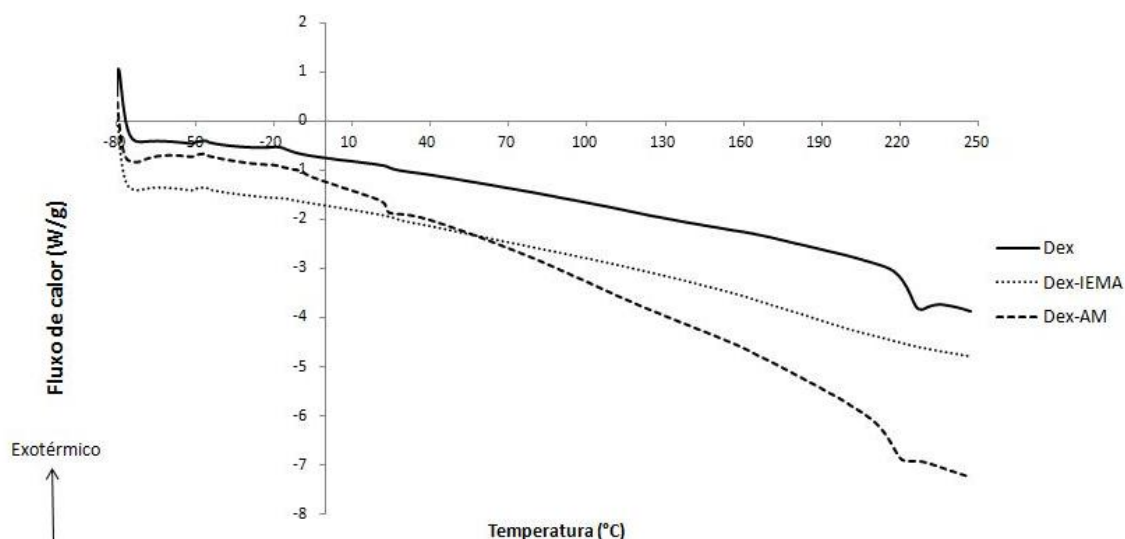


Figura 21: Curvas de fluxo de calor do dextrano, Dex-IEMA e Dex-AM.

Tal como se pode observar na Figura 21, os materiais não apresentam picos endotérmicos que correspondam à fusão, sendo portanto materiais amorfos. Os eventos detetados são a transição vítrea nas curvas de fluxo de calor do dextrano e do Dex-AM, a uma temperatura de *ca.* 224 °C e de 217 °C, respetivamente. Uma justificação possível para a T_g do Dex-AM ser mais baixa que a do dextrano pode prender-se com a substituição dos grupos $-OH$ por um grupo mais volumoso, o que induz um aumento da distância entre as cadeias poliméricas e, conseqüentemente, a um aumento de volume livre, diminuindo

assim a T_g [76]. No Dex-IEMA não foi possível detetar qualquer evento, facto que poderá estar relacionado com a taxa de aquecimento utilizada na análise; para a deteção da T_g quanto mais lento for o aquecimento melhor.

3.2. Preparação e caracterização dos reticulantes de base LA

Tal como referido anteriormente, foram sintetizados reticulantes de base LA para serem usados nas formulações para a preparação das membranas. Os reticulantes foram obtidos a partir da reação de poliésteres-polióis de base LA com o AM. Os poliésteres-polióis, por sua vez, foram obtidos a partir da reação do LA com diferentes polióis. Os polióis, PEG, PCL-diol e PNT, foram escolhidos para conferir aos reticulantes diferentes propriedades (e.g., hidrofiliicidade/hidrofobicidade, flexibilidade), esperando-se que estas, de alguma forma, fossem transferidas para as membranas, quando estes materiais eram usados nas suas formulações.

3.2.1 Caracterização química dos poliésteres-polióis de base LA e reticulantes de base LA

A Figura 22 apresenta os espectros de FTIR dos poliésteres-polióis.

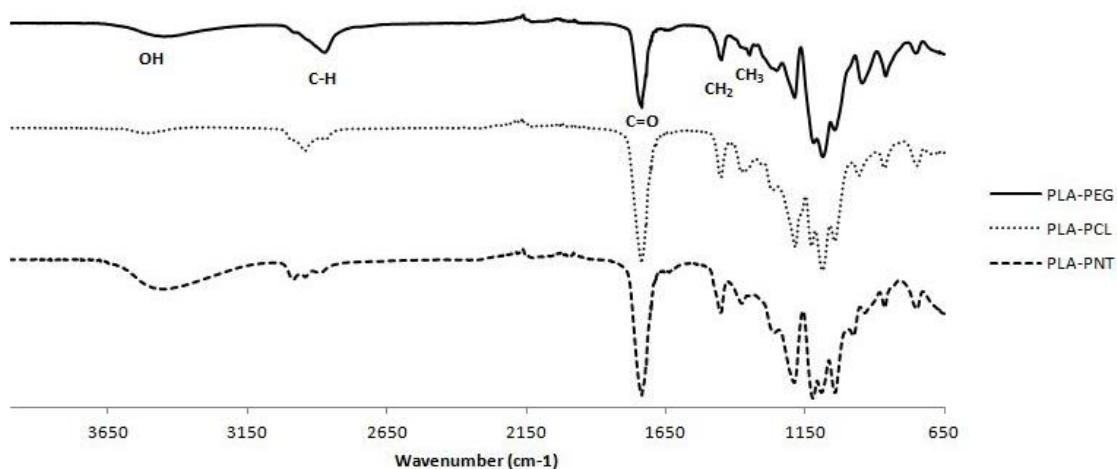


Figura 22: Espectro de FTIR do PLA-PEG, PLA-PCL e PLA-PNT.

Nos espectros de FTIR relativos ao PLA-PEG, PLA-PCL e PLA-PNT, é possível verificar uma banda entre 3650 e 3100 cm^{-1} correspondente à elongação dos grupos $-\text{OH}$. A cerca de 1715 cm^{-1} é possível observar a banda pertencente à elongação do grupo $-\text{C}=\text{O}$ da ligação éster.

Os poliésteres-polióis foram ainda analisados por ^1H RMN (Figura 23).

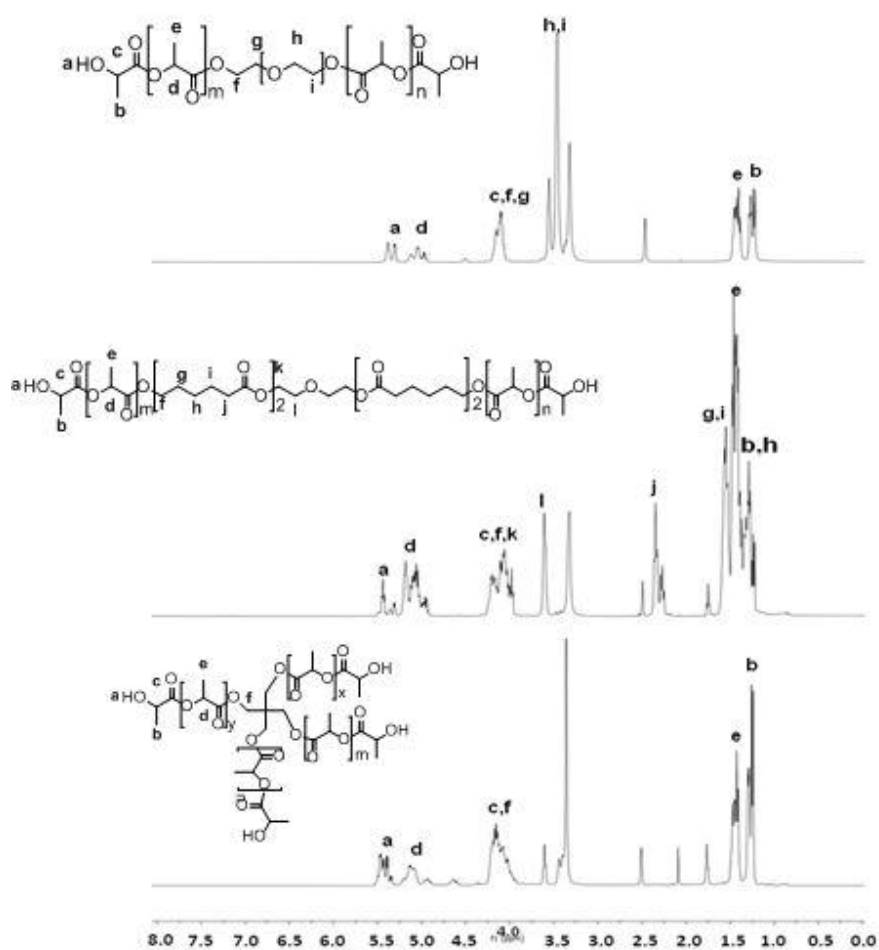


Figura 23: Espectro de ^1H RMN em DMSO-d_6 do PLA-PEG, PLA-PCL e PLA-PNT.

Os espectros obtidos na Figura 23 indicam que as reações de preparação dos poliésteres-polióis foram bem-sucedidas, na medida em que os espectros estão de acordo com a estrutura esperada. Através da análise de ^1H RMN foi ainda possível calcular os pesos moleculares, usando para isso os integrais correspondentes aos prótons pertencentes ao poliól e à estrutura oligomérica de LA. O peso molecular obtido foi de 433 g/mol para o PLA-PEG, 1137,8 g/mol para o PLA-PCL e 206,72 g/mol para o PLA-PNT.

Após ter-se verificado que os poliésteres-polióis foram preparados com sucesso, estes reagiram com o AM para dar origem aos reticulantes. A Figura 24 apresenta os espectros de FTIR dos reticulantes.

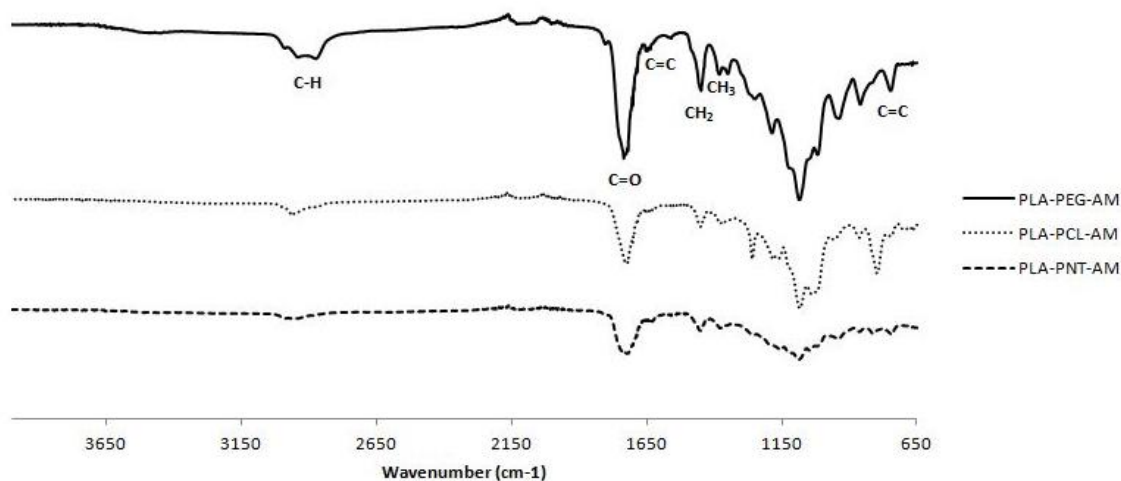


Figura 24: Espectro de FTIR do PLA-PEG-AM, PLA-PCL-AM e PLA-PNT-AM.

É possível verificar que a banda correspondente à elongação dos grupos -OH , perfeitamente visível nos espectros dos poliésteres-polióis (Figura 24), não é detetada nos espectros do reticulante. Este facto indica o consumo dos grupos -OH por reação com o AM. Também se observam duas novas bandas a 1650 cm^{-1} e 750 cm^{-1} correspondentes à elongação e flexão, respetivamente, da ligação dupla.

A estrutura química dos três reticulantes foi ainda analisada por ^1H RMN (Figura 25).

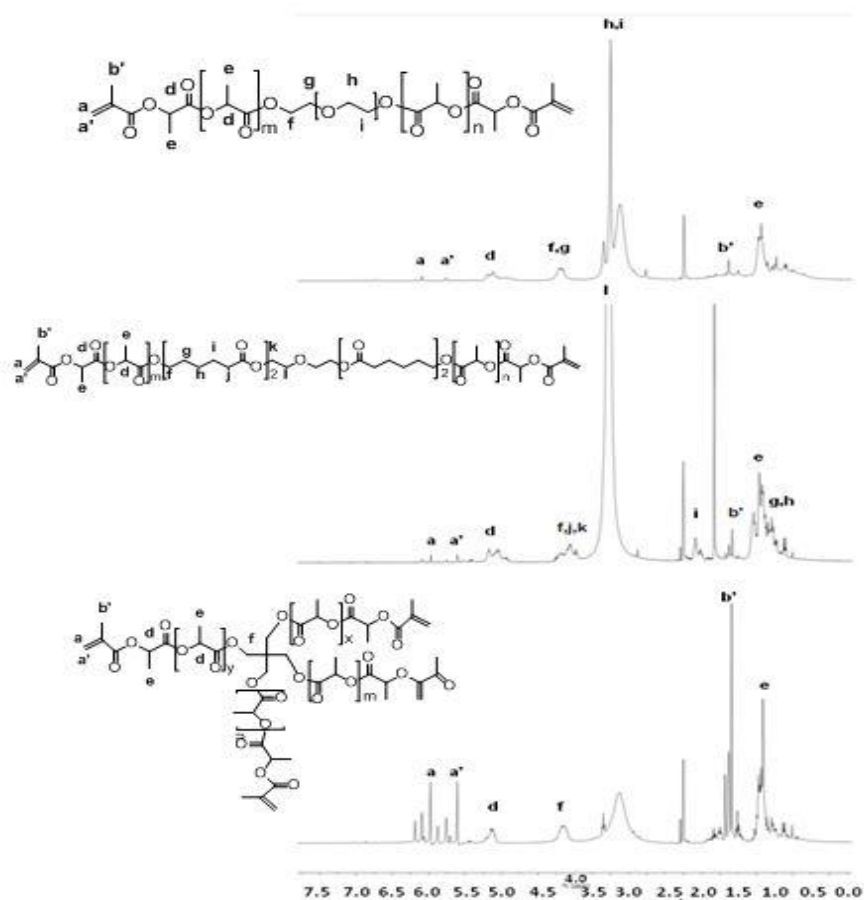


Figura 25: Espectro de ^1H RMN em DMSO-d_6 do PLA-PEG-AM, PLA-PCL-AM e PLA-PNT-AM.

Nos espectros dos reticulantes é notório o desaparecimento da ressonância correspondente ao $-\text{OH}$ observado no espectro dos poliésteres-polióis (ressonância indicada por **(a)** na Figura 23) e também da ressonância atribuída aos grupos $-\text{CH}_3$ da cadeia dos poliésteres-polióis ligados ao grupo $-\text{OH}$ (ressonância indicada por **(b)** na Figura 23). Tal facto indica que a reação de síntese dos reticulantes a partir dos poliésteres-polióis foi bem sucedida, tendo ocorrido quantitativamente.

3.2.2 Propriedades térmicas dos reticulantes de base LA

A estabilidade térmica dos reticulantes de base LA foi avaliada por TGA, numa gama de temperaturas entre os $25\text{ }^\circ\text{C}$ e os $600\text{ }^\circ\text{C}$, sob atmosfera inerte de azoto. A Figura 26 apresenta as curvas termogravimétricas dos três reticulantes de base LA.

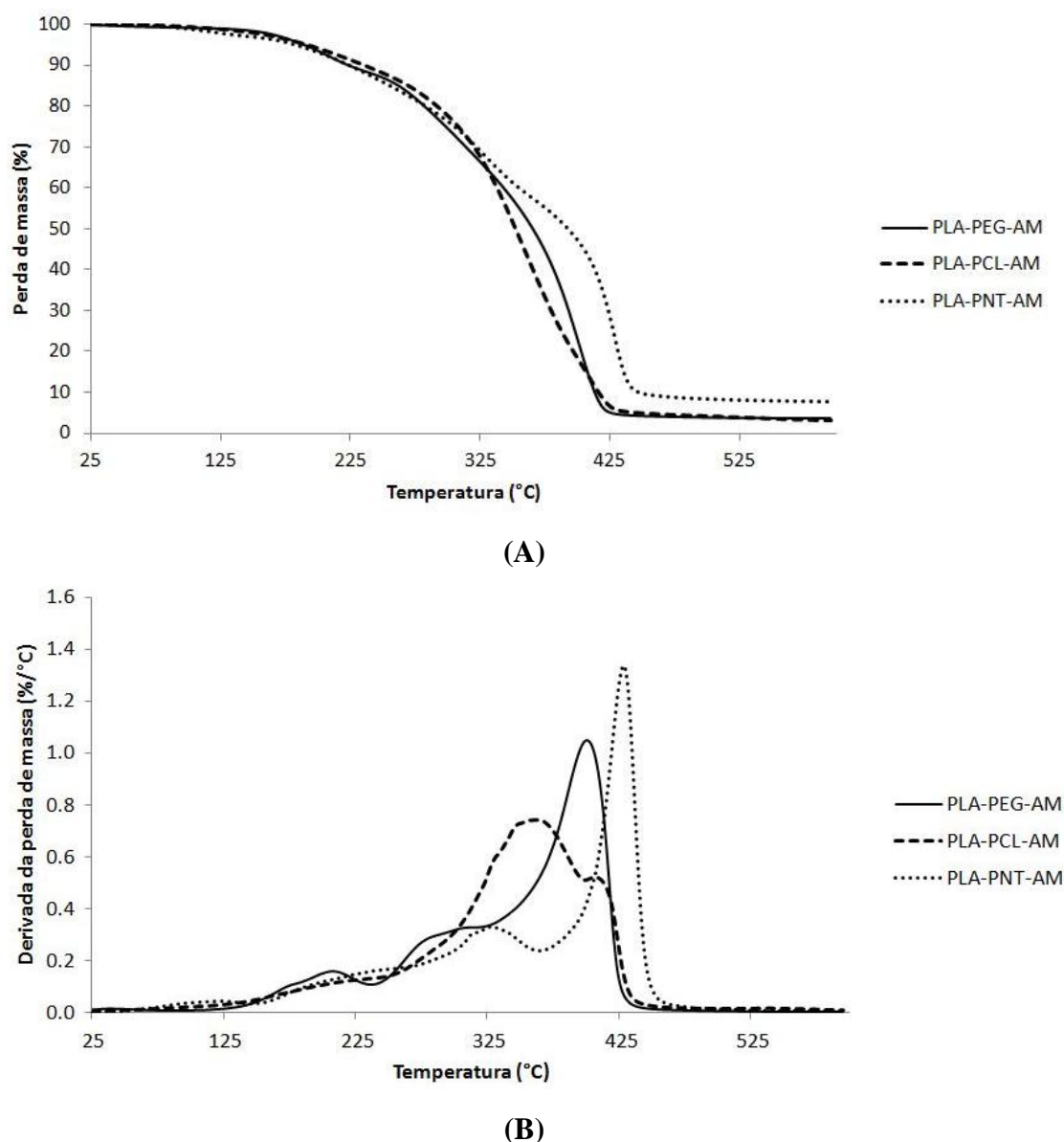


Figura 26: Traços termogravimétricos (A) e curvas da derivada da perda de massa (B) obtidos para o PLA-PEG-AM, PLA-PCL-AM e PLA-PNT-AM.

Todos os reticulantes de base LA apresentam um estágio principal de perda de massa, com ombros. Estes ombros podem ser devidos à presença de compostos de muito baixo peso molecular que degradam a temperaturas significativamente mais baixas. O estágio principal de perda de massa ocorre a temperaturas diferentes para os diferentes reticulantes, nomeadamente 325 °C-425 °C para o PLA-PEG-AM, 250 °C-425 °C para o PLA-PCL-AM e 350 °C-450 °C para o PLA-PNT-AM. Estas diferenças nas temperaturas podem, por um lado, estar relacionadas com o peso molecular dos materiais e, por outro, com as diferentes unidades centrais presentes nos reticulantes.

As temperaturas de interesse obtidas por TGA são apresentadas na Tabela 11.

Tabela 11: Temperaturas de interesse retiradas das curvas termogravimétricas: $T_{5\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 5% da massa inicial), $T_{10\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 10% da massa inicial), T_{p1} (temperatura do primeiro pico), T_{p2} (temperatura do segundo pico) e T_{p3} (temperatura do terceiro pico).

Material	$T_{5\%}$ (°C)	$T_{10\%}$ (°C)	T_{p1} (°C)	T_{p2} (°C)	T_{p3} (°C)
PLA-PEG-AM	196	231	208	301	401
PLA-PCL-AM	196	238	204	360	406
PLA-PNT-AM	197	234	220	327	428

Da análise da Tabela 11 é possível verificar que todos os reticulantes de base LA possuem estabilidade térmica semelhante, na medida em que possuem valores muito próximos de $T_{5\%}$ e $T_{10\%}$. Desta forma, os resultados indicam que a alteração da cadeia central dos reticulantes não prejudica a sua estabilidade térmica.

Os reticulantes de base LA foram ainda analisados por DSC de forma a determinar quais os eventos térmicos que ocorriam antes da degradação. As curvas de fluxo de calor estão representadas na Figura 27.

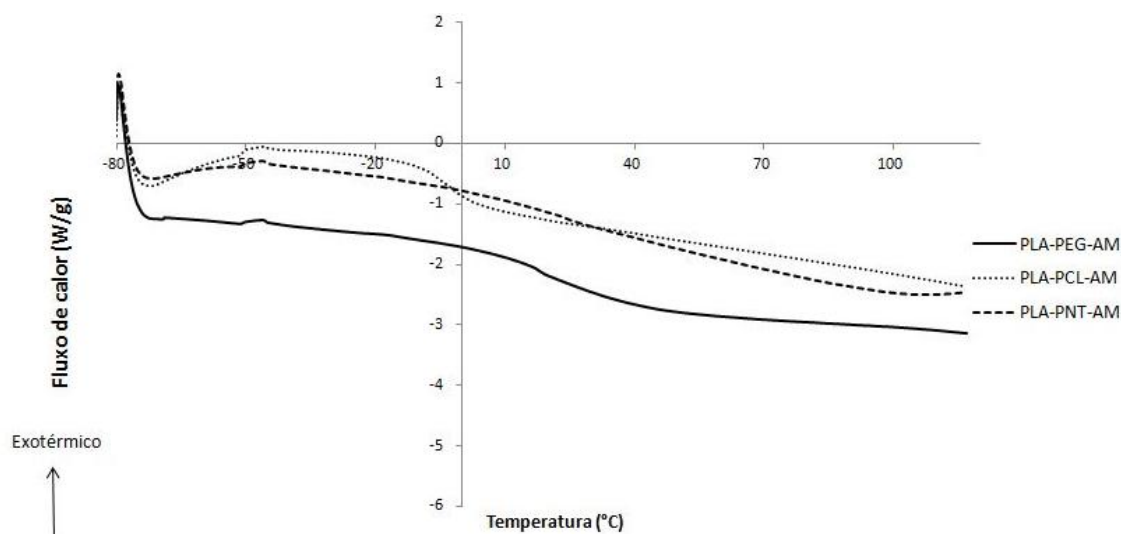


Figura 27: Curvas de fluxo de calor do PLA-PEG-AM, PLA-PCL-AM e PLA-PNT-AM.

As curvas de fluxo de calor não revelam a existência de qualquer pico endotérmico que possa ser associado à fusão, pelo que os materiais têm uma natureza amorfa. No PLA-PEG-AM e no PLA-PCL-AM é no entanto possível observar a transição vítrea para temperaturas de 17,91 °C e -2,99 °C, respetivamente. Estes resultados indicam que é possível alterar a flexibilidade dos reticulantes por alteração da sua cadeia central (ver Figura 16).

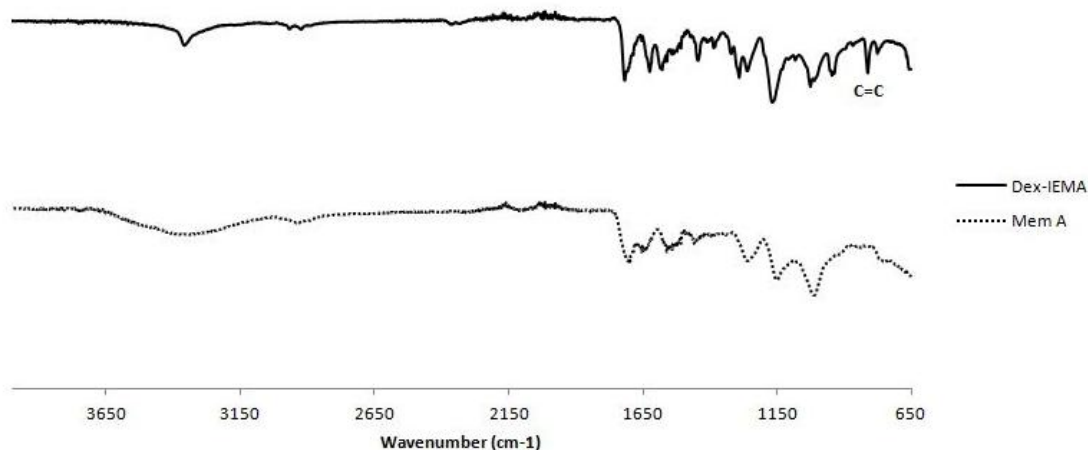
3.3. Preparação e caracterização das membranas de base dextrano

As diferentes membranas de base dextrano foram preparadas de acordo com o procedimento já descrito no capítulo anterior e com as formulações apresentadas na Tabela 9.

Sumariamente, a formação das membranas ocorre da seguinte forma. O fotoiniciador presente na formulação absorve a luz UV e origina radicais livres que vão atacar as ligações duplas, quer do dextrano modificado (Dex-IEMA e Dex-AM), quer dos reticulantes, gerando macroradiciais. Estes macroradiciais, por sua vez, vão atacar sucessivamente as ligações duplas presentes, formando assim a rede reticulada. O fotoiniciador escolhido foi o Irgacure2959 uma vez que este apresenta uma baixa toxicidade para um número considerável de linhas celulares [77], [78].

3.3.1. Caracterização química das membranas

Por forma a averiguar o sucesso da polimerização, as membranas foram analisadas por FTIR. A Figura 28 apresenta os espectros referentes ao Dex-IEMA e à membrana de Dex-IEMA (Mem A) (A) e ao Dex-AM e à membrana de Dex-AM (Mem H) (B).



(A)

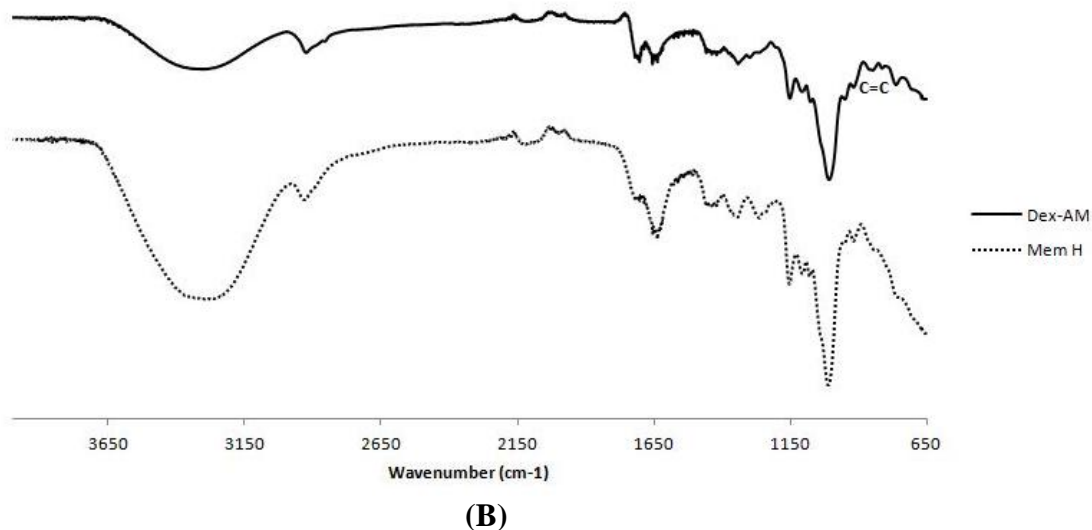


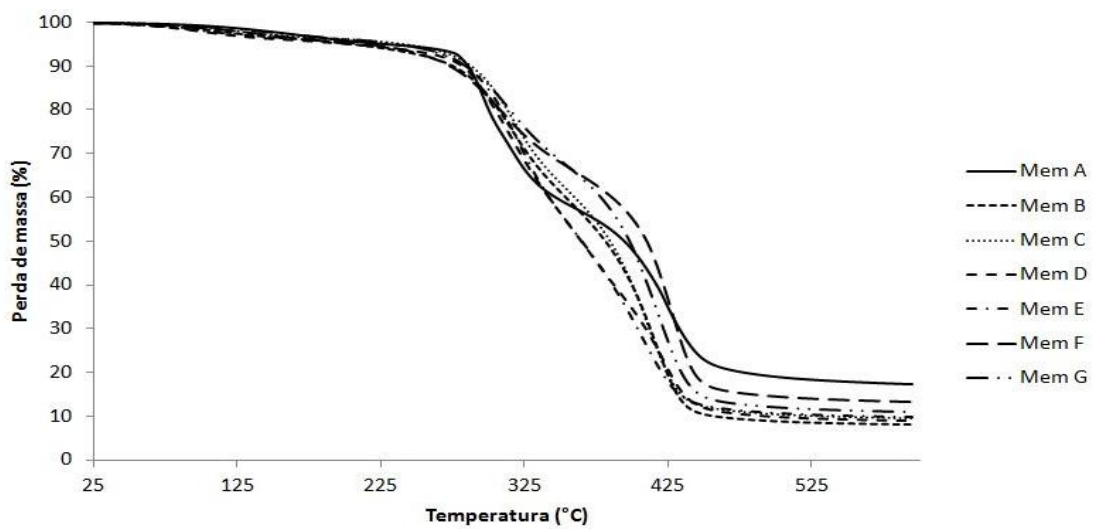
Figura 28: Espectro de FTIR do Dex-IEMA e da Mem A (A) e do Dex-AM e da Mem H (B).

A elongação correspondente à ligação dupla situa-se na zona dos 750-800 cm⁻¹ tanto para o Dex-IEMA como para o Dex-AM. Pode verificar-se que as membranas obtidas por fotopolimerização, neste caso a Mem A e a Mem H, não apresentam elongações nesta zona, o que significa que estão reticuladas. Os espectros de FTIR das restantes membranas encontram-se na

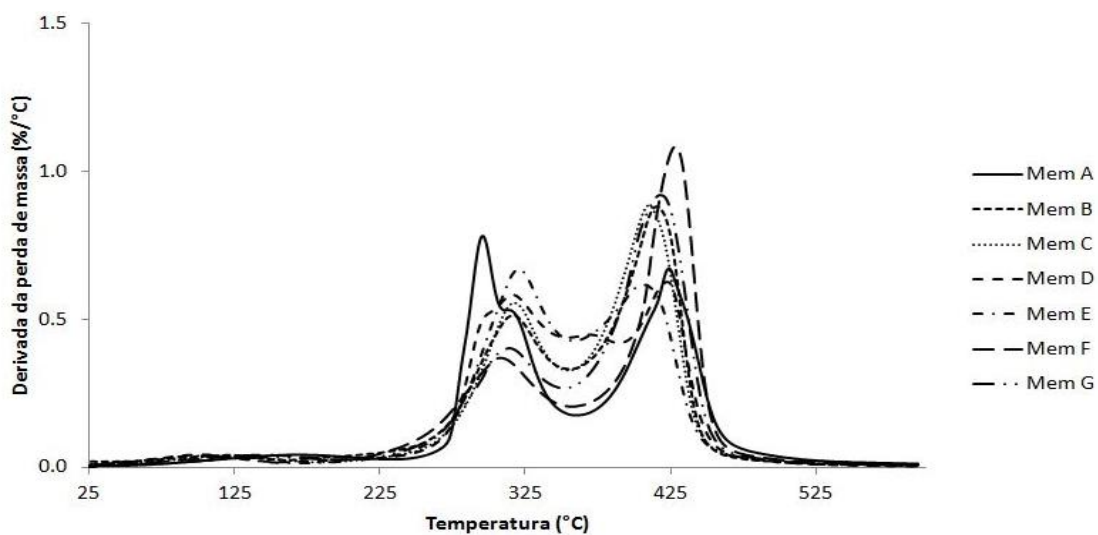
Figura A.1 e na Figura A.2.

3.3.2. Propriedades térmicas das membranas

A estabilidade térmica das membranas foi estudada por TGA, de 25 °C a 600 °C, sob atmosfera de azoto. As curvas termogravimétricas das membranas de base Dex-IEMA e de base Dex-AM são apresentadas na Figura 29 e na Figura 30, respetivamente.



(A)



(B)

Figura 29: Traços termogravimétricos (A) e curvas da derivada da perda de massa (B) obtidos para as membranas de base Dex-IEMA (Mem A, Mem B, Mem C, Mem D, Mem E, Mem F e Mem G).

A partir da Figura 29 é possível verificar que todas as membranas em estudo apresentam dois estágios de perda de massa, similarmente ao observado para o Dex-IEMA. De salientar que a inclusão dos reticulantes de base LA não compromete a estabilidade térmica das membranas.

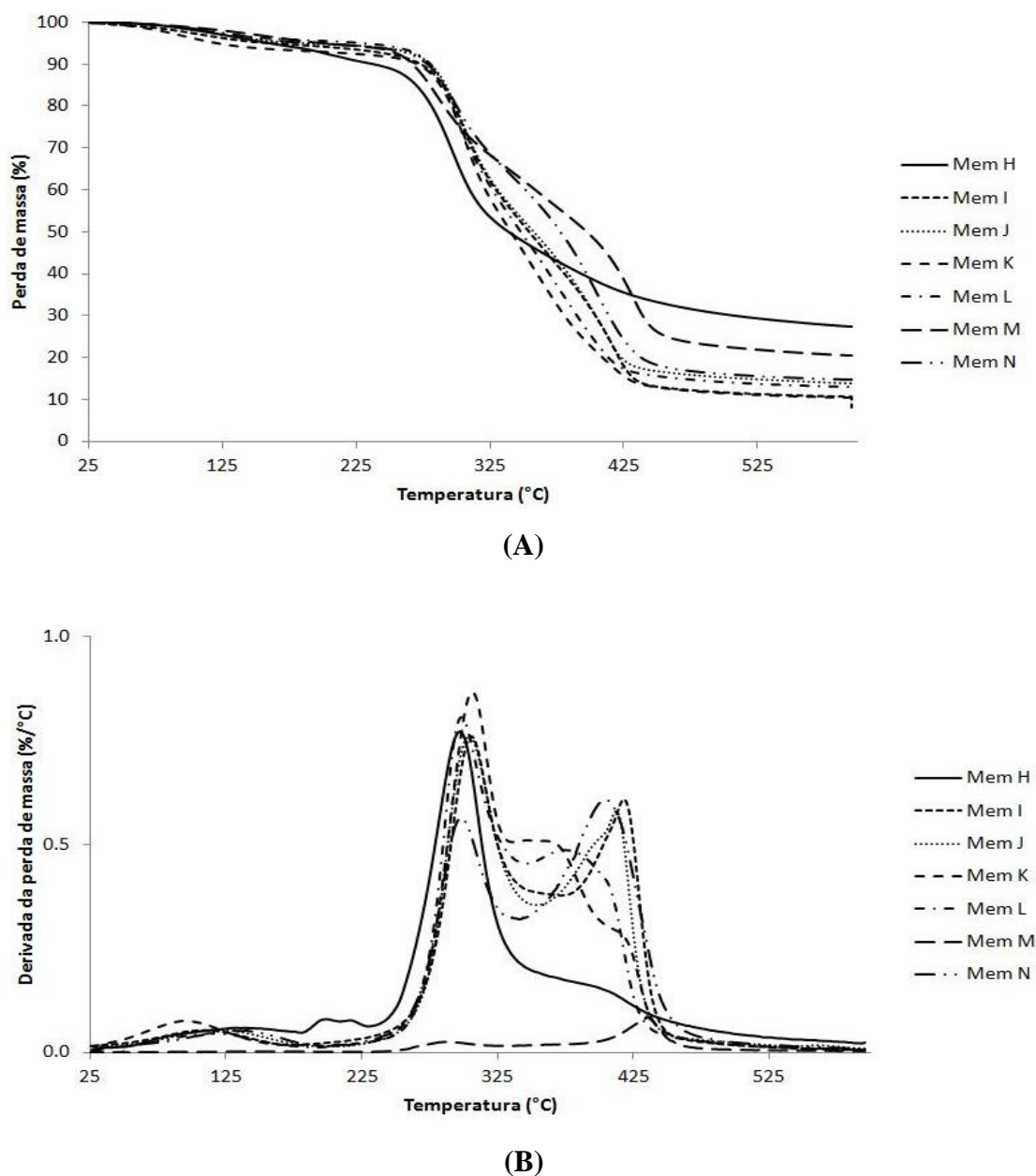


Figura 30: Traços termogravimétricos (A) e curvas da derivada da perda de massa (B) obtidos para as membranas de base Dex-AM (Mem H, Mem I, Mem J, Mem K, Mem L, Mem M e Mem N).

Relativamente às membranas de Dex-AM, verifica-se que também estas apresentam dois estágios principais de perda de massa, com um ombro para temperaturas entre 25 °C e 125 °C, correspondente à evaporação de alguma humidade residual. Da análise termogravimétrica do Dex-AM, verificou-se que este degradou num único estágio, pelo que a obtenção de dois estágios de perda de massa pode indicar a presença de dois tipos de materiais com estabilidade térmica diferente na rede reticulada. Assim, o primeiro estágio de perda de massa pode ser atribuído ao Dex-AM que não tenha sido reticulado, e o segundo estágio poderá corresponder ao material já reticulado.

A Tabela 12 apresenta as temperaturas de interesse retiradas das curvas termogravimétricas para as membranas em estudo.

Tabela 12: Temperaturas de interesse retiradas das curvas termogravimétricas: $T_{5\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 5% da massa inicial), $T_{10\%}$ (temperatura à qual a amostra perde 10% da massa inicial), T_{p1} (temperatura do primeiro pico) e T_{p2} (temperatura do segundo pico).

Membrana	Constituição	$T_{5\%}$ (°C)	$T_{10\%}$ (°C)	T_{p1} (°C)	T_{p2} (°C)
Mem A	Dex-IEMA	285	293	296	424
Mem B	Dex-IEMA+PLA-PEG-AM	280	297	317	416
Mem C	Dex-IEMA+PLA-PEG-AM+PEG-DA	283	300	317	410
Mem D	Dex-IEMA+PLA-PCL-AM	281	295	316	423
Mem E	Dex-IEMA+PLA-PCL-AM+PEG-DA	280	297	322	407
Mem F	Dex-IEMA+PLA-PNT-AM	269	292	308	428
Mem G	Dex-IEMA+PLA-PNT-AM+PEG-DA	277	298	314	418
Mem H	Dex-AM	262	277	297	397
Mem I	Dex-AM+PLA-PEG-AM	276	291	305	417
Mem J	Dex-AM+PLA-PEG-AM+PEG-DA	280	292	304	412
Mem K	Dex-AM+PLA-PCL-AM	281	292	307	361
Mem L	Dex-AM+PLA-PCL-AM+PEG-DA	278	289	299	375
Mem M	Dex-AM+PLA-PNT-AM	256	274	285	432
Mem N	Dex-AM+PLA-PNT-AM+PEG-DA	275	290	299	409

De acordo com os resultados da Tabela 12, os valores de $T_{5\%}$ e $T_{10\%}$ variam entre os 250 °C e os 298 °C. De um modo geral, verifica-se que as membranas de base Dex-IEMA têm estabilidades térmicas superiores às membranas de base Dex-AM. De entre os reticulantes de base LA, a introdução do PLA-PNT-AM (Mem F e Mem M) contribui para um decréscimo da estabilidade térmica das membranas (menores valores de $T_{5\%}$ e $T_{10\%}$). Este facto poderá estar relacionado com a estrutura em estrela deste reticulante, que poderá dar origem a uma membrana menos coesa e com menor estabilidade térmica. Neste caso, verifica-se que a introdução do PEG-DA nas membranas contribui para uma melhoria significativa da estabilidade térmica. Todas as outras membranas possuem estabilidade térmica muito semelhante.

As curvas de fluxo de calor para as membranas preparadas no decorrer do trabalho encontram-se na Figura 31 (as membranas de base Dex-IEMA (A) e as de base Dex-AM (B)).

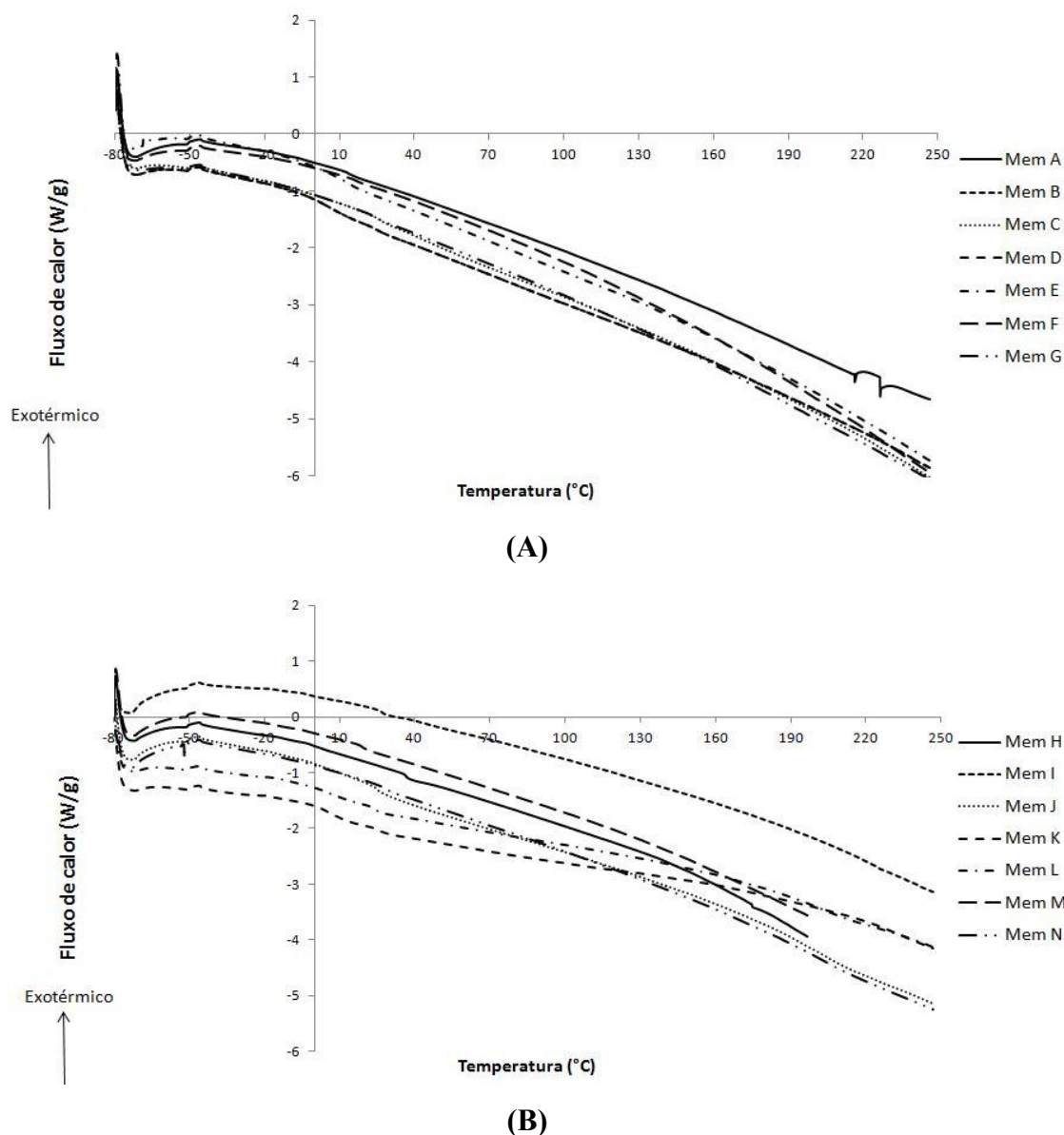


Figura 31: Curvas de fluxo de calor para as membranas de base Dex-IEMA (Mem A, Mem B, Mem C, Mem D, Mem E, Mem F e Mem G) **(A)** e de base Dex-AM (Mem H, Mem I, Mem J, Mem K, Mem L, Mem M e Mem N) **(B)**.

As curvas de fluxo de calor apresentadas na Figura 31 indicam que as membranas têm uma natureza amorfa, tal como era expectável, tendo em conta que são materiais reticulados. Em alguns casos foi possível determinar a T_g , cujos valores são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: T_g das membranas obtidas por DSC.

Material	T_g (°C)
Mem A	227
Mem H	36

Mem I	27
Mem J	25
Mem K	5
Mem L	23
Mem M	19

Ao compararmos a Mem A, composta somente por Dex-IEMA, e a Mem H, composta por Dex-AM, verificamos que a primeira tem uma T_g muito mais elevada que a segunda. No Dex-IEMA, a ligação que se forma entre os grupos $-OH$ do dextrano e o grupo isocianato do IEMA é uma ligação uretana, ao passo que no Dex-AM, a ligação formada é do tipo éster. Desta forma, na rede reticulada da Mem A predominam as ligações uretana, e na Mem H predominam as ligações éster. Sabe-se que as ligações uretana são passíveis de estabelecer ligações por pontes de hidrogénio entre si, o que leva a um maior empacotamento das cadeias poliméricas onde estas se encontram, com conseqüente redução do volume livre entre cadeias. Esta pode ser a causa para o valor mais elevado da T_g apresentado pela Mem A. Outro fator que também poderá influenciar a T_g é a presença de água no sistema, que pode atuar como plastificante dos sistemas de base dextrano [79]. De facto, olhando para a espectro de FTIR da Mem H (Figura 28) é possível verificar uma banda alargada ($3700-2970\text{ cm}^{-1}$), que poderá corresponder à presença de água na membrana. Tal não acontece para a membrana Mem A.

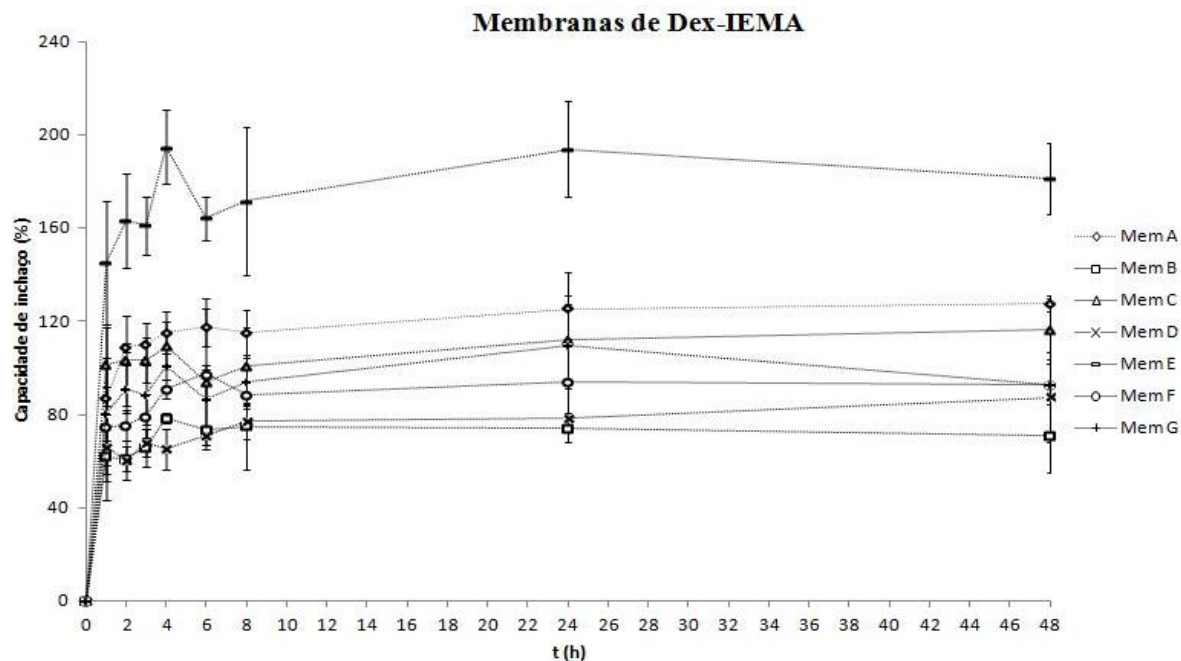
Comparando agora as membranas de base Dex-AM com os diferentes reticulantes, verifica-se que todas elas têm uma T_g mais baixa do que a verificada para a membrana produzida somente com o dextrano modificado, o que indica que os reticulantes de base LA podem de alguma forma atuar como plastificantes das membranas. A diminuição mais acentuada verificou-se quando se utilizou o PLA-PCL-AM.

Estas membranas ao serem utilizadas para regeneração do nervo, deveriam ter uma T_g inferior à temperatura fisiológica. De acordo com os resultados, as membranas constituídas por Dex-AM apresentam-se promissoras no que respeita a esta propriedade.

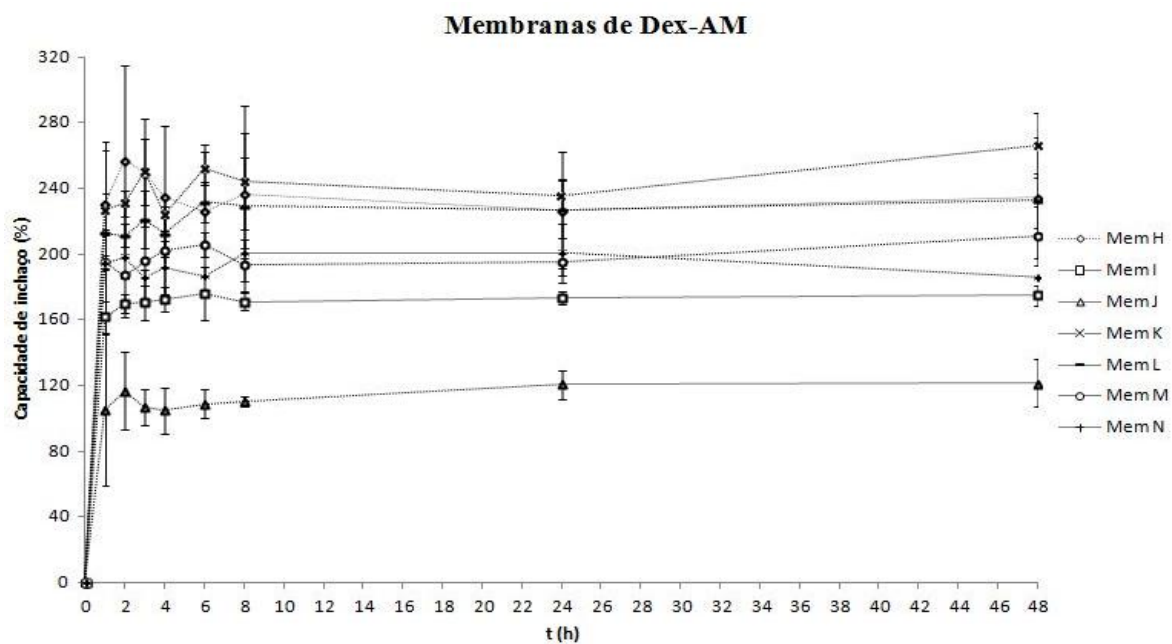
3.4. Estudo da capacidade de inchaço da membrana

A capacidade de inchaço permite inferir acerca da hidrofiliidade/hidrofobicidade dos materiais. Para fazer a determinação desta propriedade, as membranas em estudo foram imersas em água destilada e colocadas numa estufa a $37\text{ }^\circ\text{C}$.

Os gráficos de capacidade de inchaço vs tempo para as diferentes membranas em estudo são apresentados na Figura 32 (membranas de base Dex-IEMA **(A)** e membranas de base Dex-AM **(B)**). Na Tabela 14 são apresentados os valores de capacidade de inchaço máximos observados para cada uma das membranas.



(A)



(B)

Figura 32: Capacidade de inchaço das membranas constituídas por Dex-IEMA (Mem A, Mem B, Mem C, Mem D, Mem E, Mem F e Mem G **(A)** e das membranas constituídas por Dex-AM (Mem H, Mem I, Mem J, Mem K, Mem L, Mem M e Mem N) **(B)**, a 37 °C, durante 48h.

Tabela 14: Capacidade de inchaço máxima das membranas constituídas por Dex-IEMA e Dex-AM.

Membranas	Constituição	Capacidade de inchaço máxima (%)
Mem A	Dex-IEMA	128 ± 3
Mem B	Dex-IEMA+PLA-PEG-AM	71 ± 16
Mem C	Dex-IEMA+PLA-PEG-AM+PEG-DA	117 ± 13
Mem D	Dex-IEMA+PLA-PCL-AM	88 ± 19
Mem E	Dex-IEMA+PLA-PCL-AM+PEG-DA	181 ± 15
Mem F	Dex-IEMA+PLA-PNT-AM	93 ± 9
Mem G	Dex-IEMA+PLA-PNT-AM+PEG-DA	93 ± 9
Mem H	Dex-AM	234 ± 37
Mem I	Dex-AM+PLA-PEG-AM	175 ± 6
Mem J	Dex-AM+PLA-PEG-AM+PEG-DA	122 ± 14
Mem K	Dex-AM+PLA-PCL-AM	266 ± 19
Mem L	Dex-AM+PLA-PCL-AM+PEG-DA	233 ± 17
Mem M	Dex-AM+PLA-PNT-AM	211 ± 18
Mem N	Dex-AM+PLA-PNT-AM+PEG-DA	186 ± 1

Através dos gráficos apresentados na Figura 32 é possível verificar que todas as membranas atingem o equilíbrio no que respeita à capacidade de inchaço após 2 a 3 horas de imersão.

De um modo geral, através da **Tabela 14**, verifica-se que as membranas que contêm na sua formulação o Dex-IEMA têm capacidades de inchaço mais baixas do que as preparadas a partir do Dex-AM. Tal facto poderá dever-se ao estabelecimento das ligações de hidrogénio através das ligações uretana, que levam a uma maior compactação da rede reticulada, dificultando a entrada da água na membrana, com consequente redução da sua capacidade de inchaço.

A introdução de PLA-PCL-AM na formulação das membranas (Mem D; Mem E e Mem K; Mem L) leva a um aumento da capacidade de inchaço em ambas as séries de membranas, quando comparado com a introdução de PLA-PEG-AM (Mem B; Mem C e Mem I; Mem J). Este resultado pode parecer algo contraditório, uma vez que sendo o PEG uma molécula mais hidrofílica que o PCL, esperar-se-ia que a introdução do PLA-PEG-AM nas membranas contribuísse para um aumento da hidrofiliabilidade das mesmas, com

consequente aumento da capacidade de inchaço. No entanto, os dados de DSC referentes aos reticulantes mostram que o PLA-PCL-AM tem uma T_g significativamente mais baixa que o PLA-PEG-AM, podendo este conferir uma maior mobilidade às membranas onde está inserido. Desta forma, torna-se mais fácil à água penetrar no interior das membranas. O mesmo efeito poderá explicar os resultados para as membranas contendo PLA-PNT-AM (Mem F; Mem G e Mem M; Mem N), que apresentam uma maior capacidade de inchaço do que as que contêm PLA-PEG-AM (Mem B; Mem C e Mem I; Mem J). Todavia, uma conclusão efetiva não pode ser tirada neste caso, na medida em que não foi possível determinar a T_g do PLA-PNT-AM. A introdução de PEG-DA na formulação mostrou aumentar a capacidade de inchaço das membranas Mem C face à Mem B e da Mem E face à Mem D. De salientar ainda que, excetuando a Mem E e a Mem K, todas as outras membranas contendo reticulantes de base LA mostraram ter capacidade de inchaço inferior às das membranas sem reticulante. Este facto pode estar relacionado com o facto de os reticulantes de base LA terem alguma hidrofobicidade, o que pode também levar a um aumento da hidrofobicidade das membranas.

3.5. Degradação hidrolítica das membranas *in vitro*

Uma das principais características de um material para ser aplicado em regeneração do nervo é a sua degradação quando em contacto com fluidos biológicos. Assim sendo, foram levados a cabo testes de degradação hidrolítica *in vitro*, utilizando um tampão fosfato de pH=7,4 para simular os fluidos biológicos. Os testes decorreram a 37 °C.

No gráfico da Figura 33 está representada a perda de massa em função do tempo, para as membranas de base Dex-IEMA e Dex-AM, respetivamente.

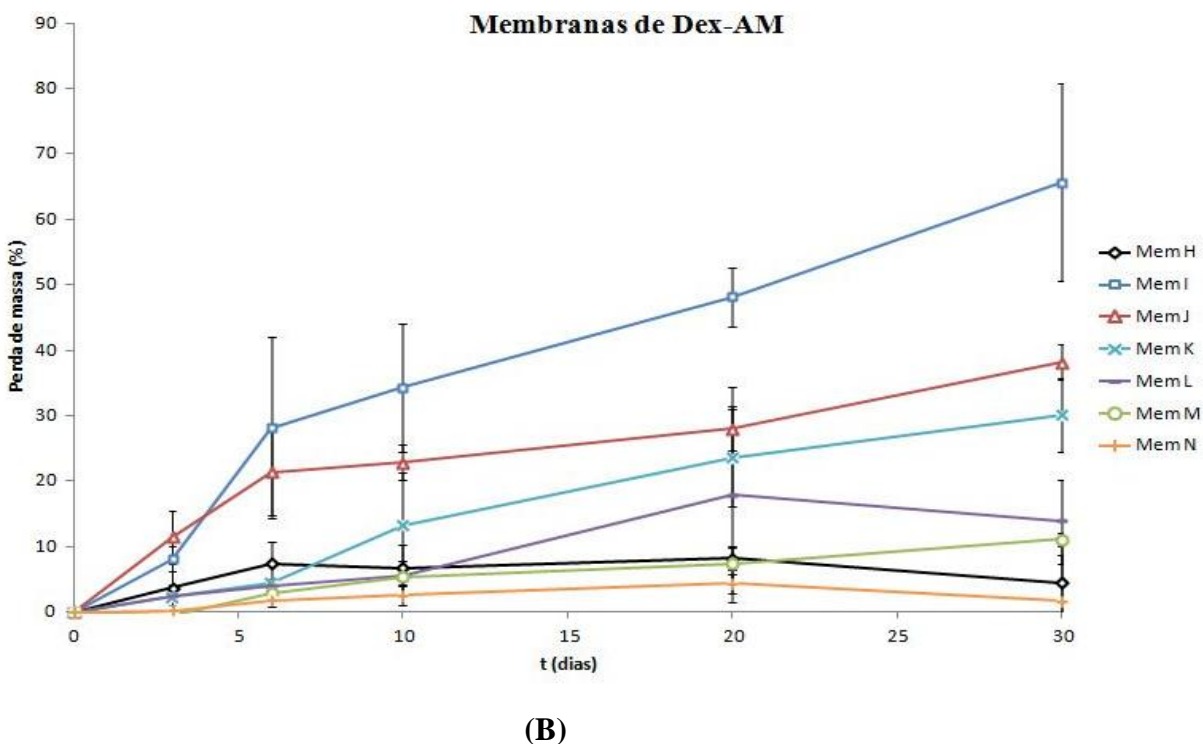
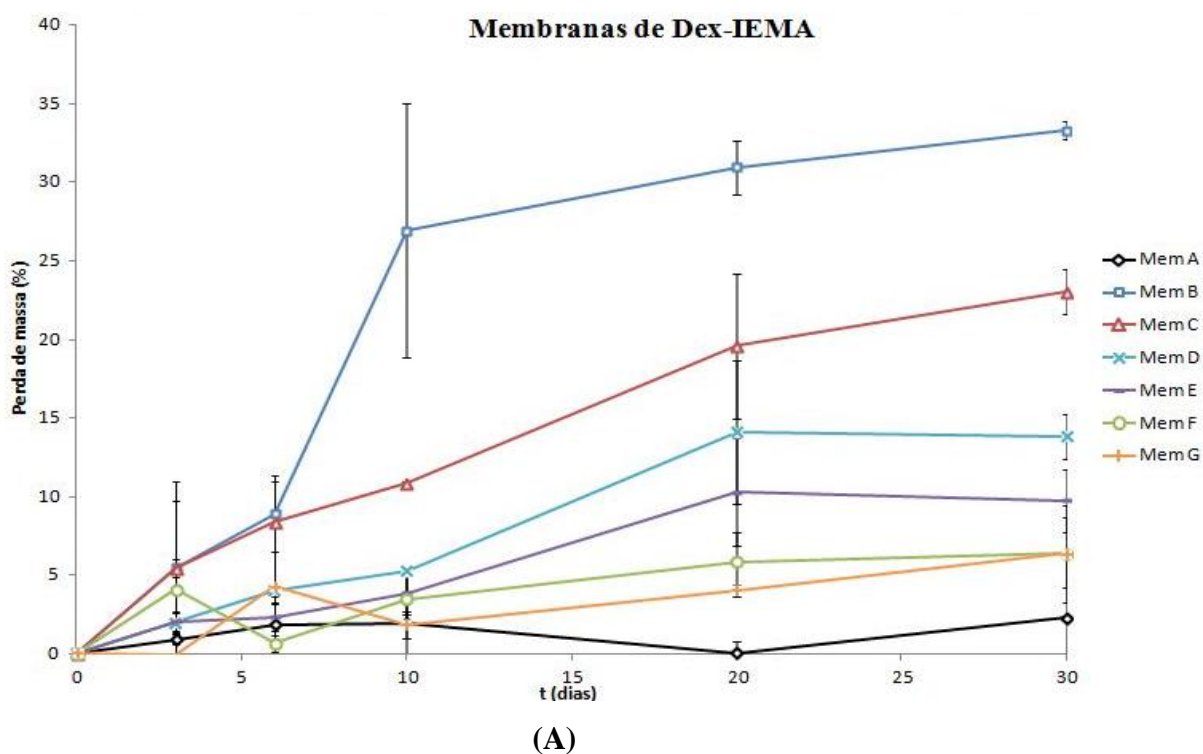


Figura 33: Testes de degradação das membranas constituídas por Dex-IEMA (Mem A, Mem B, Mem C, Mem D, Mem E, Mem F e Mem G **(A)**) e das membranas constituídas por Dex-AM (Mem H, Mem I, Mem J, Mem K, Mem L, Mem M e Mem N **(B)**), a 37 °C, durante 30 dias.

Tabela 15: Perda de massa após 30 dias das membranas constituídas por Dex-IEMA e Dex-AM.

Membranas	Constituição	Perda de massa após 30 dias (%)
Mem A	Dex-IEMA	2 ± 4
Mem B	Dex-IEMA+PLA-PEG-AM	33 ± 0,6
Mem C	Dex-IEMA+PLA-PEG-AM+PEG-DA	23 ± 2
Mem D	Dex-IEMA+PLA-PCL-AM	14 ± 1
Mem E	Dex-IEMA+PLA-PCL-AM+PEG-DA	10 ± 2
Mem F	Dex-IEMA+PLA-PNT-AM	6 ± 2
Mem G	Dex-IEMA+PLA-PNT-AM+PEG-DA	6 ± 3
Mem H	Dex-AM	4 ± 7
Mem I	Dex-AM+PLA-PEG-AM	66 ± 15
Mem J	Dex-AM+PLA-PEG-AM+PEG-DA	38 ± 3
Mem K	Dex-AM+PLA-PCL-AM	30 ± 6
Mem L	Dex-AM+PLA-PCL-AM+PEG-DA	14 ± 6
Mem M	Dex-AM+PLA-PNT-AM	11 ± 1
Mem N	Dex-AM+PLA-PNT-AM+PEG-DA	2 ± 7

De um modo geral, através dos gráficos da Figura 33, é possível verificar que todas as membranas começam a ter uma perda de massa significativa após 10 dias dos testes iniciarem.

Ao comparar as perdas de massa das membranas à base de Dex-IEMA (Mem A, Mem B, Mem C, Mem D, Mem E, Mem F, Mem G) com as membranas à base de Dex-AM (Mem H, Mem I, Mem J, Mem K, Mem L, Mem M, Mem N), pode concluir-se que estas últimas apresentam uma perda de massa mais elevada. Esta diferença pode ser justificada pelo tipo de ligação do dextrano modificado. As ligações éster presentes na cadeia do Dex-AM podem contribuir para uma maior degradação das membranas em PBS. De salientar ainda que as membranas de base Dex-AM têm T_g abaixo de 37 °C o que implica que, à temperatura a que foi feito o teste de degradação hidrolítica, as membranas apresentavam alguma mobilidade das suas cadeias poliméricas, permitindo uma maior facilidade de penetração do meio de degradação no seu interior.

Verifica-se ainda que com a introdução dos reticulantes de base LA, nas membranas, houve um aumento da percentagem de perda de massa, tanto para as de base Dex-IEMA como para as de base Dex-AM, à exceção da Mem N. Uma vez que os materiais de base LA têm elevada propensão para degradar em meio fisiológico, a sua introdução nas membranas potencia também a degradação das mesmas. A inclusão de PEG-DA nas membranas levou a uma ligeira diminuição da perda de massa (Mem B vs Mem C; Mem D vs Mem E; Mem F vs Mem G; Mem I vs Mem J; Mem K vs Mem L; Mem M vs Mem N) o que pode estar relacionado com o facto de o PEG, *per si*, ser uma molécula que não degrada em meio fisiológico. Tendo em conta os resultados, pode dizer-se que as propriedades de degradação hidrolítica das membranas podem ser facilmente alteradas, por mudanças na sua formulação.

4. CONCLUSÕES E TRABALHO FUTURO

Neste trabalho foram preparadas com sucesso membranas de base dextrano, a partir de dextrano modificado com ligações duplas e de diferentes reticulantes de base LA.

A análise química (FTIR e ^1H RMN) realizada aos dextransos modificados e aos reticulantes de base LA revelou que estes foram sintetizados com sucesso.

Também as membranas foram analisadas por FTIR tendo-se observado a ausência das bandas correspondentes às ligações duplas no seu espectro, podendo concluir-se que estas foram preparadas com sucesso. De salientar que as membranas de base Dex-AM apresentam uma banda alargada na zona dos $-\text{OH}$, o que indica que apresentam água na sua constituição. Esta água pode funcionar como plastificante das membranas, facto este que foi de alguma forma corroborado pelas T_g (<37 °C) obtidas para estes materiais. Relativamente à capacidade de inchaço, verificou-se que as membranas de Dex-IEMA tinham menores valores do que os apresentados pelas membranas de Dex-AM. Foi ainda possível verificar que a introdução dos reticulantes de base LA levou a uma diminuição da capacidade de inchaço. Por forma a ser aplicado na regeneração do nervo, o material deve ser hidrofílico, mas não deve apresentar valores muito elevados de capacidade de inchaço, de forma a não afetar os tecidos circundantes (e.g., vasos sanguíneos) com o aumento de volume. Desta forma, as membranas preparadas a partir do Dex-IEMA são as mais indicadas para a aplicação em estudo neste trabalho. No que concerne à degradação *in vitro* das membranas, verifica-se que as de base Dex-AM têm uma maior propensão para serem degradadas. Também a inclusão dos reticulantes de base LA leva a um aumento da perda de massa. Tendo em conta que para a aplicação em regeneração de nervo periférico a degradação do material deve ser feita de acordo com o crescimento do nervo, é importante que este não degrade de forma muito rápida. Desta forma, as membranas constituídas por Dex-IEMA e por PLA-PCL-AM são os materiais mais promissores.

Uma vez que neste trabalho se obtiveram materiais promissores em termos de propriedades térmicas, capacidade de inchaço e degradação hidrolítica *in vitro* seria agora importante fazer ensaios de citotoxicidade *in vitro*, por forma a avaliar se estes materiais

teriam algum efeito nocivo sobre as células. Após a realização destes testes, seria interessante produzir tubos a partir das formulações mais promissoras aqui apresentadas. Seria também importante produzir materiais a partir de dextrano com outros pesos moleculares por forma a verificar de que forma este parâmetro influencia as propriedades dos materiais.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] K. S. Saladin, *Human Anatomy*. 2008.
- [2] A. S. and H. N. Sapru, "Overview of the nervous system," in *Essential Neuroscience*, 2006, pp. 3–5.
- [3] A. S. and H. N. Sapru, "The autonomic nervous system," in *Essential Neuroscience*, 2006, pp. 382–395.
- [4] K. S. Topp and B. S. Boyd, "Structure and Biomechanics of Peripheral Nerves : Nerve Responses to Physical Stresses and Implications for Physical Therapist Practice," vol. 86, no. 1, pp. 92–109, 2002.
- [5] W. W. Campbell, "Evaluation and management of peripheral nerve injury," *Clin. Neurophysiol.*, vol. 119, pp. 1951–1965, 2008.
- [6] S. Lee and S. Wolfe, "Peripheral nerve injury and repair," *J. Am. Acad. Orthop. Surg.*, vol. 8, no. 4, pp. 243–252, 2000.
- [7] "SEER Training." [Online]. Available: <http://training.seer.cancer.gov/anatomy/nervous/tissue.html>. [Accessed: 04-Apr-2016].
- [8] C. J. L. and P. W. O. Antonio J. Flores, "Anatomy and Physiology of Peripheral Nerve Injury and Repair," *Am. J. Orthop.*, pp. 167–173, 2000.
- [9] D. B. and J. D. Harvey Lodish, Arnold Berk, S Lawrence Zipursky, Paul Matsudaira, "Overview of Neuron Structure and Function," in *Molecular Cell Biology*, New York, 2000.
- [10] C. E. Schmidt and J. B. Leach, "Neural tissue engineering: strategies for repair and regeneration," *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 5, pp. 293–347, 2003.
- [11] F. J. Rodríguez, A. Valero-Cabré, and X. Navarro, "Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury," *Drug Discovery Today: Disease Models*, vol. 1, no. 2. pp. 177–185, 2004.
- [12] T. N. Satoshi Ichihara, Yuji Inada, "Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts," *Int. J. Care Inj.*, pp. 29–39, 2008.
- [13] X. Navarro, M. Vivó, and A. Valero-Cabré, "Neural plasticity after peripheral nerve injury and regeneration," *Prog. Neurobiol.*, vol. 82, no. 4, pp. 163–201, 2007.
- [14] L. J.-S. Yang, "Clinical Gate: Fastest Clinical Insight Engine." [Online]. Available: <http://clinicalgate.com/acute-nerve-injuries/>. [Accessed: 21-Mar-2016].
- [15] Michael D. Ehlers, "Deconstructing the axon: Wallerian degeneration and the ubiquitin–proteasome system," *Trends Neurosci.*, vol. 27, no. 1, pp. 2–6, 2004.
- [16] I. Allodi, E. Udina, and X. Navarro, "Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level," *Prog. Neurobiol.*, vol. 98, no. 1, pp. 16–37, 2012.
- [17] W. Daly, L. Yao, D. Zeugolis, A. Windebank, and A. Pandit, "A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration : bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery," *J. R. Soc. Interface*, vol. 9, pp. 202–221, 2012.
- [18] X. Gu, F. Ding, Y. Yang, and J. Liu, "Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration," *Prog. Neurobiol.*, vol. 93, no. 2, pp. 204–230, 2011.

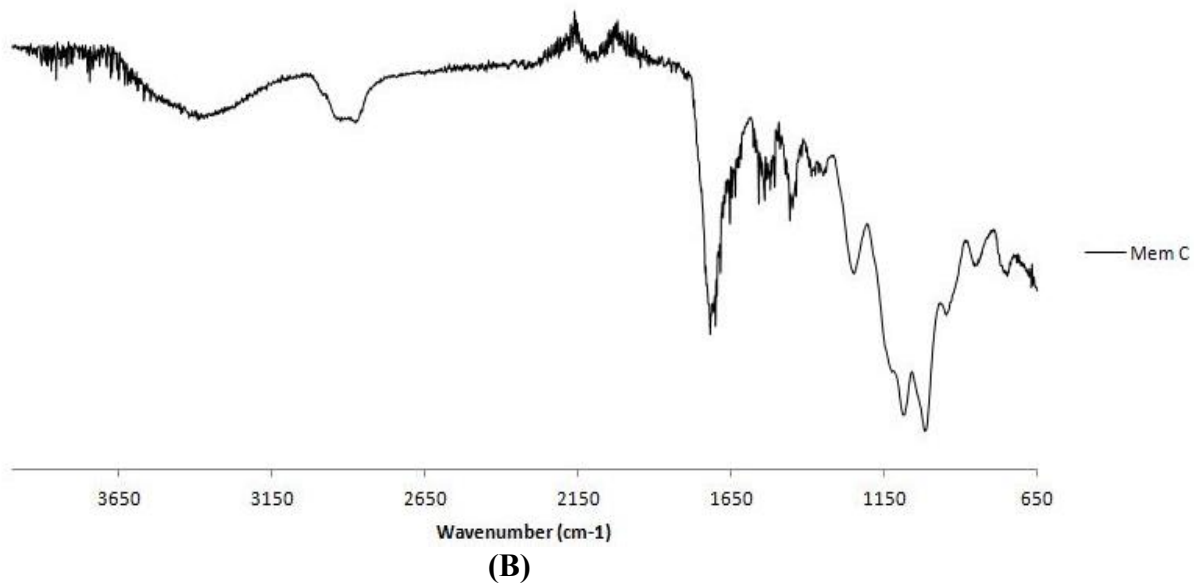
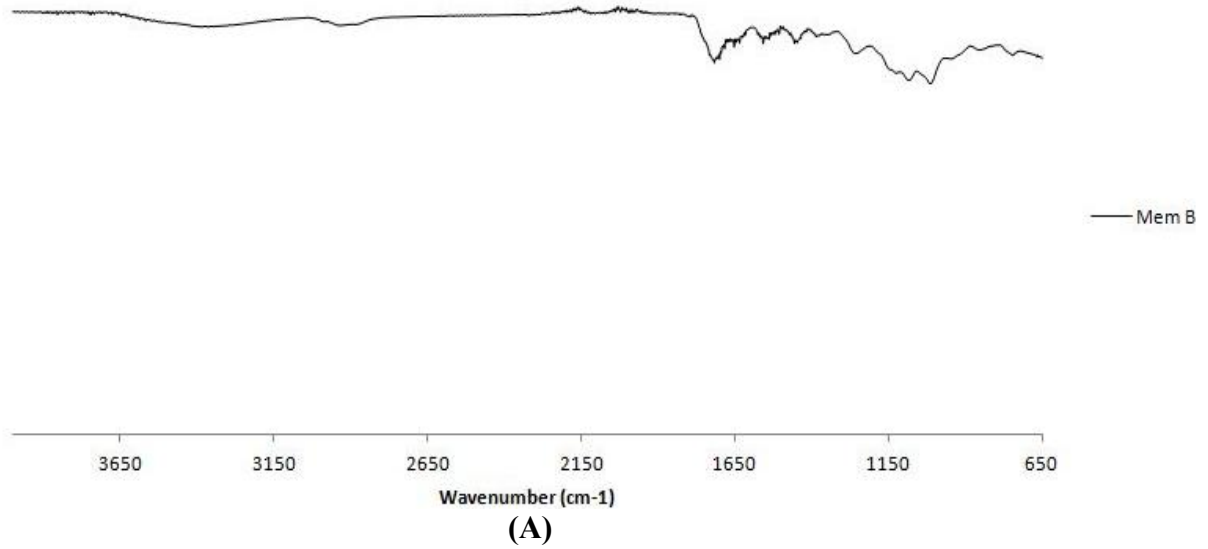
- [19] E. O. Johnson and P. N. Soucacos, "Nerve repair : Experimental and clinical evaluation of biodegradable artificial nerve guides," *Int. J. Care Inj.*, pp. 30–36, 2008.
- [20] E. O. Johnson, A. B. Zoubos, and P. N. Soucacos, "Regeneration and repair of peripheral nerves," *Int. J. Care Inj.*, pp. 24–29, 2005.
- [21] F. C. and J. Y. Dianna Y. Nguyen, Richard T. Tran, "Tissue-Engineered Peripheral Nerve Guide Fabrication Techniques," in *Nerves and Nerve iljuries*, 2015, pp. 971–992.
- [22] G. C. W. de Ruiter, M. J. A. Malessy, M. J. Yaszemski, A. J. Windebank, and R. J. Spinner, "Designing ideal conduits for peripheral nerve repair," *Neurosurg. Focus*, vol. 26, no. 2, pp. 1–15, 2009.
- [23] X. Jiang, S. H. Lim, H. Q. Mao Hai-Quan, and S. Y. Chew, "Current applications and future perspectives of artificial nerve conduits," *Exp. Neurol.*, vol. 223, no. 1, pp. 86–101, 2010.
- [24] S. P. Frostick, Q. Yin, and G. J. Kemp, "Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration," *Microsurgery*, vol. 18, pp. 397–405, 1998.
- [25] F. Z. Maria Siemionow, Mehmet Bozkurt, "Regeneration and repair of peripheral nerves with different biomaterials: Review," *Repair Peripher. Nerves*, vol. 30, no. 3, pp. 574–588, 2010.
- [26] S. Geuna, P. Tos, P. Titolo, D. Ciclamini, T. Beningo, and B. Battiston, "Update on nerve repair by biological tubulization," *J. Brachial Plex. Peripher. Nerve Inj.*, vol. 9, pp. 1–6, 2014.
- [27] P. Konofaos, "Nerve Repair by Means of Tubulization : Past , Present , Future," *J. Reconstr. Microsurg.*, vol. 29, pp. 149–164, 2013.
- [28] L. S. N. and C. T. L. Bret D. Ulery, "Biomedical applications of biodegradable polymers," *J Polym Sci, Part B Polym Phys*, vol. 49 (12), pp. 832–864, 2011.
- [29] S. Wang and L. Cai, "Polymers for fabricating nerve conduits," *Int. J. Polym. Sci.*, pp. 1–20, 2010.
- [30] D. Press, "Peripheral nerve conduits : technology update," pp. 405–424, 2014.
- [31] J. R. G. A.C. Fonseca, P. Ferreira, R.A. Cordeiro, P.V. Mendonça and and J. F. J. C. M.H. Gil, *Drug Delivery Systems for Predictive Medicine: Polymers as Tools for Advanced Applications*. 2013.
- [32] S. Mizrahy and D. Peer, "Polysaccharides as building blocks for nanotherapeutics.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 41, no. 7, pp. 2623–40, 2012.
- [33] P. B. Malafaya, G. A. Silva, and R. L. Reis, "Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 59, no. 4–5, pp. 207–233, 2007.
- [34] M. Rani, A. Agarwal, and Y. S. Negi, "Review: Chitosan based hydrogel polymeric beads - as drug delivery system," *BioResources*, vol. 5, no. 4, pp. 2765–2807, 2010.
- [35] J. H. Hamman, "Chitosan based polyelectrolyte complexes as potential carrier materials in drug delivery systems," *Mar. Drugs*, vol. 8, no. 4, pp. 1305–1322, 2010.
- [36] K. Nagpal, S. K. Singh, and D. N. Mishra, "Chitosan nanoparticles: a promising system in novel drug delivery.," *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).*, vol. 58, no. 11, pp. 1423–1430, 2010.
- [37] A. D. Augst, H. J. Kong, and D. J. Mooney, "Alginate hydrogels as biomaterials," *Macromol. Biosci.*, vol. 6, no. 8, pp. 623–633, 2006.
- [38] A. S. Hoffman, "Selecting the right polymer for biomaterial applications," in *Polymers in Drug Delivery*, 2006.

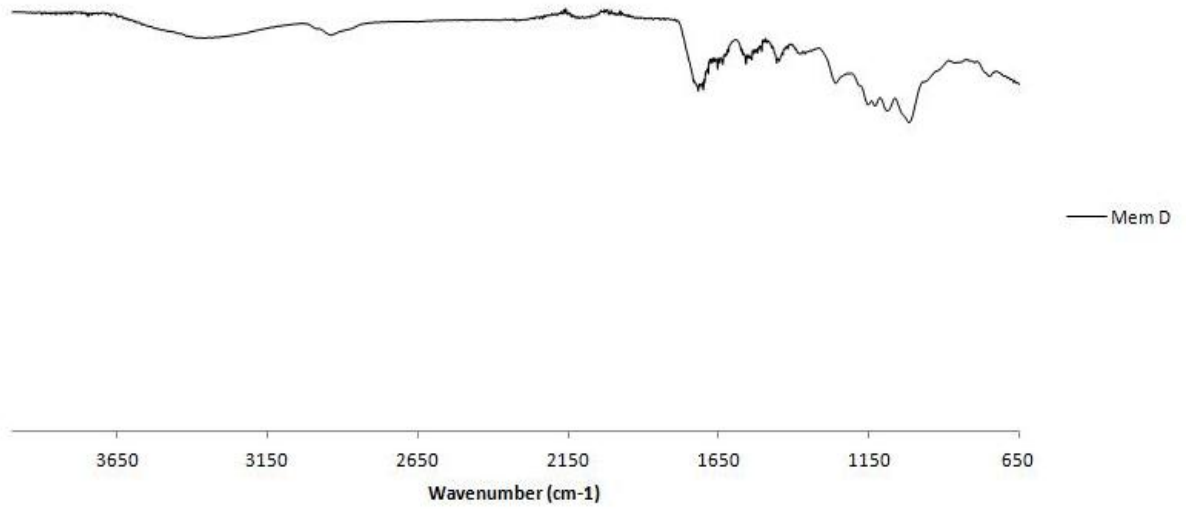
-
- [39] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery," *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.*, vol. 102, pp. 47–90, 2006.
- [40] L. S. Nair and C. T. Laurencin, "Biodegradable polymers as biomaterials," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 32, pp. 762–798, 2007.
- [41] S. Yoshii, M. Oka, M. Shima, M. Akagi, and A. Taniguchi, "Bridging a 30-mm nerve defect using collagen filaments," *Spine (Phila. Pa. 1976)*, vol. 28, pp. 467–474, 2003.
- [42] M. P. Lohmeyer J, Zimmermann S, Sommer B, Machens HG, Lange T, "Bridging peripheral nerve defects by means of nerve conduits," *Chirurg*, vol. 78(2), pp. 142–7, 2007.
- [43] A. Bozkurt, A. Boecker, J. Tank, H. Altinova, R. Deumens, C. Dabhi, R. Tolba, J. Weis, G. A. Brook, N. Pallua, and S. G. A. van Neerven, "Efficient bridging of 20 mm rat sciatic nerve lesions with a longitudinally micro-structured collagen scaffold," *Biomaterials*, vol. 75, pp. 112–122, 2016.
- [44] J. T. Wei Wang, Soichiro Itoh, Atsushi Matsuda, Shizuko Ichinose, Kenichi Shinomiya, Yuiro Hata, "Influences of mechanical properties and permeability on chitosan nano/microfiber mesh tubes as a scaffold for nerve regeneration," *J. Biomed. Mater. Res.*, pp. 557–566, 2007.
- [45] C. I. N. Ishikawa, Y. Suzuki, M. Ohta, H. Cho, S. Suzuki, M. Dezawa, "Peripheral nerve regeneration through the space formed by a chitosan gel sponge," *J. Biomed. Mater. Res.*, pp. 33–40, 2007.
- [46] K. Haastert-Talini, S. Geuna, L. B. Dahlin, C. Meyer, L. Stenberg, T. Freier, C. Heimann, C. Barwig, L. F. V. Pinto, S. Raimondo, G. Gambarotta, S. R. Samy, N. Sousa, A. J. Salgado, A. Ratzka, S. Wrobel, and C. Grothe, "Chitosan tubes of varying degrees of acetylation for bridging peripheral nerve defects," *Biomaterials*, vol. 34, no. 38, pp. 9886–9904, 2013.
- [47] C. T.-T. Francesca Ruini and G. C. Stefania Raimondo, Pierluigi Tos, Pierfrancesco Pugliese, Stefano Geuna, "Nerve guidance conduits based on bi-layer chitosan membranes for peripheral nerve regeneration," *Biomed. Sci. Eng.*, vol. 2:12, pp. 1–7, 2016.
- [48] K. Suzuki, Y. Suzuki, M. Tanihara, K. Ohnishi, T. Hashimoto, K. Endo, and Y. Nishimura, "Reconstruction of rat peripheral nerve gap without sutures using freeze-dried alginate gel," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 49, no. 4, pp. 528–533, 2000.
- [49] A. C. Fonseca, A. C. Serra, and J. F. J. Coelho, "Bioabsorbable polymers in cancer therapy: latest developments," *EPMA J.*, vol. 6, no. 1, p. 18, 2015.
- [50] S. Wang, A. C. A. Wan, X. Xu, S. Gao, H. Q. Mao, K. W. Leong, and H. Yu, "A new nerve guide conduit material composed of a biodegradable poly(phosphoester)," *Biomaterials*, vol. 22, no. 10, pp. 1157–1169, 2001.
- [51] A. L. D. and C. T. M. Jr, "Salvage of Sensation in a Hallux-to-Thumb Transfer by Nerve Tube Reconstruction," *Am. Soc. Surg. Hand*, vol. 31, no. 9, pp. 1495–1498, 2006.
- [52] E. H. W. and A. L. D. Gedge D. Rosson, "Motor nerve regeneration across a conduit," *Microsurgery*, pp. 107–114, 2008.
- [53] S. I. Nikolaev, A. R. Gallyamov, G. V. Mamin, and Y. A. Chelyshev, "Poly(ϵ -Caprolactone) nerve conduit and local delivery of vegf and fgf2 genes stimulate neuroregeneration," *Bull. Exp. Biol. Med.*, vol. 157, no. 1, pp. 155–158, 2014.
- [54] Z. H. Zhou, X. P. Liu, and L. H. Liu, "Preparation and Biocompatibility of Poly(L-
-

- lactide-co-glycolide) Scaffold Materials for Nerve Conduits,” *Des. Monomers Polym.*, vol. 11, no. 5, pp. 447–456, 2008.
- [55] S. hui Hsu, S. H. Chan, C. M. Chiang, C. Chi-Chang Chen, and C. F. Jiang, “Peripheral nerve regeneration using a microporous polylactic acid asymmetric conduit in a rabbit long-gap sciatic nerve transection model,” *Biomaterials*, vol. 32, no. 15, pp. 3764–3775, 2011.
- [56] C. O. Goulart, F. R. Pereira Lopes, Z. O. Monte, S. V. Dantas, A. Souto, J. T. Oliveira, F. M. Almeida, C. Tonda-Turo, C. C. Pereira, C. P. Borges, and A. M. B. Martinez, “Evaluation of biodegradable polymer conduits - poly(l-lactic acid) - for guiding sciatic nerve regeneration in mice,” *Methods*, vol. 99, pp. 28–36, 2016.
- [57] D. Yin, X. Wang, Y. Yan, and R. Zhang, “Preliminary studies on peripheral nerve regeneration using a new polyurethane conduit,” *J. Bioact. Compat. Polym.*, vol. 22, no. 2, pp. 143–159, 2007.
- [58] Y. Niu, K. C. Chen, T. He, W. Yu, S. Huang, and K. Xu, “Scaffolds from block polyurethanes based on poly(ϵ -caprolactone) (PCL) and poly(ethylene glycol) (PEG) for peripheral nerve regeneration,” *Biomaterials*, vol. 35, no. 14, pp. 4266–4277, 2014.
- [59] Y. Niu, L. Li, K. C. Chen, F. Chen, X. Liu, J. Ye, W. Li, and K. Xu, “Scaffolds from alternating block polyurethanes of poly(ϵ -caprolactone) and poly(ethylene glycol) with stimulation and guidance of nerve growth and better nerve repair than autograft,” *J. Biomed. Mater. Res. A*, vol. 103, no. 7, pp. 2355–64, 2015.
- [60] K. L. and G. X. S. Feng Xie, Qing Feng Li, Bin Gu, “In vitro and in vivo evaluation of a biodegradable chitosan–PLA composite peripheral nerve guide conduit material,” *Microsurgery*, vol. 30, no. 3, pp. 242–248, 2010.
- [61] W. Sufan, Y. Suzuki, M. Tanihara, K. Ohnishi, K. Suzuki, K. Endo, and Y. Nishimura, “Sciatic nerve regeneration through alginate with tubulation or nontubulation repair in cat,” *J. Neurotrauma*, vol. 18, no. 3, pp. 329–338, 2001.
- [62] J. H. L. Se Heang Oh, “Fabrication and characterization of hydrophilized porous PLGA nerve guide conduits by a modified immersion precipitation method,” *J. Biomed. Mater. Res. Part A*, pp. 530–538, 2006.
- [63] A. J. P. Henk J. Hoppen, Jan W. Leenslag, “Two-ply biodegradable nerve guide: basic aspects of design construction and biological performance,” *Biomaterials*, pp. 286–290, 1990.
- [64] S. Kehoe, X. F. Zhang, and D. Boyd, “FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy,” *Injury*, vol. 43, no. 5, pp. 553–572, 2012.
- [65] A. K. Thomas Heinze, Tim Liebert, *Esterification of Polysaccharides*, vol. 53, no. 9, 2013.
- [66] S. H. Kim, C. Y. Won, and C. C. Chu, “Synthesis and characterization of dextran-based hydrogel prepared by photocrosslinking,” *Carbohydr. Polym.*, vol. 40, no. 3, pp. 183–190, 1999.
- [67] J. F. Almeida, P. Ferreira, A. Lopes, and M. H. Gil, “Photocrosslinkable biodegradable responsive hydrogels as drug delivery systems,” *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 49, no. 5, pp. 948–954, 2011.
- [68] S. Kim and C. Chu, “Synthesis and characterization of dextran – methacrylate hydrogels and structural study by SEM,” 1999.
- [69] J. V. S. and T. V. Kari Hiltunen, Mika Harkonen, “Synthesis and Characterization of Lactic Acid Based Poly (ester - amide),” *Macromolecules*, vol. 29, pp. 8677–8682,

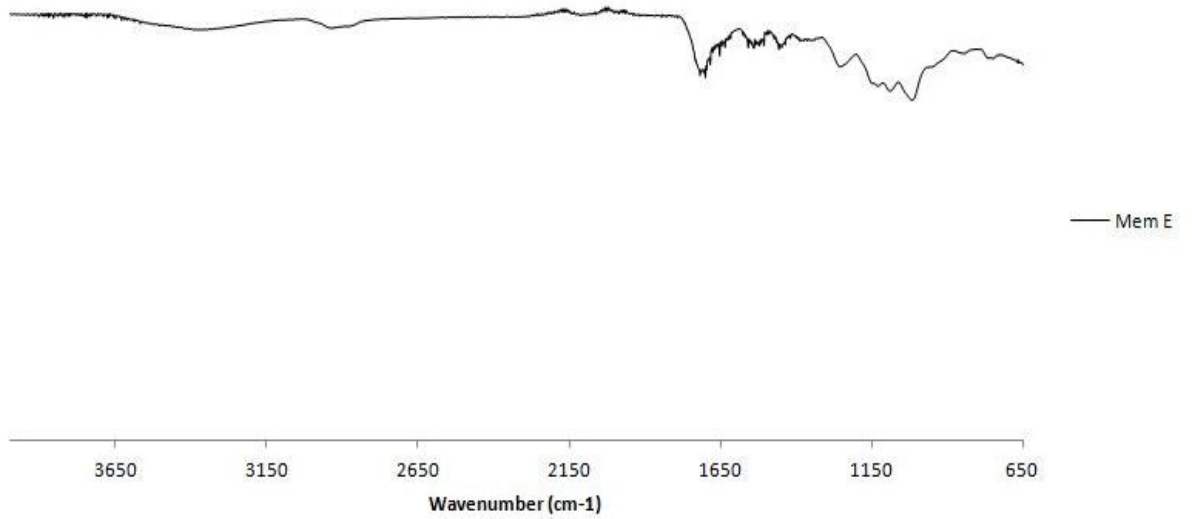
- 1996.
- [70] K. Hiltunen and J. V Seppa, “The Use of Different Diols in the Synthesis of Low-Molecular-Weight Lactic-Acid-Based Telechelic Prepolymers,” *J. Appl. Polym. Sci.*, vol. 67, pp. 1017–1023, 1998.
- [71] A. Sakakura, K. Kawajiri, T. Ohkubo, Y. Kosugi, and K. Ishihara, “Widely useful DMAP-catalyzed esterification under auxiliary base- and solvent-free conditions,” *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, no. 47, pp. 14775–14779, 2007.
- [72] A. J. R. Lasprilla, G. A. R. Martinez, B. H. Lunelli, A. L. Jardini, and R. M. Filho, “Poly-lactic acid synthesis for application in biomedical devices - A review,” *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no. 1, pp. 321–328, 2012.
- [73] A. S. Karikari, W. F. Edwards, J. B. Mecham, and T. E. Long, “Influence of peripheral hydrogen bonding on the mechanical properties of photo-cross-linked star-shaped poly(D,L-lactide) networks,” *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 5, pp. 2866–2874, 2005.
- [74] K. Gekko, “Thermal Analysis of Low Molecular Weight Dextran,” *Agric. Biol. Chem.*, vol. 42 (6), pp. 1287–1288, 1978.
- [75] N. M. Girouard, S. Xu, G. T. Schueneman, M. L. Shofner, and J. C. Meredith, “Site-Selective Modification of Cellulose Nanocrystals with Isophorone Diisocyanate and Formation of Polyurethane-CNC Composites,” *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, no. 2, p. A–J, 2016.
- [76] Y. Zhang and C.-C. Chu, “Thermal and mechanical properties of biodegradable hydrophilic-hydrophobic hydrogels based on dextran and poly (lactic acid).,” *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, vol. 13, no. 8, pp. 773–81, 2002.
- [77] I. Mironi-Harpaz, D. Y. Wang, S. Venkatraman, and D. Seliktar, “Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: Crosslinking efficiency versus cytotoxicity,” *Acta Biomater.*, vol. 8, no. 5, pp. 1838–1848, 2012.
- [78] C. G. Williams, A. N. Malik, T. K. Kim, P. N. Manson, and J. H. Elisseeff, “Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation,” *Biomaterials*, vol. 26, no. 11, pp. 1211–1218, 2005.
- [79] R. P. and S. G. Ring, “The physical chemistry of starch,” in *Polysaccharides: structural diversity and functional versatility*, 2004, pp. 591–604.

APÊNDICE A





(C)



(D)

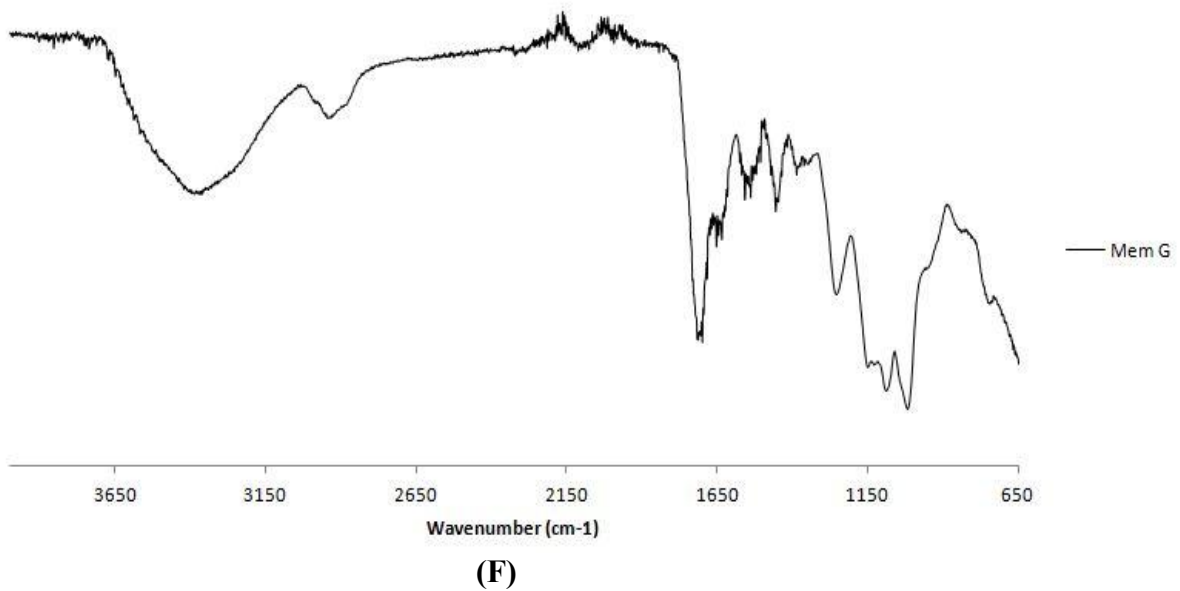
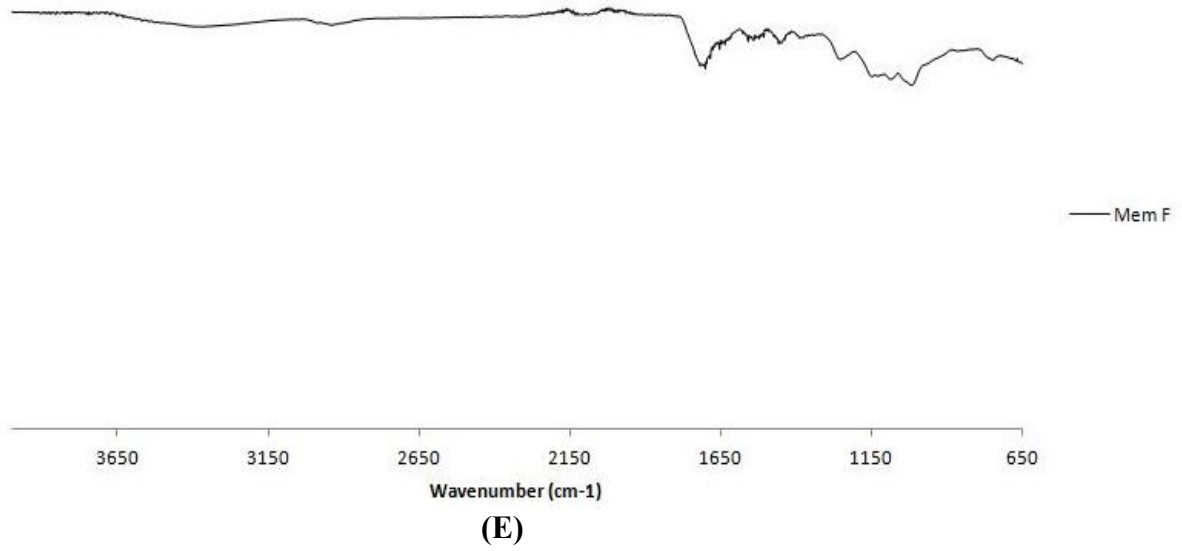
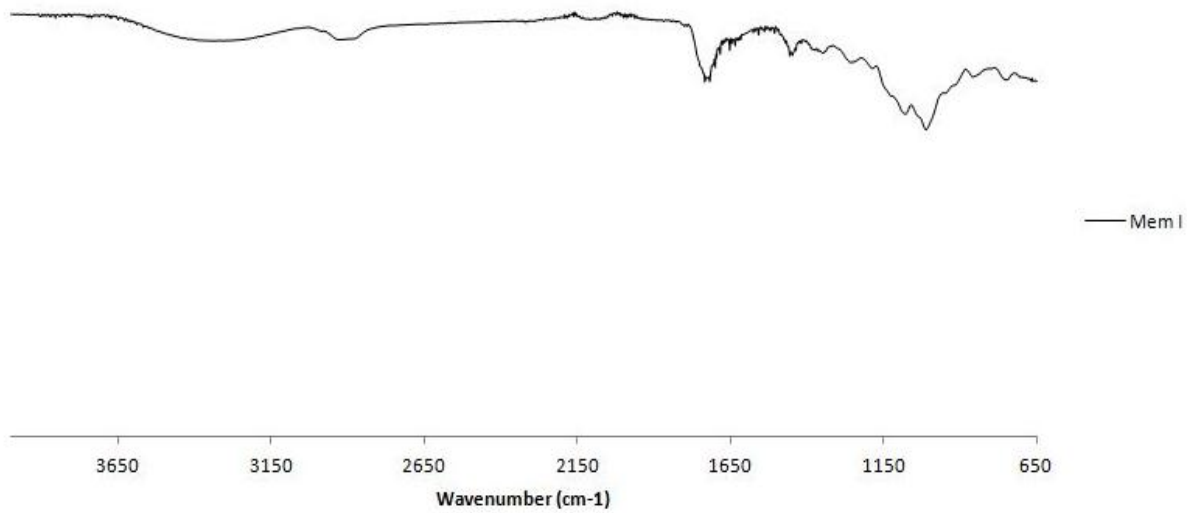
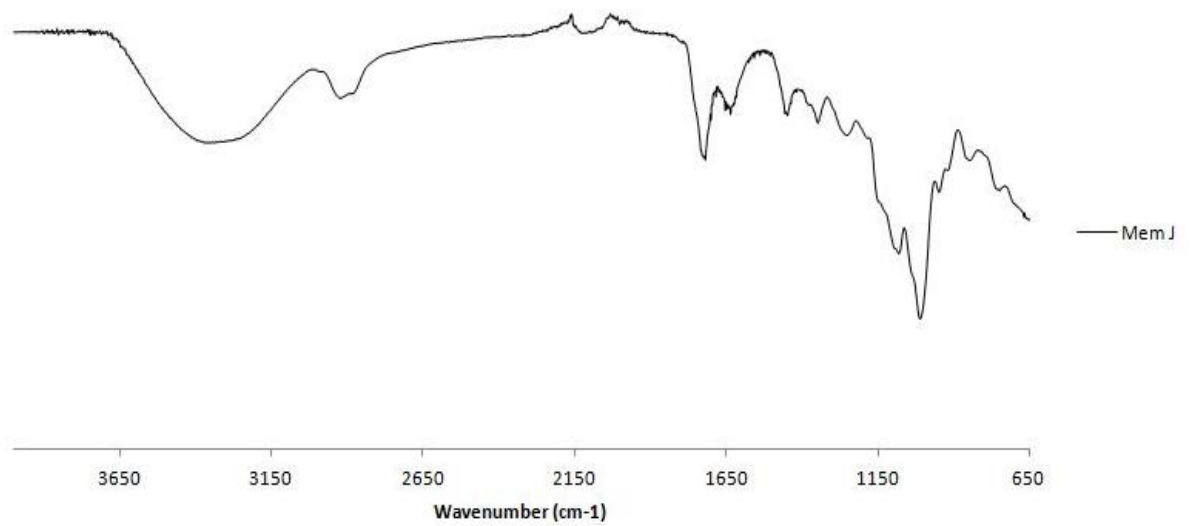


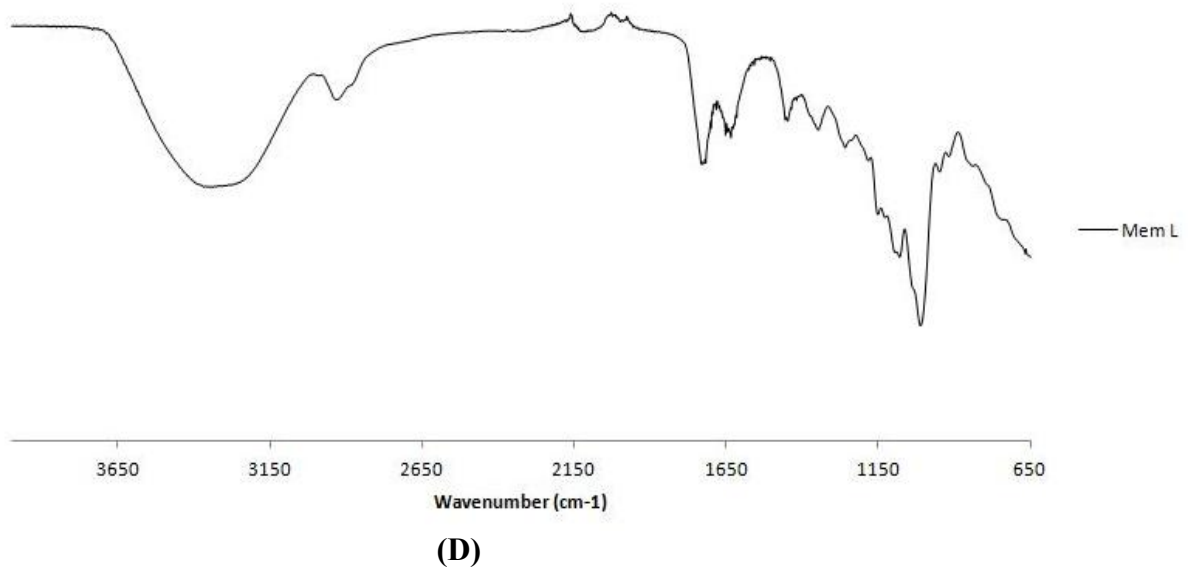
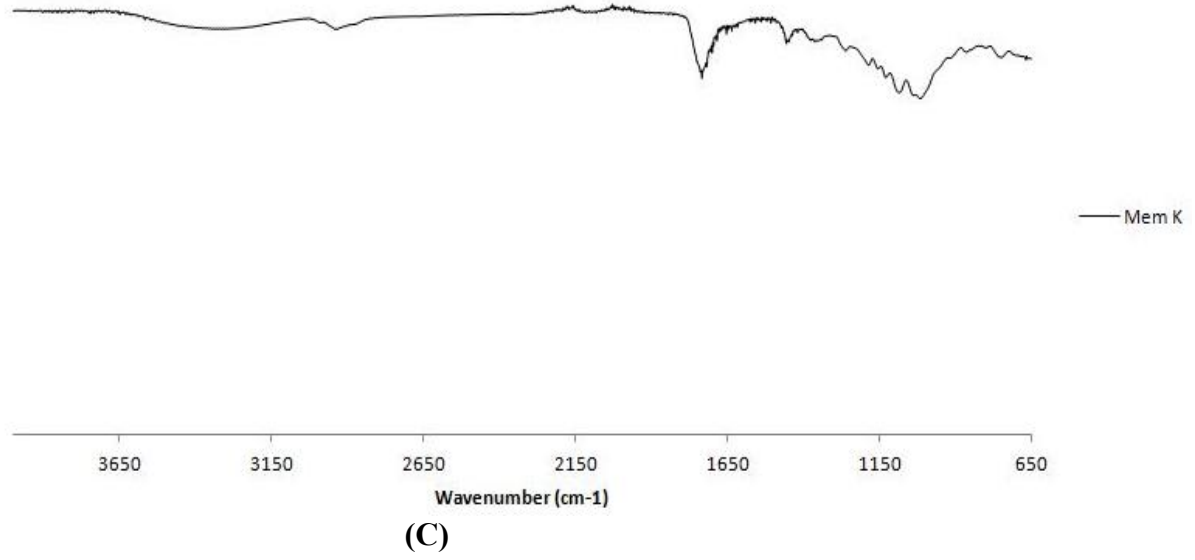
Figura A.1: Espectro de FTIR da Mem B (A), Mem C (B), Mem D (C), Mem E (D), Mem F (E) e Mem G (F).



(A)



(B)



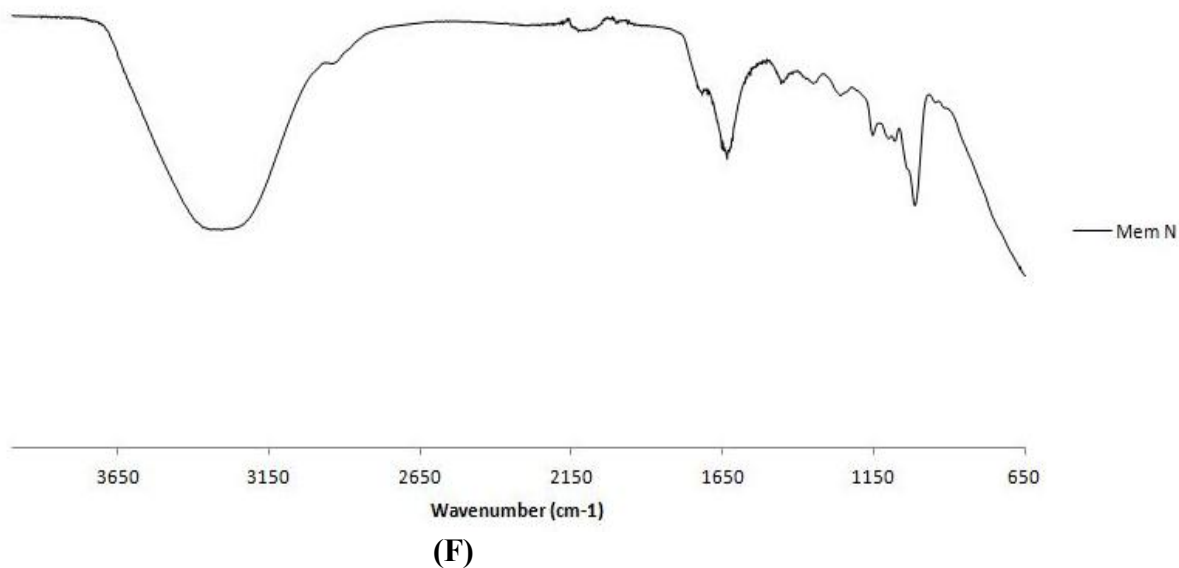
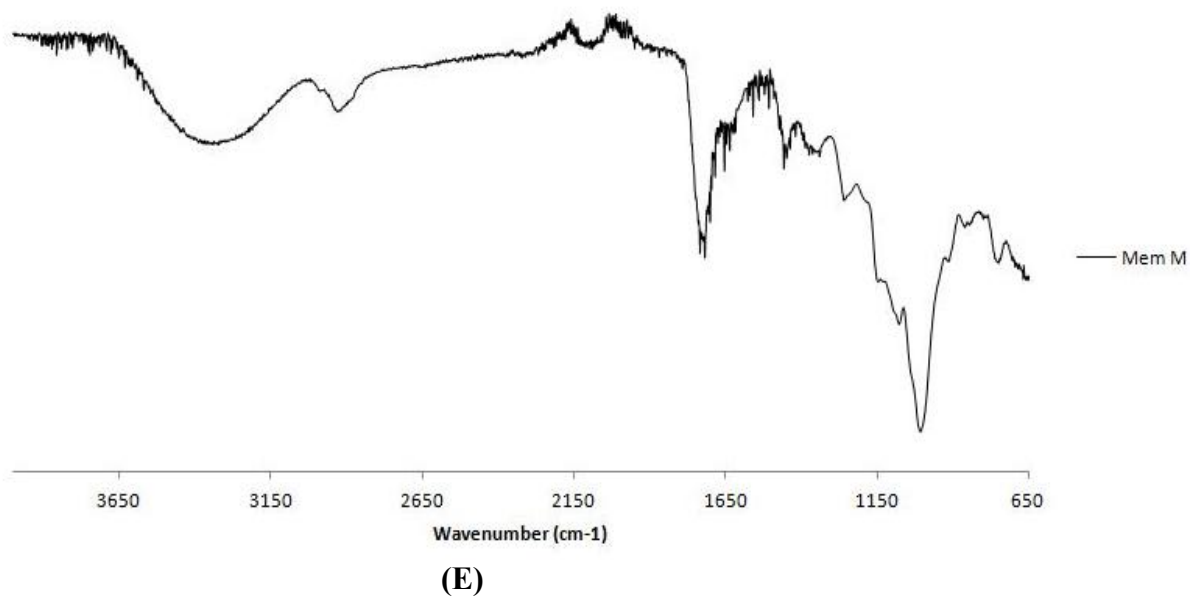


Figura A.2: Espectro de FTIR da Mem I (A), Mem J (B), Mem K (C), Mem L (D), Mem M (E) e Mem N (F).