



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**SÍNTESE DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS  
PCL/PLGA/NANOFIBRAS DE POLIPIRROL PARA APLICAÇÃO EM  
CONDUTO BIOCAMPATÍVEL PARA REGENERAÇÃO NERVOSA**

**CRISTINA LORENSKI FERREIRA**

**QUÍMICA LICENCIATURA E INDUSTRIAL**

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

**Porto Alegre**

**Março, 2017**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**SÍNTESE DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS  
PCL/PLGA/NANOFIBRAS DE POLIPIRROL PARA APLICAÇÃO EM  
CONDUTO BIOCAMPATÍVEL PARA REGENERAÇÃO NERVOSA**

**CRISTINA LORENSKI FERREIRA**

Química Licenciatura e Industrial

ORIENTADOR: PROF(a). DR(a). NARA REGINA DE SOUZA BASSO

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

*Projeto: Desenvolvimento de novos materiais e dispositivos para aplicação em medicina regenerativa.*

**Porto Alegre**

**Março, 2017**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

## SÍNTESE DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS PCL/PLGA/NANOFIBRAS DE POLIPIRROL PARA APLICAÇÃO EM CONDUTO BIOCAMPATÍVEL PARA REGENERAÇÃO NERVOSA

**CANDIDATA: CRISTINA LORENSKI FERREIRA**

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

**DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - ORIENTADORA**

### BANCA EXAMINADORA

**DRA. VANUSCA DALOSTO JAHNO - DO PÓS GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE MATERIAIS - UNIVERSIDADE FEEVALE**

**DRA. ROSANE ANGÉLICA LIGABUE - DO PGETEMA/FENG - PUCRS**

**PUCRS**

Campus Central

Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 103 - CEP: 90619-900

Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625

E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br

www.pucrs.br/feng

O acaso é uma palavra sem sentido. Nada pode existir sem causa.

*Voltaire*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais Dirceu da Silva Ferreira e Helena Lorenski Ferreira, ao meu namorado Felipe Linhares, a minha irmã Andreza Lorenski Ferreira, ao meu afilhado Artur Ferreira Peixoto e ao meu cunhado Junior de Barcelos Peixoto. Obrigada pelo amor e apoio em todos os momentos da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Felipe, meu namorado, pelo amor e companheirismo, estando ao meu lado em todos os momentos.

Aos meus pais, Dirceu e Helena e à minha irmã, Andreza, por serem meu porto seguro; família, base de tudo.

À Professora Nara Basso, exemplo de profissional e de ser humano. Agradeço por ter me orientado com competência e carinho.

À professora Rosane Ligabue, pelas valorosas contribuições para a elaboração deste trabalho.

À Mestra Cristhiane A. Valente, pelo apoio e essenciais contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Organometálicos da PUC, pelo apoio e amizade, em especial a Ana Flávia Borsoi, a Bruna Sgarioni, a Thuany Maraschini, a Raiane Gonçalves, a Gabriela Messias, a Manoela A. Prado e ao Pedro Tondo.

A PUCRS, especialmente à Faculdade de Química e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>V</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>VI</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>VII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>XIII</b>
<b>LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>XVI</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>5</b>
2.1. <b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>5</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>6</b>
3.1. <b>Lesão de Nervos Periféricos</b> .....	<b>6</b>
3.2. <b>Terapias de Regeneração do Nervo Periférico Lesionado</b> .....	<b>7</b>
3.3. <b>Engenharia de Tecidos e Condutos de Guiamento de Nervos</b> .....	<b>9</b>
3.3.1. <b>Materiais utilizados na Engenharia de Tecidos</b> .....	<b>9</b>
3.3.2. <b>Condutos de Guiamento de Nervos</b> .....	<b>10</b>
3.3.2.1. <b>Suportes biodegradáveis e não biodegradáveis</b> .....	<b>11</b>
3.4. <b>Poli(ácido láctico-co-glicólico)</b> .....	<b>12</b>
3.4.1. <b>Propriedades físicas do Poli(ácido láctico-co-glicólico)</b> .....	<b>13</b>
3.4.2. <b>Degradação hidrolítica</b> .....	<b>14</b>
3.5. <b>Policaprolactona</b> .....	<b>16</b>
3.6. <b>Polipirrol</b> .....	<b>18</b>
3.7. <b>Materiais Nanoestruturados</b> .....	<b>21</b>
3.8. <b>Condutos de Blendas e de Compósitos para a regeneração nervosa</b> ....	<b>22</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
4.1. <b>Materiais</b> .....	<b>26</b>
4.2. <b>Métodos</b> .....	<b>27</b>
4.2.1. <b>Síntese química do PPy</b> .....	<b>27</b>
4.2.2. <b>Preparação das Blendas e dos Nanocompósitos</b> .....	<b>29</b>

<b>4.3. Técnicas de Caracterização</b> .....	<b>30</b>
4.3.1. Degradação hidrolítica .....	31
4.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	32
4.3.3. Condutividade elétrica .....	33
4.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	34
4.3.5. Análise Termogravimétrica (TGA).....	34
4.3.6. Determinação do ângulo de contato .....	34
4.3.7. Teste de citotoxicidade .....	35
<b>4.4. Análise Estatística</b> .....	<b>36</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>5.1. Caracterização das Nanofibras de PPy</b> .....	<b>37</b>
<b>5.2. Caracterização das Blendas e dos Nanocompósitos</b> .....	<b>41</b>
<b>5.3. Propriedades das Blendas e dos Nanocompósitos</b> .....	<b>43</b>
5.3.1. Degradação hidrolítica .....	43
5.3.1.1. Medidas de pH.....	49
5.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	51
5.3.3. Condutividade elétrica .....	59
5.3.4. Propriedades térmicas .....	61
5.3.5. Determinação do ângulo de contato .....	70
5.3.6. Teste de citotoxicidade .....	73
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	<b>77</b>
<b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	<b>79</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>80</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>92</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>93</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Microanatomia do nervo periférico (Adaptado, Boezaart et al.,2010). .....	7
Figura 3.2. Estrutura do PLGA: x é o número de unidades de ácido láctico e y, o número de unidades de ácido glicólico (Makadia et al., 2011).....	13
Figura 3.3. Reação de Hidrólise do PLGA (Makadia et al., 2011).....	14
Figura 3.4. Curvas de libertação de fármaco, <i>in vivo</i> , para PLGA 50:50, 65:35, 75:25 e 85:15. PLGA 65:35 significa 65% de ácido láctico e 35% de ácido glicólico (Makadia et al., 2011). .....	15
Figura 3.5. Degradação hidrolítica da PCL resultando no ácido capróico (Bosworth et al., 2010). .....	17
Figura 3.6. Estruturas químicas: (a) Pirrol e (b) Polipirrol. ....	18
Figura 3.7. Micrografia da fibra de PLGA revestida por PPy (Zhao et al., 2016).....	21
Figura 3.8. Exemplos de <i>designs</i> para condutos nervosos (Arslantunali et al.,2014).23	
Figura 4.1. Diagrama esquemático da síntese química do PPy sob repouso. ....	29
Figura 4.2. Diagrama esquemático da preparação dos filmes das blendas. ....	30
Figura 4.3. Fluxograma das técnicas de caracterização utilizadas. ....	31
Figura 4.4. Esquema para medidas de condutividade elétrica pelo Método da Sonda quatro pontas. A letra “L” representa a distância entre as pontas. (Adaptado, Giroto e Santos, 2002). .....	33
Figura 4.5. Reação de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT).....	35
Figura 5.1. Micrografias das nanofibras de PPy obtidas: (a) e (b) agitação magnética; (c) e (d) repouso. (e) ampliação da região demarcada em (b). Ampliação: (a) e (c) 1.000x; (b) e (d) 10.000x; (e) 20.000x. ....	37
Figura 5.2. Curvas de TGA e DTG das nanofibras de PPy. ....	40
Figura 5.3. Imagem do filme de PCL.....	41

- Figura 5.4. Imagens dos filmes dos nanocompósitos: (a) PCL:PPy (100); (b) PCL:PLGA:PPy (90:10); (c) PCL:PLGA:PPy (80:20) e (d) PCL:PLGA:PPy (70:30). ..... 41
- Figura 5.5. Imagens dos filmes dos nanocompósitos preparados em molde retangular: (a)PCL:PLGA:PPy (70:30) e (b) PCL:PPy (100). ..... 42
- Figura 5.6. Demonstração da interação intermolecular por ligação de Hidrogênio entre a carbonila da PCL e o grupo –NH– do PPy. .... 42
- Figura 5.7. Gráfico do comportamento de perda de massa do filme de PCL puro e dos filmes das blendas PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30). \* $p < 0,05$ , entre PCL:PLGA (90:10) e (70:30) em 150 dias e \* $p < 0,05$ , entre 30 e 150 dias para PCL:PLGA (80:20) e (70:30). ..... 45
- Figura 5.8. Gráfico do comportamento de perda de massa dos filmes de PCL puro, das blendas PCL:PLGA e dos respectivos nanocompósitos PCL:PLGA:PPy: (a) 100, (b) 90:10, (c) 80:20 e (d)70:30. \* $p < 0,05$  ou \*\* $p < 0,01$ . ..... 46
- Figura 5.9. Gráfico do comportamento de perda de massa dos nanocompósitos: PCL:PPy (100) e PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30). \* $p < 0,05$ , entre 30 e 180 dias para PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30). .... 47
- Figura 5.10. Valores de pH da solução PBS: (a) PCL (100), PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30) até 150 dias de incubação e (b) PCL:PPy (100), PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30) até 180 dias de incubação. . 50
- Figura 5.11. Micrografias das superfícies dos filmes antes da degradação: (a) PCL (100); (b) PCL:PLGA (90:10); (c) PCL:PLGA (80:20) e (d) PCL:PLGA (70:30). Ampliação: 2.000x..... 51
- Figura 5.12. Micrografia da superfície do filme de PCL antes da degradação. Ampliação 500x..... 52
- Figura 5.13. Micrografias das superfícies dos filmes de PCL (100): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x. ... 53
- Figura 5.14. Micrografias das superfícies dos filmes da blenda PCL:PLGA (90:10): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x ..... 54
- Figura 5.15. Micrografias das superfícies dos filmes da blenda PCL:PLGA (80:20): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90

- dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x ..... 54
- Figura 5.16. Micrografias das superfícies dos filmes da blenda PCL:PLGA (70:30): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x ..... 55
- Figura 5.17. Micrografias das superfícies dos nanocompósitos antes da degradação: (a)PCL:PPy (100); (b) PCL:PLGA:PPy(90:10); (c) PCL:PLGA:PPy(80:20) e (d) PCL:PLGA:PPy (70:30). Ampliação: 2.000x..... 56
- Figura 5.18. Micrografias das superfícies dos filmes de PCL:PPy (100): (a) antes da degradação; (b)após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x .... 57
- Figura 5.19. Micrografias das superfícies dos filmes de PCL:PLGA:PPy (90:10): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x 58
- Figura 5.20. Micrografias das superfícies dos filmes de PCL:PLGA:PPy (80:20): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x 58
- Figura 5.21. Micrografias das superfícies dos filmes de PCL:PLGA:PPy (70:30): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x 59
- Figura 5.22. Imagens do comportamento de dispersão das nanofibras de PPy na matriz polimérica: (a)PCL:PLGA:PPy (70:30) e (b) PCL:PPy (100). ..... 61
- Figura 5.23. Curvas de DSC dos filmes de PCL (100) e das blendas PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30): (a) ciclo de resfriamento e (b) segundo ciclo de aquecimento..... 62
- Figura 5.24. Curvas de DSC do PCL:PPy (100) e dos nanocompósitos PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30): (a) ciclo de resfriamento e (b) segundo ciclo de aquecimento. .... 64
- Figura 5.25. Sobreposição dos termogramas dos filmes: (a) PCL (100); PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30) e (b) PCL:PPy (100); PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30). ..... 66
- Figura 5.26. Curvas de TGA/DTG: (a) PCL (100) e (b) PCL:PPy (100)..... 68
- Figura 5.27. Curvas de TGA/DTG: (a) PCL:PLGA (70:30) e (b) PCL:PLGA:PPy (70:30)..... 69

- Figura 5.28. Imagem do ângulo de contato de uma gota de água deionizada na superfície de: (a) PCL(100) 78°; (b) PCL:PLGA (70:30), 74° e (c) PCL:PPy (100) 70°..... 72
- Figura 5.29. Análise da viabilidade das linhagens: (a) FGH, (b) MRC-5 e (c) RAW após 24h de cultivo com os filmes poliméricos puros ou blendas de PCL:PLGA nas proporções de (90:10), (80:20), (70:30).\*\*p<0,01 ou \*\*\*p<0,001 vs Controle..... 74
- Figura 5.30. Análise da viabilidade das linhagens: (a, d) FGH, (b, e) MRC-5 e (c, f) RAW após (a-c) 24h ou (d-f) 48h de cultivo com os nanocompósitos PCL:PPy (100) e PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30).\*p<0,05 vs Controle. .... 76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Caracterização dos reagentes utilizados .....	27
Tabela 4.2. Formulações das Blendas e dos Nanocompósitos preparados. ....	29
Tabela 5.1. Condutividade elétrica e rendimento do PPy em diferentes condições de síntese. ....	39
Tabela 5.2. Comportamento de perda de massa (%) até 180 dias de degradação. ....	43
Tabela 5.3. Resumo das faixas de perda de massa (%) para Blendas e Nanocompósitos. ....	44
Tabela 5.4. Medidas de condutividade elétrica ( $S.cm^{-1}$ ) das Blendas e dos Nanocompósitos. ....	60
Tabela 5.5. Dados calorimétricos das amostras obtidos a partir das curvas de DSC. ....	61
Tabela 5.6. Propriedades térmicas das amostras obtidas a partir dos termogramas ....	65
Tabela 5.7. Medidas do ângulo de contato entre a interface filme-água.....	71
Tabela 5.8. Classificação da superfície em função do ângulo de contato ( $^{\circ}$ ) .....	72
Classificação de citotoxicidade de materiais - níveis de viabilidade celular em porcentagem segundo categorias de toxicidade dos materiais do documento ISO 10993-5: 1999.....	92

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APTS	Ácido p-toluenosulfônico monohidratado
ASTM	American Society for Testing and Materials – Sociedade Americana de Ensaio de Materiais
CGN	Conduto de Guiamento de Nervos
CGNs	Conduitos de Guiamentos de Nervos
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
FDA	Food and Drug Administration – Administração de Alimentos e Medicamentos
ME	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico
PBS	Solução tampão fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PCs	Polímeros condutores
PGA	Poli(ácido glicólico)
pH	Potencial de Hidrogênio
PLA	Poli(ácido láctico)
PLLA	Poli(ácido L-láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-glicólico)
PPy	Polypyrrole - Polipirrol
Py	Pirrol
SNC	Sistema Nervoso Central
T <sub>c</sub>	Temperatura de cristalização
T <sub>f</sub>	Temperatura de fusão
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise Termogravimétrica

## RESUMO

LORENSKI FERREIRA, Cristina. **Síntese de nanocompósitos poliméricos PCL/PLGA/nanofibras de polipirrol para aplicação em conduto biocompatível para regeneração nervosa**. Porto Alegre. 2017. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Lesão de nervos periféricos continua sendo um importante tema de pesquisas no meio científico, podendo causar deficiência no paciente por toda a vida. Polímeros biocompatíveis são materiais potencialmente capazes de auxiliarem a regeneração de nervos periféricos sendo utilizados para a produção de tubos biocompatíveis. O objetivo deste trabalho é preparar e caracterizar nanocompósitos poliméricos baseados em policaprolactona (PCL), poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e nanofibras de polipirrol (PPy) capazes de atuarem como conduto guia na regeneração de nervos periféricos. PPy foi sintetizado *via* polimerização química oxidativa com ácido p-toluenosulfônico monohidratado (APTS) como agente dopante. Foram preparados filmes de blendas PCL:PLGA e de nanocompósitos PCL:PLGA:nanofibras de PPy pelo método de evaporação de solvente, nas razões de PCL:PLGA 100:0, 90:10, 80:20 e 70:30 (m/m); aos filmes com a nanocarga, foram adicionados 10% de PPy. Para caracterizá-los, foram utilizadas as técnicas: MEV, DSC, TGA, determinação da condutividade elétrica e do ângulo de contato, teste de citotoxicidade e de degradação hidrolítica, *in vitro*, com base na norma ASTM F1635-11. As nanofibras de PPy apresentaram condutividade elétrica igual a  $2,0 \cdot 10^{-1} \text{ S} \cdot \text{cm}^{-1}$ . A presença de PLGA e de PPy não modificou, significativamente, as propriedades térmicas dos filmes. Porém, no processo de degradação, houve uma tendência à maior perda de massa para as blendas com maior percentual de PLGA quando submetidas a maiores tempos de incubação (150 dias); ao adicionar PPy às blendas, a perda de massa ocorreu em menores tempos (90 dias). Os filmes dos nanocompósitos apresentaram superfície atóxica e de morfologia porosa, com caráter hidrofílico intermediário, boa estabilidade térmica e tempo de degradação adequado para o potencial uso no tratamento de lesões em nervos periféricos.

Palavras-Chaves: poli(ácido láctico-co-ácido glicólico), policaprolactona, nanofibras de polipirrol, nanocompósitos.

## ABSTRACT

LORENSKI FERREIRA, Cristina. **Synthesis of polymeric nanocomposites PCL/PLGA/polypyrrole nanofibers for application in biocompatible conduit for nerve regeneration.** Porto Alegre. 2017. Master Project. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Peripheral nerve injury continues to be an important research topic in the scientific community as it may cause lifelong disability. Biocompatible polymers are materials potentially capable of aiding the regeneration of peripheral nerves being used for the production of biocompatible tubes. The aim of this work is to prepare and characterize polymeric nanocomposites based on polycaprolactone (PCL), poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and polypyrrole nanofibers (PPy) capable of acting as a guidewire in the regeneration of peripheral nerves. PPy was synthesized by oxidative chemical polymerization with p-toluenesulphonic acid monohydrate (PTSA) as a doping agent. PCL:PLGA blends films and PCL:PLGA:PPy nanofibers nanocomposites films were prepared by the solvent casting method, in the ratio of PCL:PLGA 100:0, 90:10, 80:20 and 70:30 (m/m); to the films with nanoload were added 10% PPy. In order to characterize the films, the following techniques were used: SEM, DSC, TGA, determination of electric conductivity and contact angle, citotoxicity test and hydrolytic degradation test, *in vitro*, based on ASTM F1635-11 standards. The PPy nanofibers presented electrical conductivity equal to  $2.0 \cdot 10^{-1} \text{ S.cm}^{-1}$ . The presence of PLGA and PPy did not change, meaningfully, the thermal properties of the films. However, in the degradation process, there was a tendency to a greater loss of mass for the blends with higher percentage of PLGA when submitted to longer incubation periods (150 days); when PPy was added to these blends, mass loss occurred in shorter periods (90 days). The nanocomposites films showed nontoxic and porous morphology surface, with hydrophilic intermediary character, good thermal stability and adequate degradation time for potential use in the treatment of injury in peripheral nerves.

Key Words: poly (lactic-co-glycolic acid), polycaprolactone, polypyrrole nanofibers, nanocomposites.



## 1. INTRODUÇÃO

A lesão do nervo periférico é um problema clínico mundial que atinge de 2,8 a 5% na população. Pode ser considerado um importante problema econômico e social, uma vez que frequentemente atinge a faixa etária mais produtiva e a população jovem. Além do evidente prejuízo econômico causado por todos os dias em que o paciente fica desabilitado para o trabalho, o maior ônus das transecções nervosas é o dano causado à qualidade de vida das pessoas (Midha et al., 2006; Nan et al., 2012; Fonseca et al., 2016).

As lesões completas raramente apresentam recuperação sem intervenção cirúrgica e as técnicas atuais de reparação oferecem resultados aleatórios e frequentemente insatisfatórios. Frente a essas limitações, muitos pesquisadores buscam alternativas terapêuticas, como o uso de biomateriais, para aperfeiçoar o reparo de nervos periféricos danificados (Oliveira et al., 2004).

Buscando a reabilitação do paciente, a medicina regenerativa tem utilizado o transplante de enxerto de nervo autólogo, no qual se utiliza material do próprio paciente no tratamento em lesões de grande extensão nervosa. Entretanto, essa técnica possui muitas desvantagens, como: a necessidade de cirurgia para a extração do nervo doador, a incompatibilidade entre o nervo defeituoso e o diâmetro do enxerto, a quantidade limitada do enxerto doador e a perda da função do local doador (Oliveira et al., 2004; Midha et al., 2006; Rodrigues et al., 2012).

Na medicina regenerativa, polímeros biodegradáveis têm sido avaliados como materiais potencialmente capazes de auxiliarem a regeneração de nervo periférico (Arslantunali et al., 2014).

O processo de construção de tubos biodegradáveis depende de diversos fatores que são fundamentais para uma maior eficácia do tubo. Devem possuir microporos interconectados que facilitem a adesão e a proliferação celular por meio da permeabilidade de nutrientes, devem ter baixa resposta imune e ser biodegradáveis, a fim de evitar uma segunda abordagem cirúrgica e evitar complicações como a dor crônica (Erbetta et al., 2012). Além disso, o material deve ser biocompatível, suficientemente flexível e com tempo de degradação conveniente com intuito de minimizar o inchaço e a inflamação. Também é desejável que o material apresente propriedades capazes de atuarem sinergicamente na regeneração nervosa, tais como, canais intraluminares para guiamento, atividade neurotrófica e estímulo elétrico (Schmidt et al., 2003; Chiono et al., 2009; Erbetta et al., 2012; Daly et al., 2012).

Para satisfazer os requisitos necessários a esses tubos biodegradáveis são utilizados sistemas poliméricos de componentes múltiplos (Armentano et al., 2010). Polímeros são combinados, criteriosamente, para conseguir um sistema com propriedades não atingíveis por qualquer um dos constituintes isoladamente (Jose et al., 2012). Para tanto, são utilizados blendas e compósitos.

Vários polímeros são utilizados para a produção de tubos biodegradáveis, entre eles estão o poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA), a policaprolactona (PCL) e combinações entre ambos (Erbetta et al., 2012; Daly et al., 2012; Arslantunali et al., 2014; Keane et al., 2014).

O PLGA, pertencente à família dos polímeros biodegradáveis aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*), é um poliéster alifático absorvido pelo organismo. Materiais baseados no PLGA que apresentem microporos na superfície aumentam a permeabilidade a nutrientes, favorecendo a adesão, a proliferação celular e a produção de matriz extracelular aumentando, portanto, a vascularização e o crescimento tecidual (Park et al., 2005; Oh et al., 2008). O PLGA tem sido amplamente utilizado na engenharia de tecidos, como matriz para encapsulamento e confecção de fármacos e na preparação de suportes biomédicos aplicados à regeneração nervosa (Makadia et al., 2011; Jianh et al., 2014).

A policaprolactona (PCL) também é um polímero adequado para a confecção de tubos guias para o crescimento de nervos, pois é um material biodegradável e bioabsorvível aprovado pelo FDA e amplamente estudada *in vitro* e *in vivo* (Díaz et al., 2014).

Também são considerados materiais atraentes para aplicações médicas os polímeros condutores (PCs), já que vários tecidos biológicos respondem a campos e estímulos elétricos. Estudos mostram que os PCs possuem uma boa capacidade para suportar e modular o crescimento de várias células, como as células nervosas e também células ósseas (Wang, X. et al., 2004; Lee et al., 2012).

O polipirrol (PPy) é um polímero condutor e tem sido muito investigado em virtude de sua biocompatibilidade e de sua fácil síntese, além da possibilidade de ser polarizado eletricamente, o que melhora os índices de regeneração (Gomez et al., 2007; Lee et al., 2012). É um dos polímeros condutores mais estudados, *in vitro* e *in vivo*, para regeneração nervosa e outras aplicações em engenharia de tecido, pois é capaz de gerar sinais elétricos para locais alvo e pode, simultaneamente, proporcionar suporte físico para o crescimento celular (Lee et al., 2012).

Na literatura, são encontrados diversos sistemas poliméricos para aplicação médica, entre eles: blendas poliméricas de PCL e PLGA na forma de fibras preparadas por eletrofiação (Hiep et al., 2010; Subramanian et al., 2012; Li, X. et al., 2015; Chou et al., 2017), blendas poliméricas de PCL e poli(L-ácido láctico)(PLLA) (Pierucci et al., 2008) e de PCL e poli(ácido láctico) (PLA), preparadas *via* evaporação de solvente (Mobasserri et al., 2013) e blendas de PLGA e PLA na forma de nanofibras preparadas *via* eletrofiação (Liu, H. et al., 2012).

Na literatura, também são encontrados sistemas em que fibras do polímero biodegradável (PLGA, PLA, PCL, entre outros) são recobertas pelo polímero condutor (polipirrol e polianilina) na forma particulada. Destacam-se os seguintes estudos com o polipirrol: fibras de PLGA revestidas por PPy (Lee et al., 2012), tubos biodegradáveis com camada interna de copolímero de polipirrol-co-policaprolactona (PPy-PCL) e com camada externa de PLGA (Nguyen et al., 2013) e ainda,

compósitos baseados em matrizes de poli(D,L-láctico) (PDLLA) (Wang, Z. et al., 2003), PLLA e PCL (Boutry et al., 2013) com nanopartículas de PPy dispersas.

Neste trabalho, pretende-se polimerizar o polímero condutor (PPy) com a morfologia de nanofibras e dispersá-lo em um sistema polimérico biodegradável. Tubos de polímeros biodegradáveis com nanofibras de PPy podem promover a formação de microambiente que estimula o processo de regeneração nervosa. A morfologia de nanofibra é interessante, pois a dimensão na escala nanométrica permite a adição de uma menor quantidade da carga para que as propriedades desejadas sejam observadas. Além disso, a morfologia de fibras se assemelha aos tecidos biológicos e essa semelhança pode vir a favorecer o tratamento e a aceitação do material pelo organismo (Armentano et al., 2010; Leung e Ko, 2011; Spivey et al., 2012).

No presente trabalho, a mistura da PCL com o PLGA foi chamada de blenda polimérica e, de nanocompósito, o resultado da dispersão das nanofibras de polipirrol na blenda.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo preparar nanocompósitos baseados em PCL, PLGA e nanofibras de polipirrol capazes de atuarem como conduto guia na regeneração de nervos periféricos.

### 2.1. Objetivos Específicos

- Sintetizar nanofibras de PPy *via* polimerização química oxidativa;
- Preparar filmes a partir de blendas com diferentes razões de PCL:PLGA contendo nanofibras de PPy dispersas;
- Caracterizar os nanocompósitos em relação à morfologia e às propriedades térmicas e elétricas;
- Avaliar a degradação dos nanocompósitos *in vitro*;
- Avaliar a citotoxicidade dos nanocompósitos preparados, utilizando técnica de cultivo celular *in vitro*.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

Este capítulo tem como objetivo a apresentação da revisão da literatura sobre o trabalho a ser desenvolvido, destacando as pesquisas realizadas na área dos compósitos empregados na regeneração do nervo periférico lesionado, bem como novas técnicas de regeneração que utilizam polímeros biodegradáveis. Além disso, serão apresentados os principais resultados divulgados e as tendências de linhas de pesquisa.

#### **3.1. Lesão de Nervos Periféricos**

Os nervos periféricos são extensões do Sistema Nervoso Central (SNC) e responsáveis pela integração das atividades das extremidades, em suas funções sensitiva e motora. O nervo periférico consiste em feixes de fibras nervosas, os fascículos nervosos. Cada fibra é envolvida por uma camada protetora de tecido conjuntivo chamado endoneuro. Cada fascículo é envolvido por um tecido conjuntivo denso e forte que o protege de traumas e compressões externas, chamado perineuro. Os fascículos caminham de forma relativamente organizada dentro do nervo periférico, envoltos por tecido conjuntivo denominado epineuro (Mattar et al., 1999) (Figura 3.1.).

Lesão de nervos periféricos continua sendo um importante tema de debates e de pesquisas no meio científico, pois se trata de um problema de saúde grave para a sociedade, sendo considerado um problema clínico mundial (Rodrigues et al., 2012; Arslantunali et al., 2014), já que afeta de 2,8% a 5% da população que podem permanecer com a deficiência por toda a vida (Midha et al., 2006; Fonseca et al., 2016).

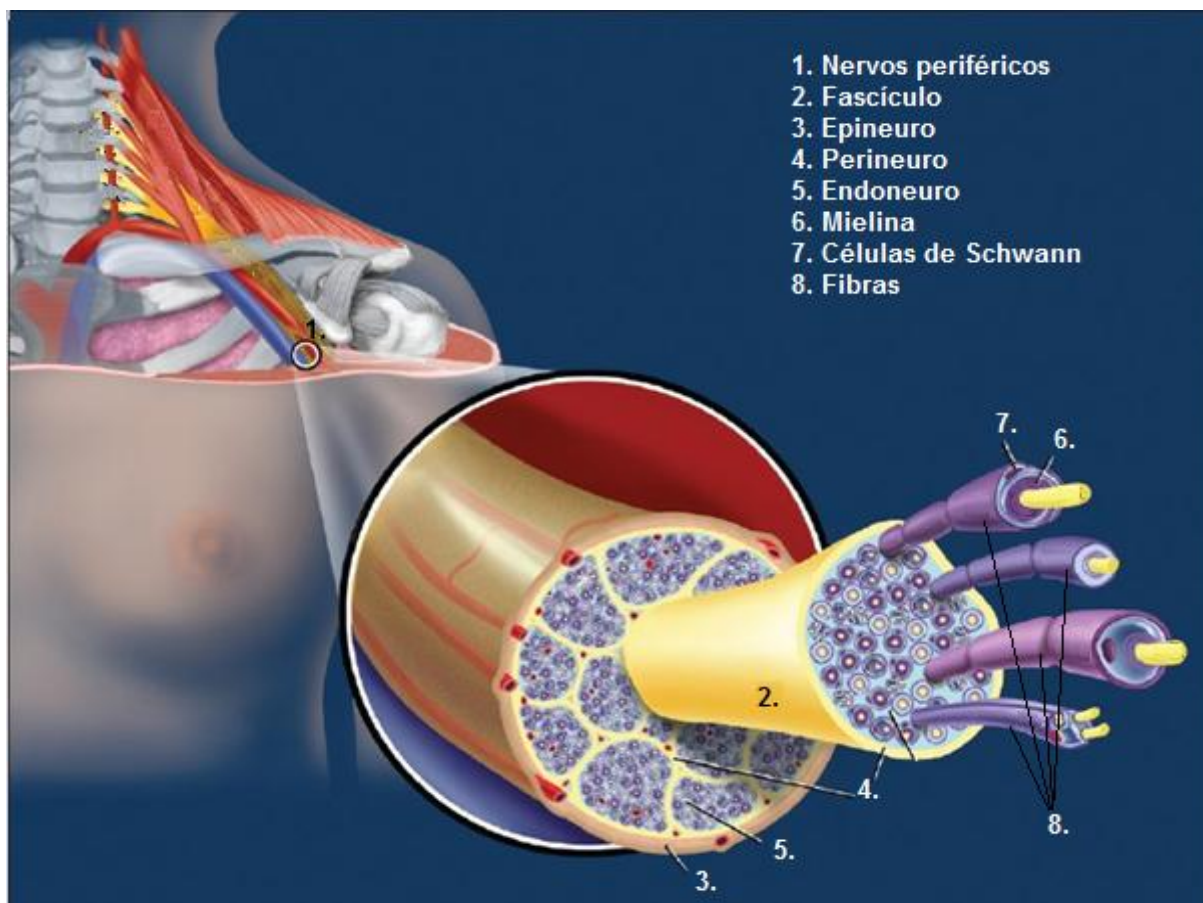


Figura 3.1. Microanatomia do nervo periférico (Adaptado, Boezaart et al., 2010).

Em geral, as lesões do nervo periférico são causadas por danos mecânicos, térmicos, químicos ou isquêmicos resultantes, principalmente, de acidentes traumáticos ou de alguma doença degenerativa (Arslantunali et al., 2014). Rodrigues et al. (2012) relataram que essas lesões são comumente causadas por acidentes de trânsito, lacerações com vidro ou são decorrentes de traumas esportivos.

A lesão do nervo periférico pode levar à perda da comunicação neuronal ao longo dos nervos sensoriais e motores, bem como entre o Sistema Nervoso Central (SNC) e os órgãos periféricos resultando, muitas vezes, em neuropatias dolorosas devido à redução das funções motoras e sensoriais (Arslantunali et al., 2014).

### 3.2. Terapias de Regeneração do Nervo Periférico Lesionado

O reparo pós-traumático do nervo periférico é um dos principais desafios da medicina reparadora e de microcirurgia (Chiono et al., 2009; Durgam et al., 2010).

Apesar dos recentes avanços no campo da Engenharia de Tecidos, a recuperação funcional após lesões nervosas graves é, geralmente, parcial e insatisfatória (Chiono et al., 2009). A transecção do nervo periférico resulta na perda da função do órgão-alvo que raramente pode ser recuperada sem reparação cirúrgica (Oliveira et al., 2004). Destaca-se que mesmo após intervenção cirúrgica, os nervos periféricos apresentam pobre recuperação (Rodrigues et al., 2012).

Várias abordagens clínicas estão em uso para tratar a lesão do nervo periférico, dependendo da gravidade da mesma (Durgam et al., 2010).

A principal terapia médica para lesões completas é a reparação pelo realinhamento cirúrgico das extremidades cortadas por religação, *via* sutura, extremidade-a-extremidade dos cotos do nervo (Oliveira et al., 2004; Durgam et al., 2010; Arslantunali et al., 2014). Esse método é inadequado para lesões com lacunas (*gaps*) longas devido à possibilidade de a sutura causar tensão no nervo que, por sua vez, inibe sua regeneração (Durgam et al., 2010).

No caso de uma lacuna significativa, em que a reparação extremidade-a-extremidade não seja possível, são utilizados condutos nervosos (Arslantunali et al., 2014) ou enxertos autólogos de nervos periféricos, através dos quais os cotos nervosos seccionados são reconectados e servem de apoio para o recrescimento do axônio (Kweon et al., 2003; Oliveira et al., 2004; Chiono et al., 2009; Durgam et al., 2010; Arslantunali et al., 2014).

No entanto, a simples reconexão dos cotos não é suficiente para que a reinervação seja bem sucedida, uma vez que não permite um controle preciso da orientação dos fascículos e das suas subestruturas (Oliveira et al., 2004).

São três os parâmetros mais importantes a serem considerados na reparação de lesões dos nervos periféricos: o comprimento da lacuna do nervo formada, o tempo decorrido entre a lesão e o reparo e a idade do paciente (Arslantunali et al., 2014).

Intervenções cirúrgicas que envolvem auto-enxerto são restritas a lacunas de cerca de cinco centímetros de comprimento de nervo e apresentam desvantagens



como: a necessidade de uma segunda cirurgia (Oliveira et al., 2004; Durgam et al., 2010; Arslantunali et al., 2014), a limitação na fonte de nervo doador, a perda de sensibilidade na área do nervo doador (Kweon et al., 2003; Oliveira et al., 2004; Durgam et al., 2010), a incompatibilidade de tamanho do nervo doador, o potencial de infecção e a formação de doloroso neuroma (Arslantunali et al., 2014). Além disso, não permite a recuperação funcional completa (Kweon et al., 2003; Chiono et al., 2009), sendo esta raramente alcançada, especialmente em relação a nervos motores; os nervos sensoriais costumam ter melhores resultados (Rodrigues et al., 2012).

As limitações de auto-enxertos incentivaram os pesquisadores à investigação de métodos alternativos como a fabricação de novos condutos nervosos para a regeneração dos nervos periféricos lesionados (Kweon et al., 2003; Arslantunali et al., 2014).

A recuperação total da funcionalidade do nervo pode ser conseguida de forma que a regeneração do axônio seja guiada até os tecidos-alvo, através da utilização de Condutos de Guiamento de Nervos (CGNs) – *Nerve Guidance Channels* (NGCs) (Kweon et al., 2003; Chiono et al., 2009). CGNs artificiais têm sido produzidas utilizando uma variedade de polímeros naturais e sintéticos, biodegradáveis e não biodegradáveis (Chiono et al., 2009).

### **3.3. Engenharia de Tecidos e Condutos de Guiamento de Nervos**

#### **3.3.1. Materiais utilizados na Engenharia de Tecidos**

A engenharia de tecidos é um campo multidisciplinar emergente que envolve biologia, medicina e engenharia e vai contribuir com as formas de zelar pela saúde por restaurar, manter ou melhorar as funções dos tecidos e dos órgãos (Hiep et al., 2010; Keane et al., 2014).

A utilização de biomateriais representa uma opção promissora, sendo os biomateriais componentes fundamentais para a engenharia de tecidos (Oliveira et al., 2004; Keane et al., 2014).

Biomaterial é toda substância (exceto drogas) ou combinações de substâncias, de origens sintéticas ou naturais, que durante um período de tempo indeterminado é empregada como um todo ou em parte integrante de um sistema para tratamento, ampliação ou substituição para qualquer tecido, órgãos ou funções corporais (Williams, 2008).

A função de um biomaterial na regeneração de tecidos é prestar apoio e suporte mecânico necessário até que ocorra o crescimento suficiente do tecido natural. Uma vez que isso tenha acontecido, o novo tecido deve ser capaz de suportar várias tensões (Bosworth et al., 2010; Keane et al., 2014). A investigação de biomateriais tem sido, em grande parte, destinada a imitar a estrutura nativa e a composição da Matriz Extracelular (ME) que fornece não só suporte físico e organização espacial, mas também um microambiente bioativo que apoia e promove funções celulares (Keane et al., 2014).

Vários tipos de biopolímeros têm sido utilizados como condutos nervosos, com resultados comparáveis aos auto-enxertos (Oliveira et al., 2004).

### **3.3.2. Condutos de Guiamento de Nervos**

A Engenharia de Tecidos tem fornecido CGNs (Rodrigues et al., 2012) que são aprovados pelo FDA como dispositivos usados para preencher a lacuna no nervo gerada pela lesão e auxiliar os axônios a brotarem do coto proximal ao coto distal (Kweon et al., 2003; Durgam et al., 2010). Acelerar a reinervação do tecido é considerado o fator mais importante na reparação de nervos, por isso, a introdução de sinais de crescimento adicionais elétricos, como a estimulação por campo elétrico e sinais biológicos, podem ser a chave para melhorar a regeneração do nervo (Kweon et al., 2003; Gomez et al., 2007).

A principal característica que deve apresentar um material para ser utilizado como CGN é a biocompatibilidade (Oliveira et al., 2004; Bosworth et al., 2010; Keane et al., 2014). Segundo Williams (2008), biocompatibilidade refere-se à capacidade de um biomaterial em desempenhar a sua função desejada no que diz respeito a uma terapia médica, sem suscitar quaisquer efeitos indesejáveis locais ou

sistêmicos para o destinatário daquela terapia, mas gerando a mais apropriada e benéfica resposta celular ou tecidual, numa situação específica.

Além de biocompatível, o material a ser utilizado como CGN deve satisfazer uma variedade de critérios que são relatados na literatura e são destacados a seguir.

O material deve apresentar uma taxa ótima de degradação que deve ser lenta o suficiente para fornecer um suporte para o crescimento celular, mas rápida o suficiente para não impedir o processo de regeneração (Oliveira et al., 2004; Bosworth et al., 2010; Keane et al., 2014). E ainda, o material deve estimular a migração de células, bem como o crescimento axonal, acelerando assim a regeneração (Oliveira et al., 2004).

Além da biodegradabilidade, é desejável que os condutos nervosos sejam flexíveis, apresentem características topográficas, como alta porosidade e a capacidade de estimulação elétrica aliada a fatores de crescimento (Oliveira et al., 2004; Gomez et al., 2007; Arslantunali et al., 2014, Díaz et al., 2014).

Adicionalmente, o material deve ser não citotóxico, não carcinogênico, não imunogênico e não mutagênico, e ainda, apresentar permeabilidade e facilidade de aplicação cirúrgica (Durgam et al., 2010; Lu, X. et al., 2010).

#### 3.3.2.1. Suportes biodegradáveis e não biodegradáveis

Tubos sintéticos têm sido construídos a partir de material biodegradável e não biodegradável (Midha et al., 2006).

Os principais polímeros biodegradáveis de origem sintética são alguns poliésteres, moléculas que apresentam um grupo funcional éster na sua cadeia principal, sendo que os mais utilizados na fabricação de condutos nervosos são: poli(ácido láctico)(PLA), poli(L-ácido láctico) (PLLA), poli(ácido glicólico) (PGA) e poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) (Oliveira et al., 2004; Midha et al., 2006; Durgam et al., 2010; Lu, X. et al., 2010; Arslantunali et al., 2014), policaprolactona

(PCL) e vários copolímeros desses materiais (Durgam et al., 2010; Lu, X. et al., 2010).

Os materiais não biodegradáveis utilizados para produzir suportes são silicone, hidrogéis à base de metacrilato, poliestireno, e poli(tetrafluoroetileno) (Midha et al., 2006; Arslantunali et al., 2014).

Suportes artificiais não biodegradáveis, construídos de silicone, por exemplo, auxiliam o crescimento do nervo e proporcionam resultados benéficos. Em estudos pioneiros, relatados no início da década de 1990, Lundborg et al. (1991; 1994) demonstraram a viabilidade e o sucesso na reconstrução do nervo ulnar e mediano usando condutas curtas de silicone. No entanto, essas condutas podem levar à inflamação crônica e à compressão dos tecidos e, portanto, devem ser removidas cirurgicamente quando a cicatrização neural for concluída (Midha et al., 2006; Bosworth et al., 2010; Rodrigues et al., 2012).

Para evitar as dificuldades de uma segunda cirurgia no local da lesão, suportes biodegradáveis são os preferidos pelos médicos (Bosworth et al., 2010; Rodrigues et al., 2012). Nesse contexto, materiais biodegradáveis proporcionam melhores resultados em comparação com as substâncias não reabsorvíveis (Oliveira et al., 2004).

### **3.4. Poli(ácido láctico-co-glicólico)**

Desde as duas últimas décadas, o copolímero poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) tem sido um dos polímeros mais interessantes para aplicações médicas (Makadia et al., 2011; Erbetta et al., 2012; Arslantunali et al., 2014; Keane et al., 2014; Zhao et al., 2016).

Esse polímero é um dos candidatos poliméricos mais atraentes usados como suportes para a Engenharia de Tecidos, sendo amplamente utilizado como um material de guia de nervo (Makadia et al., 2011; Erbetta et al., 2012; Arslantunali et al., 2014; Keane et al., 2014) e na fabricação de dispositivos para administração controlada de medicamentos, de proteínas e de várias outras macromoléculas, tais como DNA, RNA e peptídeos (Makadia et al., 2011).

O PLGA é um copolímero sintético, pertencente à classe dos poliésteres, composto por unidades monoméricas de poli(ácido glicólico) - (PGA) e poli (ácido láctico) - (PLA) (Figura 3.2.).

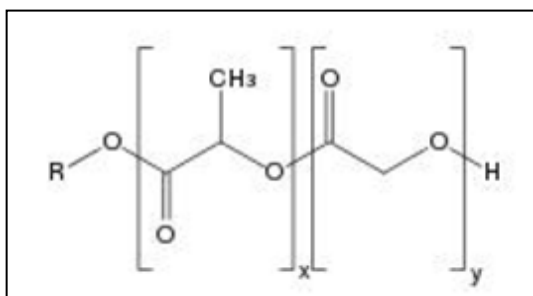


Figura 3.2. Estrutura do PLGA: x é o número de unidades de ácido láctico e y, o número de unidades de ácido glicólico (Makadia et al., 2011).

O PLGA é um polímero biocompatível, bioabsorvível e biodegradável em subprodutos não tóxicos (ácido láctico, ácido glicólico, dióxido de carbono e água) apresentando baixa resposta inflamatória. Além disso, é relativamente hidrofóbico e apresenta boa resistência mecânica (Makadia et al., 2011; Erbetta et al., 2012; Arslantunali et al., 2014; Keane et al., 2014; Zhao et al., 2016).

Embora o PLGA não seja tóxico, o acúmulo de produtos de degradação e o inchaço do polímero durante o processo de degradação podem alterar o pH em torno dos suportes. Tal alteração pode causar a irritação mecânica do tecido circundante que, às vezes, resultam em resposta inflamatória. Para resolver esse problema, foram estudadas estratégias para o uso de fármacos anti-inflamatórios (Zhao et al., 2016).

#### 3.4.1. Propriedades físicas do Poli(ácido láctico-co-glicólico)

As propriedades físicas do PLGA dependem de múltiplos fatores, como: a massa molar, a proporção entre PLA e PGA, a topologia da superfície que influencia a exposição à água e a temperatura de armazenamento (Makadia et al., 2011).

O grau de cristalinidade e o ponto de fusão dos polímeros estão diretamente relacionados à massa molar, sendo este bastante dependente da proporção molar dos monômeros (Makadia et al., 2011).

A massa molar e o grau de cristalinidade influenciam diretamente a resistência mecânica do polímero, o comportamento de inchamento, a capacidade do mesmo em submeter-se à hidrólise e subsequentemente a sua taxa de degradação (Makadia et al., 2011; Erbetta et al., 2012).

Quanto à temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), o PLGA apresenta valores na faixa de 45 a 55 °C (Jones, 2004), portanto, encontra-se no estado vítreo na temperatura fisiológica de 37 °C, apresentando, assim, a estrutura da cadeia bastante rígida (Makadia et al., 2011).

Os polímeros de PLGA comercialmente disponíveis são normalmente caracterizados em termos de viscosidade intrínseca, que está diretamente relacionada às massas molares (Makadia et al., 2011).

### 3.4.2. Degradação hidrolítica

A taxa de degradação de polímeros biodegradáveis é significativamente afetada por fatores, como: estrutura química, composição do sistema, presença de monômeros e oligômeros, tamanho e forma da superfície, morfologia dos componentes do sistema, mecanismo de hidrólise e massa molar. Os polímeros com elevadas massas molares, por apresentarem cadeias mais longas, requerem mais tempo para degradarem-se do que os polímeros de cadeias poliméricas curtas (Makadia et al., 2011; Erbetta et al., 2012).

Em água, o PLGA sofre degradação por hidrólise das suas ligações éster, como mostrado na Figura 3.3. (Makadia et al., 2011).

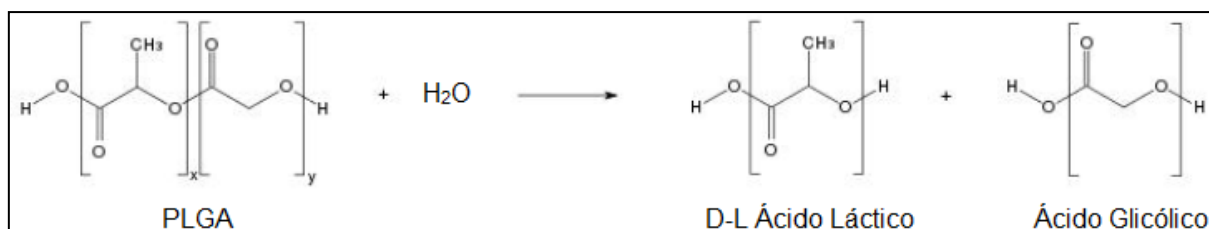


Figura 3.3. Reação de Hidrólise do PLGA (Makadia et al., 2011).

A degradação do PLGA é um processo uniforme que ocorre principalmente no “bulk” da matriz polimérica. Erosão e difusão superficial também fazem parte do processo de degradação do PLGA. Nesse processo, a penetração de água na matriz é maior do que a taxa de degradação do polímero (Makadia et al., 2011).

A hidrólise, *in vitro*, do PLGA é acelerada em pH alcalino e fortemente ácido devido à autocatálise dos grupos terminais carboxílicos, resultado da degradação, e menos pronunciada em pH ligeiramente ácido e neutro (Makadia et al., 2011).

O PLGA é utilizado para a fabricação de dispositivos para administração controlada de fármacos. A Figura 3.4. apresenta curvas para liberação de fármaco como resultado da degradação de PLGA. As curvas mostram que a taxa de liberação diminui com o aumento da concentração do ácido láctico (Makadia et al., 2011).

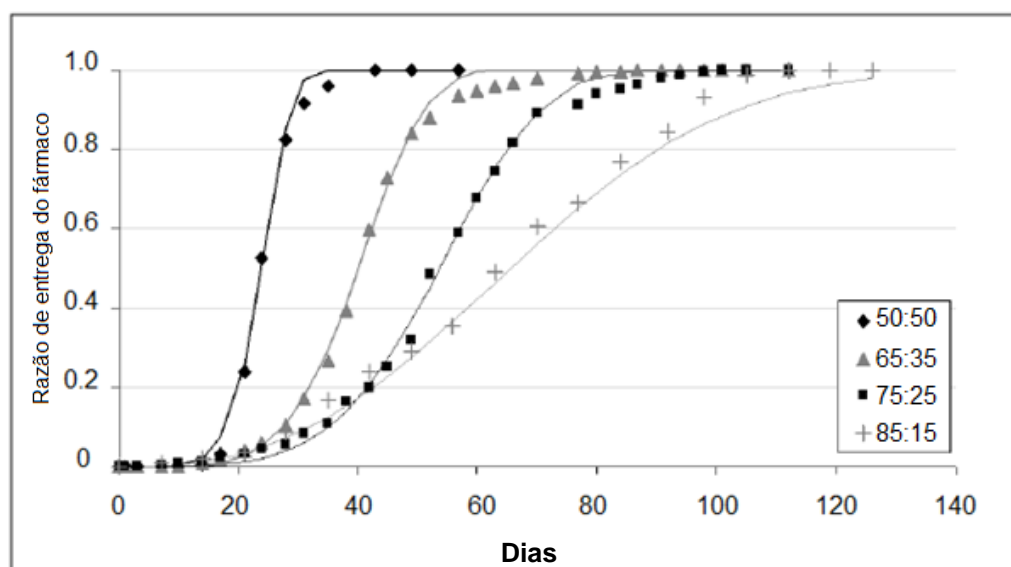


Figura 3.4. Curvas de liberação de fármaco, *in vivo*, para PLGA 50:50, 65:35, 75:25 e 85:15. PLGA 65:35 significa 65% de ácido láctico e 35% de ácido glicólico (Makadia et al., 2011).

A cinética de degradação do PLGA pode ser modificada pela taxa de copolimerização dos monômeros PLA e PGA que o constituem (Erbeta et al., 2012; Arslantunali et al., 2014; Keane et al., 2014; Zhao et al. 2016).

A presença de grupos metila no PLA torna-o mais hidrofóbico em relação ao PGA. Copolímeros de PLGA ricos em PLA são menos hidrofílicos, logo absorvem

menos água e, conseqüentemente, degradam-se mais lentamente (Lu, L. et al., 2000; Makadia et al., 2011; Erbetta et al., 2012; Zhao et al., 2016). As faixas de tempo de degradação dos copolímeros de PLGA 50:50 e 85:25 são de 1 a 2 meses e de 5 a 6 meses, respectivamente (Ozdil e Aydin, 2014).

Essas características distintas dos monômeros constituintes do PLGA o fazem um atraente copolímero para a fabricação de “suportes” com os mais variados tempos de degradação. Pode-se investigar o melhor tempo para o efeito terapêutico do “suporte”, conforme cada necessidade clínica, e assim, proporcionar a fabricação de materiais de rápida até lenta degradação (Barbanti et al., 2008).

### **3.5. Policaprolactona**

A policaprolactona (PCL) tem sido investigada para aplicações biomédicas devido a sua boa biocompatibilidade e baixa imunogenicidade. Além disso, é conhecida como um material biodegradável, já que os produtos da degradação são rapidamente metabolizados pelo corpo e eliminados sem toxicidade (Díaz et al., 2014; Li, Z. et al., 2014).

A PCL é usada no Capronor, um dispositivo contraceptivo implantável disponível comercialmente desde o ano de 2013. A toxicologia da PCL tem sido estudada na avaliação da segurança do Capronor e o material tem sido considerado seguro (Li, Z. et al., 2014).

As vantagens da PCL para aplicações de liberação do fármaco, em comparação com outros tipos de poliésteres alifáticos, tais como PLA e PGA, incluem a sua alta permeabilidade para medicamentos e a geração de produtos de degradação menos ácidos (Li, Z. et al., 2014).

A policaprolactona é um poliéster alifático linear que sofre degradação hidrolítica devido à susceptibilidade das suas ligações ésteres à hidrólise. Além disso, apresenta elevada solubilidade em solventes orgânicos, baixas temperaturas de fusão (55°C – 60°C) e de transição vítrea (-60°C) (Lu, X. et al., 2010; Arslantunali et al., 2014; Díaz et al., 2014).



A PCL é um polímero semicristalino e, portanto, apresenta regiões cristalinas dispersas em uma matriz amorfa. A degradação hidrolítica ocorre, preferencialmente, nessas regiões amorfas do polímero, nas quais os grupos éster estão mais expostos ao ataque das moléculas de água. A degradação hidrolítica resulta na formação de um ácido carboxílico conhecido como ácido capróico (ácido 6-hidroxi-hexanóico) (Bosworth et al., 2010; Díaz et al., 2014), como mostra a Figura 3.5.

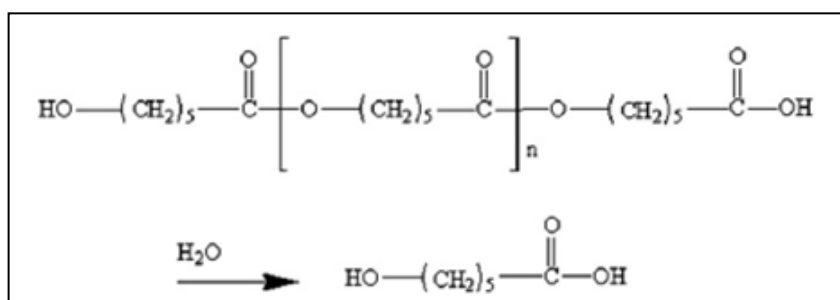


Figura 3.5. Degradação hidrolítica da PCL resultando no ácido capróico (Bosworth et al., 2010).

Os produtos de degradação são metabolizados através do ciclo do ácido tricarboxílico ou eliminados *via* secreção renal direta (Díaz et al., 2014).

As cadeias clivadas podem rearranjar-se de forma ordenada, mantendo ou aumentando o nível de cristalinidade do polímero. O ácido carboxílico gerado como subproduto, se não for removido, pode aumentar a acidez circundante promovendo a autocatálise que acelera a taxa de degradação. O tipo de grupo funcional presente ao longo do comprimento da cadeia do polímero afeta a taxa de absorção de água e, conseqüentemente, a taxa de degradação hidrolítica. A natureza hidrofóbica da PCL deve limitar a taxa de absorção de água, diminuindo a taxa de degradação que varia com a sua forma estrutural e morfológica, bem como depende da área de superfície em relação ao volume (Bölgen et al., 2005; Bosworth et al., 2010).

A PCL foi ignorada por mais de duas décadas devido, parcialmente, ao fato de sua degradação ocorrer em longo prazo (até 1 ano), considerado inadequado para algumas aplicações médicas (Díaz et al., 2014).

### 3.6. Polipirrol

Biomateriais que apresentam múltiplos estímulos são atraentes para aplicações biomédicas. Em particular, sinais elétricos e biológicos são fatores importantes para aplicações tais como condutos nervosos e sondas neurais (Gomez et al., 2007).

Os neurônios são altamente influenciados por estímulos elétricos devido a sua natureza inerente na transmissão eletroquímica de sinais ao longo do sistema nervoso. Como consequência, dispositivos capazes de estimular as células nervosas *via* mecanismos elétricos têm sido investigados (Gomez et al., 2007). Os polímeros eletricamente condutores são materiais promissores devido à sua elevada biocompatibilidade e condutividade elétrica (Fahlgren et al., 2015), sendo capazes de transferir carga elétrica na mesma extensão que um condutor elétrico ou um semicondutor (Jeeju et al., 2012).

O polipirrol (Figura 3.6.) é um polímero inerentemente condutor que vem despertando interesse crescente na área dos biomateriais desde o ano de 2000, devido ao efeito positivo que a estimulação elétrica mostrou ter na regeneração do tecido (Runge et al., 2010). Portanto, corresponde a um material atraente para ser utilizado na fabricação de próteses neurais para a regeneração nervosa (Fonner et al., 2008).

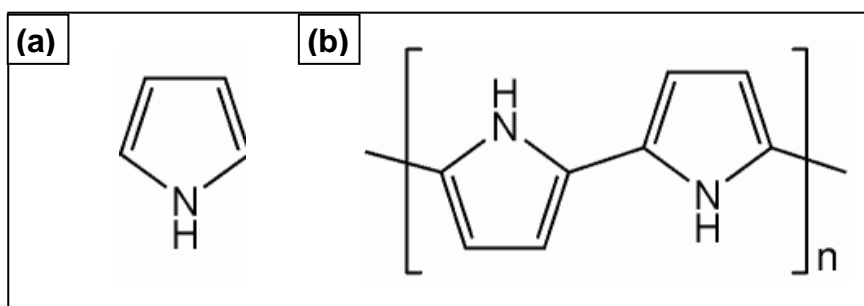


Figura 3.6. Estruturas químicas: (a) Pirrol e (b) Polipirrol.

De todos os polímeros condutores conhecidos, o PPy é um dos mais estudados, devido à facilidade de polimerização, através da oxidação do monômero pirrol (Jeeju et al., 2012).

Esse polímero é biocompatível, apresenta boa condutividade elétrica e potencial para ter elevadas áreas de superfície, já que o arranjo estrutural pode ser facilmente controlado. Além disso, pode ser facilmente sintetizado, apresenta boa estabilidade ambiental e térmica (Xia et al., 2011; Jeeju et al., 2012; Nguyen et al., 2013).

O método de síntese do polímero condutor e os tipos de dopantes utilizados influenciam a topografia da superfície, a molhabilidade e as propriedades mecânicas. A utilização de um polímero condutor com moléculas biológicas ativas ou fármacos em combinação com a estimulação elétrica corresponde a estratégias para a liberação controlada de fármacos (Fahlgren et al., 2015).

O polipirrol pode ser sintetizado *via* oxidação química do monômero pirrol. Dentre os agentes oxidantes disponíveis, o cloreto férrico é o preferido, pois proporciona maiores valores de condutividade elétrica. Apesar de a polimerização ser possível na temperatura ambiente, a síntese deve ser realizada mantendo-se a temperatura a 0 °C já que, em temperaturas na faixa de 0 °C – 5 °C, reações laterais são controladas (Reza et al., 2006; Patil et al., 2012).

Filmes finos ou grossos não citotóxicos de PPy podem ser fabricados eletroquimicamente. No entanto, a falta de biodegradabilidade desses condutores de polipirrol continua sendo um problema durante a regeneração (Durgam et al., 2010).

Além de não ser biodegradável, o PPy apresenta outras limitações, como a baixa solubilidade na maioria dos solventes e propriedades mecânicas pobres, que torna os materiais frágeis e quebradiços (Runge et al., 2010).

Para superar essas limitações e promover a possibilidade de incorporar polímeros eletricamente condutores em biomateriais, foram desenvolvidos materiais compósitos (Runge et al., 2010). Esses compósitos incorporam uma pequena quantidade de polipirrol em uma matriz polimérica com propriedades adequadas para fins biomédicos (Lu, X. et al., 2010; Runge et al., 2010). Devido ao fato de o PPy ser insolúvel, infusível e não biodegradável, a carga de PPy nos filmes de compósitos deve ser mantida tão baixa quanto possível.

Para produzir compósitos poliméricos de PPy altamente condutores, as partículas de PPy devem ser adequadamente dispersas nas matrizes poliméricas para que sejam construídas redes condutoras controladas pelas cargas de PPy e pelas microestruturas das matrizes (Lu, X. et al., 2010).

Nas matrizes de polímero cristalino, estudos têm apontado que as cargas quase sempre residem nas regiões amorfas da matriz do polímero cristalino devido às forças de repulsão que derivam do processo de cristalização (Lu, X. et al., 2010).

Os domínios cristalinos presentes em compósitos com polímero condutor com matriz cristalina funcionam como isoladores, pois quebram alguns possíveis caminhos condutores existentes no interior do compósito. Portanto, um aumento dos domínios cristalinos em um compósito com polímero condutor pode resultar na diminuição da condutividade (Lu, X. et al., 2010).

Para utilizar o PPy em um implante de biomaterial, é importante reproduzir e controlar as propriedades elétricas, bem como a topografia física e química da superfície do polímero. A rugosidade das superfícies do implante (medida na escala nanométrica e micrométrica) afeta a adesão celular alterando a área superficial percebida pela célula. O ângulo de contato é uma medida relativa da energia de superfície, que também afeta fortemente a adesão celular (Fonner et al., 2008).

Estudos têm demonstrado o papel da estimulação elétrica na orientação do crescimento, na diferenciação, na migração e na proliferação de vários tipos de células (Durgam et al., 2010). Quigley et al. (2009) e Durgam et al. (2010) demonstraram que substratos de PPy eletricamente condutores foram capazes de estimular o crescimento de células PC12 neuronais e gânglios da raiz dorsal (DRG) *in vitro*.

Nguyen et al. (2013) também estudaram a estimulação do PPy usando correntes direta/alternada (+/-1 mA) aplicando um potencial elétrico constante de 100 mV durante 2 a 8h. Nesse estudo, foi constatado que a produção de um campo elétrico através de um substrato pode acelerar a cicatrização dos nervos, possivelmente através do aumento da adsorção de proteínas na superfície conduto,

aumento do crescimento celular polarizado ou através da alteração das vias de sinalização celular.

Há estudos sobre o uso do PPy, sem a aplicação de estimulação elétrica externa. Destaca-se o trabalho de Zhao et al. (2016), o qual relata que fibras de PLGA, sintetizadas por eletrofiação, ao serem revestidas pelo polímero PPy, passaram a apresentar atividade elétrica e revelaram melhores interações celulares, ao serem comparadas com as fibras de PLGA sem PPy depositado (Figura 3.7.).

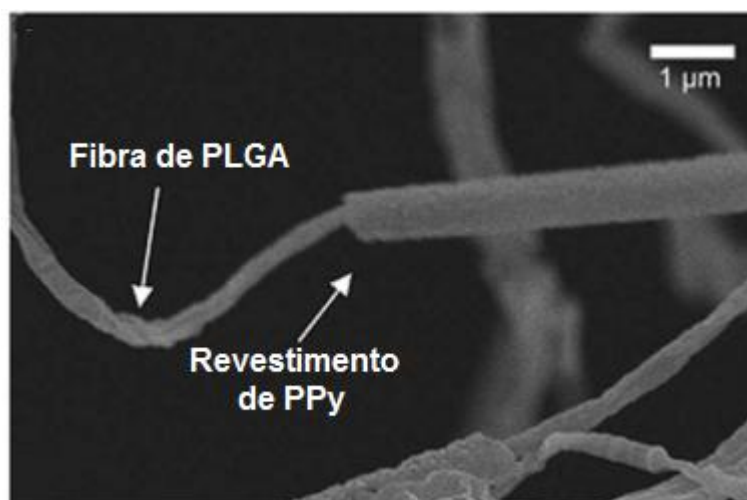


Figura 3.7. Micrografia da fibra de PLGA revestida por PPy (Zhao et al., 2016).

### 3.7. Materiais Nanoestruturados

A Nanotecnologia é uma área que está gerando novas expectativas tecnológicas, pois possibilita o desenvolvimento de nanomateriais que imitam a complexa estrutura dos tecidos biológicos (Duran et al., 2006; Armentano et al., 2010). Em geral, os tecidos biológicos assemelham-se a fibras, logo materiais na forma de nanofibras podem vir a favorecer a aceitação do material pelo organismo (Leung e Ko, 2011; Spivey et al., 2012).

Os materiais em nano escala têm despertado interesse, pois, além de mimetizarem o tecido biológico, exibem elevada área superficial, maior reatividade química e melhor capacidade de penetração nas células em comparação com os seus homólogos volumosos (Goel et al., 2010; Kim, S. et al., 2011).

O método da eletrofiação é um dos mais simples entre todos os métodos para a preparação de esteiras fibrosas. Muitos trabalhos utilizam esse método para preparar micro e nanofibras de polímeros, como: quitosana (Bhattacharai et al., 2005; Homayoni et al., 2009), PLA (Kim, K. et al., 2003;), PLGA (You et al., 2005; Wang, S. et al., 2012; Puppi et al., 2010) e PCL (Pham et al., 2006; Cipitria et al., 2011). Esses trabalhos mostraram que micro e nanofibras de polímeros são capazes de suportar a adesão celular e melhorar a proliferação celular.

Além desses materiais, uma importante classe de polímeros que também motivam pesquisas no âmbito da Nanotecnologia é a de polímeros condutores. Dentre os nanomateriais poliméricos condutores, o polipirrol tem sido considerado um material promissor para área médica, como mencionado no item 3.6.

Para a preparação de nanofibras de PPy, podem ser utilizados métodos químicos ou eletroquímicos. A polimerização química oxidativa é um método simples que não necessita de instrumentos especiais. A partir desse método podem ser obtidas grandes quantidades de polipirrol (Reza, 2006; Goel et al., 2010; Xia et al., 2011).

O método utilizado para preparar as nanofibras de PPy deve ser capaz de controlar o tamanho, a forma e a morfologia das nanoestruturas, uma vez que as propriedades de materiais automontados (do inglês: *self-assembled*) são fortemente dependentes das suas interações intermoleculares e, assim, da sua estrutura dimensional (Goel et al., 2010).

### **3.8. Conduitos de Blendas e de Compósitos para a regeneração nervosa**

Conduitos nervosos podem ser preparados de diferentes maneiras correspondendo a tubos cilíndricos com canais internos ou matrizes poliméricas, com paredes porosas ou com incorporação de células; o *design* pode incluir agentes bioativos (Figura 3.8.) (Arslantunali et al., 2014).

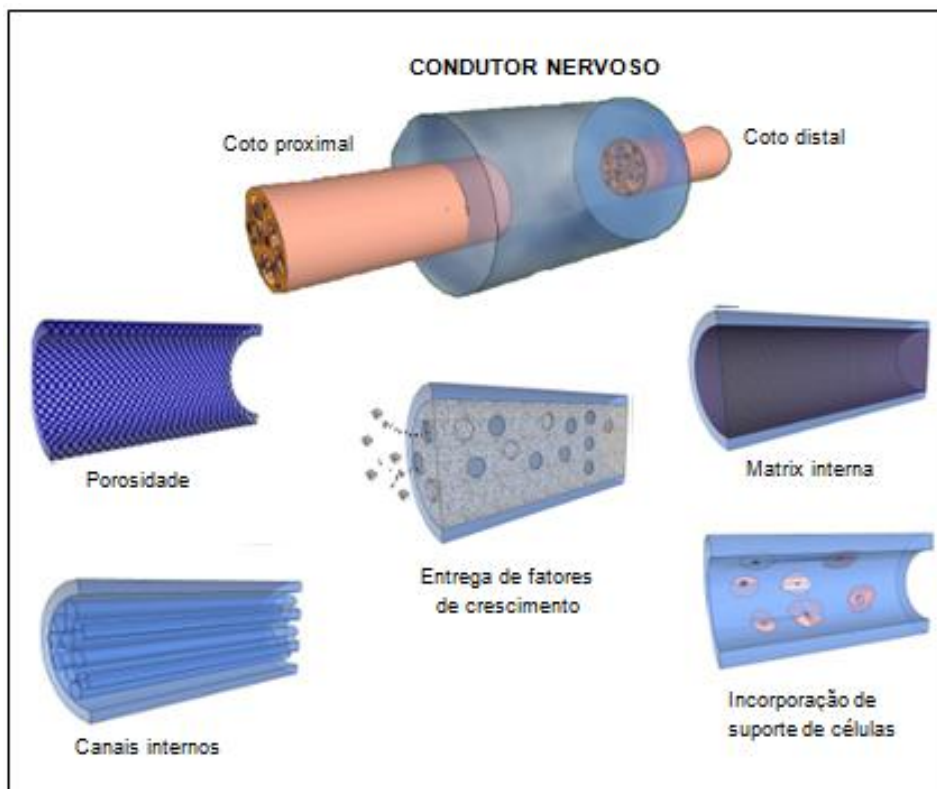


Figura 3.8. Exemplos de *designs* para condutos nervosos (Arslantunali et al., 2014).

Esses tubos utilizados para aplicação na regeneração nervosa podem ser constituídos de blendas poliméricas (Hiep et al., 2010; Zhao et al., 2016).

Hiep et al. (2010) e Zhao et al. (2016) prepararam blendas de PLGA/PCL utilizando a técnica de eletrofição. A PCL por ser flexível, apresenta elevada resistência mecânica, por isso, tem sido utilizada juntamente com o PLGA, por este ser mais rígido, quebradiço e, portanto, frágil, e apresentar baixas propriedades de alongamento (Hiep et al., 2010; Zhao et al., 2016). No entanto, por ser mais hidrofílico, o PLGA é melhor do que o PCL em relação à adesão e à proliferação celular. A PCL apresenta maior hidrofobicidade e, por isso, não apresenta quaisquer sítios ativos fisiológicos, o que a torna desfavorável para o crescimento celular. Além disso, a PCL apresenta menor taxa de degradação em relação ao PLGA (Sung et al., 2004; Hiep et al., 2010).

O trabalho de Zhao et al. (2016) constatou que o suporte de PLGA/PCL pode oferecer boa flexibilidade, porosidade desejada, degradabilidade lenta e topografia da superfície com melhores propriedades biológicas. Além disso, a proliferação celular nas nanofibras alinhadas é, significativamente, mais elevada do que em

aleatórias. A blenda apresentou melhor biocompatibilidade do que os suportes de PLGA puros.

Arslantunali et al. (2014) prepararam um conduto de PLGA, utilizando ácido acético como solvente, com macroporos organizados em pacotes de canais de até 20 $\mu$ m de largura, que, em seguida, foram usados como um canal do nervo. Esse dispositivo, aliado à liberação de proteínas, aumentou a regeneração do nervo, guiando e estimulado o crescimento do mesmo.

Em outro estudo, Arslantunali et al. (2014) fabricaram nanofibras de PLGA *via* técnica de eletrofiação e as revestiu com PPy a fim de investigar o efeito combinado de estruturas de nanofibras e estimulação elétrica. As malhas de PPy-PLGA, aumentaram o crescimento e a diferenciação de células PC12 de rato. O efeito combinado de estimulação elétrica e orientação topográfica proporciona condutos nervosos mais eficientes.

Lu, X. et al. (2010) prepararam membranas de PCL/PPy, quitosana/PPy e PCL/quitosana/PPy e constataram que a cristalinidade das membranas PCL/PPy ou quitosana/PPy é, significativamente superior, a das demais, o que significa que existem mais domínios cristalinos nas membranas PCL/PPy ou quitosana/PPy; isso justifica sua menor condutividade elétrica em comparação com PCL/quitosana/PPy.

Durgam et al. (2010) fabricaram o copolímero biodegradável PCL-PPy, no qual o PPy garante a estimulação elétrica e a PCL a degradação por hidrólise. Ao longo de um período de duas semanas o copolímero PCL-PPy perdeu 26% da sua massa original quando submetido à temperatura de 37°C e à solução de PBS. Esse copolímero revestiu as paredes internas do conduto de guiamento de nervos (CGN) feitas do polímero biodegradável não condutor comercialmente disponível poli (3-hidroxitirato-co-3-hidroxitirato). Esse CGN foi implantado em um defeito de 10mm no nervo ciático de ratos e, após oito semanas, foi constatado o crescimento axonal. Os estudos indicaram que esse CGN tem boa biocompatibilidade, apoio, proliferação e crescimento de neurônios *in vivo* (sem estimulação elétrica) e de células PC12 *in vitro* (sem estimulação elétrica e com estimulação elétrica), sendo que a aplicação de um potencial elétrico constante (100mV) em células PC12, semeadas em PPy, quase duplica o crescimento do nervo (Durgam et al., 2010).



Nguyen et al. (2013) fabricaram CGN's condutores, mecanicamente fortes, suturáveis, biocompatíveis e biodegradáveis. Esses CGN's foram fabricados com uma camada interna de copolímero PCL-PPy e uma camada externa de PLGA com a finalidade de melhorar o suporte mecânico. Os resultados apresentados nesse estudo demonstram que, em condições fisiológicas, o conduto de PLGA/PCL-PPy é um material promissor para aumentar o comprimento do axônio na reparação do nervo já que, quando estimulado eletricamente, é capaz de aumentar a taxa de crescimento do comprimento do axônio em 21% quando medidos três dias após estimulação.

Assim, neste trabalho pretende-se preparar filmes a partir de polímero biodegradável (blendas de PCL/PLGA) e polímero condutor (PPy) nanoestruturado na forma de fibra, que apresentem propriedades morfológicas, elétricas e térmicas, bem como tempo de degradação e citotoxicidade adequados para a preparação de tubos multifuncionais capazes de atuarem na regeneração de nervo periférico.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção, serão abordadas as metodologias utilizadas para preparar as nanofibras de PPy, os filmes das blendas de PCL:PLGA e os filmes dos nanocompósitos de PCL:PLGA:nanofibras de PPy. Além disso, serão apresentadas as metodologias utilizadas para avaliar a degradação hidrolítica e a citotoxicidade dos filmes, bem como as técnicas de caracterização dos filmes e das nanofibras de PPy sintetizadas.

Os experimentos de síntese das nanofibras de PPy e de preparação dos filmes foram realizados no Laboratório de Organometálicos e Resinas – LOR/FAQUI/PUCRS. As amostras foram caracterizadas quanto à degradação hidrolítica *in vitro* (FAQUI/PUCRS), à morfologia da superfície (Laboratório Central de Microscopia e Microanálise – LabCEMM/PUCRS), à condutividade elétrica (UNESP - Campus de Ilha Solteira), às propriedades térmicas (Laboratório Multiusuário de Análise Térmica – LAMAT/UFRGS), ao ângulo de contato (FAQUI/PUCRS) e à citotoxicidade (Instituto de Toxicologia e Farmacologia–INTOX/PUCRS).

### 4.1. Materiais

Na Tabela 4.1., são apresentados os dados sobre os reagentes e os solventes utilizados nos procedimentos experimentais.

O PLGA foi adquirido da empresa PURAC na forma de *pellets* sendo armazenado sob argônio e refrigeração (-15°C). O copolímero PLGA utilizado nesse trabalho contém maior quantidade de unidades monoméricas de PLA em relação às de PGA, contendo 85% de PLA e 15% de PGA. Além disso, apresenta viscosidade inerente de 2,3 dL/g e massa molar (Mw) de 363.000 g/mol.

A PCL, de massa molar (Mn) de 80.000 g/mol, foi adquirida da empresa Sigma-Aldrich na forma de *pellets* sendo armazenada em temperatura ambiente.

Tabela 4.1. Caracterização dos reagentes utilizados

Produto	Origem	Pureza (%)
Poli(ácido L-láctico-co-ácido glicólico) – (PLGA Comercial)	PURAC (PLG8523; 85:15 L-Láctico:glicólico)	99,39
Pirrol (Py)	Sigma-Aldrich	98
Policaprolactona (PCL)	Sigma-Aldrich	99,5
Ácido p-toluenosulfônico monohidratado (APTS)	Sigma-Aldrich	98,50
Ácido Clorídrico (HCl)	Vetec	37
Clorofórmio (CHCl <sub>3</sub> )	Synth	99,80
Etanol (C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O)	Sigma- Aldrich	99,50
Cloreto Férrico (FeCl <sub>3</sub> )	Sigma- Aldrich	97
Solução tampão fostato salino (PBS)	Sigma- Aldrich	-----
Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico (MTT)	Sigma- Aldrich	-----
Dimetilsulfóxido (DMSO)	Sigma- Aldrich	-----

Para a confecção dos filmes dos experimentos foram utilizadas placas de vidro Petri de 5 cm de diâmetro ou moldes retangulares nas dimensões 5,2x9,2x2,0 cm e 5,2x10x2,0 cm. Água deionizada e água destilada foram utilizadas ao longo de todos os experimentos.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Síntese química do PPy

A preparação das nanofibras de polipirrol foi baseada na metodologia descrita por Valente (2014).

O monômero pirrol (Py) apresenta impurezas que devem ser removidas. Para tanto, primeiramente foi realizada a destilação do mesmo até a obtenção de um líquido incolor. Os demais reagentes foram utilizados como recebidos.

A reação para obtenção de nanofibras de polipirrol ocorreu por meio da polimerização química oxidativa, em meio aquoso, a 0°C, e na presença do ácido p-toluenosulfônico monohidratado (APTS) como agente dopante.

Além de dopante, o APTS funciona como surfactante, pois, durante a síntese, atua como *soft-template* já que é capaz de controlar a morfologia do polipirrol através da formação de micelas dentro das quais crescem as fibras. O APTS também auxilia no aumento da estabilidade térmica e da condutividade elétrica do produto (Osmatová et al., 2003; Goel et al., 2010; Xia et al., 2011; Valente, 2014).

A razão molar [dopante]:[monômero] foi igual a quatro. O agente oxidante utilizado foi o cloreto férrico (FeCl<sub>3</sub>) e a razão molar [oxidante]:[monômero] foi de [1,7]:[1]. As condições experimentais foram escolhidas devido aos resultados de trabalhos anteriores do grupo (Valente, 2014).

Em uma síntese típica, o pirrol (0,5mL;  $7,2 \cdot 10^{-3}$  mol) foi dissolvido em 20 mL da solução aquosa do dopante (APTS), sob agitação, em temperatura de 0°C por 60 minutos. Essa mistura foi chamada de dispersão A. Na sequência, foram adicionados, gota a gota, 5 mL da solução aquosa do agente oxidante (solução B). Ao término da adição da solução B, a reação transcorre por 24 h sob repouso e em banho de gelo nas 4 h horas iniciais. O produto corresponde a um sólido preto. A fim de remover as impurezas, este sólido foi filtrado e lavado com água destilada e etanol. O PPy foi seco em estufa sob temperatura de 80 °C durante 4 h. A massa de PPy obtida foi de 0,43200 g, que levou a um rendimento de 89%. A Figura 4.1. apresenta um esquema representativo do procedimento experimental.

Para avaliar a influência da agitação na obtenção das nanofibras de polipirrol, o procedimento foi repetido, porém mantendo-se a agitação até o término da reação, 24 h. A massa de PPy obtida foi de 0,40830 g, cujo rendimento foi de 85%.

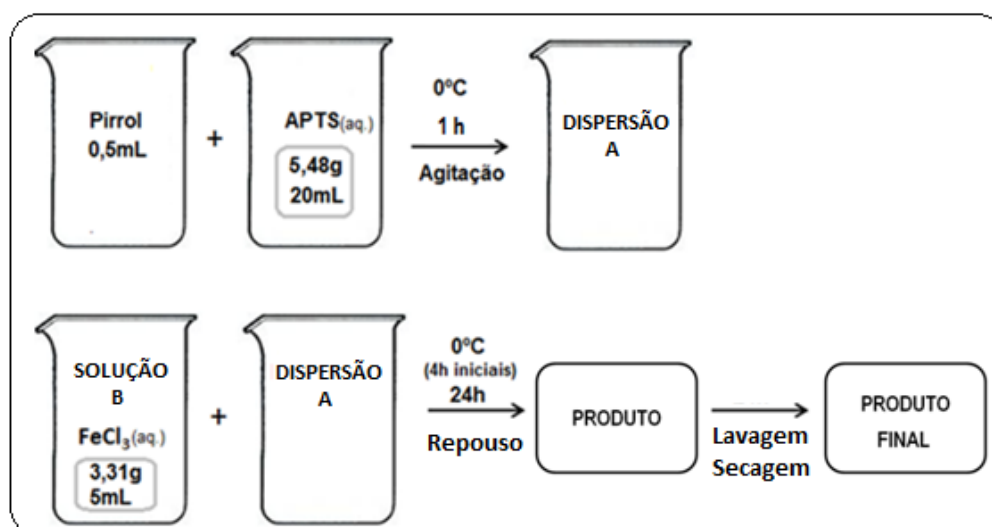


Figura 4.1. Diagrama esquemático da síntese química do PPy sob repouso.

#### 4.2.2. Preparação das Blendas e dos Nanocompósitos

Foram preparadas blendas de PCL:PLGA e nanocompósitos de PCL:PLGA:PPy com diferentes proporções dos polímeros, conforme descrito na Tabela 4.2.

Tabela 4.2. Formulações das Blendas e dos Nanocompósitos preparados.

Sistemas poliméricos	Siglas dos Sistemas poliméricos	% (m/m)			Massas dos sistemas poliméricos em placa Petry (Ø 5 cm) [g]
		PCL	PLGA	PPy	
Blendas	PCL(100)	100	0	0	0,20
	PCL:PLGA (90:10)	90	10	0	0,20
	PCL:PLGA (80:20)	80	20	0	0,20
	PCL:PLGA (70:30)	70	30	0	0,20
Nanocompósitos	PCL:PPy(100)	100	0	10	0,22
	PCL:PLGA:PPy (90:10)	90	10	10	0,22
	PCL:PLGA:PPy (80:20)	80	20	10	0,22
	PCL:PLGA:PPy (70:30)	70	30	10	0,22

Os filmes das blendas foram preparados por meio da técnica de evaporação de solvente. Massas previamente determinadas de PCL e PLGA foram dispersas em 7 mL de clorofórmio. A fim de promover a dispersão da mistura, a mesma foi deixada por 4 h, em temperatura ambiente, em banho de ultrassom de 40 kHz (Unique, modelo USC-2500A). Após, a dispersão dos polímeros foi vertida em placa de vidro

Petri ( $\varnothing$  5 cm). Em uma bancada de nível horizontal, o solvente foi evaporado por 48h em temperatura ambiente (Figura 4.2.).

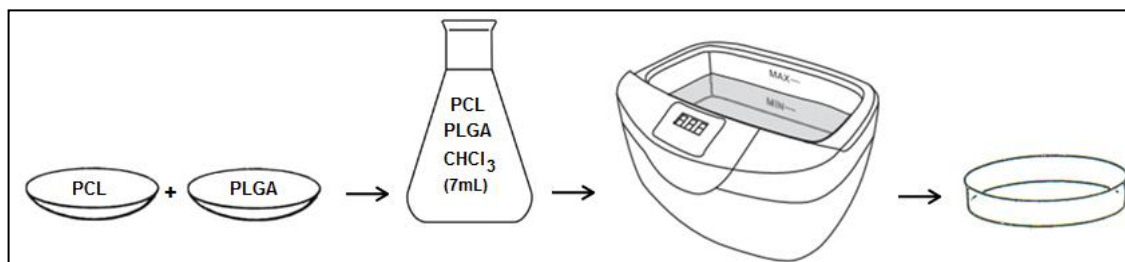


Figura 4.2. Diagrama esquemático da preparação dos filmes das blendas.

Além dos filmes das blendas de PCL:PLGA nas razões 90:10, 80:20 e 70:30, foram preparados filmes de PCL puro.

Os filmes dos nanocompósitos de PCL:PLGA:PPy foram preparados em três etapas. Na primeira, as blendas de PCL:PLGA foram preparadas nas diferentes proporções conforme a metodologia descrita anteriormente; na segunda etapa, ao PPy foi adicionado clorofórmio e a mistura foi mantida por 4 h, em temperatura ambiente, em banho de ultrassom de 40 kHz. Na última etapa, a dispersão de PPy foi adicionada às blendas de PCL:PLGA. Essa mistura foi mantida por 8h em banho de ultrassom, devido à dificuldade de dispersão da nanocarga. No preparo do filme de PCL:PPy, a metodologia utilizada foi a mesma. Para todos os filmes dos nanocompósitos, a quantidade de PPy adicionada foi de 10% (m/m) em relação à massa do polímero biodegradável.

Além de placas Petry ( $\varnothing$  5 cm), moldes retangulares foram utilizados, nas dimensões 5,2x9,2x2,0 cm e 5,2x10x2,0 cm, para preparar algumas amostras de filmes. Para tal, foi utilizada a mesma metodologia descrita anteriormente.

### 4.3. Técnicas de Caracterização

O estudo das propriedades dos nanocompósitos preparados relacionado à morfologia da superfície, à condutividade elétrica, ao processo de degradação hidrolítica, ao comportamento térmico e à citotoxicidade é fundamental para avaliar a forma como o implante pode vir a interagir com o organismo.

Para caracterizar as amostras produzidas foram utilizadas as seguintes técnicas: Degradação hidrolítica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Condutividade elétrica, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise Termogravimétrica (TGA), Determinação do ângulo de contato e Teste de citotoxicidade. O fluxograma dessas técnicas é apresentado na Figura 4.3.

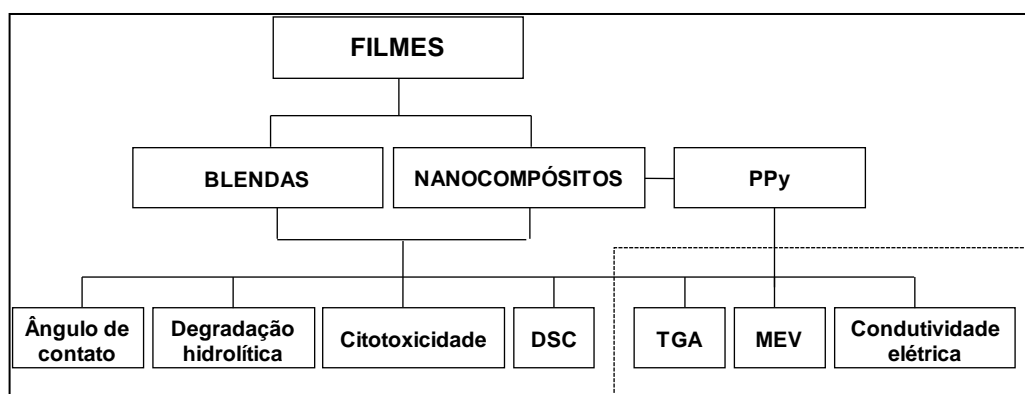


Figura 4.3. Fluxograma das técnicas de caracterização utilizadas.

#### 4.3.1. Degradação hidrolítica

Os testes de degradação hidrolítica *in vitro* dos sistemas poliméricos foram realizados conforme a Norma ASTM F1635-11 (2011). Esse método de ensaio destina-se a avaliar a taxa de degradação e as alterações nos materiais produzidos com polímeros hidroliticamente degradáveis utilizados em implantes cirúrgicos.

O teste divide-se em três partes: i) preparo das amostras e coleta de dados antes da degradação; ii) incubação em tempo determinado; iii) retirada das amostras da incubadora e coleta de dados após a degradação.

Os filmes foram cortados em amostras de 0,5 cm de diâmetro. Após a determinação da massa de cada amostra, as mesmas foram imersas em 5 mL de solução tampão fosfato salino (PBS) e mantidas à 37 °C em tubos de polipropileno, de 15 mL, em equipamento adaptado e termostatizado com agitação de 60 rpm. Esse equipamento corresponde a uma mesa agitadora, modelo MA-140/CF e marca Marconi, que simula uma incubadora.

As amostras foram feitas em sextuplicata e removidas conforme os tempos de degradação pré-definidos: 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. Finalizado o tempo de incubação, as amostras foram retiradas da incubadora e lavadas com água destilada. Na sequência, as amostras foram submetidas à secagem a vácuo e suas massas foram medidas até a obtenção de massa constante (Pt), para posterior caracterização por perda de massa, análise microscópica e medidas de pH da solução salina na qual as amostras permaneceram submersas. A perda de massa foi calculada através da Equação 4.1.

$$\% \text{ Perda de Massa} = [(P_0 - P_t) / P_0] \times 100 \quad (4.1.)$$

Sendo  $P_0$  correspondente à massa antes do teste de degradação e  $P_t$  correspondente à massa seca após cada tempo de degradação avaliado (Li, H. et al., 2005).

Para a medição dos valores de pH das soluções remanescentes nos tubos de polipropileno, foi utilizado um pHmetro, marca Digimed e modelo DM-20.

Uma balança analítica de cinco casas decimais, marca Mettler Toledo e modelo AG285, foi utilizada para realizar a medição das massas das amostras dos filmes.

#### **4.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As morfologias das amostras sólidas em pó de PPy e dos filmes produzidos foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para tanto, foi utilizado um equipamento da marca Philips XL30. As amostras a serem caracterizadas foram fixadas com uma fita de carbono dupla face condutora sobre um suporte (*stub*) e, posteriormente, recobertas com ouro em um metalizador BALTEC SCD 005. As micrografias foram registradas no modo de espalhamento elétrico usando onda elétrica com 20 keV ou 30 keV (tensão de aceleração). Os aumentos variaram, em geral, de 200x até 20.000x para observação das características topográfica dos materiais analisados.



Para a determinação do diâmetro das fibras de PPy, as micrografias foram tratadas e analisadas através do programa ImageJ, software de análise e processamento de imagens. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

#### 4.3.3. Condutividade elétrica

Os valores de condutividade elétrica do polipirrol e dos filmes foram determinados através do Método da Sonda quatro pontas (Figura 4.4.).

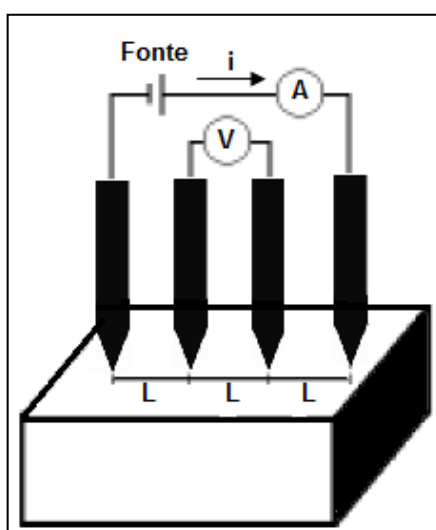


Figura 4.4. Esquema para medidas de condutividade elétrica pelo Método da Sonda quatro pontas. A letra "L" representa a distância entre as pontas. (Adaptado, Giroto e Santos, 2002).

As sondas que monitoram a corrente e a tensão são contatos pontuais, usualmente montados em um suporte especial com as pontas das sondas dispostas em linha, a uma distância equivalente umas das outras. Uma corrente é aplicada entre as sondas externas e a diferença de potencial é medida entre as duas sondas internas (Giroto e Santos, 2002).

Foi empregado o Equipamento Keithley, modelo 236, usado como medidor de corrente, e o Multímetro, modelo HP 34401, usado como medidor de voltagem. Para tal, a amostra de PPy é prensada e a pastilha obtida (13,4 mm de diâmetro e em torno de 1 mm de espessura) é submetida ao teste. As medidas de condutividade elétrica dos demais sistemas poliméricos foram realizadas diretamente sobre as superfícies dos filmes dos mesmos.

#### 4.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As temperaturas de fusão ( $T_f$ ) e de cristalização ( $T_c$ ), bem como, a entalpia de fusão ( $\Delta H_f$ ) dos filmes foram determinadas usando um equipamento de DSC (modelo DSC Q200, TA Instruments). A faixa de temperatura utilizada foi de 0 a 350°C com taxa de aquecimento e resfriamento de 10 °C/min, sob atmosfera de gás nitrogênio. Um primeiro aquecimento foi realizado para retirar a história térmica do polímero. Os resultados foram obtidos pelas curvas de resfriamento e do segundo aquecimento.

O percentual de cristalinidade foi determinado pela Equação 4.2. (Navarro-Baena et al., 2016; Jeeju et al., 2012)

$$\% X_c = [\Delta H_f / (\Delta H_f^\circ \cdot W)] \times 100 \quad (4.2.)$$

Onde %  $X_c$  é o grau de cristalinidade em porcentagem,  $W$  é a proporção mássica do homopolímero na blenda,  $\Delta H_f$  refere-se à entalpia de fusão da amostra obtida por DSC e  $\Delta H_f^\circ$  corresponde à entalpia de fusão de referência da PCL 100% cristalina, teoricamente, cujo valor é igual a 139,5 J/g (Barbanti et al., 2011).

#### 4.3.5. Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos filmes foi avaliada utilizando o equipamento SDT (modelo Q600, TA Instruments). A faixa de temperatura utilizada foi de 25 a 1000 °C com uma taxa de aquecimento 10 °C/min, sob atmosfera de nitrogênio.

#### 4.3.6. Determinação do ângulo de contato

Para medir o ângulo de contato dos filmes, foi utilizado um goniômetro Phoenix 301 da SEO. As determinações das medidas do ângulo de contato dos filmes foram realizadas com água deionizada e determinadas logo após o contato da gota com o material a ser analisado. Foram aplicadas seis gotas de água deionizada e realizada a média dos ângulos, considerando um erro experimental de 2° entre as medidas.

#### 4.3.7. Teste de citotoxicidade

A determinação da viabilidade celular é a metodologia mais comumente utilizada na pesquisa de toxicidade. A viabilidade é definida como a porcentagem de células vivas ou saudáveis na amostra (Kwolek-Mirek, 2014).

A viabilidade celular foi analisada por método colorimétrico que mede a atividade mitocondrial resultante da redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazóico (MTT) em formazan (Figura 4.5.).

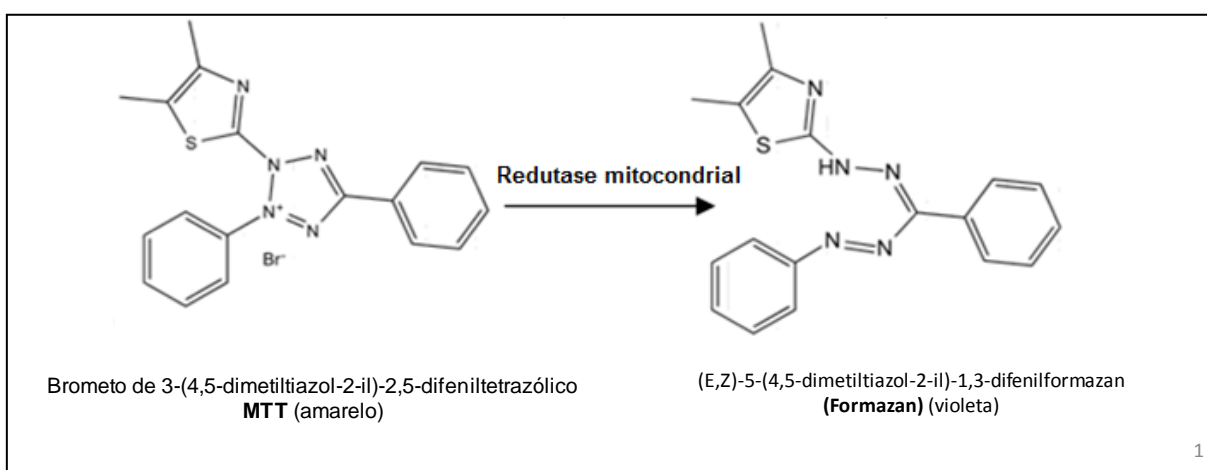


Figura 4.5. Reação de redução do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazóico (MTT)

A concentração celular foi determinada em contador automático (Cell Counter, Thermo Scientific) e  $5 \times 10^3$  células/poço foram plaqueadas em placas de 96 poços. Após 24 h, os filmes foram mergulhados no meio de cultura, na proporção de  $6\text{cm}^2$  por mililitro de meio. As células foram incubadas por 24 ou 48 h; os filmes foram retirados dos poços e as células incubadas com solução de MTT por 4 h a  $37^\circ\text{C}$ . Após esse período, a solução de MTT foi removida e os cristais de formazan solubilizados com dimetilsulfóxido (DMSO). A absorbância foi medida em espectrofotômetro (Spectramax – Molecular Devices) a 595 nm.

O ensaio de MTT foi realizado seguindo as normas preconizadas pela ISO 10993-5 (2009), a qual padroniza os testes de citotoxicidade de biomateriais em cultura de células por contato direto ou indireto.

Foram realizadas análises para determinar os efeitos dos polímeros puros (PLGA e PCL), das blendas e dos nanocompósitos sobre linhagens celulares no que diz respeito à viabilidade celular. As linhagens estudadas foram FGH, MRC-5 e RAW que correspondem, respectivamente, à fibroblasto bucal, à fibroblasto pulmonar e à macrófago.

#### **4.4. Análise Estatística**

Foram realizadas análises estatísticas para todos os resultados quantitativos que foram expressos como média±erro padrão. Os resultados de perda de massa e de pH foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste de Bonferroni. As medidas de ângulo de contato e os resultados do teste de citotoxicidade foram avaliados por ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni. Para todas as análises, foi utilizado um intervalo de confiança de 95%, com diferenças consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ . As análises estatísticas e os gráficos foram realizadas utilizando o programa GraphPad® (San Diego, CA, USA, versão 5.0).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Caracterização das Nanofibras de PPy

A metodologia utilizada para a obtenção de nanofibras de polipirrol foi a polimerização química oxidativa em meio aquoso, a 0°C, na presença do APTS como agente dopante.

Neste trabalho, foi avaliada a influência da agitação magnética na morfologia, no rendimento de reação e na condutividade elétrica do polipirrol.

A morfologia das amostras de polipirrol sintetizadas foi avaliada por meio da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Figura 5.1.

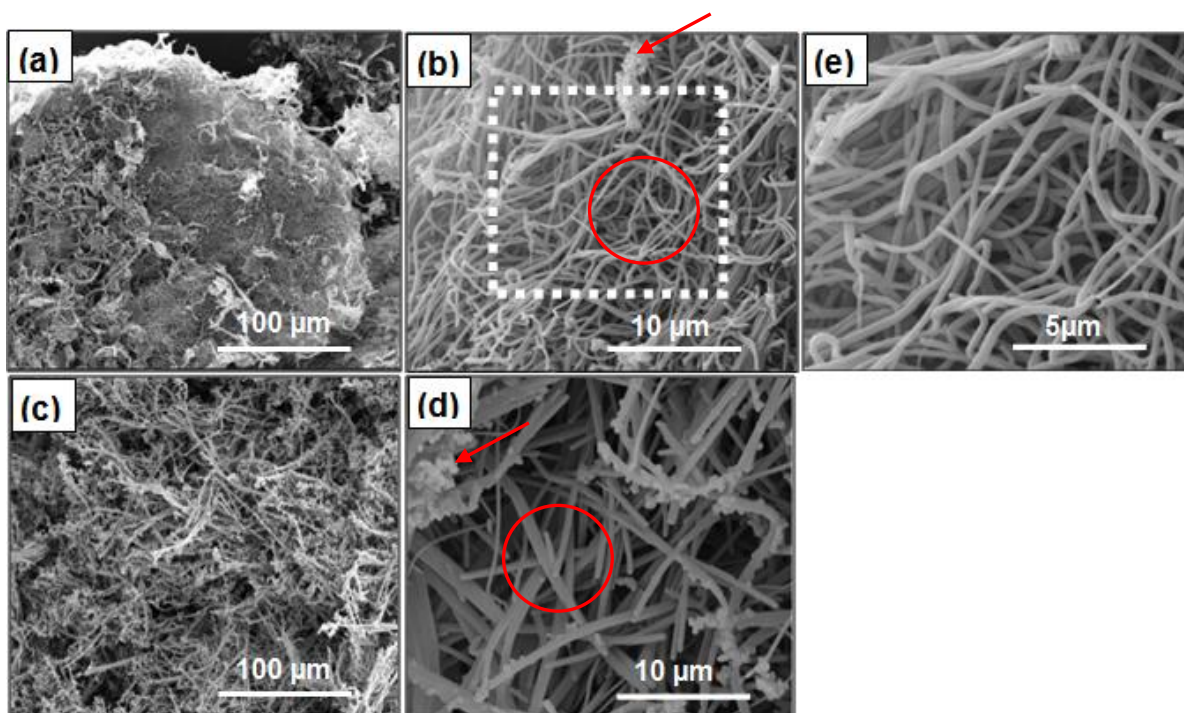


Figura 5.1. Micrografias das nanofibras de PPy obtidas: (a) e (b) agitação magnética; (c) e (d) repouso. (e) ampliação da região demarcada em (b). Ampliação: (a) e (c) 1.000x; (b) e (d) 10.000x; (e) 20.000x.

A partir da Figura 5.1, observa-se que, nas condições avaliadas, ambas as metodologias resultaram em nanofibras homogêneas (indicadas na Figura 5.1 com círculos) e em nanofibras com aglomerados na superfície (indicadas na Figura 5.1. com setas). A morfologia de partículas globulares aglomeradas é resultado do crescimento descontrolado da cadeia polimérica. A obtenção de nanoestruturas de forma mais controlada e ordenada por métodos de síntese mais simples, como o caso do método químico utilizado, é considerado um grande desafio (Liu et al., 2001; Goel et al., 2010).

As fibras obtidas sob agitação apresentaram dimensão média de  $334\pm 66$  nm (Figura 5.1(b)). Para as fibras obtidas sob repouso, a dimensão média foi de  $589\pm 144$  nm (Figura 5.1(d)). As fibras tenderam a aglomerar-se em redes, criando dificuldades na estimativa do comprimento das mesmas.

Neste trabalho, foram obtidas fibras em ambas as condições de síntese – agitação e repouso – porém, as fibras obtidas sob repouso apresentaram-se mais espessas do que as obtidas sob agitação magnética. Porém, na literatura, Kaner e Li (2006) relataram que quando o sistema é mecanicamente agitado, as nanofibras inicialmente formadas colidem umas com as outras e uma nucleação heterogênea acontece na superfície dessas partículas, resultando na agregação das nanofibras inicialmente formadas. Quando o sistema é deixado em repouso é esperada uma nucleação homogênea que resulta em nanofibras com superfície regular e tamanhos uniformes.

Feng et al. (2009) ao avaliarem a influência da agitação na obtenção de nanofibras, constataram que é possível obter nanofibras sob agitação durante a polimerização. Esse estudo revelou que micro e nanofibras mais espessas e com aglomerados na superfície são obtidas quando a polimerização ocorre sob agitação, devido à fusão das fibras mais finas durante a agitação.

Na literatura, é mencionado que além da influência da agitação, o tempo de reação, a temperatura e a razão [monômero]:[dopante] também interferem na morfologia do polímero resultante (Masuda e Asano, 2003; Kaynak e Foitzik, 2010; Valente, 2014).

É válido salientar que a morfologia de fibras é um aspecto importante e desejável na preparação de biomateriais, devido à semelhança com os tecidos biológicos que podem favorecer o tratamento e a aceitação do material pelo organismo (Leung e Ko, 2011; Spivery et al., 2012).

O PPy é um polímero condutor que, quando dopado com variados dopantes, apresenta um comportamento na faixa de semicondutores,  $10^{-7}$ -  $10^2$  S/cm (Yang et al., 2012).

A síntese química é uma das técnicas utilizadas para a síntese de polímeros condutores, embora seja considerada de difícil reprodutibilidade de resultados, pois a condutividade elétrica do polímero condutor sintetizado é extremamente sensível à pureza do solvente, à natureza do oxidante, à concentração dos reagentes, ao tempo de reação, à temperatura e à velocidade de agitação (Calvo et al., 2002).

A Tabela 5.1. apresenta os valores de condutividade elétrica determinados para as amostras de PPy obtidas nas diferentes condições de síntese, bem como os rendimentos obtidos.

Tabela 5.1. Condutividade elétrica e rendimento do PPy em diferentes condições de síntese.

<b>Amostra</b>	<b>Condição de Síntese</b>	<b>Condutividade Elétrica (S/cm)</b>	<b>Rendimento (%)</b>
PPy- APTS	Agitação	$1,1 \times 10^{-1}$	85
	Repouso	$2,0 \times 10^{-1}$	89

A partir da tabela 5.1., observa-se que os valores de condutividade elétrica encontram-se na faixa de semicondutores ( $10^{-7}$  –  $10^2$  S.cm<sup>-1</sup>) e a agitação não resultou em uma diferença relevante. Além disso, a agitação magnética durante 24h de reação também não influenciou significativamente o rendimento da síntese.

A estabilidade térmica do PPy foi avaliada através da análise termogravimétrica (TGA), Figura 5.2.

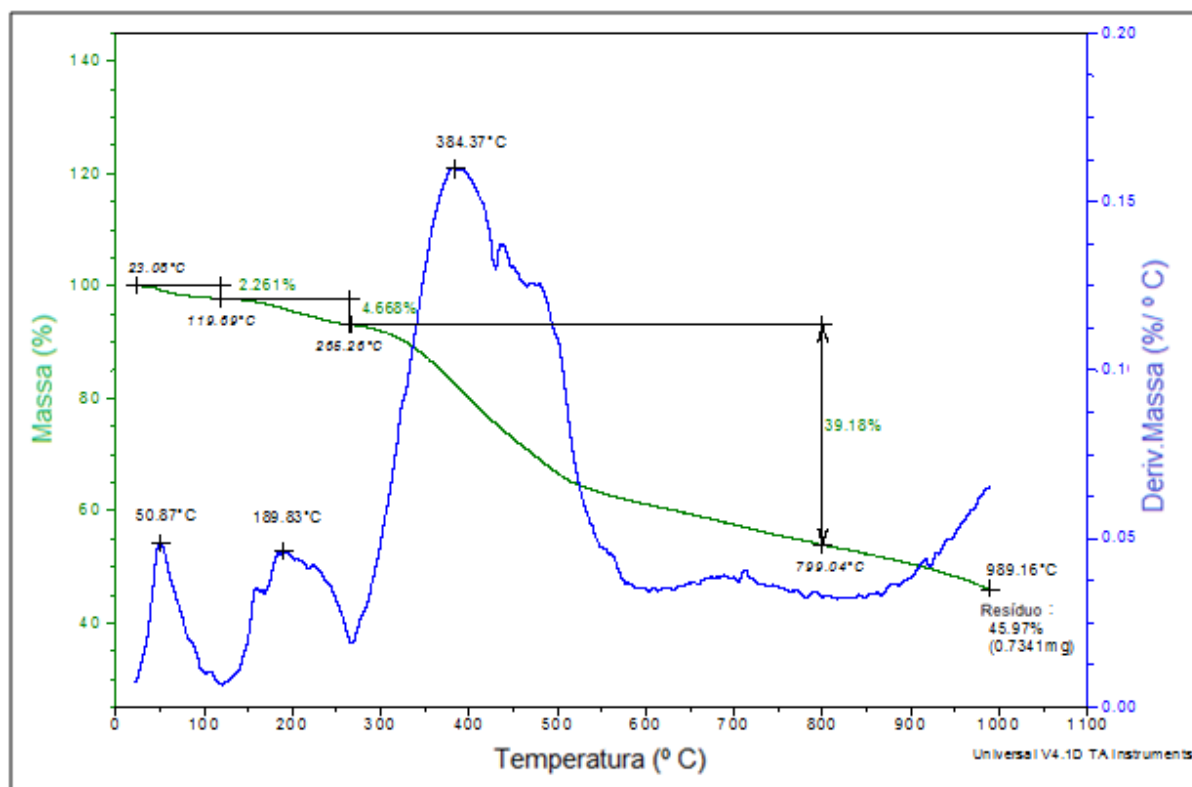


Figura 5.2. Curvas de TGA e DTG das nanofibras de PPy.

A partir do termograma, observam-se três etapas de perda de massa. Na primeira etapa, correspondente a faixa de temperatura de 23 – 120 °C, o polímero perde 2,3 % de massa. Essa perda é referente à volatilização de moléculas de água fisicamente adsorvidas (Omastová et al., 2003; Basavaraja et al., 2009; Goel et al., 2010) e eliminação de oligômeros e monômeros que não reagiram (Basavaraja et al., 2009). É importante notar que as fibras nanométricas mostram dessorção a baixa temperatura o que pode ser devido ao tamanho nanométrico da matriz de PPy que facilita o processo de dessorção (Goel et al., 2010).

Até, aproximadamente, 265 °C, o polipirrol perde mais 4,7% relativo à remoção de íons dopantes (para-tolueno sulfonatos) não reagidos da superfície do PPy e à possível produção e liberação de gases. A principal perda de massa, 39,2%, ocorre na faixa de 265 – 800 °C, correspondendo à temperatura de degradação máxima de 384 °C. Nessa etapa, a perda de massa é atribuída ao processo de degradação do dopante e ao rompimento das cadeias de PPy. Na temperatura de 989 °C, o resíduo obtido foi de 46% referente ao PPy que não se degradou (Basavaraja et al., 2009; Goel et al., 2010). PPy dopado com ácidos sulfônicos são



termicamente estáveis na faixa de temperatura de 10 a 400 °C. Além dessa faixa de temperatura, o processo de decomposição torna-se muito rápido (Goel et al., 2010).

## 5.2. Caracterização das Blendas e dos Nanocompósitos

Os filmes de PCL, das blendas de PCL:PLGA e dos nanocompósitos de PCL:PPy e PCL:PLGA:PPy foram obtidos pelo método da evaporação do solvente conforme descrito no item 4.2.2.

A Figura 5.3. ilustra o filme de PCL puro e a Figura 5.4., os filmes dos nanocompósitos.



Figura 5.3. Imagem do filme de PCL.

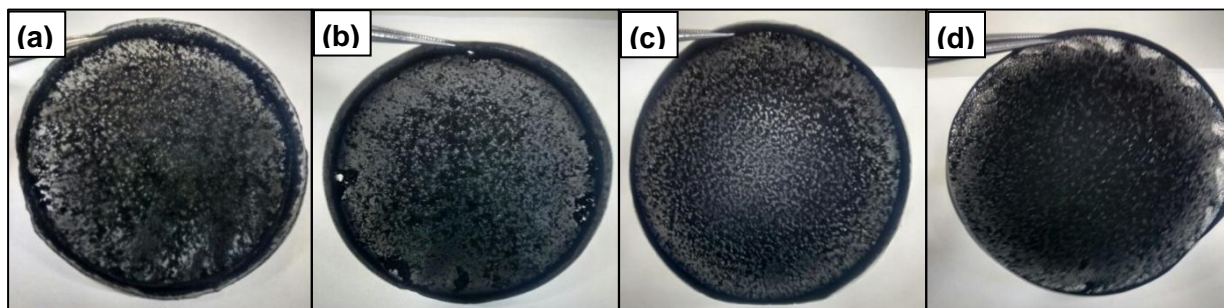


Figura 5.4. Imagens dos filmes dos nanocompósitos: (a) PCL:PPy (100); (b) PCL:PLGA:PPy (90:10); (c) PCL:PLGA:PPy (80:20) e (d) PCL:PLGA:PPy (70:30).

Observa-se que a dispersão do PPy não é homogênea, mesmo após 8 h de sonicação no PCL puro, e tende a melhorar com a adição do PLGA nas blendas. A dificuldade de dispersão do PPy se deve à sua forma nanoestruturada e, portanto, a sua tendência em formar aglomerados de nanofibras.

A partir da Figura 5.5., fica mais evidente a influência do PLGA na dispersão da nanocarga na matriz biodegradável.

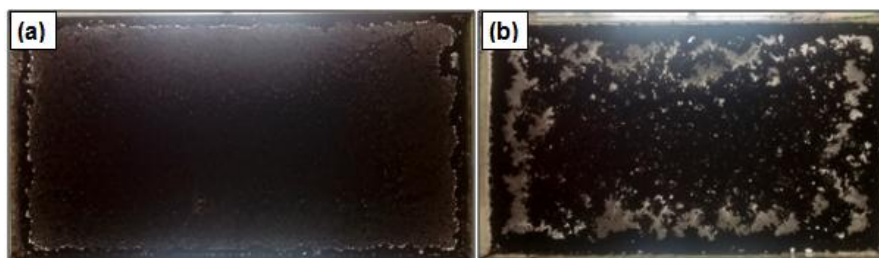


Figura 5.5. Imagens dos filmes dos nanocompósitos preparados em molde retangular:  
(a)PCL:PLGA:PPy (70:30) e (b) PCL:PPy (100).

Nas blendas e nos nanocompósitos, as interações intermoleculares entre os polímeros controlam o nível de miscibilidade. As interações intermoleculares influenciam a homogeneidade da distribuição de PPy na matriz de PCL ou de PCL:PLGA. O centro mais provável para interações específicas nestas misturas é a ligação de hidrogênio entre a carbonila dos grupos ésteres do PCL e do PLGA e o grupo  $-NH-$  do PPy. (Corres et al., 2006). A Figura 5.6 mostra a interação intermolecular por ligação de hidrogênio entre a PCL e o PPy.

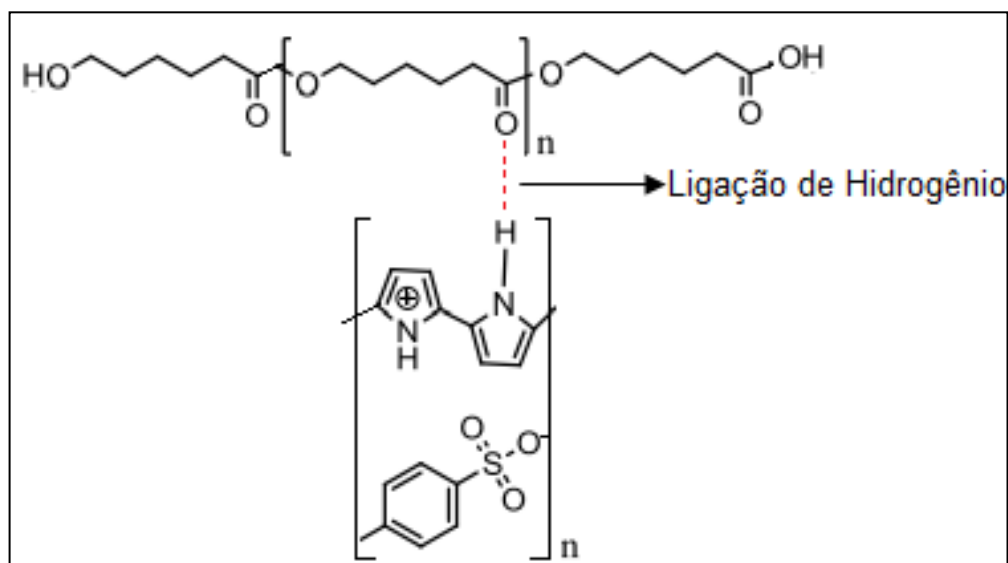


Figura 5.6. Demonstração da interação intermolecular por ligação de Hidrogênio entre a carbonila da PCL e o grupo  $-NH-$  do PPy.

O PPy interage com ambos os polímeros que compõem a matriz (PCL e PLGA) por ligações de hidrogênio. Percebe-se que a adição de PLGA favorece a dispersão do PPy no filme. Esse comportamento pode estar relacionado ao fato de a carga se dispersar melhor na fase amorfa, conforme já mencionado na literatura (Lu, X. et al., 2010).

### 5.3. Propriedades das Blendas e dos Nanocompósitos

#### 5.3.1. Degradação hidrolítica

Os comportamentos de degradação hidrolítica dos filmes foram investigados em diferentes tempos de incubação. Foram avaliadas a composição das blendas e a presença do PPy no processo de degradação dos sistemas poliméricos.

Na sequência, são apresentados os resultados de perda de massa, as medidas de pH e as micrografias das superfícies em função dos tempos de incubação, nos quais os filmes estiveram em contato com a solução tampão fosfato salino e sujeitos à degradação hidrolítica, descrito no item 4.3.1.

Tabela 5.2. Comportamento de perda de massa (%) até 180 dias de degradação.

Amostra	Dias					
	30	60	90	120	150	180
PCL (100)	2,18±0,87	2,81±0,16	1,75±0,51	4,08±0,60	4,62±0,71	NA
PCL:PLGA (90:10)	1,97±0,63	2,58±0,36	1,42±0,76	3,98±1,24	2,71±0,68	NA
PCL:PLGA (80:20)	1,76±0,25	2,79±0,32	0,80±0,40	3,92±0,84	4,73±0,59	NA
PCL:PLGA (70:30)	2,14±0,73	2,64±0,55	0,65±0,12	3,96±0,47	5,11±0,67	NA
PCL:PPy (100)	1,69±0,35	2,62±0,72	3,08±0,37	2,72±0,20	3,39±0,38	3,19±0,47
PCL:PLGA:PPy (90:10)	1,22±0,43	2,70±0,63	3,75±0,58	3,50±0,69	3,89±0,63	3,95±0,19
PCL:PLGA:PPy (80:20)	1,51±0,48	3,94±0,62	2,87±0,27	3,70±0,28	3,73±0,24	4,68±0,56
PCL:PLGA:PPy (70:30)	2,39±0,20	4,03±0,39	3,75±0,73	2,83±0,44	2,71±0,30	4,70±0,44

NA: não avaliado

A Tabela 5.3. apresenta as faixas de perda de massa das blendas e dos nanocompósitos em função do tempo de degradação.

Tabela 5.3. Resumo das faixas de perda de massa (%) para Blendas e Nanocompósitos.

<b>Dias</b>	<b>Blendas</b>	<b>Nanocompósitos</b>
30	1,39 – 2,63	1,34 – 2,07
60	2,36 – 3,05	2,73 – 3,91
90	0,71 – 1,60	2,88 – 3,85
120	3,20 – 4,77	2,79 – 3,59
150	3,63 – 4,96	3,04 – 3,82
180	NA	3,72 – 4,55

\*NA: não avaliado

Os dados de perda de massa média foram avaliados em função da composição da blenda dentro de cada período de tempo de degradação avaliado. Também foi avaliada a perda de massa média considerando uma mesma composição nos diferentes períodos de tempo de degradação avaliados. Para todas as análises, foram consideradas diferenças estatisticamente significativas para  $p < 0,05$  (\*) ou  $p < 0,01$  (\*\*).

Os resultados de perda de massa das blendas também são mostrados na forma de gráfico (Figura 5.7.).

A influência da adição do PLGA na matriz de PCL, dentro de um mesmo período de tempo, foi verificada avaliando os percentuais de perda de massa dos filmes PCL (100), PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30) no período de tempo que se deseja investigar. Foi observado que apenas em 150 dias de incubação houve uma perda de massa duas vezes maior da blenda PCL:PLGA (70:30) em relação a PCL:PLGA (90:10) (Figura 5.7.). Esses resultados indicam que a adição de PLGA, em menores tempos de degradação, não influencia, significativamente, o processo de perda de massa do filme de PCL puro e das blendas. Alterações significativas, devido à composição, começam a ser percebidas somente a partir de maiores tempos de degradação.

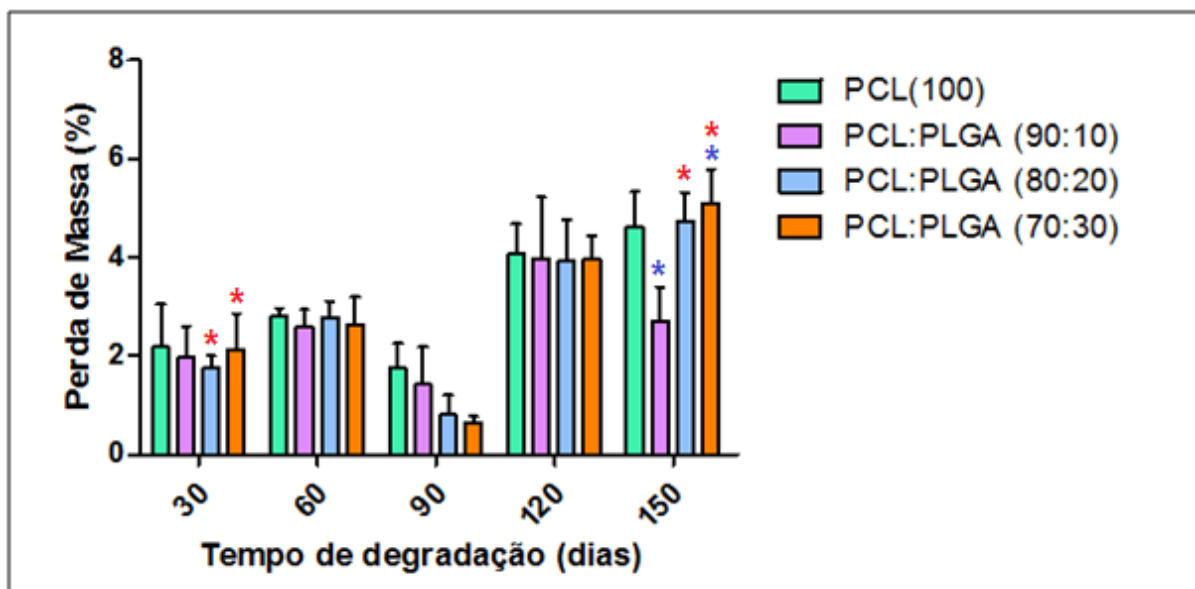


Figura 5.7. Gráfico do comportamento de perda de massa do filme de PCL puro e dos filmes das blendas PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30). \* $p < 0,05$ , entre PCL:PLGA (90:10) e (70:30) em 150 dias e \* $p < 0,05$ , entre 30 e 150 dias para PCL:PLGA (80:20) e (70:30).

Também foi avaliado o processo de perda de massa para a blenda com a mesma composição em função do período de degradação. Por exemplo, a evolução da perda de massa da blenda PCL:PLGA (70:30) em 30, 60, 120 e 150 dias de incubação. Foi observado que perdas de massa significativas foram verificadas para as blendas PCL:PLGA (80:20) e (70:30). Em 150 dias de degradação, essas blendas perderam cerca de 2,5 vezes mais massa em relação às perdas obtidas em 30 dias (Figura 5.7.). Observa-se que variações significativas, em processos de perda de massa, só são verificadas em função do tempo para as composições com maior percentual de PLGA.

A Figura 5.8. apresenta gráficos que revelam a influência da adição do PPy no filme de PCL puro e nas blendas em função do tempo de degradação avaliado.

A análise estatística dos resultados, apresentados na Tabela 5.2 e na Figura 5.8., permite avaliar a influência da adição do polipirrol nos percentuais de perda de massa dos filmes para cada composição de PCL e PLGA dentro de um mesmo período de incubação estudado. Esses resultados revelaram que a adição de PPy foi significativa ( $p < 0,05$ ) aos 90 dias de incubação para o filme com 80% de PCL e 20% de PLGA. Nesse caso, a perda de massa do nanocompósito revelou ser, aproximadamente, quatro vezes maior que a da blenda (Figura 5.8. (c)). Para o filme

com 70% de PCL e 30% de PLGA, houve diferença significativa aos 90 dias ( $p < 0,01$ ) e aos 150 dias de incubação ( $p < 0,05$ ). Aos 90 dias de incubação, a perda de massa do nanocompósito revelou ser, aproximadamente, seis vezes maior. No entanto, aos 150 dias, o maior percentual de perda de massa foi verificado para a blenda, aproximadamente, duas vezes maior (Figura 5.8. (d)). Para as demais blendas e nanocompósitos (Figura 5.8. (a) e (b)), não houve diferença significativa nos tempos de incubação avaliados. Esse resultados permitem constatar que a adição de PPy influenciou as perdas de massa das blendas com maior percentual de PLGA nos períodos de tempo de 90 e 150 dias.

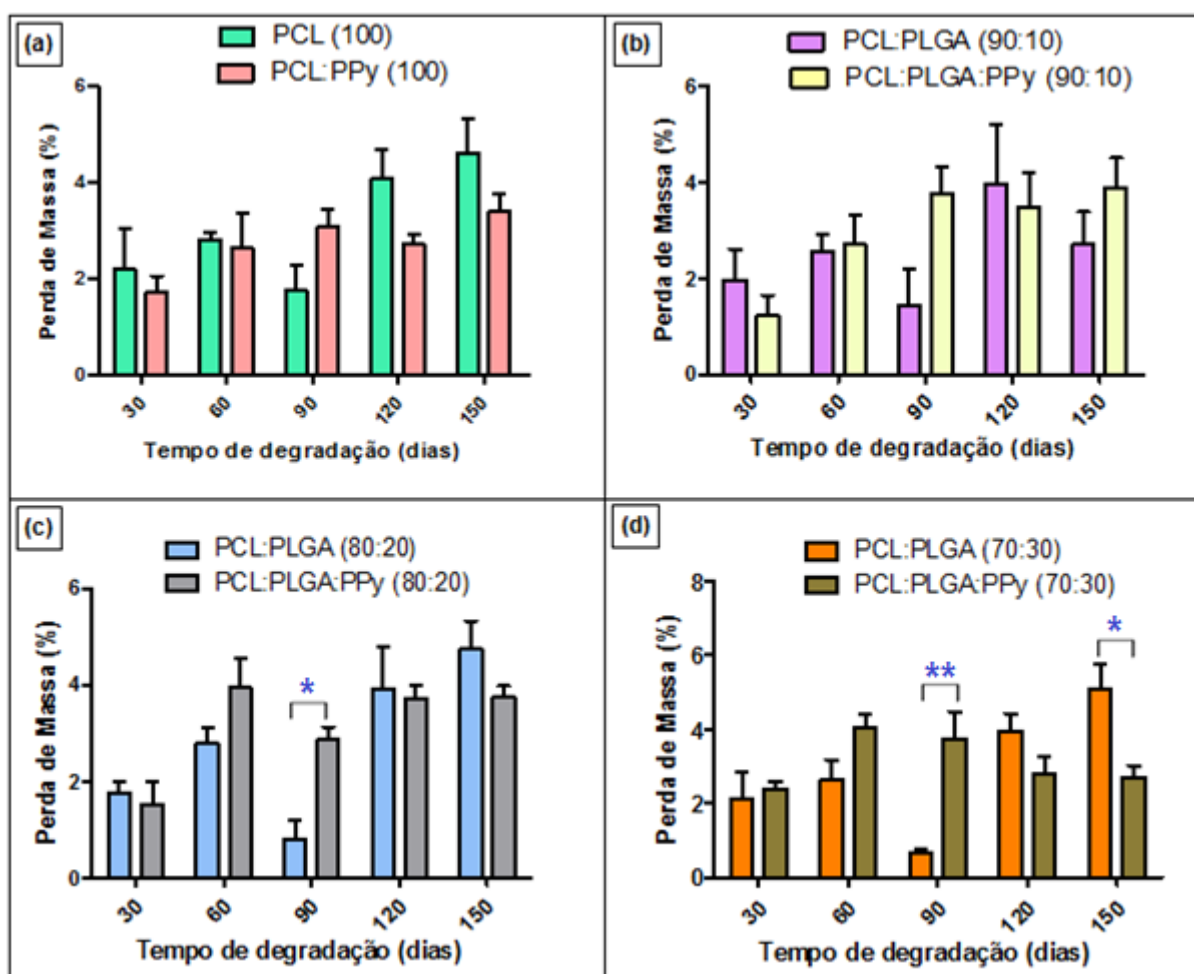


Figura 5.8. Gráfico do comportamento de perda de massa dos filmes de PCL puro, das blendas PCL:PLGA e dos respectivos nanocompósitos PCL:PLGA:PPy: (a) 100, (b) 90:10, (c) 80:20 e (d) 70:30. \* $p < 0,05$  ou \*\* $p < 0,01$ .

A Figura 5.9. apresenta o gráfico que revela a influência da adição de PLGA na matriz PCL:PPy, conforme o tempo de degradação avaliado.

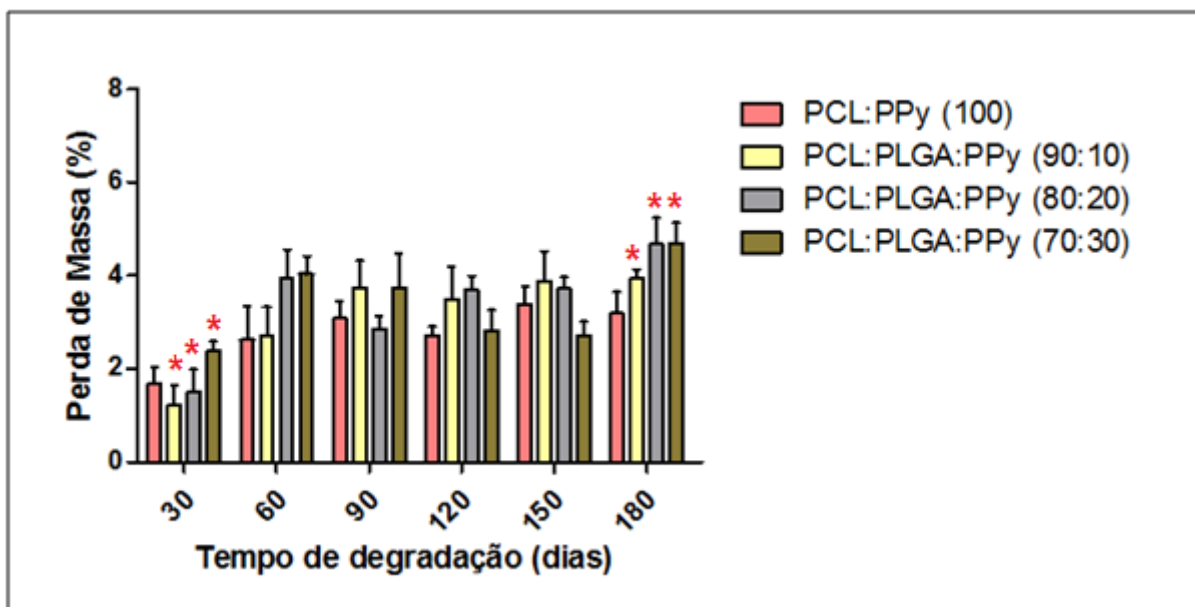


Figura 5.9. Gráfico do comportamento de perda de massa dos nanocompósitos: PCL:PPy (100) e PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30). \* $p < 0,05$ , entre 30 e 180 dias para PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30).

Quanto ao estudo da influência da composição dos nanocompósitos na perda de massa dentro de um mesmo período de tempo - por exemplo, todos os sistemas no tempo de 60 dias de incubação - a análise estatística revelou que a adição de PLGA não influenciou, significativamente, a perda de massa da matriz PCL:PPy (100) dentro de um mesmo tempo. Portanto, avaliando dentro de cada período de tempo, a composição do nanocompósito não influenciou estatisticamente a perda de massa. Logo, todos os nanocompósitos revelaram o mesmo comportamento de perda de massa dentro de um mesmo período de tempo.

A mesma composição do nanocompósito em diferentes tempos de degradação também pode ser avaliada – por exemplo, PCL:PLGA:PPy (90:10) em 30, 60, 90, 120, 150 e 180 dias. A análise estatística revelou que todos os nanocompósitos, exceto PCL:PPy (100), perderam cerca de 3 vezes mais massa aos 180 dias comparado às perdas obtidas aos 30 dias de incubação (Figura 5.9.).

Os resultados de perda de massa indicam que a adição do PLGA à matriz de PCL somente exerce influência significativa em maior tempo de degradação e quando as composições das blendas apresentam maior percentual de PLGA.

Já a adição de PPy influenciou as perdas de massa das blendas com maior percentual de PLGA, além de em maiores tempos de degradação, 150 dias, também no tempo de 90 dias.

No caso do filme PCL:PPy (100), não percebeu-se alteração no comportamento de perda de massa com a evolução do período de degradação, entretanto, todos os demais nanocompósitos que apresentam PLGA na sua composição, revelaram perda significativa de massa com a evolução do período de degradação. Esse comportamento indica que a presença de PLGA é responsável por provocar perdas de massa significativas com a evolução do processo de degradação.

O estudo de degradação realizado no presente trabalho revela que os filmes expostos por mais tempo no PBS tendem a apresentar maiores percentuais de perda de massa, embora o processo de degradação seja lento. Esse comportamento está de acordo com a literatura, pois estudos de Barbanti et al. (2011) mostram que a PCL é morfologicamente estável até um ano de degradação. Quanto ao PLGA 85:15, utilizado no presente estudo, o processo de degradação começa no período de 5 a 6 meses (Ulery et al., 2011).

Da mesma forma, o presente estudo revela que a perda de massa dos filmes é lenta e parece ser definida pelo comportamento de degradação lento da PCL, que, por ser um polímero semi cristalino e relativamente hidrofóbico (Tang et al., 2005) apresenta faixas lentas de degradação.

Com relação à influência do tempo, é importante destacar que, aos 90 dias, o percentual de perda de massa das blendas foi menor em relação ao observado aos 60 dias de incubação. Esse comportamento também foi observado no estudo de Casarin et al. (2011). Estudo esse que consistiu na degradação, *in vitro*, da blenda de policaprolactona (PCL) e poli(hidroxibutirato-co-hidroxivalerato) (PHBV) em solução tampão fosfato salino. Esse estudo revelou que os arcabouços de PCL e PHBV perderam massa ao longo do tempo de contato com a solução tampão fosfato, porém, com redução na velocidade de perda de massa após 60 dias. Esse comportamento é resultado da redução da fase amorfa dos polímeros à medida que a degradação evolui, já que o acesso das moléculas de água às cadeias é mais fácil



na fase amorfa, esta é consumida primeiro. No primeiro estágio de degradação, há penetração e difusão da água nas regiões amorfas do polímero e cisão hidrolítica das ligações ésteres das cadeias poliméricas. O segundo estágio ocorre quando parte considerável da região amorfa está degradada, e prossegue no centro dos domínios cristalinos. Dessa forma, há um aumento percentual do grau de cristalinidade (Barbanti et al., 2006; Lucas et al., 2008).

#### 5.3.1.1. Medidas de pH

Os filmes foram degradados em 5 mL de solução tampão fosfato salino (PBS; pH ~7,4; à 37 °C e 60 rpm) e o pH do meio foi acompanhado em função do tempo de degradação. O uso da solução tamponada permite uma simulação de degradação mais próxima do processo *in vivo*. Além disso, a solução pode neutralizar os produtos ácidos liberados pela hidrólise do PLGA impedindo uma aceleração na degradação, porém, com o aumento na taxa de degradação, esse controle torna-se cada vez mais difícil e a tendência é o decaimento do pH (Renouf-Glauser et al., 2005; Jahno, 2005; Alexis et al., 2006; Yoshioka et al., 2008).

Nesse estudo, foi avaliada a alteração do pH da solução tampão isenta de amostra. O pH dessa solução permaneceu em 7,4.

Os resultados das medidas de pH das soluções de PBS, nas quais as amostras foram imersas, são exibidos na Figura 5.10.

Os valores médios de pH revelaram-se na faixa de 7,33 a 7,34 para as blendas e na faixa de 7,28 a 7,31 para os nanocompósitos até 150 e 180 dias de incubação avaliados, respectivamente.

Constata-se, portanto, que não houve alteração significativa dos valores de pH nos tempos de incubação avaliados. Esse resultado permite concluir que, entre as blendas, a adição de PLGA não influencia, de maneira relevante, os valores de pH até os 150 dias de incubação e a adição de PPy nas matrizes de PCL:PLGA também não influencia, de maneira relevante, os valores de pH até os 180 dias investigados.

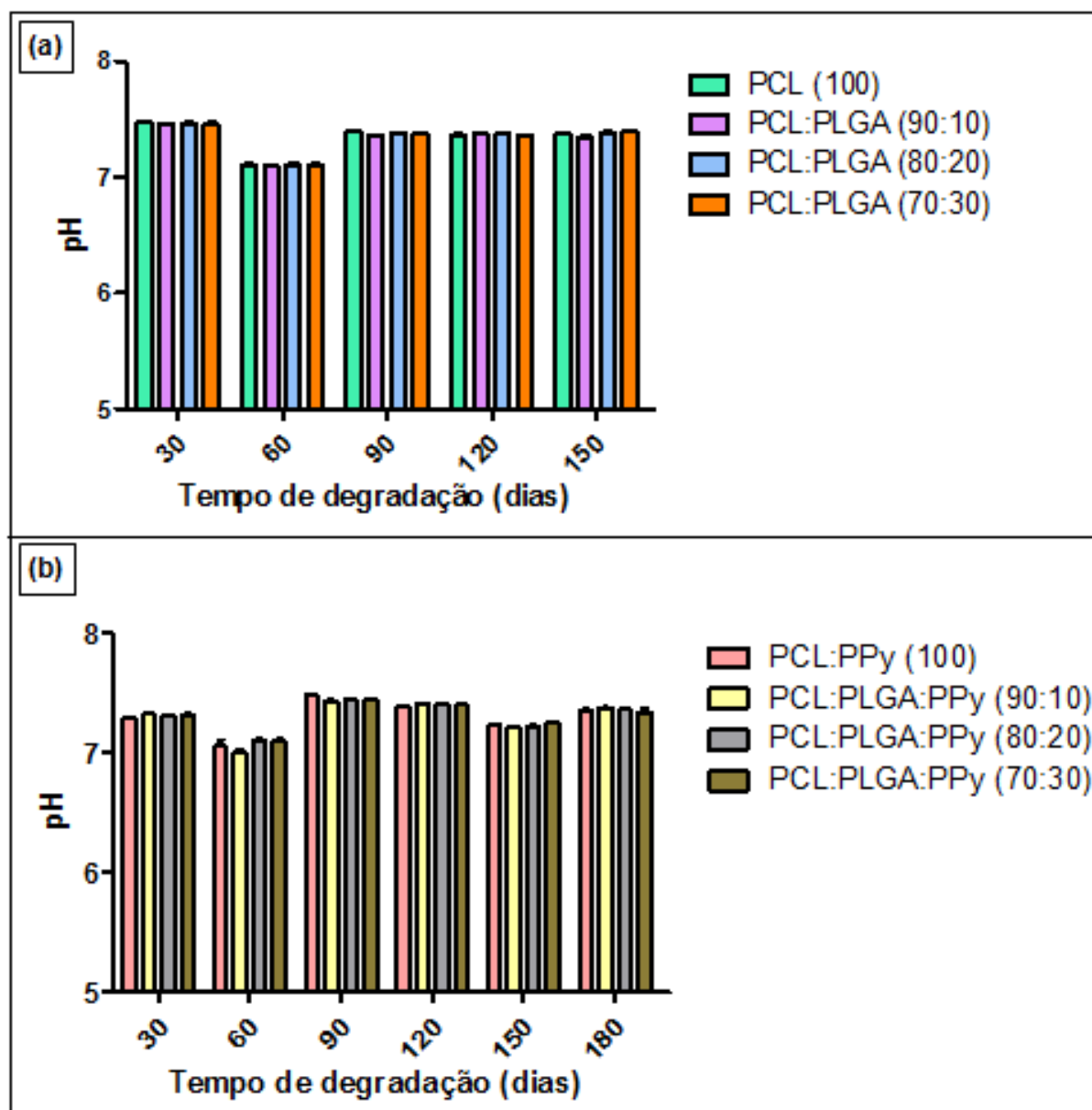


Figura 5.10. Valores de pH da solução PBS: (a) PCL (100), PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30) até 150 dias de incubação e (b) PCL:PPy (100), PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30) até 180 dias de incubação.

Na literatura, as matrizes de PLGA 85:15, ao serem submetidas à degradação hidrolítica sob as mesmas condições do presente estudo, revelam que, nas primeiras semanas, o pH mantém-se constante, próximo de 7,4. Somente a partir de oito semanas o valor do pH começa a decair, consideravelmente, devido aos produtos ácidos que resultam do processo de hidrólise do PLGA (Alexis et al., 2006; Yoshioka et al., 2008).

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmam que o processo de degradação dos sistemas poliméricos estudados é lento, já que os produtos ácidos

da hidrólise do PLGA não estão presentes em quantidade suficiente para provocar alteração no valor do pH na solução de PBS.

### 5.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As morfologias das amostras foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura antes e após os períodos de 60, 90 e 150 dias de incubação.

Na sequência, são ilustradas as micrografias das amostras dos filmes das blendas e dos nanocompósitos submetidos à degradação hidrolítica.

A Figura 5.11. revela as micrografias dos filmes de PCL puro e das blendas PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30) antes do processo de degradação.

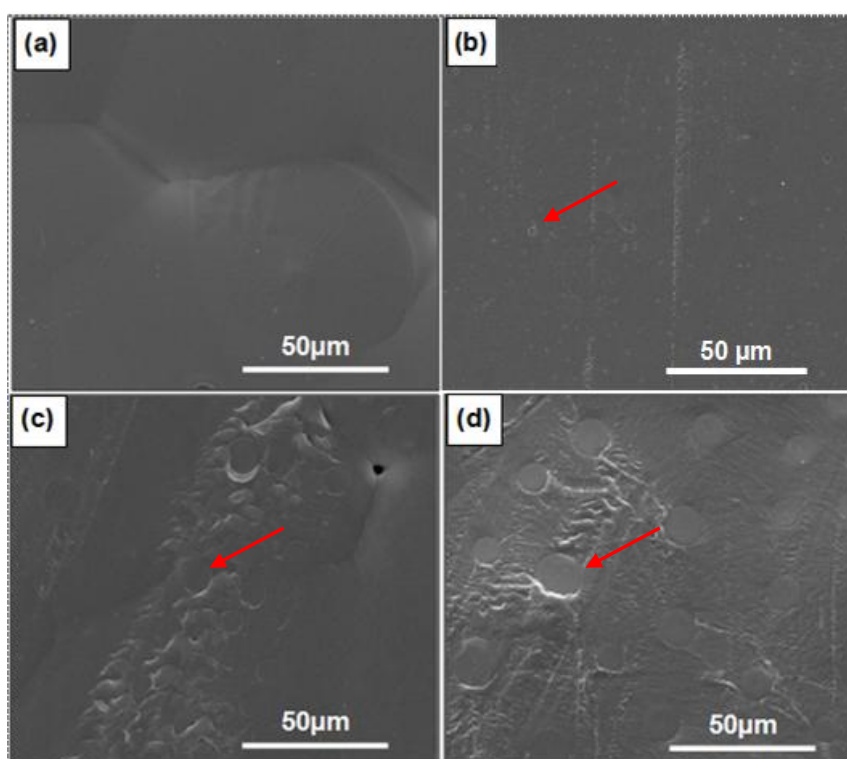


Figura 5.11. Micrografias das superfícies dos filmes antes da degradação: (a) PCL (100); (b) PCL:PLGA (90:10); (c) PCL:PLGA (80:20) e (d) PCL:PLGA (70:30). Ampliação: 2.000x.

A Figura 5.11. (a) é uma ampliação da Figura 5.12. Nesta, é possível perceber a presença de agregados esféricos característicos com lacunas na forma de vazios na superfície do filme de PCL.

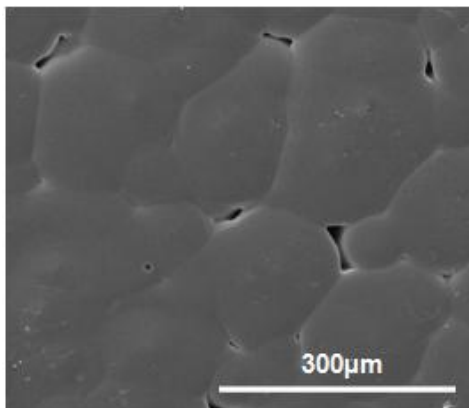


Figura 5.12. Micrografia da superfície do filme de PCL antes da degradação. Ampliação 500x.

A partir da Figura 5.11., verifica-se que a adição de PLGA na matriz de PCL, altera a superfície do filme, pois a fase de PLGA imiscível se dispersa na matriz como domínios esféricos (indicados por setas na Figura 5.11.). Esses domínios aumentam à medida que aumenta a concentração de PLGA. Isso indica uma limitação na quantidade de PLGA adicionado, já que há tendência à formação de agregados maiores ao invés de ocorrer a dispersão homogênea do PLGA na matriz polimérica. Resultados similares foram observados em filmes de PCL:PLGA produzidos por Tang et al. (2005) pelo método de evaporação utilizando PLGA 65:35.

A Figura 5.13. mostra as micrografias do filme de PCL puro antes e após o processo de degradação.

A degradação da amostra de PCL puro evolui para desgastes superficiais com aspectos de depressões e erupções, como observado aos 150 dias de degradação (Figura 5.13. (d)). Esse comportamento também foi observado no estudo de Ferreira et al. (2014).

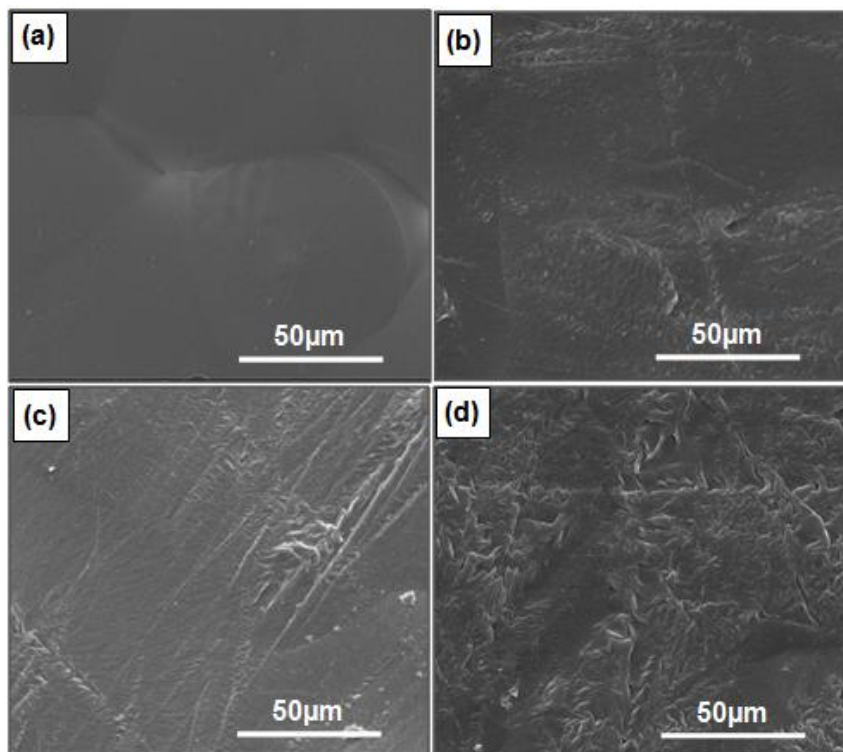


Figura 5.13. Micrografias das superfícies dos filmes de PCL (100): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x.

As Figuras 5.14., 5.15. e 5.16. apresentam as micrografias das blendas PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30), respectivamente, antes e após o processo de degradação.

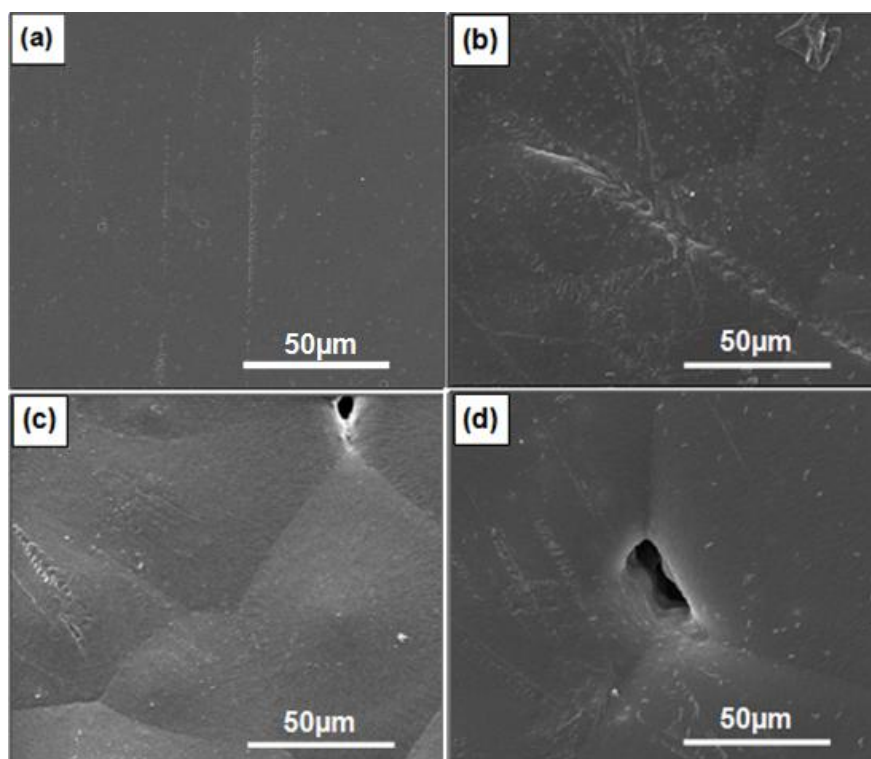


Figura 5.14. Micrografias das superfícies dos filmes da blenda PCL:PLGA (90:10): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x

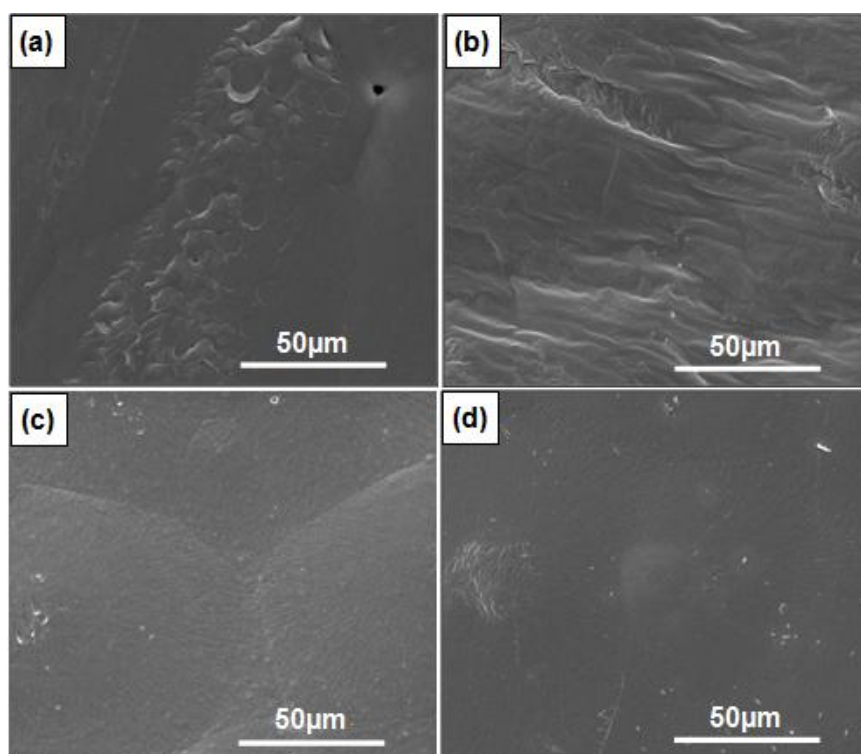


Figura 5.15. Micrografias das superfícies dos filmes da blenda PCL:PLGA (80:20): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x

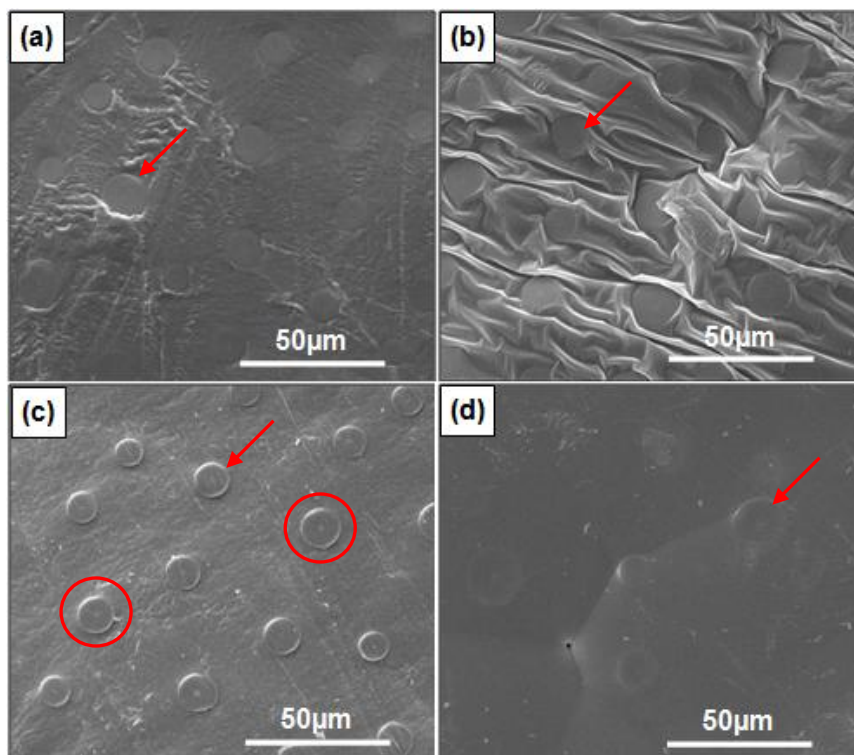


Figura 5.16. Micrografias das superfícies dos filmes da blenda PCL:PLGA (70:30): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x

A partir da análise das micrografias dos filmes das blendas (Figuras 5.14., 5.15. e 5.16.) pode ser observado que não houve alteração acentuada nas superfícies antes e após a degradação dos filmes das blendas PCL:PLGA (90:10) e (80:20). Para a blenda PCL:PLGA (70:30) observa-se a fase de PLGA dispersa na matriz como domínios esféricos (indicados por setas na Figura 5.16.) e, após 90 dias de exposição na solução tampão fosfato salina, observa-se que os domínios apresentam-se intumescidos devido à primeira fase do processo de degradação que corresponde à incorporação de moléculas de água (indicados por círculos na Figura 5.16.(c)). Esse comportamento está de acordo com os resultados de degradação descritos no item 5.3.1 a respeito da diminuição do percentual de perda de massa aos 90 dias de degradação.

O PLGA tem a característica de absorver a água presente no meio devido à interação entre as moléculas de água com os grupos hidrofílicos da sua estrutura química. Segundo Lucas et al. (2008), o estudo do mecanismo de degradação hidrolítica revela que a água, ao penetrar a matriz polimérica, pode provocar o intumescimento do polímero. A intrusão de água inicia a hidrólise do polímero,



levando à criação de oligômeros e monômeros. A degradação progressiva altera a microestrutura da matriz devido à formação de poros, então os oligômeros e monômeros são liberados.

As micrografias ilustram que houve pouca alteração das superfícies dos filmes, assim estão de acordo com os resultados de perda de massa obtidos pelo teste *in vitro* de degradação. Este resultado é interessante e indica que todas as blendas propostas demonstram que são adequadas quando se planeja aplicações terapêuticas de ação prolongada e com pouca modificação do aspecto inicial do filme.

A Figura 5.17. revela as micrografias das superfícies dos filmes dos nanocompósitos antes do processo de degradação.

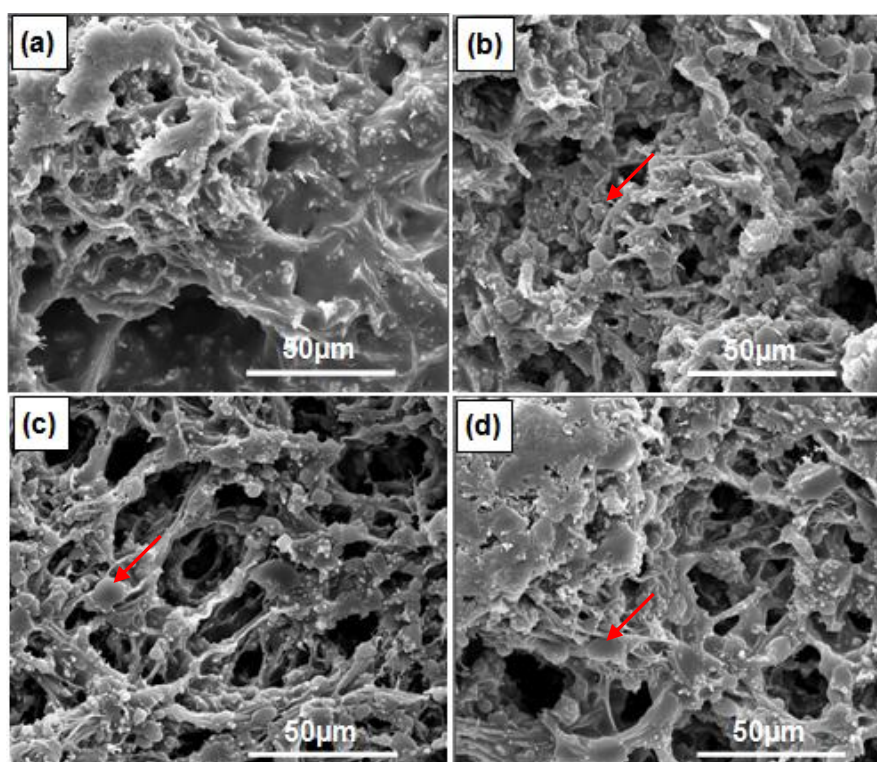


Figura 5.17. Micrografias das superfícies dos nanocompósitos antes da degradação: (a)PCL:PPy (100); (b) PCL:PLGA:PPy(90:10); (c) PCL:PLGA:PPy(80:20) e (d) PCL:PLGA:PPy (70:30). Ampliação: 2.000x

Comparando as micrografias dos filmes de PCL e das blendas antes da degradação (Figura 5.11.) com as dos seus respectivos nanocompósitos (Figura 5.17.), observa-se o aspecto fibroso e irregular adquirido pelo material com a adição de PPy. A partir da Figura 5.17., pode-se observar que os filmes PCL:PLGA:PPy



(90:10), (80:20) e (70:30) apresentam domínios esféricos de PLGA dispersos na matriz (indicados por setas na Figura 5.17.).

A Figura 5.18. mostra as micrografias antes e após a degradação do filme de PCL:PPy (100).

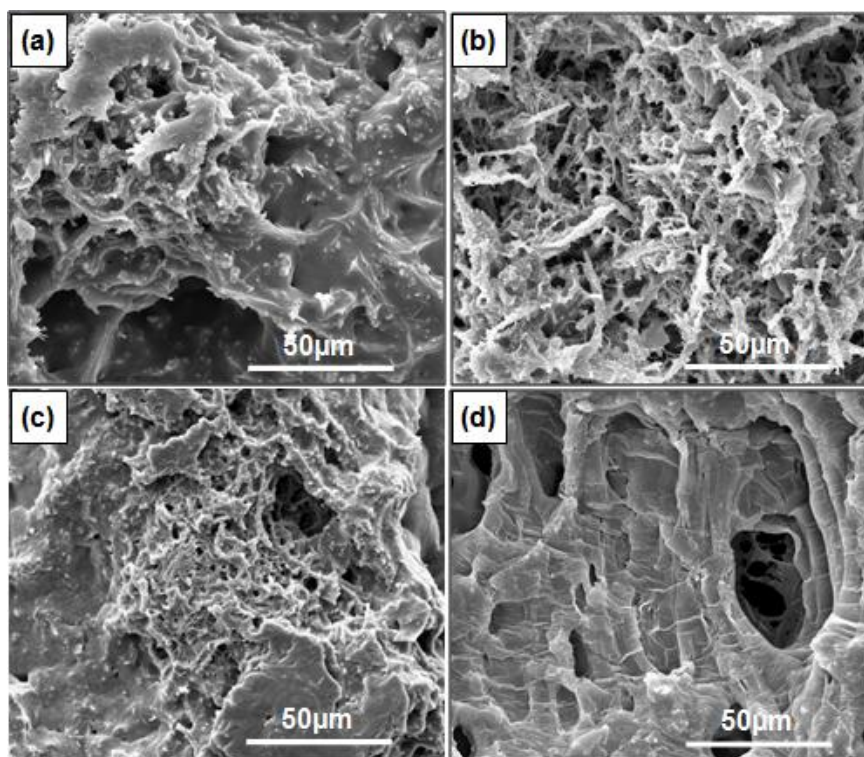


Figura 5.18. Micrografias das superfícies dos filmes de PCL:PPy (100): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x

A partir da Figura 5.18., verifica-se que, após os períodos de incubação avaliados, as superfícies dos filmes de PCL:PPy tornaram-se ainda mais irregulares e fibrosas.

As Figuras 5.19., 5.20. e 5.21. apresentam as micrografias dos filmes dos nanocompósitos PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30), respectivamente, antes e após o processo de degradação.

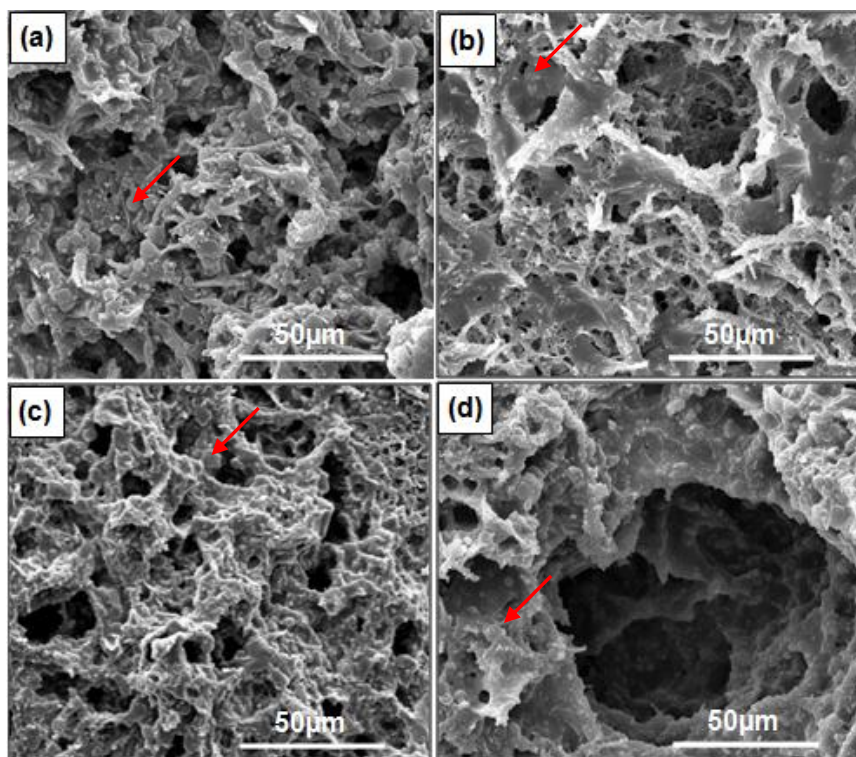


Figura 5.19. Micrografias das superfícies dos filmes de PCL:PLGA:PPy (90:10): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x

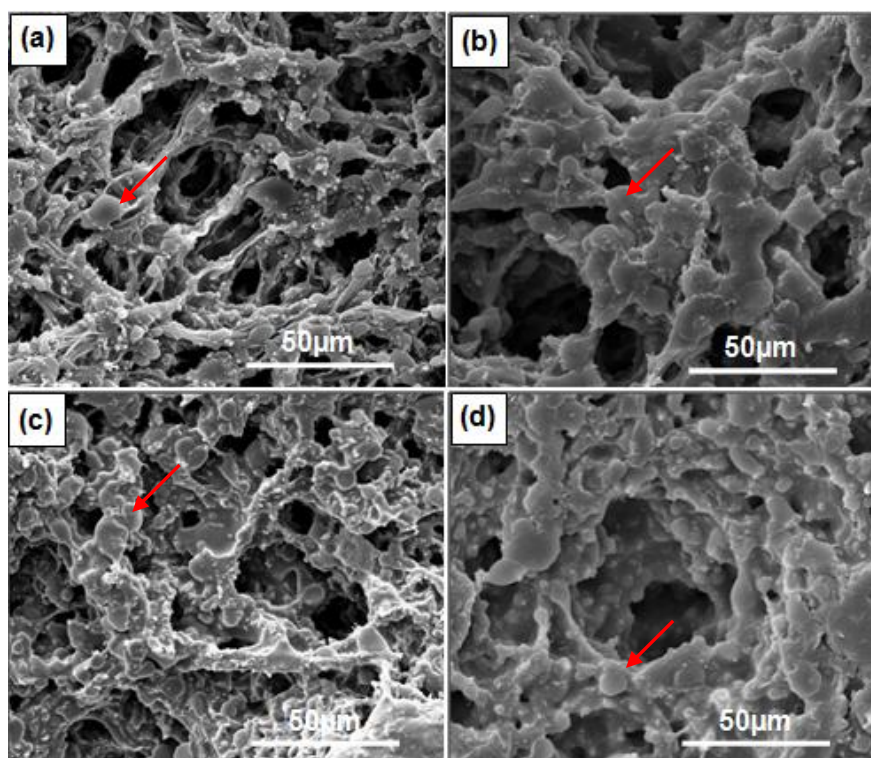


Figura 5.20. Micrografias das superfícies dos filmes de PCL:PLGA:PPy (80:20): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x

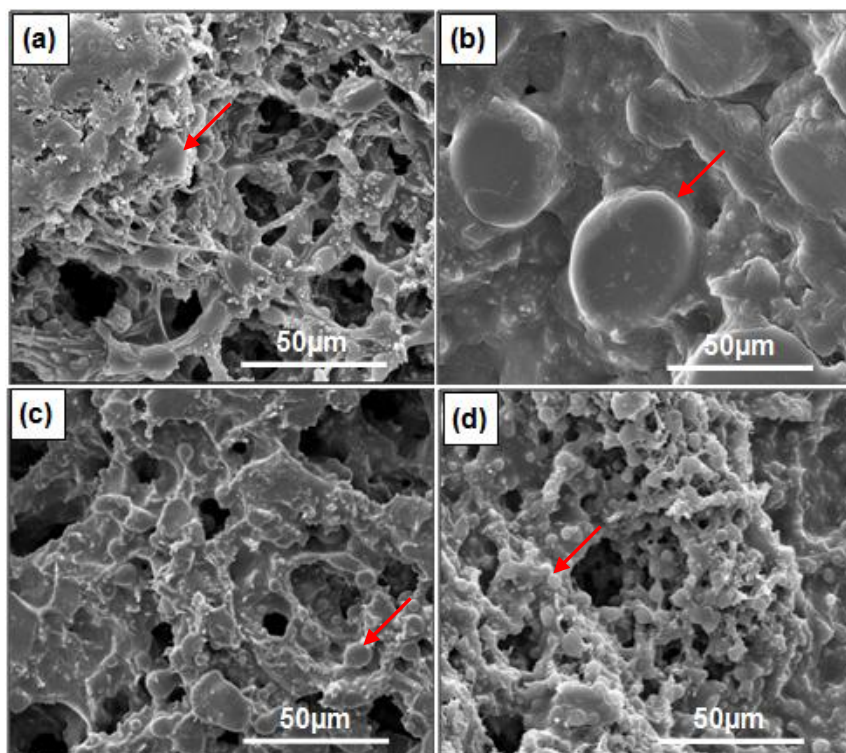


Figura 5.21. Micrografias das superfícies dos filmes de PCL:PLGA:PPy (70:30): (a) antes da degradação; (b) após 60 dias de degradação; (c) após 90 dias de degradação e (d) após 150 dias de degradação. Ampliação: 2.000x

As micrografias mostram que as superfícies dos filmes dos nanocompósitos não são afetadas significativamente pelo tempo de degradação. É possível observar que as Figuras 5.19., 5.20. e 5.21. revelam os domínios esféricos de PLGA dispersos na matriz (indicados por setas nas Figuras 5.19., 5.20. e 5.21.).

As nanofibras de PPy mantiveram-se distribuídas de forma irregular na matriz polimérica. Essas nanofibras proporcionam a presença de poros com tamanhos variados que podem servir de arcabouços para promover o crescimento e a proliferação celular guiada pelas nanofibras de PPy e assim facilitar a formação de novos tecidos biológicos na engenharia tecidual.

### 5.3.3. Condutividade elétrica

A condutividade elétrica das blendas e dos nanocompósitos foi determinada pelo método da sonda quatro pontas. Os valores de condutividade elétrica, em  $S.cm^{-1}$ , dos filmes são relatados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4. Medidas de condutividade elétrica ( $S.cm^{-1}$ ) das Blendas e dos Nanocompósitos.

Sistemas poliméricos	Composição (%m/m)			Condutividade elétrica (S/cm)
	PCL	PLGA	PPy	
Blendas	100	0	0	$1 \times 10^{-10}$
	70	30	0	$1 \times 10^{-11}$
Nanocompósitos	100	0	10	$2 \times 10^{-5}$
	90	10	10	$1 \times 10^{-6}$
	80	20	10	$5 \times 10^{-3}$
	70	30	10	$5 \times 10^{-3}$

Os valores de condutividade elétrica exibidos na Tabela 5.4. mostram que os filmes de PCL e das blendas de PCL:PLGA são isolantes. O PPy, por ser um polímero condutor, provoca o aumento da condutividade elétrica de sistemas poliméricos ao ser adicionado como carga nos mesmos. Os resultados exibidos na Tabela 5.4 mostram que a presença de 10% de PPy na matriz de PCL aumenta a condutividade da mesma em um fator de  $10^5$ . Na matriz de PCL:PLGA (70:30), a mesma quantidade de PPy conferiu um aumento no valor da condutividade em um fator de  $10^8$ . Portanto, constata-se que os valores de condutividade elétrica dos nanocompósitos revelam-se maiores nos que apresentam maior proporção de PLGA.

Segundo Lu, X. et al. (2010), a condutividade elétrica depende da dispersão da nanocarga na matriz; logo, para produzir compósitos poliméricos de PPy altamente condutores, as partículas de PPy devem ser adequadamente dispersas nas matrizes poliméricas para que sejam construídas redes condutoras controladas pelas cargas de PPy e pelas microestruturas das matrizes. A Figura 5.22. ilustra os filmes de PCL:PLGA:PPy (70:30) e PCL:PPy (100) a partir dos quais constatamos a melhor dispersão do PPy na matriz contendo 30% de PLGA, um polímero amorfo.

Esse comportamento também pode ser explicado a partir da cristalinidade dos polímeros, conforme discutido anteriormente. As cargas tendem a se dispersarem melhor nas regiões amorfas da matriz polimérica semi cristalina, então os domínios cristalinos funcionam como isolantes, pois interrompem possíveis caminhos condutivos existentes no interior do compósito. Portanto, um aumento dos domínios cristalinos em um compósito com polímero condutor pode resultar na diminuição da condutividade (Lu, X. et al., 2010).



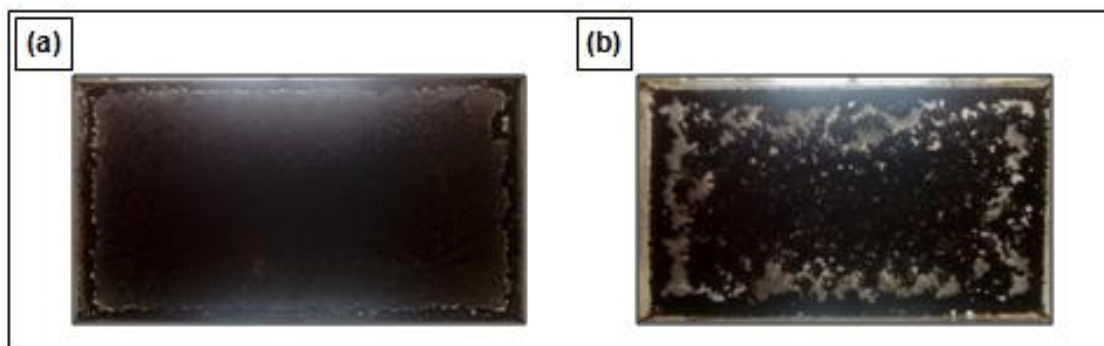


Figura 5.22. Imagens do comportamento de dispersão das nanofibras de PPy na matriz polimérica: (a)PCL:PLGA:PPy (70:30) e (b) PCL:PPy (100).

### 5.3.4. Propriedades térmicas

As temperaturas de fusão ( $T_f$ ) e de cristalização ( $T_c$ ), bem como, as entalpias de fusão ( $\Delta H_f$ ) dos filmes foram determinadas pela análise calorimétrica diferencial (DSC) (Figuras 5.23. e 5.24.).

Os valores de  $T_f$ ,  $T_c$  e  $\Delta H_f$  bem como os percentuais de cristalinidade dos filmes são reunidos na Tabela 5.5.

Tabela 5.5. Dados calorimétricos das amostras obtidos a partir das curvas de DSC.

Amostra	$T_f$ (°C)	$T_c$ (°C)	$\Delta H_f$ (J/g)	Cristalinidade (%)
PCL (100)	53	29	40	29
PCL:PLGA (90:10)	53	26	32	25
PCL:PLGA (80:20)	55	26	21	19
PCL:PLGA (70:30)	54	26	19	19
PCL:PPy (100)	48	25	36	28
PCL:PLGA:PPy (90:10)	51	28	24	21
PCL:PLGA:PPy (80:20)	50	26	20	20
PCL:PLGA:PPy (70:30)	47	19	20	22

As curvas de DSC do PCL e das blendas PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30) são apresentadas na Figura 5.23.

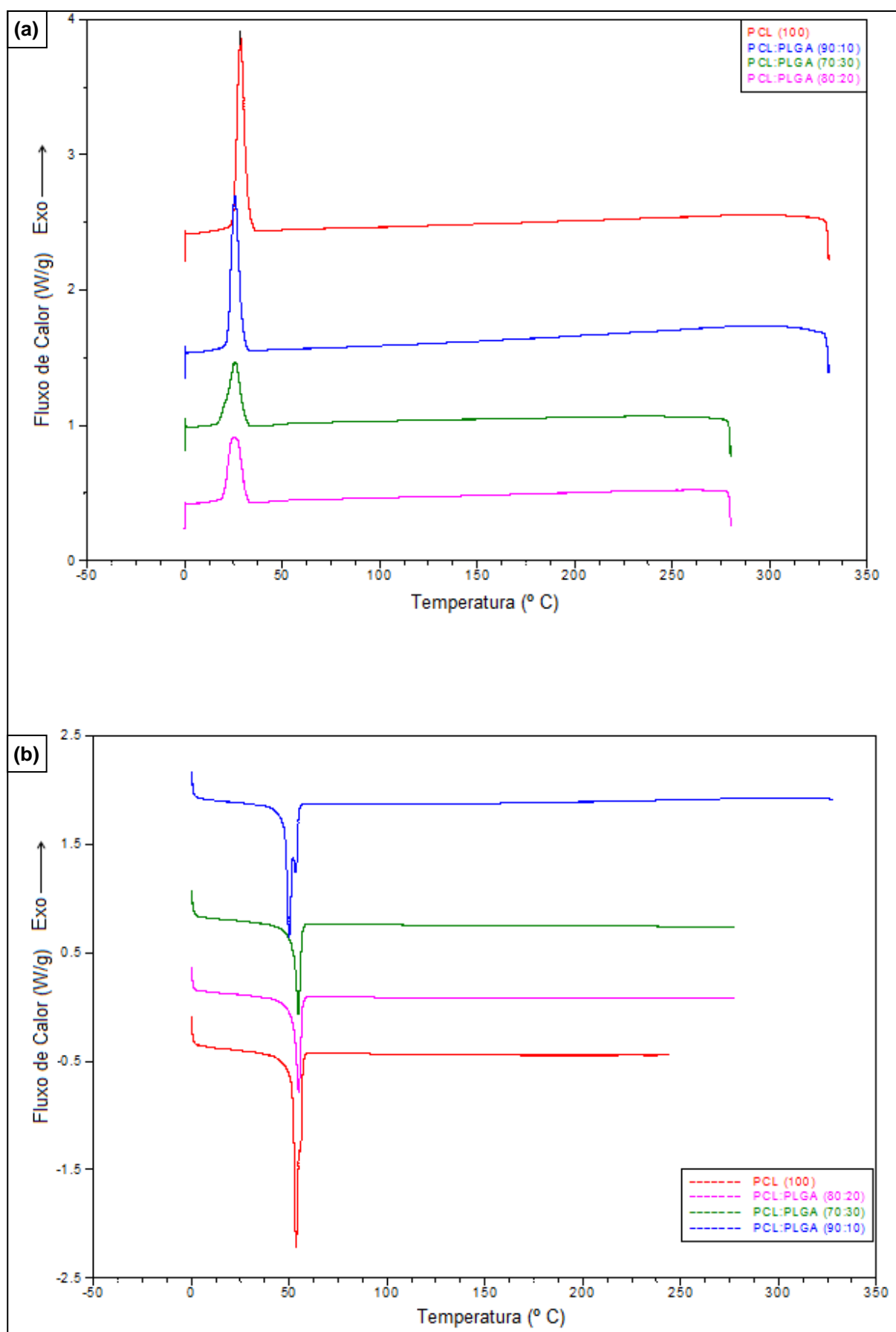


Figura 5.23. Curvas de DSC dos filmes de PCL (100) e das blends PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30): (a) ciclo de resfriamento e (b) segundo ciclo de aquecimento.

O filme de PCL preparado apresentou  $T_f$  de 53 °C e  $T_c$  de 29 °C. Esses resultados estão de acordo com a literatura (Tang et al., 2005; Navarro-Baena et al., 2016). A adição PLGA não resultou em alteração na temperatura de fusão da PCL, entretanto, a adição de 30% de PLGA, reduziu pela metade, aproximadamente, o valor da entalpia de fusão da PCL. Esse resultado corrobora com os obtidos por Tang et al. (2005). A adição de PLGA, um polímero amorfo, diminui o percentual de cristalinidade das blendas, conforme o esperado.

As curvas de DSC do PCL:PPy (100) e dos nanocompósitos PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30) são apresentadas na Figura 5.24.

A adição de PPy reduziu a  $T_f$  das blendas, entretanto não influenciou a cristalinidade das mesmas. Embora se observe uma tendência à diminuição da  $T_f$ , esse resultado não é significativo.

As curvas de DSC dos nanocompósitos não registraram quaisquer transições com as quais a temperatura de transição vítrea do PPy pudesse ser associada. Esse resultado é devido à baixa carga de PPy adicionada, de modo que a sua contribuição é muito pequena para ser medida (Lu, X. et al., 2010). Embora, seja evidenciado que a adição de PPy reduziu a  $T_f$  das blendas.

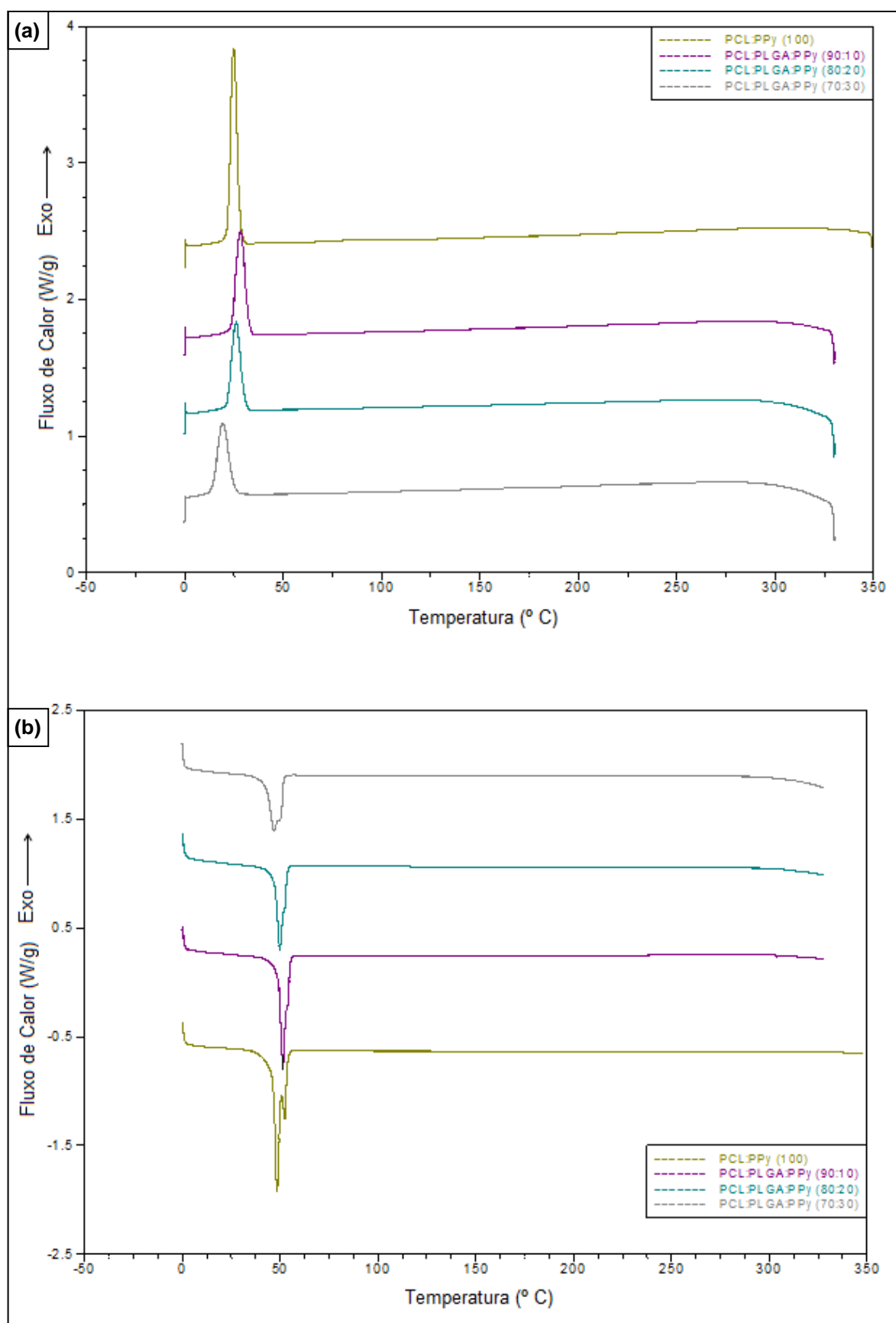


Figura 5.24. Curvas de DSC do PCL:PPy (100) e dos nanocompósitos PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30): (a) ciclo de resfriamento e (b) segundo ciclo de aquecimento.



A estabilidade térmica de suportes biocompatíveis é um fator importante que deve ser avaliado, já que a degradação térmica pode gerar moléculas menores, bem como subprodutos de degradação, que podem interferir com a composição química do material e alterar sua citotoxicidade e biocompatibilidade (Barbantiet al., 2011). A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada a fim de avaliar a estabilidade térmica das amostras. Para tanto, foi determinada a perda de massa com o aumento da temperatura, bem como a temperatura de degradação máxima das amostras.

Os valores de  $T_{onset}$  (temperatura na qual a degradação começa),  $T_{endset}$  (temperatura na qual a degradação termina),  $T_{máx.}$  (temperatura na qual a perda de massa foi máxima), bem como os resultados de perda de massa e os percentuais em massa de resíduos obtidos são reunidos na Tabela 5.6.

Tabela 5.6. Propriedades térmicas das amostras obtidas a partir dos termogramas

<b>Amostra</b>	Perda de massa (%)	$T_{onset}$ (°C)	$T_{máx.}$ (°C)	$T_{endset}$ (°C)	Resíduo(%) $T_{endset}$	Resíduo(%) 600°C
PCL (100)	95	310	397	466	3,70	2,46
PCL:PLGA (90:10)	96	278	399	445	1,78	2,13
PCL:PLGA (80:20)	93	275	398	455	4,10	3,40
PCL:PLGA (70:30)	95	268	401	434	3,40	3,27
PCL:PPy (100)	92	343	406	462	4,07	2,52
PCL:PLGA:PPy (90:10)	83	348	407	462	12,55	10,87
PCL:PLGA:PPy (80:20)	78	346	409	458	17,96	15,83
PCL:PLGA:PPy (70:30)	94	346	408	465	0,31	ND

\*ND: não determinado

As curvas de TGA dos filmes de PCL, das blendas PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30) e dos seus respectivos nanocompósitos são apresentadas na Figura 5.25.

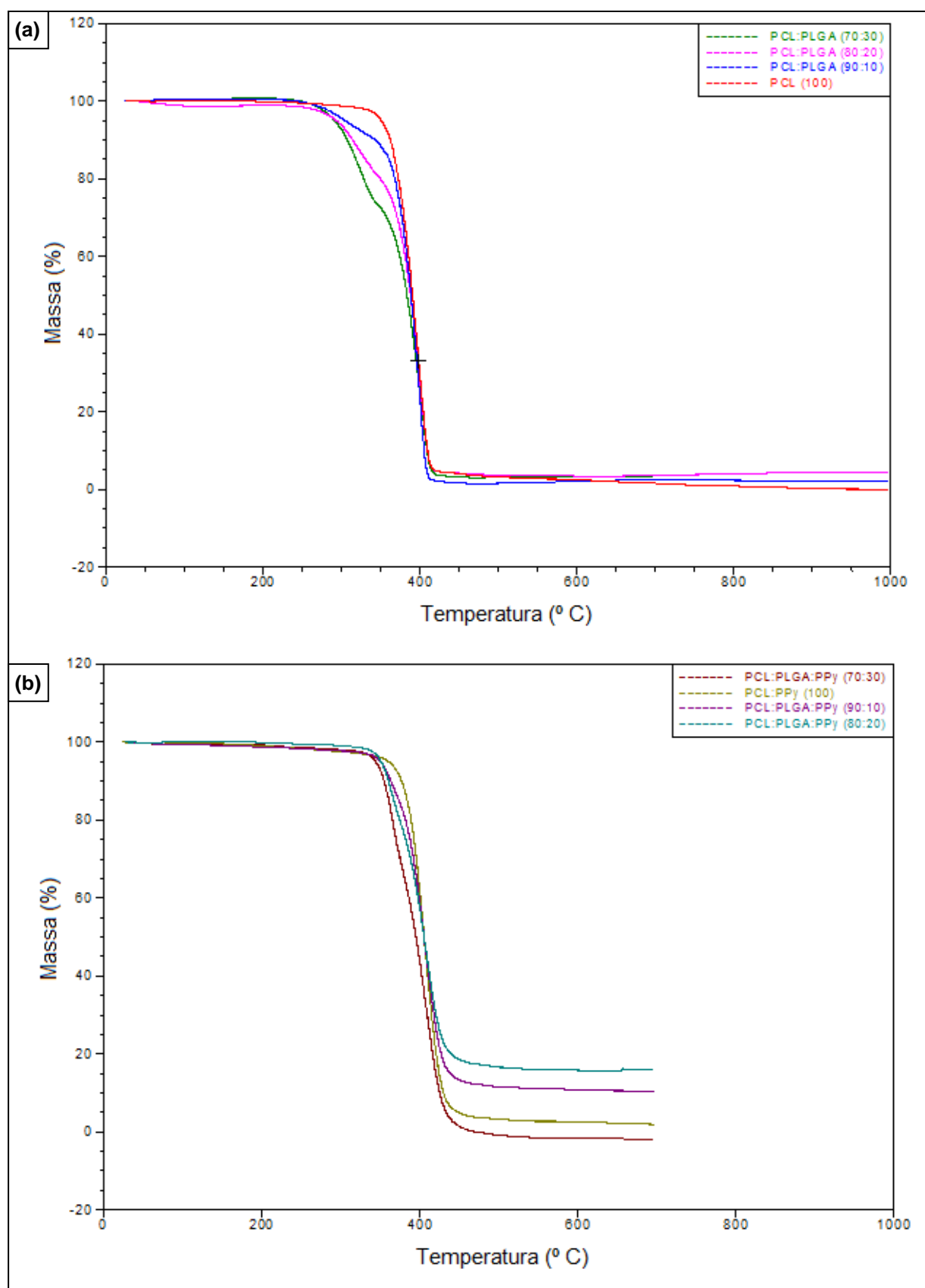


Figura 5.25. Sobreposição dos termogramas dos filmes: (a) PCL (100); PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30) e (b) PCL:PPy (100); PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30).

A partir da análise dos dados exibidos na Tabela 5.6 e dos termogramas dos sistemas poliméricos sem PPy (Figura 5.25 (a)), verifica-se que o filme de PCL apresenta maior estabilidade térmica quando comparado às blendas, visto que a adição de PLGA provoca a diminuição dos valores de  $T_{onset}$  das blendas. Esse resultado indica que o polímero degrada-se mais rapidamente com o aumento do percentual de PLGA, embora não se observe uma variação significativa na  $T_{máx.}$

A influência da adição do PPy na estabilidade térmica das blendas foi investigada (Figura 5.25 (b)). O PPy aumentou a estabilidade térmica das blendas, uma vez que os nanocompósitos apresentaram maiores valores de  $T_{onset}$  comparado àqueles observados para as blendas.

O valor médio de  $T_{máx.}$  determinado para os filmes das blendas foi de 394 °C (Figura 5.25 (a)); para os nanocompósitos, o valor médio de  $T_{máx.}$  obtido foi de 402°C (Figura 5.25 (b)). Portanto, a temperatura de degradação máxima dos filmes não foi alterada, de forma relevante, com a adição de PLGA e nanofibras de PPy.

Os termogramas e as respectivas derivadas (TGA/DTG) dos filmes de PCL, PCL:PPy (100), PCL:PLGA (70:30) e PCL:PLGA:PPy (70:30) são apresentados nas Figuras 5.26. e 5.27. Os demais termogramas são apresentados na seção Apêndice.

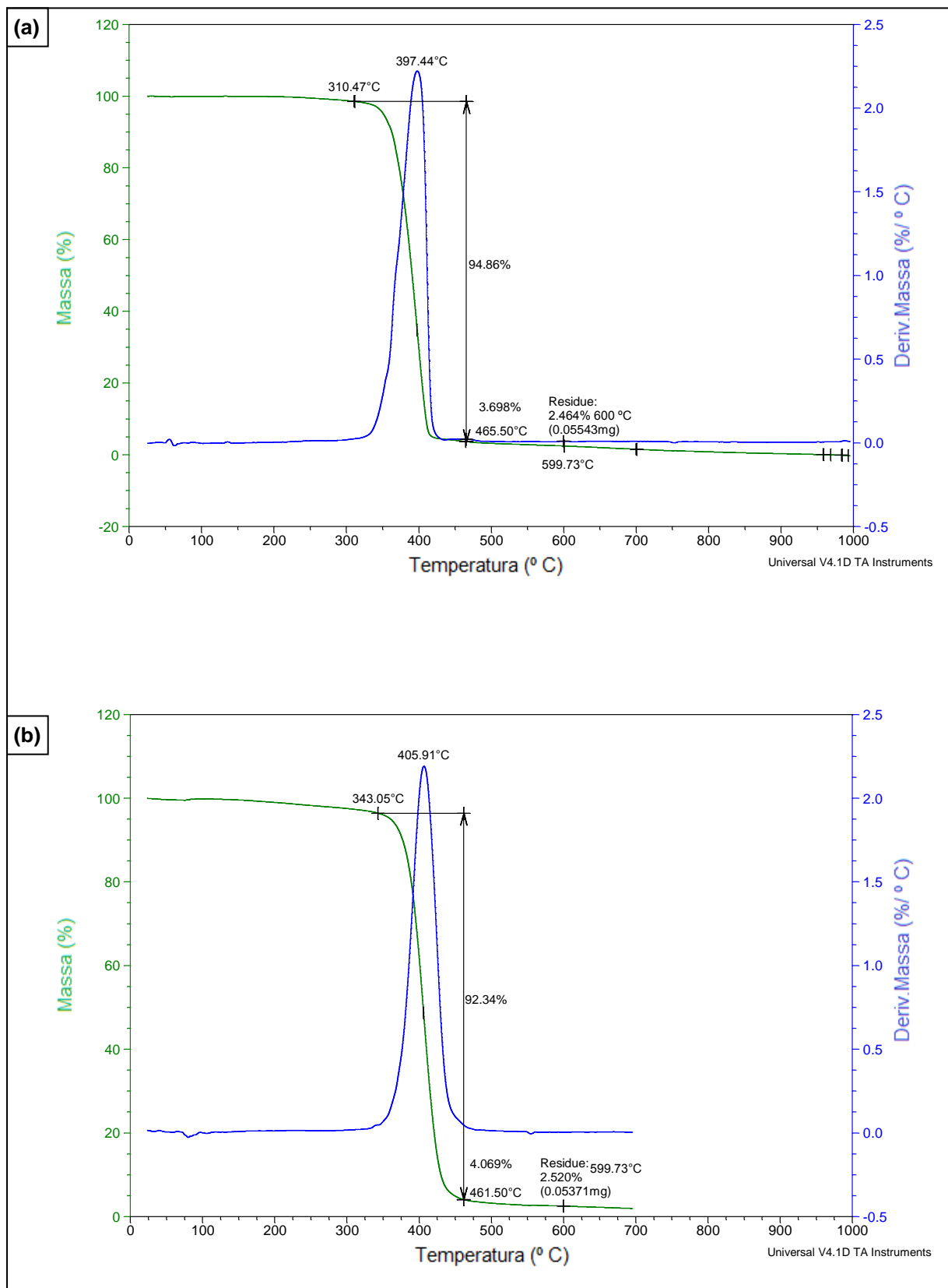


Figura 5.26. Curvas de TGA/DTG: (a) PCL (100) e (b) PCL:PPy (100).

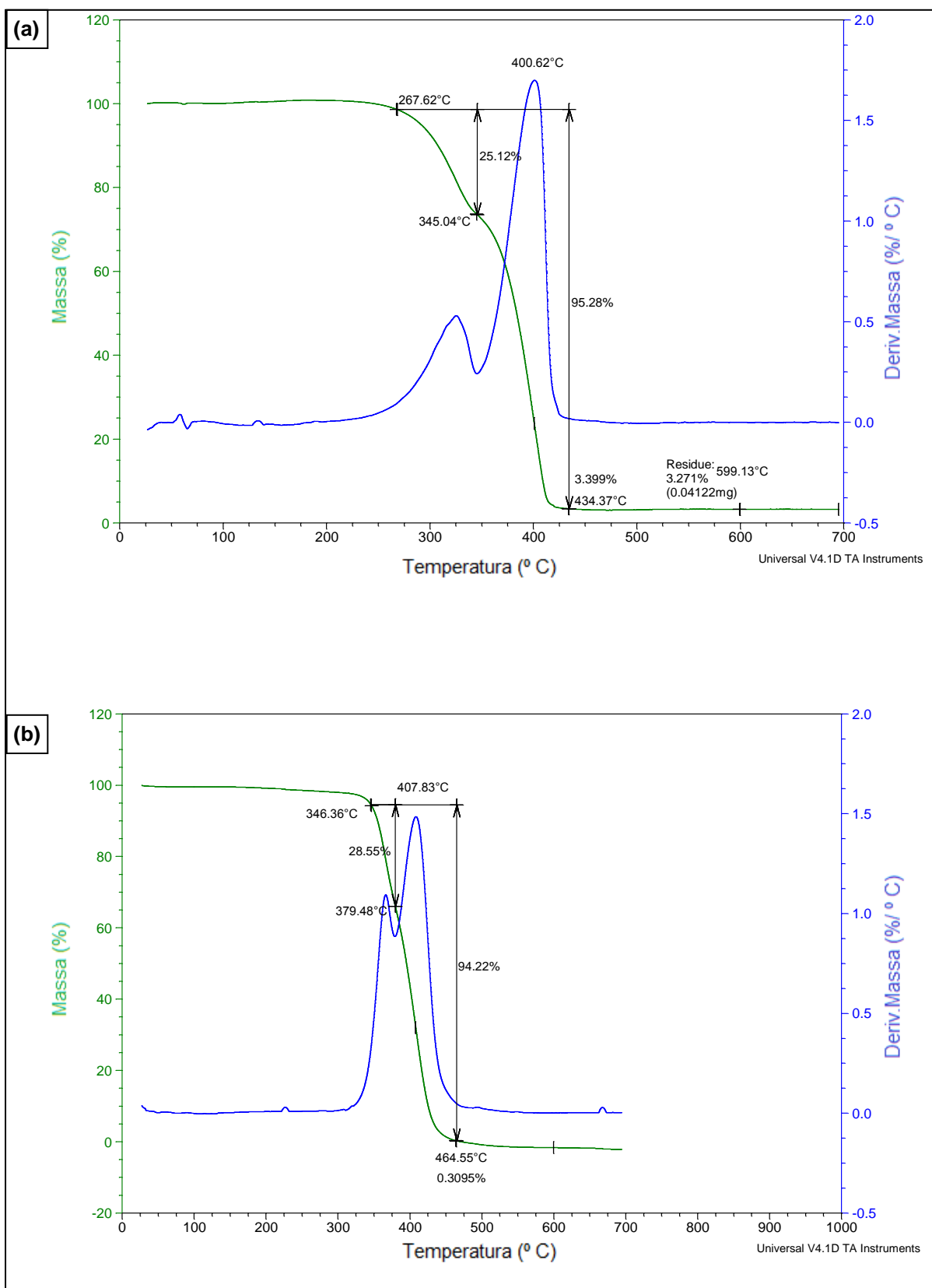


Figura 5.27. Curvas de TGA/DTG: (a) PCL:PLGA (70:30) e (b) PCL:PLGA:PPy (70:30).

As curvas TGA/DTG referente ao PCL e ao PCL:PPy (100) (Figura 5.26) revelam um único evento de perda de massa relacionado ao processo de degradação da matriz polimérica, cujos valores de temperatura máxima correspondem, respectivamente, a 397 e 406 °C. Navarro-Baena et al. (2016) estudaram a estabilidade térmica da PCL e constataram que a temperatura de degradação máxima é em torno de 400 °C, conforme determinado no presente estudo.

A Figura 5.27.(a) mostra dois eventos que correspondem à perda de massa referente à degradação da PCL, cuja temperatura manteve-se em torno de 400 °C, e do PLGA, cujo valor apresentado foi de 325 °C. Esses resultados corroboram como os estudos de Mainardes et al. (2006), que constataram que a decomposição térmica do PLGA é caracterizada por evento endotérmico que inicia a 320°C. Ao comparar esses resultados aos obtidos para o respectivo nanocompósito, PCL:PLGA:PPy (70:30), constata-se que a temperatura de degradação máxima do filme de PCL manteve-se em torno de 400 °C, mas aumentou em 41°C, de 325 para 366 °C, para o PLGA. A partir desse resultado, é possível supor que o PPy está disperso no PLGA, deslocando o pico característico de degradação do PLGA para temperaturas mais elevadas.

A degradação térmica de polímeros biocompatíveis tem sido descrita como um processo envolvendo vários estágios e mecanismos que dependem dos grupos ésteres (Penco et al., 2000). Dessa forma, as diferenças das propriedades térmicas entre os materiais são atribuídas à composição e cristalinidade do material, já que quanto maior o número de cadeias carbônicas lineares, bem como as proximidades das mesmas, maior será a estabilidade térmica do material (Barbanti et al., 2011).

### **5.3.5. Determinação do ângulo de contato**

Para avaliar as superfícies dos filmes quanto à hidrofiliabilidade, foram determinados os valores do ângulo de contato. Esses dados foram expressos como média±erro padrão e analisados por ANOVA de uma via seguida do teste de Bonferroni (Tabela 5.7.).

Tabela 5.7. Medidas do ângulo de contato entre a interface filme-água.

Amostras	Ângulo de Contato (°)
PLGA	78,8±1,7
PCL	77,8±0,6
PCL:PLGA (90:10)	75,4±0,1
PCL:PLGA (80:20)	74,8±0,3
PCL:PLGA (70:30)	73,7± 0,3
PCL:PPy (100)	69,6±0,3
PCL:PLGA:PPy (90:10)	73,6±0,3
PCL:PLGA:PPy (80:20)	73,1±0,4
PCL:PLGA:PPy (70:30)	72,6±0,7

A partir da análise estatística realizada, verifica-se que as blendas de PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30) apresentam valores de ângulo de contato na faixa de 74,4 a 74,9°. Para os nanocompósitos, PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30), os valores de ângulo de contato estão compreendidos na faixa de 72,6 a 73,6°.

Os valores obtidos para as blendas, PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30), foram menores em relação ao valor do ângulo de contato da PCL (Figura 5.28 (a) e (b)). Esses resultados estão de acordo com o que foi verificado com o estudo de Tang et al. (2005), que indica que a adição de PLGA reduz o ângulo de contato das blendas de PCL:PLGA, provocando o aumento da hidrofiliabilidade das mesmas.

A adição de 10% de PPy também influenciou o valor do ângulo de contato do filme de PCL provocando a redução desse valor em, aproximadamente, 8° (Figura 5.28 (a) e (c)).

O PPy dopado com ácido p-toluenosulfônico apresenta ângulo de contato com a água de 64,7° (Melo et al., 2005) e, portanto, seu caráter hidrofílico tende a aumentar a hidrofiliabilidade dos filmes.

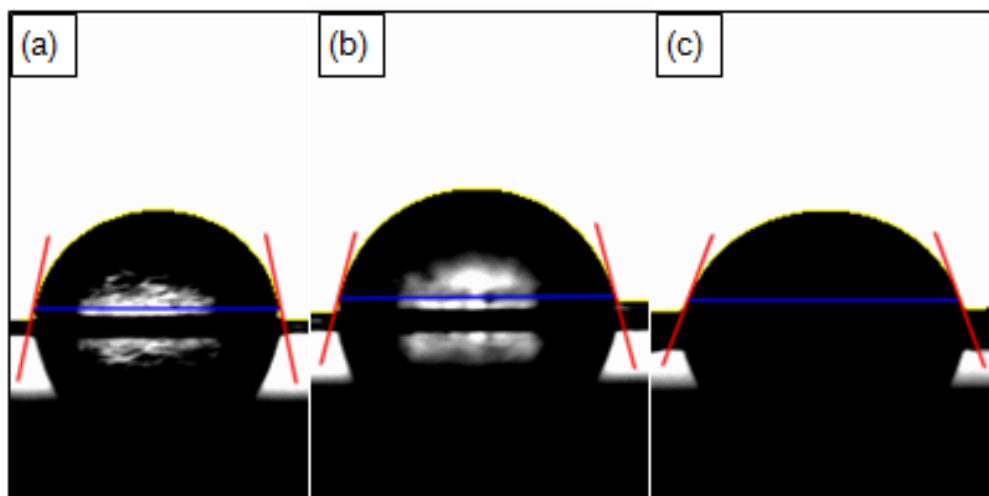


Figura 5.28. Imagem do ângulo de contato de uma gota de água deionizada na superfície de: (a) PCL(100) 78°; (b) PCL:PLGA (70:30), 74° e (c) PCL:PPy (100) 70°.

As superfícies dos polímeros puros, bem como dos sistemas poliméricos preparados classificam-se como intermediárias, segundo a classificação proposta por Toma (2016) (Tabela 5.8), já que apresentam valores de ângulo de contato na faixa de 30 a 90°.

Tabela 5.8. Classificação da superfície em função do ângulo de contato (°)

Ângulo de Contato (°)	Superfície
~ 0°	Super-hidrofílica
< 30°	Hidrofílica
30 – 90°	Intermediária
90– 140	Hidrofóbica
>140	Super-hidrofóbica

A hidrofiliidade é uma propriedade importante para os biomateriais, pois aumenta a adesão, a proliferação e o crescimento celular (Fonner et al., 2008; Liu, H. et al., 2012).

Superfícies hidrofóbicas, no entanto, têm alta afinidade com uma ampla variedade de proteínas. A adsorção de proteínas plasmáticas - por exemplo, albumina e fibrinogênio - associadas ao implante e às mudanças conformacionais promovem reações inflamatórias. Dessa forma, as superfícies hidrofílicas podem



aumentar a biocompatibilidade do material, já que tem pouca afinidade com essas proteínas (Thevenot et al., 2008).

### 5.3.6. Teste de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade, *in vitro*, foi realizado o ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólico), que mede a atividade mitocondrial de células vivas e representa um parâmetro de suas atividades metabólicas (Tang et al., 2007).

A classificação de citotoxicidade de materiais conforme os níveis de viabilidade celular (ISO 10993-5, 1999) é apresentada na seção Anexo.

Os resultados dos testes de citotoxicidade dos homopolímeros puros (PCL (100) e PLGA (100)) e das blendas, são apresentados na Figura 5.29.

A análise da viabilidade das linhagens FGH, MRC-5 e RAW, após 24h, nas amostras de PCL (100), de PLGA (100) e das blendas PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30) revelaram que os filmes de PCL (100) e da blenda PCL:PLGA (90:10) causaram a diminuição significativa da viabilidade celular apenas da linhagem RAW ( $p < 0,001$ ), comparada ao grupo controle. A linhagem RAW também revelou diminuição significativa ( $p < 0,01$ ) da viabilidade celular, em relação ao controle, para a blenda PCL:PLGA (80:20) (Figura 5.29.).

Para as linhagens FGH e MRC-5, os percentuais de viabilidade celular revelaram-se significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) após 24 h de cultivo com os filmes da blenda PCL:PLGA (70:30) em comparação ao controle. Esse resultado evidencia o aumento do percentual de PLGA nas blendas provoca o aumento da viabilidade celular. Esse resultado corrobora com o estudo de Tang et al. (2005), a partir do qual foi constatado que osteoblastos tendem a ligarem-se, preferencialmente, às blendas PCL:PLGA com alta percentagem de PLGA.

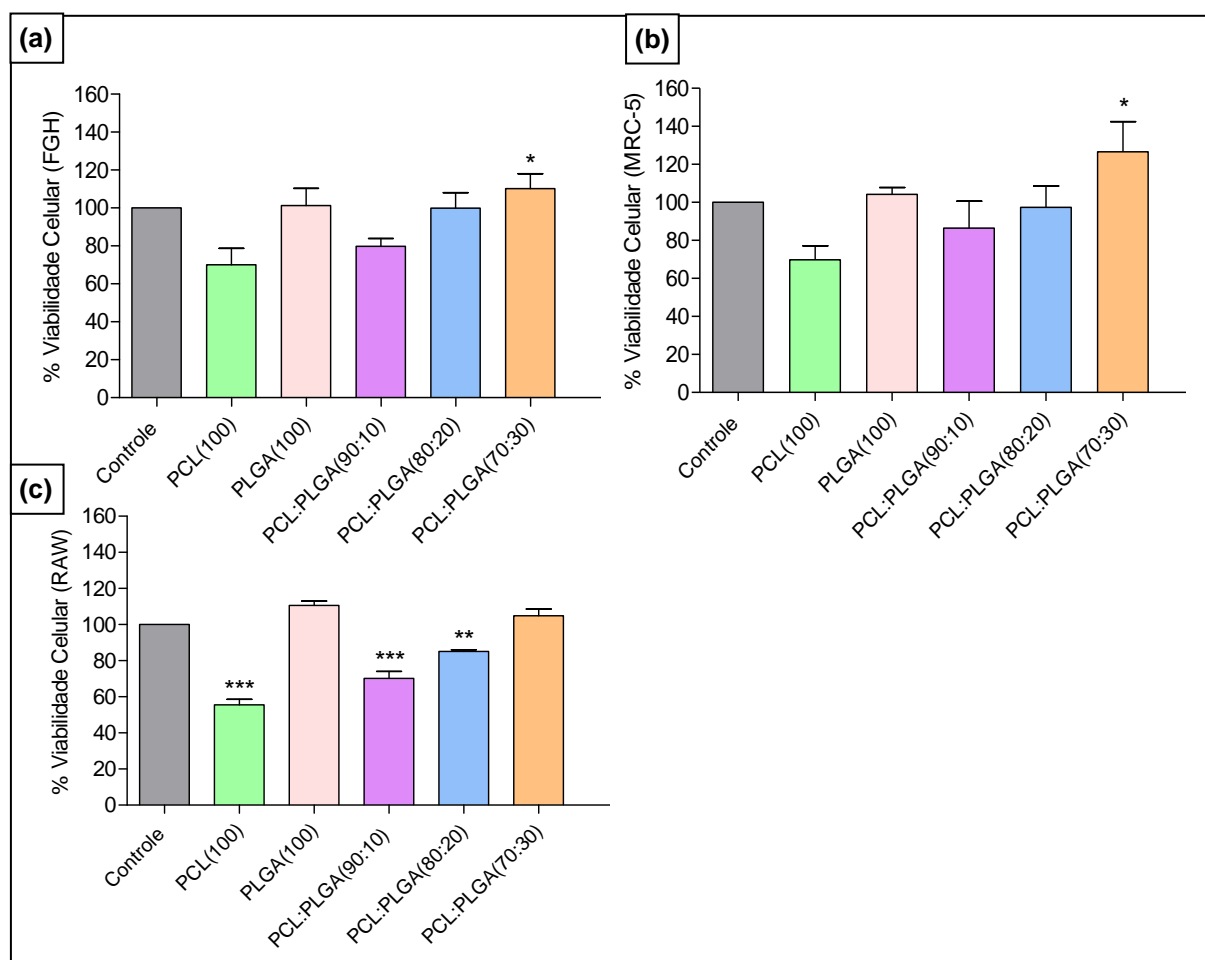


Figura 5.29. Análise da viabilidade das linhagens: (a) FGH, (b) MRC-5 e (c) RAW após 24h de cultivo com os filmes poliméricos puros ou blendas de PCL:PLGA nas proporções de (90:10), (80:20), (70:30). \*\* $p < 0,01$  ou \*\*\* $p < 0,001$  vs Controle.

Esses resultados indicam que apenas para a linhagem RAW, os filmes de PCL (100) e de PCL:PLGA (90:10), revelam-se moderadamente citotóxicos e os filmes PCL:PLGA (80:20), levemente citotóxicos, comparado ao controle, conforme a classificação de citotoxicidade ISO 10993-5.

A PCL é conhecida, em geral, como sendo compatível com a viabilidade e crescimento celular (Tang et al., 2005), porém, Calvert et al. (2000) caracterizou o comportamento de osteoblastos de células estromais de medula óssea em filmes de PCL, PLGA e suas blendas e esse estudo revelou que o filme de PCL puro foi o material menos capaz de reter os osteoblastos, enquanto que o PLGA era osteocondutor. Além disso, mostrou que os osteoblastos aderiram-se e espalharam-se sobre os filmes das blendas PCL:PLGA e o filme PCL:PLGA (70:30) atraiu mais

células do que os demais filmes nos três primeiros dias. Comportamento também observado no presente estudo para as linhagens de fibroblastos (FGH e MRC-5).

A Figura 5.30. apresenta os resultados de viabilidade celular das linhagens FGH, MRC-5 e RAW, após 24h e 48h, nas amostras contendo polipirrol. Apenas o filme PCL:PPy (100) exibiu diminuição estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) na viabilidade celular da linhagem FGH.

Os demais resultados não revelaram diminuição estatisticamente significativa na viabilidade celular das linhagens testadas, apresentando valores similares aos das células cultivadas na placa de cultura (controle). Dessa forma, conclui-se que o PPy, quando presente em blendas PCL:PLGA, não induz toxicidade às linhagens estudadas.

Esses resultados são corroborados com o estudo de Wang et al. (2004) que constataram biocompatibilidade entre as células de Schwann e amostras de PPy, sendo este, portanto, adequado para o crescimento de tecido nervoso de mamíferos.

Um dado importante a ser considerado é que o PPy modificou a morfologia dos filmes preparados, deixando-os mais rugosos e com superfície adequada para o crescimento celular. A topografia de superfície de suportes poliméricos é um fator importante que influencia a aderência de células que pode dificultar ou promover a ligação de células. É geralmente conhecido que superfícies mais rugosas promovem a ligação das células e é importante poder controlar esta propriedade do suporte. A escala para promover a ligação de células varia de 10 a 1000 nm (Runge et al., 2010).

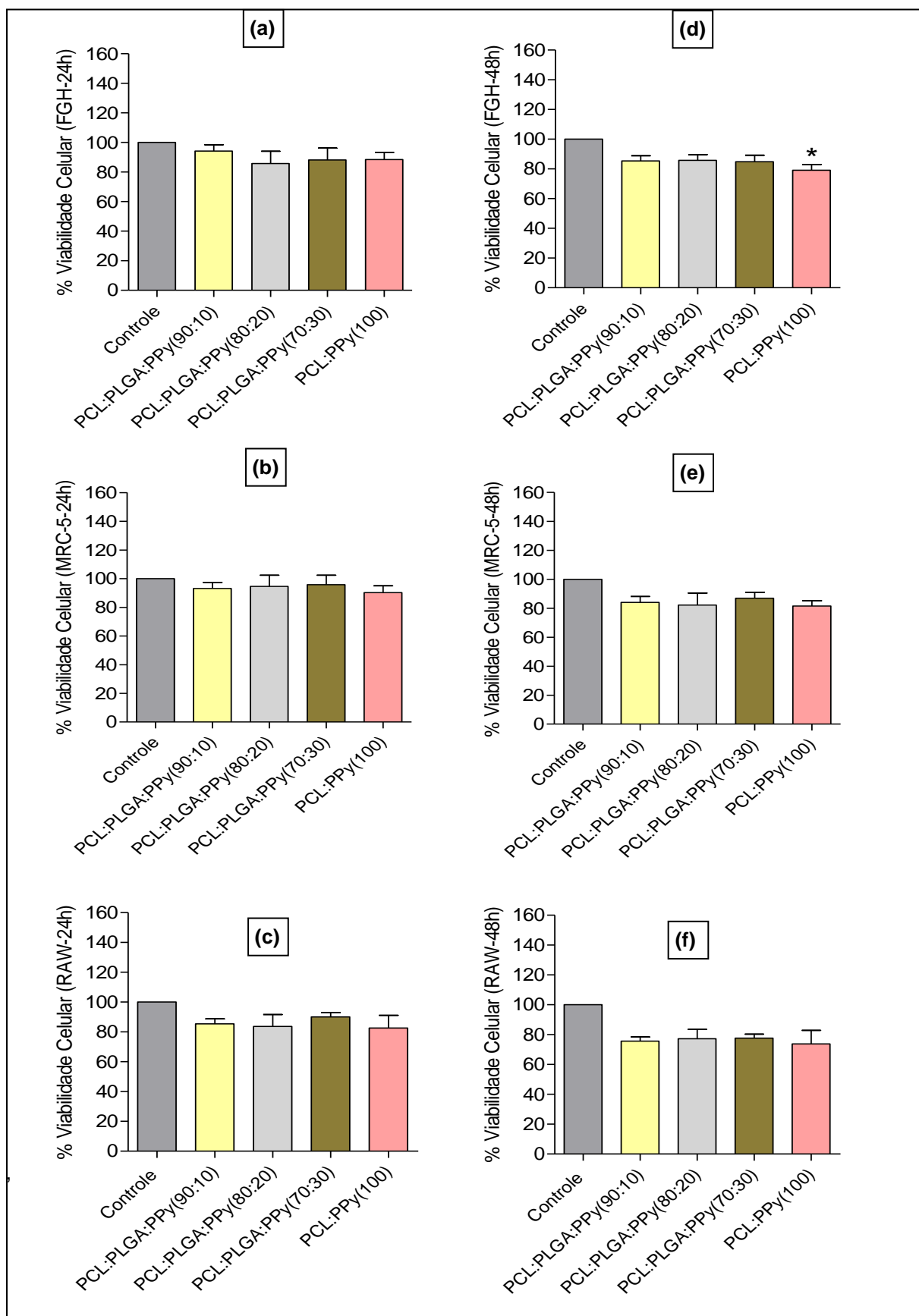


Figura 5.30. Análise da viabilidade das linhagens: (a, d) FGh, (b, e) MRC-5 e (c, f) RAW após (a-c) 24h ou (d-f) 48h de cultivo com os nanocompósitos PCL:PPy (100) e PCL:PLGA:PPy (90:10), (80:20) e (70:30). \* $p < 0,05$  vs Controle.

## 6. CONCLUSÕES

Nanofibras de PPy foram obtidas por meio da polimerização química oxidativa, sob agitação e sob repouso, usando ácido p-toluenossulfônico como agente dopante. Ambas as metodologias resultaram em nanofibras homogêneas e em nanofibras com aglomerados na superfície. As fibras obtidas sob agitação apresentaram dimensão média de  $334\pm 66$  nm e para as obtidas sob repouso, o valor médio determinado foi de  $589\pm 144$  nm. A agitação não influenciou, significativamente, o rendimento da síntese e a condutividade elétrica das nanofibras, cujos valores verificados foram na ordem de  $10^{-1}$  S.cm<sup>-1</sup>, portanto, na faixa de semicondutores ( $10^{-7} - 10^2$  S.cm<sup>-1</sup>).

Foram preparados filmes de PCL e de PCL:PLGA (90:10), (80:20) e (70:30) com e sem a presença de nanofibras de polipirrol. A dispersão das nanofibras de PPy na matriz polimérica biodegradável resultou em um material com morfologia rugosa e fibrosa contendo poros interconectados. Esse resultado é importante pois essa morfologia favorece a permeabilidade de nutrientes e facilita a adesão e a proliferação celular. Os sistemas poliméricos preparados apresentaram boa estabilidade térmica, sendo que a adição do PPy melhorou a estabilidade térmica dos filmes, bem como a condutividade elétrica dos mesmos. Os filmes com maior percentual de PLGA revelaram-se mais condutivos e a explicação para esse comportamento reside no fato de que a nanocarga tende a dispersar-se, preferencialmente, na fase amorfa da matriz polimérica, nesse caso, na fase de PLGA.

A incorporação de PLGA na PCL diminuiu o grau de cristalinidade, enquanto que a adição de PPy não influenciou a cristalinidade das blendas.

Os resultados de perda de massa indicam que a adição do PLGA à matriz de PCL somente exerce influência significativa em maior tempo de degradação, 150

dias, e quando as composições das blendas apresentam maior percentual de PLGA. Já a adição de PPy tende a influenciar as perdas de massa das blendas com maior percentual de PLGA e em maiores tempos de incubação, 90 e 150 dias. No caso do filme PCL:PPy, não foi verificada alteração no comportamento de perda de massa com a evolução do período de degradação, ao contrário do que foi observado para os demais nanocompósitos, que apresentam PLGA na sua composição. Esse comportamento indica que a presença de PLGA é responsável por provocar perdas de massa significativas com a evolução do processo de degradação. Os resultados do comportamento de perda de massa dos diferentes sistemas poliméricos preparados demonstram que os mesmos revelam-se adequadas para o potencial uso no tratamento de lesões em nervos periféricos, pois são lesões de lenta recuperação e necessitam que o material fique pelo menos seis meses sem sofrer degradação.

Os resultados de citotoxicidade permitiram concluir que a blenda de PCL:PLGA (70:30) não demonstrou citotoxicidade em contato com os tipos celulares avaliados, fibroblastos e macrófagos. O aumento do percentual de PLGA, portanto, resultou em superfícies que apresentam maior viabilidade celular. O PPy, quando presente em blendas PCL:PLGA, não induz toxicidade às linhagens estudadas.

A partir deste trabalho, foram produzidos filmes de nanocompósitos com superfície classificada como intermediária quanto ao ângulo de contato com a água, atóxica e de morfologia porosa que favorecem o crescimento celular guiado pelas nanofibras de PPy. Além disso, esses filmes revelam boa estabilidade térmica e tempo de degradação adequado para o uso no tratamento de lesões em nervos periféricos. Logo, suportes biocompatíveis baseados em PCL e PLGA com nanofibras de PPy dispersas correspondem a materiais que podem vir a contribuir com o processo de regeneração nervosa e, portanto, são promissores para aplicação na engenharia tecidual.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Em continuidade a este trabalho sugere-se:

- Avaliar a influência da incorporação de PLGA e PPy nas propriedades mecânicas dos sistemas poliméricos preparados;
- Avaliar a microestruturação dos filmes de blendas e blendas/PPy no processo de adesão e proliferação celular;
- Testar *in vivo* a viabilidade e a eficácia do uso dos sistemas poliméricos contendo as nanofibras de PPy funcionalizadas incorporando fatores de crescimento (FK 506).

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXIS, F.; Venkatraman, S.; Rath, S. K.; Gan, L. H. Some insight into hydrolytic scission mechanisms in bioerodible polyesters. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 102, n. 4, p. 3111–3117, 2006.

ARMENTANO, I.; Dottori, M.; Fortunati, E.; Mattioli, S.; Kenny, J. M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, p. 2126–2146, 2010.

ARSLANTUNALI, D.; Dursun, T.; Yucel, D.; Hasirci, N.; Hasirci, V. Peripheral nerve conduits: Technology update. **Medical Devices: Evidence and Research**, v. 7, n. February 2016, p. 405–424, 2014.

ASTM F 1635-11 – Standart test method for *in vitro* degradation testing of hydrolytically degradable polymer resins and fabricated forms for surgical implants. West Conshohocken, PA PA19428-2959, United States. ASTM-American Society for Testing and Materials International; 2011.

BARBANTI, S.H.; Santos, A. R.; Zavaglia, A. C.; Duek, E. A. R. Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) and poly (D,L -lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds used in bone tissue engineering prepared by melt compression – particulate leaching method. **J. Mater Sci: Mater Med**, p. 2377–2385, 2011.

BARBANTI, S. H.; Zavaglia, C. A. C.; Duek, E. A. R. Degradação Acelerada de Suportes de Poli( $\epsilon$ -Caprolactona) e Poli(D,L-Ácido Láctico-co-Ácido Glicólico) em Meio Alcalino. **Ciência e Tecnologia, São Paulo**, v. 16, p. 141–148, 2006.



BARBANTI, S. H. ; Zavaglia, C. A. C.; Duek, E.A.R. Effect of Salt Leaching on PCL and PLGA (50/50) Resorbable Scaffolds 2. Material and Methods. **Materials Research**, v. 11, n. 1, p. 75–80, 2008.

BASAVARAJA, C.; Kim, N. R.; Jo, E. A.; Pierson, R.; Huh, D. S. Venkataraman, A.. Transport Properties of Polypyrrole Films Doped with Sulphonic Acids. **Bull. Korean Chem. Soc**, v. 30, n. 11, 2009.

BHATTARAI, N.; Edmondson, D.; Veiseh, O.; Matsen, F. A.; Zhang, M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. **Biomaterials**, v. 26, n. 31, p. 6176–6184, 2005.

BOEZAART, A.P.; Tighe, P. New trends in regional anesthesia for shoulder surgery: Avoiding devastating complications. **International Journal of Shoulder Surgery**, v. 4, p. 1 – 7, 2010.

BÖLGEN, N.; Menciloglu, Y. Z.; Acavay K.; Vargel, I.; Piskin, E. *In vitro* and *in vivo* degradation of non-woven materials made of poly( $\epsilon$ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. **J. Biomater. Sci. Polymer Edn**, v. 16, n. 12, p. 1537–1555, 2005.

BOSWORTH, L. A.; Downes, S. Physicochemical characterisation of degrading polycaprolactone scaffolds. **Polymer Degradation and Stability**, v. 95, n. 12, p. 2269–2276, 2010.

BOUTRY, C. M.; Gerber-Hörler, I.; Hierold, C. Electrically Conducting Biodegradable Polymer Composites (Polylactide-Polypyrrole and Polycaprolactone-Polypyrrole) for Passive Resonant Circuits. **Polymer Engineering And Science**, 2013.

CALVERT, J. W.; Marra, K. G.; Cook, L.; Kumta, P. N.; Dimilla, P. A.; Weiss, L. E. Characterization of osteoblast-like behavior of cultured bone marrow stromal cells on various polymer surfaces. **J Biomed Mater Res**, v. 52, p. 279 – 284, 2000.

CALVO, P. A.; Rodríguez, J.; Grande, H.; Mecerreys, D.; Pomposo, J.A. Chemical oxidative polymerization of pyrrole in the presence of m-hydroxybenzoic acid- and m-hydroxycinnamic acid-related compounds. **Synthetic Metals**, v. 126, n. 1, p. 111–116, 2002.

CASARIN, S. A.; Malmonge, S. M.; Kobayashi, M.; Agnelli, J. A. M. Study on *in Vitro* Degradation of Bioabsorbable Polymers Poly (Hydroxybutyrate-Co-Valerate) - (PHBV) and Poly (Caprolactone) - (PCL). **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 2, p. 207 – 215, 2011.

CHIONO, V.; Tonda-Turo, C.; Ciardelli, G. Artificial Scaffolds for Peripheral Nerve Reconstructio. In: **International Review of Neurobiology**. p. 173–198, 2009.

CHOU, S.; Woodrow, K. A. Relationships between mechanical properties and drug release from electrospun fibers of PCL and PLGA blends. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 65, p. 724–733, 2017.

CIPITRIA, A.; Skelton, A.; Dargaville, T. R.; Dalton, P. D.; Hutmacher, D.W. Design, fabrication and characterization of PCL electrospun scaffolds - a review. **Journal of Materials Chemistry**, v. 93, n. ii, p. 1539–1550, 2011.

CORRES, M. A.; Mugica A.; Carrasco, P. M.; Cortázar, M. M. Effect of crystallization on morphologyeconductivity relationship in polypyrrole/poly(3-caprolactone) blends. **Polymer**, v. 47, p. 6759–6764, 2006.

DALY, W.; Zeugolis, Y. D.; Windebank, A.; Pandit, A.A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. **J. R. Soc. Interface**, p. 202–221, 2012.

DÍAZ, E.; Sandonis, I.; Valle, M. B. *In Vitro* Degradation of Poly (caprolactone)/nHA Composites. **Journal of Nanomaterials**, p. 1 – 8, 2014.

DURAN, N.; Morais, P. C.; Mattoso, L. H. C. **Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber, 2006.

DURGAM, H.; Sapp, S.; Deister, C.; Khaing, Z.; Chang, E.; Luebben, S.; Schmidt, C. E. Novel Degradable Co-polymers of Polypyrrole Support Cell Proliferation and Enhance Neurite Out-Growth with Electrical Stimulation. **Journal of Biomaterials Science**, v. 21, p. 1265–1282, 2010.

ERBETTA, C. D. C. Alves, R. J. Resende, J. M. Freitas, R. F. S. Sousa, R. G. Synthesis and Characterization of Poly(D,L-Lactide-co-Glycolide) Copolymer. **Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 3, p. 208–225, 2012.

FAHLGREN, A; Bratengeier, C.; Gelmi, A.; Semeins, C. M.; Nulend, J. K.; Jager, E. W. H., Bakkers, A. D. Biocompatibility of Polypyrrole with Human Primary Osteoblasts and the Effect of Dopants. **Journal Plos One**, p. 1–18, 2015.

FENG, J.; Yan, W.; Zhang, L. Synthesis of polypyrrole micro/nanofibers via a self-assembly process. **Microchim Acta**, v. 166, p. 261–267, 2009.

FERREIRA, F. A.; Malmonge, S.M. **Degradação Hidrolítica De Polímeros XXIV Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica. Anais...2014**

FONNER, J. M.; Forciniti, L.; Nguyen, H.; Byrne, J. D.; KouL, Y.; Nawaz, J. S.; Biocompatibility implications of polypyrrole synthesis techniques. **Biomed.Mater**, v. 3, p. 1 – 12, 2008.

FONSECA, P. R. B.; Gatto, B.E.O.; Tondato, V. A. Neuropatia dolorosa pós-traumática e pós-operatória. **Rev Dor**. p. 59 – 62, 2016.

GIROTTTO, E. M.; Santos, I. A. Medidas de resistividade elétrica DC em sólidos: Como efetuá-las corretamente. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 639–647, 2002.

GOEL, S.; Mazumdar, N. A.; Gupta, A. Synthesis and characterization of polypyrrole nanofibers with different dopants. **Polym. Adv. Techno.**, v. 21, p. 205–210, 2010.

GOMEZ, N.; Schmidt, C. E. Nerve growth factor-immobilized polypyrrole: Bioactive electrically conducting polymer for enhanced neurite extension. **J Biomed Mater**, v. 81A, p. 135 – 149, 2007.

HIEP, N.T.; Lee, B. T. Electrospinning of PLGA /PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. **J Mater Sci Mater Med**, v. 21, p. 1969–1978, 2010.

HOMAYONI, H.; Ravandi, S. A. H.; Valizadeh, M. Electrospinning of chitosan nanofibers: Processing optimization. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, n. 3, p. 656–661, 2009.

JAHNO, V. D. Síntese e caracterização do poli(L-ácido láctico) para uso como biomaterial. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais - UFRGS. 2005.

JEEJU, P. P.; Varma, S. J.; Xavier, P. A. F.; Sajimol, A. M.; Novel polypyrrole films with excellent crystallinity and good thermal stability. **Materials Chemistry and Physics**, v. 134, n. 2-3, p. 803–808, 2012.

JIANG, B.; Akar, B.; Waller, T. M.; Larson, J. C.; Appel, A. A.; Brev, E. M. Design of a composite biomaterial system for tissue engineering applications. **Acta Biomaterialia**, v. 10, n. 3, p. 1177–1186, 2014.

JONES, D. **Pharmaceutical Application of Polymers for Drug Delivery**.v. 6. Rapra Technology, 2004. 9p.

JOSE, J. P.; Malhotra, S. K.; Thomas, S.; Joseph, K., Goda, K.; Sreekala, M. S. Introduction to Polymer Composites. In: **Polymer Composites**. v. 1, 2012.

KANER, R. B.; Li, D. Shape and Aggregation Control of Nanoparticles: Not Shaken, Not Stirred. **Journal of the American Chemical Society**, 128 (3), p. 968–975, 2006.

KAYNAK, A.; Foitzik, R. Synthesis and Characterization of Soluble Conducting Polymers. **Research Journal of Textile and Apparel**, v. 14, n. 2, p. 45 – 52, 2010.

KEANE, T. J.; Badylak, S. F. Biomaterials for tissue engineering applications. **Seminars in Pediatric Surgery**, v. 23, n. 3, p. 112–118, 2014.

KIM, K.; Yu, M.; Zong, X. H.; Chiu, J.; Fang, D. F.; Seo, Y. S.; Hsiao, B. S.; Chu, B.; Hadjiargyrou, M. Control of degradation rate and hydrophilicity in electrospun non-woven poly(D,L-lactide) nanofiber scaffolds for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 24, n. 27, p. 4977–4985, 2003.

KIM, S. Oh, W. K; Jeong, Y. S; Hong, J. Y; Cho, B. R; Hahn, J. S.; Jang, J. Cytotoxicity of, and innate immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 9, p. 2342–2350, 2011.

KWEON, H.;Kyong, M.; Kyu, I.; Hee, T.; Chul, H.; Lee, H.; Oh, J.; Akaike, T.; Cho, C. A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 24, p. 801–808, 2003.

KWOLEK-MIREK, M.; Zadrag-Tecza, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Res**, v. 14, p. 1068–1079, 2014.

LEE, J. Y.; Bashur, C. A.; Milroy, C. A.; Forciniti, L.; Goldstein, A. S.; Schmidt, C. E. Nerve Growth Factor-Immobilized Electrically Conducting Fibrous Scaffolds for Potential Use in Neural Engineering Applications. **IEEE transactions on nanobioscience**, v. 11, n. 1, p. 15–21, 2012.

LEUNG, V.; Ko, F. Biomedical applications of nanofibers. **Polym. Adv. Technol.**, v. 22, p. 350 – 365, 2011.

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

LI, X.;Yang, C.; Li, L.; Xiong, J.; Xie, L.; Yang, B.; Yu, M.; Feng, L.; Jiang, Z.; Guo, W.; Tian, W. A Therapeutic Strategy for Spinal Cord Defect : Human Dental Follicle Cells Combined with Aligned PCL / PLGA Electrospun Material.**BioMed Research International**, p. 1-12, 2015.

LI, Z.; Tan, H. Towards the development of polycaprolactone based amphiphilic block copolymers : molecular design, self-assembly and biomedical applications. **Materials Science & Engineering C**, v. 45, p. 620–634, 2014.

LIU, H.; Wang, S.; Qi, N. Controllable Structure, Properties, and Degradation of the Electrospun PLGA / PLA-Blended Nanofibrous Scaffolds. **Polymer Science**, v. 125, p. E468 – E476, 2012.

LIU, J.; Wan, M. Studies on formation mechanism of polypyrrole microtubule synthesized by template-free method. **Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry**, v. 39, n. 7, p. 997–1004, 2001.

LU, L.; Peter, S.J.; Lyman, M. D.; Lai, H.; Leite, S. M.; Tamada, J. A.; Uyama, S.; Vacanti, J. P.; Langer, R.; Mikos, A. G. *In vitro* and *in vivo* degradation of porous poly (D,L -lactic-co-glycolic acid) foams. **Biomaterials**, v. 21, p. 1837–1845, 2000.

LU, X.; Qiu, Z.; Wan, Y.; Hu. Z.; Zhao Y. Preparation and characterization of conducting polycaprolactone/ chitosan / polypyrrole composites. **Composites Part A**, v. 41, n. 10, p. 1516–1523, 2010.

LUCAS, N.; Bienaime, C.; Belloy, C.; Queneudec, M.; Silvestre, F.; Saucedo, J.E.N. Polymer biodegradation : Mechanisms and estimation techniques. **Chemosphere**, v. 73, p. 429–442, 2008.

LUNDBORG, G.; Rosen, B.; Abrahamson, S. O.; Dahlin, L.; Danielsen, N. Tubular repair of the median nerve in the human forearm. Preliminary findings. **J Hand Surg Br.**, v. 19, p. 273–276, 1994.

LUNDBORG, G.; Dahlin, L. B.; Danielsen, N. Ulnar nerve repair by the silicone chamber technique. Case report. **Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg**, v. 25, p. 79 – 82, 1991.

MAINARDES, R. M.; Palmira, M.; Gremião, D.; Evangelista, R.C. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, p. 523 – 530, 2006.

MAKADIA, H. K.; Siegel, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p. 1377–1397, 2011.

MASUDA, H.; Asano, D.K. Preparation and properties of polypyrrole. **Synthetic Metals**, v. 135-136, p. 43–44, 2003.

MATTAR, R.; Azze, R.J. Lesão dos nervos periféricos. In: **Instituto de Ortopedia e Traumatologia**, Atualização em Traumatologia do Aparelho Locomotor. São Paulo, n 3, p.1- 28, 1999.

MELO, C. P.; Neto, B.B.; Lira, L. F. B.; Souza, J. E. G. Influence of the nature of the surface of polypyrrole films upon their interaction with volatile organic compounds. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 258, p. 99–103, 2005.

MIDHA, R. Emerging techniques for nerve repair: nerve transfers and nerve guidance tubes. In: **Clinical Neurosurgery**. [s.l: s.n.]. v. 53, p. 185–190, 2006.

MOBASSERI, S. A.; Terenghi, G.; Downes, S. Micro-structural geometry of thin films intended for the inner lumen of nerve conduits affects nerve repair. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 24, p. 1639–1647, 2013.

NAN, J.; Hu, X.; Li, H.; Zhang, X.; Piao, R. Use of nerve conduits for peripheral nerve injury repair: A Web of Science-based literature analysis. **Neural Regeneration Research**, v. 35, p. 2826 – 2833, 2012.

NAVARRO-BAENA, I.; Sessini, V.; Dominici, F.; Torre, L.; Kenny, J. M.; Peponi, L. Design of biodegradable blends based on PLA and PCL: From morphological, thermal and mechanical studies to shape memory behavior. **Polymer Degradation and Stability**, v. 132, p. 97–108, 2016.

NGUYEN, H. T.; Sapp, S.; Wei, C.; Chow, J.K.; Nguyen, A.; Coursen, J.; Luebben, S.; Chang, E.; Ross, R.; Schmidt, C.E. Electric field stimulation through a biodegradable polypyrrole-co-polycaprolactone substrate enhances neural cell growth. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 102, p. 2554–2564, 2013.

OH, S. H.; Kim, J. H.; Song, K. S.; Jeon, B. H.; Yoon, J. H.; Seo, T. B.; Uk, N.; Lee, I. W.; Lee, J. H. Peripheral nerve regeneration within an asymmetrically porous PLGA / Pluronic F127 nerve guide conduit. **Biomaterials**, v. 29, p. 1601–1609, 2008.

OLIVEIRA, A. L. R.; Pierucci, A.; Pereira, K. B. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. **Brazilian Journal of Morphological Science**, v. 21, p. 225–231, 2004.

OMASTOVÁ, M.; Trchová, M.; Kovářová, J.; Stejskal, J. Synthesis and structural study of polypyrroles prepared in the presence of surfactants. **Synthetic Metals**, v. 138, p. 447–455, 2003.

OZDIL, D.; Aydin, H. M. Polymers for medical and tissue engineering applications. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 89, p. 1793–1810, 2014.

PARK, G. E.; Pattison, M. A.; Park, K.; Webster, T. J. Accelerated chondrocyte functions on NaOH-treated PLGA scaffolds. **Biomaterials**, v. 26, p. 3075–3082, 2005.

PATIL, A. J.; Pandey, A. K. A novel approach for in situ polymerization of polypyrrole on cotton substrates. **Indian Journal of Fibre & Textile Research**, v. 37, p. 107–113, 2012.

PENCO, M.; Sartore, L.; Bignotti, F.; D'antone, S.; Landro, L. Thermal properties of a new class of block copolymers based on segments of poly (D,L -lactic-glycolic acid) and poly ( $\epsilon$  -caprolactone). **European Polymer Journal**, v. 36, p. 901–908, 2000.

PHAM, Q. P.; Sharma, U.; Mikos, A. G. Electrospun poly ( $\epsilon$ -caprolactone) microfiber and multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 10, p. 2796–2805, 2006.



PIERUCCI, A.; Aparecida, E.; Duek, R. D. E.; Leite, A.; Oliveira, R. D. E. Peripheral Nerve Regeneration through Biodegradable Conduits Prepared Using Solvent Evaporation. **Tissue Engineering**, v. 14, n. 5, p. 30–43, 2008.

PUPPI, D.; Piras, A. M.; Detta, N.; Dinucci, D.; Chiellini, F. Poly(lactic-co-glycolic acid) electrospun fibrous meshes for the controlled release of retinoic acid. **Acta Biomaterialia**, v. 6, n. 4, p. 1258–1268, 2010.

QUIGLEY, B. A. F.; Razal, J. M.; Thompson, B. C.; Simon, E. M.; Kita, M.; Kennedy, E.L.; Clark, G. M.; Wallace, G. G.; Kapsa, R. M. I. A Conducting-Polymer Platform with Biodegradable Fibers for Stimulation and Guidance of Axonal Growth. **Advanced Materials**, v. 21, p. 4393–4397, 2009.

RENOUF-GLAUSER, A. C.; Rose, J.; Farrar, D.; Cameron, R. E. A degradation study of PLLA containing lauric acid. **Biomaterials**, v. 26, n. 15, p. 2415–2422, 2005.

REZA, Ansari. Polypyrrole Conducting Electroactive Polymers: Synthesis and Stability Studies. **E-Journal of Chemistry**, v. 3, p.186-201, 2006.

RODRIGUES, M. C. O.; Rodrigues, J. A. A.; Glover, L. E.; Voltarelli, J.; Borlongan, C. V. Peripheral Nerve Repair with Cultured Schwann Cells: Getting Closer to the Clinics. **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1–10, 2012.

RUNGE, M. B.; Dadsetan, M.; Baltrusaitis, J.; Knight, A. M.; Ruesink, T.; Lazcano, E. A.; Lu, L.; Windebank, A. J.; Yaszemski, M. J. The development of electrically conductive polycaprolactone fumarate e polypyrrole composite materials for nerve regeneration. **Biomaterials**, v. 31, n. 23, p. 5916–5926, 2010.

SCHMIDT, C. E.; Leach, J. B. Neural tissue engineering: Strategies for repair and regeneration. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 5, p. 293–347, 2003.

SPIVEY, E. C.; Khaing, Z. Z.; Shear, J.B.; Schmidt, C. E. The fundamental role of subcellular topography in peripheral nerve repair therapies. **Biomaterials**, v. 33, n. 17, p. 4264–4276, 2012.

SUBRAMANIAN, A.; Krishnan, U. M.; Sethuraman, S. Fabrication, Characterization and In Vitro Evaluation of Aligned PLGA – PCL Nanofibers for Neural Regeneration. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 40, n. 10, p. 2098–2110, 2012.

SUNG, H.; Meredith, C.; Johnson, C.; Galis, Z. S. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. **Biomaterials**, v. 25, p. 5735–5742, 2004.

TANG, L.; Liu, H.; Wang, Y.L. Evaluation of the biocompatibility of acellular porcine dermis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 57, n. 2, p. 215–218, 2007.

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

THEVENOT, P.; Hu, W.; Tang, L. Surface Chemistry Influences Implant Biocompatibility. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 270-280, 2008.

TOMA, H. E. **Nanotecnologia Molecular – Materiais e Dispositivos**. 1ª ed. São Paulo: Blucher, 2016. 178p.

ULERY, B. D.; Nair, L. S.; Laurencin, C. T. Biomedical Applications of Biodegradable Polymers. **Journal of polymer science**, v. 49, p. 832–864, 2011.

VALENTE, C. A. Síntese de nanofibras de polipirrol para potencial aplicação em conduto biodegradável para regeneração nervosa. Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais Faculdade de Engenharia - PUC, Porto Alegre. 2014.

WANG, S.; Zhang, Y. Preparation , Structure , and in vitro Degradation Behavior of the Electrospun Poly (lactide-co-glycolide) Ultrafine Fibrous Vascular Scaffold. **Fibers and Polymers**, v. 13, n. 6, p. 754–761, 2012.

WANG, X.; Gu, X.; Yuan, C.; Chen, S.; Zhang, P.; Zhang, T.; Yao, J.; Chen, F.; Chen, G. Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo. **J Biomed Mater Res**, v. 68, p. 411 – 422, 2004.

WANG, Z.; Roberge, C.; Wan, Y.; Dao, L. H.; Guidoin, R.; Zhang, Z. A biodegradable electrical bioconductor made of polypyrrole nanoparticle/poly(D,L-lactide) composite: A preliminary in vitro biostability study. **Journal of biomedical materials**, v. 66, p. 738–746, 2003.

WILLIAMS, D. F. Leading Opinion On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, p. 1–13, 2008.

XIA, X.; Yin, J.; Qiang, P.; Zhao, X. Electrorheological properties of thermo-oxidative polypyrrole nanofibers. **Polymer**, v. 52, n. 3, p. 786–792, 2011.

YANG, C.; Wang, X.; Wang, Y.; Liu, P. Polypyrrole nanoparticles with high dispersion stability via chemical oxidative polymerization in presence of an anionic – non-ionic bifunctional polymeric surfactant. **Powder Technology**, v. 217, p. 134–139, 2012.

YOSHIOKA, T.; Kawazoe, N.; Tateishi, T.; Chen, G. *In vitro* evaluation of biodegradation of poly(lactic-co-glycolic acid) sponges. **Biomaterials**, v. 29, p. 3438–3443, 2008.

YOU, Y.; Min, B. M.; Lee, S. J.; Lee, T. S.; Park, W. H. *In vitro* degradation behavior of electrospun polyglycolide, polylactide, and poly(lactide-co-glycolide). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 95, n. 2, p. 193–200, 2005.

ZHAO, W.; Li, J.; Jin, K; Liu, W.; Qiu, X.; Li, C. Fabrication of functional PLGA-based electrospun scaffolds and their applications in biomedical engineering. **Materials Science & Engineering C**, v. 59, p. 1181–1194, 2016.

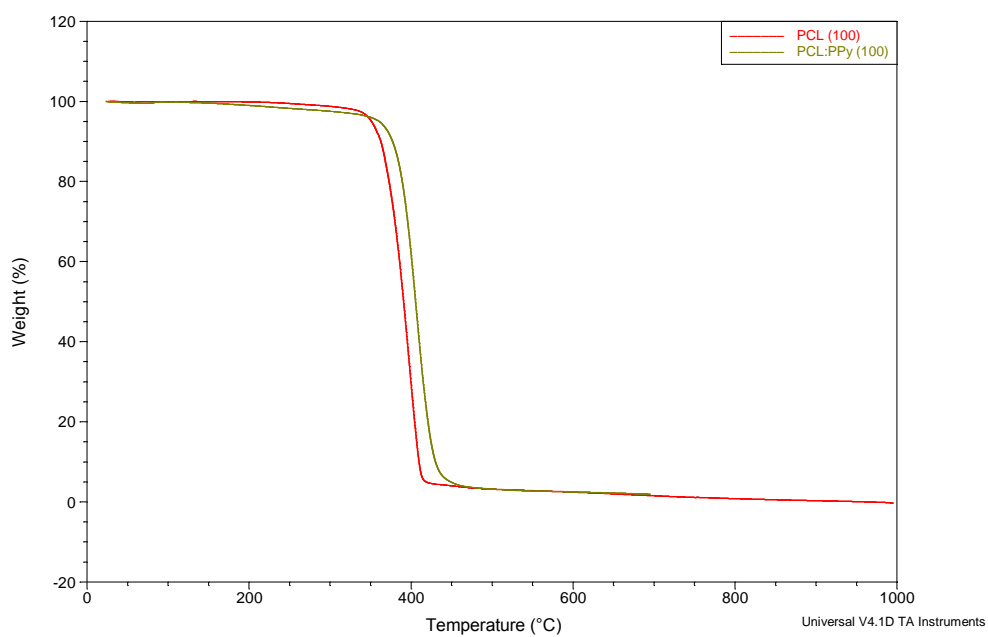
## ANEXO

Classificação de citotoxicidade de materiais - níveis de viabilidade celular em porcentagem segundo categorias de toxicidade dos materiais do documento ISO 10993-5: 1999.

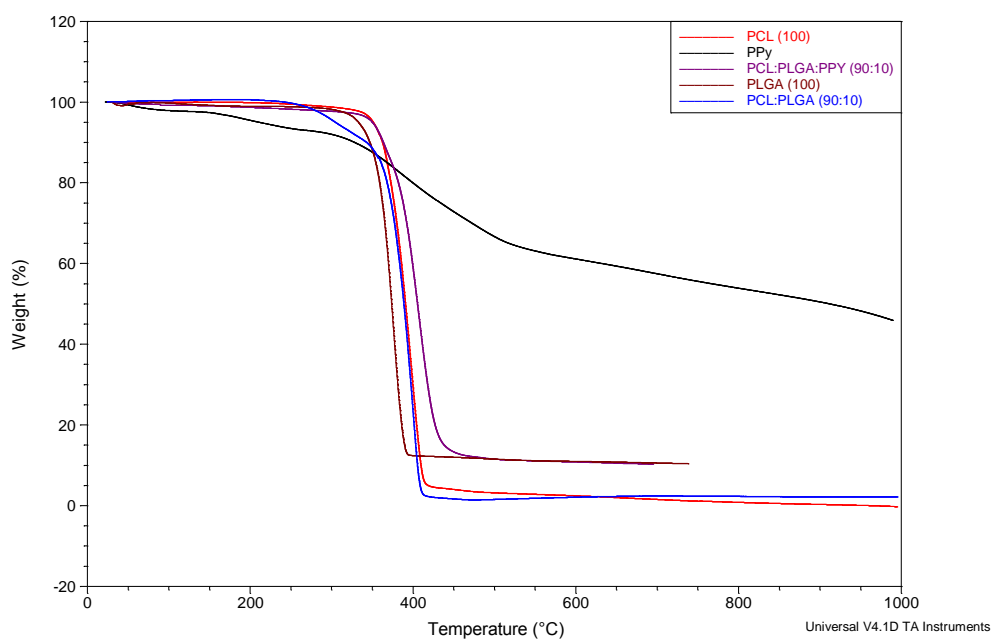
<b>Citotoxicidade</b>	<b>Viabilidade celular (%)</b>
	<b>Faixa</b>
Não citotóxico	> 90
Levemente citotóxico	80 a 89
Moderadamente citotóxico	50 a 79
Severamente citotóxico	< 50

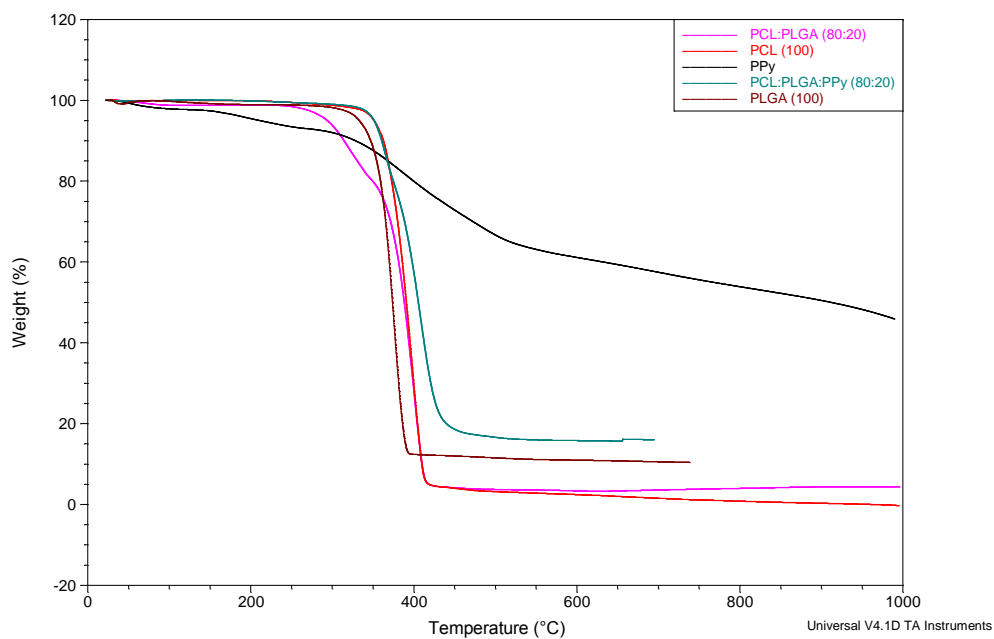
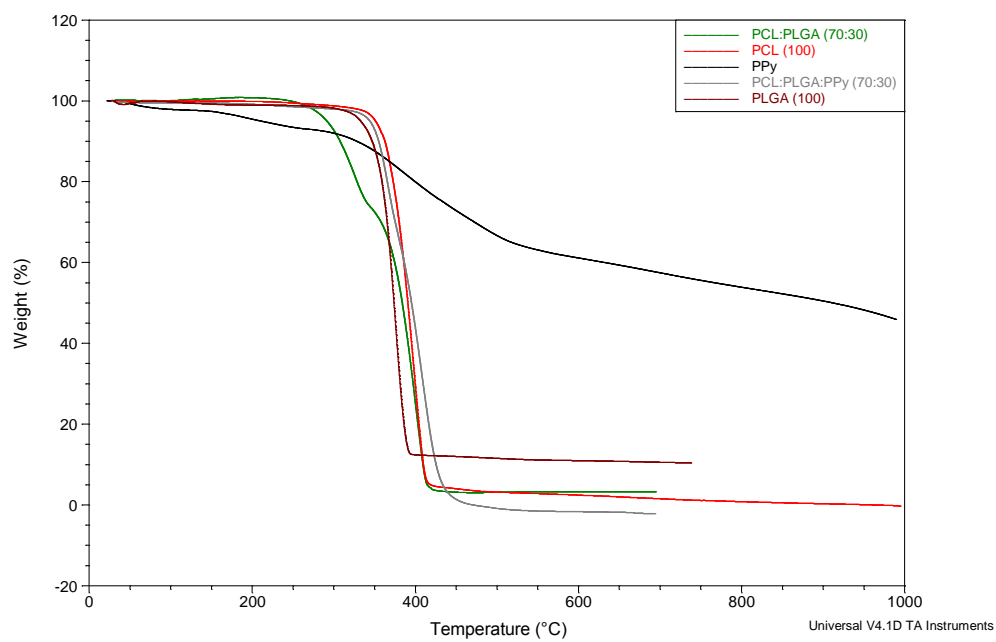
## APÊNDICE

## TGA – PCL (100) e PCL:PPy (100)

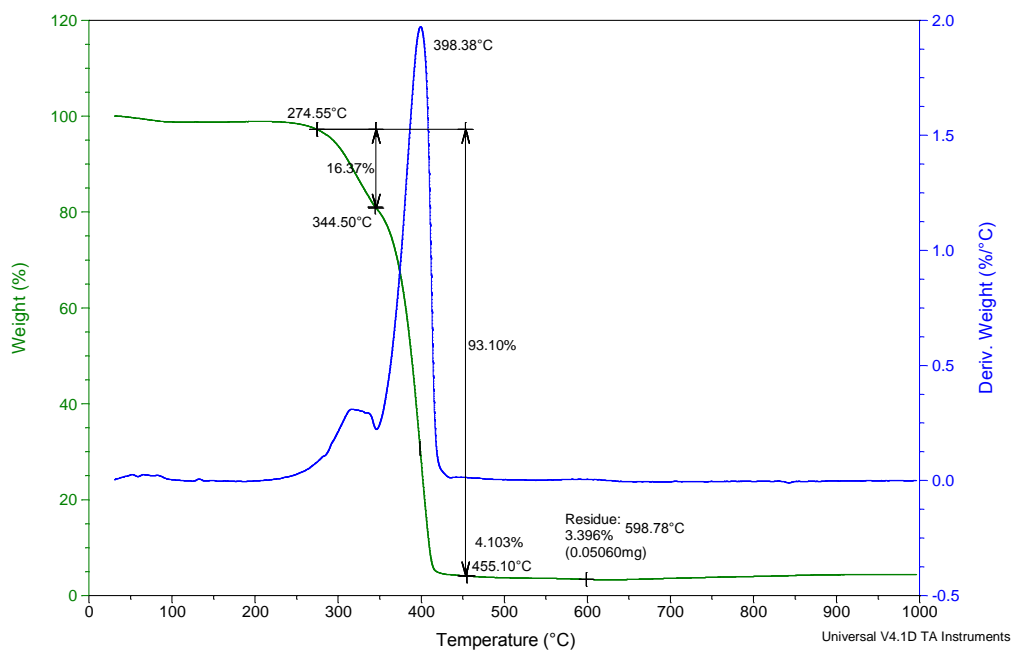


## TGA – PCL:PLGA (90:10) e PCL:PLGA:PPy (90:10)

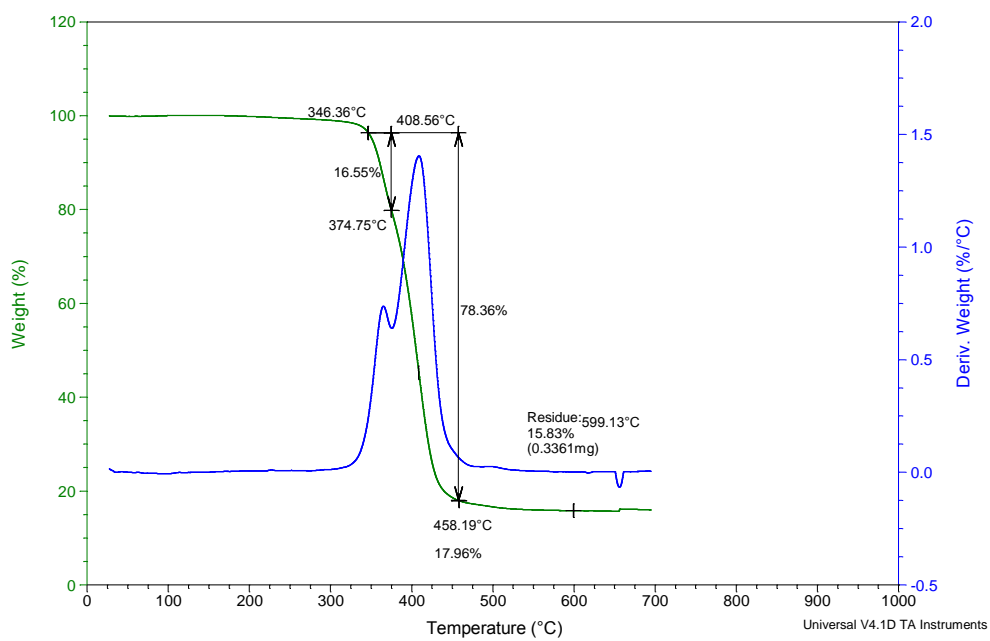


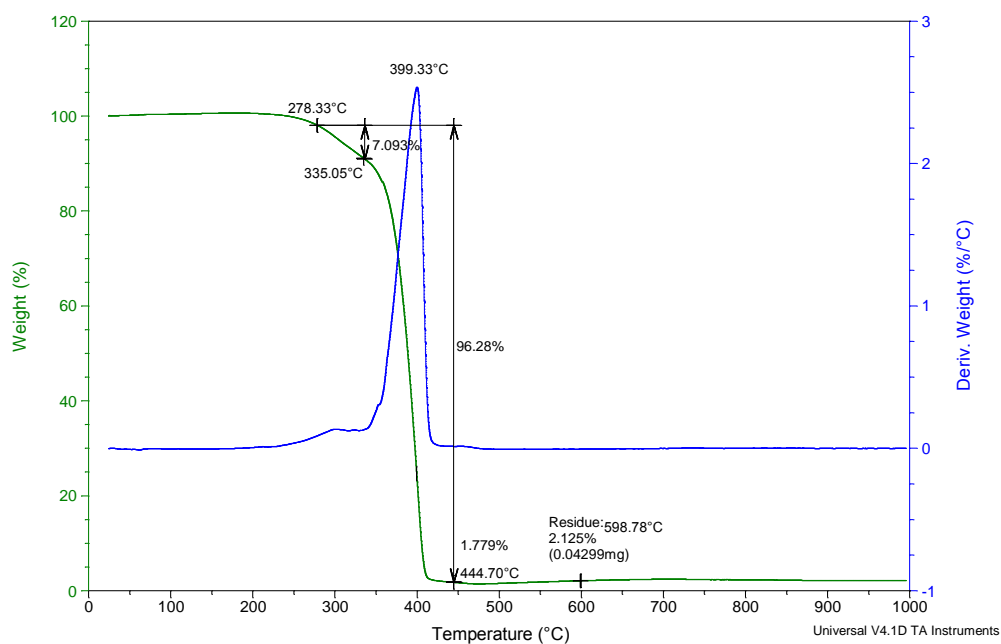
**TGA – PCL:PLGA (80:20) e PCL:PLGA:PPy (80:20)****TGA - PCL:PLGA (70:30) e PCL:PLGA:PPy (70:30)**

### TGA/DTG-PCL:PLGA (80:20)



### TGA/DTG - PCL:PLGA:PPy (80:20)



**TGA/DTG – PCL:PLGA (90:10)****TGA/DTG – PCL:PLGA:PPy (90:10)**