



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**SÍNTESE DE NANOFIBRAS DE POLIPIRROL PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO EM CONDUTO BIODEGRADÁVEL PARA
REGENERAÇÃO NERVOSA**

CRISTHIANE ALVIM VALENTE

LICENCIADA EM QUÍMICA E QUÍMICA INDUSTRIAL

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

Porto Alegre

Março, 2014



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**SÍNTESE DE NANOFIBRAS DE POLIPIRROL PARA POTENCIAL
APLICAÇÃO EM CONDUTO BIODEGRADÁVEL PARA
REGENERAÇÃO NERVOSA**

CRISTHIANE ALVIM VALENTE

LICENCIADA EM QUÍMICA E QUÍMICA 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.

O presente trabalho foi alcançado em cooperação com a Hewlett-Packard Brasil Ltda. e com recursos provenientes da Lei de Informática (Lei nº 8.248, de 1991).

**Porto Alegre
Março, 2014**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
 FACULDADE DE ENGENHARIA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

SÍNTESE DE NANOFIBRAS DE POLIPIRROL PARA POTENCIAL APLICAÇÃO EM CONDUTO BIODEGRADÁVEL PARA REGENERAÇÃO NERVOSA

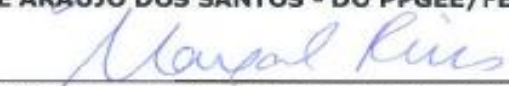
CANDIDATA: CRISTHIANE ALVIM VALENTE

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. MARLISE ARAÚJO DOS SANTOS - DO PPGE/FENG - PUCRS


 DR. MARÇAL JOSÉ RODRIGUES PIRES - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

“Te podés caer 20 veces. Y te volvés a levantar. Y que en la vida a veces se le puede caer alguna lagrima a uno, pero hay que seguir”.

(Carlos Páez Vilaró)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família que está sempre ao meu lado em qualquer situação e desafio, em especial aos meus pais Eduardo e Neiza pelo amor e apoio em todos os momentos da minha vida. Para minhas irmãs Jacqueline e Patrícia que me ajudaram nesta trajetória. Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, por tudo que venho recebendo, minha família, amigas pela natação, amigas pela fé, amigos pela química, amigos pelos amigos, e amigos para sempre se Deus quiser.

Agradeço em especial aos meus pais, Eduardo e Neiza, por todo o amor, carinho, dedicação e por me ajudarem a conquistar meus sonhos, sem o apoio de vocês eu não teria forças. As minhas irmãs, Jacqueline e Patrícia, pela ajuda especial nesta etapa de estudos e por todas as emoções e crescimento que fomos adquirindo uma com as outras.

Agradeço ao meu grupo Rumo Certo e demais companheiras de Emaús, minhas amigas pela fé, pelas orações poderosas de vocês.

A minha professora Dr^a. Nara Regina de Souza Basso por toda orientação e dedicação que sempre pude contar e pela confiança em minha capacidade para o início de um novo trabalho. Agradeço também pelo aprendizado pessoal e profissional através da sua convivência.

Aos professores Dr. Marçal Pires e Dr^a. Marlise A. dos Santos pela participação na banca examinadora, em especial aos valiosos questionamentos do Prof. Dr. Marçal visando o melhoramento do trabalho. Ao professor Dr. Ricardo Papaléo por sua colaboração para o aperfeiçoamento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Jefferson Luis Braga Silva do Laboratório de Pesquisa de Habilidades Médicas da PUCRS e ao seu grupo de pesquisa, em especial a cooperação e colaboração do amigo e colega Eduardo Goldani.

À colega Aline Aquino, minha grande amiga desde o tempo de graduação e hoje meu grande exemplo como profissional, além do seu exemplo de pessoa humilde e verdadeira, uma amiga de grande coração sempre disponível a ajudar. Não poderia esquecer o seu marido, Leandro “Aquino”, pela amizade, almoços e os cafés pelos bares da PUCRS, além do entusiasmo e confiança no sucesso pela Química.

Aos queridos colegas e amigos do LOR, que trabalham ou trabalharam no LOR enquanto realizei o curso de Mestrado (Cláudia, Guilherme, Manoela, Emanuelli, Fabi G., Suelen, Rafa Duczinski, Evandro, Léo, Wesley, Fran, Michele,

Elisa, Raiane... são muitos), pela amizade, apoio, almoços e pelos ótimos momentos de parceria na hora do café com rendimento máximo de ótimas risadas.

A minha companheira de trabalho Fabiana Pilar, pela ajuda e colaboração para o desenvolvimento deste trabalho e hoje mais que uma colega, uma grande amiga que pela Química ganhei.

Agradeço em especial a Priscila Caimi que me ajudou no começo deste trabalho com sua excelente dedicação como bolsista de Iniciação Científica e ao Lucas Weber por dar continuidade aos passos dela e colaborar na coleta dos resultados finais.

A Thuany Maraschin por toda ajuda e disposição, foi uma anjinha enviada por Deus para me salvar nas horas de sufoco.

As minhas colegas Ana Paula Graebin e Maria Helena Reis pela força, amizade, caroninhas e saídas para *Happy hour* entre amigas. A Gabrielly pela amizade e receita mágica com suco de laranja. A Cláudia pela sua divertida companhia nos almoços pela universidade e dicas gastronômicas deliciosas.

Aos queridos amigos Wesley e Aline Aquino, sem essa dupla a formatação deste trabalho não seria possível. Não poderia esquecer o Léo, pela companhia em dias longos no LOR, assim como o Rafa, o orgulho entre os ICs do laboratório.

A minha amiguinha iluminada por Deus Fabiana Silva Costa por sua amizade mais que especial, além de suas orações e incentivo de que tudo somos capazes de alcançar.

A Bruna pelas caronas no final de longos dias de trabalho para um jantar entre amigas.

A todos os funcionários da Faculdade de Química e do PGETEMA pela colaboração no desenvolvimento deste trabalho. Obrigado especial aos funcionários do Almoxi e para o bem humorado Sr. Nelson por toda ajuda.

Ao PGETEMA e a FAQUI pela estrutura oferecida.

A HP pela bolsa concedida.

E por fim a Deus novamente e a Nossa Senhora para que iluminem meu caminho, para que eu possa seguir sempre no rumo certo sem medo de errar.

Muito obrigado a todos que me ajudaram e desculpas aos que eu posso ter esquecido de mencionar.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	5
AGRADECIMENTOS	6
SUMÁRIO	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	15
LISTA DE QUADROS.....	16
LISTA DE SÍMBOLOS.....	17
RESUMO	21
ABSTRACT.....	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivos Específicos	27
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	28
3.1. Polipirrol (PPy)	28
3.2. Biomateriais nano estruturados	34
3.3. Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA).....	37
3.4. Engenharia de Tecidos	42
3.4.1. Fatores de Crescimento.....	45
3.4.2. Tacrolimus (FK506)	47
4. MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1. Materiais.....	50
4.2. Métodos.....	52
4.2.1. Síntese química do PPy.....	52
4.2.2. Preparação de filmes de PLGA	53
4.2.3. Preparação de nanocompósitos de PLGA com PPy pelo método sanduíche por evaporação de solvente	54
4.2.4. Síntese química para funcionalização de nanofibras PPy	58
4.2.5. Mistura direta do fármaco Tacrolimus em PLGA com nanofibras de PPy	60

4.3. Técnicas de Caracterização	61
4.3.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) ...	61
4.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	62
4.3.3. Análise Termogravimétrica (TGA).....	62
4.3.4. Espectroscopia de Impedância Elétrica	63
4.3.5. Degradação Hidrolítica	63
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	65
5.1. Preparação de nanofibras de PPy	65
5.2. Preparação dos filmes de PLGA.....	83
5.3. Preparação dos nanocompósitos de PLGA/PPy	84
5.3.1. Método A	84
5.3.2. Método B	91
5.4. Preparação de nanofibras de PPy funcionalizadas com fator de crescimento	96
5.5. Preparação dos nanocompósitos de PLGA/PPy/Tacrolimus.....	103
5.6. Teste de Degradação	104
5.6.1. Perda de Massa.....	105
5.6.2. Controle do pH.....	109
5.6.3. Espessura	112
5.6.4. MEV das matrizes de degradação.....	114
6. CONCLUSÕES	120
7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	122
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Estrutura dos polímeros condutores intrínsecos mais estudados. Adaptado de: (Rocha-Filho, 2000).29
- Figura 3.2. Estequiometria global da oxidação do pirrol com cloreto férrico como agente oxidante formando polipirrol. Para cada três unidades constituídas uma é protonada. Adaptado de: Osmatová et al., 2003. .31
- Figura 3.3. Estrutura de um nervo periférico formado pelo conjunto de fibras nervosas envoltas por tecido conjuntivo. Fonte: MedicinaNET37
- Figura 3.4. Estrutura química de PLGA (x é o número de unidades de PGA e y é o número de unidades de PLA. Fonte: Adaptado de (Duran et al., 2006; Makadia e Siegel, 2011).....38
- Figura 3.5. Reação de hidrólise de um grupo éster. Fonte: Duran et al., 2006.....39
- Figura 3.6. Mecanismo da rota metabólica dos produtos de degradação gerados por hidrólise do PLGA. Adaptado de: Barbanti et al., 2005.....40
- Figura 3.7. Mecanismo de ativação do fator de transcrição NF-AT via calcineurina na célula T (A) e mecanismo de ação do FK506 inibindo a função da calcineurina (B). Fonte: Adaptação de (Costa et al., 2006; Morais de Souza, 2012).....48
- Figura 4.1. Diagrama esquemático da síntese química do PPy.....53
- Figura 4.2. Diagrama esquemático da evaporação do solvente sem fluxo de nitrogênio (a) e com fluxo de nitrogênio (b).....54
- Figura 4.3. Diagrama esquemático da preparação dos filmes de PLGA com PPy pelo método sanduíche por evaporação de solvente. Fonte: Adaptado de (Khang et al., 2003).....56
- Figura 4.4. Diagrama esquemático dos filmes de PLGA/PPy estruturados na forma de sanduíche.....57
- Figura 4.5. Diagrama esquemático da síntese química para obtenção de nanofibras de PPy funcionalizadas com 1-(2 carboxietil)pirrol.....59
- Figura 4.6. Diagrama esquemático da preparação do filme estruturado como sanduíche de PLGA com PPy pelo método B . Fonte: Adaptado de (Khang et al., 2003).....60

- Figura 4.7. (a) e (b) Incubadora termostatzada adaptada. (c) Triplicadas das amostras em degradação.....64
- Figura 5.1. Imagens de MEV das amostras de PPy com diferentes agentes dopantes: a) HCl b)ADBS c) APTS. Razão molar [dop]:[Py] = 1,13...66
- Figura 5.2. Imagens de MEV das amostras de PPy com diferentes agentes dopantes e razão molar [dop]:[Py] = 4; a) HCl; b)ADBS; c) APTS; d) PTS.67
- Figura 5.3. a) e b) Imagens de MEV da obtenção das primeiras fibras de PPy na presença do dopante APTS e razão molar [dop]:[Py] = 4.68
- Figura 5.4. a) b) e c) Imagens de MEV em diferentes magnitudes das fibras de PPy com dopante APTS e razão molar [dop]:[Py] = 4 , 3^a tentativa de reprodutibilidade.....69
- Figura 5.5. a) b) e c) Imagens de MEV e, diferentes magnitudes das fibras de PPy com dopante APTS e razão molar [dop]:[Py] = 4, 2^a tentativa de reprodutibilidade.....69
- Figura 5.6. a) e b) Imagens de MEV das fibras de PPy com dopante APTS, razão molar [dop]:[Py] = 4 e reação com 24h de agitação magnética.70
- Figura 5.7. Imagens de MEV da amostra de PPy com dopante APTS e razão molar [dop]:[Py] = 4 . (a) síntese na temperatura entre -10 e -5 °C; (b) síntese na temperatura ambiente.....71
- Figura 5.8. Imagens de MEV das amostras de PPy com dopante APTS e razão molar [dop]:[Py] = 2.71
- Figura 5.9. Imagens de MEV das amostras de PPy com dopante PTS e razão molar [dop]:[Py] = 4. a) Reação por 24h em temperatura ambiente b) Reação com agitação 24h.....72
- Figura 5.10. Imagens de MEV da amostra de PPy com dopante PTS e razão molar [dop]:[Py] = 6.72
- Figura 5.11. Imagens de MEV das amostras de PPy com dopante ADBS. a) razão molar [dop]:[Py] = 4 e b) razão molar [dop]:[Py] = 0,05.....73
- Figura 5.12. Espectroscopia de Infravermelho do Polipirrol com diferentes dopantes.74
- Figura 5.14. Termogramas do polipirrol com os diferentes dopantes.77

- Figura 5.15. Termogramas dos PPy-APTS de reações com pequenas modificações. PPy-APTS e PPy-APTS (c/agitação) têm morfologia de fibra e os demais PPy dopados tem forma particulada..... 80
- Figura 5.16. a) e b) Imagens de MEV da superfície de filmes de PLGA (0,2g) sob fluxo de nitrogênio..... 83
- Figura 5.17. a) e b) Imagens de MEV da superfície de filmes de PLGA (0,2g) sem fluxo de nitrogênio..... 84
- Figura 5.18. Imagem de MEV de fibras de PPy com dopante APTS removidas da polimerização sobre filme de PLGA. Técnica descrita no item 4.2.3. 85
- Figura 5.19. a) b) e c) Imagens de MEV em diferentes magnitudes das fibras de PPy com dopante APTS removidas da polimerização sobre o filme de PLGA. Técnica descrita no item 4.2.3. 86
- Figura 5.20. a) e b) Imagens de MEV em diferentes magnitudes do filme de PLGA com o pó resultante da reação de PPy com dopante APTS que ficou aderido sobre o filme. Técnica descrita no item 4.2.3..... 87
- Figura 5.21. Imagens de MEV do filme de PLGA com o pó resultante da reação de PPy com dopante APTS que ficou aderida sobre o filme. Técnica descrita no item 4.2.3..... 88
- Figura 5.22. a) e b) Imagens de MEV em diferentes magnitudes do pó resultante da reação de PPy que ficou aderida sobre o filme de PLGA. Técnica descrita no item 4.2.3..... 88
- Figura 5.23. a) e b) Imagem de MEV de nanofibras de PPy com dopante APTS removidas da polimerização sobre filme de PLGA. Técnica descrita no item 4.2.3. 89
- Figura 5.24. Diagrama esquemático do sistema reacional para síntese de polipirrol sobre filme de PLGA. Método A descrito no item 4.2.3. 90
- Figura 5.25. Imagens de MEV das fibras de PPy recobertas com PLGA. a) b) e c) 1h de dispersão em banho de ultrassom do PPy em 0,2 g de PLGA. ... 92
- Figura 5.26. Imagens de nanocompósitos de PLGA (0,2 g) com fibras de PPy. Tempo de dispersão: a) 1h; b) 4h; c) 8h. 92
- Figura 5.27. Imagens de MEV de fibras de PPy recobertas com PLGA (0,2 g). a) b) e c) Dispersão de 4h de banho de ultrassom do PPy em PLGA. 93
- Figura 5.28. Imagens de MEV de fibras de PPy recobertas com PLGA (0,2 g). (a) e (b) Dispersão de 8h de banho de ultrassom. 93

- Figura 5.29. Imagem do filme de PLGA (0,2 g) com PPy-APTS na morfologia particulada (4h de banho de ultrassom)..... 94
- Figura 5.30. a) e b) Imagens de MEV do filme compósito de particulados de PPy em PLGA (0,2 g) com 4h de dispersão em banho de ultrassom. Camada representante da camada interna do filme quando estruturado em forma de sanduíche (técnica descrita no item 4.2.3)..... 94
- Figura 5.31. Imagens de MEV do filme compósito de particulados de PPy em PLGA com 4h de dispersão em banho de ultrassom. Camada representante da camada interna do filme quando estruturado em forma de sanduíche (técnica descrita no item 4.2.3). 95
- Figura 5.32. Espectroscopia de IV dos filmes de PLGA e do nanocompósito de PLGA/PPy (única camada). 95
- Figura 5.33. Esquema das etapas de preparação do PPy funcionalizado e ligado com FC. NHS: N-Hidroxisuccinimida; EDS:1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; FC: FK506. Adaptado de Lee et al., 2006. 97
- Figura 5.34. Imagens de MEV do PPy-APTS na presença do 1-(2 carboxietil)pirrol na razão de [1]: [1] do [funcionalizador]:[monômero]. Técnica descrita no item 4.2.4. 97
- Figura 5.35. Imagens de MEV do pó resultante da síntese química para funcionalização de nanofibras de PPy. Razão [funcionalizador]: [monômero] em a) [1,5]: [1] e b) [0,5]: [1]. Técnica descrita no item 4.2.4. 98
- Figura 5.36. Espectroscopia de infravermelho do funcionalizador 1-(2 carboxietil)pirrol (Py-COOH). Espectro A: funcionalizador puro misturado com KBr anidro. Espectro B: funcionalizador puro analisado com 4 vezes mais quantidade de KBr anidro (diluído em KBr). 99
- Figura 5.37. Espectroscopia de Infravermelho do Py sintetizado com APTS na presença do 1-(2-carboxietil)pirrol (Py-COOH). Razão Molar [funcionalizador]:[pirrol] presente na legenda dos espectros 4 a 7. Espectro 7: Síntese na presença de nanofibras de PPy-APTS. 100
- Figura 5.38. Termogramas de diferentes PPy dopados. PPy-COOH corresponde a amostra da síntese de obtenção de PPy na presença do funcionalizador com grupamento -COOH, conforme descrito no item 4.2.4. 101
- Figura 5.39. Imagens de filmes de PLGA. (a) PLGA (0,2g); (b) PLGA (0,2 g) com FK506..... 104
- Figura 5.40. Imagens do filme de PLGA (0,2g)/PPy(0,02g)/FK506. 104

- Figura 5.41. Comportamento de Perda de Massa (%) até 28 dias de degradação dos filmes de PLGA e compósitos de PLGA/PPy estruturado na forma de sanduíche pelo método B. 106
- Figura 5.42. Comportamento de Perda de Massa (%) até 28 dias de degradação dos filmes de PLGA e compósitos de PLGA/PPy - UNC (filme de camada única). 107
- Figura 5.43. Amostras da Perda de Massa (%) até 28 dias de degradação dos filmes de PLGA/PPy-APTS. UNC = filme de camada única. 108
- Figura 5.44. Amostras da Perda de Massa (%) até 28 dias de degradação dos filmes de PLGA. 109
- Figura 5.45. Controle do pH das soluções de degradação (PBS) dos filmes puros de PLGA e os nanocompósitos de PLGA/PPy. Branco: apenas solução de PBS. 111
- Figura 5.46. Controle da espessura pré e pós períodos de degradação dos filmes de PLGA, PLGA/PPy-APTS estruturados tipo sanduíche e PLGA/PPy-APTS de camada única. Unidade de medida: μm 113
- Figura 5.47. MEV do filme de PLGA 2. a) antes da degradação; b) 7 dias pós degradação e c) 28 dias pós degradação. 114
- Figura 5.48. MEV do filme 1B (PLGA/PPy-APTS) estruturado na forma de sanduíche. a) antes da degradação; b) 7 dias pós degradação e c) 28 dias pós degradação. 115
- Figura 5.49. MEV do filme 2B (PLGA/PPy-APTS) estruturado na forma de sanduíche. a) antes da degradação; b) 7 dias pós degradação e c) 28 dias pós degradação. 115
- Figura 5.50. MEV do filme 2B-UNC (PLGA/PPy-APTS) de camada única; a) b) e c) antes da degradação. 116
- Figura 5.51. MEV do filme 2B-UNC (PLGA/PPy-APTS) de camada única (a) e (b) pós 7 dias de degradação, (c) e (d) 28 pós degradação. 117
- Figura 5.52: MEV do filme 1B-UNC (PLGA/PPy-APTS) de camada única (a) e (b) antes da degradação. 118
- Figura 5.53. MEV do filme 1B-UNC (PLGA/PPy-APTS) de camada única (a) e (b) após 28 dias de degradação. 118

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Caracterização dos reagentes utilizados.....	51
Tabela 4.2. Relações de massas (g) de PLGA utilizadas para preparação dos filmes puros de PLGA.....	54
Tabela 4.3. Relações de massas (g) de PLGA utilizadas para preparação dos filmes estruturados na forma de sanduíche preparados pelos métodos A e B.....	56
Tabela 4.4. Massas utilizadas para preparar a 2ª camada dos filmes em estrutura de sanduíche pelo método B e para os filmes de camada única de PLGA com PPy-APTS.	57
Tabela 5.1. Razões molares utilizadas de [dop]:[Py].	65
Tabela 5.2. Porcentagem de resíduo até 600° C do PPy com diferentes dopantes.....	78
Tabela 5.3. Porcentagem de resíduo até 600° C do PPy dopado com APTS.	80
Tabela 5.4. Condutividade elétrica para o PPy dopado com diferentes dopantes....	82
Tabela 5.4. . Porcentagem de resíduo até 600° C do PPy dopado com APTS, PPy-FeCl ₃ e do PPy funcionalizado (PPy-COOH)	102

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Resumo das propriedades importantes e necessárias no planejamento de biomateriais biodegradáveis.....	42
---	----

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
<	Menor que
≤	Menor e igual que
°C	Grau Celsius
1D	Uma Dimensão
ADBS	Ácido dodecilbenzenosulfônico
ADN/DNA	Ácido desoxirribonucléico/ deoxyribonucleic acid
APTS	Ácido p-toluenosulfônico monohidratado
ARN/RNA	Ácido ribonucléico/ ribonucleic acid
ASTM	American Society for Testing and Materials
ATR	Refletância Total Atenuada
BDNF	Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro
Bioglass®	Partículas Bioativas de pó de vidro fundido
Cl ⁻	Íon Cloreto
cm	Centímetro
CME	Centro de Microscopia Eletrônica
CNANO	Centro de Nanociência e Nanotecnologia
CSA	Ácido canforsulfônico
CsA	Ciclosporina A
DBSNa	Dodecilbenzenossulfonato de sódio
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial

FAQUI	Faculdade de Química
FC	Fatores de Crescimento
FDA	Food and Drug Administration
FK506	Tacrolimus
FK506-FKBP	Complexo de Tacrolimus ligado a imunofilina específica
FKBP-12	Proteína 12 ligadora de FK506 ou inunofilina
FKPB-52	Proteína (outro tipo de imunofilina)
FN	Fatores Neurotróficos
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GAP-43/B50	Proteína
HCl	Ácido Clorídrico
IF	Imunofilina
IL-2	Interleucina -2
ITT FUSE	Instituto Tecnológico em Ensaios e Segurança Funcional
IV	Infravermelho
KBr	Brometo de Potássio
LabCEMM	Laboratório Central de Microscopia e Microanálise
LAMAT	Laboratório Multiusuário de Análise Térmica
LED	Diodos Emissores de Luz
LOR	Laboratório de Organometálicos
MEC	Matriz Extracelular
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão

min	Minutos
mL	Mililitros
MWCNT	Nanotubos de Carbono de Multi-paredes
NF-AT	Fator de Transcrição
NGC	Conduto Artificial de Orientação Neural
NGCs	Conduos Artificiais de Orientação Neural
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NT-3	Neurotrofina – 3
NT-4/5	Neurotrofina - 4/5
P(3HB)	Poli - 3-hidroxibutirato
P(LLA/CL)	Poli (ácido L-láctico - co - ε-caprolactona)
p75	Receptor de ligação específica da superfície celular
PANI	Polianilina
PBS	Solução Tampão Fosfato Salino
PC	Polímero Condutor
PCIs	Polímeros Condutores Intrínsecos
PCL	Poli (ε-caprolactona)
PCs	Polímeros Condutores
PGA	Poli (ácido glicólico)
pH	Potencial de Hidrogênio
PLA	Poli (ácido láctico)
PLC	Fosfolipose C

PLGA	Poli (ácido láctico - co- glicólico)
PLLA	Poli (ácido L- láctico)
PPy	Polipirrol
PTS	p-toluenosulfonato de sódio
PUCRS	Pontifícia Universidade do Rio Grande do Sul
Py	Pirrol
Py-COOH	1-(2 carboxietil)pirrol
S/cm	Siemens/cm (condutividade)
SDS	Dodecil sulfato de sódio
T (%)	Transmitância (%)
TAC	Tacrolimus
Tg	Temperatura de Transição Vítrea
TGA	Análise termogravimétrica
TK	Tirosino quinose
TrK	Receptor tirosina quinase
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UNISINOS	Universidade do Vale do Rio dos Sinos
σ	Condutividade (S/cm)
μm	Micrometro

RESUMO

ALVIM VALENTE, Cristhiane. **Síntese de nanofibras de polipirrol para potencial aplicação em conduto biodegradável para regeneração nervosa.** Porto Alegre. 2014. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

Lesões dos nervos periféricos por acidentes de trabalho ou doméstico são comuns e suportes de polímeros biodegradáveis com função estrutural temporária para auxiliarem na regeneração de tecidos vivos lesados vêm sendo explorados. Polímeros condutores, como o polipirrol (PPy), também têm sido investigados devido facilidade de síntese e biocompatibilidade. Condutos Artificiais de Orientação Neural multifuncional com fatores de crescimento (FC) vêm sendo estudados para aperfeiçoar a regeneração de feridas em nervos periféricos. O objetivo principal deste trabalho é preparar compósitos poliméricos de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) - (PLGA) com nanofibras de PPy capazes de atuarem como conduto guia na regeneração de nervos periféricos. Nanofibras de PPy foram sintetizadas via polimerização química oxidativa com diferentes agentes dopantes. Filmes de PLGA/nanofibras PPy/Tacromilus (FK506) foram preparados pelo método do sanduíche por evaporação do solvente. As nanofibras de PPy foram caracterizadas por FTIR, MEV, espectroscopia de impedância elétrica e TGA. Também foi avaliada a degradação *in vitro* dos filmes compósitos de PLGA/PPy. As nanofibras de PPy com condutividade elétrica de $8 \cdot 10^{-4}$ S/cm foram obtidas com dopante ácido p-toluenosulfônico (APTS) na razão [dop]:[PPy] = 4 e na temperatura de 0°C. Filmes de PLGA/PPy-nanofibras apresentam morfologia superficial irregular fibrosa com poros aleatórios que podem servir de arcabouços para o crescimento celular. A degradação dos filmes PLGA/PPy não alteraram o pH do meio, houve aumento de espessuras e as perdas de massas ficaram na faixa de 7-21 % até os 28 dias de degradação avaliados. A adição das nanofibras favoreceu o processo de perda de massa cerca de 4% para os filmes PLGA/PPy mais espessos ($\geq 0,6$ g de PLGA) e 6% para filmes mais finos (0,2 g de PLGA) até os 28 dias de degradação.

Palavras-Chaves: nanofibras de polipirrol; nervos periféricos; poli (ácido láctico-co-ácido glicólico); nanocompósito.

ABSTRACT

ALVIM VALENTE, Cristhiane. **Synthesis of polypyrrole nanofibers for potential application in biodegradable conduit for nerve regeneration.** Porto Alegre. 2014. Master. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Injury of peripheral nerves of accidents at work or home are common carriers and scaffolds of biodegradable polymers with temporary structural function to assist in the regeneration of damaged living tissue are being explored. Conducting polymers such as polypyrrole (PPy), have also been explored because of biocompatibility to various cell types and ease of synthesis. Artificial Nerve Guidance Conduits with multifunctional growth factors (GF) have been studied to improve the regeneration of injured peripheral nerves. The main objective is to prepare polymer composites of poly (lactic - co - glycolic acid) - (PLGA) with PPy nanofibers able to act as a conduit in peripheral nerve regeneration. PPy nanofibers were synthesized via chemical oxidative polymerization with different dopants. Films PLGA / nanofiber PPy / tacrolimus (FK506) were prepared by sandwich solvent casting method. The PPy nanofibers were characterized by FTIR, SEM, electrical impedance spectroscopy and TGA. *In vitro* degradation of PLGA/PPy composite films was also evaluated. PPy nanofibers of electrically conductive $8 \cdot 10^{-4}$ S / cm were obtained with dopant p-toluenesulfonic acid (PTSA) in the ratio [dop]: [Py] = 4 and 0 ° C. Films PLGA / PPy-nanofibers exhibit irregular surface morphology with voids that can serve as frameworks for cell growth guided. The degradation of PLGA / PPy films did not alter the pH of the buffer solution, an increase of thickness and mass loss was in the range of 7-21% until 28 days of degradation reviews. The addition of nanofibers favored the process of mass loss of about 4% for the PLGA / PPy thicker (≥ 0.6 g of PLGA) films and 6% for thinner films (0.2 g PLGA) until 28 days degradation.

Key-words: polypyrrole nanofibers, peripheral nerves, poly (lactic-co-glycolic acid); nanocomposite.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem ocorrido um vasto progresso no campo da nanotecnologia e um significativo desenvolvimento em nanoestruturas de uma dimensão (1D) com propriedades em nanoescala e escala molecular como, por exemplo, os nanotubos de carbono, os nanotubos/fios de semicondutores inorgânicos e metálicos, nanofibras/tubos de polímeros conjugados, etc (Tran et al., 2007; Long et al., 2011). Essas nanoestruturas têm provocado profundos impactos nas mais diferentes áreas da ciência devido às suas potenciais aplicações na nanoeletrônica ou eletrônica molecular, em nanodispositivos e sistemas, materiais nanocompósitos, bio-nanotecnologia e medicina (Long et al., 2011). Os polímeros semicondutores e metálicos são a quarta geração de materiais poliméricos, que também podem ser chamados de polímeros condutores (PCs) ou metais orgânicos, ou ainda como polímeros condutores intrínsecos (PCIs) ou “metal sintético” (Zoppi e De Paoli, 1993; Long et al., 2011). Os PCs possuem um mecanismo especial de condução que lhes confere propriedades elétricas únicas, tais como o processo de dopagem reversível, propriedades eletroquímicas e processabilidade (Long et al., 2011). Nas últimas décadas estão sendo amplamente estudadas as nano estruturas 1D (nanotubos, nanofios, nanofibras) de PCs como o poliacetileno, a polianilina (PANI) e o polipirrol (PPy), pois com a diminuição da escala dos materiais, tanto a área de superfície e a energia de superfície são consideravelmente aumentadas, tornando-se cada vez mais úteis para as mais diversas aplicações industriais (Guimard et al., 2007; Goel et al., 2010; Long et al., 2011; Leung e Ko, 2011). Neste contexto, métodos de preparação de PCs nanoestruturados para obtê-los em forma de nanofibras, nanotubos, nanofitas, etc estão sendo amplamente investigados (Goel et al., 2010).

Os PCs têm chamado atenção para aplicações biomédicas, porque eles são capazes de auxiliar o deslocamento de sinais elétricos para os locais de destino (orgão-alvo) e podem, simultaneamente, fornecer suporte físico para o crescimento celular (Guimard et al., 2007; Lee et al., 2012). Em particular, o PPy e seus derivados têm sido explorados para utilização como materiais de engenharia de tecidos neurais devido a sua biocompatibilidade e facilidade de síntese (Guimard et al., 2007; Xia et al., 2011; Lee et al., 2012).

A lesão do nervo periférico é um problema clínico muito comum e muitas vezes leva à perda da função sensorial e motora, causando uma diminuição na qualidade de vida dos pacientes (Nan et al., 2012).

Os nervos periféricos são normalmente expostos a lesões físicas, que são geralmente causadas por algum acidente em consequência do aumento da violência urbana, dos acidentes de trânsito, acidentes profissionais e domésticos, lesões esportivas, desastres naturais ou por danos de guerra, entre outros traumas, bem como os de efeitos secundários iatrogênicos de cirurgia (Silva e Camargo, 2010; Gu et al., 2011). Cada vez mais estas lesões tornam-se frequentes na rotina dos atendimentos nas emergências dos hospitais e numerosas cirurgias são realizadas a cada ano na tentativa terapêutica de se conseguir a regeneração e a restauração da função do nervo danificado (Gu et al., 2011).

Entre os vários tipos de lesões do nervo periférico são os ferimentos de transecção que podem ter um impacto mais significativo na qualidade de vida dos pacientes, pois são os que resultam em grandes lacunas neurais onde o tronco do nervo é completamente interrompido (Gu et al., 2011). Apesar dos vários avanços tecnológicos, ainda hoje a reparação de nervos periféricos é um campo desafiador, pois os processos bioquímicos envolvidos na regeneração de lesões nervosas periféricas é de alta complexibilidade e os atuais tratamentos e técnicas disponíveis para a reconstrução de órgãos e tecidos lesados ainda necessitam de otimização para que possam ter melhores respostas e uma recuperação funcional completa do local ferido (Silva e Camargo, 2010; Gu et al., 2011).

A utilização de polímeros biodegradáveis e biocompatíveis capazes de atuar como suporte de orientação na regeneração nervosa tem sido uma abordagem promissora na área de Engenharia de Tecidos (Barbanti et al., 2005).

O poli ácido láctico-co- ácido glicólico (PLGA), tem sido um candidato polimérico biodegradável bastante atraente e explorado na fabricação de dispositivos para administração de fármacos e para aplicações na engenharia de tecidos, pois este polímero derivado do ácido láctico e ácido glicólico é biocompatível e possui uma ampla faixa de tempos de degradação, propriedades mecânicas ajustáveis e é aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para utilização em clínica humana (Jain, 2000; Makadia e Siegel, 2011).

A regeneração de nervos periféricos envolve um complexo desafio biológico de mecanismos mediados por numerosos sinais celulares e moleculares e o uso de fatores de crescimento (FC) está despertando grande interesse dos pesquisadores por sua atuação como moduladores celulares e efeitos bioquímicos únicos sobre a regeneração e restauração da função do nervo (Silva e Camargo, 2010; Sebben et al., 2011; Gu et al., 2011).

Os atuais tratamentos clínicos disponíveis, especialmente para lesões de grande extensão nervosa, ainda envolvem a utilização de auto-enxertos e suturas dessas lacunas; porém estes recursos são muitas vezes ineficientes devido à incompatibilidade de tamanhos entre os tecidos do doador e do receptor, formação de neuromas e pela perda de função do local doador (Lee et al., 2012).

A utilização de terapias utilizando os FC tem aumentado nos últimos anos porque a presença local dos FC são importantes no controle da sobrevivência, migração, proliferação e diferenciação de vários tipos celulares que estão envolvidos no processo de reparo tecidual (Gu et al., 2011). Os FC devem ser administrados de forma local para que possam atingir um efeito terapêutico mais adequado e para uma menor ocorrência de reações adversas e para isso estão em desenvolvimento muitos estudos que utilizam os FC combinados em condutos poliméricos sintéticos para auxiliarem na regeneração de nervos lesados (Sebben et al., 2011; Gu et al., 2011). A complexidade biológica envolvida no processo de regeneração nervosa faz com que outras moléculas bioativas com ações semelhantes aos FC também

estejam sendo investigadas. Os fármacos com ação neuroregenerativa e neuroprotetora são uma alternativa de substâncias bioativas bastante exploradas, por exemplo, o uso do Tacrolimus (FK506) no tratamento de lesões de nervos periféricos (Muramoto et al., 2003; Gu et al., 2011; Phan e Schuind, 2011). Portanto, o desenvolvimento de Conduitos Artificiais de Orientação Nervosa (do inglês *artificial nerve guidance conduits* - NGCs) associados às moléculas bioativas vem sendo uma alternativa bastante atraente e estudada, pois são materiais que proporcionam múltiplos estímulos, tais como: orientação de contato, atividade neurotrófica, porosidade e atividade elétrica, contribuindo para a regeneração de feridas em tecidos nervosos (Lee et al., 2012).

Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo preparar compósitos poliméricos de PLGA contendo nanofibras de polipirrol e o fármaco Tacrolimus (FK506) para auxiliarem como condutos guias na regeneração nervosa de nervos periféricos. A investigação da síntese e a preparação de condutos artificiais poliméricos se justificam quando se considera a simplicidade dos procedimentos envolvidos na síntese para obtenção das nanofibras de PPy e da evidência clínica que sugere que a nano e microtopografia incorporada aos “suportes” (do inglês *scaffolds*) (Barbanti et al., 2005) não se limita apenas a melhorar a regeneração de nervos periféricos, mas é um pré-requisito para a restauração significativa da função nervosa (Goel et al., 2010; Xia et al., 2011; Lee et al., 2012; Spivery et al., 2012).

2. OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo principal preparar compósitos poliméricos de PLGA com nanofibras de polipirrol capazes de atuarem como conduto guia na regeneração de nervos periféricos.

2.1. Objetivos Específicos

O objetivo principal divide-se nos objetivos específicos descritos a seguir:

- Sintetizar nanofibras de PPy via polimerização química oxidativa em meio aquoso e na presença de diferentes agentes dopantes;
- Caracterizar a morfologia, estrutura molecular, propriedades térmicas e elétricas das nanofibras de PPy preparadas;
- Preparar sistemas poliméricos de PLGA com nanofibras de PPy e o fármaco Tacrolimus (FK506) estruturado em forma de sanduíche pelo método da evaporação de solvente;
- Caracterizar a morfologia dos sistemas poliméricos formados;
- Avaliar o comportamento de degradação *in vitro* dos sistemas poliméricos preparados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo busca apresentar um relato da literatura sobre os elementos responsáveis pelo direcionamento da pesquisa a fim de auxiliar na compreensão de palavras-chaves que foram utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho.

3.1. Polipirrol (PPy)

A descoberta do poliacetileno dopado e os relatos sobre sua condutividade elétrica intrínseca na ordem de grandeza de alguns metais a temperatura ambiente fez surgir uma nova área de interesse: os polímeros condutores intrínsecos (PCIs) – polímeros que conduzem corrente elétrica sem a incorporação de cargas condutoras (Zoppi e De Paoli, 1993; Zoppi e De Paoli, 1995). Os PCIs são materiais orgânicos que apresentam propriedades elétricas e ópticas similares àquelas apresentadas pelos metais e semicondutores inorgânicos, e ao mesmo tempo exibem as propriedades atraentes dos polímeros convencionais, tais como a facilidade de síntese e flexibilidade no processamento (Guimard et al., 2007).

Os PCIs têm atraindo cada vez mais a atenção da comunidade científica devido as suas propriedades elétricas específicas e por apresentarem inúmeras aplicações no setor industrial de microeletrônicos, incluindo a tecnologia de bateria, dispositivos fotovoltaicos, diodos emissores de luz (LED), monitores eletrocromáticos e mais recentemente no campo biológico (Zoppi e De Paoli, 1995; Guimard et al., 2007).

A polianilina (PANI), o polipirrol (PPy) e o politiofeno são os PCIs que têm sido intensamente estudados nas últimas décadas, devido à sua alta condutividade elétrica e boa estabilidade ambiental. Entre os PCIs, os baseados em PPy têm atraído um interesse especial devido a alta condutividade elétrica, flexibilidade e

facilidade na síntese, por sua estabilidade ambiental e boas propriedades mecânicas, sendo um promissor candidato há várias aplicações industriais (Thiéblemont et al., 1993; Yang et al., 2002; Osmatová et al., 2003; Reza, 2006).

Os PCIs apresentam ligações simples e duplas alternados entre os átomos de carbono ao longo da cadeia polimérica, oferecendo um caminho para o fluxo de elétrons responsável pela boa condução elétrica (Rocha-Filho, 2000). A Figura 3.1 apresenta as estruturas de alguns dos PCIs mais estudados.

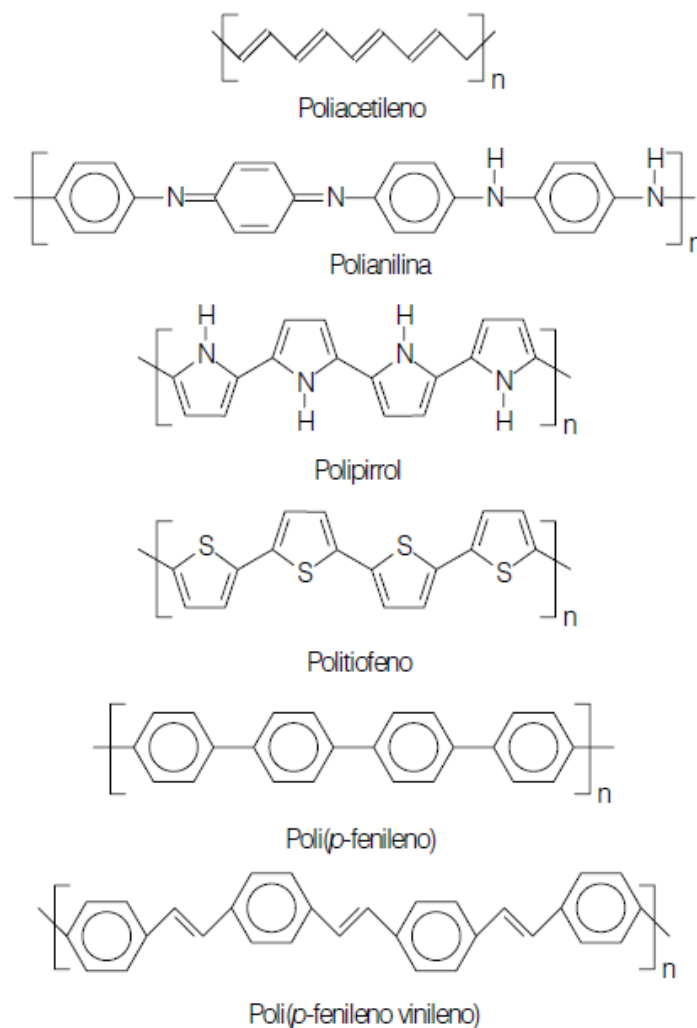


Figura 3.1. Estrutura dos polímeros condutores intrínsecos mais estudados. Adaptado de: (Rocha-Filho, 2000).

Em 1980 estudos com os PCs para fins biomédicos expandiu grandemente devido a descoberta de que estes materiais são compatíveis com muitas moléculas biológicas e cada vez mais investigações foram surgindo na área médica. Pesquisas

revelam que os PCs mostram-se, através de estimulação elétrica, com atividades de modulador celular sobre a adesão celular, migração, síntese de ácido desoxirribonucléico - ADN (do inglês *deoxyribonucleic acid* - DNA) e secreção de proteínas. Muitos destes estudos envolveram nervos, ossos, músculos e células cardíacas, que respondem a impulsos elétricos. Grande parte dos PCs apresentaram importantes vantagens para aplicações biomédicas tais como biocompatibilidade, capacidade de prender (aprisionar) e controladamente liberar moléculas biológicas (isto é, a dopagem reversível), capacidade de transferir cargas a partir de uma reação bioquímica e o potencial de alterar facilmente as suas propriedades elétricas, químicas e físicas para atender melhor a natureza da aplicação específica desejada. Estas características únicas são úteis em muitas aplicações biomédicas, tais como biossensores, engenharia de tecidos, sondas neurais, dispositivos de liberação de drogas e bio-actuadores (Guimard et al., 2007).

O fato de vários tecidos responderem a campos e estímulos elétricos faz dos PCs um atraente material para as inúmeras aplicações biológicas e médicas. Embora ainda existam muitas perguntas não respondidas, particularmente em relação aos mecanismos pelos quais a condução elétrica através dos PCs afeta as células, existem evidências convincentes para demonstrar o impacto significativo que os PCs estão começando a fazer no campo biomédico (Ateh et al., 2006; Guimard et al., 2007).

Os PCs podem ser sintetizados por diferentes técnicas, sendo por três métodos de polimerização: química, eletroquímica e fotoeletroquímica, os mais comuns (Kumar e Sharma, 1998). Dentre estes métodos, a síntese química é a mais utilizada e a forma mais vantajosa para as indústrias, pois permite a produção do material em maior escala (Faez et al., 2000; Guimard et al., 2007).

A polimerização química necessita de um agente oxidante, o qual quando introduzido no meio reacional provoca a oxidação do monômero para a geração de seu cátion-radical e ele por sua vez seguido de seu acoplamento para gerar dicátions (dímeros). A repetição deste processo gera uma propagação da cadeia (oligômeros) e a formação do polímero (Monika et al., 2010). As sínteses da polianilina e do polipirrol podem ser realizadas de maneiras semelhantes sob a ação

de um forte agente oxidante que deve possuir um potencial de redução suficiente para a oxidação do monômero (Faez et al., 2000; Hocevar, 2011).

Os métodos de polimerização do PPy mais usados são a síntese eletroquímica ou química, sendo que a oxidação do monômero pirrol (Py) pode ocorrer em vários solventes orgânicos e também em meio aquoso e por esse motivo destaca-se entre os demais PCs (Thiéblemont et al., 1993; Osmatová et al., 2003; Reza, 2006).

O método de polimerização química é o mais utilizado por ser um processo simples e rápido, sem a necessidade de instrumentos especiais como para o método eletroquímico. A polimerização química oxidativa do monômero por oxidantes químicos em solventes aquosos ou não aquosos é bastante usada quando se requer maiores quantidades de PPy e que são obtidos na forma sólida como um pó fino e preto (Reza, 2006; Kaynak e Foitzik, 2010).

Na literatura o cloreto férrico tem sido comentado como o melhor oxidante químico e a água o melhor solvente para a polimerização química no que diz respeito às características de condutividade elétrica mais favoráveis (Reza, 2006).

A Figura 3.2 ilustra a estequiometria global do PPy resultante da polimerização química do Py com o cloreto férrico como agente oxidante (Osmatová et al., 2003).

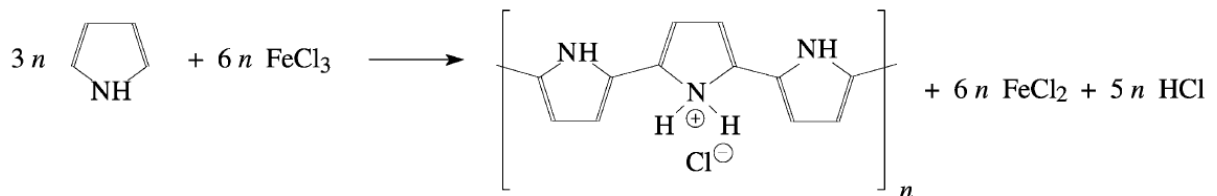


Figura 3.2. Estequiometria global da oxidação do pirrol com cloreto férrico como agente oxidante formando polipirrol. Para cada três unidades constituídas uma é protonada. Adaptado de: Osmatová et al., 2003.

Quando os polímeros são produzidos, seja pelo método químico ou eletroquímico por oxidação do monômero, há a incorporação concomitante de uma molécula dopante carregada negativamente (A^-). Ao selecionar moléculas bioativas como os dopantes carregados negativamente, os polímeros podem em seguida, serem modificados para uma funcionalidade específica, por meio da incorporação de proteínas, peptídeos ou de componentes da matriz extracelular (MEC) (Gilmore et al., 2009).

Além da variedade de reagentes e concentrações que podem ser utilizadas e modificadas, outros parâmetros de síntese tais como tempo, temperatura e pH, durante o processo de polimerização química ou eletroquímica também vão influenciar nas propriedades do polímero resultante e por isso vários estudos já foram feitos para avaliar as melhores condições experimentais de polimerização do PPy (Masuda e Asano, 2003; Kaynak e Foitzik, 2010).

Yang et al. (2002) estudaram a polimerização do pirrol na presença do ácido β -naftaleno sulfônico (β -ANS) e do p-toluenosulfonato de sódio (PTS) como agentes dopantes pelos métodos químico e eletroquímico. Os autores observaram que a morfologia (nanotubos, nanofibras), o tamanho e as propriedades elétricas das estruturas obtidas são fortemente dependentes da metodologia, da concentração do agente dopante e da relação molar entre o pirrol e o dopante utilizado.

A polimerização do pirrol na presença de surfactantes tais como ácido dodecilbenzeno sulfônico (ADBS), dodecilbenzenossulfonato de sódio (DBSNa), dodecil sulfato de sódio (SDS), ácido canforsulfônico (CSA), resultou no aumento da estabilidade térmica, do rendimento e da condutividade elétrica, além de influenciar na morfologia (partículas globulares, fibrilares, tubulares) do produto (Osmatová et al., 2003; Goel et al., 2010).

Os surfactantes podem afetar a preparação do PPy de três modos fundamentais: (1) agentes tensoativos aniônicos podem formar uma ligação iônica com o polycation PPy, incorporando-se na estrutura do polímero como um ânion de dopagem, (2) a parte hidrofóbica das moléculas de surfactante podem adsorver sobre o polímero condutor produzido, e (3) as micelas do surfactante, se presentes,

podem afetar a distribuição dos reagentes entre a fase micelar e aquosa, alterando assim o local e o curso da polimerização do pirrol (Osmatová et al., 2003).

A biocompatibilidade do PPy preparado por meios químicos e eletroquímicos foi avaliado por Wang et al. (2003) que mostrou que o PPy não apresentou qualquer evidência de toxicidade aguda e subaguda, reação pirogênica, hemólise, efeito alergênico e mutagênico, e as células de Schwann apresentaram uma melhor taxa de sobrevivência e proliferação quando em contato o PPy.

A biocompatibilidade não é uma propriedade intrínseca de um material, mas depende do ambiente biológico e da tolerabilidade que existe das interações específicas entre droga-polímero-tecido (Makadia e Siegel, 2011).

O estudo de Wang et al. (2003) também mostrou que a regeneração do nervo ciático de ratos utilizando-se tubo de silicone revestido com PPy foi melhor do que em tubo de silicone sem a presença do polímero. Os resultados do estudo mostraram uma boa biocompatibilidade do PPy com o tecido nervoso periférico de rato indicando que o PPy pode ser um bom material para ser aplicado na regeneração de nervos periféricos danificados (Wang et al., 2003).

Os PCs são bastante atrativos para a confecção de “suportes” na Engenharia de Tecidos, pois estão demonstrando boa capacidade para suportar e modular o crescimento de várias células, como as células nervosas e células ósseas (Ghasemi-Mobarakeh et al., 2011).

A biocompatibilidade e as propriedades funcionas versáteis do PPy vem contribuindo para uma nova geração de biomateriais e possibilitando seu uso na medicina de forma isolada ou em combinação com biopolímeros (Wang et al., 2003; Ateh et al., 2006; Martino et al., 2012).

Considerando este fato, é de interesse fundamental desenvolver métodos mais adequados para sintetizar estruturas de PPy mais controladas, definidas e homogêneas a fim de explorar melhor o potencial desse polímero e de outros PCs (Goel et al., 2010).

3.2. Biomateriais nano estruturados

As atuais terapias da medicina moderna envolvem principalmente a prevenção, manipulação e controle de doenças por meio de produtos químicos ou moléculas biológicas. A restauração e substituição direta de células e tecidos doentes estão se tornando uma possibilidade clínica devido aos avanços na área de biomateriais e atualmente são os polímeros os candidatos de maior interesse para o desenvolvimento dessa nova geração de materiais, os chamados biomateriais "mais inteligentes" (Hodgson et al., 1994; Dawson et al., 2008).

Os biomateriais podem ser definidos como substâncias de origens naturais ou sintéticas que são toleradas de forma transitória ou permanente pelos diversos tecidos que constituem os órgãos dos seres vivos. Eles são utilizados como um todo ou parte de um sistema que trata, restaura ou substituiu algum tecido, órgão ou função do corpo, ou ainda como material viável utilizado em um dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos (Jahno, 2005).

O avanço na área de biomateriais está diretamente ligado ao domínio e crescimento da nanotecnologia, pois é uma área de pesquisa que está revolucionando o meio científico e gerando novas expectativas tecnológicas, por exemplo, o desenvolvimento de nanomateriais impulsionada pela possibilidade de se obter novas ou melhores propriedades com a diminuição da escala dos materiais (Duran et al., 2006; Leung e Ko, 2011).

Os nanomateriais, principalmente para fins de aplicações em campos biológicos, estão sendo bastante estudados porque em escala nanométrica exibem uma elevada área superficial, maior reatividade química e uma melhor capacidade de penetração nas células em comparação com os seus homólogos volumosos (Kim et al., 2011).

Diferentes nanosistemas inteligentes podem ser desenvolvidos com base em polímeros biodegradáveis, possibilitando melhorias no valor terapêutico de várias moléculas bioativas solúveis e não solúveis em água, melhorando a biodisponibilidade, a solubilidade e o tempo de retenção (Martino et al., 2012). A degradação é conseqüentemente o mecanismo para a liberação das moléculas e

que podem ser moduladas pelas propriedades do polímero, tais como peso molecular, composição do polímero ou copolímero e da cristalinidade (Monika et al., 2010; Martino et al., 2012). Nanosistemas inteligentes poliméricos estão sendo explorados, principalmente, com o propósito de transportar vários fármacos ou moléculas ativas para liberá-los nos sítios de interesse através de alterações conformacionais em resposta a pequenos estímulos ambientais, tais como: temperatura, força iônica, pH, luz ou do campo eletromagnético, oferecendo promessas de melhorias revolucionárias em várias áreas como em engenharia de tecidos, diagnóstico e sistemas de liberação de fármacos específicos (Martino et al., 2012).

Afirma-se em um relatório que as oportunidades comerciais para os materiais nanoestruturados em aplicações biomédicas são estimados como sendo da ordem de 180 bilhões de dólares americanos em 2015 (Lu e Ding, 2008).

Os “Suportes” e demais estruturas de aplicação biomédica podem ser definidos como uma estrutura artificial que deve imitar a estrutura morfológica e a função do tecido circundante. Por isso a morfologia dos “suportes” em termos de interconectividade, tamanho de poros e forma são pontos-chave para uma melhor interação célula-biomaterial (Barbanti et al., 2005; Martino et al., 2012).

Uma estratégia que vem sendo utilizada na busca de melhores resultados terapêuticos é a combinação de diferentes nanoestruturas, afim de integrar as funções dos componentes e obter-se materiais multifuncionais ou sistemas multi-híbridos com adaptação de bioatividade, integridade estrutural e mecânica, bem como modificações na condutividade elétrica. Misra et al. (2007) pela primeira vez, incorporou nanotubos de carbono de multi-paredes (MWCNT) num composto biorreabsorvível e bioativo. O Poli-3-hidroxibutirato (P(3HB)) sendo a matriz polimérica biorreabsorvível e as partículas esféricas de Bioglass® (derivado de uma massa fundida de pó de vidro) como o componente bioativo foram combinados com os MWCNT para o desenvolvimento de um “suporte” nanocompósito ternário devido a combinação de três materiais diferentes. A adição de MWCNTs em materiais compósitos bioativos proporciona um novo material altamente condutor, pois os compósitos de MWCNT obedecem a lei de Ohm e exibem uma condução ôhmica clássica (Misra et al., 2007; Martino et al., 2012).

Nanotubos, nanofios, nanofitas, nanofibras de PCs podem ser preparados por métodos físicos, como eletrospiação (do inglês *electrospinning*), e vias químicas, tais como síntese guiada por molde físico duro (do inglês *hard physical template-guided synthesis*) e síntese de molde químico mole (do inglês *soft chemical template synthesis*), por exemplo, a polimerização interfacial, o método isento de molde (do inglês *template-free*), a polimerização diluída, a polimerização em emulsão inversa, reações de mistura rápida etc., e uma variedade de técnicas de litografia (Long et al., 2011).

As fibras poliméricas estão se tornando cada vez mais atraentes quando os diâmetros das fibras diminuem a nanômetros devido às diversas características que são oferecidas devido a pequena escala, tais como: elevada área e energia de superfície em relação ao volume, alta porosidade, flexibilidade em funcionalidades de superfície e propriedades mecânicas superiores, permitindo uma aderência melhorada do material com as células, proteínas e fármacos (Lu e Ding, 2008; Leung e Ko, 2011).

As tecnologias para a fabricação de nanofibras tem chamado cada vez mais a atenção dos pesquisadores como uma solução potencial para os desafios na área biomédica, pois de um ponto de vista estrutural, quase todos os tecidos e órgãos humanos são depositados e organizados em formas ou estruturas de nanofibras, como pele, ossos, nervos, dentina, colágeno e cartilagem (Lu e Ding, 2008; Leung e Ko, 2011). Em geral, fibra é uma estrutura com importante semelhança aos tecidos biológicos naturais e essa semelhança pode vir a favorecer o tratamento e a aceitação do material pelo organismo (Leung e Ko, 2011; Spivery et al., 2012).

A Figura 3.3 ilustra a estrutura de um nervo periférico formado pelo conjunto de fibras nervosas envoltas por tecido conjuntivo.

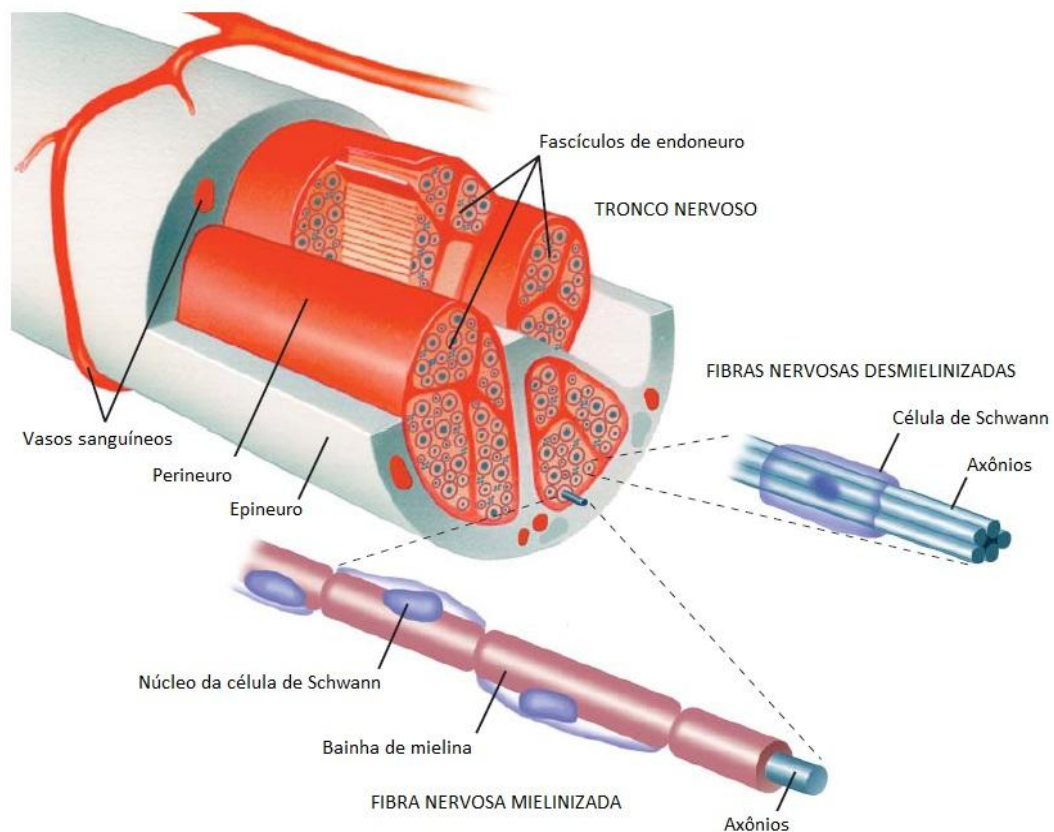


Figura 3.3. Estrutura de um nervo periférico formado pelo conjunto de fibras nervosas envoltas por tecido conjuntivo. Fonte: MedicinaNET

Na Engenharia de Tecidos as nanofibras são as estruturas mais desejáveis para as aplicações biomédicas devido a nanofibra ser a estrutura mais próxima de imitar a estrutura nativa de uma MEC, que é composta principalmente de nanofibras de colágeno (Yoo et al., 2009; Leung e Ko, 2011).

O interesse em nanofibras não se destina apenas para as aplicações biomédicas (liberação de fármacos, engenharia de tecidos e cosméticos), estende-se a materiais funcionais e dispositivos (compósitos reforçados, filtros, roupas de proteção, tecidos inteligentes) como também na área de energia e eletrônica (baterias, pilhas, capacitores, sensores, catalisadores) (Lu e Ding, 2008).

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

Vários biomateriais de polímeros biodegradáveis, biocerâmicas e biocompósitos são fabricados como “suportes” para a aplicação em regeneração de tecidos. O Poli (ácido glicólico) (PGA), poli (ácido láctico) (PLA) e os seus

copolímeros de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) são os materiais mais frequentemente utilizados na fabricação dos “suportes” para o transplante de células na Engenharia de Tecidos (Sultana e Khan, 2012).

O copolímero PLGA faz parte da família dos polímeros biodegradáveis com boa resistência mecânica e altamente biocompatível e por isso tem sido bastante estudado e utilizado como um veículo transportador de fármacos, proteínas e outras macromoléculas, tais como ADN, ácido ribonucléico – ARN (do inglês *ribonucleic acid - RNA*) e peptídeos (Jain, 2000; Makadia e Siegel, 2011).

Desde os anos de 1960 os pesquisadores têm explorado a utilidade dos polímeros PLA / PGA e os bons resultados como materiais de sutura fizeram-lhes candidatos atraentes para outras aplicações biomédicas, como na reconstrução de ligamentos, substituição traqueal, herniorrafia ventral, curativos cirúrgicos, enxertos vasculares, reparações nervosas, odontológicas e de fraturas (Jain, 2000).

A Figura 3.4 ilustra o copolímero PLGA constituído pelas suas unidades monoméricas de PGA e PLA. O ácido láctico é mais hidrofóbico que o ácido glicólico e, portanto, os copolímeros de PLGA ricos em ácido láctico são menos hidrofílicos, absorvem menos água, e, conseqüentemente, degradam-se mais lentamente (Jain, 2000).

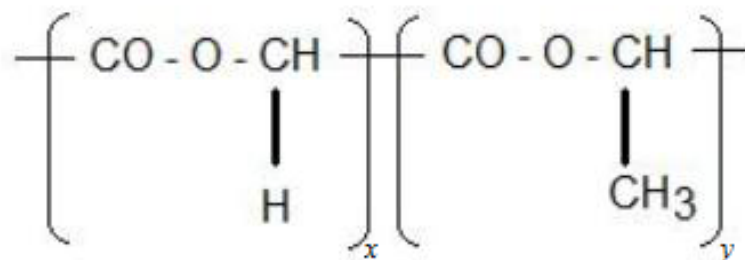


Figura 3.4. Estrutura química de PLGA (x é o número de unidades de PGA e y é o número de unidades de PLA. Fonte: Adaptado de (Duran et al., 2006; Makadia e Siegel, 2011).

O processo de degradação do PLGA é por hidrólise e não envolve atividade enzimática. Uma importante vantagem deste copolímero é poder variar a proporção entre suas unidades monoméricas e assim variar e ajustar o tempo de degradação do material conforme a necessidade e especificidade da aplicação (Jain, 2000; Rezende et al., 2005; Motta e Duek, 2006).

Tanto “*in vitro*” como em “*in vivo*” o PLGA sofre degradação em ambiente aquoso (degradação hidrolítica (hidrólise) ou biodegradação) através da clivagem das suas ligações ésteres hidrolisáveis ao longo da cadeia (Jain, 2000; Wu e Wang, 2001). Na Figura 3.5 está ilustrada a hidrólise de um grupo éster.



Figura 3.5. Reação de hidrólise de um grupo éster. Fonte: Duran et al., 2006.

O PLGA no seu processo de degradação é quebrado em unidades menores por hidrólise e seus produtos, ácido láctico e ácido glicólico, são eliminados do corpo por vias metabólicas (Jr Santos e Wada, 2007). O ácido láctico entra no ciclo do ácido tricarboxílico (ciclo de Krebs) e sofre metabolização para ser eliminado como dióxido de carbono e água (Jain, 2000). O ácido glicólico é excretado via renal, mas eventualmente entra no ciclo de Krebs para ser eliminado como dióxido de carbono e água (Jain, 2000; Barbanti et al., 2005; Jr Santos e Wada, 2007). A Figura 3.6 ilustra o mecanismo de degradação dos produtos gerados da hidrólise do PLGA.

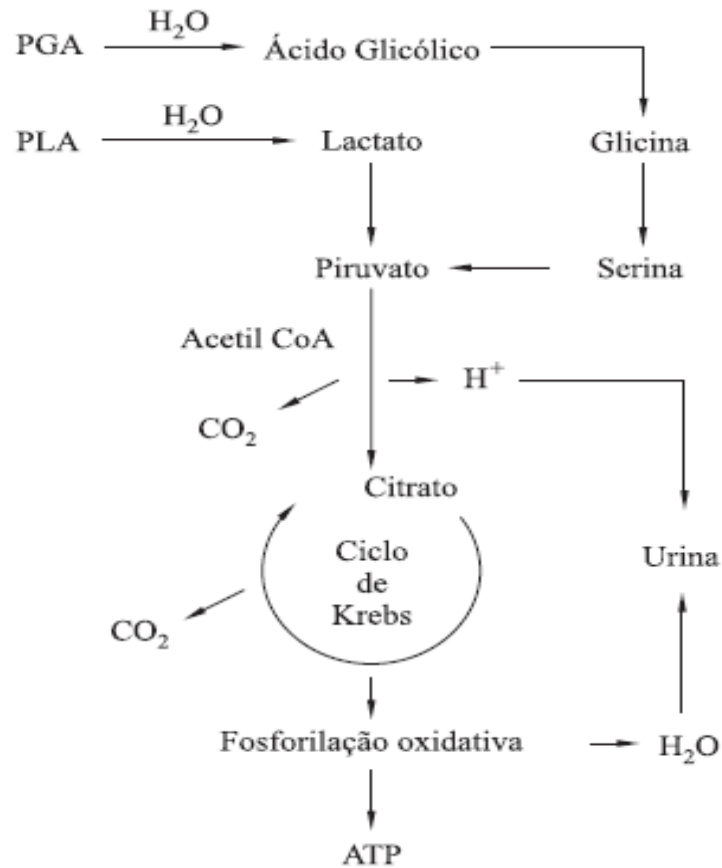


Figura 3.6. Mecanismo da rota metabólica dos produtos de degradação gerados por hidrólise do PLGA. Adaptado de: Barbanti et al., 2005.

A velocidade de degradação de um polímero pode variar de dias a meses e depende de alguns fatores, como da sua estrutura e composição química, distribuição da massa molecular, presença de monômeros e oligômeros, tamanhos e forma da superfície do sistema, morfologia dos componentes do sistema (amorfo, semicristalino, cristalino), local de implantação do sistema e mecanismo de hidrólise (Fialho et al., 2003; Yoshioka et al., 2010). Logo, a taxa de biodegradação dos copolímeros de PLGA é dependente da proporção molar do PLA e PGA na cadeia do polímero, peso molecular do polímero, grau de cristalinidade e da temperatura de transição vítrea (T_g) do polímero (Jain, 2000; Yoshioka et al., 2010).

O PLA e PLGA apresentam uma T_g que se encontra acima da fisiológica (37°C) e, nessa condição, eles se encontram na forma cristalina. Desse modo, a cadeia se apresenta como uma estrutura relativamente rígida, proporcionando uma força mecânica significativa, permitindo que sejam usados na formulação de

suportes que exijam um maior desempenho mecânico. O PGA apresenta uma Tg inferior ou até mesmo próxima à corporal, sendo este um fator que o torna inadequado para a utilização em sistemas de liberação de fármacos quando se necessita de um elevado tempo para obter-se o efeito terapêutico desejado, pois ele é rápido e facilmente degradado pelo organismo. A Tg é um fator importante na velocidade de degradação dos polímeros, pois está relacionada ao grau de cristalinidade e à organização das cadeias poliméricas. Portanto, o polímero que apresenta uma maior Tg, geralmente se degrada mais lentamente (Fialho et al., 2003; Yoshioka et al., 2010).

Essas características distintas dos monômeros constituintes do PLGA o fazem um atraente copolímero para a fabricação de “suportes” com os mais diferentes tempos de degradação, proporcionando materiais de rápida até lenta degradação, e assim, permitindo explorar o melhor tempo para o efeito terapêutico do “suporte” conforme cada necessidade clínica (Fialho et al., 2003; Barbanti et al., 2005).

A ideia dos implantes de biomateriais de polímeros biodegradáveis, como os de PLGA, é permitir que as células cresçam e se organizem enquanto o polímero se degrada e os produtos secundários biocompatíveis e toxicologicamente seguros são eliminados do organismo pelas vias metabólicas, levando a uma substituição natural do suporte por novo tecido no sítio lesado e assim evitando a inserção de implantes que venham ter a necessidade de uma nova intervenção cirúrgica para sua remoção pós-efeito terapêutico desejado ou por motivos de reações inflamatórias indesejáveis (Jain, 2000; Sousa et al., 2000; Rezende et al., 2005).

O Quadro 3.1 apresenta um resumo das propriedades que são importantes e necessárias no planejamento de biomateriais biodegradáveis (Mayer et al., 2000).

Quadro 3.1. Resumo das propriedades importantes e necessárias no planejamento de biomateriais biodegradáveis.

Biomaterial biodegradável
<ul style="list-style-type: none"> • Atóxico e livre de toxina, com o objetivo de minimizar indesejadas respostas de corpo estranho sobre a implantação. • Tempo de degradação deverão ser compatíveis para a regeneração ou o tempo de terapia necessário. • Propriedades mecânicas devem ser adequadas para a tarefa desejada. • Produtos de degradação devem ser facilmente eliminados do corpo e não devem ser tóxicos. • Material deve ser facilmente processado para permitir a adaptação para a tarefa desejada.

Fonte: Mayer et al., 2000.

3.4. Engenharia de Tecidos

Os atuais tratamentos disponíveis para a regeneração tecidual geralmente envolvem auto-enxertos e aloenxertos, sendo preferencialmente os auto-enxertos o tratamento de escolha devido à sua origem genética idêntica. A desvantagem desta técnica é a sua dependência sob a disponibilidade das áreas doadoras, tornando-se um grande desafio quando ocorrem casos de grandes áreas lesadas. Outra problemática é a compatibilidade de tamanho entre a área doadora e receptora, sendo que o sítio doador sempre sofre danos devido a remoção de tecidos saudáveis. Para os aloenxertos a desvantagem é a grande chance de serem rejeitados pelo organismo receptor devido as respostas imunitárias contra a introdução de um material de origem genética diferente (Leung e Ko, 2011).

A Engenharia de Tecidos é um campo interdisciplinar que busca novos conhecimentos e técnicas para a reconstrução de órgãos e tecidos, juntamente com outras áreas de nicho, tais como neuroproteses, biossensores e liberação de drogas (Barbanti et al., 2005; Guimard et al., 2007).

Os desafios e as dificuldades na Engenharia Tecidual é bastante ampla, sendo necessário o desenvolvimento de novas tecnologias para a regeneração de tecidos através da obtenção de materiais biocompatíveis que sirvam de “suporte” e que possam atuar como um hospedeiro temporário para que as células do tecido

danificado possam se anexarem, proliferarem, e diferenciar-se no tecido específico, aquele que necessita ser reparado (Leung e Ko, 2011).

Os avanços na área da biologia molecular combinados com os relatos biofísicos das propriedades de superfície dos materiais vem contribuindo para uma melhor compreensão das interações entre células, superfície e microambientes (poros) desses novos suportes; porém é um campo complexo que ainda precisa ser melhor investigado (Guimard et al., 2007).

A Engenharia de Tecidos ainda não possui técnicas e/ou fabricação padrão de materiais adequados para facilitar, por exemplo, o crescimento direcional de nervos. A terapia mais atual para a regeneração de nervos periféricos consiste na utilização de um conduto/tubulação que serve como um guia de orientação para o crescimento do nervo lesado, proporcionando uma via para auxiliar na sua regeneração, o chamado Conduto Artificial de Orientação Nervosa (NGC) para a reparação e regeneração de nervos periféricos (Martino et al., 2012; Lee et al., 2012). A primeira geração desses condutos artificiais disponíveis para utilização na clínica foram os tubos de silicone não reabsorvíveis e que ainda hoje são bastante utilizados por falta de alternativas terapêuticas mais acessíveis e pela escassez de novos produtos para este tipo de lesão (Nectow et al., 2012).

Atualmente no que diz respeito ao crescimento de tecidos em bio-reatores artificiais e temporários são os polímeros biodegradáveis que estão sendo explorados e utilizados para o desenvolvimento de uma nova geração de “suportes” de apoio celular, podendo ser de biopolímeros de origem sintética ou natural, tais como PLA, PGA, PLGA, PCL (Poli (ϵ -caprolactona)), colágeno, fibrina e quitosana (Martino et al., 2012; Nectow et al., 2012).

Apesar da atraente atividade elétrica dos PCs sempre existe o desejo de se aperfeiçoar a obtenção e a preparação de um material, principalmente quando se visa uma aplicação específica. Para otimizar as propriedades biológicas dos PCs está sendo adotado a estratégia de incorporação de moléculas bioativas em suas estruturas, tais como os fatores de crescimento, que podem ter efeitos benéficos sobre o comportamento celular (Ateh et al., 2006; Guimard et al., 2007).

Chun-Yang Wang et al. (2011) demonstraram que um suporte com nanofibras alinhadas de fibroína de seda misturadas com uma blenda de nanofibras de Poli (ácido L-láctico- co- ϵ -caprolactona) (P (LLA-CL)), promoveram uma regeneração do nervo periférico significativamente melhor do que quando na presença do alinhado puro de P (LLA-CL).

Cada vez mais biomoléculas ativas estão sendo utilizadas tais como as enzimas peroxidase de rábano, fosforilases, lactato desidrogenase polifenoloxidase, glicose oxidase e desaminases que foram presas em filmes de PCs para aperfeiçoarem o funcionamento de biossensores. Tais moléculas podem ser incorporadas através de algumas técnicas que incluem a adsorção física, aprisionamento, dopagem e ligação covalente (Guimard et al., 2007).

A adsorção física é a técnica mais simples, mas a sua desvantagem é que a molécula adsorvida pode dissociar-se e deixar o material "inativo". O aprisionamento é outro método não-covalente que pode ser conseguido tendo a molécula desejada presente na solução do monômero durante a síntese. O processo de dopagem dos PCs também pode ser explorado para modificar os PCs de forma não covalente, desde que o dopante selecionado esteja carregado. Para uma funcionalização mais permanente dos PCs os métodos covalentes são mais utilizados. O monômero pode ser sintetizado com grupos funcionais desejados e, em seguida polimerizado. Pós-polimerização a modificação covalente é possível, porém é mais difícil para os polímeros insolúveis. A funcionalização de PCs com diferentes biomoléculas está permitindo a obtenção de PCs com ação melhorada devido à presença de sensíveis elementos biológicos que lhes conferem a capacidade de "ligar" e "desligar" diferentes vias de sinalizações, melhorando a sua ação de adesão e proliferação de uma variedade de tipos de células e da sua biocompatibilidade (Guimard et al., 2007).

Adaptar propriedades específicas dos materiais, em volume e superfície, poderia fornecer novas soluções para os sistemas de Engenharia de Tecidos, como o controle de montagem celular em micro e nano superfícies padronizadas, liberação de fármacos (polímeros biodegradáveis), liberação do tecido (polímeros termossensíveis) e biossensoriamento integrado (polímeros eletroativos). Além disso, estes materiais proporcionam o avanço em estudos de base fundamental

relacionados com as interações de superfície de tecidos e materiais. Em reconhecimento a complexibilidade da área médica e tantas exigências especiais, pesquisadores estão envolvidos com classes únicas de materiais para uso experimental em aplicações biológicas e os PCs, como o PPy, oferecem uma nova classe de material a este respeito (Ateh et al., 2006).

3.4.1. Fatores de Crescimento

Os fatores de crescimento (FC) referem-se a uma variedade de proteínas e polipeptídios que possuem a capacidade de regular a proliferação e diferenciação celular, sendo responsáveis por promover o reparo tecidual após alguma lesão (Gu et al., 2011).

Os fatores neurotróficos (FN) ou neurotrofinas são uma importante classe de FC de uma família de polipeptídios que auxiliam no processo de sobrevivência de populações neuronais distintas, estimulando e controlando a neurogênese (Johnson et al., 2008; Gu et al., 2011). As neurotrofinas estão restritas a quatro fatores estruturalmente relacionados: fator de crescimento do nervo (NGF), fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), neurotrofina - 3 (NT-3) e neurotrofina - 4/5 (NT-4/5). As neurotrofinas promovem uma série de respostas neurais por receptores de ligação específicos da superfície celular, que geralmente são classificados em duas classes: p75 e da família do receptor tirosina quinase (TrK) (Gu et al., 2011).

Muitos estudos estão descrevendo a importância do papel de FN na sobrevivência neuronal, tanto durante o desenvolvimento e após a lesão tecidual (Allodi, 2012).

No estado normal tais fatores são na sua maioria sintetizados por tecidos alvo e são utilizados para a viabilidade dos corpos de células nervosas. Após a lesão do nervo, os FN são sintetizados por células não-neuronais (células de Schwann e fibroblastos) no tronco do nervo e agem para apoiar a sobrevivência e o crescimento dos axônios na regeneração e reinervação de órgãos-alvo desnervados (Johnson et al., 2008; Allodi, 2012).

A regeneração do nervo é modulada por diversas interações complexas entre as células, moléculas da MEC e dos FC. A presença localizada dos FC nos sítios de

lesão nervosa exerce um papel vital e complexo para controlar a sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação de vários tipos de células envolvidas no processo de regeneração nervosa (Gu et al., 2011).

Um corpo de prova indicou que após a lesão do nervo os fatores de crescimento endógenos secretados por células neurais no coto distal do nervo podem apoiar a regeneração do axônio, mas que esta ação natural de apoio não é sustentada indefinidamente devido a um declínio evidente com o tempo na produção dos fatores de crescimento no interior celular. Portanto, o fornecimento de FC no local da lesão de forma contínua e controlada torna-se uma preocupação importante na pesquisa. Além dos efeitos neurotróficos que são indiretamente fornecidos por células de suporte no interior do “suporte” neural, o uso de fatores de crescimento exógenos integrados ao suporte neural podem servir como um componente de base para a Engenharia de Tecidos Nervosos a fim de suprir a ineficiência da produção endógena (Gu et al., 2011).

Estudos apontam efeitos favoráveis ao uso de fatores de crescimento para a regeneração de nervo periférico, porém os resultados são variáveis e dependentes do tipo e da dose de fatores utilizados. Neste sentido, muitos grupos de pesquisa fazem a utilização conjunta de dois ou mais fatores de crescimento na tentativa de obter efeitos sinérgicos sobre a regeneração do nervo periférico, e tais fatos já foram evidenciados por alguns estudos (Gu et al., 2011).

A complexidade e a importância dos sinais bioquímicos que abrangem a Engenharia de Tecidos para o desenvolvimento de enxertos artificiais de tecidos nervosos, fazem com que outras moléculas bioativas que possuam ações semelhantes aos fatores neurotróficos típicos e naturais, também estejam sendo testados e avaliados quanto à sua possibilidade de servirem como aditivos aos “suportes” (Gu et al., 2011).

Apesar de evidências favoráveis ao uso de FC ainda existem numerosos problemas associados com as aplicações clínicas dos FC, pois ainda não há um uso adequado para fins terapêuticos humanos. Por isso há um grande empenho de pesquisadores para desenvolver novos medicamentos artificiais ou agentes modelos utilizando-se os fatores de crescimento e cada vez mais se faz necessário o

emprego de fármacos com atividade neurotrófica, mas que possam exibir melhores propriedades farmacocinéticas (Gu et al., 2011).

3.4.2. Tacrolimus (FK506)

O tacrolimus (TAC), também denominado FK506, foi descoberto por pesquisadores japoneses a partir do caldo de fermentação da bactéria *Streptomyces tsukubaensis* encontrada no solo da cidade de Tsukuba, no Japão. (Kino et al., 1987; Muramoto et al., 2003; Pereira, 2006).

Sua fórmula e massa molecular foi determinada como $C_{44}H_{69}NO_{12}.H_2O$ e 822,05 g/mol, respectivamente. É uma molécula que apresenta propriedades imunossupressoras, pois suprimiu respostas imunes tanto em estudos *in vitro* como *in vivo* com ratos (Kino et al., 1987; Ardenghi e Ceresér, 2000; Gold et al., 2004).

O agente imunossupressor FK506 é uma molécula aprovada pelo FDA para utilização clínica e está sendo bastante empregada no controle e prevenção da rejeição de aloenxertos, tal como é com a ciclosporina A (CsA), pois atua no bloqueio da ativação de linfócitos e outras células do sistema imunológico (Gold, 1997; Muramoto et al., 2003; Kaminska et al., 2004).

O tacrolimus possui propriedades imunossupressoras potentes, porém a molécula FK506 quando sozinha é inativa e necessita ligar-se a sua proteína de ligação intracelular, a proteína 12 ligadora de FK506 (FKBP-12, ou inumofilina) formando assim um complexo para exercer seu efeito terapêutico. Esse complexo FK506-FKBP inibe a atividade da calcineurina (ou serina/treonina proteína fosfatase 2B), base da ação imunossupressora do FK506 (Gold et al., 2004; Kaminska et al., 2004). O complexo FK506-FKBP ao inibir a calcineurina não permite que ela seja capaz de desfosforilar o NF-AT de células T (do inglês *Nuclear factor of activated T cells*), um fator de transcrição que ativa o gene da IL-2 (interleucina-2) e de outras citocinas inflamatórias. Assim, não havendo ativação do NF-AT, não ocorre a produção de IL-2 e, conseqüentemente, a ativação da célula T para proliferação de células T específicas (Costa et al., 2006; Morais de Souza, 2012).

A Figura 3.7 ilustra o mecanismo de ação da síntese de citocinas na célula T e a ação do FK506 inibindo esta síntese pela inibição da calcineurina (Costa et al., 2006; Morais de Souza, 2012).

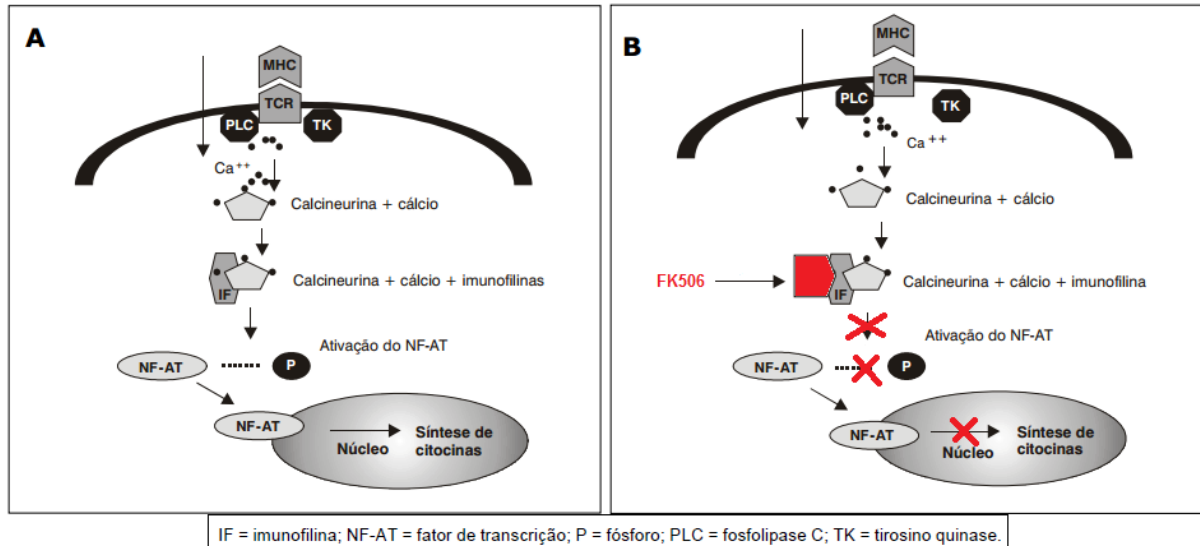


Figura 3.7. Mecanismo de ativação do fator de transcrição NF-AT via calcineurina na célula T (A) e mecanismo de ação do FK506 inibindo a função da calcineurina (B). Fonte: Adaptação de (Costa et al., 2006; Morais de Souza, 2012).

A descoberta de que as imunofilinas também estão presentes no sistema nervoso proporciona um novo nível de complexidade no processo de regulação da função neural. (Muramoto et al., 2003; Pereira, 2006).

Estudos mostram que a administração sistêmica dose- dependente de FK506 acelera a regeneração nervosa e a recuperação funcional do nervo ciático em ratos após lesão por esmagamento. O efeito parece resultar de um aumento da taxa de regeneração axonal e frequentemente o imunossupressor vem sendo utilizado com fins de efeitos neuroregenerativos, pois tem sido relatado efeitos neuroprotetores em modelos animais de isquemia cerebral focal e global, bem como em modelos de doenças neurodegenerativas (Muramoto et al., 2003). Os mecanismos neuroregenerativos e neuroprotetores de FK506 independem da sua atividade imunossupressora, o que sugere que o FK506 pode estimular a regeneração do nervo a doses mais baixas do que são necessários para induzir a imunossupressão; porém o mecanismo da ação neuroprotetora do FK506 não é totalmente compreendido (Kino et al., 1987; Muramoto et al., 2003; Gold et al., 2004).

A atividade imunossupressora do FK506 está relacionado com sua ligação com uma imunofilina (FKBP-12), conforme ilustrado na Figura 3.7; porém este caminho parece não ser o único envolvido nas suas propriedades neuroregenerativas, pois sabe-se que FK506 pode se ligar em outra imunofilina, como por exemplo a FKPB-52, levando a ativação de vários outros caminhos para seus efeitos terapêuticos. Um dos caminhos mais estudados é com relação ao aumento da síntese de GAP-43/B50, que estimula a atividade de progressão do cone de crescimento do axônio através da interação com os seus microfilamentos de actina. Outros caminhos também estão envolvidos, mas ainda não são claros. A ativação de várias outras vias bioquímicas que envolvem diferentes quinases e receptores que regulam o fluxo de cálcio intracelular podem também desempenhar um papel na transdução de sinal de fatores de crescimento. Ligante de imunofilina como o FK506, pode por vários caminhos complexos, aumentar o número e a maturidade dos axônios durante a regeneração (Gold et al., 2004; Phan e Schuind, 2011).

É muito importante a descoberta de novos fármacos com efeitos neuroprotetores e a compreensão do mecanismo a nível molecular que os envolvem e para atingir este objetivo se faz necessário estabelecer um modelo *in vitro* no qual o FK506 tenha ação protetora contra a morte celular neuronal, todavia estabelecer um modelo *in vitro* não é uma tarefa muito fácil. Além do FK506, outros ligantes para imunofilinas representa um importante campo de estudos para o desenvolvimento de uma nova classe de agentes terapêuticos e de novos tratamentos para uma variedade de distúrbios neurológicos (Muramoto et al., 2003; Gold et al., 2004). No presente estudo pretende-se preparar sistemas poliméricos de PLGA com nanofibras de PPy e o fármaco Tacrolimus na forma de filmes estruturados tipo sanduíche capazes de proporcionarem uma liberação local e controlada do fármaco FK506 através da degradação da matriz polimérica, sendo uma fonte contínua de estímulo para a regeneração axonal.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão abordadas as metodologias utilizadas para preparar as nanofibras de PPy, os filmes de PLGA com nanofibras de PPy e o fator de crescimento (FK506) e as técnicas para a caracterização das amostras. Também será apresentada a metodologia utilizada para avaliar a degradação hidrolítica dos filmes nanocompósitos preparados.

Os experimentos de síntese e preparação dos filmes foram realizados no Laboratório de Organometálicos - LOR/FAQUI/PUCRS e as caracterizações das amostras foram feitas no Laboratório de Espectroscopia/FAQUI/PUCRS, no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise - LabCEMM da PUCRS, no ITT FUSE - Instituto Tecnológico em Ensaios e Segurança Funcional da UNISINOS, no Centro de Microscopia Eletrônica - CME e no Laboratório de Microscopia Eletrônica do CNANO/UFRGS, ambos na Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.

O experimento de degradação *in vitro* foi realizado no Laboratório de Pesquisa de Habilidades Médicas da PUCRS.

As análises de TGA foram feitas no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica - LAMAT na UFRGS.

4.1. Materiais

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

Tabela 4.1. Caracterização dos reagentes utilizados.

Produto	Origem	Pureza
Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) – (PLGA Comercial)	PURAC (PLG8523; 85:15 L-Láctico:glicólico)	99,39%
Pirrol (Py)	Sigma- Aldrich	98%
Ácido p-toluenosulfônico (APTS)	Sigma- Aldrich	98,5%
p-toluenosulfonato 95% de sódio (PTS)	Sigma- Aldrich	95%
Ácido dodecilbenzenosulfônico (ADBS)	Sigma- Aldrich	90%
1-(2-carboxietil)pirrol (Py- COOH)	Sigma- Aldrich	97%
Ácido Clorídrico (HCl)	Vetec	37%
Clorofórmio (CHCl ₃)	SYNTH	99,8%
Diclorometano (CH ₂ Cl ₂)	Sigma- Aldrich	99,5%
Etanol (CH ₃ CH ₂ OH)	Sigma- Aldrich	99,5%
Cloreto Férrico (FeCl ₃)	Sigma- Aldrich	97%
Tacrolimus (FK506)	Sigma- Aldrich	98%
Solução tampão fostato salino (PBS)	Sigma- Aldrich	-----

Placas de vidro Petri de 5,6 cm de diâmetro foram usadas para a confecção dos filmes de todos os experimentos. Água deionizada e água destilada foram utilizadas ao longo das experiências.

O PLGA para a confecção dos filmes foi adquirido da empresa PURAC na forma de pellets sendo armazenado sob argônio e refrigeração (-15 °C). O copolímero PLGA utilizado neste trabalho possui maior quantidade de unidades monoméricas de PLA em relação ao PGA, contendo 85% de PLA e 15% de PGA. Com o fármaco Tacrolimus também se teve o cuidado do armazenamento sob-refrigeração (-15 °C).

4.2. Métodos

4.2.1. Síntese química do PPy

O monômero pirrol foi primeiramente destilado até obtenção do líquido incolor para a remoção de impurezas (Patil e Pandey, 2012). Os demais reagentes foram utilizados como recebidos.

As reações para obtenção de nanofibras de polipirrol ocorreram por meio da polimerização química oxidativa em meio aquoso a 0°C e na presença de diferentes agentes dopantes (Osmatová et al., 2003; Goel et al., 2010; Xia et al., 2011).

Os dopantes testados foram: ácido clorídrico (HCl), ácido p-toluenosulfônico monohidratado (APTS), ácido dodecilbenzenosulfônico (ADBS), p-toluenosulfonato de sódio (PTS). Foram avaliadas diferentes razões [dopante]:[monômero]. O agente oxidante para todas as sínteses foi o cloreto férrico (FeCl₃) e a razão molar [oxidante]:[monômero] foi de [1,7]:[1] (Xia et al., 2011).

O pirrol (0,5mL; $7,2 \cdot 10^{-3}$ mol) é dissolvido em 20 mL de meio aquoso com um determinado dopante sob agitação na temperatura de 0°C por 60 minutos. Esta mistura é chamada de solução A. Após adicionou-se, gota a gota, a solução aquosa de 5 mL contendo o agente oxidante, solução B. Ao término da adição da solução B a reação transcorre por 24h em repouso e banho de gelo nas 4h horas iniciais.

Ambas as soluções foram preparadas com água deionizada. O produto final, um sólido preto, foi filtrado e lavado com água destilada e etanol para a remoção das impurezas até obtenção da água de lavagem incolor. O sólido preto de PPy é seco em estufa (80°C) por 4h.

O diagrama esquemático da síntese do PPy é ilustrado na Figura 4.1.

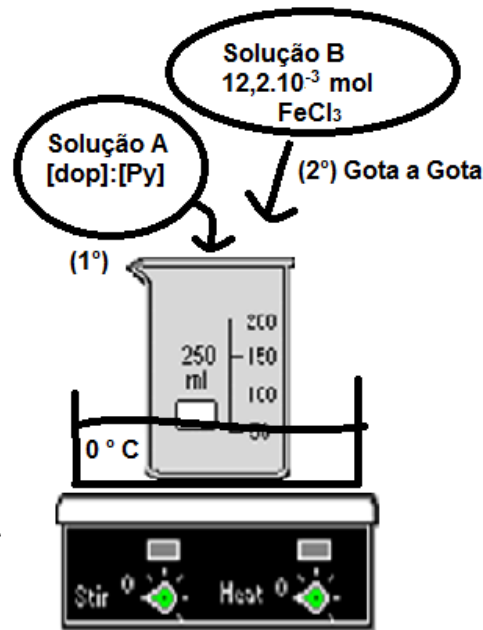


Figura 4.1. Diagrama esquemático da síntese química do PPy.

Sínteses com 24h de agitação, temperatura abaixo de 0°C (-8 a -5°C) e temperatura ambiente também foram avaliadas. Tais alterações foram feitas isoladamente, sem alteração dos outros parâmetros ao mesmo tempo.

4.2.2. Preparação de filmes de PLGA

Através da técnica de evaporação de solvente foram preparados filmes de PLGA com diferentes concentrações do polímero para a obtenção de filmes com diferentes espessuras (Rezende et al., 2005).

Primeiramente, o polímero foi dissolvido em banho de ultrassom de 40 kHz (Unique, modelo USC-2500A) por 2 horas à temperatura ambiente utilizando-se clorofórmio como solvente. Após total solubilização, a solução de PLGA é vertida em placas de vidro petri (Ø 5,6 cm). Em uma bancada de nível horizontal, o solvente é evaporado por 24h em temperatura ambiente. Também foram preparados filmes na presença de fluxo de nitrogênio (N₂) na primeira hora da evaporação do solvente.

A Figura 4.2 ilustra o sistema de preparação dos filmes de PLGA sem e com a presença de fluxo de nitrogênio.

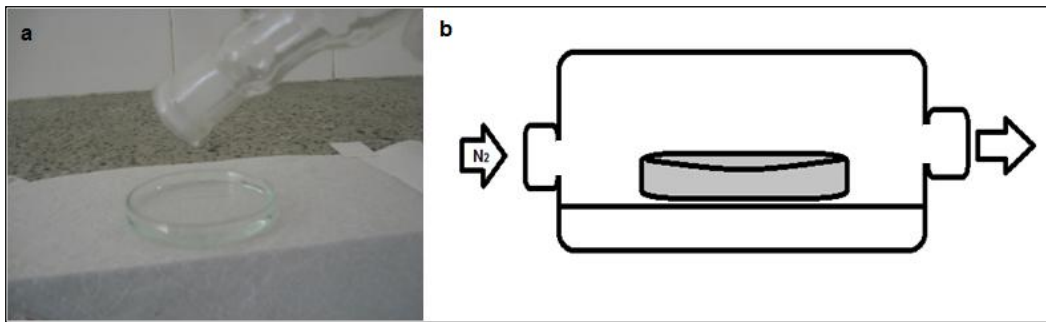


Figura 4.2. Diagrama esquemático da evaporação do solvente sem fluxo de nitrogênio (a) e com fluxo de nitrogênio (b).

A Tabela 4.2 ilustra as quantidades de PLGA utilizadas no preparo dos filmes de PLGA sem fluxo de gás N_2 . No preparo dos diferentes filmes as massas descritas na Tabela 4.2 foram solubilizadas em 6 mL de clorofórmio.

Tabela 4.2. Relações de massas (g) de PLGA utilizadas para preparação dos filmes puros de PLGA.

FILME	Massa (g) de PLGA
PLGA1	~1,0
PLGA2	~0,6
PLGA3	~0,2

4.2.3. Preparação de nanocompósitos de PLGA com PPy pelo método sanduíche por evaporação de solvente

Um diagrama esquemático dos processos de fabricação pelo método sanduíche por evaporação de solvente é ilustrado na Figura 4.3 (Khang et al., 2003). Em uma primeira etapa, diferentes quantidades de massas de PLGA foram dissolvidas em clorofórmio conforme mencionado no tópico 4.2.2, a fim de se obter filmes de PLGA com diferentes espessuras. Após, uma segunda camada do

sanduíche, camada do meio ou recheio, foi preparado por meio de duas metodologias diferentes:

Método A: o pirrol é polimerizado diretamente sobre a primeira camada de PLGA, conforme descrito no item 4.2.1; porém com algumas adaptações na montagem do sistema reacional. O dopante e a razão [dopante]: [monômero] estabelecida nesta etapa foi aquela em que a morfologia de fibra neste estudo foi obtida. Neste caso é o dopante APTS e a razão entre o dopante e monômero é igual a quatro. Após o tempo de reação do PPy o filme foi lavado com água deionizada e etanol para retirada dos resíduos da síntese e por 24h deixada em temperatura ambiente para evaporação dos solventes da lavagem. Uma mesma quantidade de concentração de solução de PLGA que foi utilizada na 1ª camada de PLGA é novamente vertida sobre o filme, isto é, a camada da reação de PPy foi recoberta (“sanduichada”) entre duas camadas de PLGA, formando um filme de camadas com estrutura tipo sanduíche. Após evaporação do solvente durante 24h à temperatura ambiente, o filme de PLGA/PPy é armazenado em atmosfera inerte de N₂ até à sua utilização.

Método B: inicialmente preparou-se nanofibras de polipirrol conforme descrito no item 4.2.1 e após o pó das nanofibras de PPy são dispersas em 3 mL de clorofórmio e adicionadas a uma solução de PLGA em clorofórmio de mesma concentração utilizada no preparo da 1ª camada. A quantidade de PPy utilizado corresponde a 10% em massa com relação a massa de PLGA. A solução de PPy/PLGA é sonificada durante 8h à temperatura ambiente, e após a solução é vertida sobre a 1ª camada de PLGA. Depois de 24h de evaporação a última camada de PLGA de mesma concentração utilizada na 1ª camada é vertida sobre a camada de PPy/PLGA, isto é, a camada de PPy/PLGA foi recoberta (“sanduichada”) entre duas camadas de PLGA, formando um filme de camadas com estrutura tipo sanduíche. Após evaporação do solvente durante 24h à temperatura ambiente, o filme de PLGA/PPy estruturado na forma de sanduíche é armazenado em atmosfera inerte de N₂ até à sua utilização.

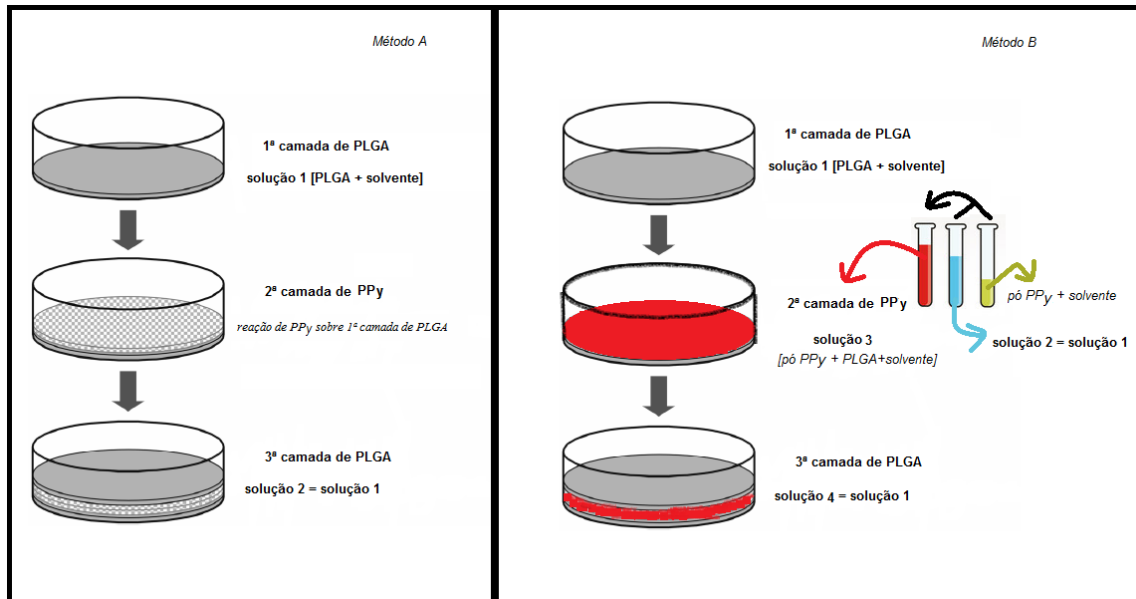


Figura 4.3. Diagrama esquemático da preparação dos filmes de PLGA com PPy pelo método sanduíche por evaporação de solvente. Fonte: Adaptado de (Khang et al., 2003).

A Tabela 4.3 ilustra os valores em massa dos filmes estruturados na forma de sanduíche que foram preparados pelos métodos A e B.

Tabela 4.3. Relações de massas (g) de PLGA utilizadas para preparação dos filmes estruturados na forma de sanduíche preparados pelos métodos A e B.

Sanduíche	Método A	Massa (g) total aproximada de PLGA
1A	~0,50 g de PLGA por camada	~1,0
2A	~0,30 g de PLGA por camada	~0,6
3A	~0,15 g de PLGA por camada	~0,3
Sanduíche	Método B	Massa (g) aproximada total de PLGA
1B	~0,60 g de PLGA por camada	~1,8
2B	~0,20 g de PLGA por camada	~0,6

A Tabela 4.4 ilustra os valores utilizados na segunda camada dos filmes preparados pelo método B.

Tabela 4.4. Massas utilizadas para preparar a 2ª camada dos filmes em estrutura de sanduíche pelo método B e para os filmes de camada única de PLGA com PPy-APTS.

Massas dos filmes estruturados na forma de sanduíche e camada única		
2ª camada e camada única	Massa (g) de PLGA	Massa (g) de PPy-APTS
1B e 1B-UNC	~0,6	~0,06
2B e 2B-UNC	~0,2	~0,02

A Figura 4.4 ilustra a estrutura final na forma de sanduíche dos filmes preparados.

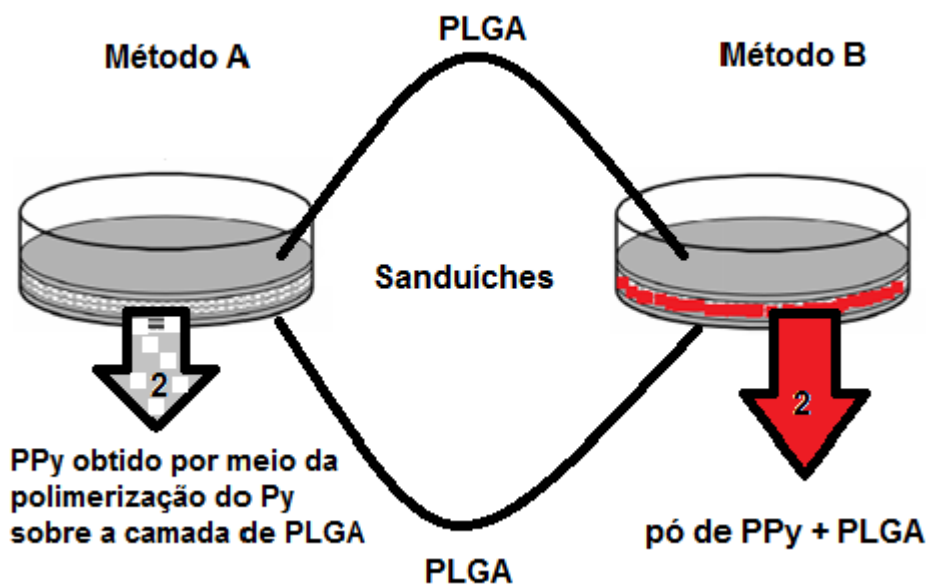


Figura 4.4. Diagrama esquemático dos filmes de PLGA/PPy estruturados na forma de sanduíche.

Filmes de PLGA/PPy correspondente a 2ª camada (camada intermediária do sanduíche ou recheio) do sistema polimérico preparado pelo Método B foram preparados isoladamente a fim de caracterizar o filme compósito de PLGA/PPy como uma camada única e direta, sem o recobrimento das camadas externas de PLGA. A Tabela 4.4 também corresponde as quantidades de PLGA e PPy utilizados

para a preparação dos compósitos de PLGA/PPy em filmes de camada única (recheio). Os procedimentos de preparo destes filmes de única camada foram os mesmos mencionados neste mesmo item de número 2.4.3 (método B); porém sem as etapas correspondentes as camadas externas do sistema polimérico em forma de sanduíche (1ª e 3ª camada de PLGA).

A sigla UNC foi utilizada para identificar as amostras de única camada, como 1B -UNC e 2B- UNC, respectivamente.

4.2.4. Síntese química para funcionalização de nanofibras PPy

A funcionalização das nanofibras de PPy com o 1-(2 carboxietil)pirrol tem como objetivo fixar o FC (Tacrolimus- FK506) diretamente nas nanofibras de PPy.

As reações para obtenção de nanofibras de polipirrol funcionalizadas ocorreram por meio da polimerização química oxidativa conforme descrito no item 4.2.1; porém com adição do reagente funcionalizador na preparação da solução A.

Na primeira abordagem o pirrol (0,05mL; $7,2 \cdot 10^{-4}$ mol) e o funcionalizador 1-(2 carboxietil)pirrol são dissolvidos em meio aquoso com o dopante APTS sob agitação na temperatura de 0°C por 60 minutos. Esta mistura é chamada de solução A. Após adicionou-se, gota a gota, a solução B contendo o agente oxidante. Ao término da adição da solução B a reação transcorre por 24h em repouso e com banho de gelo nas 4h horas iniciais.

Água deionizada foi o solvente utilizado na síntese e o produto final foi filtrado e lavado com água destilada para a remoção das impurezas até obtenção da água de lavagem incolor. Após a amostra é seca em estufa (80°C) por 4h.

O dopante e a razão [dopante]: [monômero] estabelecida nesta etapa foi aquela em que a morfologia de fibra neste estudo foi obtida. Neste caso é o APTS e a razão de valor igual a quatro, correspondente a um excesso de dopante durante a síntese. As razões [funcionalizador]: [monômero] avaliados foram [1]:[1], [0,5]:[1] e [1,5]:[1]. O agente oxidante para todas as sínteses foi o cloreto férrico (FeCl_3) e a razão molar [oxidante]:[monômero] de [1,7]:[1].

A Figura 4.5 ilustra o diagrama esquemático da síntese química para obtenção de nanofibras de PPy funcionalizadas com 1-(2 carboxietil)pirrol.

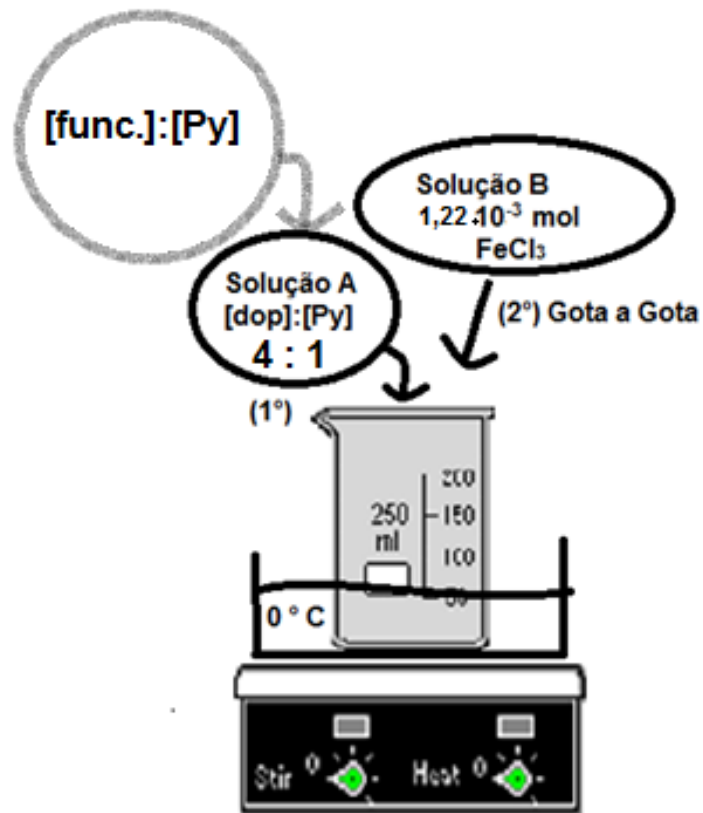


Figura 4.5. Diagrama esquemático da síntese química para obtenção de nanofibras de PPy funcionalizadas com 1-(2 carboxietil)pirrol.

Uma segunda abordagem foi testada utilizando-se de nanofibras pré-prontas pelo método descrito no item 4.2.1. Nesta 2ª abordagem uma quantidade de nanofibras de PPy correspondente a 40% em massa com relação a quantidade de monômero foi adicionada no preparo da solução A, formando uma solução contendo o funcionalizador, pirrol (Py) e as nanofibras de PPy-APTS. As demais etapas da síntese transcorreram conforme descrito para 1ª abordagem deste mesmo item de número 4.2.4 e avaliou-se apenas a razão molar [funcionalizador]:[monômero] correspondente a [1]:[1].

4.2.5. Mistura direta do fármaco Tacrolimus em PLGA com nanofibras de PPy

No preparado dos filmes de PLGA com nanofibras de PPy estruturados na forma de sanduíche, descrito no item 4.2.3, a adição do fármaco Tacrolimus foi realizada durante o preparo da 2ª camada da estrutura pelo método B. Prepara-se uma solução de FK506 em clorofórmio que é diretamente misturada na solução correspondente a 2ª camada da estrutura final.

A Figura 4.6 ilustra o diagrama esquemático da adição direta da solução de FK506 na preparação de filmes de PLGA/PPy-APTS/FK506 estruturados na forma de sanduíche.

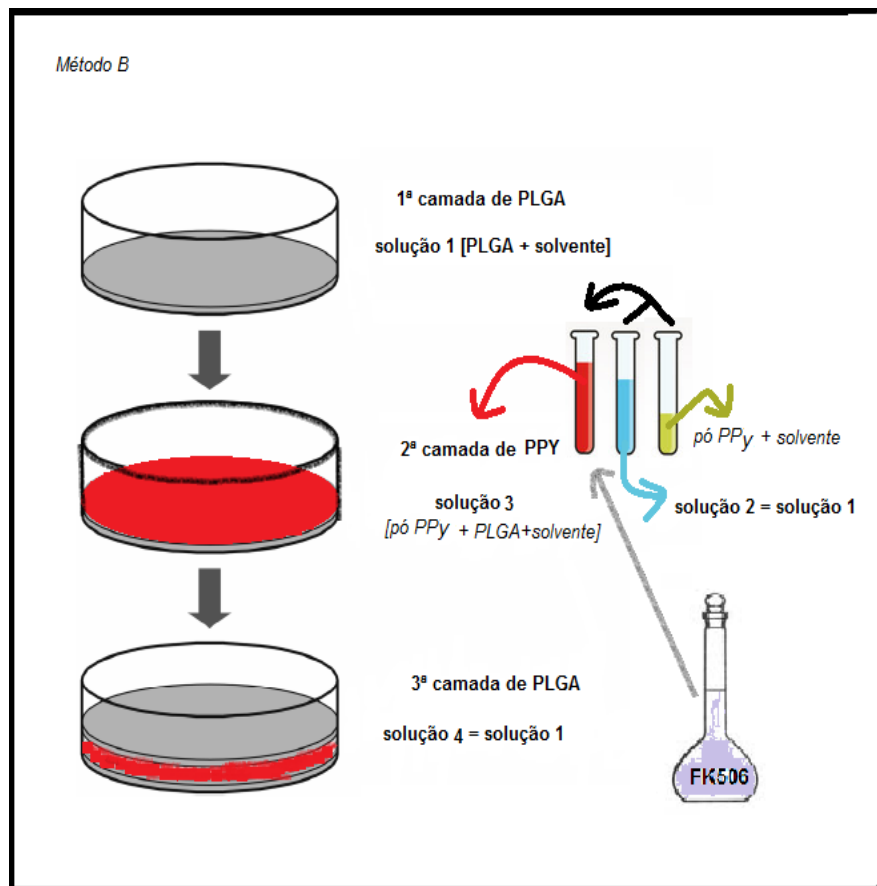


Figura 4.6. Diagrama esquemático da preparação do filme estruturado como sanduíche de PLGA com PPy pelo método B. Fonte: Adaptado de (Khang et al., 2003).

Preparou-se filmes de PLGA/FK506 e PLGA/PPy-APTS/FK506 sem a estrutura final de sanduíche, correspondente aos filmes sem as camadas externas de PLGA. Os filmes preparados correspondem à formação da 2ª camada da Figura 4.6. Utilizou-se 0,2 g de PLGA para o filme de PLGA/FK506 e 0,2 g de PLGA com

0,02 g de nanofibras de PPy-APTS para o filme de PLGA/PPy-APTS/FK506. Para ambos os filmes utilizou-se uma solução de 0,00126 g de FK506 em 5 ml de clorofórmio.

A quantidade de FK506 utilizado foi determinada considerando resultados anteriores encontrados na literatura por meio da administração subcutânea de 5mg/kg de FK506 para o tratamento de nervo ciático de ratos (Costa et al., 2006).

4.3. Técnicas de Caracterização

O estudo das estruturas formadas, propriedades físico-químicas e da morfologia da superfície, assim como o comportamento de degradação dos sistemas poliméricos são de extrema importância para compreender o desempenho da interação do implante com o organismo. Portanto, as técnicas de caracterização auxiliam na compreensão e descrição de informações importantes do comportamento dos sistemas formados.

As caracterizações das amostras produzidas foram feitas utilizando-se técnicas de espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA), e espectroscopia de impedância elétrica, a fim de verificar as propriedades térmicas, elétricas, morfológicas das amostras obtidas.

4.3.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A estrutura molecular dos materiais produzidos foi determinada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR) com o objetivo de identificar os grupos funcionais presentes nas amostras. Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos no espectrômetro da Perkin-Elmer modelo (*Spectrum One FT-IR Spectrometer*) na região de 400 a 4000 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , utilizando-se amostras do pó de PPy preparadas em pastilhas de KBr sob pressão de 10 toneladas, em uma prensa Perkin-Elmer Instruments. Para avaliar os filmes nanocompósitos de PLGA/PPy utilizou-se o espectrômetro da Perkin-Elmer modelo (*Spectrum 100 FT-IR Spectrometer*) na região de 650 a 4000

cm⁻¹ com acessório de refletância total atenuada universal (*Universal ATR - Sampling Accessory - UATR*).

4.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia das amostras sólidas em pó de PPy e dos filmes produzidos foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em diferentes centros de microscopia.

As análises quando realizadas no Centro de Microscopia e Microanálise da PUCRS utilizou-se um aparelho Philips XL30 e as amostras produzidas foram fixadas com auxílio de uma fita dupla face condutora de carbono sobre um suporte (*stub*) e posteriormente recobertas com ouro em um metalizador BALTEC SCD 005. As imagens foram registradas no modo de espalhamento elétrico usando uma onda elétrica com 20 KeV ou 30 KeV (tensão de aceleração). Os aumentos em geral variaram de 200x até 30.000x para observação das características topográfica dos materiais.

O equipamento utilizado no CME da UFRGS foi o Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 6060.

O equipamento utilizado no ITT-FUSE da Unisinos foi o Microscópio Eletrônico de Varredura da ZEISS modelo EVO LS 15.

O equipamento utilizado no CNANO/UFRGS foi o Microscópio Eletrônico de Varredura EVO50 – Carl Zeiss.

4.3.3. Análise Termogravimétrica (TGA)

Análise termogravimétrica (TGA) foi realizada para uma melhor compreensão sobre a estabilidade térmica das amostras de PPy preparados. As amostras foram aquecidas de 20 a 600 °C com fluxo de Nitrogênio (100 ml.min⁻¹) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹, utilizando-se o aparelho SDT Q600 fabricado pela TA Instruments no Laboratório Multi-Usuários de Análises Térmicas (LAMAT) da UFRGS.

4.3.4. Espectroscopia de Impedância Elétrica

Amostras do pó de PPy foram prensadas em forma de disco (2 x 12 mm) e foram utilizadas para realização das medidas de espectroscopia elétrica. Utilizou-se uma porta amostras com eletrodos circulares de prata para introduzir a onda senoidal proveniente de um gerador de funções (Agilent) e um osciloscópio (Minipa) foi usado para analisar os parâmetros da onda e medir a defasagem entre a corrente e a tensão. Detalhes do procedimento experimental são dados em Chinaglia et al. (2008). O ruído experimental foi minimizado usando-se gaiola de Faraday aterrada, filtro de linha e estabilizador de tensão. A incerteza estatística foi reduzida tomando um mínimo de três medidas para cada amostra.

4.3.5. Degradação Hidrolítica

Para uma avaliação mais próxima do real comportamento de degradação de um material com potencial aplicação na área médica se faz necessário o uso de um protocolo que leve em consideração as condições mais próximas do pH do ambiente *in vivo*. Portanto, os testes de degradação hidrolítica *in vitro* dos materiais foram baseados na norma ASTM F1635 - 11 (2011).

As amostras de 0,5 cm de diâmetro foram mantidas em 5 mL de solução tampão fosfato salino, PBS, à 37 °C dentro de tubos de polipropileno de 15 mL em equipamento adaptado e termostatizado com agitação de 60 rpm. As amostras foram feitas em triplicatas e removidas em tempos pré-determinados (7, 14, 21 e 28 dias de incubação). Após, são lavadas com água destilada e secas sob vácuo e suas massas medidas até obterem massa constante (Pt), para posterior caracterização por perda de massa, espessura, MEV e medida de pH da solução salina (Li e Chang, 2005). A biodegradação foi calculada através da Equação 4.1:

$$\% \text{ Perda de Massa} = \left(\frac{P_0 - P_t}{P_0} \right) \times 100$$

(4.1)

Sendo P0 correspondente ao peso da massa antes do teste de degradação e Pt o peso da massa seca após cada tempo de degradação avaliado (Li e Chang, 2005).

Este método de ensaio destina-se a avaliar a taxa de degradação (isto é, a taxa de perda de massa) e as alterações no material ou propriedades estruturais, ou ambos, de materiais de polímeros hidroliticamente degradáveis utilizados em implantes cirúrgicos (ASTM F1635 - 11 (2011)).

Adaptou-se uma mesa agitadora, modelo MA-140/CF e marca Marconi, para simular uma incubadora com controle da temperatura e poder manter os níveis de agitação e temperatura no interior do equipamento durante os períodos de degradação.

Para medir as espessuras dos filmes pré e pós-períodos de degradação utilizou-se o aparelho medidor digital de espessura (MDE), marca Hanatek e modelo nº 8020. A incerteza estatística foi reduzida tomando um mínimo de dez medidas para cada amostra.

Para medir o pH das soluções utilizou-se pHmetro, marca Digmed e modelo DM-20.

Para as medidas das massas dos filmes utilizou-se uma balança analítica de cinco casas decimais, marca Mettler Toledo e modelo AG285.

A Figura 4.7 mostra o equipamento adaptado para simular uma incubadora termostaticada utilizada nos testes de degradação hidrolítica *in vitro*.

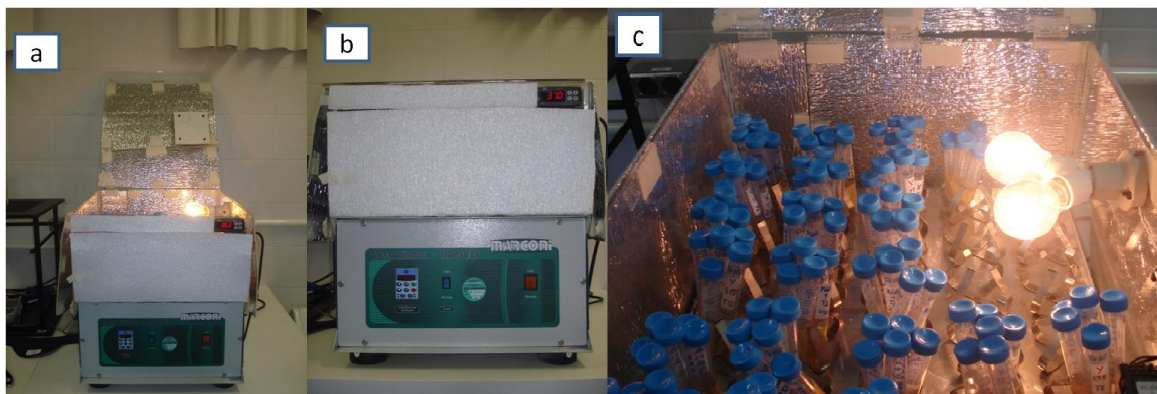


Figura 4.7. (a) e (b) Incubadora termostaticada adaptada. (c) Triplicadas das amostras em degradação.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Preparação de nanofibras de PPy

A metodologia utilizada para a obtenção de nanofibras de polipirrol foi a polimerização química oxidativa em meio aquoso a 0°C e na presença de diferentes agentes dopantes, conforme descrito no item 4.2.1 (Osmatová et al.2003; Goel et al., 2010; 2003; Xia et al.,2011).Os dopantes testados foram: ácido clorídrico (HCl), ácido p-toluenosulfônico monohidratado (APTS), ácido dodecilbenzenosulfônico (ADBS), p-toluenosulfonato de sódio (PTS). Foram avaliadas diferentes razões [dopante]:[monômero] conforme valores indicados na Tabela 5.1. Exceto o HCl, os demais agentes dopantes podem também ter ação de surfactantes.

Tabela 5.1. Razões molares utilizadas de [dop]:[Py].

Relação Molar	[dop]:[Py]
A	1,13
B	4
C	2
D	0,05
E	6

Obs.: A e B avaliados com os dopantes HCl; APTS, PTS e ADBS; C avaliado apenas com APTS; D avaliado apenas com ADBS; E avaliado apenas com PTS.

Na literatura tem sido muito discutido a influência da natureza do dopante e das condições de reação na morfologia do polipirrol resultante (Zang et al., 2006; Yin e Yang, 2011).

A morfologia das amostras de polipirrol sintetizadas foram inicialmente avaliadas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Na Figura 5.1 são apresentadas as imagens de MEV correspondentes as superfícies das amostras de PPy com diferentes agentes dopantes. Em todas as amostras a relação molar [dop]:[Py] foi igual a 1,13.

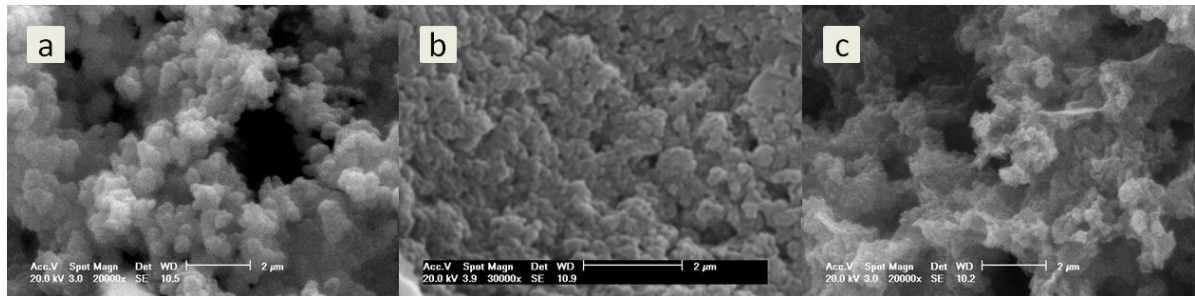


Figura 5.1. Imagens de MEV das amostras de PPy com diferentes agentes dopantes: a) HCl b)ADBS c) APTS. Razão molar [dop]:[Py] = 1,13.

A partir da Figura 5.1 pode ser observado que nas condições avaliadas não foi possível a obtenção das nanofibras de PPy para nenhum dos dopantes. Em todas as amostras observa-se a formação de PPy com morfologia particulada globular com regiões de maiores aglomeramentos.

O mesmo procedimento experimental foi utilizado novamente para os dopantes (HCl, ADBS, PTS, APTS), porém a razão molar [dop]:[Py] avaliada foi igual a 4 (Xia et al., 2011). Na Figura 5.2 é possível observar as diferentes morfologias obtidas com a alteração no valor da razão molar para cada dopante. A modificação da razão molar [dop]:[Py] para um excesso de dopante no meio reacional proporcionou a obtenção de diferente morfologias, estando de acordo com a literatura que aponta uma alta influência dos dopantes nas formas resultantes dos produtos nos processos de sínteses, tanto pelo método químico como pelo eletroquímico (Osmavotá et al., 2003; Anzari, 2006; Goel et al., 2010).

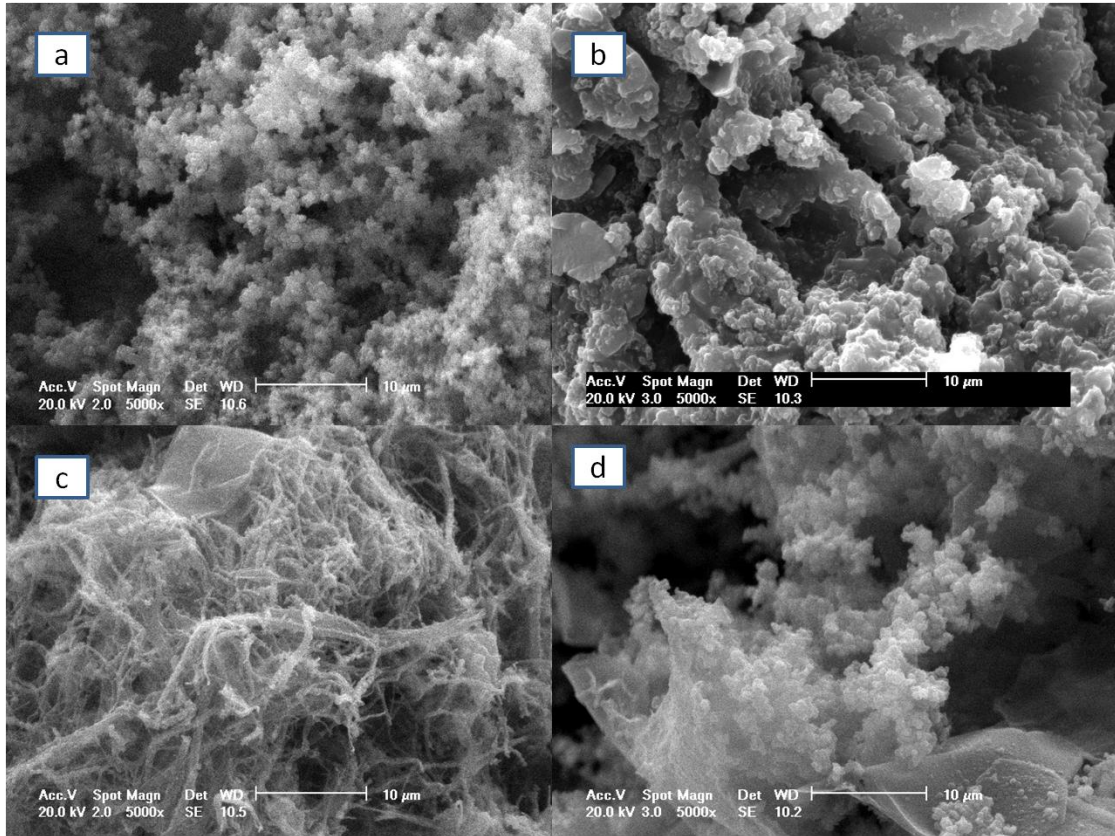


Figura 5.2. Imagens de MEV das amostras de PPy com diferentes agentes dopantes e razão molar $[dop]:[Py] = 4$; a) HCl; b) ADBS; c) APTS; d) PTS.

A partir da Figura 5.2 observamos que a modificação na razão molar $[dop]:[Py]$ em 4 vezes mais elevada favoreceu a morfologia de fibras para o dopante APTS. Resultados similares e dependentes da concentração do surfactante foram relatados por Liu e Wan (2001) ao verificar que a concentração de ácido β -naftaleno sulfônico (β -ANS) afetou fortemente as morfologias de PPy-ANS. Baixas concentrações resultou em PPy-ANS granular e ao aumentar a concentração de β -ANS, mais e mais estruturas fibrosas apareciam como morfologia predominante, porém esse aumento foi possível até uma concentração específica do surfactante durante o estudo e quando ultrapassada retornavam a predominar os blocos aglomerados de partículas granulares no lugar das fibras (Liu e Wan, 2001). Outro dado interessante do estudo de Liu e Wan (2001) é que a morfologia fibrosa inicialmente observada se revelou por imagens de MET como ocas, sendo algumas fibras sem preenchimento, caracterizando a formação de estruturas tubulares devido ao seu interior não preenchido (Liu e Wan, 2001). Yang et al. (2002) relatou a obtenção de PPy com estruturas de tubos ou fibras e também observou que a

morfologia resultante é dependente da concentração do dopante e da relação molar entre o pirrol e o dopante.

O impedimento do crescimento descontrolado da cadeia polimérica, que resulta na morfologia de partículas globulares aglomeradas é uma tarefa difícil, sendo ainda um grande desafio a obtenção de estruturas nanoestruturas de forma mais controlada e ordenada por métodos de síntese mais simples, como o caso do método químico (Liu e Wan, 2001; Goel et al., 2010).

Neste trabalho nanofibras de PPy foram obtidas somente quando o APTS foi o agente dopante e a razão molar [dop]:[Py] igual a 4.

Nas Figuras 5.3 , 5.4 e 5.5 observar-se as micrografias de outras amostras de PPy dopado com APTS que foram obtidas em diferentes sínteses a fim de verificar a reprodutibilidade da morfologia de nanofibras usando-se o mesmo procedimento experimental.

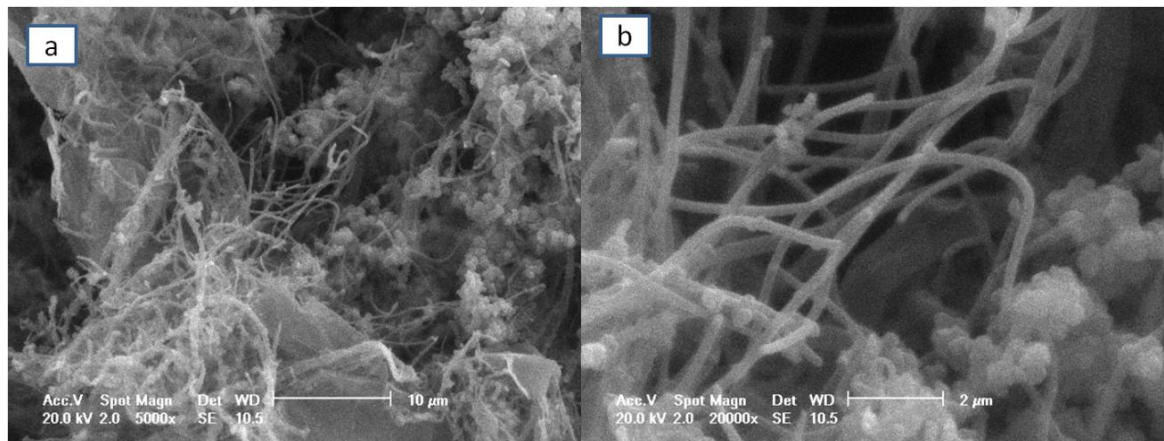


Figura 5.3. a) e b) Imagens de MEV da obtenção das primeiras fibras de PPy na presença do dopante APTS e razão molar [dop]:[Py] = 4.

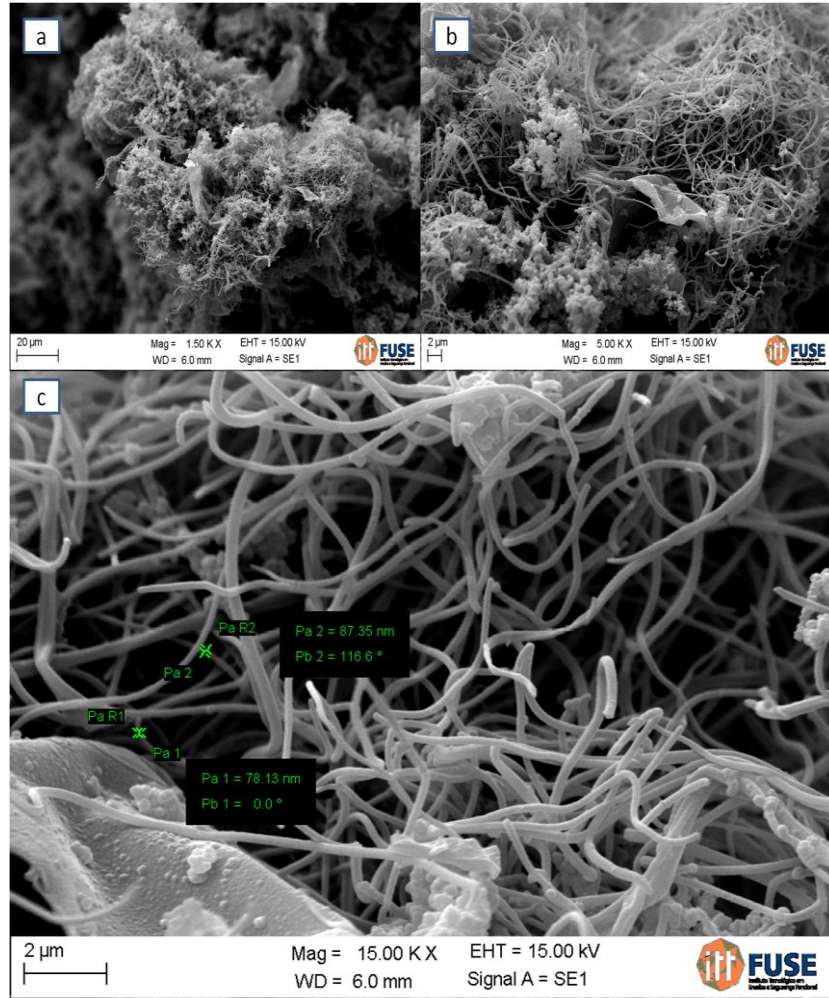


Figura 5.4. a) b) e c) Imagens de MEV em diferentes magnitudes das fibras de PPy com dopante APTS e razão molar [dop]:[Py] = 4 , 3ª tentativa de reprodutibilidade.

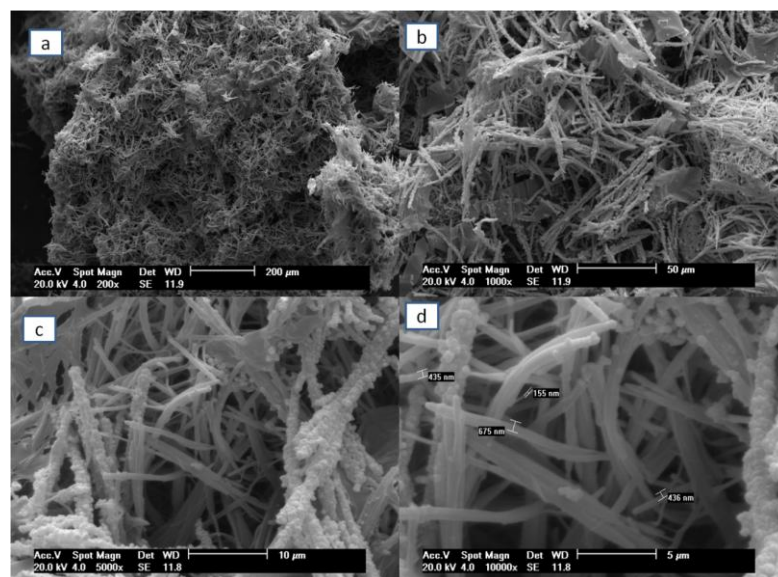


Figura 5.5. a) b) e c) Imagens de MEV e, diferentes magnitudes das fibras de PPy com dopante APTS e razão molar [dop]:[Py] = 4 , 2ª tentativa de reprodutibilidade.

Após obtenção das primeiras fibras de PPy na presença do dopante APTS, outros parâmetros experimentais foram modificados a fim de verificar a influência na obtenção da morfologia de fibras com o dopante APTS. O primeiro parâmetro alterado foi o tempo de agitação. O tempo de agitação de 2 minutos no tempo inicial de reação, tempo necessário para gotejar a solução oxidante, passou a ser constante durante as 24h de reação. A Figura 5.6 ilustra as fibras obtidas na presença de agitação magnética nas 24h de reação, demonstrando que foi possível a formação das fibras, porém elas se apresentam mais aglomeradas e com maior diâmetro.

Feng, Yan e Zhang (2009) também observaram que a agitação durante a polimerização do Py exerce uma influência na morfologia da nano estrutura formada. Por agitação, micro e nanofibras apresentaram-se de forma mais grosseira e aglomerada devido à fusão das fibras mais finas, conseqüentemente resultando em fibras mais espessas quando a polimerização ocorre em agitação do que quando no estado estático (Feng, Yan e Zhang, 2009).

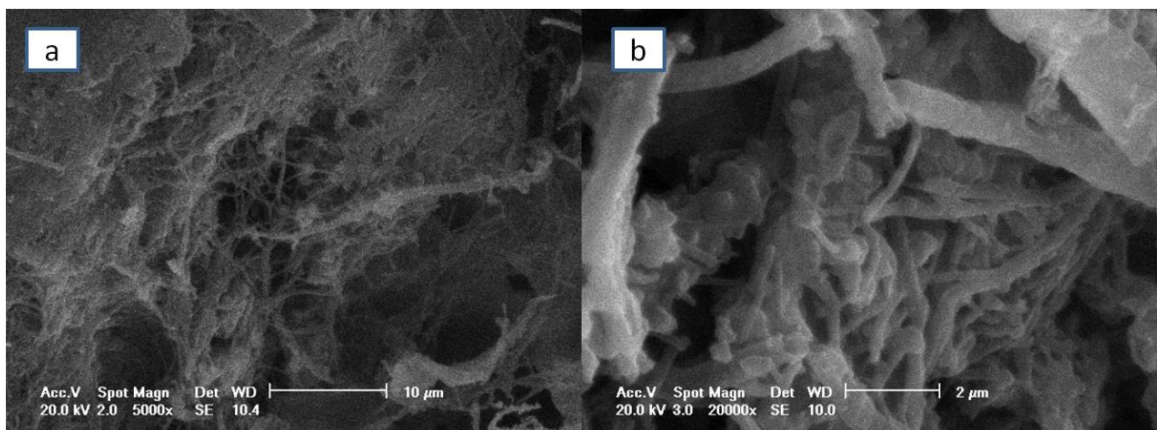


Figura 5.6. a) e b) Imagens de MEV das fibras de PPy com dopante APTS, razão molar [dop]:[Py] = 4 e reação com 24h de agitação magnética.

Outro parâmetro modificado foi à temperatura de reação e o procedimento inicial foi repetido em temperatura abaixo de 0°C e posteriormente em temperatura ambiente. O sistema reacional foi colocado dentro de um congelador com temperatura entre -10 e -5 °C e na Figura 5. 7 (a) podemos observar no centro da imagem a formação de fibra, mas a estrutura particulada foi a predominante, logo a temperatura abaixo de 0° C não favoreceu a formação de nanofibras, assim como para a síntese na temperatura ambiente (Figura 5.1.7 (b)) que também não resultou

na formação de fibras. A temperatura de 0 °C é a mais adequada para a obtenção da morfologia desejada neste estudo quando se utiliza o dopante APTS em excesso no meio reacional, sendo a temperatura mais um importante parâmetro para obtenção da morfologia fibrilar desejada.

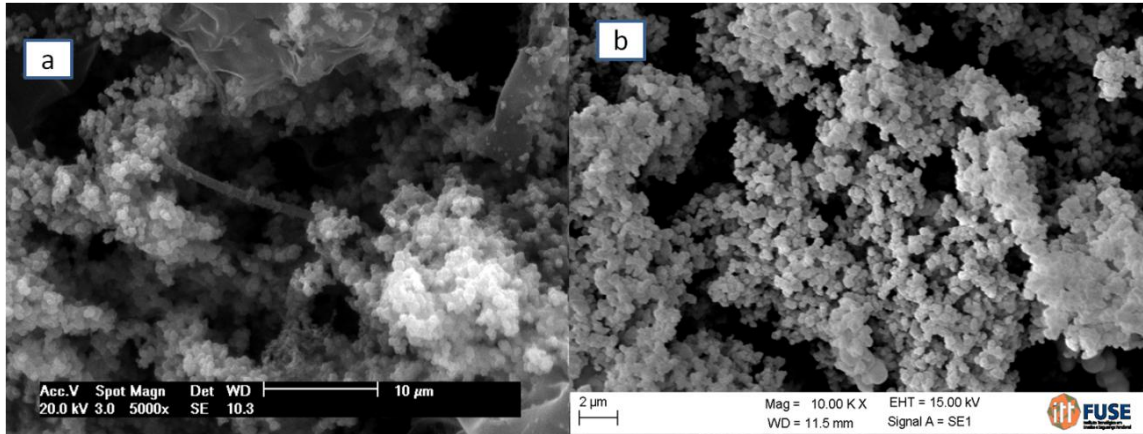


Figura 5.7. Imagens de MEV da amostra de PPy com dopante APTS e razão molar [dop]:[Py] = 4 .
(a) síntese na temperatura entre -10 e -5 °C; (b) síntese na temperatura ambiente.

Foi avaliada uma quantidade intermediária do dopante APTS, razão molar [dop]:[Py] = 2, e a Figura 5.8 ilustra que não foi possível a formação de fibras, demonstrando a necessidade de um excesso mais elevado do dopante no meio reacional.

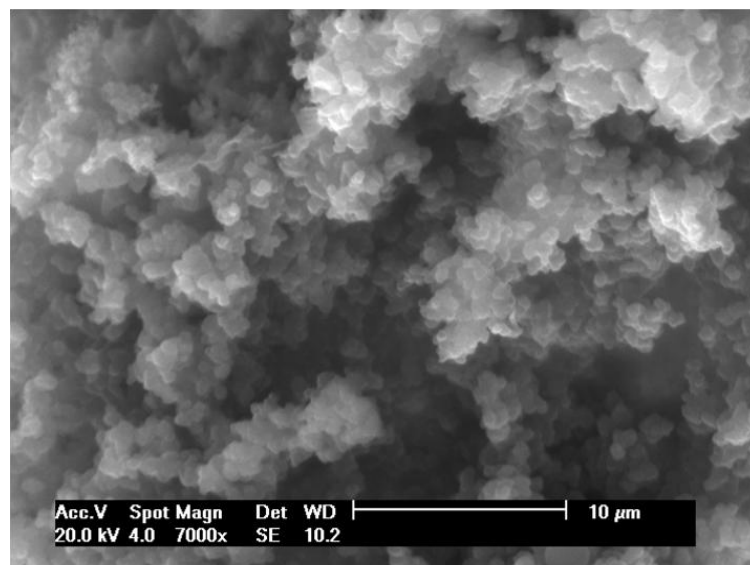


Figura 5.8. Imagens de MEV das amostras de PPy com dopante APTS e razão molar [dop]:[Py] = 2.

Sabendo-se que as propriedades dos materiais resultantes de automontagem são fortemente dependentes das interações intermoleculares, dos métodos e das

condições de síntese, por isso foram feitas modificações nas sínteses para os demais dopantes em estudo na tentativa de obter PPy na morfologia de fibras.

A Figura 5.9 ilustra a morfologia da síntese de polimerização do Py na presença de PTS. Em ambos os parâmetros modificados nos procedimentos de síntese, temperatura e agitação da reação química, a morfologia predominante foi à particulada.

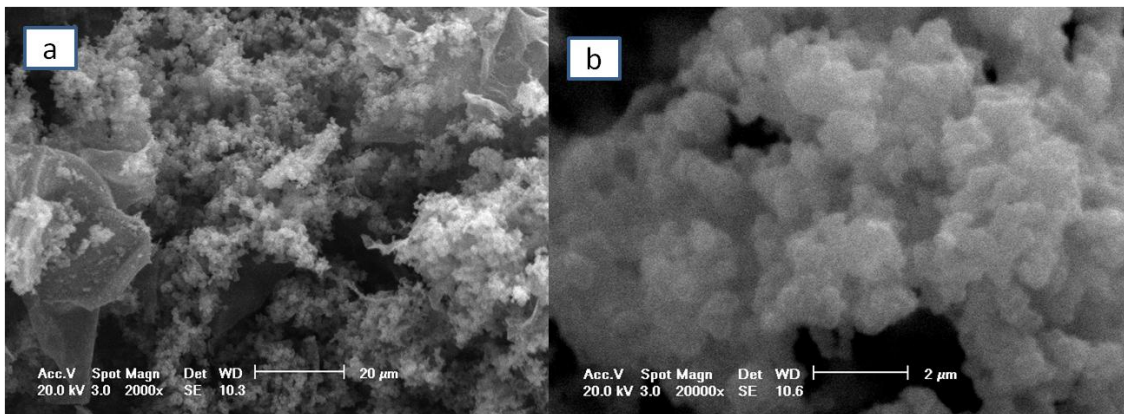


Figura 5.9. Imagens de MEV das amostras de PPy com dopante PTS e razão molar [dop]:[Py] = 4.
a) Reação por 24h em temperatura ambiente b) Reação com agitação 24h.

Outro parâmetro modificado na síntese com o PTS foi à relação molar entre dopante e monômero. Na Figura 5.10 observa-se a predominância de estruturas particuladas do PPy dopado com PTS obtidas da síntese com razão molar [dop]:[Py] = 6.

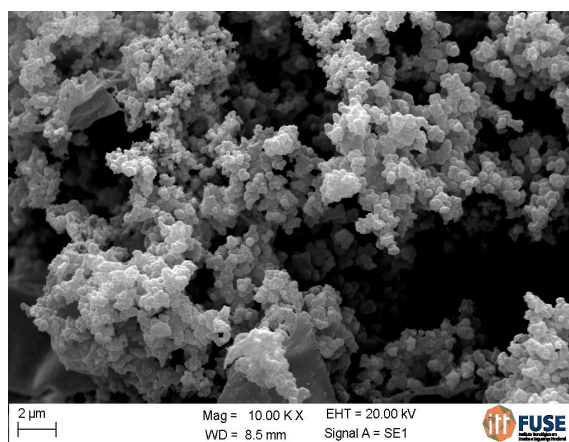


Figura 5.10. Imagens de MEV da amostra de PPy com dopante PTS e razão molar [dop]:[Py] = 6.

A Figura 5.11 ilustra os particulados resultantes da síntese do Py na presença do dopante ADBS, sendo possível verificar que as formas resultantes ficaram um pouco menos compactadas com a redução na quantidade de ADBS no meio reacional; porém não houve a formação de fibras.

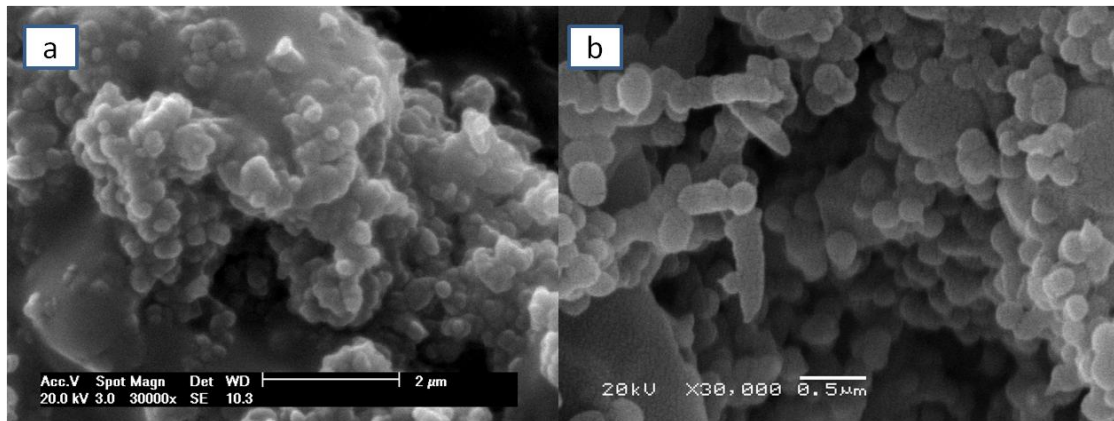


Figura 5.11. Imagens de MEV das amostras de PPy com dopante ADBS. a) razão molar [dop]:[Py] = 4 e b) razão molar [dop]:[Py] = 0,05.

A partir das micrografias de MEV é possível observar que a morfologia do PPy é fortemente influenciado pelo controle das condições experimentais: temperatura, tempo de agitação, concentração e natureza do dopante. O tipo e a concentração de dopante parecem ser fatores determinantes na formação de nanofibras, pois nas mesmas condições experimentais avaliados neste estudo somente foram obtidas nanofibras quando o APTS foi utilizado como o agente dopante.

A estrutura molecular das amostras de PPy com os diferentes dopantes preparados neste estudo foram avaliados por meio da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) no intervalo de 400-4000 cm^{-1} . A Figura 5.12 ilustra o espectro de infravermelho das amostras obtidas que evidência os principais sinais associados à estrutura do PPy (Wang et al., 2011).

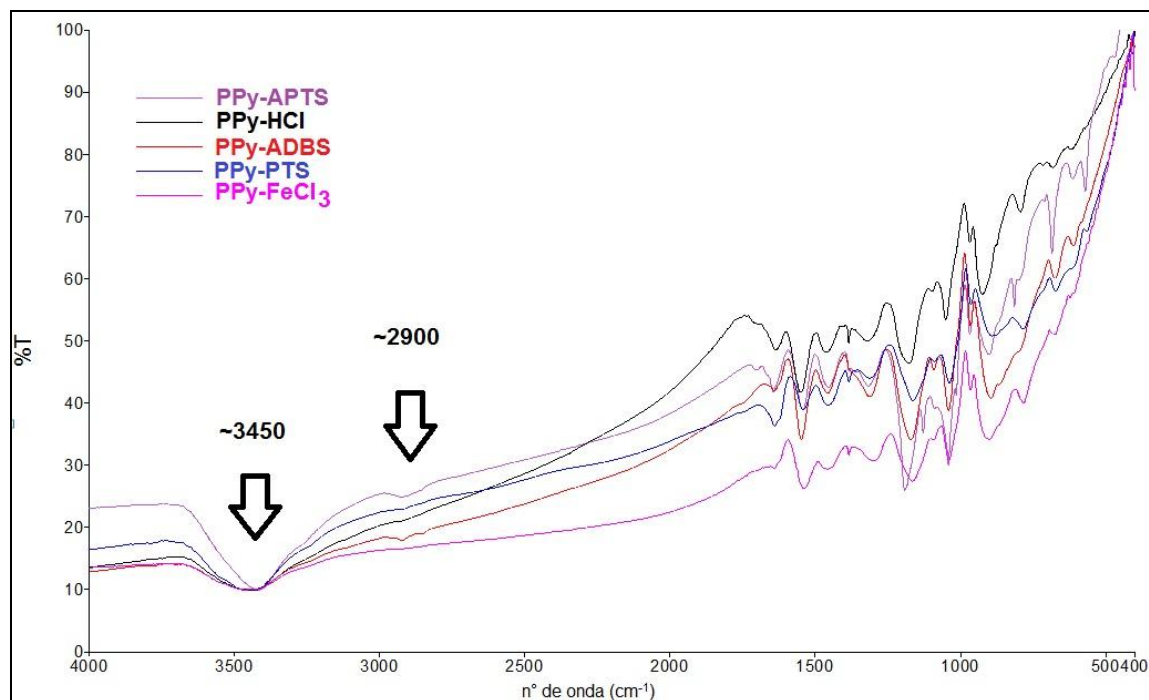


Figura 5.12. Espectroscopia de Infravermelho do Polipirrol com diferentes dopantes.

A partir da Figura 5.12 verifica-se uma banda larga na região de 3400-3500 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação de N-H (Osmatová et al., 2003; Goel et al., 2010; Gupta et al., 2011; Jeeju et al., 2012; Chandrasekaran et al., 2013). Na região de 2850-2925 cm^{-1} observa-se para os espectros PPy-ADBS e PPy-APTS uma banda com baixa intensidade associada a vibração da ligação C-H na presença de dopante no produto da polimerização (Yang e Liu, 2010). Os espectros de PPy-PTS, PPy-HCl e PPy-FeCl₃ não possuem o sinal na região de 2850-2925 cm^{-1} devido aos diferentes graus de dopagem que o PPy pode ter e das condições de síntese (Osmatova et al., 2003).

Na Figura 5.13 verificam-se vários sinais semelhantes, porém com alguns pequenos deslocamentos nas regiões das bandas e também com diferentes intensidades de absorção dos sinais que podem ser atribuídos ao grau de dopagem (interações do produto com o íon de dopagem), a estrutura do dopante ou qualquer alteração na morfologia do produto (por exemplo, a formação de nanoestruturas), pois se sabe que as vibrações que envolvem elétrons π deslocalizados na cadeia polimérica são afetadas pela dopagem do polímero (Osmatová et al., 2003; Gupta et

al, 2011). Os espectros ilustram um sinal em $1633-1644\text{ cm}^{-1}$ correspondente a vibração característica do estiramento da ligação C=C (Shen e Wan, 1998), assim como em $1536-1560\text{ cm}^{-1}$ que também é uma região referente à absorção da vibração de estiramento da ligação C=C do anel do pirrol (Lee et al, 1995; Shen e Wan, 1998; Kang e Geckeler et al, 2000; Liu e Wan, 2001; Reung-u-rai et al., 2008; Wei e Lu, 2009 ; Xia et al.,2011; Jeeju et al., 2012), identificando a existência de compostos contendo anéis aromáticos e neste estudo as bandas confirmam a presença das vibrações das ligações do anel de pirrol (Shen e Wan, 1998; Liu e Wan, 2001; Kim et al.,2008; Xia et al.,2011). A vibração de estiramento da ligação N-C no anel do pirrol está relacionado com a região $1445-1475\text{ cm}^{-1}$ dos espectros (Osmatová et al., 2003; Kwon et al., 2008; Xia et al.,2011; Jeeju et al.,2012) e a região da banda larga em $\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ para 1400 cm^{-1} é atribuída a deformação da ligação C-H ou C-N dentro do plano do anel (Osmatová et al., 2003; Xia et al., 2011).

As bandas nas regiões de aproximadamente 1550 cm^{-1} , 1200 cm^{-1} e 900 cm^{-1} caracterizam as vibrações de PPy no estado dopado e variações nas posições dos sinais são reflexo do efeito do íon dopante sobre as vibrações do anel de PPy (Tran et al., 2007; Xue et al., 2010; Yang e Liu, 2010; Goel et al., 2010; Su et al., 2012; Yang et al., 2012). Para o espectro de PPy-APTS as bandas de absorção em 1543 e 1453 cm^{-1} (vibrações de estiramento das ligações do anel de pirrol), 900 e 1192 cm^{-1} (vibrações de estiramento do PPy dopado), 1041 e 1317 cm^{-1} (vibrações de defomações do estiramento das ligações C-N e C-H, respectivamente) indicam que as nanofibras de PPy compartilham da mesma estrutura molecular que o PPy convencional (Tran et al., 2007; Feng, Yan e Zhang, 2009).

Os sinais de absorção em 1037 e 1041 cm^{-1} para os espectros de PPy-PTS, PPy-ADBS e PPy-APTS correspondem à vibração de alongamento simétrico de S=O (Reung-u-rai et al., 2008; Yang e Liu, 2010; Yang et al., 2012) e para estes mesmos espectros a região em $1194 - 1164\text{ cm}^{-1}$ corresponde as vibrações de estiramento assimétrico de O=S=O (Reung-u-rai et al., 2008), sendo uma região que a vibração de estiramento de $-\text{SO}_3$ se sobrepõe a vibração das ligações do anel de pirrol. Em $\sim 670-684\text{ cm}^{-1}$ corresponde a deformação da ligação C-C fora do anel ou do “balanço” da ligação C-H (Xia et al., 2011).

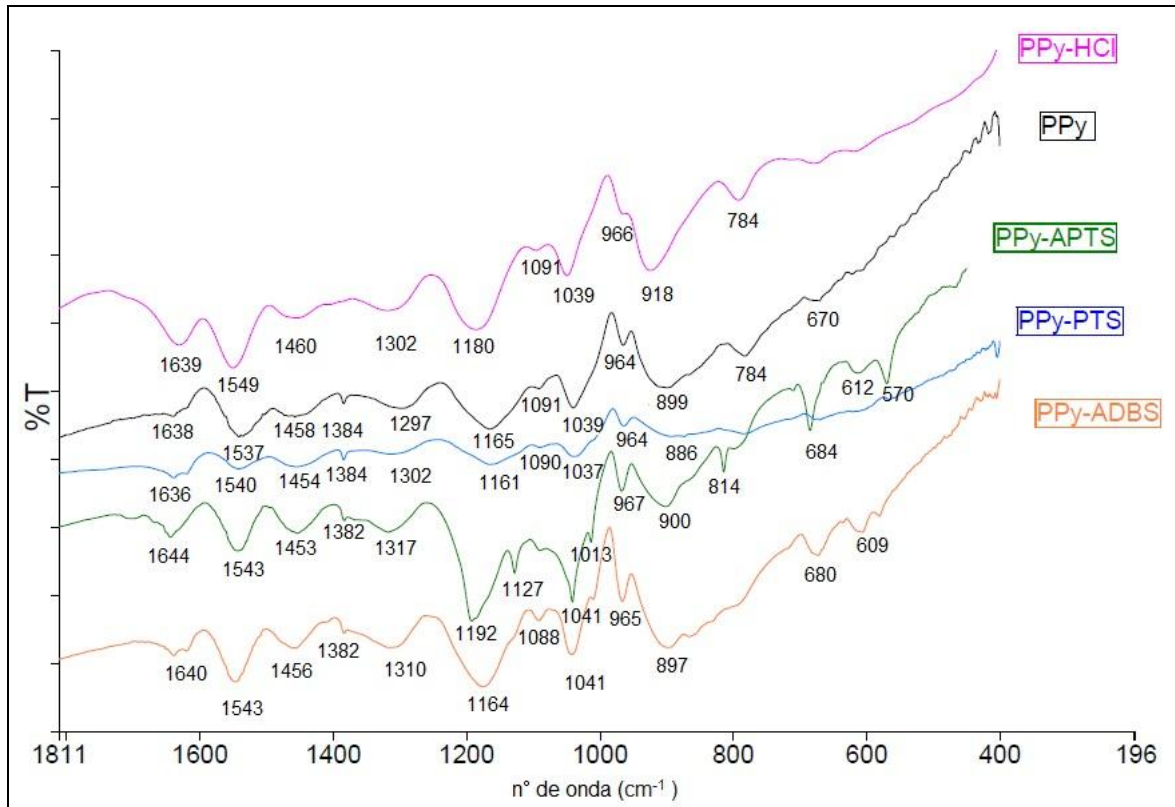


Figura 5.13. Espectroscopia de infravermelho do Polipirrol com diferentes dopantes

A partir da Figura 5.13 observa-se várias bandas e sinais comuns a todos os PPy sintetizados, indicando que o PPy dopado com os diferentes dopantes possuem uma estrutura de cadeia polimérica principal muito semelhante (Shen e Wan, 1998). Os sinais observados nas amostras de PPy dopados neste estudo estão de acordo com os relatos disponíveis na literatura, confirmando que ocorreu a formação de polipirrol. Os suaves deslocamentos dos sinais apresentados nos espectros são comuns e causados pelas diferentes estruturas dos dopantes participantes da síntese e dos diferentes graus de dopagem que os produtos de PPy obtiveram neste estudo (Osmatova et al., 2003).

As propriedades térmicas dos polímeros preparados foram avaliadas por TGA e a Figura 5.14 mostra o perfil de degradação com o aumento de temperatura das amostras de PPy que foram sintetizados com quatro diferentes dopantes.

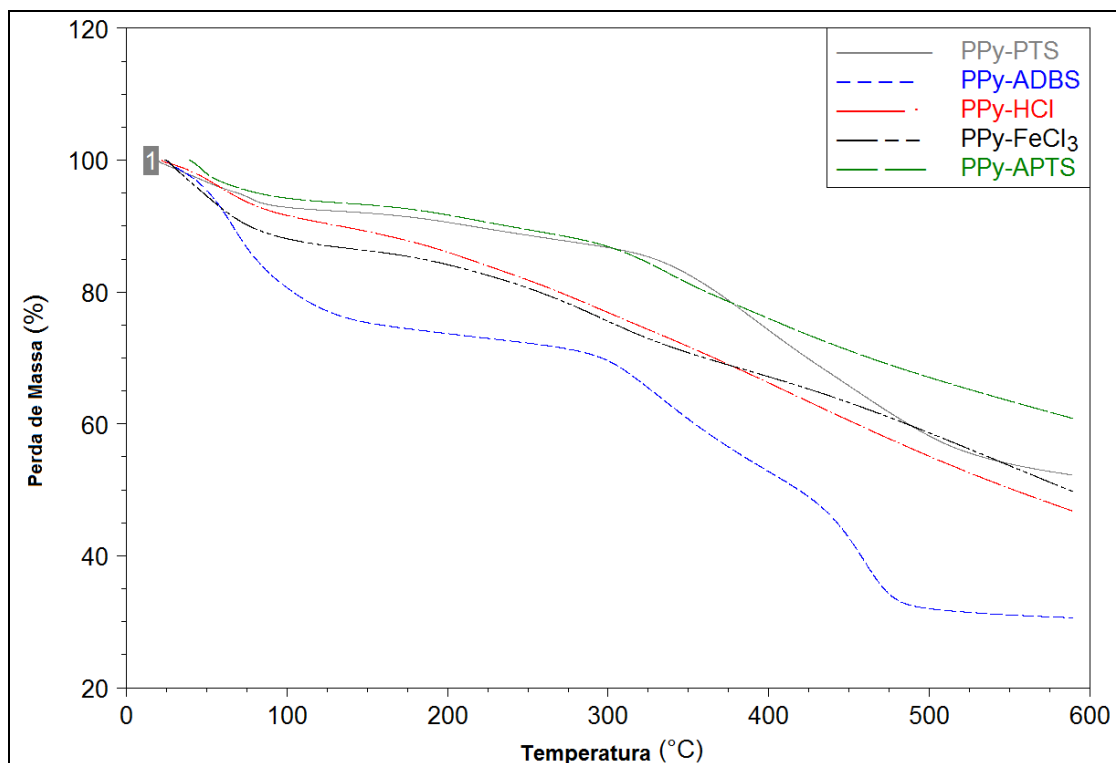


Figura 5.14. Termogramas do polipirrol com os diferentes dopantes.

Observa-se através dos diferentes decaimentos das curvas da Figura 5.14 que as perdas de massas dos diferentes PPy sintetizados são dependentes do íon dopante presente na estrutura do produto (Osmatova et al., 2003; Goel et al., 2010).

Segundo a literatura a perda de massa abaixo de 150 °C se deve à volatilização de moléculas de água e dopantes adsorvidos fisicamente na cadeia polimérica, além de oligômeros e monômeros livres (Basavaraja et al., 2007; Basavaraja et al., 2009; Goel et al., 2010). Com o passar do tempo a temperatura é gradativamente elevada permitindo analisar o processo de degradação de cada amostra e observa-se uma segunda perda de massa entre 150 e 350 °C que está relacionada com a decomposição das cadeias de PPy e dos íons dopantes que estavam quimicamente ligados ao PPy (Osmatova et al., 2003; Basavaraja et al., 2007; Goel et al., 2010). As curvas confirmam a influência dos íons dopantes na estabilidade térmica do PPy e indicam que a decomposição de todas as amostras começam em temperaturas superiores à temperatura fisiológica de 37 °C e que a

partir dos 200 °C o processo de degradação fica mais rápido (Basavaraja et al., 2007; Basavaraja et al., 2009; Goel et al., 2010).

A Tabela 5.2 resume o comportamento de degradação das amostras de PPy dopados com diferentes dopantes.

Tabela 5.2. Porcentagem de resíduo até 600° C do PPy com diferentes dopantes.

Temperatura (°C)	100	200	300	400	500	600
Amostras	Resíduo (%)					
PPy – FeCl ₃	94	87	77	68	58	50
PPy – HCl	92	86	77	66	55	47
PPy – ADBS	81	74	70	53	32	31
PPy – APTS	94	92	87	76	67	61
PPy - PTS	94	87	77	68	58	50

Obs: PPy – APTS com morfologia de nanofibras.

A partir da Figura 5.14 e da Tabela 5.2 verificou-se neste estudo que o PPy dopado com APTS mostrou-se ser o mais estável, pois é a amostra com a menor perda de massa e com o maior % de resíduo até os 600°C avaliados neste estudo, estando de acordo com outros estudos que apontam a influência do dopante nas propriedades do produto final e de resultados de melhor estabilidade térmica para o PPy dopado com APTS (Goel et al., 2010). O segundo PPy mais estável foi o dopado com o dopante PTS, o sal do dopante APTS, no qual apresentou um termograma bastante similar ao PPy dopando com APTS. Após o PPy-FeCl₃ (sem dopante adicional na síntese), seguido do PPy-HCl apresentaram os comportamentos mais estáveis, respectivamente. Por último o PPy dopando com o ADBS foi o que apresentou uma perda de massa mais acentuada e o menor valor % de resíduo aos 600 °C de análise, sendo o menos estável. A ordem de estabilidade

térmica dos PPy deste estudo é PPy-APTS > PPy-PTS > PPy-FeCl₃ > PPy-HCl > PPy-ADBS.

As diferenças significativas no padrão e percentual de perda de massa está diretamente relacionado com a presença e o tipo dos diferentes dopantes na estrutura do PPy (Goel et al., 2010), confirmados pelos termogramas apresentados na Figura 5.14 que ilustram comportamentos similares para aqueles PPy dopados com o mesmo íon dopante. O PPy-APTS e PPy-PTS, dopados com o mesmo íon aniônico (PTS⁻), apresentam suas curvas térmicas bastante similares, assim como o PPy-FeCl₃ e o PPy-HCl. Os íons dopantes para o PPy na reação sem dopante específico são os íons Cl⁻ provenientes do oxidante (FeCl₃) que dopam a cadeia do PPy, por isso a similaridade de comportamento térmico entre o PPy-FeCl₃ e PPy-HCl. O PPy-ADBS é o que apresenta a mais drástica diferença de comportamento com relação aos demais, afirmando a influência direta dos dopantes na estrutura do PPy e estando de acordo com a literatura que evidência que os dopantes alteram as propriedades quando presentes no produto (Yang et al., 2002; Goel et al., 2010). Portanto os comportamentos térmicos apresentados reforçam os resultados da análise de infravermelho de que os dopantes aniônicos incorporam na estrutura do PPy (Osmatova et al., 2003).

A Figura 5.15 ilustra os termogramas dos PPy dopados com o APTS a partir de sínteses com pequenas alterações em suas condições reacionais e observa-se que as curvas apresentam comportamentos bastante semelhantes, porém o PPy-APTS que resultou na morfologia de fibras apresentou após 400 °C um menor decaimento na quantidade de perda de massa e nos 600 °C possui o maior % de resíduo, logo possui a melhor estabilidade térmica com relação as demais amostras. O PPy-APTS (da síntese c/agitação e morfologia de fibras) apresenta uma curva termogravimétrica com leve diferença de decaimento com relação ao PPy-APTS (reação padrão de obtenção das fibras que ocorre em repouso), evidenciando que as condições reacionais também podem influenciar, mesmo que de modo tímido, nas propriedades térmicas do produto (Yang et al., 2002; Goel et al., 2010; Balint, Cassidy e Cartmell, 2014).

A curva do particulado PPy-APTS obtido da síntese em temperatura ambiente apresentou o maior decaimento térmico após 250 °C e o menor % de resíduo no

final da análise, assim indicando que as sínteses em temperatura $\leq 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ favoreceram um produto com melhor estabilidade térmica.

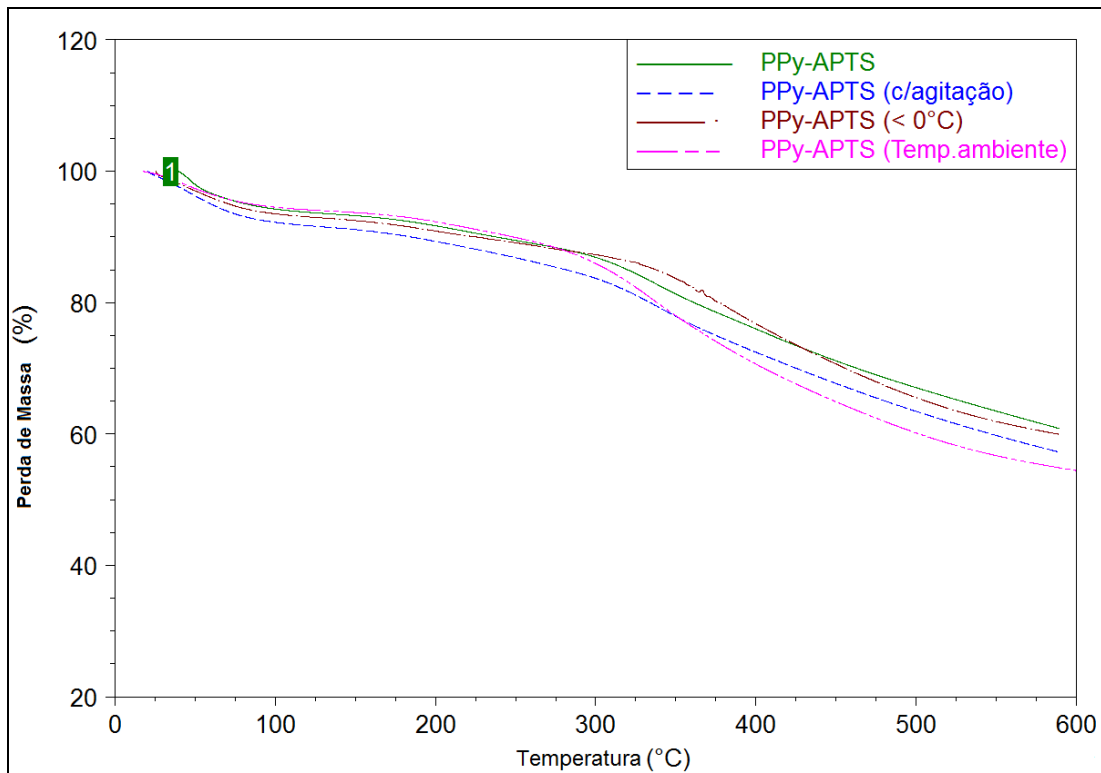


Figura 5.15. Termogramas dos PPy-APTS de reações com pequenas modificações. PPy-APTS e PPy-APTS (c/agitação) têm morfologia de fibra e os demais PPy dopados tem forma particulada.

A Tabela 5.3 resume o comportamento térmico dos PPy dopados com APTS.

Tabela 5.3. Porcentagem de resíduo até 600° C do PPy dopado com APTS.

Temperatura (°C)	100	200	300	400	500	600
Amostras	Resíduo (%)					
PPy – APTS *	94	92	87	76	67	61
PPy – APTS * (c/agitação)	92	89	84	72	63	57
PPy – APTS (< 0 °C)	94	91	87	77	66	60
PPy– APTS(Temp. ambiente)	95	92	86	71	60	54

Obs: PPy – APTS* com morfologia de nanofibras.

A ordem de estabilidade térmica dos PPy dopados com APTS com pequenas modificações nas condições de síntese neste estudo é PPy-APTS > PPy-APTS (< 0°C) > PPy-APTS (c/ agitação) > PPy-APTS (Temp. ambiente), respectivamente.

Neste estudo as fibras de PPy-APTS obtiveram o melhor comportamento térmico com relação as demais amostras de PPy, indo de encontro com resultados apresentados por Goel et al. (2010) que também obteve nanofibras de PPy na presença do dopante APTS de melhor estabilidade térmica com relação a outras nanofibras de PPy dopadas (outros dopantes).

As diferentes morfologias apresentadas nas imagens de MEV em conjunto com os diferentes comportamentos de estabilidade térmica apresentados pelos PPy dopados neste estudo estão de acordo com as evidências apresentadas na literatura que indicam a forte influência dos dopantes e das condições reacionais específicas nas propriedades térmicas e morfológicas finais do produto (Kang e Geckeler et al, 2000 ; Yang et al.,2002; Osmatová et al., 2003; Goel et al.,2010; Balint, Cassidy e Cartmell, 2014).

A condutividade elétrica é outra propriedade sensível e afetada pela estrutura dos dopantes e condições de síntese (Kang e Geckeler et al, 2000; Yang et al.,2002; Osmatová et al., 2003; Goel et al.,2010; Rahman et al., 2012; Balint, Cassidy e Cartmell, 2014). No geral encontra-se uma ampla faixa de comportamento da condutividade elétrica, passando de isolantes para semicondutores e até condutores de altos valores. Na literatura alguns estudos apontam para os PPy dopados com variados dopantes um comportamento na faixa de semicondutores entre $10^{-7} - 10^2$ S/cm (Yang et al., 2012). Infelizmente autores relatam que a condutividade elétrica dos polímeros quando sintetizados pelo método químico apresentam sempre valores mais baixos do que seus homólogos via síntese eletroquímica (Balint, Cassidy e Cartmell, 2014).

A Tabela 5.4 resume os valores de condutividade elétrica encontrados para os PPy dopados com os diferentes dopantes deste estudo.

Tabela 5.4. Condutividade elétrica para o PPy dopado com diferentes dopantes.

Amostras	Condutividade elétrica (S/cm)
PPy-APTS	8.10^{-4}
PPy- PTS	3.10^{-1}
PPy-ADBS	4.10^{-3}
PPy-FeCl ₃	ND
PPy-HCl	ND

Obs: PPy-APTS com morfologia de nanofibras; ND: não determinado.

Os resultados de condutividade elétrica encontrados neste estudo indicam uma melhor condutividade para o PPy-PTS, seguido do PPy-ADBS e PPy-APTS, respectivamente. Os PPy avaliados neste estudo apresentam valores na faixa de semicondutores, porém valores mais próximos seriam esperados para os PPy dos dopantes APTS e PTS que possuem o mesmo íon dopante, mas não foi verificado tal similaridade neste estudo. Estes pequenos desvios de resultados de condutividade elétrica podem ser atribuídos à extrema sensibilidade da propriedade as condições de síntese e influência dos reagentes (Kang e Geckeler et al., 2000; Yang et al., 2002; Osmatová et al., 2003; Goel et al., 2010; Rahman et al., 2012; Balint, Cassidy e Cartmell, 2014), pois sabe-se que a condutividade elétrica do polímero resultante é extremamente sensível à escolha da pureza do solvente, da natureza do oxidante, da concentração relativa dos reagentes, tempo de reação, temperatura, velocidade de agitação, etc, tornando a síntese química uma via de difícil reprodutibilidade de resultados (Calvo et al., 2002). Outros detalhes mais sutis, como a ordem de adição dos reagentes, velocidade de agitação, tempo de trabalho, solvente utilizado para a limpeza do produto, pureza dos solventes e das condições de trabalho (inertes ou atmosféricas) parecem ter efeitos ainda mais graves sobre os resultados e devido a estas condições experimentais bastante específicas e delicadas que são vários os grupos de pesquisadores que reivindicam e ressaltam

problemas para a reprodução de alguns resultados (Kang e Geckeler et al, 2000; Calvo et al., 2002).

A obtenção de elevados valores para a condutividade elétrica para os PCs quando à síntese é pelo método químico é difícil, pois além da influência da estrutura do dopante nas propriedades, o produto também é sensível às condições de síntese (Goel et al., 2010; Osmatová et al., 2003; Balint, Cassidy e Cartmell, 2014). Portanto, as condições estabelecidas neste estudo para a síntese de PPy foram favoráveis para obtenção de PPy com condutividade elétrica na faixa de semicondutores.

Apesar dos baixos valores para a condutividade elétrica dos produtos de PPy neste estudo, o método químico é o mais simples e barato com relação a outros métodos de síntese para obtenção de polímeros condutores e os valores encontrados estão de acordo com a faixa de semicondutores referenciada por alguns autores (Yang et al., 2002; Yang et al., 2012).

5.2. Preparação dos filmes de PLGA

Filmes de PLGA foram obtidos pelo método da evaporação do solvente e foram avaliadas as superfícies obtidas quando preparadas com e sem fluxo de nitrogênio. As Figuras 5.16 e 5.17 mostram as superfícies dos filmes obtidos, verificando-se uma superfície porosa quando preparada com o fluxo de nitrogênio e uma superfície lisa quando a etapa da evaporação do solvente transcorreu sem a corrente contínua de gás de N₂.

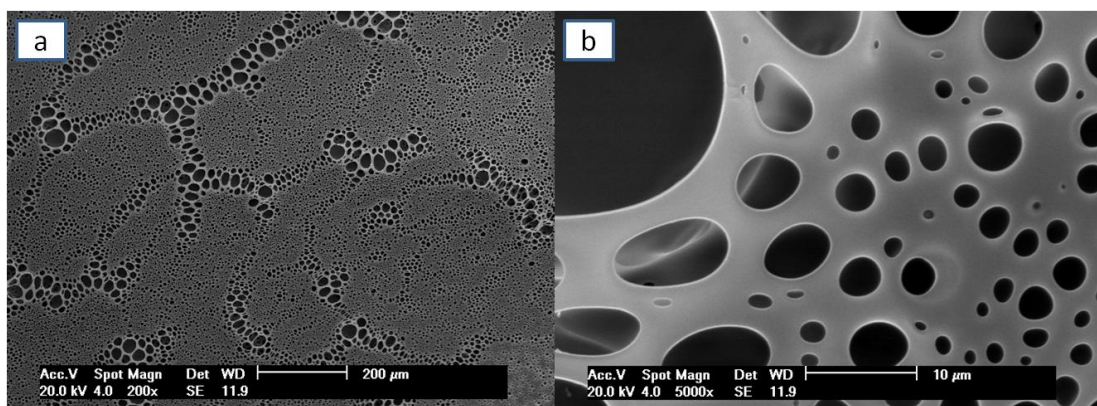


Figura 5.16. a) e b) Imagens de MEV da superfície de filmes de PLGA (0,2g) sob fluxo de nitrogênio.

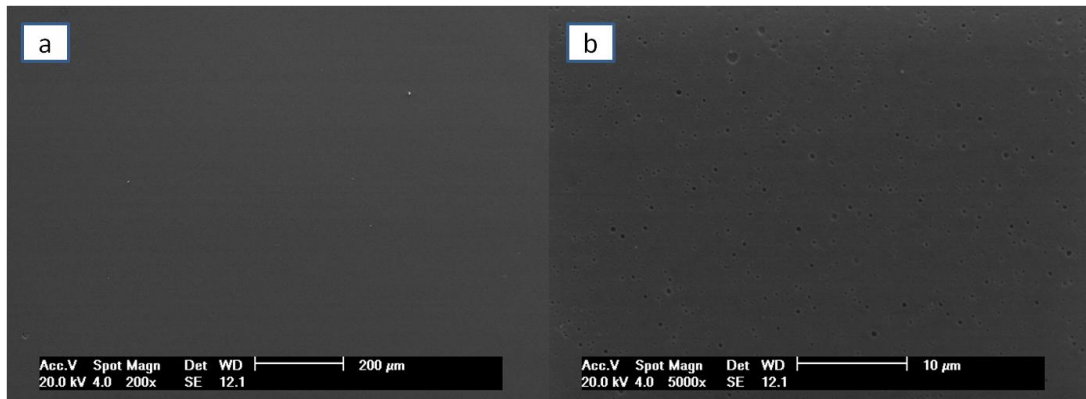


Figura 5.17. a) e b) Imagens de MEV da superfície de filmes de PLGA (0,2g) sem fluxo de nitrogênio.

Devido à grande porosidade irregular apresentada pelo filme de PLGA quando preparado na presença de fluxo de gás de N_2 e com o objetivo de evitar a difusão de fármacos ou fatores de crescimento (FC) para o exterior do suporte polimérico que será preparado a partir de filmes poliméricos (matriz de PLGA) utilizando-se o método da evaporação do solvente, optou-se pelo método de preparo dos filmes sem o fluxo de gás de N_2 . A porosidade irregular apresentada pelo filme quando na presença de fluxo de gás N_2 pode vir a facilitar a difusão do FC e por isso os filmes preparados neste estudo foram confeccionados sem o fluxo de gás N_2 , pois a porosidade é um parâmetro que deve ser melhor explorado em futuros estudos.

5.3. Preparação dos nanocompósitos de PLGA/PPy

5.3.1. Método A

Na preparação dos nanocompósitos de PLGA/PPy pelo método A descrito no item 4.2.3, as nanofibras de PPy foram diretamente polimerizadas sobre a matriz de PLGA. Na preparação dos compósitos de PLGA/PPy o PPy foi sintetizado utilizando o APTS como dopante na razão [APTS]:[Py] de 4:1, pois somente nestas condições foram obtidas as nanofibras conforme descrito anteriormente.

Na tentativa de verificar a influência da superfície de PLGA na síntese de nanofibras, foram caracterizadas por MEV, separadamente, o PPy removido pelo

processo de lavagem com água e etanol e a superfície do filme de PLGA contendo o PPy aderido, isto é, o que não foi removido pela lavagem.

A Figura 5.18 ilustra as fibras de PPy que foram removidas da superfície da 1ª camada de PLGA por meio da lavagem com água e etanol. Observa-se que a reação de polimerização do pirrol na superfície do PLGA resultou na morfologia de fibras, indicando a formação das fibras diretamente sobre o filme de PLGA.

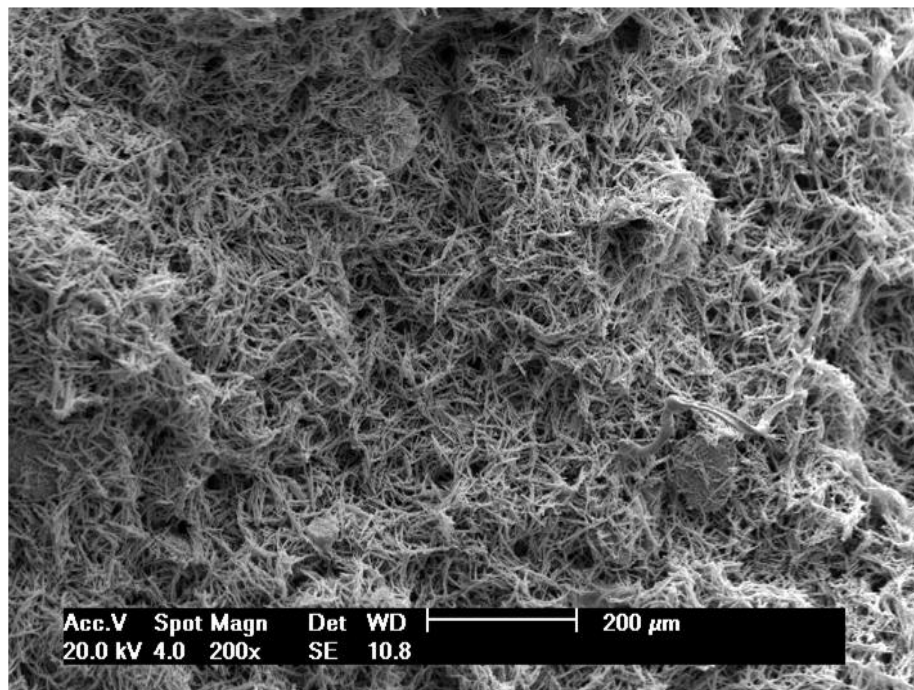


Figura 5.18. Imagem de MEV de fibras de PPy com dopante APTS removidas da polimerização sobre filme de PLGA. Técnica descrita no item 4.2.3.

Com o auxílio da Figura 5.19 que ilustra as fibras da Figura 5.18 com maior ampliação é possível verificar que as fibras formadas apresentam particulados em toda a sua estrutura fibrosa. Segundo Huang e Kaner (2004) na polimerização da polianilina (PANI) a unidade morfológica básica inicialmente formada parece ser nanofibras com diâmetro médio de 30-35 nm; porém quando as condições experimentais não são adequadamente controladas as nanofibras inicialmente formadas tornam-se suporte para o crescimento secundário da PANI resultando em aglomerados com forma irregular, contendo pequenas quantidades de nanofibras e principalmente particulados aglomerados. A Figura 5.19 parece indicar o início de um processo semelhante à síntese da PANI quando a polimerização do Py ocorre na superfície do filme de PLGA.

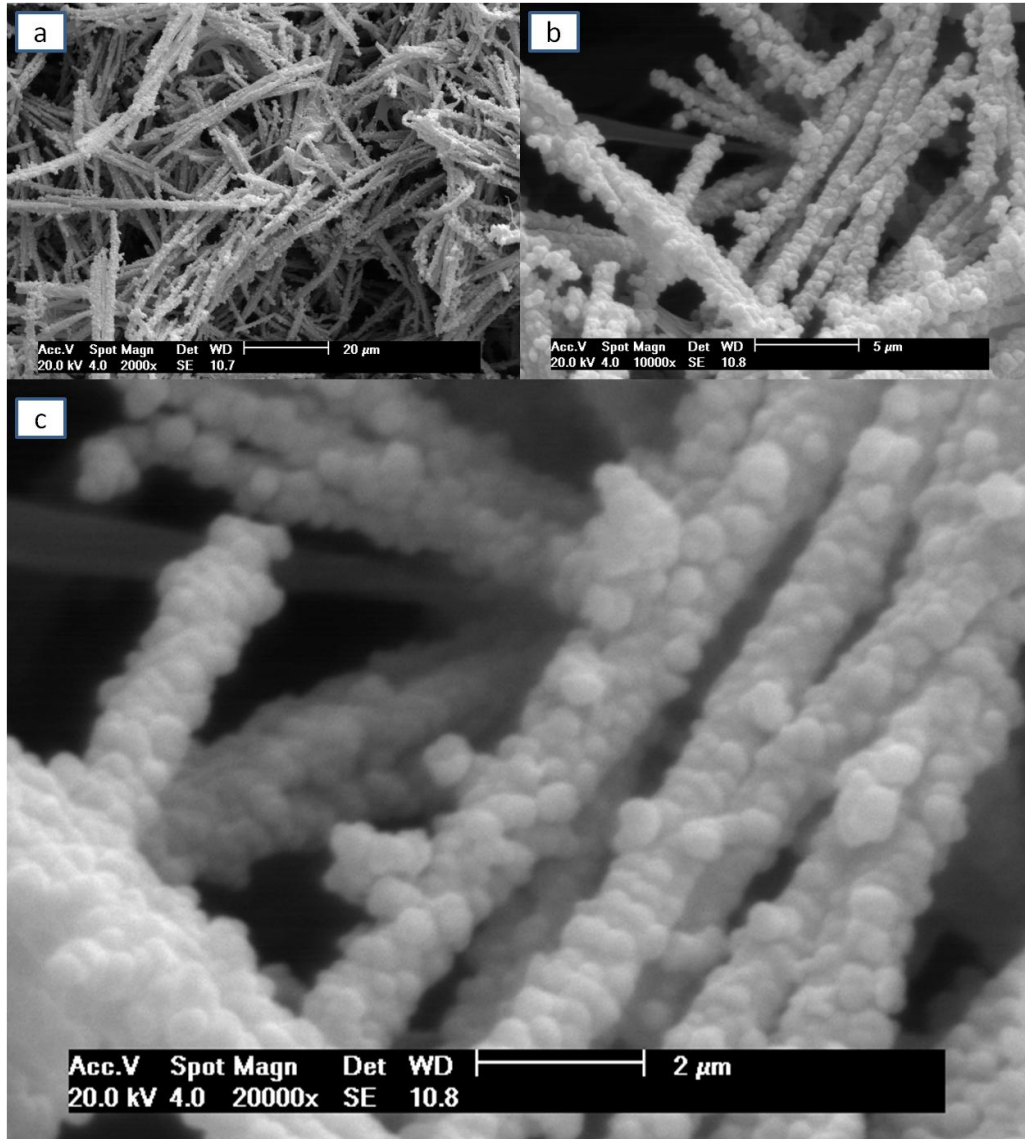


Figura 5.19. a) b) e c) Imagens de MEV em diferentes magnitudes das fibras de PPy com dopante APTS removidas da polimerização sobre o filme de PLGA. Técnica descrita no item 4.2.3.

A Figura 5.20 ilustra o filme de PLGA com PPy aderido depois da remoção do excesso de nanofibras de PPy sobre a superfície do filme. Não foi possível verificar a morfologia de fibras no PPy aderido diretamente na superfície do filme, ao contrário do que foi verificado no restante do PPy removido pela lavagem com água e etanol, conforme as Figuras 5.18 e 5.19.

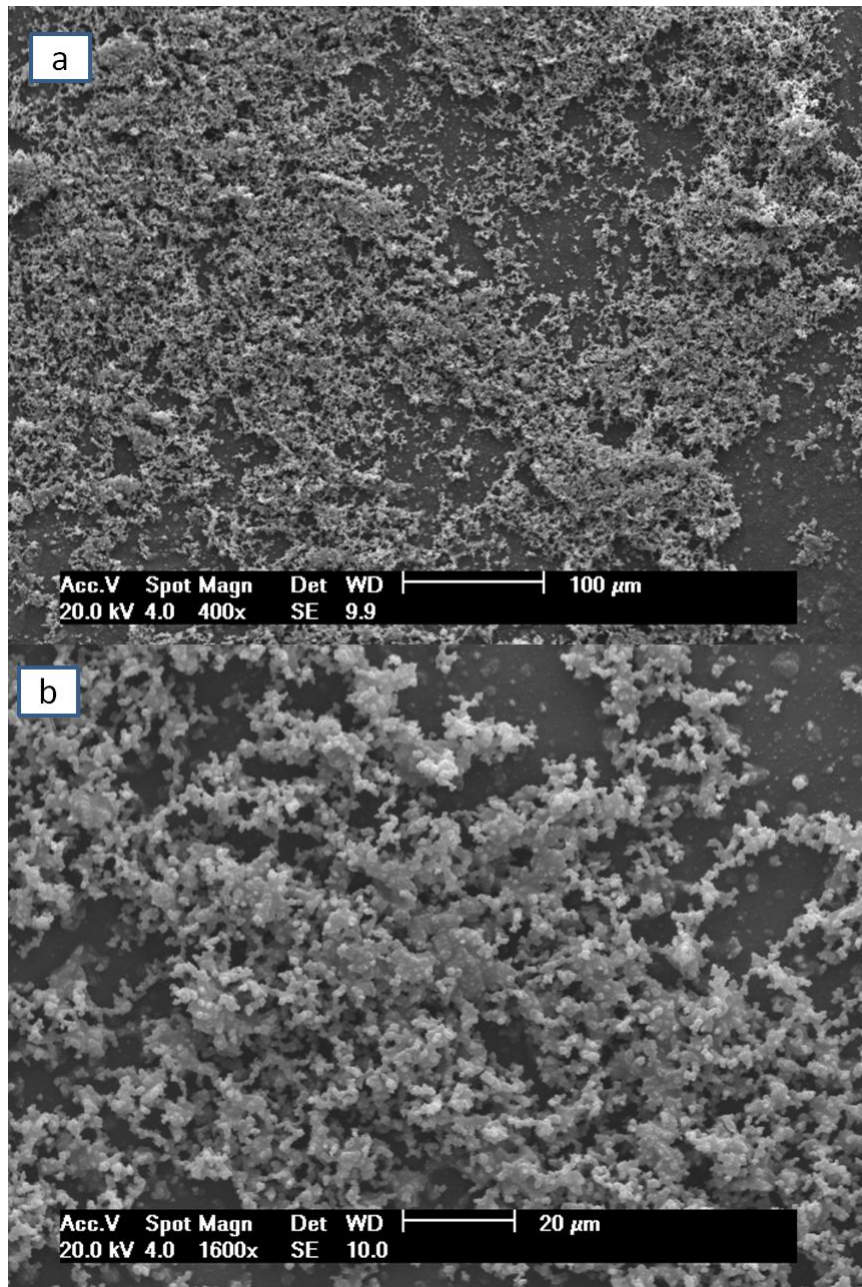


Figura 5.20. a) e b) Imagens de MEV em diferentes magnitudes do filme de PLGA com o pó resultante da reação de PPy com dopante APTS que ficou aderido sobre o filme. Técnica descrita no item 4.2.3.

Na tentativa de obter a morfologia de fibras aderida na superfície de filmes de PLGA a técnica (método A) foi repetida várias vezes.

A Figura 5.21 ilustra a superfície de outro filme de PLGA com PPy aderido na superfície e observa-se que a dispersão do PPy na superfície do filme não é homogênea, assim como na imagem anterior (Figura 5.20).

A partir das imagens das Figuras 5.20 e 5.21 também é possível observar que a superfície dos filmes de PLGA não sofreram modificações pós-reação química do PPy diretamente em suas superfícies, pois as regiões que não estão cobertas com o PPy permanecem com suas superfícies lisas, assim como na Figura 5.17 que se refere a superfície lisa de filme de PLGA.

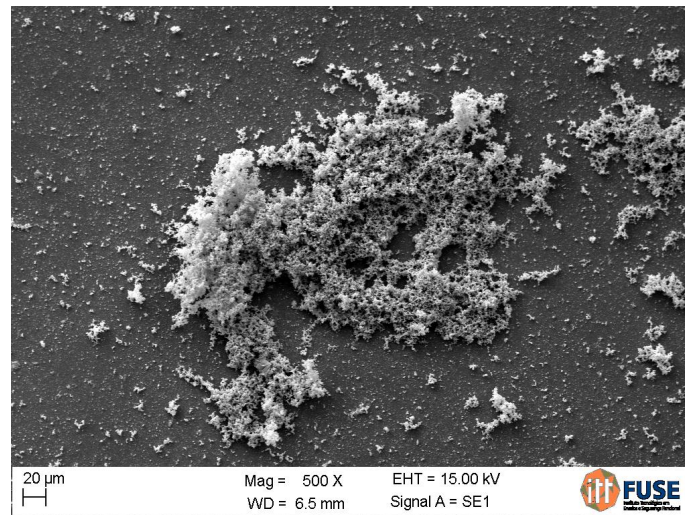


Figura 5.21. Imagens de MEV do filme de PLGA com o pó resultante da reação de PPy com dopante APTS que ficou aderida sobre o filme. Técnica descrita no item 4.2.3.

A Figura 5.22 apresenta a imagem de MEV ampliada do PPy aderido sobre o filme de PLGA ilustrado anteriormente na Figura 5.21, confirmando que a morfologia que ficou aderida na superfície do filme de PLGA é a particulada globular.

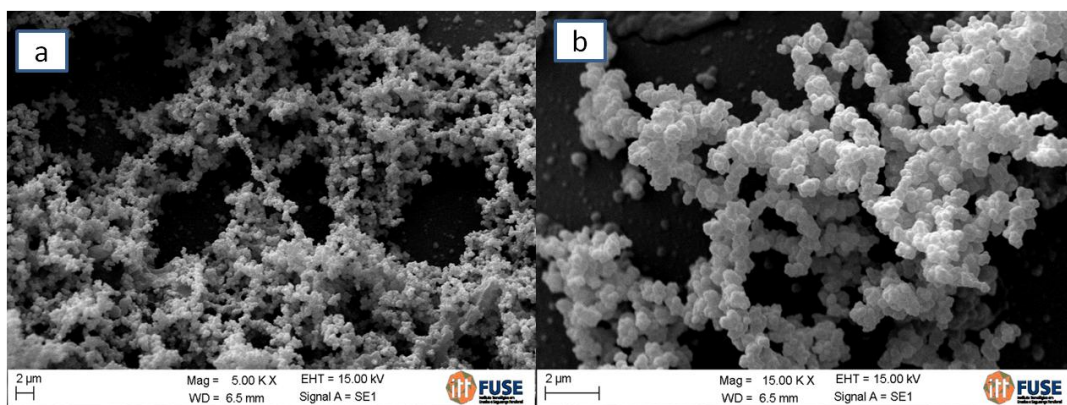


Figura 5.22. a) e b) Imagens de MEV em diferentes magnitudes do pó resultante da reação de PPy que ficou aderida sobre o filme de PLGA. Técnica descrita no item 4.2.3.

A Figura 5.23 novamente ilustra a morfologia fibrilar típica do PPy presente na solução de lavagem em todas as polimerizações realizadas por meio do método A. Portanto, os resultados de MEV indicam que as nanofibras de PPy se formam na

solução da reação de polimerização que ocorre em contato com os filmes de PLGA (5.18 e 5.23), porém o PPy que ficou aderido na superfície do filme apresenta a morfologia particulada (globular). Assim, indicando que na região de contato entre a superfície do filme de PLGA e a solução da reação química é mais difícil à formação da morfologia de fibras.

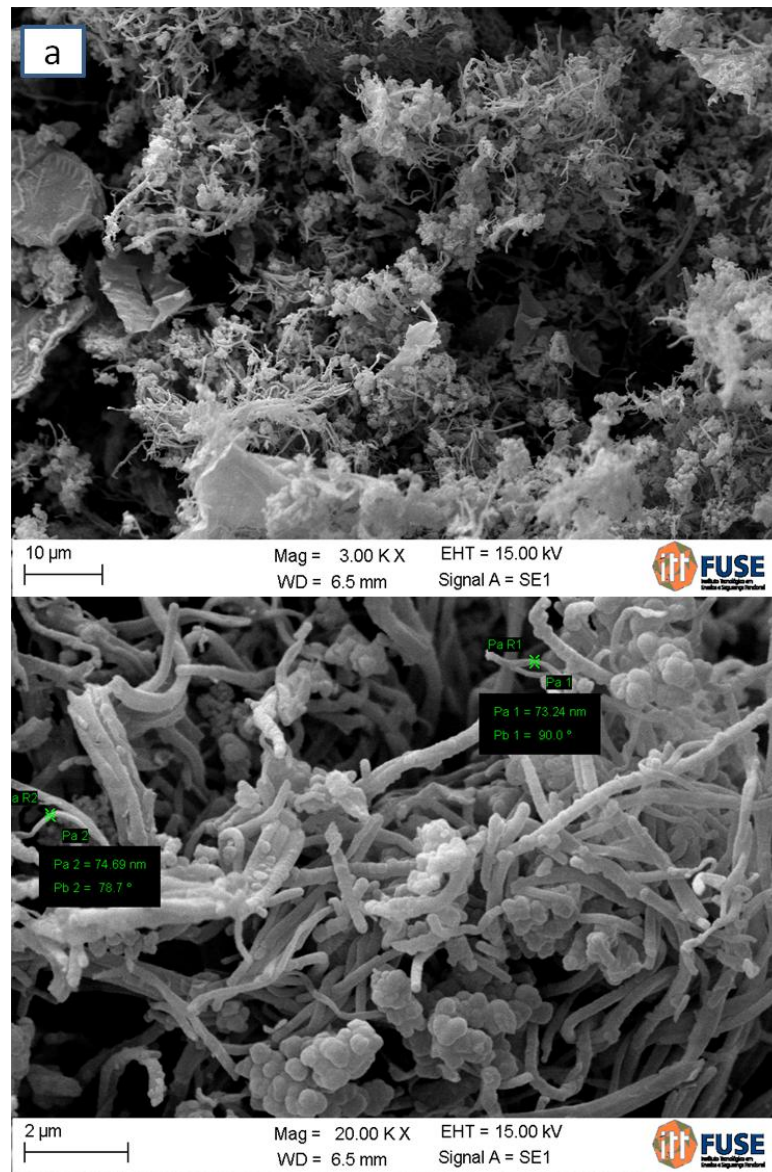


Figura 5.23. a) e b) Imagem de MEV de nanofibras de PPy com dopante APTS removidas da polimerização sobre filme de PLGA. Técnica descrita no item 4.2.3.

As diferenças morfológicas nas fibras formadas sobre o filme de PLGA pode estar relacionado com a temperatura adequada do sistema reacional, pois no tópico 5.1 observou-se que a temperatura foi um importante parâmetro para obtenção de nanofibras de PPy com o dopante APTS, sendo a condição ideal a temperatura de 0°C.

Lembrando que a escolha de solventes, tempo de reação e temperatura, como as técnicas utilizadas na polimerização são importantes fatores que influenciam nas propriedades finais do PPy (Rahman et al., 2012). Logo, o sistema reacional pelo método A adotado neste estudo não favoreceu o controle da temperatura ideal devido à solução da síntese não estar em contato direto com o banho de gelo como ocorre com o sistema padrão de síntese descrito no item 4.2.1. A Figura 5.24 ilustra todo o sistema reacional do método A adotado nesta etapa do estudo e observa-se que a solução da síntese de PPy pelo método A possui uma diferença de contato com o banho de gelo, pois além da barreira de vidro do frasco de Becker há também a superfície de vidro da placa de petri com uma camada do filme de PLGA e essas barreiras podem ter dificultado que a solução da síntese sobre o filme não mantivesse a temperatura adequada de 0°C e assim contribuindo e modificando as características das fibras obtidas nesta etapa.

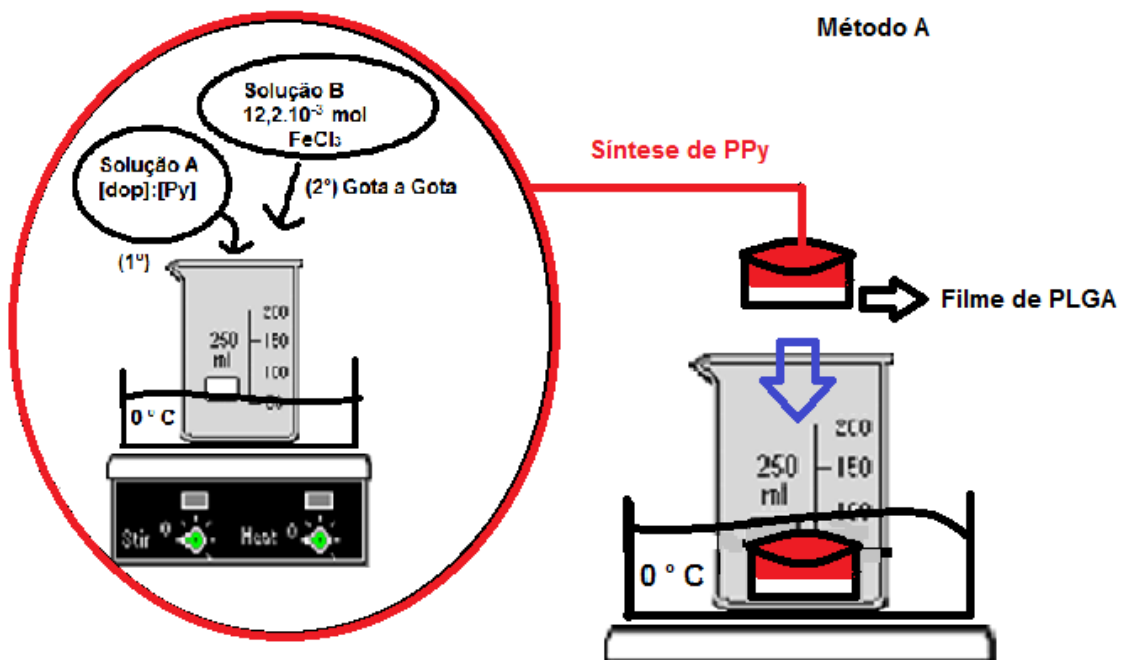


Figura 5.24. Diagrama esquemático do sistema reacional para síntese de polipirrol sobre filme de PLGA. Método A descrito no item 4.2.3.

5.3.2. Método B

Considerando que a morfologia de nanofibra não foi verificada para o PPy aderido na superfície do filme de PLGA pelo método A, outra metodologia foi avaliada: Método B.

Na preparação dos nanocompósitos de PLGA/PPy pelo método B descrito no item 4.2.3, inicialmente as nanofibras de PPy são obtidas pela síntese descrita no item 4.2.1, para depois serem dispersas na matriz de PLGA com o auxílio do banho de ultrassom. O pó de PPy utilizado nesta etapa foi aquele obtido da síntese com o dopante APTS e razão molar [dop]:[Py]=4, pois foi o dopante que neste estudo obteve-se a morfologia de fibra desejada para o PPy resultante.

Inicialmente preparou-se filmes de PLGA/PPy correspondente a 2ª camada (camada intermediária do sanduíche ou recheio) do sistema polimérico pelo Método B, a fim de caracterizar o filme compósito de PLGA/PPy como uma camada única (sem o recobrimento das camadas externas de PLGA) e para verificar o comportamento de dispersão das nanofibras de PPy na matriz de PLGA antes de montar todo o sistema polimérico em estrutura de sanduíche.

A Figura 5.25 mostra as fibras de PPy que ficaram recobertas por PLGA quando o tempo de dispersão do PPy em PLGA foi de 1h, sendo possível observar regiões concentradas de fibras de PPy não dispersos na matriz polimérica. A fim de melhorar a dispersão das fibras de PPy na matriz de PLGA o tempo de suspensão de PLGA e PPy em clorofórmio no banho de ultrassom foi estendido.

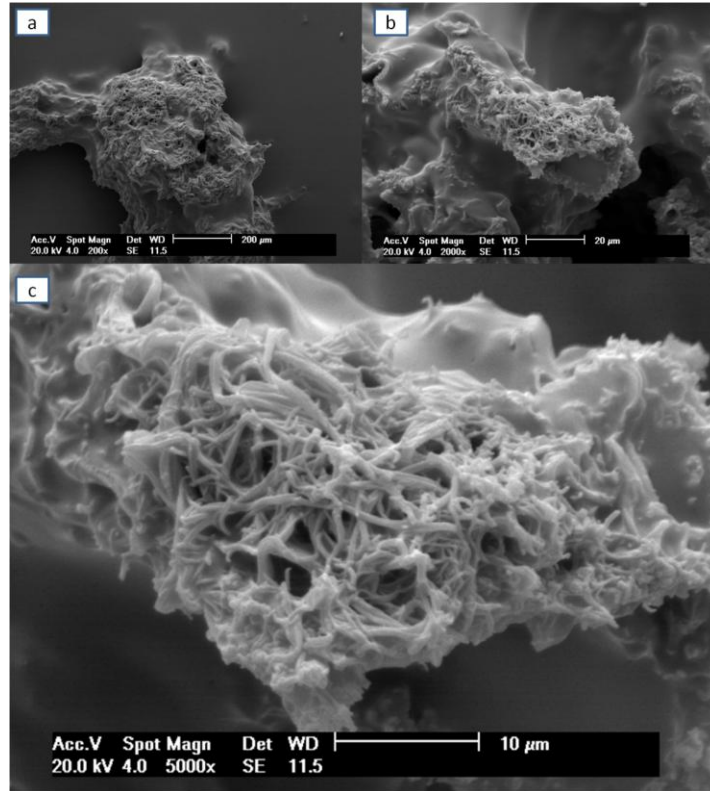


Figura 5.25. Imagens de MEV das fibras de PPy recobertas com PLGA. a) b) e c) 1h de dispersão em banho de ultrassom do PPy em 0,2 g de PLGA.

A Figura 5.26 mostra as imagens dos filmes nanocompósito de PLGA/PPy com diferentes tempos de dispersão das fibras de PPy em PLGA e observa-se que um maior tempo de banho de ultrassom (8h) resulta numa melhor dispersão do pó de PPy na matriz polimérica, mas ainda sendo possível observar a presença de pequenas regiões de concentrados de PPy em todos os tempos avaliados.

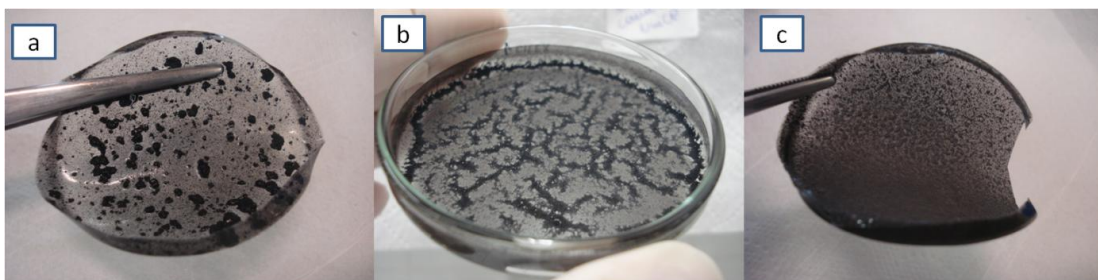


Figura 5.26. Imagens de nanocompósitos de PLGA (0,2 g) com fibras de PPy. Tempo de dispersão: a) 1h; b) 4h; c) 8h.

A Figura 5.27 mostra as micrografias de MEV obtidas para os filmes com 4h de dispersão no ultrassom. Pode-se observar o PLGA recobrindo as fibras de PPy nas regiões de maior aglomeração das fibras de PPy.

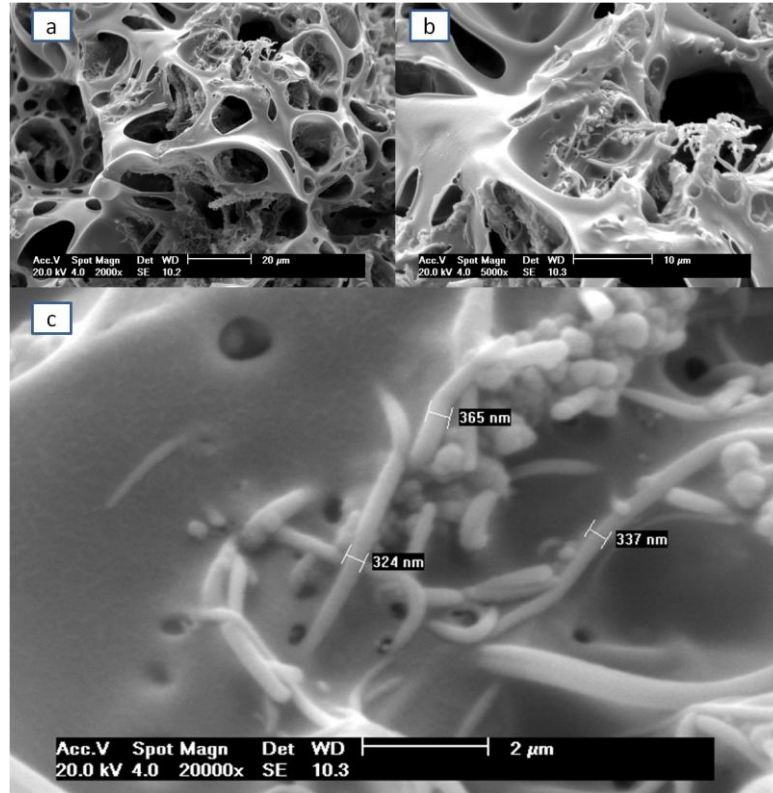


Figura 5.27. Imagens de MEV de fibras de PPy recobertas com PLGA (0,2 g). a) b) e c) Dispersão de 4h de banho de ultrassom do PPy em PLGA.

A Figura 5.28 ilustra os filmes obtidos com 8h de dispersão das fibras de PPy em PLGA (0,2 g) e as regiões de nanofibras de PPy apresentam-se mais recobertas pela matriz. Observa-se uma superfície com rugosidade e uma superfície com mais imperfeições quando comparada às imagens de filmes puros de PLGA ilustrado na Figura 5.17.

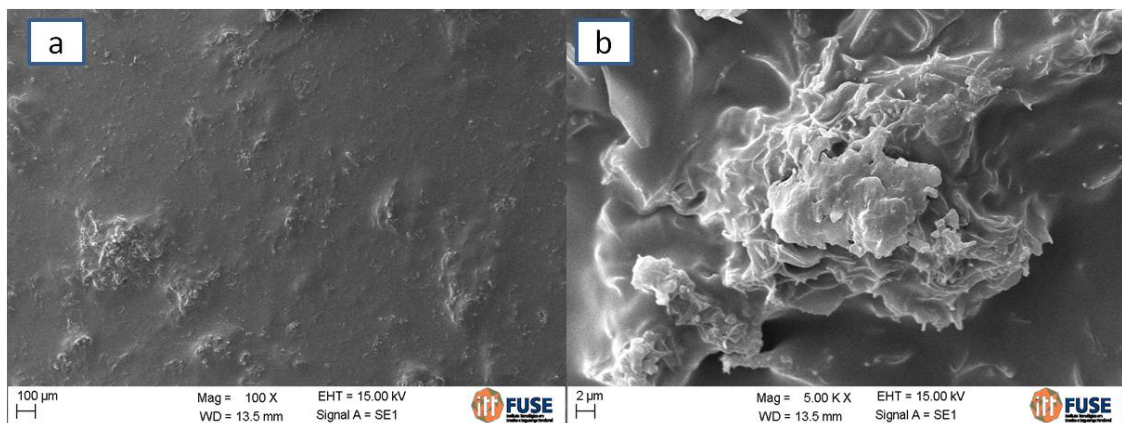


Figura 5.28. Imagens de MEV de fibras de PPy recobertas com PLGA (0,2 g). (a) e (b) Dispersão de 8h de banho de ultrassom.

A fim de testar a dispersão de PPy na forma particulada se preparou um filme de PLGA/PPy utilizando-se o PPy-APTS com morfologia predominantemente particulada e observou-se que a dispersão do PPy particulado é mais simples com relação a forma fibrilar. A Figura 5.29 ilustra o filme de PLGA/PPy (particulado) com dispersão bastante homogênea e sem regiões visíveis de aglomerados do PPy.

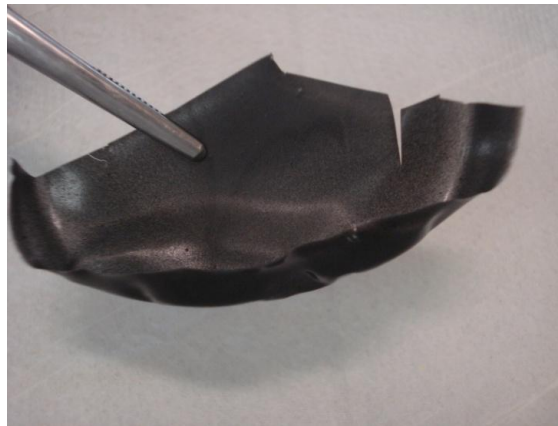


Figura 5.29. Imagem do filme de PLGA (0,2 g) com PPy-APTS na morfologia particulada (4h de banho de ultrassom).

As Figuras 5.30 e 5.31 ilustram uma superfície mais porosa para o filme preparado com a forma particulada do PPy e com 4h de ultrassom. Observar-se uma superfície mais heterogênea e com poros, não é possível observar a forma particulada do PPy como acontece com a morfologia fibrilar, indicando que a dispersão da forma particulada do PPy é mais fácil e requer menos tempo para dispersão.

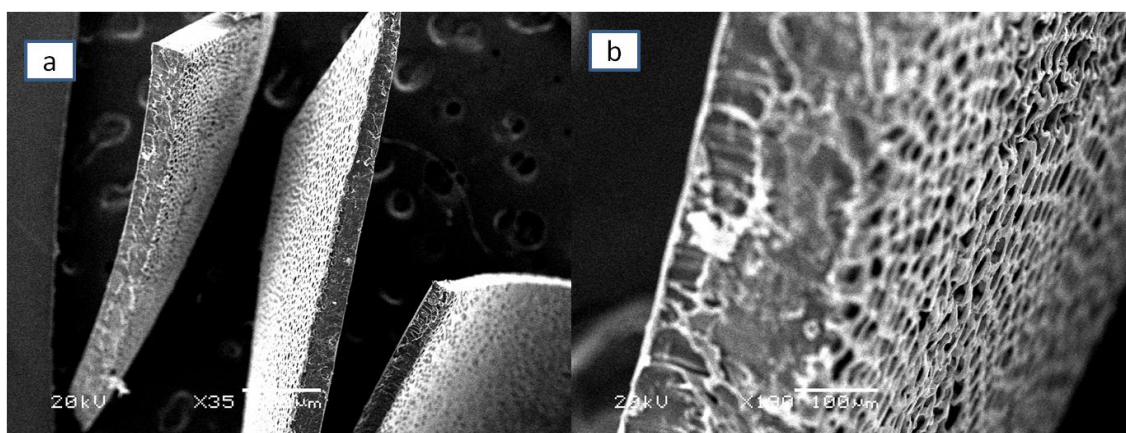


Figura 5.30. a) e b) Imagens de MEV do filme composto de particulados de PPy em PLGA (0,2 g) com 4h de dispersão em banho de ultrassom. Camada representante da camada interna do filme quando estruturado em forma de sanduíche (técnica descrita no item 4.2.3).

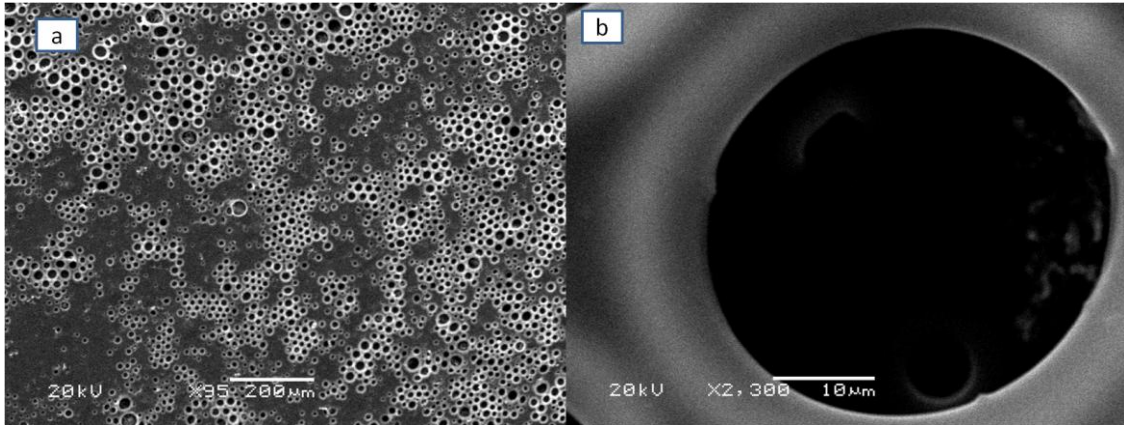


Figura 5.31. Imagens de MEV do filme composto de particulados de PPy em PLGA com 4h de dispersão em banho de ultrassom. Camada representante da camada interna do filme quando estruturado em forma de sanduíche (técnica descrita no item 4.2.3).

Para a dispersão do PPy na forma fibrilar adotou-se neste estudo o tempo mínimo de 8h em banho de ultrassom para se conseguir uma maior dispersão e distribuição das fibras de PPy na matriz de PLGA.

A estrutura molecular dos filmes de PLGA/PPy foram avaliadas por Infravermelho por Transformada de Fourier com acessório de reflexão UATR, conforme ilustrada na Figura 5.32.

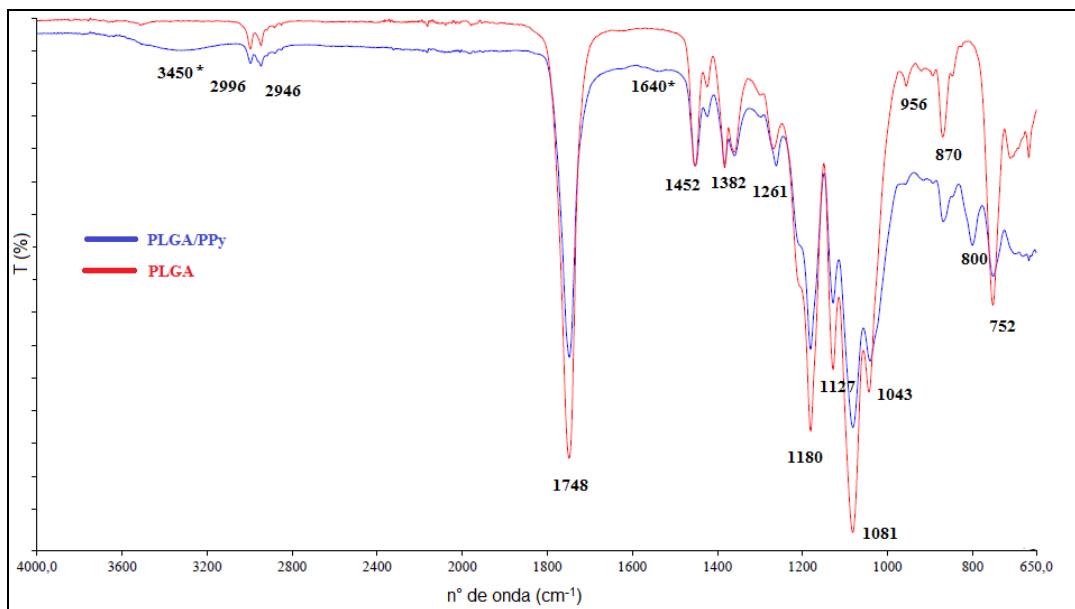


Figura 5.32. Espectroscopia de IV dos filmes de PLGA e do nanocompósito de PLGA/PPy (única camada).

A partir da Figura 5.32 observa-se um sinal forte em 1748 cm^{-1} correspondente ao grupo carboxil (-COO-) presente na estrutura do copolímero PLGA. As outras bandas e sinais que caracterizam o PLGA estão de acordo com valores apresentados na literatura (Erbeta et al., 2012). As bandas em 3450 e 1640 cm^{-1} são características de PPy (Shen e Wan, 1998; Osmatová et al., 2003; Goel et al., 2010; Xia et al., 2011; Yu, Dai e Lan, 2011) e a ausência de sinal na região de 3450 cm^{-1} (característico do grupo hidroxil) indica que o filme de PLGA é anidro (Erbeta et al., 2012); deste modo reforçando que o sinal na região de 3450 cm^{-1} é referente ao PPy presente no sistema compósito de PLGA/PPy. Não se observa nenhum novo sinal no espectro do compósito, indicando que houve apenas interações do tipo Van der Waals entre o PLGA e o PPy (Yu, Dai e Lan, 2011).

Os MEVs das superfícies dos filmes preparados estruturalmente na forma de sanduíche pelo Método B serão apresentados no item de número 5.6, pois serão apresentados juntamente com os resultados do comportamento de degradação destes sistemas poliméricos.

5.4. Preparação de nanofibras de PPy funcionalizadas com fator de crescimento

A funcionalização do polipirrol com o fator de crescimento (FC) envolve duas etapas de síntese. Na primeira etapa o pirrol é polimerizado na presença do 1-(2 carboxietil)pirrol (Py-COOH) a fim de inserir na cadeia do polipirrol grupos funcionais de carboxila (PPy-COOH). Na etapa seguinte o FC, FK506, é incorporado na cadeia polimérica por meio de reação com os grupos de carboxila (-COOH). A Figura 5.33 ilustra um esquema das etapas de reação para a incorporação do FC na cadeia do PPy-COOH (polipirrol funcionalizado).

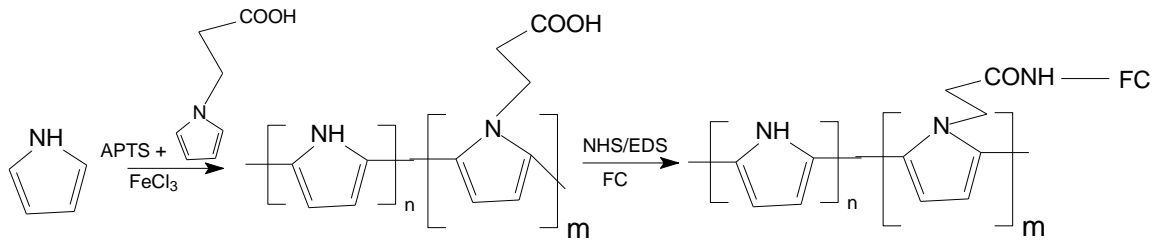


Figura 5.33. Esquema das etapas de preparação do PPy funcionalizado e ligado com FC. NHS: N-Hidroxisuccinimida; EDS: 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida; FC: FK506. Adaptado de Lee et al., 2006.

A metodologia utilizada para a obtenção de nanofibras de PPy funcionalizadas com o Py-COOH ocorreu por meio da polimerização química conforme descrito no item 4.2.1. O dopante utilizado foi o APTS e razão molar [dop]:[Py] = 4. Na primeira tentativa de funcionalização foi utilizado uma relação molar entre o [Py-COOH]:[Py] de [1]:[1]. A Figura 5.34 mostra as micrografias da amostra do PPy (PPy-COOH) obtido na presença do funcionalizador (Py-COOH) durante a síntese e observa-se a presença da morfologia particulada apesar do uso da mesma metodologia e condições reacionais que foram obtidas as fibras de PPy-APTS. A morfologia de PPy na presença do Py-COOH foi predominante de particulados (partículas globulares).

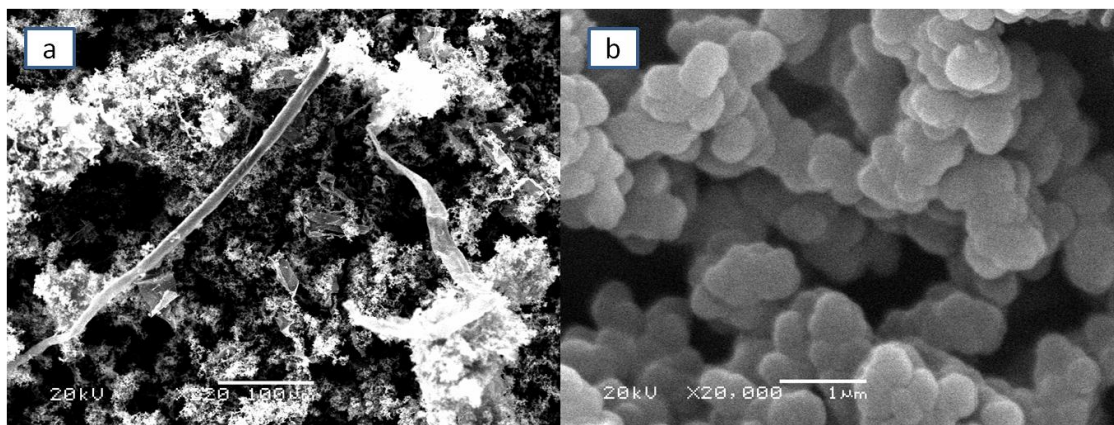


Figura 5.34. Imagens de MEV do PPy-APTS na presença do 1-(2 carboxietil)pirrol na razão de [1]: [1] do [funcionalizador]:[monômero]. Técnica descrita no item 4.2.4.

Na tentativa de obtenção de fibras de polipirrol funcionalizadas (PPy-COOH) com o grupo funcional carboxila duas outras razões molares entre funcionalizador e pirrol foram avaliadas: [1,5]: [1] e [0,5]: [1].

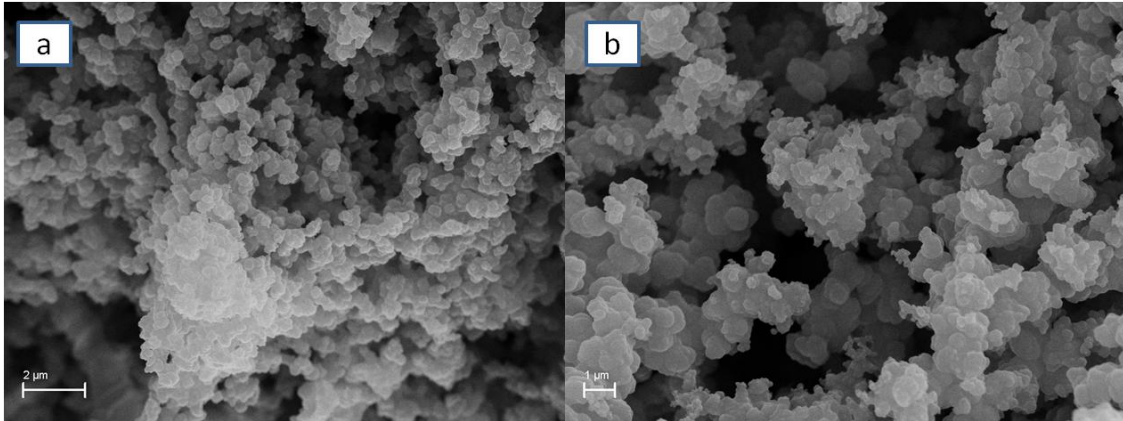


Figura 5.35. Imagens de MEV do pó resultante da síntese química para funcionalização de nanofibras de PPy. Razão [funcionalizador]: [monômero] em a) [1,5]: [1] e b) [0,5]: [1]. Técnica descrita no item 4.2.4.

A partir das Figuras 5.34 e 5.35 é possível observar que não houve a formação de nanofibras de PPy na presença do 1-(2 carboxietil)pirrol em nenhuma das razões molares avaliadas neste trabalho.

A estrutura molecular das amostras de PPy-COOH, PPy sintetizado na presença do funcionalizador (Py-COOH), foram avaliados por meio da espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) no intervalo de $400-4000\text{ cm}^{-1}$. A Figura 5.36 ilustra o espectro de infravermelho do funcionalizador puro para a verificação do pico característico do grupo da funcionalidade carboxila (-COOH) (Lee et al., 2006).

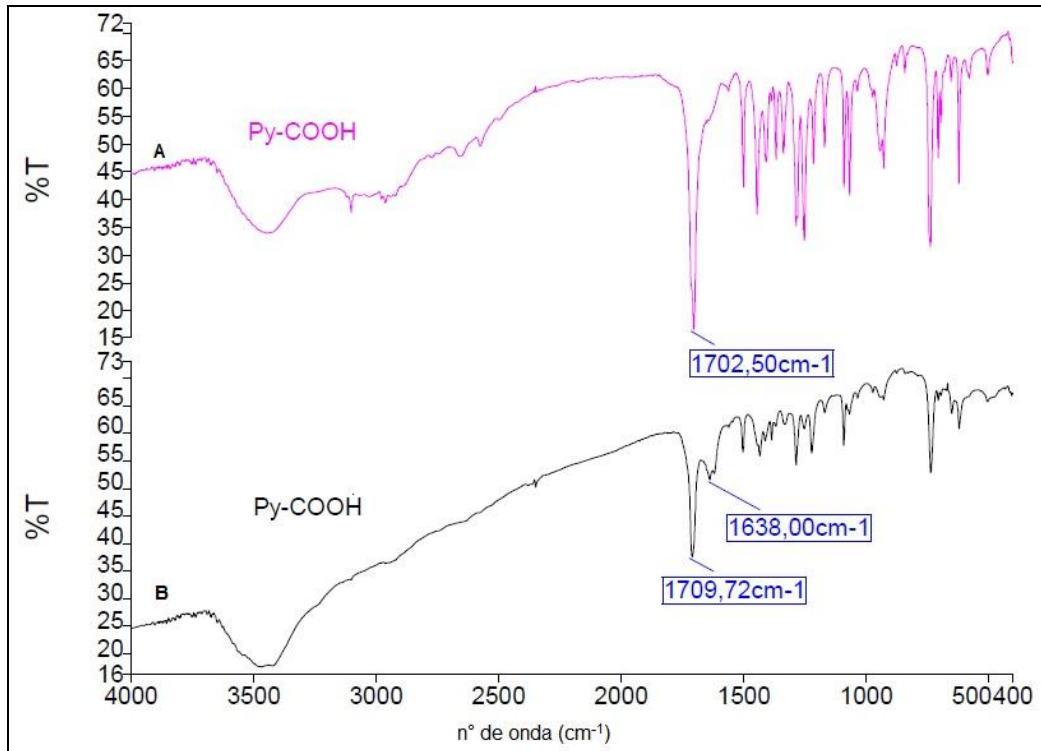


Figura 5.36. Espectroscopia de infravermelho do funcionalizador 1-(2 carboxietil)pirrol (Py-COOH). Espectro A: funcionalizador puro misturado com KBr anidro. Espectro B: funcionalizador puro analisado com 4 vezes mais quantidade de KBr anidro (diluído em KBr).

A Figura 5.37 ilustra o espectro de infravermelho das amostras de PPy-COOH obtidas e todos os resultados demonstraram posições dos sinais similares as principais bandas de IV que estão associadas à estrutura de PPy (Wang et al., 2011), porém não foi possível observar o sinal característico do grupamento funcional -COOH em $\sim 1703 \text{ cm}^{-1}$ (Lee et al., 2006), sugerindo que o grupo funcional não incorporou na estrutura do produto final.

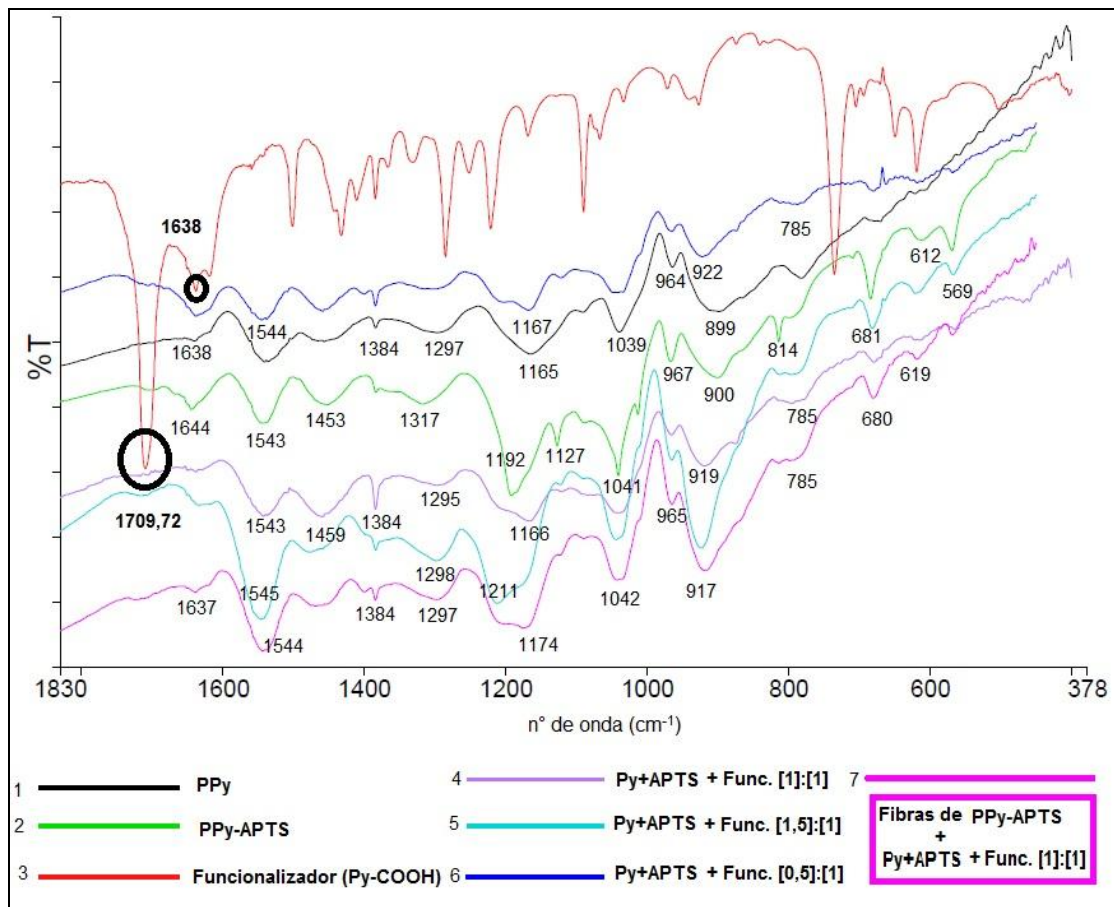


Figura 5.37. Espectroscopia de Infravermelho do Py sintetizado com APTS na presença do 1-(2-carboxietil)pirrol (Py-COOH). Razão Molar [funcionalizador]:[pirrol] presente na legenda dos espectros 4 a 7. Espectro 7: Síntese na presença de nanofibras de PPy-APTS.

Na Figura 5.37 verificam-se várias regiões com sinais semelhantes aos espectros das sínteses anteriores e que também apresentam alguns pequenos deslocamentos dos sinais e diferentes intensidades de absorção que podem ser atribuídos ao grau de dopagem, morfologia e as condições de síntese (Osmatová et al., 2003). Verifica-se sinais e bandas das principais vibrações de PPy em aproximadamente 1545, 1300, 1166, 1041 e 900 cm^{-1} para todos os espectros. Porém, não se observa o sinal característico atribuído ao grupo $-\text{COOH}$ em aproximadamente 1709 cm^{-1} , mesmo quando a razão entre o pirrol e o 1-(2-carboxietil)pirrol foi elevada para [1,5]:[1]. Estes resultados sugerem que o grupo $-\text{COOH}$ não foi incluído na cadeia do PPy.

Na busca por nanofibras de PPy funcionalizadas (PPy-COOH) uma segunda abordagem foi testada e a síntese para funcionalização foi realizada na presença de fibras de PPy-APTS preparadas previamente. A intenção era que ocorresse o depósito do PPy-COOH nas fibras presentes no sistema reacional, porém a falta do sinal característico do grupo funcional -COOH no espectro 7 da Figura 5.37, referente a esta nova tentativa de síntese, sugere que por essa via de síntese alternativa também não houve a inserção do grupo -COOH no produto final.

A Figura 5.38 mostra o comportamento térmico da amostra PPy-COOH obtida da síntese para funcionalização do PPy com o grupamento -COOH e observa-se que o decaimento da curva é bastante similar ao comportamento térmico apresentado pelo produto PPy-APTS. Tal comportamento reforça o resultado encontrado na espectroscopia de infravermelho de que não houve a inserção do grupamento funcional, logo justifica o comportamento térmico do PPy que deveria estar funcionalizado (PPy-COOH) sendo muito próximo ao comportamento apresentado pelo PPy-APTS.

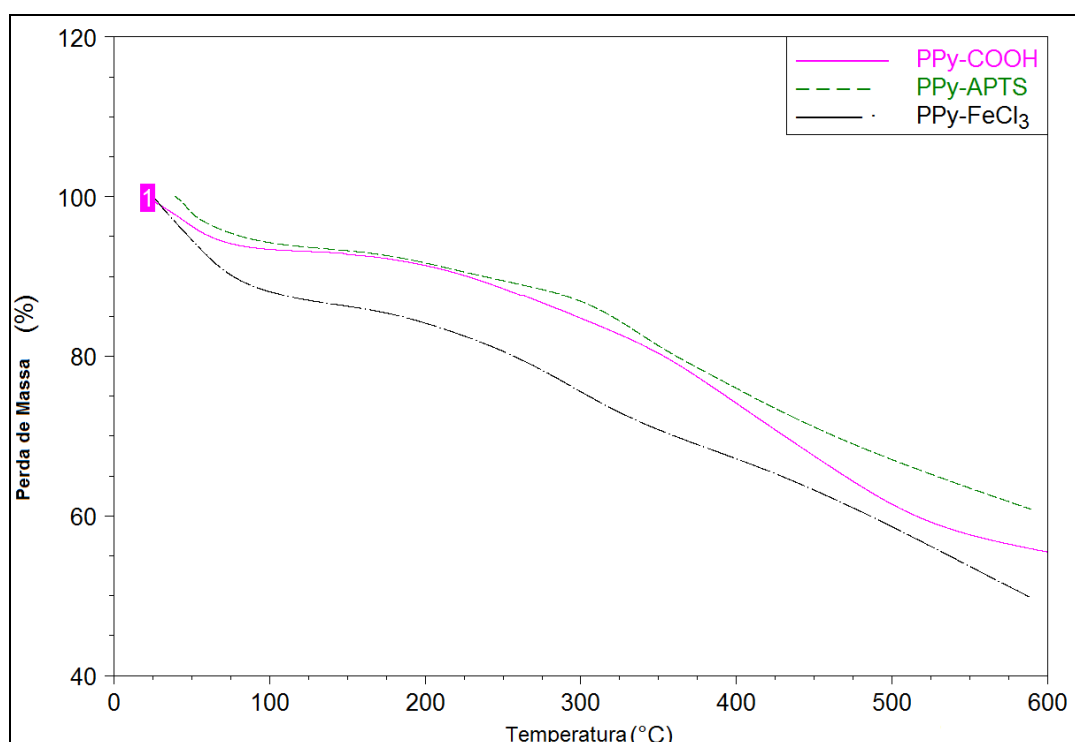


Figura 5.38. Termogramas de diferentes PPy dopados. PPy-COOH corresponde a amostra da síntese de obtenção de PPy na presença do funcionalizador com grupamento -COOH, conforme descrito no item 4.2.4.

A Tabela 5.4 detalha o comportamento térmico do PPy-COOH (não foi funcionalizado devido a falta do grupamento funcional desejado em sua estrutura) com relação aos PPy dopados com APTS e FeCl₃.

Tabela 5.4. . Porcentagem de resíduo até 600° C do PPy dopado com APTS, PPy- FeCl₃ e do PPy funcionalizado (PPy-COOH)

Temperatura (°C)	100	200	300	400	500	600
Amostras	Resíduo					
PPy – FeCl ₃	94	87	77	68	58	50
PPy – APTS	94	92	87	76	67	61
PPy-COOH	93	91	85	74	61	55

Obs: PPy – COOH amostra obtida da síntese de funcionalização do PPy (item 4.2.1); porém sem o grupamento –COOH na estrutura final.

A partir da Tabela 5.4 observa-se que o PPy-APTS manteve-se com o maior % resíduo quando comparado com o PPy-COOH que deveria ter presente em sua estrutura o grupo funcional -COOH. Até os 400 °C o decaimento de perda de massa se manteve igual para o PPy-APTS e PPy-COOH, reforçando que o grupamento funcional de fato não foi inserido na cadeia polimérica do produto. As diferenças finais nas curvas podem estar atribuídas à presença do reagente funcionalizador no meio reacional, uma vez já mencionado que além das condições de síntese, os reagentes e suas purezas também alteram as propriedades do produto (Kang e Geckeler et al, 2000; Yang et al.,2002; Osmatová et al., 2003; Goel et al.,2010; Balint, Cassidy e Cartmell, 2014).

Considerando que a reação de polimerização do pirrol na presença do 1-(2 carboxietil)pirrol não resultou em nanofibras, assim como não acorretou na inserção do grupo –COOH na cadeia polimérica e nem o depósito de PPy-COOH sobre as fibras pré prontas de PPy-APTS, uma outra abordagem foi adotada para preparação dos sistemas poliméricos contendo o FC desejado.

O sistema polimérico alternativo pode ser considerado como um sanduíche formado por duas camadas externas de PLGA e uma camada intermediária formada por nanofibras de PPy e o FC dispersos no PLGA. A diferença em relação a primeira abordagem é que o fator de crescimento não está ligado quimicamente na cadeia do PPy. Filmes de PLGA com fator de crescimento disperso diretamente também tem sido descrito na literatura para aplicações biomédicas (Muramoto et al., 2003; Gu et al., 2001; Phan e Schuind, 2011; Sebben et al., 2011).

5.5. Preparação dos nanocompósitos de PLGA/PPy/Tacrolimus

A preparação do filme nanocompósito de PLGA/PPy/FK506 e PLGA/FK506 foram preparados conforme descrito no item 4.2.5. Nesta abordagem alternativa a colocação do FC no sistema polimérico foi pela adição direta de uma solução do fármaco FK506 na solução de nanofibras de PPy com PLGA em clorofórmio e na solução pura de PLGA.

As Figura 5.39 e 5.40 ilustram os filmes preparados para verificação do comportamento da dispersão do FK506 nas soluções de PLGA e PLGA/PPy. Uma região esbranquiçada não visualizada no filme de PLGA puro é claramente observada no filme de PLGA com FK506 (Figura 5.39). A presença do fármaco alterou o comportamento de dispersão do PPy no PLGA e regiões com maiores aglomeramentos das fibras de PPy são facilmente observados no filme de PLGA/PPy com FK506 (Figura 5.40). Optou-se por usar uma pequena dosagem de FK506 nesta etapa, pois o fármaco é um material de alto valor por miligrama e outros testes na continuidade deste trabalho pretende-se avaliar novas e melhores condições experimentais para a inserção do FC no sistema PLGA/PPy/FC.

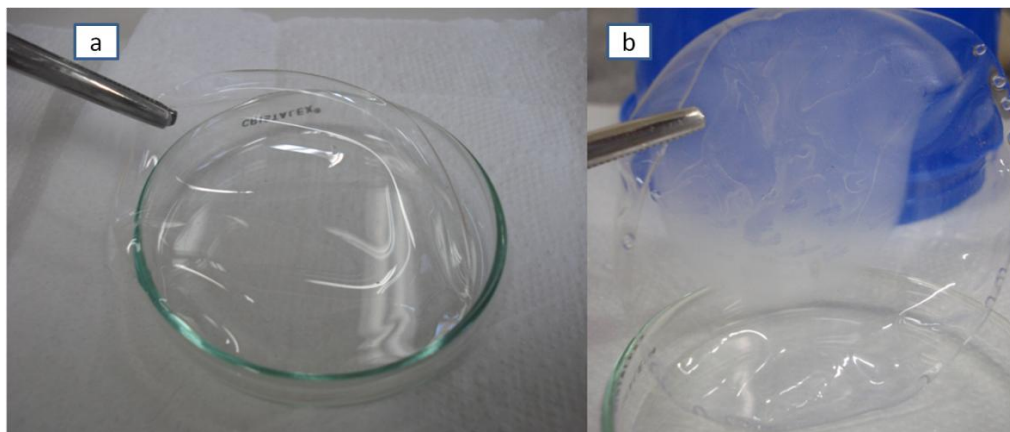


Figura 5.39. Imagens de filmes de PLGA. (a) PLGA (0,2g); (b) PLGA (0,2 g) com FK506.

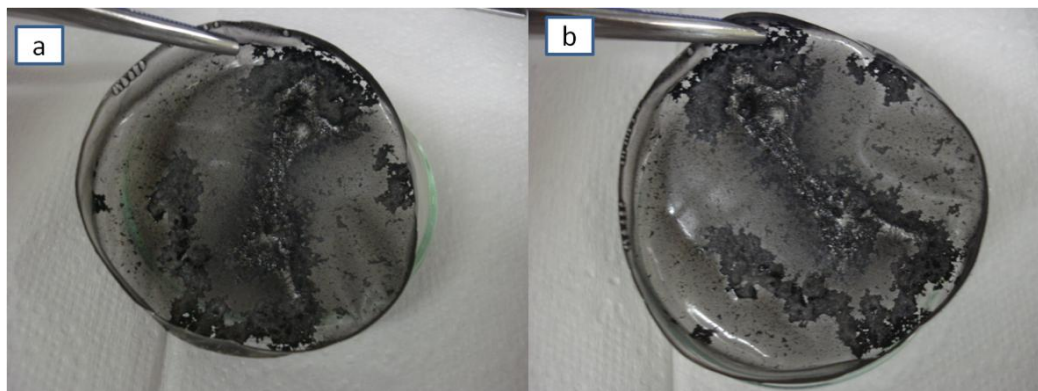


Figura 5.40. Imagens do filme de PLGA (0,2g)/PPy(0,02g)/FK506.

5.6. Teste de Degradação

A fim de verificar o comportamento de degradação prepararam-se diferentes filmes poliméricos pelo método da evaporação do solvente conforme descrito nos itens 4.2.2 e 4.2.3.

A seguir, são apresentados os resultados da perda de massa, medidas de pH e espessuras, e a morfologia das superfícies conforme o tempo de incubação em que os filmes estiveram sob ação da degradação hidrolítica em contato com uma solução tampão fosfato salino (descrito no item 4.3.6).

Foram avaliados filmes puros de PLGA, filmes de PLGA/PPy-APTS estruturados na forma de sanduíche pelo método B e filmes de PLGA/PPy-APTS sem as camadas externas de PLGA (filmes de única camada - UNC).

5.6.1. Perda de Massa

Em cada período de degradação as amostras em triplicatas foram retiradas da solução de incubação, lavadas com água destilada e secas para posteriormente serem pesadas até massa constante. A porcentagem de perda mássica foi calculada utilizando a fórmula citada no item 4.3.6 e os valores médios, assim como o desvio padrão de cada amostra em cada período de tempo são exibidos na Tabela 5.5.

Tabela 5.5: Comportamento de Perda de Massa (%) até 28 dias de degradação.

Comportamento de perda de massa (%) em dias				
Filme	7	14	21	28
PLGA 1	7,24 ±1,16	9,49±2,46	11,01±0,70	13,70±8,13
PLGA 2	8,48±0,42	9,53±0,73	9,96±0,67	11,13±0,33
PLGA 3	7,38±0,29	8,90±1,12	10,09±0,80	14,90±2,50
2B	11,41±1,05	12,26±0,51	12,51±0,52	13,68±0,74
1B	8,65±0,48	9,49±0,70	10,98±0,38	11,25±1,08
2B - UNC	10,46±0,80	12,66±1,01	13,12±1,43	15,19±1,01
1B - UNC	7,28±0,58	13,54±0,59	18,12±5,23	21,29±1,28

A Figura 5.41 ilustra o gráfico sobre as alterações nas massas dos filmes (PLGA e PLGA/PPy-APTS estruturado na forma de sanduíche pelo método B) com o tempo de incubação.

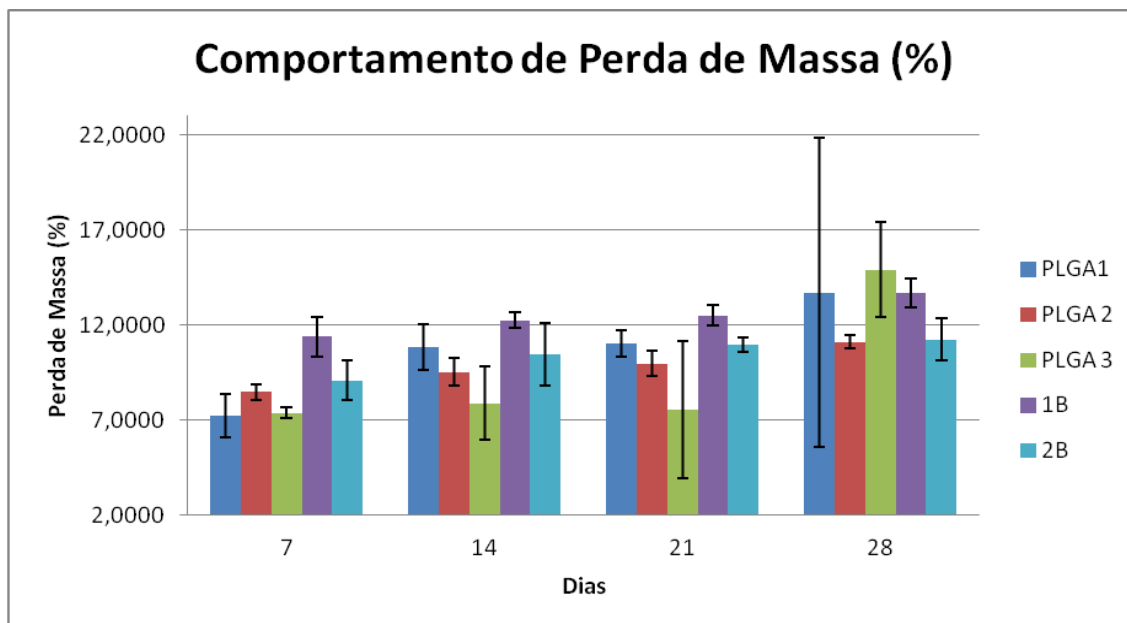


Figura 5.41. Comportamento de Perda de Massa (%) até 28 dias de degradação dos filmes de PLGA e compósitos de PLGA/PPy estruturado na forma de sanduíche pelo método B.

Observa-se que todos os filmes perdem massa de forma lenta (pouco acentuada) e tendem a aumentar a perda de massa (%) com o decorrer dos dias de incubação. A faixa de degradação até 7 dias foi de 7,24-11,41 (%), para 14 dias de 8,90-12,26 (%), 21 e 28 dias as faixas são de 9,96-12,51 e 11,13-14,90 (%), respectivamente. Não ocorre um comportamento de perda de massa muito diferente para os filmes puros de PLGA e os filmes estruturados como sanduíche (PLGA/PLGA+PPy-APTS/PLGA), logo a presença de PPy na camada interna dos filmes sanduíches não influenciou no comportamento de degradação do PLGA até os 28 dias de incubação, sendo a característica mais hidrofóbica do PLGA (85:15) a causa predominante no comportamento de perda de massa pouco acentuado até os 28 dias (Wu e Ding, 2004).

A Figura 5.42 ilustra o gráfico de comportamento de perda de massa dos filmes de PLGA e dos filmes de camada única de PLGA/PPy-APTS (camada recheio).

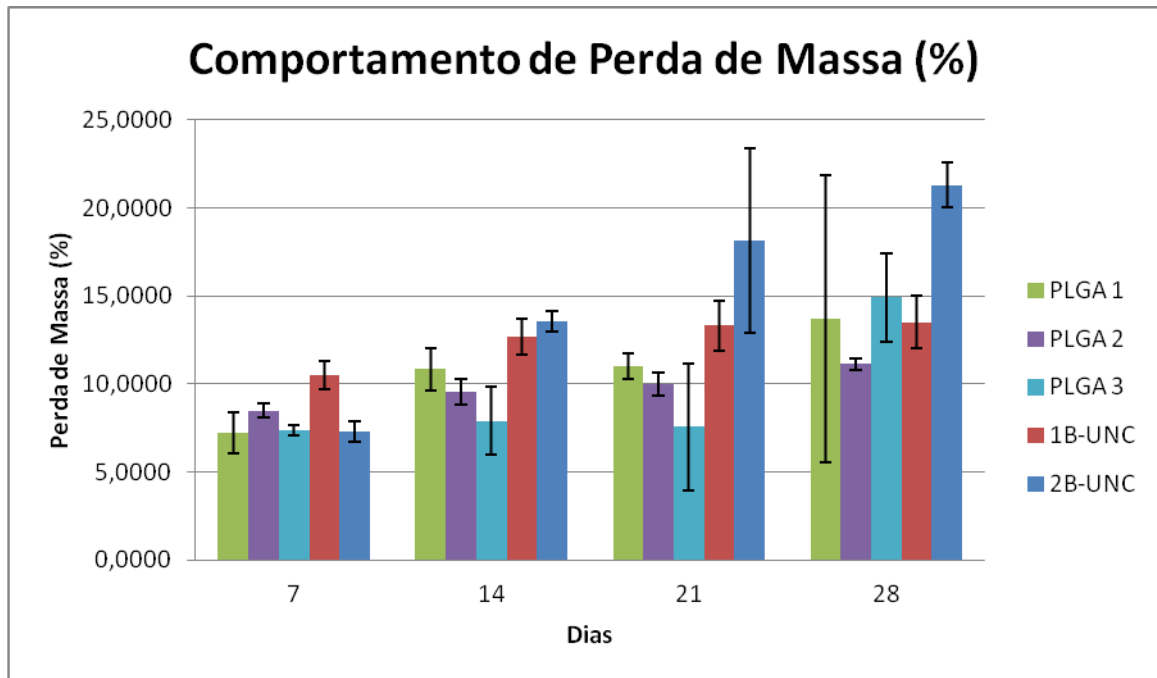


Figura 5.42. Comportamento de Perda de Massa (%) até 28 dias de degradação dos filmes de PLGA e compósitos de PLGA/PPy - UNC (filme de camada única).

A partir da Figura 5.42 observa-se que os filmes de camada única, sem as camadas externas de PLGA, também apresentam uma tendência de perda de massa bastante similar aos demais filmes. A amostra menos espessa contendo PPy (2B-UNC) apresenta maior porcentagem de perda mássica ao longo dos dias, apresentando um comportamento de degradação mais acentuado com relação ao comportamento dos demais filmes. Ebrahimian-hosseini et al. (2011) em seus estudos também verificou uma maior e mais rápida degradação dos seus suportes compósitos quando comparados ao suporte puro de PLGA. A incorporação de partículas (tipo cerâmicas de fosfato de cálcio) na confecção do suporte causou um aumento na hidrofiliabilidade e maior absorção de água, consequentemente maior e mais rápida degradação do filme (Ebrahimian-hosseini et al., 2011).

Observa-se entre os filmes de camada única que o filme 2B-UNC também se destaca no comportamento mais acentuado na perda de massa com relação ao outro filme de camada única (1B-UNC), sugerindo que a presença das nanofibras de PPy em filmes de PLGA de menor espessura (menor quantidade de PLGA na confecção do filme) facilitam a degradação do PLGA. Portanto, a adição das

nanofibras de PPy favoreceram o processo de perda de massa em aproximadamente 4% para os filmes mais espessos ($\geq 0,6$ g de PLGA) e em 6% para os filmes mais finos (0,2 g de PLGA) até os 28 dias de incubação avaliados.

Imagens de MEV no item 5.6.4 no seguimento deste trabalho concluirá a compreensão desses resultados de perda de massa dos filmes de camada unida (1B-UNC e 2B-UNC).

As figuras 5.43 e 5.44 ilustram algumas amostras utilizadas nos testes de degradação e observa-se que no aspecto visual os filmes não sofreram alterações significativas e apresentam coloração, tamanho e forma muito similar as de suas referências denominadas Zero (P0), aquelas que não passaram pelo processo de degradação. Neste estudo o resultado surge que o tempo de degradação não foi o suficiente para modificar as amostras de forma significativa.

Wu e Ding (2004) que avaliaram a degradação de suportes porosos de PLGA 85:15, mesma razão utilizada neste estudo, e observaram mudanças de forma e dimensões dos suportes avaliados a partir de 8 semanas de incubação (Wu e Ding, 2004). Portanto, o comportamento de degradação deste estudo está coerente com outros relatos da literatura que apontam uma mudança estrutural macroscópica para tempos mais longos de incubação de suportes fabricados com PLGA pobres em PGA, portanto mais hidrofóbicos (Lu et al., 2000; Wu e Ding, 2004).

DEGRADAÇÃO	Zero (P0)	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias
AMOSTRA					
2B -UNC					
1B -UNC					
2B					
1B					

Figura 5.43. Amostras da Perda de Massa (%) até 28 dias de degradação dos filmes de PLGA/PPy-APTS. UNC = filme de camada única.

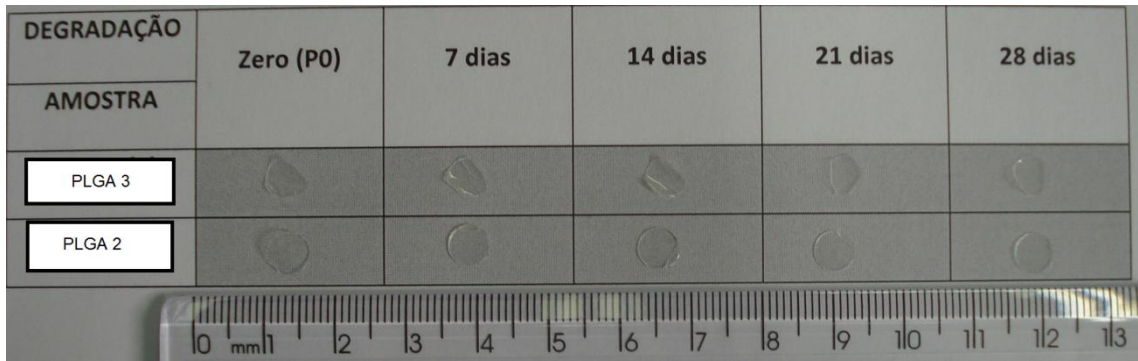


Figura 5.44. Amostras da Perda de Massa (%) até 28 dias de degradação dos filmes de PLGA.

Os PLGAs são conhecidos por serem polímeros com comportamento higroscópico variado, sendo possível variar o tempo de degradação variando a relação dos seus monômeros constituintes. A degradação é mais lenta quanto menor a presença do PGA, logo materiais de matriz de PLGA que possuem maior dificuldade de difusão com a água e mudanças nos seus aspectos físicos de coloração, alterando-se de transparentes para branco e turvo possuem uma degradação mais lenta quanto menor a presença de PGA (monômero higroscópico) (Vey et al., 2008). Na figura 5.44 comprova esse comportamento, pois as amostras da degradação do PLGA continuam com a mesma transparência visual inicial durante todo o tempo de degradação avaliado neste estudo, estando de acordo com outros estudos que mostram mudanças físicas rápidas quanto maior o teor de PGA. Neste estudo a relação dos monômeros de PLA:PGA é de 85:15 e mudanças visuais na coloração dos filmes avaliados até 28 dias não foram observadas, estando de acordo com a literatura que aponta uma menor ação de hidrólise em PLGA de alto teor de PLA (Jain, 2000; Fialho et al., 2003; Vey et al., 2008).

5.6.2. Controle do pH

O uso da solução tamponada permite uma simulação de degradação mais próxima do *in vivo* e a solução pode neutralizar os radicais ácidos liberados pela hidrólise do PLGA impedindo uma aceleração geral na degradação, mas com o aumento na taxa de degradação esse controle fica 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)

Os filmes foram degradados em 5 ml de meio 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. Os valores médios, assim como o desvio padrão de cada amostra em cada período de tempo são exibidos na Tabela 5.6.

Tabela 5.6: Comportamento do pH da solução de degradação.

pH da solução PBS (duração em dias)				
Filme	7	14	21	28
PLGA 1	7,42±0,02	7,48±0,01	7,36±0,01	7,39±0,01
PLGA 2	7,42±0,02	7,30±0,03	7,36±0,01	7,58±0,02
PLGA 3	7,43±0,01	7,48±0,01	7,34±0,01	7,39±0,01
1B-UNC	7,39±0,01	7,41±0,01	7,32±0,01	7,51±0,01
2B-UNC	7,39±0,02	7,42±0,01	7,33±0,02	7,52±0,01
1B	7,31±0,01	7,45±0,01	7,33±0,01	7,50±0,01
2B	7,38±0,00	7,41±0,01	7,32 ±0,01	7,50 ±0,01
Branco	7,42±0,01	7,46±0,01	7,39±0,01	7,54±0,01

Analisando a Figura 5.45 observa-se que não ocorreu mudanças significativas nos valores de pH das soluções de PBS após os períodos de degradação. A solução branco (somente com solução tampão fosfato exposta às mesmas condições de temperatura e agitação) manteve um comportamento de pH na faixa de 7,39-7,54 e as soluções dos demais filmes na faixa de 7,31- 7,58. O comportamento da solução PBS na presença dos filmes foi similar a solução branco, logo a degradação dos filmes até o período avaliado não acarretou em mudanças ao pH do meio.

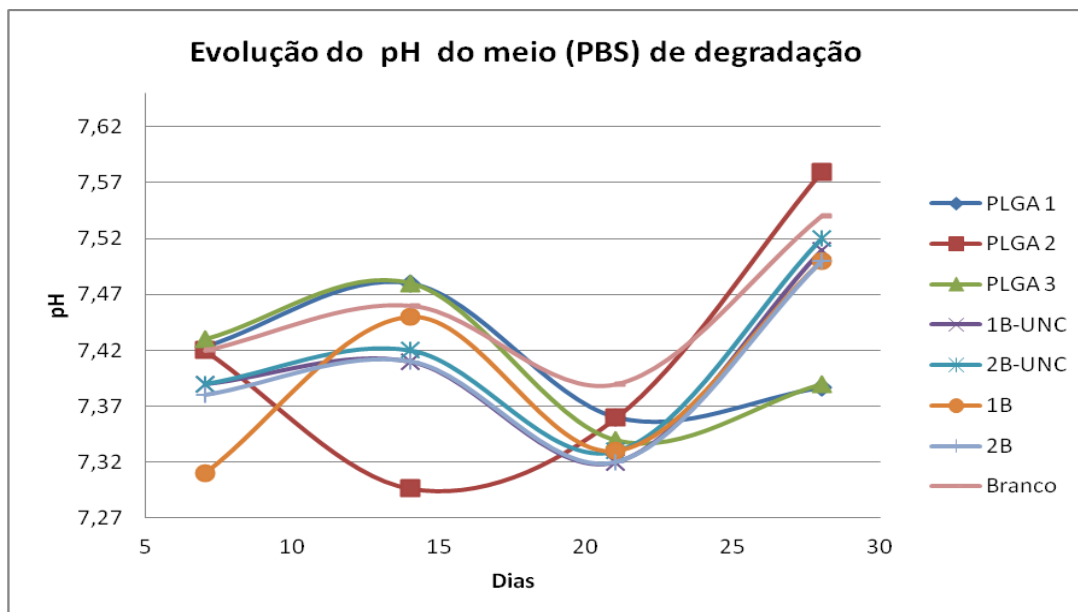


Figura 5.45. Controle do pH das soluções de degradação (PBS) dos filmes puros de PLGA e os nanocompósitos de PLGA/PPy. Branco: apenas solução de PBS.

O comportamento das soluções de PBS na presença dos filmes de PLGA/PPy-APTS, tanto na forma estruturada em sanduíche como para os filmes de camada única, mantiveram suas faixas de pH em 7,31-7,50 e 7,39 – 7,52, respectivamente. Os filmes com PPy na estrutura também não alteraram significativamente o pH da solução de degradação, logo a presença do PPy na estrutura dos filmes não acarretou em modificações para o meio até os 28 dias de degradação avaliados neste estudo.

Os pHs encontrados e a faixa estreita dos valores para todos os meios dos filmes avaliados estão de acordo com outros estudos que mostram que nas primeiras semanas o pH se mantém constante e próximo de 7,4 para matrizes de PLGA de alto teor de PLA. Mudanças significativas no pH podem ser observadas após um dia de incubação, por exemplo, quando se utiliza PLGA de 50:50 (PLA/PGA) (Vey et al., 2008), enquanto para composições de PLGA de 75:25 e 85:15 (PLA/PGA) as mudanças de pH vão ser observadas a partir de 8 semanas e então o valor de pH começa a decair consideravelmente devido ao processo de hidrólise (Wu e Ding, 2004; Alexis et al., 2006; Yoshioka et al., 2008). A faixa de comportamento do pH em 7,30-7,58 indica que os produtos da hidrólise do PLGA não se fazem presentes em quantidade suficiente no meio para alterarem o valor de forma significativa, assim como a presença do PPy, indicando que a incubação em

condições fisiológicas simulada se manteve linear, estando de acordo com a literatura que aponta uma degradação mais lenta para o PLGA rico em PLA e mudanças no meio a partir de 8 semanas de incubação (Jain, 2000; Yoshioka et al., 2008; Vey et al., 2011).

Neste estudo a solução tampão permaneceu inalterada e com valores relativamente constantes, sem resultar em alterações significativas no pH do meio até os 28 dias de degradação para todas as amostras avaliadas.

5.6.3. Espessura

Em cada período de degradação as amostras em triplicatas foram secas e suas espessuras medidas antes e após cada período de incubação. Os valores médios, assim como o desvio padrão de cada amostra em cada período da avaliação da degradação são exibidos na Tabela 5.7.

Tabela 5.7: Comportamento das espessuras dos filmes antes e após período de degradação.

Filme	Espessuras (μm) em dias de degradação				
	0	7	14	21	28
PLGA 1	216,2 \pm 43,6	281,1 \pm 7,0	281,8 \pm 31,4	312,4 \pm 6,7	248,1 \pm 22,1
PLGA 2	157,5 \pm 7,9	221,6 \pm 45,8	161,1 \pm 5,6	163,2 \pm 10,5	190,17 \pm 45,7
PLGA 3	61,9 \pm 4,3	139,9 \pm 74,8	120,5 \pm 33,5	90,5 \pm 26,1	96,9 \pm 25,9
1B	573,8 \pm 89,0	611,8 \pm 116,5	602,8 \pm 41,0	591,5 \pm 53,4	704,7 \pm 58,7
2B	223,8 \pm 26,0	398,3 \pm 96,0	357,7 \pm 48,4	437,2 \pm 55,9	420,2 \pm 66,5
1B-UNC	147,3 \pm 25,3	175,0 \pm 19,0	164,1 \pm 59,2	203,8 \pm 25,3	176,7 \pm 41,6
2B-UNC	141,3 \pm 13,7	180,7 \pm 26,3	151,0 \pm 15,5	160,5 \pm 15,5	162,5 \pm 21,5

A partir dos resultados apresentados na Tabela 5.7 observa-se uma variação no desvio padrão entre as amostras e este resultado pode estar relacionado com a dificuldade de reprodutibilidade das condições experimentais de preparação dos filmes gerando diferentes defeitos estruturais durante a confecção dos filmes, sendo uma limitação da técnica.

O gráfico da figura 5.46 ilustra os dados da Tabela 5.7, sendo possível verificarmos que os filmes tendem a aumentar a sua espessura após contato com o meio aquoso (solução PBS) devido ao processo de degradação por hidrólise.

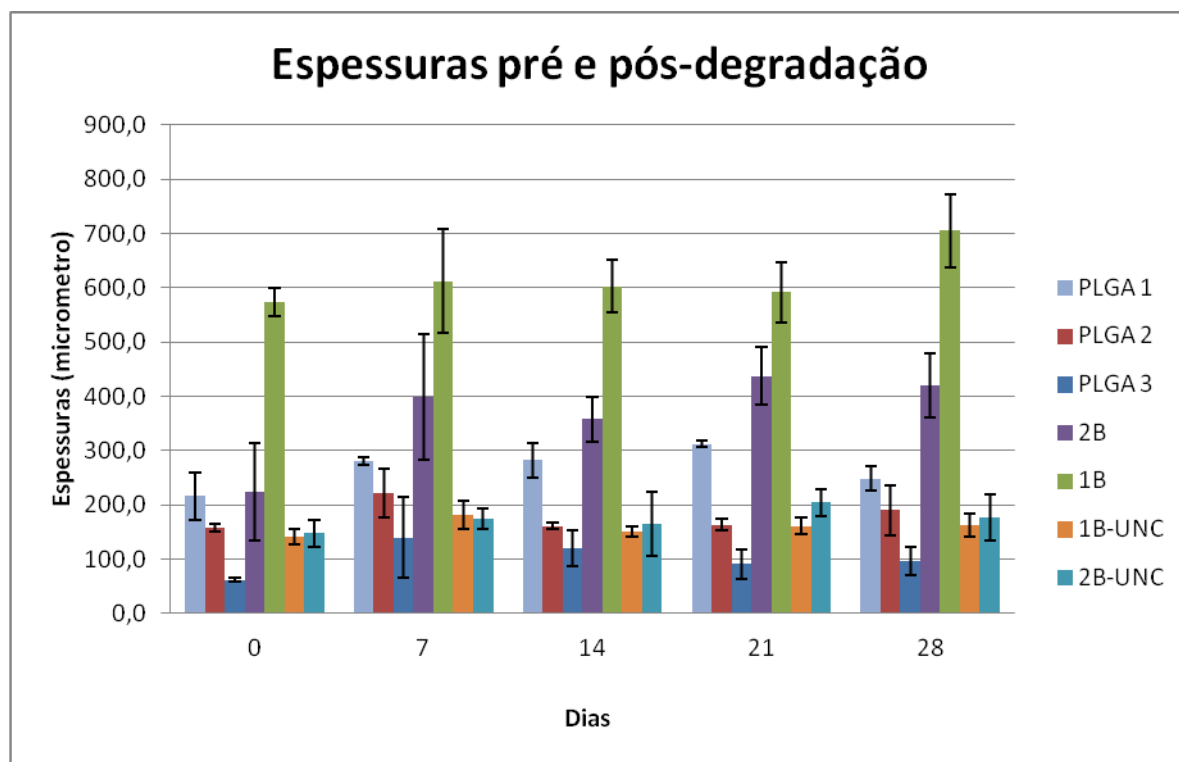


Figura 5.46. Controle da espessura pré e pós períodos de degradação dos filmes de PLGA, PLGA/PPy-APTS estruturados tipo sanduíche e PLGA/PPy-APTS de camada única. Unidade de medida: μm .

A grande variação no comportamento da expansão dos filmes pode ser atribuída à diferença da homogeneidade nas espessuras ao longo da extensão dos mesmos, provenientes do processo de preparo. A técnica aplicada neste estudo mostra-se limitada na garantia da reprodutibilidade das espessuras, sendo uma das limitações da técnica, que se inclui dentro das perspectivas de melhorias a serem desenvolvidas na continuidade de trabalhos futuros. Tais irregularidades podem ter ocasionado diferentes interações entre o meio e o filme, sendo assim, pequenas imperfeições podem influenciar e modificar a interação do solvente-filme acarretando em diferentes comportamentos de expansão obtidos neste estudo. No estudo de Lu, Garcia e Mikos (1999) sobre a biodegradação de filmes de PLGA relataram que o processo de fabricação deve ser cuidadosamente controlado, tais como a espessura e a relação PLA:PGA, onde tais parâmetros foram observados ter grande efeito sobre a degradação do filme.

Na continuidade deste trabalho é importante desenvolver técnica e material de laboratório apropriado para garantir o controle na preparação dos filmes

de PLGA. Pode-se citar como exemplo o nivelamento da bancada, a prensagem do filme logo após a preparação e vidraria específica.

5.6.4. MEV das matrizes de degradação

Após alguns períodos de degradação as integridades estruturais das amostras foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura.

A Figura 5.47 ilustra o comportamento de superfície de um filme de PLGA puro antes e pós o período de degradação.

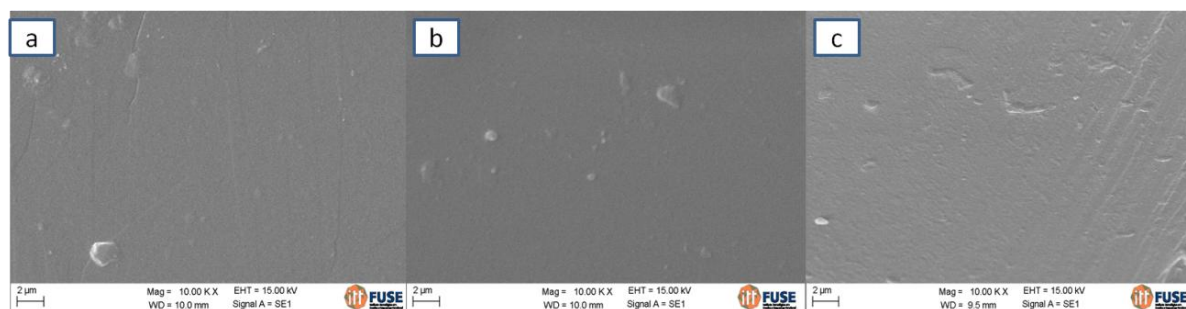


Figura 5.47. MEV do filme de PLGA 2. a) antes da degradação; b) 7 dias pós degradação e c) 28 dias pós degradação.

Os demais filmes de PLGA puro apresentaram imagens semelhantes ao filme de PLGA 2 e mantiveram suas superfícies lisas, sem grandes alterações até os 28 dias de degradação.

As Figuras 5.48 e 5.49 ilustram as superfícies dos filmes estruturados na forma de sanduíche, 1B e 2B, respectivamente. Observam-se superfícies sem grandes modificações com o passar dos dias de degradação, sendo similares as imagens apresentadas pelos filmes de PLGA puros. Algumas impurezas devido aos sais presentes na solução PBS podem estar presentes em algumas amostras (Figura 5.48 (b) e (c); Figura 5.49 (b) e (c)).

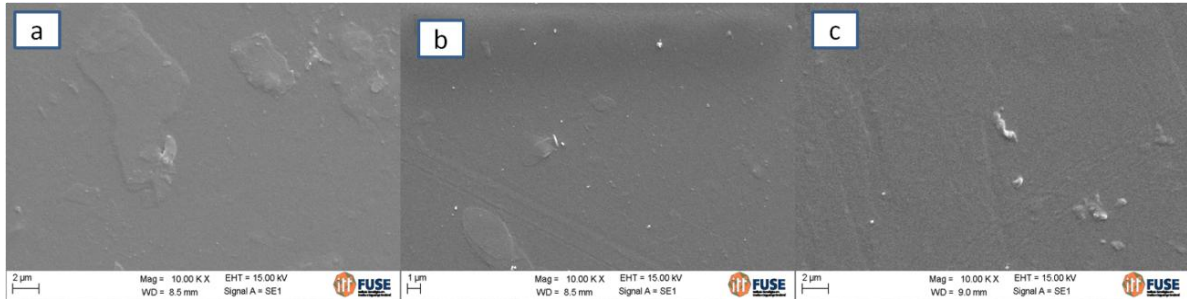


Figura 5.48. MEV do filme 1B (PLGA/PPy-APTS) estruturado na forma de sanduíche. a) antes da degradação; b) 7 dias pós degradação e c) 28 dias pós degradação.

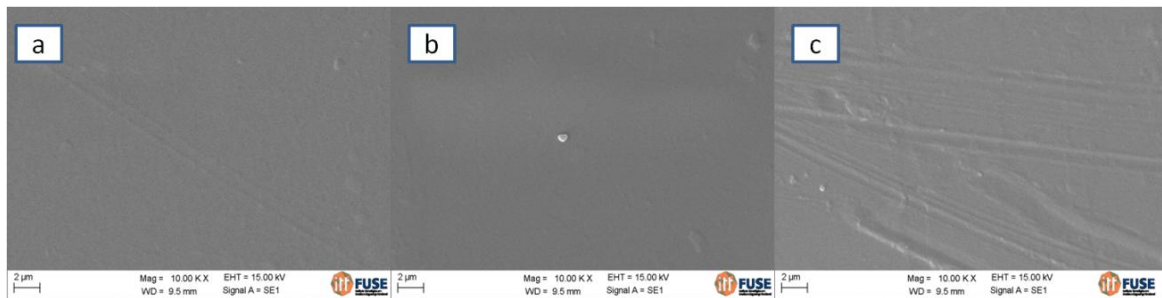


Figura 5.49. MEV do filme 2B (PLGA/PPy-APTS) estruturado na forma de sanduíche. a) antes da degradação; b) 7 dias pós degradação e c) 28 dias pós degradação.

A Figura 5.50 ilustra a superfície do filme 2B-UNC, correspondente a camada de PLGA com PPy sem as camadas externas de PLGA. Observa-se uma superfície de morfologia irregular fibrosa evidenciando uma dispersão aleatória das nanofibras de PPy que ficaram recobertas com o PLGA. A distribuição irregular das nanofibras de PPy na matriz de PLGA proporcionaram a presença de espaços vazios (poros) com tamanhos variados que podem servir de arcações “tridimensionais” para promover o crescimento e a proliferação celular guiada por nanofibras de PPy e assim facilitar a formação de novos tecidos biológicos na engenharia tecidual.

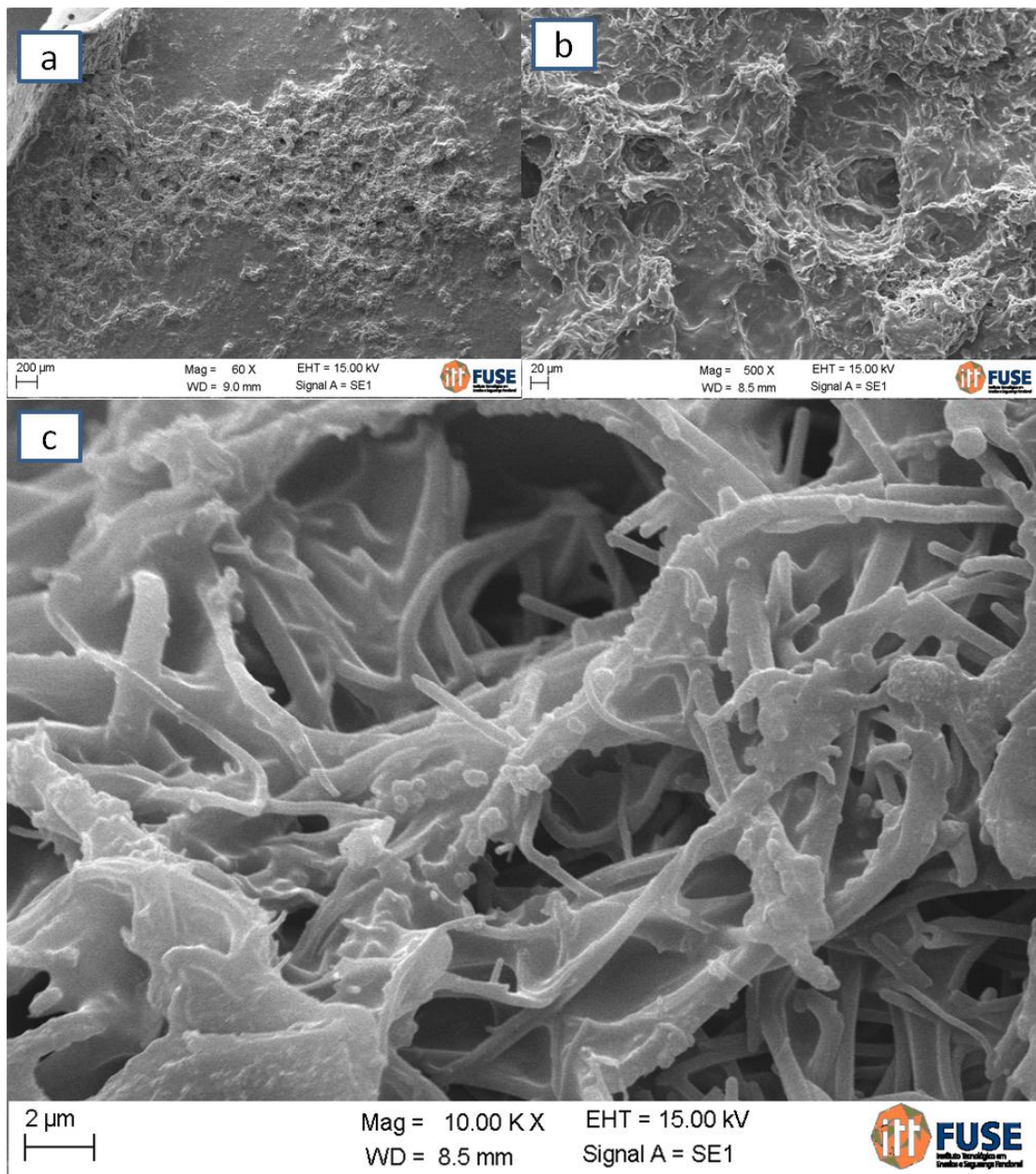


Figura 5.50. MEV do filme 2B-UNC (PLGA/PPy-APTS) de camada única; a) b) e c) antes da degradação.

A Figura 5.51 ilustra a superfície do filme 2B-UNC pós 7 e 28 dias de degradação e não se observa diferenças de estruturas com o passar dos dias.

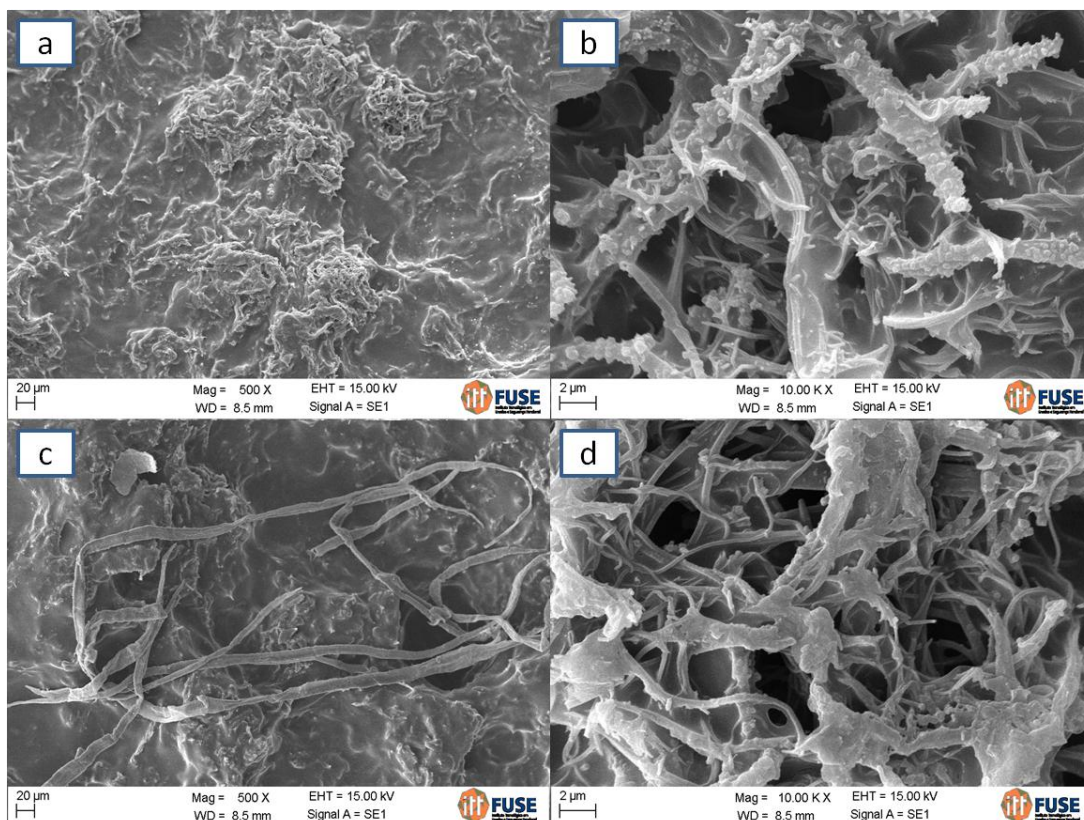


Figura 5.51. MEV do filme 2B-UNC (PLGA/PPy-APTS) de camada única (a) e (b) pós 7 dias de degradação, (c) e (d) 28 pós degradação.

A irregularidade da superfície do filme 2B-UNC, sem as camadas externas de PLGA, devido a distribuição irregular do PPy apresenta regiões com aglomeração das fibras de PPy e arcabouços que podem ter contribuído para um maior contato do filme com o meio de incubação (PBS), assim facilitando a hidrólise do PLGA e favorecendo a perda de massa mais acentuada para este filme, conforme apresentado no item 5.6.1. Porém a perda de massa mais acentuada com relação aos demais filmes não foi o suficiente para mudar significativamente suas características de superfície e nem o pH do meio de degradação, conforme visto no item 5.6.2 .

A Figura 5.52 ilustra a superfície do filme 1B-UNC antes do início da degradação e observa-se uma superfície mais lisa e homogênea, com menor rugosidade e presença de poros do que o filme 2B-UNC (Figura 5.51), pois as nanofibras de PPy estão mais recobertas pelo PLGA. Este fato pode ser justificado considerando que o filme 1B-UNC apresenta maior espessura e, portanto o PLGA recobre melhor as nanofibras de PPy.

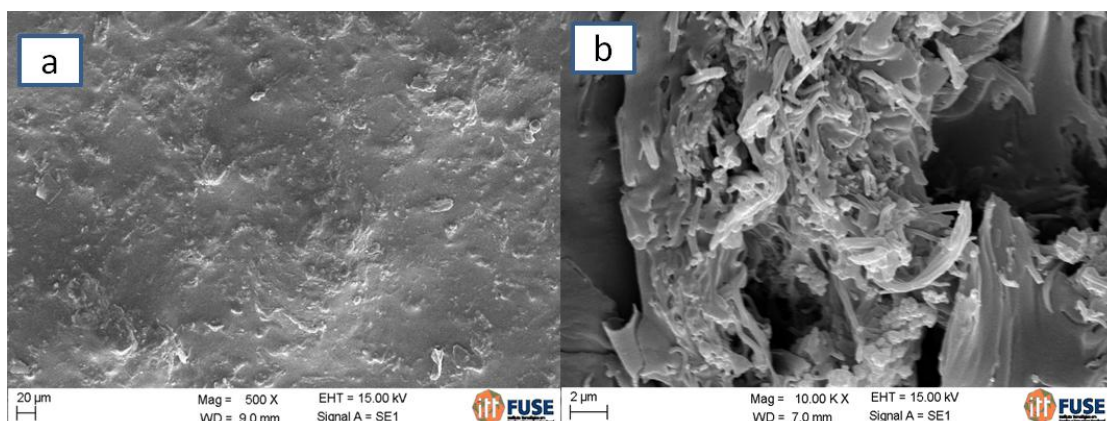


Figura 5.52: MEV do filme 1B-UNC (PLGA/PPy-APTS) de camada única (a) e (b) antes da degradação.

A figura 5.53 ilustra a superfície do filme 1B-UNC após 28 dias de degradação e observa-se uma superfície similar àquela inicial (antes do processo de degradação).

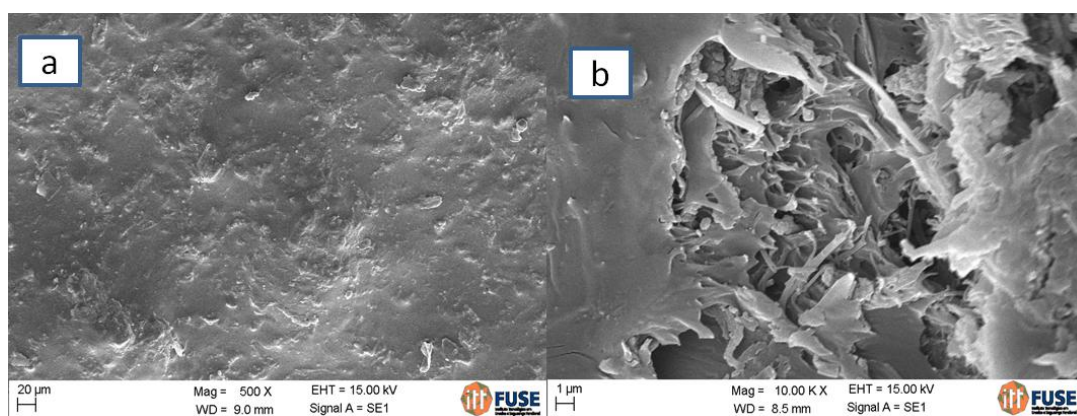


Figura 5.53. MEV do filme 1B-UNC (PLGA/PPy-APTS) de camada única (a) e (b) após 28 dias de degradação.

A partir da imagem (a) da Figura 5.52 observa-se que a superfície contínua irregular, porém com as fibras mais recobertas deixando-as um pouco menos em alto relevo quando comparadas com a imagem (a) da Figura 5.50 e (a) da Figura 5.51. Isso é possível, pois o filme 1B-UNC é feito com mais quantidade de PLGA e assim possibilitando um maior recobrimento das fibras e consequentemente uma maior espessura.

As imagens de MEV (Figuras 5.50 e 5.51) ilustram bem a presença de variados poros criados através da adição das fibras de PPy na matriz de PLGA. A presença de porosidade facilita a penetração da solução de PBS no filme, que por sua vez promove a ação de clivagem das ligações ésteres da matriz polimérica (Oh, Kang e Lee, 2006), além de fornecer uma área de superfície mais elevada para facilitar a adesão das células e as interações célula-suporte, oferecendo um espaço para a proliferação, diferenciação e crescimento celular (Shum, Lie Mark. 2005).

O desenvolvimento de suportes mais adequados para as aplicações na área da Engenharia de Tecidos são aqueles que tentam imitar a função estrutural e biológica do tecido a ser curado, pois está sendo cada vez mais evidenciada a importância da morfologia para a produção dos dispositivos artificiais, pois devem apresentar a maior similaridade estrutural com os tecidos humanos alvos para que as respostas dos tecidos doentes ao tratamento sejam cada vez melhores (Faez, 2000; Xia et al., 2011; Leung, 2011; Spivery et al., 2012). Logo, os filmes nanocompósitos de PLGA/PPy-nanofibras demonstram uma morfologia topográfica fibrosa bastante interessante para aplicação na regeneração de nervos periféricos, pois tem as vantagens da biodegradabilidade do PLGA e a semelhança das nanofibras de PPy com a organização tecidual natural dos nervos periféricos, portanto os filmes nanocompósitos de PLGA/PPy-nanofibras é uma sugestão de suporte biodegradável nanoestruturado com potencial aplicação no campo biomédico, especialmente na Engenharia de Tecidos.

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos pode-se concluir que:

- As nanofibras de polipirrol são obtidas quando as condições experimentais como temperatura, tempo de agitação, razão molar entre [dopante]:[monômero] e tipo de dopante são controlados. Neste estudo nanofibras de PPy foram obtidas preferencial na presença do dopante APTS em excesso no meio reacional e na temperatura de 0° C. A razão [dopante]:[monômero] ideal foi de razão 4:1.
- As nanofibras de PPy-APTS apresentaram estabilidade térmica até aproximadamente 205 °C (perda de 10% de massa) e condutividade elétrica na faixa de semicondutores ($8 \cdot 10^{-4}$ S/cm).
- A presença do reagente funcionalizador 1-(2 carboxietil)pirrol na síntese para a introdução do grupo carboxila na cadeia das nanofibras de PPy impediu a formação da morfologia de fibras para o PPy e as condições reacionais avaliadas neste estudo não favoreceu a introdução do grupo funcional na cadeia polimérica do produto;
- As nanofibras de PPy são mais difíceis de dispersar na matriz de PLGA quando comparado com a sua morfologia particulada globular, proporcionando o desenvolvimento de filmes nanocompósitos de superfícies irregulares com a presença de poros aleatórios que podem servir de arcabouços para o crescimento celular guiado por nanofibras de PPy. A irregularidade superficial dos filmes nanocompósitos de única camada (PLGA com nanofibras de PPy) apresentam a morfologia mais adequada para aplicação desejada devido a vantagem da biodegradabilidade do PLGA e da semelhança das nanofibras de PPy com a

organização tecidual do tecido biológico alvo. Assim, filmes biodegradáveis de PLGA e nanofibras de PPy são uma alternativa adequada para preparação de suportes tubulares para aplicação na regeneração de nervos periféricos.

- Durante os testes de degradação *in-vitro* dos filmes nanocompósito de PLGA/PPy de camada única a presença das fibras mostrou acelerar a perda de massa em relação aos filmes puros de PLGA. A perda de massa aumentou cerca de 4% para os filmes PLGA/PPy mais espessos ($\geq 0,6$ g de PLGA) e 6% para os filmes mais finos (0,2 g de PLGA) até os 28 dias de degradação. A morfologia topográfica fibrosa com arcabouços apresentada por estes filmes favoreceu a interação do filme com o meio de incubação, acelerando o processo de degradação por hidrólise dos sistemas poliméricos.

- Os filmes estruturados na forma de sanduíche pelo método B demonstram ser mais adequados para a aplicação desejada, pois garante a presença das nanofibras no sistema polimérico e os filmes não sofrem uma degradação inicial acelerada devido o recobrimento da camada intermediária de PLGA com nanofibras de PPy (recheio) por camadas externas de PLGA, assim o processo inicial de degradação é dependente apenas das características do PLGA.

- Não se observou alteração do pH do meio de incubação durante todos os períodos de degradação avaliados para todos os sistemas poliméricos deste estudo. Todos os filmes obtiveram expansão de suas espessuras em contato com a solução tampão e a perda de massa dos filmes de PLGA e PLGA/PPy ficou na faixa de 7-21% até os 28 dias de degradação avaliados.

7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Em continuidade a este trabalho sugere-se estudar aspectos metodológicos, que visem à obtenção de resultados mais representativos e principalmente, que tornem a obtenção de nanofibras de PPy mais atrativas (bioativas) para serem aplicadas em condutos biodegradáveis para a regeneração de nervos periféricos. Para isso, são propostos os itens abaixo:

- Pesquisar as condições ideais de síntese para obtenção de nanofibras de polipirrol com os demais dopantes deste estudo (HCl; PTS e ADBS);
- Pesquisar as condições ideais de síntese para obtenção de nanofibras de PPy funcionalizadas com 1-(2 carboxietil)pirrol ;
- Avaliar novas condições experimentais para a inserção do fator de crescimento (FC) no sistema PLGA/PPy/FC;
- Ampliar os testes de degradação *in vitro* dos sistemas poliméricos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXIS, F.; Venkatraman, S.; Rath, S.K.; Leong-Some insight into hydrolytic scission mechanisms in bioerodible polyesters. **Journal of Applied Polymer Science**, v.102, p. 3111-3117, 2006.

ALLODI, I.; Udina, E.; Navarro, X. Specificity of peripheral nerve regeneration: Interactions at the axon level. **Progress in Neurobiology**, v. 98, p. 16-37, 2012.

ARDENGHI, J.; Ceresér, K.M.M. Tracromilus na imunossupressão em transplantes hepáticos. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 57, n. 6, 2000. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br> Acesso em 15.08.2013.

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.

ATEH, D.D, Navsaria, H.A, Vadgama, P. Polypyrrole-based conducting polymers and interactions with biological tissues. **Journal of the Royal Society Interface**, v.3, p. 741-752, 2006.

BALINT, R.; Cassidy, N.J; Cartmell, S.H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, *in press*: doi: 10.1016/j.actbio.2014.02.015.

BARBANTI, S.H., Zavaglia, C.A.C., Duek, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p.13-21, 2005.

BASAVARAJA, C.; Choi, Y. M.; Park, H. T.; Huh, D. S., Lee, J.W.; Revanasiddappa, M.; Raghavendra, S.C.; Khasim, S.; Vishnuvardhan, T. K. Preparation, Characterization and Low Frequency a.c. Conduction of Polypyrrole-Lead Titanate Composites. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v.28, n.7, p.1104-1108, 2007.

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, p.2701-2706, 2009.

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, p. 111-116, 2002.

CHANDRASEKARANA, J.; Nithyaprakasha, D.; Punithavenic, B.; Sasikumara, L.; Ajjana, K.B.; Manoharana D. Study of optical, dielectric and optoelectronic properties of dodecylbenzene sulfonic acid doped polypyrrole. **Optik - International Journal for Light and Electron Optics**, v.124, p.2057-2061, 2013.

CHINAGLIA, D.L.; Gozzi, G. Alfaro, R.A.M.; Hessel, R. Espectroscopia de impedância no laboratório de ensino. **Revista Brasileira de Ensino de Física**. São Paulo, v. 30, n. 4, p. 4504-1-4504-9, 2008.

CHOUGULE, M.A.; Pawar, S.G.; Godse, P.R.; Mulik, R.N.; Sen, S.; Patil, V.B. Synthesis and characterization of polypyrrole (PPy) thin films. **Soft Nanoscience Letters**, v. 1, p. 6-10, 2011.

COSTA, M.P.; Cunha, A.S.; Silva, C.F.; Barros Filho, T.E.P; Ferreira, M.C. Use of polyglycolic acid tube associated with Fk506 in regeneration of peripheral nerves. **Acta Ortopédica Brasileira**, v.14, n. 1, p. 25-29, 2006.

DAWSON, E.; Mapili, G.; Erickson, K. Taqvi, S.; Roy, K. Biomaterials for stem cell differentiation. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 215–228, 2008.

DING, C.; Qian, X.; Shen, J.; An, X. Preparation and characterization of conductive paper via in-situ polymerization of pyrrole. **BioResources**, v. 5, p. 303-319, 2010.

DURAN, N.; Matosso, L.H.C. ; Morais, P.C. **Nanotecnologia: Introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo, 2006. 208 p.

EBRAHIMIAN-HOSSEINABADI, M.; Ashrafizadeh, F.; Etemadifar, M.; Venkatraman, S. S. Preparation and mechanical behavior of PLGA/nano-BCP composite scaffolds during in-vitro degradation for bone tissue engineering. *Polymer Degradation and Stability*, v. 96, p. 1940-1946, 2011.

ERBERTTA, 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. **J. of Biomaterials and Nanobiotechnology**, v. 3, p. 208–225, 2012.

FAEZ, R.; Reis, C.; Scandiucci de Freitas, P.; K. Kosima, O.; Ruggeri, G.; De Paoli, M. Polímeros Condutores. **Química Nova na Escola**, n. 11, p.13-18, 2000.

FIALHO, S.L.; Rego, M.G.B.; Cardillo, J. A.; Siqueira, R.C.; Jorge, R.; Jr Cunha, A. S. Implantes biodegradáveis destinados à administração intra-ocular. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 891-896, 2003.

FONNER, J.M.; Forciniti, L.; Nguyen, H.; Byrne, J.D.; Kou, Y.; Syeda-Nawaz, J.; C.E., Schmidt. Biocompatibility implications of polypyrrole synthesis techniques. **Biomedical Materials**, 2008.

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

GHASEMI-MOBARAKEH, L.; Prabhakaran, M.P.; Morshed, M.; Nars-Esfahani, M.H.; Baharvand, H.; Kiani, S.; Al-Deyab, S.S.; Ramakrishna, S. Application of conductive polymers, scaffolds and electrical stimulation for nerve tissue engineering. **Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 5, p. 17-35, 2011.

GILMORE, K.J.; Kita, M.; Han, Y.; Gelmi, A.; Higgins, M.J.; Moulton, S.E.; Clark, G.M.; Kapsa, R.; Wallace, G.G. Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components. **Biomaterials**, v. 30 p. 5292-5304, 2009.

GOEL, S.; Mazumdar, N. A.; Gupta, A. Synthesis and characterization of polypyrrole nanofibers with different dopants. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 21, p. 205-210, 2010.

GOLD, B.G.; Udina, E.; Bourdette, D.; Navarro, X. Neuroregenerative and neuroprotective actions of neuroimmunophilin compounds in traumatic and inflammatory neuropathies. **Neurological Research**, v. 26, p. 371-80, 2004.

GOLD, BG. FK506 and the role of immunophilins in nerve regeneration. **Molecular Neurobiology**, v. 15, p. 285-306, 1997.

GU, X.; Ding, F.; Yang, Y.; Liu, J. Construction of tissue engineered nerve grafts and their application in peripheral nerve regeneration. **Progress in Neurobiology**, v. 93, p.204-230, 2011.

GUIMARD, N.K.; Gomez, N.; Schmidt, C.E. Conducting polymers in biomedical engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 32, p. 876-921, 2007.

GUPTA, N.D.; Banerjee, D.; Das, N.S.; Chattopadhyay, K.K. Kinetics of micelle formation and their effect on the optical and structural properties of polypyrrole nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 385, p. 55-62, 2011.

HOCEVAR, M. A. Desenvolvimento de Biossensores Enzimáticos Amperométricos Utilizando Nanopartículas de Polipirrol. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais – UFRGS. Porto Alegre. 2011.

HODGSON, A.; Gilmore, K.; Small, C.; Wallace, G.; Mackenzie, I.; Aoki, T.; Ogata, N. Reactive supramolecular assemblies of mucopolysaccharide, polypyrrole and protein as controllable biocomposites for a new generation of intelligent biomaterials. **Supramolecular Science**, v. 1, n. 2, p. 77-83, 1994.

ISHPAL, A. K. Spectroscopic and electrical sensing mechanism in oxidant-mediated polypyrrole nanofibers/nanoparticles for ammonia gas. **Journal of Nanoparticle Research**, v.15, p.1637-1642, 2013.

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, Porto Alegre, 2005.

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

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

JOHNSON, E.O.; Charchanti, A.; Soucacos, P.N. Nerve repair: Experimental and clinical evaluation of neurotrophic factors in peripheral nerve regeneration. **Injury**, v. 39, p. 37-42, 2008.

Jr SANTOS, Arnaldo R.; Wada, M. L. F. Polímeros Biorreabsorvíveis como Substrato para Cultura de Células e Engenharia Tecidual. Revisão, UNESP. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n.4, p. 308-317, 2007.

KAMINSKA, B.; Gaweda-Walerich, K.; Zawadzka, M. Molecular mechanisms of neuroprotective action of immunosuppressants - facts and hypotheses. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 8, p. 45-58, 2004.

KANG, H.C.; Geckeler, K.E. Enhanced electrical conductivity of polypyrrole prepared by chemical oxidative polymerization: effect of the preparation technique and polymer additive. **Polymer**, v. 41, p. 6931-6934, 2000.

KASSIM, A.; Basar, Z.B.; Mahmud, H.N.M.E. Effects of preparation temperature on the conductivity of polypyrrole conducting polymer. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 114, n. 2, p.155-162, 2002.

KAYNAK, A.; Rintoul, L.; George, G.A. Change of mechanical and electrical properties of polypyrrole films with dopant concentration and oxidative aging. **Materials Research Bulletin**, v. 35, p. 813–824, 2000.

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

KHANG, G.; Jeon, E.K.; Rhee, J.M.; Lee, I.; Lee, S.J.; Lee, H.B. Controlled Release of Nerve Growth Factor from Sandwiched Poly(L-lactide-co-glycolide) Films for the Application in Neural Tissue Engineering. **Macromolecular Research**, v. 11, p. 334-340, 2003.

KIM, D.K.; Oh, K.W.; Ahn, H.J.; Kim, S.H. Synthesis and characterization of polypyrrole rod doped with p-toluenesulfonic acid via micelle formation. **Journal of Applied Polymer Science**, v.107, p. 3925-3932, 2008.

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, p. 2342-2350, 2011.

KINO, T. FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a Streptomyces. I. Fermentation, isolation, and physico-chemical and biological characteristics. **Journal of Antibiotics**, v. 40, p. 1249-1255, 1987.

KUMAR, D.; Sharma, R. C. Advances in conductive polymers. **European Polymer Journal**, v. 34, n.8, p. 1053-1060, 1998.

HUANG, K.; Wan, M.; Long, Y.; Chen, Z.; Wei. Y.; Multi-functional polypyrrole nanofibers via a functional dopant-introduced process. *Synthetic Metals*, v. 155, p. 495-500, 2005.

KWON, W.J.; Suh, D.H.; Chin, B.D.; Yu, J.W. Preparation of Polypyrrole Nanoparticles in Mixed Surfactants System. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 110, p. 1324-1329, 2008.

LEE, J. Y.; Lee, J.W.; Schmidt, C.E. Conjugation on active ester-functionalized polypyrrole Neuroactive conducting scaffolds: nerve growth factor. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 6, n. 38, p. 801-810, 2009.

LEE, J.-W.; Serna, F.; Nickels, J.; Schmidt, C.E. Carboxylic Acid-Functionalized Conductive Polypyrrole as a Bioactive Platform for Cell Adhesion. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 1692-1695, 2006.

LEE, J.W.; Serna, F.; Schmidt, C.E. Carboxylic-Endcapped Conductive Polypyrrole: Biomimetic Conducting Polymer for Cell Scaffolds and Electrodes. **Langmuir**, v. 22, p. 9816-9819, 2006.

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, p. 15-21, 2012.

LEE, J.Y.; Kim, D.Y.; Kim, C.Y. Synthesis of soluble polypyrrole of the doped state in organic solvents. **Synthetic Metals**, v. 74, p.103-106, 1995.

LEUNG, V.; Ko, F. Biomedical applications of nanofibers. **Polymers for Advanced Technologies**, 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.

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, p. 997-1004, 2001.

LONG, Y.; Li, M.; Gu, C.; Wan, M.; Duvail, J.; Liu, Z.; Fan, Z. Recent advances in synthesis, physical properties and applications of conducting polymer nanotubes and nanofibers. **Progress in Polymer Science**, v. 36, p. 1415-1442, 2011.

LU, P.; Ding, B. Applications of Electrospun Fibers. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 2, p. 169-182, 2008.

MAIA, D.J.; De Paoli, M.A.; Alves, O.L.; Zarbin, A. J. G., Neves, S. Síntese de Polímeros Condutores em Matrizes Sólidas Hospedeiras. **Química Nova**, v. 23, p. 204-215, 2000.

MAKADIA, H. K.; Siegel, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. **Polymers**, v. 3, p.1377-1397, 2011.

MARTINO, S. D'Angelo, F.; Armentano, I.; Kenny, J.M.; Orlacchio, A. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 338-351, 2012.

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

MAYER, J., Karamuka, E.; Akaike, T.; Wintermantel, E. Matrices for tissue engineering-scaffold structure for a bioartificial liver support system. **Journal of Controlled Release**, v. 64, p. 81-90, 2000.

MISRA, S.K.; Watts, P.C.P.; Valappil, S.P.S.; Silva, R.P.; Roy, I.; Boccaccini, A.R. Poly (3-hydroxybutyrate)/Bioglass composite films containing carbon nanotubes. **Nanotechnology**, v.18, n. 7, p. 1-7, 2007.

MONIKA; Kumar, R.; Chauhan, R.P.; Kumar, R.; Chakarvarti, S.K. Synthesis of conducting polymers and their characterization. **Indian Journal of Pure & Applied Physics**, v. 48, p. 524-526, 2010.

MORAIS DE SOUZA, M.C. Desenvolvimento de sistemas poliméricos de implantação intraocular contendo tacrolimus para o tratamento de uveítes crônicas. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - UFMG, Belo Horizonte. 2012.

MOTTA, A.C., Duek, E.A.R. Síntese, Caracterização e Degradação "in vitro" do poli(L-ácido láctico-co-ácido glicólico). **Revista Matéria**, v. 11, n. 3, p. 340-350, 2006.

MULLER, D.; Rambo, C.R.; Recouvreux, D.O.S.; Porto, L.M.; Barra, G.M.O. Chemical in situ polymerization of polypyrrole on bacterial cellulose nanofibers. **Synthetic Metals**, v.161, p.106-111, 2011.

MURAMOTO, M.; Yamazaki, T.; Nishimura, S.; Kita, Y. Detailed in vitro pharmacological analysis of FK506-induced neuroprotection. **Neuropharmacology**, v. 45, p. 394-403, 2003.

NAN, J.; Hu, X.; Li, H.; Zhang, X.; Piao, R. Use of nerve conduits for peripheral nerve injury repair, Web of Science-based literature analysis. **Neural Regeneration Research**, v. 7, n.35, p. 2826-2833, 2012.

MOSNÁČKOVÁ, K.; Chehimi, M.M.; Fedorko, P.; Omastová, M. Polyamide grafted with polypyrrole: formation, properties, and stability. **Chemical Papers**, v. 67, p. 979-994, 2013.

OH, S. H.; KANG, S. G.; Lee, J. H. Degradation behavior of hydrophilized PLGA scaffolds prepared by melt-molding particulate-leaching method: Comparison with control hydrophobic one. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 17, p. 131-137, 2006.

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.

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.

PAN, Z.; Ding, J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. **Interface Focus** , v. 2, p. 366–377, 2012.

PEREIRA, R.R. Estudo do efeito antiinflamatório do Tacrolimus no modelo de

pleurisia, em camundongos. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas - UFSC, Florianópolis, 2006.

PHAN, D.Q.D.; Schuind, F. Tolerance and effects of FK506 (tacrolimus) on nerve regeneration: a pilot study. **The Journal of Hand Surgery**, v. 37, p. 537-543, 2011.

PILLALAMARRI, S.K.; Blum, F.D.; Bertino, M. F. Synthesis of gold nanoparticles attached to polypyrrole nanofibers. **Polymer Preprints**, v. 46, p. 483, 2005.

RAHMAN, N.A.; Kudin, T.I.T.; Ali, A.M.M.; Yahya, M.Z.A. Synthesis and Characteristics of Conducting Polymer-Based Polypyrrole in Different Solvents. **Journal of Materials Science and Engineering A**, v. 2, p. 190-195, 2012.

RENOUF-GLAUSER AC, R.J.; Farrar D.F.; Cameron RE. A degradation study of PLLA containing lauric acid. *Biomaterials*, v. 26, p. 2415-2422, 2005.

REUNG-U-RAI. A.; Prom-Jun, A.; Prissanaroon-Ouajai, W.; Ouajai, S. Synthesis of highly conductive polypyrrole nanoparticles via microemulsion polymerization. **Journal of Metals, Materials and Minerals**, v.18, n.2, p.27-31, 2008.

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

REZENDE, C.A.; Luchesi, C.; Barbo, M^ªL.P.; Duek, E.A.R. Membranas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) como curativos para pele: degradação *in vitro* e *in vivo*. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 3, p. 232-238, 2005.

ROCHA-FILHO, R.C. Nobel 2000 Polímeros Condutores: Descoberta e aplicações. **Química Nova na Escola**, n.12, p.11-14, 2000.

ROSA B.S.; Muller, D.; Barra, G.M.O. Obtenção de sensor de pressão à base de poli(etileno-co-acetato de vinila) com polipirrol ou polianilina. **Exacta**, v. 8, n. 1, p. 27-34, 2010.

LAKARD, S.; Herlem, G.; Propper, A.; Kastner, A.; Michel, G.; Vallès-Villarreal, N.; Gharbi, T.; Fahys, B. Adhesion and proliferation of cells on new polymers modified biomaterials. **Bioelectrochemistry**, v. 62, p.19-27, 2004.

SEBBEN, A. D.; Lichtenfels, M.; Braga da Silva, J. L. Regeneração de Nervos Periféricos: terapia celular e fatores neurotróficos. Peripheral Nerve Regeneration: cell therapy and neurotrophic factors. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 46, p. 643-649, 2011.

SHEN, Y.; Wan, M. In situ doping polymerization of pyrrole with sulfonic acid as a dopant. **Synthetic Metals**, v. 96, p.127-132, 1998.

SHEN, Y.; Wan, M. Tubular Polypyrrole Synthesized by in Situ Doping Polymerization in the Presence of Organic Function Acids as Dopants. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 37, p. 1443-1449, 1999.

GOEL, S.; Mazumdar, N.A.; Gupta, A. Synthesis and characterization of polypyrrole nanofibers with different dopants. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 21, p. 205-210, 2010.

SILVA, C.K.; Camargo, A.E. Mecanismos Envolvidos na Regeneração de Lesões Nervosas Periféricas. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, p. 93-98, 2010.

SHUM, A. WT.; Li, J.; Mark, A. FT. Fabrication and structural characterization of porous biodegradable poly(dl-lactic-co-glycolic acid) scaffolds with controlled range of pore sizes. *Polymer Degradation and Stability*, v. 87, p. 487-493, 2005.

SOUSA, R.A.; Kalay, G.; Reis, R.L.; Cunha, A.M.; Bevis, M.J. Injection Molding of a Starch/EVOH Blend Aimed as an Alternative Biomaterial for Temporary Applications. Starch-Based Polymer for Biomedical Application. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 77, p.1303-1315, 2000.

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, p. 4264-4276, 2012.

STEJSKAL, J.; Omastová, M.; Fedorova, S.; Prokes, J.; Trchová, M. Polyaniline and polypyrrole prepared in the presence of surfactants: a comparative conductivity study. **Polymer**, v. 44, p. 1353-1358, 2003.

SU, N.; Li, H.B.; Yuan, S.J.; Yi, S.P.; Yin, E.Q. Synthesis and characterization of polypyrrole doped with anionic spherical polyelectrolyte brushes. **Express Polymer Letters**, v. 6, n. 9, p. 697-705, 2012.

SULTANA, N.; Khan, T.H. In Vitro Degradation of PHBV Scaffolds and nHA/PHBV Composite Scaffolds Containing Hydroxyapatite Nanoparticles for Bone Tissue Engineering. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, p. 1-12, 2012.

THIÉBLEMONT, J.C.; Planche, M.F.; Petrescu, C.; Bouvier, J.M.; Bidan, G. Stability of chemically synthesized polypyrrole films. **Synthetic Metals**, v. 59, p. 81-96, 1993.

TRAN, H.D.; Shin, K.; Hong, W.G.; D'Arcy, J.M.; Kojima, R.W.; Weiller, B.H.; Kaner, R.B. A Template-Free Route to Polypyrrole Nanofibers. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 28, p. 2289-2293, 2007.

VASQUES, C.T.; Domenech, S.C.; Barreto, P.L.M.; Soldi, V. Polypyrrole-modified starch films: structural, thermal, morphological and electrical characterization. **e-Polymers**, v. 10, p. 253-269, 2013.

VEY, E.; Roger, C.; Booth, J.; Claybourn, M.; Miller, A.F.; Saiani, A. Degradation kinetics of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution as revealed by infrared and Raman spectroscopies. **Polymer Degradation and Stability**, v. 96, p. 1882-1889, 2011.

VEY, E.; Roger, C.; Meehan, L.; Booth, J.; Claybourn, M.; Miller, A.F.; Saiani, A. Degradation mechanism of poly(lactic-co-glycolic) acid block copolymer cast films in phosphate buffer solution. **Polymer Degradation and Stability**, v. 93, p. 1869-1876, 2008.

WANG, C.; Zhang, K.; Fan, C.; Mo, X.; Juan, H.; Li, F. Aligned natural–synthetic polyblend nanofibers for peripheral nerve regeneration. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 634-643, 2007.

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. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 68, p. 411-422, 2003.

WANG, X.; Yang, C.; Liu, P. Well-defined polypyrrole nanoflakes via chemical oxidative polymerization in the presence of sodium alkane sulfonate. **Materials Letters**, v. 65, p.1448-1450, 2011.

WEI, M.; Lu, Y. Templating fabrication of polypyrrole nanorods/nanofibers. **Synthetic Metals**, v. 159, p. 1061-1066, 2009.

WU, L.; Ding, J. In vitro degradation of three-dimensional porous poly(d,l-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. **Biomaterials**, v. 25, p. 5821-5830, 2004.

WU, X.S.; Wang, N. Synthesis, characterization, biodegradation, and drugdelivery application of biodegradable lactic/glycolic acid polymers. Part II: Biodegradation. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 12, p. 21-34, 2001.

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

XUE, Y.; Lu, X.; Xu, Y.; Bian, X.; Kong, L.; Wang, C. Controlled fabrication of polypyrrole capsules and nanotubes in the presence of Rhodamine B. **Polymer Chemistry**, v. 1, p. 1602-1605, 2010.

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.

YANG, C.; Liu, P. Water-dispersed polypyrrole nanoparticles via chemical oxidative polymerization in the presence of a functional polyanion. **Reactive & Functional Polymers**, v. 70, p.726-731, 2010.

YANG, X.; Zhu, Z.; Dai, T.; Lu, Y. Facile Fabrication of Functional polypyrrole Nanotubes via a Reactive Self-Degraded Template. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 26, p. 1736-1740, 2005.

YANG, Y.; Liu, J.; Wan, M. Self-assembled conducting polypyrrole micro/nanotubes. **Nanotechnology**, v. 13. p. 771-773, 2002.

YOSHIOKA, T.; Kamada, F.; Kawazoe, N., Tateishi, T.; Chen, G. Structural changes and biodegradation of PLLA, PCL, and PLGA sponges during in vitro incubation. **Polymer Engineering e Science**,v 50, p 1895-1903, 2010.

YOO, H.S.; Kim, T.G.; Park, T.G. Surface-functionalized electrospun nanofibers for tissue engineering and drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p.1033-1042, 2009.

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.

YU, Q-Z.; Dai, Z-w; Lan, P. Fabrication of high conductivity dual multi-porous poly (l-lactic acid)/polypyrrole composite micro/nanofiber film. **Materials Science and Engineering: B**, v.12, p. 913–920, 2011.

ZHANG, X.; Zhang, J.; Song, W.; Liu, Z. Controllable Synthesis of Conducting Polypyrrole Nanostructures. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p.1158-1165, 2006.

ZOOPI, R. A.; De Paoli, M.A. Elastômeros Condutores Derivados de Polipirrol e Borracha de EPDM: Preparação e Propriedades. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 5, p.1-1, 1995.

ZOPPI, R.A.; De Paoli, M.A. Aplicações Tecnológicas de Polímeros Intrinsecamente Condutores: Perspectivas Atuais. **Química Nova**, v. 16, p. 560-569, 1993.

NECTOW, A.R.; Marra, K.G.; Kaplan, D.L. Biomaterials for the Development of Peripheral Nerve Guidance Conduits. **Tissue Engineering: Part B**, v.18 , p. 40-50, 2012.

