

ESCOLA POLITÉCNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
DOUTORADO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

CRISTHIANE ALVIM VALENTE

**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS HÍBRIDOS E
BIOCOMPATÍVEIS PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul



**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS
HÍBRIDOS E BIOCMPATÍVEIS PARA APLICAÇÃO NA
ENGENHARIA DE TECIDOS**

CRISTHIANE ALVIM VALENTE

QUÍMICA INDUSTRIAL E LICENCIATURA

MESTRA EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**TESE PARA A OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTORA EM ENGENHARIA E
TECNOLOGIA DE MATERIAIS**

Porto Alegre

Agosto, 2019



**DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS
HÍBRIDOS E BIOCOMPATÍVEIS PARA APLICAÇÃO NA
ENGENHARIA DE TECIDOS**

CRISTHIANE ALVIM VALENTE

QUÍMICA INDUSTRIAL E LICENCIATURA

MESTRA EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

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

Tese 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 Doutora em Engenharia e Tecnologia de Materiais.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

**Porto Alegre
Agosto, 2019**

O mundo vai girando
Cada vez mais veloz
A gente espera do mundo
E o mundo espera de nós
Um pouco mais de paciência

Lenine

Ficha Catalográfica

V154d Valente, Cristhiane Alvim

Desenvolvimento de nanocompósitos poliméricos híbridos e biocompatíveis para aplicação na engenharia de tecidos / Cristhiane Alvim Valente . – 2019.

184 p.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PUCRS.

Orientadora: Profa. Dra. Nara Regina de Souza Basso.

1. Polipirrol. 2. Nanocargas. 3. Blenda. 4. Microestruturação. 5. Nanocompósito. I. Basso, Nara Regina de Souza. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

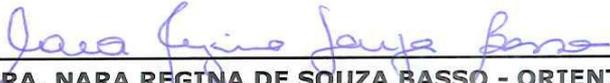


Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
 ESCOLA POLITÉCNICA
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

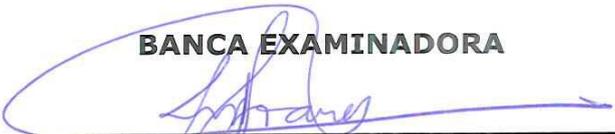
DESENVOLVIMENTO DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS HÍBRIDOS E BIOCMPATÍVEIS PARA APLICAÇÃO NA ENGENHARIA DE TECIDOS

CANDIDATA: CRISTHIANE ALVIM VALENTE

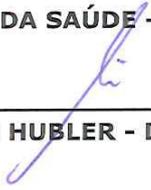
Esta Tese de Doutorado foi julgada para obtenção do título de DOUTOR EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.


 DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - ORIENTADORA

BANCA EXAMINADORA


 DRA. ROSANE MICHELE DUARTE SOARES - DO PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS
 MATERIAIS - UFRGS


 DR. DANIEL RODRIGO MARINOWIC - PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS
 DA SAÚDE - PUCRS


 DR. ROBERTO HUBLER - DO PGETEMA - PUCRS

PUCRS

Campus Central
 Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 32 - Sala 507 - CEP: 90619-900
 Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625
 E-mail: engenharia.pg.materiais@pucrs.br
 www.pucrs.br/politecnica

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, meus amigos e, principalmente, a minha amiga Gabriela Messias Miranda que foi meu porto seguro nesta caminhada. Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pelo desafio deste trabalho e por me proteger a cada obstáculo através do envio de anjos da guarda como verdadeiros amigos. Agradeço em especial aos meus pais, Eduardo e Neiza, por todo o suporte. As minhas irmãs, Jacqueline e Patricia, pela torcida no modelo à distância que os fusos horários de nossas vidas nos obrigam.

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

A minha professora Dra Nara Regina de Souza Basso por toda orientação e dedicação que sempre pude contar desde os tempos de mestrado. Aos professores Dr. Ricardo Meurer Papaleo e Dr. José Antonio Malmonge pela ajuda e colaboração para o aperfeiçoamento desse trabalho. Ao professor Dr. Dario Eberhardt que também foi um colaborador importante para o crescimento desse trabalho.

Aos professores Dr. Daniel Rodrigo Marinowic, Dr. Roberto Hubler e a Dra Rosane Michele Duarte Soares pela participação na banca examinadora, em especial aos seus valiosos questionamentos visando o melhoramento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Daniel Rodrigo Marinowic e seu aluno Felipe Valle Fortes Rodrigues pela colaboração com ensaios para avaliações biológicas, muito obrigada! Minha gratidão para a Dra. Natalia Fontana Nicoletti, Dr. Fernando Mendonça Diz, especialmente ao Dr. Pedro Cesar Chagastelles porque vocês merecem os créditos do volume de ensaios biológicos e belas imagens das propriedades biológicas obtidas para esse trabalho, sem a expertise de vocês eu não teria êxito.

Agradeço em especial a Bruna Sgaroni que me ajudou no começo deste trabalho com sua excelente dedicação como bolsista de Iniciação Científica (IC), sem a tua ajuda eu também não teria êxito. Ao Pedro Henrique Ferreira Tondo que também foi um dedicado bolsista de IC.

Aos queridos colegas e amigos do LOR (Manoela, Wesley, Michele, Thuany, Roberto, Raiane, Maria Helena, Gabriela) e TECNOPUC (Elisa, Gisele, Danizinha) pela amizade, apoio, viagens, congressos, almoços e pelos ótimos momentos de parceria na hora do café com rendimento máximo de ótimas risadas.

Agradeço a Kesiane que compartilhou comigo algumas angústias dessa caminhada comum, principalmente pelos aprendizados no processo de confiança no trabalho em equipe.

A minha amiga Gabriela Messias Miranda pela ajuda, colaboração e incentivo para o desenvolvimento desse trabalho nos momentos mais difíceis e desmotivadores, fostes um verdadeiro ombro amigo nas horas de sufoco.

Aos queridos amigos Wesley e Elisa, sempre disponíveis para um suporte técnico especializado.

A minha amiguinha, afilhada e comadre Fabiana Silva Costa por sua amizade mais que especial, amizade essa que se completou com a presença do meu afilhado Marcelo Vasconcelos e afilhadinha Lívia.

A todos os funcionários da Escola Politécnica (especialmente do curso de Química e Almoxi) e do PGETEMA pela colaboração e atenção que sempre dedicaram aos alunos. Gratidão especial a Cláudia Marina Pimenta Meira e Silva que faz seu trabalho com muita empatia e generosidade a todos. Obrigada especial ao bem-humorado Sr. Nelson por toda ajuda com as vidrarias e intervalos regados com café e bons papos. Não poderia esquecer do Felipe Castro Menezes que chegou no final dessa caminhada e completou a equipe de suporte técnico especializado.

Ao PGETEMA e Escola Politécnica pela estrutura oferecida. Gratidão aos serviços e apoio da equipe LabCEMM da PUCRS.

Ao Instituto Carbono Brasil de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pela bolsa concedida em 2016, especialmente ao Sr. Sérgio Bastian e minha orientadora Dra Nara Basso que tornaram essa parceria possível quando eu mais precisei.

Ao apoio e bolsa concedida da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

E por fim a Deus novamente e a Nossa Senhora para que iluminem meu caminho, para que eu possa acertar mais e errar menos.

Gratidão a todos que me ajudaram e desculpas aos que eu posso ter esquecido de mencionar, e também aqueles que por vendura magoei nesse caminho. Muito obrigada!

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	7
AGRADECIMENTOS	8
SUMÁRIO	10
LISTA DE FIGURAS	14
LISTA DE TABELAS	21
LISTA DE QUADROS	22
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS	23
LISTA DE UNIDADES	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
1. INTRODUÇÃO	28
2. OBJETIVOS	31
2.1. Objetivo Principal.....	31
2.2. Objetivos Específicos.....	31
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	32
3.1. Engenharia de Tecidos	32
3.1.1. Características, Propriedades e Aplicações dos Biomateriais	35
3.2. Biomateriais Poliméricos	39
3.2.1. Estratégias de Modificação de Polímeros.....	42
3.3. Biomateriais Compósitos	46
3.3.1. Nanomateriais e Materiais Nanoestruturados	48
3.3.2. Materiais/Nanomateriais baseados em Polímeros Condutores Intrínsecos	52
3.3.2.1. Polipirrol (PPy).....	53
3.3.2.2. Polipirrol com Prata (PPy/Ag)	59
3.3.2.3. Polipirrol com Grafeno e seus derivados (PPy/G, PPy/OG e PPy/OGR)	60
3.3.3. Biomateriais Compósitos Híbridos e Nanocompósitos Híbridos.....	62

4. MATERIAIS E MÉTODOS	67
4.1. Obtenção de Polipirrol (PPy), Óxido de Grafeno Reduzido (OGR) e das Nanocargas Híbridas PPy/OGR e PPy/Ag	68
4.1.1. Síntese de Polipirrol (PPy).....	68
4.1.2. Obtenção do Óxido de Grafeno Reduzido (OGR)	69
4.1.3. Sínteses das Nanocargas Híbridas de PPy/OGR.....	69
4.1.3.1. Síntese de PPy/OGR pelo Método 1	70
4.1.3.2. Síntese de PPy/OGR pelo Método 2	71
4.1.3.3. Síntese de PPy/OGR pelo Método 3	72
4.1.4. Obtenção das Nanocargas Híbridas de Polipirrol/Prata (PPy/Ag).....	73
4.2. Caracterização das Nanocargas de PPy, OGR e Nanocargas Híbridas (PPy/OGR e PPy/Ag).....	74
4.2.1. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	75
4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG).....	75
4.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)	76
4.2.4. Condutividade Elétrica (CE)	76
4.2.5. Difração de Raios-X (DRX).....	77
4.3. Avaliação das Propriedades Biológicas do PPy e das nanocargas híbridas (PPy/OGR e PPy/Ag).....	77
4.3.1. Cultura e Manutenção das Células (MTT 1).....	78
4.3.2. Preparação dos Extratos Brutos das Nanocargas (MTT 1)	78
4.3.3. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT 1).....	79
4.3.4. Cultura e Manutenção das Células (MTT 2)	80
4.3.5. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT 2).....	80
4.3.6. Análise Estatística (MTT 1 e MTT 2)	81
4.4. Preparação dos filmes poliméricos sem e com microtopografias padronizadas	81
4.5. Caracterização dos filmes poliméricos sem e com microtopografias padronizadas	83
4.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG)	84
4.5.2. Microscopia de Força Atômica (AFM).....	84

4.5.3.	Determinação de Ângulo de Contato.....	85
4.5.4.	Ensaio de Tração (Tensão x Deformação)	85
4.6.	Avaliação das propriedades biológicas dos filmes poliméricos sem e com microtopografias padronizadas.....	85
4.6.1.	Protocolos Gerais de Cultura Celular	86
4.6.1.1.	Isolamento e cultura de células do gânglio da raiz dorsal (DRG)....	87
4.6.2.	Efeitos funcionais da incubação com filmes lisos e com microtopografias padronizadas	88
4.6.2.1.	Viabilidade Celular por MTT dos filmes lisos e com microtopografias padronizadas	88
4.6.2.2.	Proliferação Celular e Morfologia Nuclear por DAPI dos filmes lisos	88
4.6.2.3.	Viabilidade e Adesão Celular por FDA/PI dos filmes lisos	89
4.6.2.4.	Morfologia e Propagação Celular nos filmes lisos e com microtopografias padronizadas	89
4.6.2.5.	Orientação celular nos filmes com microtopografias padronizadas.	90
4.6.3.	Análise estatística.....	91
4.7.	Preparação dos filmes nanocompósitos poliméricos híbridos sem e com microtopografia padronizada.....	91
4.8.	Caracterização dos filmes nanocompósitos poliméricos híbridos sem e com microtopografia padronizada	93
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	94
5.1.	Caracterização das Nanocargas Híbridas.....	94
5.1.1.	Nanocargas Híbridas de PPy/OGR	94
5.1.2.	Nanocargas Híbridas de PPy/Ag	111
5.1.3.	Biocompatibilidade das Nanocargas Híbridas de PPy/OGR e PPy/Ag...	114
5.1.3.1.	Viabilidade Celular pelo ensaio MTT 1	115
5.1.3.2.	Viabilidade Celular pelo ensaio MTT 2	117
5.1.4.	Conclusão Parcial – Nanocargas Híbridas.....	120
5.2.	Caracterização da superfície dos filmes poliméricos sem e com microtopografia padronizada.....	122

5.2.1. Biocompatibilidade dos filmes poliméricos sem e com micropografias padronizadas	130
5.2.1.1. Viabilidade Celular pelo ensaio MTT	130
5.2.1.2. Proliferação Celular e Morfologia Nuclear por DAPI.....	132
5.2.1.3. Viabilidade e Adesão Celular por FDA/PI	134
5.2.1.4. Morfologia e Propagação Celular.....	136
5.2.1.5. Adesão e Orientação Celular	138
5.2.2. Conclusão Parcial – Filmes sem e com microtopografia padronizada	142
5.3. Caracterização da superfície dos filmes nanocompósitos poliméricos híbridos sem e com microtopografia padronizada	143
5.3.1. Conclusão Parcial - Filmes nanocompósitos poliméricos híbridos sem e com microtopografia padronizada	150
6. CONCLUSÃO	151
7. PROPOSTAS	152
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153
9. APÊNDICES.....	175
9.1 Produção Científica	175
9.1.1 Artigos publicados em periódicos	175
9.1.2 Resumos publicados em Anais de Congressos	180

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Técnica da Engenharia de Tecidos. Fonte: adaptado de Barbanti et al.[39].	33
Figura 3.2. Exemplos de geometrias para estruturas na Engenharia de Tecidos para diferentes aplicações. Fonte: adaptado de Thompson.[45]	35
Figura 3.3. Exemplos de estratégias de modificação química e física de polímeros. Fonte: adaptado de Guirmard et al. [20].	42
Figura 3.4. Esquema de uma explicação possível para a superioridade de um material com micro/nanotopografia em comparação a materiais convencionais na Engenharia de Tecidos. Fonte: adaptado de Alpaslan e Webster [69].	43
Figura 3.5. Técnicas comumente utilizadas para o tratamento de superfícies para aumentar a biocompatibilidade. Fonte: adaptado de Govindarajan e Shandas[70]	44
Figura 3.6. Esquema resumido das estratégias de reparação estrutural utilizadas para melhorar os condutos de orientação neural. Fonte: adaptado de Daly et al. [72].	45
Figura 3.7. Exemplos de materiais nanoestruturados com morfologias diferentes. Fonte: Adaptado de Tiwari et al. (2013). [95]	49
Figura 3.8. Vários tipos de nanopartículas / nanoestruturas utilizadas na pesquisa biomédica. Fonte: Khanbabaie e Jahanshahi, 2012. [96]	50
Figura 3.9. Exemplo do comportamento de uma célula quando em contato com um filme polimérico qualquer sem e com nanopartículas bioativas. Fonte: Adaptado de Wu et al. (2010)[71].	51
Figura 3.10. Estruturas químicas: (A) Pirrol e (B) Polipirrol. Fonte: Adaptado de Lima et al., 2018.[120]	54
Figura 3.11. Estequiometria global da oxidação do pirrol com cloreto férrico como agente oxidante formando polipirrol. Para cada três unidades constituídas uma é protonada. Adaptado de: Omastová et al., 2003.[117]	55
Figura 3.12. Estruturas treliçadas de grafeno, OG e OGR. Adaptado de Raval (2018).[143]	60

Figura 4.1. Fluxograma das etapas de trabalho que foram realizadas durante quatro anos no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da PUCRS.	67
Figura 4.2. Esquema da síntese padrão do polipirrol. Fonte: Autora.....	69
Figura 4.3. Fluxograma das nanocargas híbridas obtidas via polimerização química <i>in situ</i> . Fonte: Autora.	70
Figura 4.4. Esquema das etapas de síntese da nanocarga híbrida de PPy/OGR (1%) pelo método 1. Fonte: Autora.....	71
Figura 4.5. Esquema das etapas de síntese da nanocarga híbrida de PPy/OGR (1%) pelo método 2. Fonte: Autora.....	72
Figura 4.6. Esquema das etapas de síntese da nanocarga híbrida de PPy/OGR (1%) pelo método 3. Fonte: Autora.....	73
Figura 4.7. Esquema ilustrativo da obtenção das nanocargas híbridas de PPy/Ag por meio do processo de <i>sputtering deposition</i> em câmara de vácuo. Fonte: Autora.....	74
Figura 4.8. Fluxograma das técnicas utilizadas para caracterização das nanocargas híbridas. Fonte: Autora.....	75
Figura 4.9. Fluxograma da avaliação biológica realizada nas nanocargas híbridas. Fonte: Autora.	78
Figura 4.10. Fotografia do molde de silício microestruturado por fotolitografia. Fonte: Garcez, 2015.[168].....	82
Figura 4.11. Fluxograma das etapas de preparação dos filmes poliméricos via evaporação de solvente com e sem microtopografias padronizadas. Fonte: Autora.	83
Figura 4.12. Fluxograma dos tipos de filmes poliméricos preparados. Fonte: Autora.	83
Figura 4.13. Fluxograma das técnicas de caracterização realizadas nos filmes poliméricos lisos e com microtopografia padronizada. Fonte: Autora....	84
Figura 4.14. Fluxograma das técnicas e dos ensaios de avaliação biológica realizados nos filmes poliméricos lisos e com microtopografias padronizadas. Fonte: Autora.....	86

Figura 4.15. Fluxograma das etapas de preparação dos nanocompósitos como filmes via evaporação de solvente sem e com microtopografia. Fonte: Autora.....	92
Figura 4.16. Fluxograma dos tipos de filmes nanocompósitos poliméricos preparados. Fonte: Autora.	92
Figura 5.1. Imagens de MET (A-C) e o espectro EDS do OGR (D).	95
Figura 5.2. Espectros de FTIR das nanocargas de PPy/OGR: a) MET1, b) MET2 e c) MET3.....	96
Figura 5.3. Imagens de MEV-FEG das nanocargas de PPy/OGR, PPy (método 1) e OGR.	98
Figura 5.4. Imagens de MEV-FEG das nanocargas de PPy/OGR, PPy (método 2) e OGR.	99
Figura 5.5. Imagens de MEV-FEG das nanocargas de PPy/OGR, PPy (método 3) e OGR.	100
Figura 5.6. Condutividade elétrica dos PPy e das nanocargas de PPy/OGR.....	101
Figura 5.7. Formação da interação π - π (ou camada de empilhamento π) entre camadas de OGR e anéis de PPy. Tipos de transferência de carga entre OGR e PPy: (A) transferência intra-carga no PPy; (B) transferência intra-carga no OGR; (C) transferência inter-carga entre PPy e OGR; e (D) transferência inter-carga entre camadas de PPy. Adaptado de Berendjchi et al. 2016.[177]	102
Figura 5.8. Imagens de MET das nanocargas de PPy (A-C) e PPy/OGR 20% (D-F) obtidas pelo método 1.....	104
Figura 5.9. Imagens de MET das nanocargas de PPy (A-C) e PPy/OGR 20% (D-F) obtidas pelo método 2.....	105
Figura 5.10. Imagens de MET das nanocargas de PPy (A-C) e PPy/OGR 20% (D-F) obtidas pelo método 3.....	106
Figura 5.11. Imagens de MET (alta resolução) do OGR (A), PPy (B) e da PPy/OGR 20% (C) obtida pelo método 3.....	107
Figura 5.12. Imagens dos espectros EDS (por MET-EDS) dos PPy e nanocargas PPy/OGR 20%: (A, B) método 1, (C, D) método 2 e (E, F) método 3. .	108

- Figura 5.13. Difrátogramas de raio-X do OGR, do PPy e do PPy/OGR obtido pelo método 3. Análises de DRX realizadas no Laboratório de Materiais e Nanoestruturas do TECNOPUC/PUCRS. 109
- Figura 5.14. Esquema representativo da polimerização *in situ* das nanocargas híbridas de PPy/OGR e a proposta das possíveis interações entre PPy e as nanofolhas de OGR. Adaptado de: Costa et al. (2019), Pattanayak et al. (2019) e Gnana Kumar et al. (2014).[125,189,190] 111
- Figura 5.15. Imagens de MEV-FEG da nanocarga de PPy/Ag (1000 s de exposição a Ag). Barra de escala: (A) 100 μm (B) 50 μm (C) 40 μm (D) 5 μm 112
- Figura 5.16. Imagens de MET da nanocarga compósito PPy/Ag (1000 s de exposição a Ag) (A-F). Imagens em alta resolução (D-F)..... 113
- Figura 5.17. (A) Espectros de FTIR, (B) Difrátograma de raio-X (realizado na FEIS-UNESP/ Campus Ilha Solteira) e (C) Condutividade elétrica do PPy e nanocargas de PPy/Ag (com 50 s, 100 s, 500 s e 1000 s de exposição a Ag)..... 114
- Figura 5.18. Gráficos da atividade metabólica medida por ensaio MTT para linhagem celular NIH/3T3 após 24 h de incubação com os extratos das nanocargas híbridas: (A) PPy e PPy/OGR pelo MET 1, (B) PPy e PPy/OGR pelo MET 2, (C) PPy e PPy/OGR pelo MET 3 e (D) PPy e PPy/Ag. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ versus Placa, # $p < 0,05$, ## $p < 0,001$, ### $p < 0,0001$ versus PPy (respectivo do seu grupo); Análise de Variância Simples (ANOVA) seguido pelo teste Post hoc de Tukey, (n = 3). 116
- Figura 5.19. Gráficos da atividade metabólica medida por ensaio MTT para linhagem celular VERO após 24 h de incubação com as nanocargas híbridas: (A) PPy pelo MET 1, (B) PPy pelo MET 3, (C) PPy/OGR 10% pelo MET 3, (D) PPy/OGR 20% pelo MET 3, (E) PPy - Síntese Padrão (base para deposição da Ag) e (F) PPy/Ag (1000 s). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus Controle (0); Análise de Variância Simples (ANOVA) seguido pelo teste Post hoc de Tukey, (n = 3). 118
- Figura 5.20. Filmes de PCL e PCL/PLGA (70:30) obtidos: a) na placa de petri (Liso) e b) no molde microestruturado. Fonte: Adaptado de Garcez, 2015.[168]122
- Figura 5.21. Imagens de MEV-FEG dos filmes de PCL, PLGA e das blendas PCL/PLGA sem e com microestruturação (canais de 15 e 20 μm). Barra de escala: 300 μm . Magnificação: 500 x. 123
- Figura 5.22. Imagem de MEV-FEG da fratura lateral do filme de PLGA com microestruturação (20 μm). Magnificação: 1000 x. 124

Figura 5.23. Imagens de AFM 2D dos filmes lisos variando a relação PCL e PLGA: (a) PCL, (b) PCL90 / PLGA10, (c) PCL80 / PLGA20, (d) PCL70 / PLGA30, e (e) PLGA. Parâmetros de rugosidade da superfície (tamanho de área: $30 \mu\text{m}^2$): (f) rugosidade média (Ra); g) Rugosidade média quadrática (Rq) e (h) Altura máxima de rugosidade (Rmax). Análise feita na superfície do filme que permaneceu em contato com o ar (superfície superior). * $p < 0,0001$ versus todos os outros grupos, ** $p < 0,0001$ versus PCL puro, 90/10 e 80/20. Análise de Variância Simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste *Post hoc* de Tukey; (i) Módulo de Young dos filmes lisos. * $p < 0,0001$ vs. PCL puro, # $p < 0,05$ versus todos os outros grupos, One-way ANOVA seguido pelo teste *Post hoc* de Tukey..... 125

Figura 5.24. Gráfico dos valores médios do ângulo de contato das gotas formadas na superfície dos filmes sem e com microtopografias (A). Imagens da gota de água na superfície lisa (B) e microestruturada com canais de $20 \mu\text{m}$ (C) de filmes com composição de 70/30 entre PCL/PLGA. Análise feita na superfície do filme que permaneceu em contato com o ar para o grupo de filmes lisos e na superfície com microcanais (15 e $20 \mu\text{m}$) para o grupo de filmes microestruturados. # $p < 0,05$ versus todos os outros filmes dentro do grupo; * $p < 0,05$ versus PLGA e ** $p < 0,001$ versus PLGA dentro do grupo. Análise de Variância Simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste *Post hoc* de Tukey. 127

Figura 5.25. Gráficos da atividade metabólica medida por ensaio MTT para linhagens celulares HaCaT (a, f), RAW 264.7 (b, g), VERO (c, h), HGF (d, i) e MRC-5 (e, j) após 24 h de incubação com filmes lisos (a – e) e microestruturados de $15 \mu\text{m}$ (f – j). Placa de cultura de tecidos e silicone foram utilizados como controles para comparações com os filmes lisos, enquanto PCL puro microestruturado foi utilizado como controle para as comparações dos filmes microestruturados. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ versus Placa; # $p < 0,05$, ## $p < 0,001$, ### $p < 0,0001$ versus PCL, Análise de Variância Simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste *Post hoc* de Tukey, ($n = 3$)..... 131

Figura 5.26. Frequência de células mitóticas como parâmetro de proliferação celular após 24 h de incubação com filmes lisos. O índice mitótico foi estabelecido para linhagens celulares HaCaT (a), RAW 264.7 (b), VERO (c), HGF (d) e MRC-5 (e). Imagens representativas de células RAW 264.7 mostrando figuras mitóticas (setas brancas) para células em controle (f), PCL (g) e PCL/PLGA (70/30) (h). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ versus controle, Análise de Variância Simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste *Post hoc* de Tukey, ($n = 3$). 133

Figura 5.27. Microscopia de fluorescência da viabilidade de células de fibroblastos (linhagem HGF). Imagens de células vivas (verdes) e mortas (vermelhas) cultivadas em placa de cultura de tecidos, silicone, filmes lisos de PLGA puro e da blenda PCL/PLGA 70/30, após 24 h (a) e 72 h (b). Ampliação original $\times 100$ 134

- Figura 5.28. Microscopia de fluorescência da viabilidade de células de fibroblastos (linhagem MRC-5). Imagens de células vivas (verdes) e mortas (vermelhas) cultivadas em placa de cultura de tecidos, silicone, filmes lisos de PLGA puro e da blenda PCL/PLGA 70/30, após 24 h (a) e 72 h (b). Ampliação original $\times 100$ 135
- Figura 5.29. Microscopia de fluorescência da viabilidade de macrófagos (linhagem RAW 264.7). Imagens de células vivas (verdes) e mortas (vermelhas) cultivadas em placa de cultura de tecidos, silicone, filmes lisos de PLGA puro e da blenda PCL/PLGA 70/30, após 24 h (a) e 72 h (b). Ampliação original $\times 100$ 136
- Figura 5.30. Imagens de MEV-FEG das células HGF nos filmes lisos e microestruturados (15 μm e 20 μm) que permaneceram aderidas nos filmes de PCL, PLGA e PCL/PLGA (70/30) após 72 horas. Magnificação original $\times 1000$; barra de escala: 100 μm 137
- Figura 5.31. Morfologia celular e orientação em filmes microestruturados (canais de 15 e 20 μm). Os fibroblastos foram cultivados por 3 dias em PGLA puro (a, b, g, h), PCL70 / PLGA30 (c, d, i, j), PCL puro (e, f, k, l) e na placa de cultura de tecido (m n). Os desvios angulares (a, c, e, g, i, k, m) e a respectiva morfologia após coloração com FDA (b, d, f, h, j, l, n) foram traçados para cada grupo. O índice S foi comparado entre os grupos para células HGF e MRC-5 (15 μm) (o) e (20 μm) (p). Ampliação original $\times 100$. * p <0,05 versus placa e # p <0,05 versus PLGA puro e PCL70 / PLGA30, Análise de Variância Simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste Post hoc de Tukey, (n = 3). 139
- Figura 5.32. Imagens da morfologia celular e orientação de neurônios derivados de β - tubulina - III positivos para gânglios da raiz dorsal crescendo em filmes microestruturados de 15 e 20 μm . As células DRG foram cultivadas por 3 dias com os filmes microestruturados de PLGA, PCL/PLGA (70/30) e PCL e lamínulas de vidro (usadas como controle). Ampliação original $\times 1000$; barra de escala: 200 μm 140
- Figura 5.33. Aspecto visual dos filmes nanocompósitos lisos de PCL/PLGA (70/30) com 10% (m/m) de nanocarga híbrida: A) de PPy (controle do MET3), B) de PPy/OGR 10% (MET3), C) de PPy/OGR 20% (MET3), D) de PPy (controle - sem Ag), e E) de PPy/Ag (1000 s). 144
- Figura 5.34. Interação intermolecular por ligação de Hidrogênio entre a carbonila do PCL e o grupo -NH- do PPy. Fonte: [224] 145
- Figura 5.35. Imagens de MEV-FEG dos filmes da blenda PCL/PLGA (70/30) e dos nanocompósitos de PCL/PLGA (70/30) com 10% (m/m) de nanocarga híbrida. 146

- Figura 5.36. Imagens de MEV-FEG das fraturas dos filmes da blenda PCL/PLGA (70/30) e dos nanocompósitos de PCL/PLGA (70/30) com 10% (m/m) de nanocarga híbrida. 146
- Figura 5.37. Imagens de AFM 2D dos filmes nanocompósitos lisos com as nanocargas híbridas em matriz de PCL/PLGA (70/30). Gráficos dos parâmetros Ra, Rq e Rmáx (tamanho de área: 40 e 20 μm^2). Análise feita na superfície que permaneceu em contato com o ar (superfície superior). One-way ANOVA seguido teste Post hoc de Tukey. 148
- Figura 5.38. Imagens das gotas formadas na superfície dos filmes de PCL/PLGA (70/30) e nanocompósitos. Gráfico com os valores médios do ângulo de contato. Análise feita na superfície do filme que permaneceu em contato com o ar. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ versus PCL/PLGA, *** $p < 0,0001$ versus PCL/PLGA/PPy (MET3), One-way ANOVA seguido do teste post hoc de Tukey 149
- Figura 5.39. Imagem do aspecto visual da blenda de PCL/PLGA (70/30) sem carga confeccionada no molde microestruturado (a). Imagens do aspecto visual (b) e de MEV-FEG (c e d) dos filmes nanocompósitos com 10% (m/m) de nanocarga (PPy – síntese padrão). Imagens da linha (c): região da superfície com canais de 20 μm . Imagens da linha (d): fratura do filme com canais de 10 μm (legenda: setas verdes - região de PCL; pontilhado azul – esferas de PLGA e pontilhado vermelho – NPs de PPy)..... 150

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Principais funções e características dos <i>scaffolds</i> para aplicações na Engenharia de Tecidos. Fonte: adaptado de Alves [44] e Edwards et al. [43].	34
Tabela 3.2. Biomateriais clinicamente disponíveis para aplicações médicas. Fonte: adaptado de Arslantunali et al. [11]; Keane et al. [5]; Mundargi et al. [55] e Barbanti et al. [39].	37
Tabela 3.3. Aplicações clínicas dos biomateriais. Fonte: adaptado de Teo et al. [52]; Pires et al. [1]; Kawachi et al. [3].	38
Tabela 3.4. Estrutura química, propriedades térmicas, módulo de elasticidade e tempo de degradação de alguns poliésteres alifáticos saturados. Fonte: adaptado de Barbanti et al.[39].	40
Tabela 5.1. Valores do ângulo de contato dos filmes sem e com microtopografias (média \pm desvio padrão).....	127

LISTA DE QUADROS

Quadro 3.1. Alguns métodos de preparação de nanotubos, nanofios, nanofitas e nanofibras de PCIs (Long et al., 2011)[90].	53
Quadro 4.1. Concentrações e linhagem celular utilizadas no ensaio MTT 2.....	80

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

AFM	do inglês <i>Atomic Force Microscopy</i>
Ag	Prata
ANOVA	Análise de Variância
APTS	Ácido p-toluenosulfônico
BSA	do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CE	Condutividade Elétrica
CNF	Celulose Nanofibrilada
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMEM	do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DRX	Difração de Raios-X
EDS	do inglês <i>Energy Dispersive Spectroscopy</i>
ET	Engenharia de Tecidos
FDA	do inglês <i>Food and Drug Administration</i>
FTIR	do inglês <i>Fourier Transformed Infrared Spectroscopy</i>
G	Grafeno
ISO	do inglês <i>International Organization for Standardization</i>
IV	Infravermelho
m/m %	Razão Percentual Mássico
MEC	Matriz Extracelular
MEV-FEG	Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo
Mn	Massa Molecular Numérica Média
MNEs	Materiais Nanoestruturados
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólico
MWCNTs	Nanotubos de Carbono de Multi-Paredes
NGF	do inglês <i>Nerve Growth Factor</i>
NP	Nanopartícula
NPs	Nanopartículas
OG	Óxido de Grafeno
OGR	Óxido de Grafeno Reduzido

P (3HB)	Poli-3-Hidroxi-butirato	
PAni	Polianilina	
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>	
PCL	Policaprolactona	
PDLA	Poli (D, L – Ácido Lático)	
PFA	Paraformaldeído	
PI	Iodeto de propídeo	
PLGA	Poli (ácido lático-co-glicólico)	
PMMA	Polimetilmetacrilato	
PPy	Polipirrol	
PTFE	Politetrafluoretileno	
Py	Pirrol	
Ra	Rugosidade Média	nm
Rmax	Rugosidade Máxima	nm
Rq	Rugosidade Média Quadrática	nm
Tc	Temperatura de cristalização	°C
TEM	do inglês <i>Transmission Electronic Microscopy</i>	
Tg	Temperatura de transição vítrea	°C
Tm	Temperatura de fusão	°C
Tm	Temperatura de fusão	°C
WCA	do inglês <i>Water Contact Angle</i>	°

LISTA DE UNIDADES

$\mu\text{g/mL}$	Unidade de Concentração Mássica
μm^2	Unidade de Área
A/g	Unidade de Densidade de Corrente Elétrica
cm^{-1}	Unidade de Número de Onda
cm^2/mL	Unidade de Área da amostra por volume de solução
dL/g	Unidade de Viscosidade Inerente
F/g	Unidade de Capacitância Elétrica Específica
GPa	Unidade do Módulo de Young
keV	Unidade de Tensão Elétrica
kHz	Unidade de Frequência
kV	Unidade de Tensão Elétrica
m^2	Unidade de Área
mA	Unidade de Corrente Elétrica
mbar	Unidade de Pressão
mg/mL	Unidade de Concentração Mássica
mm/min	Unidade de Velocidade
MPa	Unidade do Módulo de Young
N	Unidade de Força
N/m	Unidade da Constante Elástica da Mola
ng/mL	Unidade de Concentração Mássica
nM	Unidade de Concentração Molar
rpm	Rotações por Minuto
S/cm	Unidade de Condutividade Elétrica
U/mL	Unidade de Concentração (Unidades/mL)
W	Unidade de Potência Elétrica

RESUMO

VALENTE, Cristhiane Alvim. **Desenvolvimento de Nanocompósitos Poliméricos Híbridos e Biocompatíveis para Aplicação na Engenharia de Tecidos**. Porto Alegre. 2019. Tese. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

O interesse por nanocompósitos baseados em PPy vem crescendo devido a sua biocompatibilidade e viabilidade econômica, o que os tornam promissores para aplicações biomédicas. Polímeros biodegradáveis têm demonstrado potencial de uso como matrizes temporárias em estudos de terapias de danos teciduais. Neste contexto, este trabalho desejou estudar a incorporação de nanoestruturas de OGR e Ag em PPy, via adição direta do OGR na polimerização do pirrol e por pulverização catódica de Ag pós processo de síntese do PPy, assim como, realizar as caracterizações dos nanocompósitos formados por FTIR, MEV-FEG, TEM, DRX, condutividade elétrica, e avaliar a citotoxicidade *in vitro*. Além disso, preparou-se filmes poliméricos de PCL/PLGA por evaporação de solvente utilizando moldes sem e com microtopografia padronizada, os quais foram caracterizados por MEV-FEG, AFM, ângulo de contato, Módulo de Young e por ensaios *in vitro* de viabilidade, proliferação e adesão de diferentes tipos de células de mamíferos. Filmes nanocompósitos pela adição de PPy/OGR ou PPy/Ag também foram preparados por evaporação de solvente e caracterizados. A melhor metodologia para o PPy/OGR foi aquela com tratamento de sonicação, a qual dobrou a condutividade elétrica do produto com 20% (m/m) de OGR. Resultados de TEM confirmaram a deposição das nanopartículas de Ag (< 32 nm) na superfície do PPy e a condutividade elétrica foi aumentada 10^2 vezes em relação ao PPy puro. Ensaios *in vitro* de citotoxicidade dos nanocompósitos (nanocargas) sugeriram viabilidade celular até 200 $\mu\text{g/mL}$. Para os filmes poliméricos a adição de 30% (m/m) de PLGA aumentou a biocompatibilidade e a rugosidade superficial da matriz de PCL. Filmes da blenda PCL/PLGA (70/30) quando microestruturadas promoveram eficientemente a orientação de fibroblastos, bem como o crescimento e proliferação celular orientado de células neurais (DRG). Os canais nos filmes nanocompósitos foram mantidos após adição das nanocargas, sendo uma alternativa de potencialização da matriz para ação de orientação celular. Palavras-Chaves: polipirrol, nanocargas, blenda, microestruturação, nanocompósito.

ABSTRACT

VALENTE, Cristhiane Alvim. **Development of Biocompatible and Hybrid Polymeric Nanocomposites for Tissue Engineering Applications**. Porto Alegre. 2019. PhD Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

Interest in PPy-based nanocomposites has been growing due to their biocompatibility and economic viability, which make them promising for biomedical applications. Biodegradable polymers have shown potential for use as temporary matrices in studies of tissue damage therapies. Therefore, this work aimed to study the incorporation of OGR and Ag nanostructures in PPy, via direct addition of OGR in polymerization of pyrrole and direct coating of Ag by using sputtering method after PPy synthesis process, as well as to characterize the nanostructures formed by FTIR, FESEM, TEM, XRD, electrical conductivity, and to evaluate in vitro the cytotoxicity. Also, polymeric PCL/PLGA films were prepared by solvent casting, using molds without and with standardized microtopography, were characterized by FESEM, AFM, contact angle, Young's Module, and on the viability, proliferation, and adhesion of different mammalian cell types. Nanocomposite films by the addition of PPy/OGR or PPy/Ag were also prepared by solvent casting and characterized. The best method for PPy/OGR was that with sonication treatment, which doubled the electrical conductivity of the product with 20% (w/w) OGR. TEM image results confirmed the deposition of Ag nanoparticles (<32 nm) on the PPy surface and the electrical conductivity was increased 10^2 times relative to pure PPy. In vitro cytotoxicity testing of nanocomposites (nanocharges) suggested cell viability until 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. For polymeric films, the addition of 30% (w/w) of PLGA increased the biocompatibility and surface roughness of the PCL matrix. Films from the PCL/PLGA (70/30) blend when microstructured efficiently promoted the orientation of fibroblasts, as well as the oriented growth and proliferation of neural cells (DRG). The standardized channels in the nanocomposite films were maintained after the addition of the nanocharges, being an alternative interesting to enhance the matrix for cell orientation action.

Key-words: polypyrrole, nanocharges, blend, micro-structuring, nanocomposite.

1. INTRODUÇÃO

A restauração da funcionalidade total de tecidos biológicos e órgãos lesados ou perdidos ainda é um grande desafio na área da saúde. [1–3] Apesar do corpo ter propriedades intrínsecas de auto-cura, o processo de restauração pode ser prejudicado pela gravidade da lesão ou doença. [2] A Engenharia de Tecidos (ET) é a área que visa reparar e regenerar tecidos danificados com o auxílio de biomateriais (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas) combinados com células e/ou moléculas capazes de estimular a função desejada. A ET tem impulsionado a busca por biomateriais inteligentes que possam substituir os tratamentos atuais.[4–6] O primeiro passo para a reconstrução de um órgão ou tecido é a seleção do suporte, os quais podem ser poliméricos, metálicos ou cerâmicos.[1,3]

A fim de permitir que as células se sintam em seu habitat natural, se proliferem e secretem matriz extracelular própria, paralelamente com a degradação e reabsorção do biomaterial, várias metodologias estão sendo exploradas para produção de novos biomateriais e que sejam naturalmente eliminados por rotas metabólicas. Nesse contexto, os polímeros biodegradáveis são, predominantemente, os escolhidos para produzir suportes temporários aplicados à ET, abrangendo diferentes tecidos, como ossos, nervos, cartilagens, entre outros.[4] Dentre os polímeros biodegradáveis, destacam-se o Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) e Policaprolactona (PCL), pois apresentam propriedades físico-químicas interessantes para aplicação no campo biomédico.[7–9]

Até os dias de hoje, não existem biomateriais que reproduzam completamente todas as características de qualquer tecido biológico, o qual se deseja reparar e recuperar total funcionalidade.[1,3,5,10,11] A complexidade

biológica envolvida no processo de regeneração tecidual faz com que os pesquisadores tentem manipular e aperfeiçoar propriedades mecânicas, biodegradabilidade e ação biológica dos biomateriais.[10] Para isto, desde diferentes técnicas de modificação de superfícies, como litografia para micro e nanotopografias padronizadas[10,12–14], à combinação de polímeros biodegradáveis com partículas bioativas naturais e/ou sintéticas (compósitos ou compósitos híbridos), estão sendo estudadas para proporcionar biomateriais com uma ação terapêutica mais efetiva.[7,10,15,16] Cargas na escala nanométrica têm sido exploradas com objetivo de melhorar a interação do biomaterial compósito com o meio biológico, uma vez que apresentam elevada área superficial e reatividade química.[17,18]

Polímeros condutores têm se mostrado eficientes moduladores de atividades celulares, tais como crescimento, migração e adesão celular.[19,20] Dentre eles, o Polipirrol (PPy) tem sido muito utilizado para o melhoramento dos biomateriais, pois, além de apresentar propriedades elétricas similares às dos metais, apresenta biocompatibilidade com vários tecidos biológicos.[20–22] Sendo assim, biomateriais reforçados com PPy são interessantes para aplicações terapêuticas que utilizem estimulação elétrica. Grafeno, Óxido de Grafeno Reduzido (OGR) e Prata (Ag) também tem se destacado como cargas atraentes, principalmente para conferir propriedades elétricas em matrizes isolantes. Além disso, a adição do Grafeno e seus derivados podem alterar as propriedades mecânicas destas matrizes, atuando como reforço estrutural.[23–25] Já a Ag, é bem conhecida na literatura por atribuir ao material suas propriedades antimicrobianas.[26–28]

Na literatura, já foi demonstrado que biomateriais com nano e/ou microtopografias em sua superfície influenciam, significativamente, o comportamento celular como adesão, morfologia e migração em experimentos *in vitro* e *in vivo*. [12,29–31] A rugosidade superficial é uma característica importante envolvida na biocompatibilidade com as células, e vários estudos já correlacionaram uma maior afinidade celular com superfícies mais rugosas.[32,33] Outros estudos

demonstraram que as superfícies com microtopografias padronizadas influenciam favoravelmente no formato e orientação das células.[30,33–37]

Nesse sentido, justifica-se a obtenção de biomateriais multifuncionais baseados em nanocompósitos híbridos de matriz de PCL/PLGA com PPy/OGR ou PPy/Ag, com superfície microestruturada e padronizada para aplicação na ET, principalmente para regeneração de tecidos do sistema nervoso central e periférico. A incorporação destas nanocargas híbridas ainda não foi descrita na literatura para matrizes de PCL/PLGA, bem como não há relatos da fabricação de filmes nanocompósitos de PCL/PLGA/PPy ou PCL/PLGA com PPy modificado e contendo microtopografia padronizada por evaporação de solvente.

Nesta Tese de Doutorado foram investigadas metodologias de obtenção de nanocargas híbridas baseadas em PPy com OGR ou Ag. As nanocargas híbridas foram investigadas quanto suas características elétrica, de morfologia, química e estrutural, e os seus efeitos de citotoxicidade *in vitro*. Metodologia por evaporação de solvente utilizando dois tipos de moldes, sem e com microtopografia padronizada, foram investigadas para obtenção de filmes de diferentes matrizes poliméricas, a partir do PCL e PLGA. Os filmes poliméricos foram caracterizados quanto suas características morfológicas, molhabilidade e rugosidade superficiais, e as suas propriedades biológicas de biocompatibilidade *in vitro* com diferentes linhagens celulares. Por último, os filmes nanocompósitos poliméricos, baseados na blenda 70/30 de PCL/PLGA com nanocargas híbridas de PPy modificado com OGR ou Ag, foram confeccionados por evaporação de solvente com moldes sem e com microtopografia padronizada. Por último, os filmes nanocompósitos foram caracterizados quanto suas características morfológicas, molhabilidade e rugosidade superficiais.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Principal

Desenvolver filmes nanocompósitos poliméricos híbridos com superfície microestruturada padronizada baseados em matrizes biodegradáveis de PCL, PLGA e blendas de PCL/PLGA com as nanocargas de PPy, PPy/OGR e PPy/Ag para aplicação na ET.

2.2. Objetivos Específicos

Preparar nanocargas híbridas de PPy/OGR por polimerização química oxidativa *in situ* e de PPy/Ag por deposição de Ag via pulverização catódica, caracterizar suas propriedades físico-químicas e avaliar sua biocompatibilidade e citotoxicidade *in vitro*;

Preparar filmes poliméricos baseados em blendas de PCL/PLGA sem e com microtopografia (canais longitudinais) por evaporação de solvente, caracterizar suas propriedades físico-químicas e avaliar sua biocompatibilidade, citotoxicidade e orientação celular *in vitro*;

Preparar filmes nanocompósitos poliméricos sem e com microtopografia (canais longitudinais) a partir de blendas de PCL/PLGA pela adição das nanocargas híbridas, caracterizar e investigar a influência da adição das nanocargas híbridas nas propriedades físico-químicas das blendas de PCL/PLGA sem e com microtopografia padronizada.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta uma revisão da literatura a cerca dos 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. Engenharia de Tecidos

As terapias atuais na medicina moderna envolvem principalmente a prevenção, manipulação e controle de doenças por meio de produtos químicos ou moléculas biológicas. Para os casos que envolvem perda tecidual ou falência de órgãos, as alternativas de tratamento mais utilizadas são os transplantes, a reconstrução cirúrgica e a utilização de implantes, porém esses métodos apresentam limitações e resultados finais imperfeitos.

Nesse contexto, emergiu a Engenharia de Tecidos (ET), uma estratégia terapêutica na busca de novas abordagens para a reconstrução de tecidos e órgãos, envolvendo um conjunto de conhecimentos das áreas de biologia, ciências da saúde e da engenharia e ciências dos materiais.[6,38,39] A ET busca criar, reparar, regenerar e/ou substituir tecidos ou órgãos lesados para manter ou melhorar a função do tecido defeituoso ou perdido por doença, utilizando a combinação de células, biomateriais e moléculas bioativas que induzem a regeneração do tecido alvo.[4–6] A Figura 3.1 ilustra um breve esquema da técnica utilizada pela ET para regeneração de tecidos lesados.

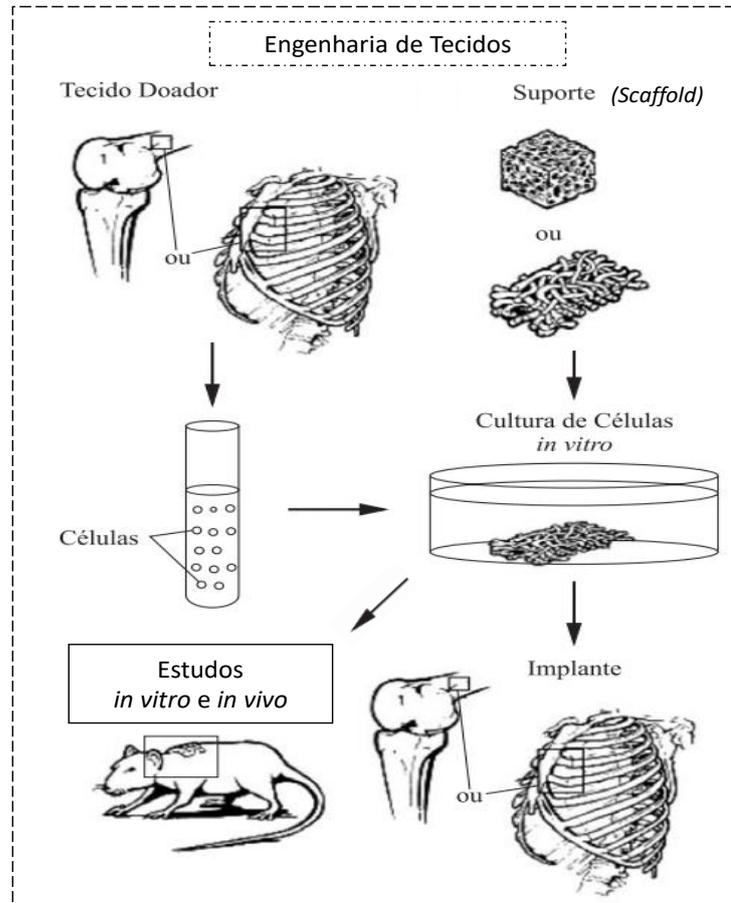


Figura 3.1. Técnica da Engenharia de Tecidos. Fonte: adaptado de Barbanti et al.[39].

Biomateriais podem ser definidos como dispositivos que entram em contato com os sistemas biológicos (incluindo os fluidos biológicos), com aplicações diagnósticas, vacinais, cirúrgicas ou terapêuticas. Eles podem ser substâncias de origem natural ou sintética, bem como a combinação de ambas, podendo ser ou não modificadas quimicamente.[1]

Scaffolds (traduzidos como: suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, andaimes) são utilizados na ET para o reparo de tecidos lesionados, auxiliando no reforço, regeneração e restauração dos mesmos quando reinseridos no paciente.[4,39] Eles basicamente atuam como um modelo estrutural para a formação de novos tecidos totalmente funcionais.[40,41] Podem ser definidos como biomateriais sólidos porosos 3D (tridimensional) desenvolvidos para o desempenho das seguintes funções.[4]:

- Promover interações entre as células e o biomaterial, bem como adesão celular e deposição de matriz extracelular (MEC);
- Permitir o transporte suficiente de gases, nutrientes e fatores reguladores para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular;
- Degradação a uma taxa controlável e próxima da taxa de regeneração do tecido de interesse; e
- Induzir inflamação mínima no sítio de interesse.

A Tabela 3.1 relaciona as principais funções e características do *scaffold* para aplicações na Engenharia de Tecidos.[39,42,43]

Tabela 3.1. Principais funções e características dos *scaffolds* para aplicações na Engenharia de Tecidos. Fonte: adaptado de Alves [44] e Edwards et al. [43].

Funções	Característica adequada à função do <i>Scaffold</i>
Evitar resposta inflamatória de toxicidade <i>in vivo</i>	Biocompatível, não-tóxica e não-carcinogênica
Promover o crescimento de tecidos e órgãos	Diferentes formas tridimensionais (3D)
Semear elevada densidade de células	Alta porosidade e alta conectividade entre poros, superfície química e física apropriada, relação área superficial/volume, tamanho de poros apropriado para permitir a penetração de células e interconectividade entre elas
Permitir elevada adesão, proliferação e diferenciação celular	
Permitir interações significativas entre a superfície celular e anexos celulares	
Promover proliferação e migração celular, bem como conduzir o crescimento do tecido ao longo do <i>scaffold</i>	
Permitir a permeação de nutrientes	
Dirigir e orientar as células da MEC para formação de novo tecido	Orientação certa das fibras dentro do <i>scaffold</i>
Degradação do <i>scaffold</i> com permanência apenas do tecido natural	Taxa e residual de degradação não-tóxica e nem inflamatória <i>in vivo</i>
Integridade estrutural <i>in vivo</i> suficiente, com tensão mecânica adequada para apoiar o tecido em desenvolvimento, de forma a resistir as forças <i>in vivo</i>	Propriedades mecânicas iguais ao tecido em desenvolvimento

Os efeitos biológicos desejados em um biomaterial (proliferação, diferenciação, invasão e repulsão celular), têm exigido que a ET utilize de diferentes

materiais e estratégias no desenvolvimento e fabricação de novos biomateriais. A forma (por exemplo, blocos, tubos, filmes, esponjas, etc.) e as propriedades físicas (por exemplo, rigidez, maciez, porosidade, degradabilidade) estão interligados diretamente a estes efeitos biológicos. Hoje a busca é por materiais com propriedades de bioindução seletivo e que possam se integrar com o tecido adjacente do hospedeiro durante a vida do paciente.[5] Neste contexto, uma característica fundamental na totalidade da ET é a biocompatibilidade[45]. A Figura 3.2 ilustra as geometrias dos biomateriais, as quais podem variar conforme a necessidade da aplicação.

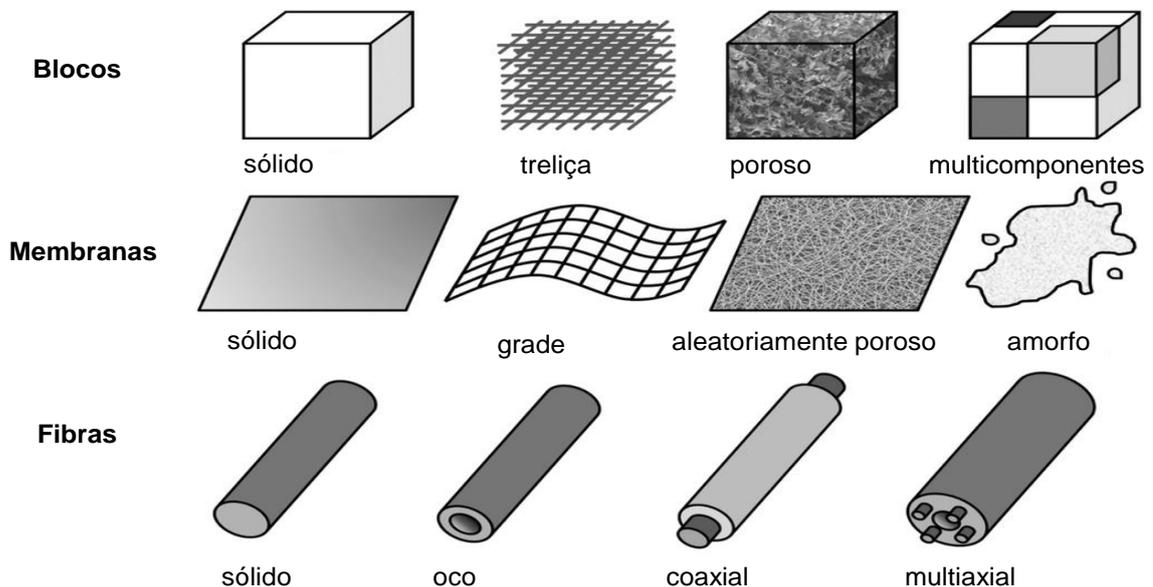


Figura 3.2. Exemplos de geometrias para estruturas na Engenharia de Tecidos para diferentes aplicações. Fonte: adaptado de Thompson.[45]

3.1.1. Características, Propriedades e Aplicações dos Biomateriais

Biocompatibilidade não é uma propriedade intrínseca de um material, mas depende do ambiente biológico e da tolerabilidade que existe das interações específicas entre fármaco-material-tecido.[46,47] Segundo Williams (2014), ela engloba uma variedade de mecanismos de interação entre os biomateriais e ambiente biológico hospedeiro. É uma propriedade de um sistema e não de um material, e a frase mais apropriada para expressar é “sistema intrinsecamente biocompatível”. [48]

Para Thompson et al. [45], biocompatibilidade é quando o material ou implante não tem toxicidade e imunogenicidade, e não apresenta efeito adverso no sistema biológico no qual está sendo introduzido. As células do próprio paciente são utilizadas para semear nos suportes, a fim de reduzir potencial reação imunológica contra os transplantes de tecidos ou células-tronco de doadores, ou xenotransplantes, reduzindo o risco de rejeição de implantes/órgãos. O objetivo é permitir que um tecido “normal” se desenvolva com as mesmas características genéticas e epigenéticas que os outros tecidos do paciente.[45]

Em termos de segurança, é fundamental avaliar a biocompatibilidade de materiais, sendo a citotoxicidade o teste de primeira escolha, pois muitos efeitos biológicos podem ser previstos pelos resultados deste ensaio.[45,49,50] Também é importante lembrar que mais de um constituinte pode estar presente no biomaterial e as interações entre eles podem influenciar na biocompatibilidade.[45] Por isso, é necessário investigar as etapas de processamento e acabamento utilizadas na confecção do material e/ou de um determinado dispositivo, bem como avaliar quaisquer subprodutos liberados pelo dispositivo química ou mecanicamente. Existem testes biológicos padrões reconhecidos, como a norma ISO 10993, que descrevem ensaios *in vitro* e *in vivo*, os quais devem ser realizados antes de aplicar qualquer novo material em seres humanos.[50–52] Até que a biocompatibilidade do biomaterial seja comprovada, ele deve ser submetido a vários estudos, desde ensaios *in vitro* até ensaios clínicos, envolvendo distintas áreas como a farmacêutica, biologia, química e toxicologia.[53]

Os biomateriais podem ser constituídos por metais, cerâmicas e polímeros, e utilizados em diversas áreas, desde a área ortopédica, cardiovascular, odontológica e até oftalmológica, bem como para a liberação de fármacos.[1,38,54] Atualmente inúmeros biomateriais para ET já estão disponíveis para várias aplicações clínicas (Tabela 3.2), porém quando as lesões são graves como no caso da perda tecidual ou de algum órgão, a terapia padrão ouro ainda é o transplante de órgãos, pois não há terapia artificial disponível no mercado tão perfeita quanto um órgão natural.[5,42]

Tabela 3.2. Biomateriais clinicamente disponíveis para aplicações médicas. Fonte: adaptado de Arslantunali et al. [11]; Keane et al. [5]; Mundargi et al. [55] e Barbanti et al. [39].

Produto	Aplicação
Apligraf® ; Dermagraft®; TransCyte®; Oasis® Matrix Wound; Integra® Bilayer Matrix Wound; Epicel®; REGRANEX®	Pele
Carticel®; NeoCart®; VeriCart™	Cartilagem
Osteocel® Plus; Pura-Matrix™; OsteoScaf™; INFUSE® Bone Graft; Biofix®, FixSorb®, Neofix®, ResorPin®	Osso
Lifeline™; Omniflow® II	Vasos sanguíneos
Anginera™; CardioWrap®; CryoValve® SynerGraft Pulmonary Heart Valve	Cardíaco
Encapsulated CellTechnology implant	Retinal (uma das formas da vitamina A)
NeraGen®; NeuroFlex™; NeuroMatrix™; NeuroWrap™; NeuroMend™; Neurotube®, Neurolac™	Nervo
Lupron Depot®, Nutropin Depot®, Suprecur® MP, Decapeptyl®, Sandostatin LAR® Depot, Somatuline® LA, Trelstar™ Depot, Arestin®, Risperidal® Consta™	Dispositivos de nanopartículas carregadas com fármaco específico (liberação controlada)
Dexon®, Vicryl®, Maxon®, PDS®,	Fios de sutura

A Tabela 3.3 resume a diversidade das aplicações clínicas e a existência de limitações/desvantagens que cada tipo de material possui. Devido a estas limitações/desvantagens, a busca por biomateriais cada vez mais eficientes é um campo de grande interesse para muitos grupos de pesquisadores.[1,3,5,10,52] Apesar dos avanços tecnológicos, a demanda dos variados problemas clínicos existentes no setor da saúde não é totalmente atendida.[5] As investigações e estudos na ciência dos materiais estão cada vez mais voltadas para a busca de métodos que aumentem a bioatividade dos biomateriais. [5,10,56] Entende-se como bioatividade à capacidade de um material afetar/interagir com o meio biológico do sítio de aplicação.[57]

Tabela 3.3. Aplicações clínicas dos biomateriais. Fonte: adaptado de Teo et al. [52]; Pires et al. [1]; Kawachi et al. [3].

	Biomaterial	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polímeros	Polietileno	Elasticidade, fácil fabricação, baixa densidade; ampla variedade de composições, propriedades e formas.	Baixa resistência mecânica, degradação dependente do tempo; podem alterar propriedades iniciais dependendo da aplicação.	Suturas, artérias, veias; Maxilofacial (nariz, orelha, maxilar, mandíbula, dente); Cimento; Tendão artificial; Oftalmologia.
	PTFE			
	Poliéster			
	Poliuretano			
	PMMA			
	Silicone			
Metais e Ligas	Aço inoxidável	Alta força de tensão, alta ductilidade e resistência a desgaste, energia de deformação alta.	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade.	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios, hastes); Agente antimicrobiano; Implantes dentários, próteses para articulações, válvulas cardíacas artificiais e endopróteses expansíveis (<i>stents</i>).
	Titânio e Ligas de Titânio			
	Prata			
	Ligas de Cobalto-Cromo			
Cerâmicas e Vidros	Alumina	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia, alta resistência à compressão e densidade.	Fragilidade, baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade e alta densidade; fabricação relativamente difícil.	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traquéias artificiais.
	Zincônia			
	Carbono			
	Fosfatos de Cálcio			
	Porcelana			
	Vidros bioativos			
Compósitos	Fibra de Carbono-Resina Termofixa	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia, alta força de tensão.	Material de fabricação incompatível.	Válvula cardíaca artificial (Carbono ou grafite pirolítico), implantes de juntas de joelho (Fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade).
	Fibra de Carbono-Termoplástico			
	Carbono-Carbono			
	Fosfato de Cálcio-Colágeno			

3.2. Biomateriais Poliméricos

Atualmente na medicina, os biomateriais poliméricos estão substituindo rapidamente os de tipo cerâmicos, metálicos e suas ligas. Polímeros são macromoléculas de alta massa molar formadas pela ligação de unidades repetitivas menores (meros) ao longo da cadeia principal.[1] Eles são macromoléculas versáteis e de fácil fabricação, sendo atrativos para muitas aplicações industriais e sua natureza biocompatível impulsiona seu uso na área biomédica. Apresentam flexibilidade estrutural que permite adaptar suas propriedades e características (por exemplo: cristalinidade, módulo de elasticidade, temperatura de transição vítrea, temperatura de fusão/cristalização, copolímeros ou não, presença ou não de grupos funcionais, entre outras) de acordo com as especificidades da aplicação desejada.[10,51,58,59]

Colágenos, alginatos e quitosanas são exemplos de polímeros naturais. Polímeros sintéticos são divididos em duas classes: não biodegradáveis e biodegradáveis.[10] Possuem estrutura de cadeia longa semelhante a estrutura de proteínas e polissacarídeos dos tecidos naturais, proporcionando vantagens sob as repostas biológicas do tecido natural em comparação à materiais metálicos e cerâmicos. Portanto, a síntese de polímeros para aplicações biomédicas vem sendo explorada.[10,51]

Recentemente, os biodegradáveis tornaram-se altamente importantes no campo médico para o desenvolvimento de *scaffolds* temporários, devido à cirurgia adicional evitável para remoção dos mesmos após promoverem sua ação terapêutica.[10,51,58,59] Além disso, possibilitam ações terapêuticas mais efetivas de várias moléculas bioativas solúveis e insolúveis em água, melhorando a sua biodisponibilidade, solubilidade e o tempo de retenção.[42,55] A degradação é consequentemente o mecanismo para a liberação destas moléculas e que pode ser modulada pelas propriedades do polímero, tais como peso molecular, composição do polímero ou copolímero e cristalinidade.[39,42,55,60]

Poliésteres alifáticos saturados apresentam propriedades químicas que permitem a sua degradação hidrolítica por meio da desesterificação. [51] Pertencem a este grupo o PGA, PLA, PLLA, PLGA e PCL (Tabela 3.4), seus copolímeros e outros, os quais são aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para uso clínico. [7,51] O grande interesse na utilização destes polímeros é devido a versatilidade que apresentam, em termos de manipulação química e da capacidade de decompor-se em fragmentos de baixo peso molecular e toxicidade, os quais podem ser reabsorvidos e eliminados por rotas metabólicas do corpo humano.[1,8,39,51,61] A Tabela 3.4 apresenta a estrutura química, as propriedades térmicas, o módulo de elasticidade e o tempo de degradação de alguns poliésteres alifáticos saturados, que são exploradas para a obtenção de biomateriais poliméricos.[39,59]

Tabela 3.4. Estrutura química, propriedades térmicas, módulo de elasticidade e tempo de degradação de alguns poliésteres alifáticos saturados. Fonte: adaptado de Barbanti et al.[39].

Polímero	Sigla	Fórmula	Tg (°C)	Tm (°C)	Módulo de Elasticidade (GPa)	Tempo de Degradação (meses) ^b
Poli(ácido glicólico)	PGA		35 - 40	225 - 230	8,4	6-12
Poli(L-ácido láctico)	PLLA		60 - 65	173 - 178	2,7	> 24
Poli(D,L-ácido láctico)	PDLLA		55 - 60	Amorfo	1,9	12 - 16
Poli(D,L-ácido láctico -co-ácido glicólico)	PLGA		45 - 50 ^a	Amorfo	2,0	1 - 2
Poli(ε-caprolactona)	PCL		(-65) (-60)	58-63	0,4	24 - 36

^a Valores para o copolímero 50/50;

^b Até a completa bioreabsorção;

Tg = temperatura de transição vítrea;

Tm = temperatura de fusão

PLGA é um dos polímeros mais utilizados na preparação de *scaffolds* para a ET, por apresentar características como fácil fabricação, baixa resposta inflamatória,

boa afinidade celular e flexibilidade nos ajustes de suas taxas de degradação.[8,11] O tempo de degradação do PLGA é modulado por meio do ajuste da razão dos seus constituintes: hidrofóbico (PLA) e hidrofílico (PGA). PLGA com alto teor de unidades hidrofílicas apresenta processo de degradação mais rápido.[62]

PCL é outro poliéster comumente empregado no desenvolvimento de *scaffolds* para a regeneração de tecidos. É um polímero semicristalino com baixas temperaturas de fusão e transição vítrea, as quais permitem que o mesmo possa manter um estado emborrachado e apresentar alta permeabilidade em condições fisiológicas.[51] Em comparação com o PLGA, PCL é hidrofóbico, portanto apresenta baixa afinidade celular, pois não possui sítios ativos favoráveis ao crescimento celular. No entanto, apresenta excelentes propriedades mecânicas, o que ajuda a prevenir fraturas prematuras nos *scaffolds*. Além disso, PCL é um polímero mais flexível, menos dispendioso e seus produtos de degradação apresentam baixa toxicidade, diferentemente dos produtos do PLGA, os quais podem acidificar o sítio de aplicação do *scaffold*. [8] Sua aplicação em dispositivos de ação terapêutica de curto prazo não é adequada, pois exhibe taxas de degradação mais lentas (2 a 4 anos) em comparação a outros polímeros biodegradáveis.[8,57,63,64]

A fim de melhorar as propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas dos polímeros isolados, que limitam a aplicação de um dado biomaterial, a combinação entre dois ou mais polímeros por meio de mistura física (blendas) vem sendo explorada na área biomédica. Por exemplo, matrizes baseadas em colágeno apresentam propriedades mecânicas inadequadas para sua aplicação de forma isolada, e uma estratégia promissora para melhorá-las é a combinação desta proteína com outros polímeros que apresentem elevada resistência mecânica.[1,65] No entanto, é preferível a utilização de blendas de matrizes poliméricas sintéticas, pois é possível ter-se um maior controle das propriedades físico-químicas dos materiais de partida. Blendas de PCL/PLGA são obtidas durante o processo de mistura destes polímeros, e as suas respectivas desvantagens são contrabalanceadas.[12,52] Além disso, as razões de PCL/PLGA podem ser modificadas, com a finalidade de se obter hidrofiliabilidade e tempos de degradação

mais adequados à aplicação desejada, e conseqüentemente controlar a adesão celular.[8,12,66] Já foi demonstrado na literatura que matrizes de PCL/PLGA favoreceram o crescimento de osteoblastos humanos nas razões 80/20 e 90/10 [66], adesão e proliferação de células de fibroblastos na razão 70/30 [8], o aumento da afinidade com fármacos [67] e a regeneração óssea alveolar na razão 50/50. [68]

3.2.1. Estratégias de Modificação de Polímeros

Várias estratégias físicas e químicas são exploradas para obtenção de combinação sinérgica de propriedades químicas, físicas e biológicas no produto.[20] Como já mencionado, misturas poliméricas têm oferecido muitas vantagens em relação ao uso de um polímero isolado na confecção de novos biomateriais. Além disso, os polímeros estão sendo combinados com outros materiais, como metais e cerâmicas, sendo esta combinação denominada compósitos.[1,52] As propriedades biológicas de matrizes poliméricas podem ser otimizadas por meio da incorporação de moléculas bioativas e/ou dopantes desejados, utilizando várias técnicas, tais como métodos químicos não covalentes (adsorção física, aprisionamento e dopagem) e covalentes, conforme observado na Figura 3.3.[20]

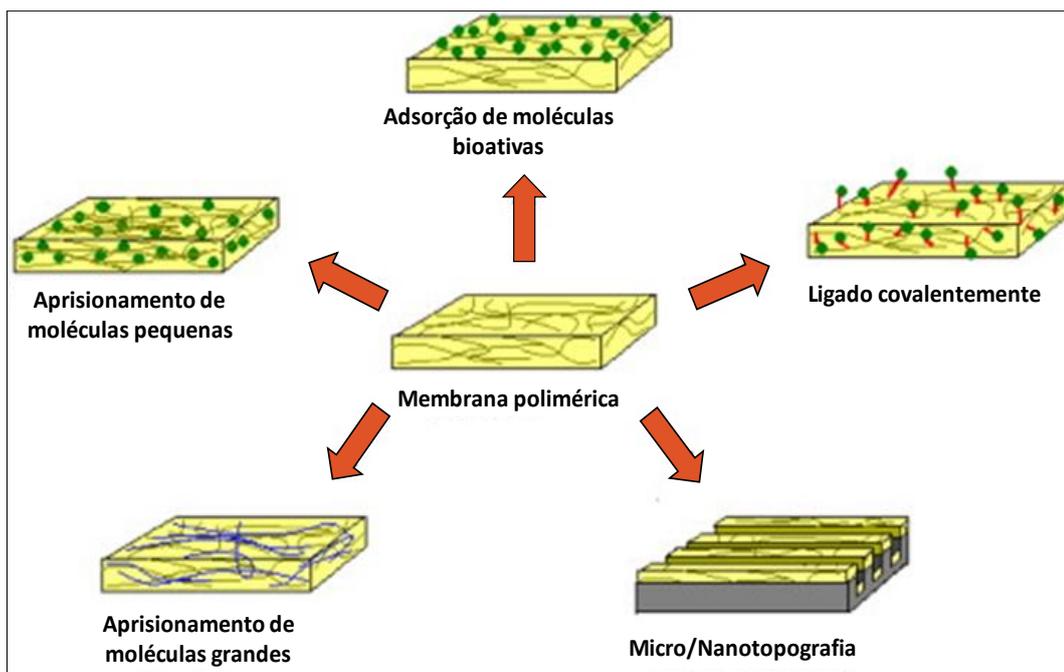


Figura 3.3. Exemplos de estratégias de modificação química e física de polímeros. Fonte: adaptado de Guirmard et al. [20].

O processo de adsorção física é direto, mas a molécula adsorvida pode dissociar-se e tornar o material “inativo”. Já o aprisionamento da molécula desejada pode ser conseguido adicionando-a na solução de monômero/eletrolito durante a síntese. O processo de dopagem também pode ser explorado para modificar não covalentemente matrizes poliméricas e para introduzir novas propriedades para uma aplicação desejada. Alternativamente, métodos covalentes podem ser usados para funcionalizar permanentemente estas matrizes. O monômero pode ser sintetizado com os grupos funcionais desejados e depois polimerizado. A modificação covalente pós-polimerização também é possível, mas é mais desafiadora para os polímeros insolúveis. Também com o objetivo de otimizar as propriedades biológicas, tratamentos de superfície, como a micro e nanotopografia por litografia padrão, são utilizados para manipular as propriedades físicas e, conseqüentemente, aumentar a adesão e a proliferação de uma variedade de tipos de células, melhorando sua biocompatibilidade, como apresentado nas Figuras 3.3 e 3.4.[20,69]

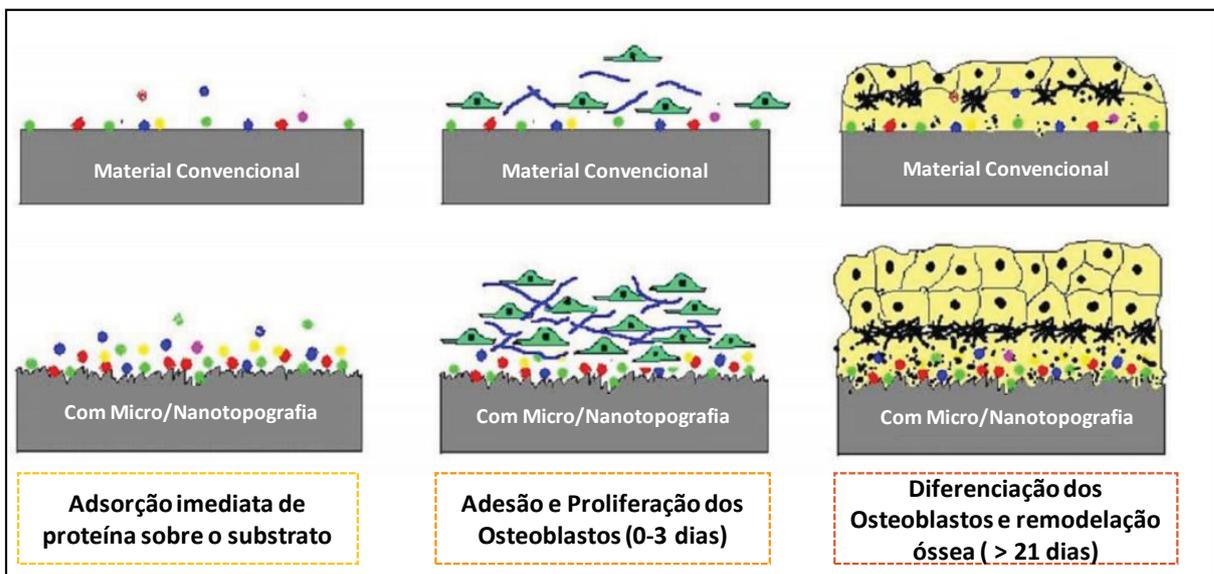


Figura 3.4. Esquema de uma explicação possível para a superioridade de um material com micro/nanotopografia em comparação a materiais convencionais na Engenharia de Tecidos. Fonte: adaptado de Alpaslan e Webster [69].

Tratamentos de superfície tem por finalidade modificar a superfície de um material para melhorar a sua funcionalidade e biocompatibilidade (Figura 3.4).[69] Alguns exemplos de técnicas utilizadas no tratamento de superfícies são:

rugosidade de superfície (ex: pulverização catódica do inglês *sputtering deposition*), modelagem padronizada de superfície (ex: litografia padrão), modificação química da superfície (ex: deposição de vapor químico ou de vapor de plasma do inglês *chemical vapor deposition* e *plasma vapor deposition*), adesão de moléculas bioativas ou fármacos na superfície (ex: por adsorção ou ligados covalentemente) e formação de superfícies porosas para facilitar a entrega de fármacos (ex: jateamento e fotolitografia).[70] A Figura 3.5 está apresentando um esquema das técnicas de tratamento de superfícies.

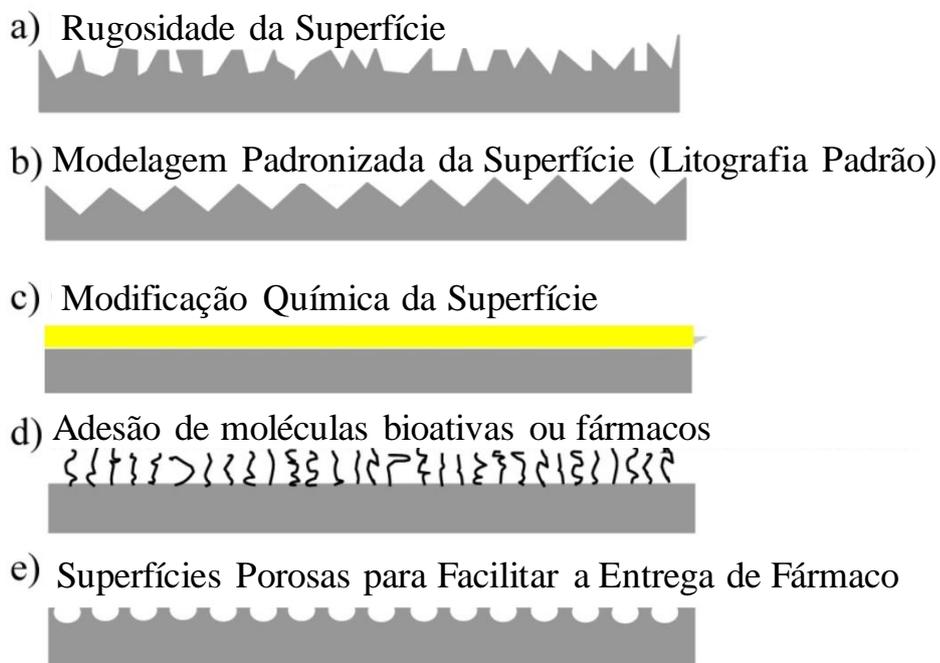


Figura 3.5. Técnicas comumente utilizadas para o tratamento de superfícies para aumentar a biocompatibilidade. Fonte: adaptado de Govindarajan e Shandas[70]

Apesar do grande sucesso em controlar individualmente as propriedades químicas e biológicas, as propriedades físicas (principalmente as propriedades mecânicas) dos tecidos biológicos são difíceis de replicar. O desempenho mecânico do tecido biológico complexo supera a maioria dos materiais poliméricos projetados, e pesquisas são necessárias para determinar o que torna o tecido biológico tão robusto. Dentro deste contexto, a abordagem que tem sido explorada por pesquisadores da área é a união de todas estas estratégias em um único material. Ao sintonizar vários parâmetros ao mesmo tempo, um amplo espectro de

funcionalidades está sendo desenvolvido e pode ser utilizado na engenharia de novos materiais para produtos biomédicos específicos.[71] Por exemplo, na produção de condutos artificiais e multifuncionais de orientação neural aplicados para a regeneração nervosa periférica, têm-se utilizado esta abordagem combinatória de técnicas.[72] A Figura 3.6 apresenta um esquema resumido das estratégias de reparação estrutural utilizadas para melhorar os condutos de orientação neural.

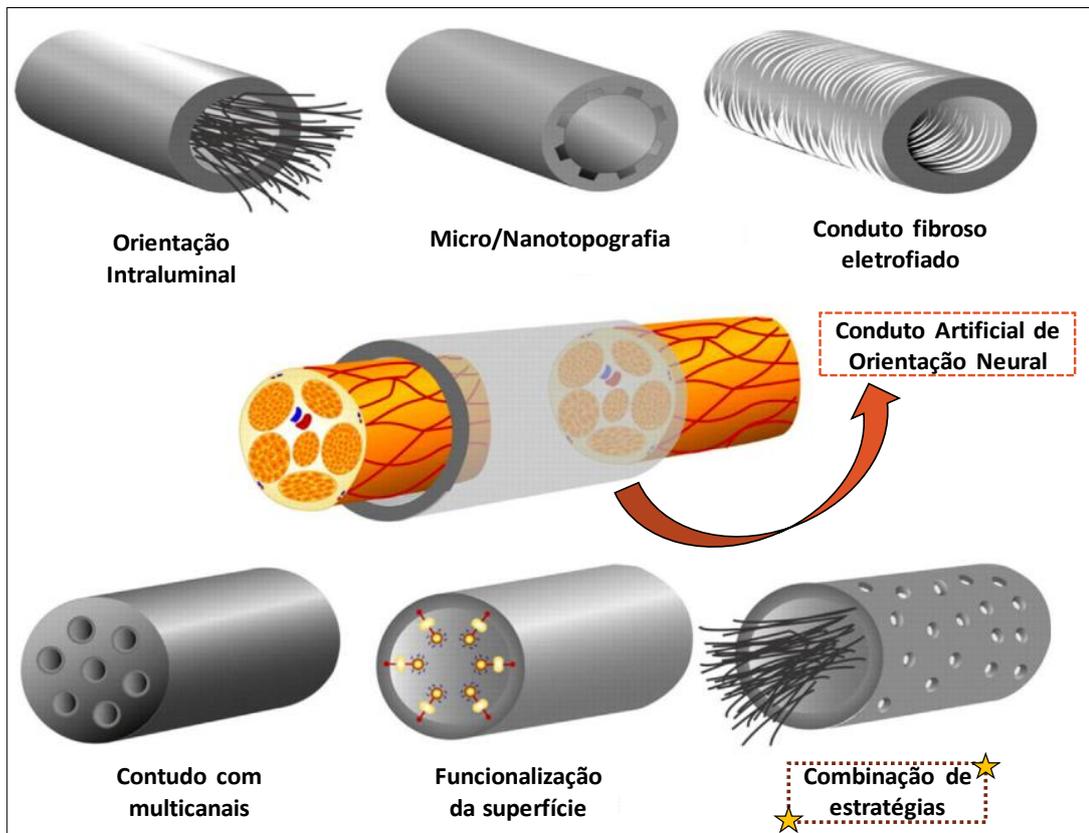


Figura 3.6. Esquema resumido das estratégias de reparação estrutural utilizadas para melhorar os condutos de orientação neural. Fonte: adaptado de Daly et al. [72].

As estratégias de reparo incluem o uso de estruturas de orientação intraluminais e projetos luminiais de multicanais, a fim de fornecer um suporte estrutural e de orientação topográfica para regeneração de axônios e migração de células de Schwann. Uma estratégia similar envolve o uso de condutos fibrosos eletrofiados com as vantagens de alta flexibilidade e porosidade, alta área superficial/volume e fibras que podem ser alinhadas para migração e proliferação guiada de células de Schwann e crescimento axonal. Outras variações incluem o

uso de condutos multicanais para controle da dispersão axonal (modelagem padronizada de superfície), bem como projetos que buscam otimizar a troca de nutrientes ou estímulos externos. Estas estratégias podem ser usadas sozinhas ou em combinação, mas requerem uma funcionalização adicional da superfície. Além disso, podem aumentar a adesão, migração, alinhamento e proliferação celular.[72]

Na literatura, já foi demonstrado que biomateriais com nano e/ou microtopografias em sua superfície, influenciam significativamente o comportamento celular como adesão, morfologia e migração em experimentos *in vitro* e *in vivo*. [12,29–31] A rugosidade superficial é uma característica importante envolvida na biocompatibilidade com as células, e vários estudos já correlacionaram uma maior afinidade celular com superfícies mais rugosas.[32,33] Alguns estudos exploraram o papel de microtopografias superficiais no formato e orientação das células.[30,33–37] A presença de micro e/ou nanoporos em estruturas poliméricas também favorece a adesão e proliferação celular, pois permitem a permeabilidade de nutrientes.[7,15,73]

Superfícies padronizadas podem favorecer o alinhamento, alongamento e polarização de células de Schwann [35–37,74], linhagens de células neurais [75], células do gânglio da raiz dorsal [76] e células-tronco mesenquimais derivadas do tecido adiposo [30], quando comparado a superfícies lisas. É importante que biomateriais apresentem propriedades de superfície adequadas para cada aplicação. Para tanto, é necessário modificar a superfície do biomaterial que entra em contato direto com o ambiente biológico.[77]

3.3. Biomateriais Compósitos

Os compósitos são uma classe de materiais constituídos por uma fase contínua (matriz) e uma fase dispersa (componente de reforço, carga ou modificador) separadas por interfaces, cujas fases constituintes apresentam identidade química e formas diferentes, as quais são conservadas distintas após o processamento.[1,78–80] Com base na identidade da fase da matriz, os compósitos podem ser classificados como: compósitos com matriz metálica, cerâmica e

polimérica.[23] A carga modificadora pode ser partículas de variadas formas (fibras, fitas, tubos, etc.), tamanhos e origem. São incorporadas com diversos objetivos, por exemplo, melhorar propriedades mecânicas, aumentar ou retardar a taxa de degradação, melhorar a biocompatibilidade e bioatividade, bem como controlar o perfil de liberação de fármacos ou fatores de crescimento quando incorporados aos biomateriais compósitos.[1,7,81–83]

Alguns polímeros quando utilizados puros apresentam baixa resistência à tração e ao impacto, e dependendo da aplicação são características insuficientes para desempenhar uma satisfatória ação mecânica.[23] Uma abordagem no melhoramento destes materiais consiste na incorporação de cargas orgânicas ou inorgânicas (componente de reforço), resultando em um material com propriedades superiores à dos materiais de partida.[78,79]

Os compósitos poliméricos são de fácil processamento e podem ser preparados por várias técnicas como, por exemplo, a eletrospinning (do inglês *electrospinning*), extrusão por fusão (do inglês *melt-extrusion*), mistura de soluções (do inglês *solution mixing*), tecnologia de látex (do inglês *latex technology*) e métodos *in situ* como a polimerização *in situ* (do inglês *in situ polymerization method*).[23]

Por meio da combinação de polímeros naturais e sintéticos com vários outros tipos de materiais, busca-se sinergizar as propriedades benéficas de diferentes componentes em um único biomaterial.[84] Dada a ampla gama de materiais disponíveis e que são compatíveis entre si para fins de processamento, as possíveis combinações de materiais como compósitos são essencialmente infinitas.[59] Este é o tipo de estratégia que vem demonstrando capacidade de melhorar a interação celular e estimular a integração do biomaterial com o tecido hospedeiro.[84] As principais associações são do tipo polímero-cerâmica e metal-cerâmica.[1]

Estudos demonstram cada vez mais que as células humanas podem aderir, crescer, migrar e se organizar melhor em compósitos poliméricos quando comparado com o biomaterial de único componente.[23,59,85,86] É através do

desenvolvimento contínuo e na implementação de melhorias nos processos de fabricação destes materiais que será possível elevar o número de casos de sucessos na ET e Medicina Regenerativa.[84]

Nesta visão constante e necessária de biomateriais cada vez mais efetivos e reforçados, surgem os nanocompósitos, que são materiais compósitos, nos quais pelo menos uma das fases apresenta-se em dimensões na faixa nanométrica ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$). Eles são vistos como os materiais mais promissores do século 21, pois podem apresentar características de desempenho superiores, sendo uma alternativa para superar as limitações dos compósitos tradicionais.[87] Nanocargas têm sido exploradas com objetivo de melhorar a interação do biomaterial compósito com o meio biológico, uma vez que apresentam elevada área superficial e reatividade química.[17,18]

3.3.1. Nanomateriais e Materiais Nanoestruturados

O avanço na área da saúde é fundamental para o desenvolvimento da sociedade, e tem sido beneficiado pelo crescimento da nanotecnologia, pois é uma área de pesquisa que está revolucionando o meio científico e gerando novas expectativas tecnológicas.[1,88,89] Por exemplo, a possibilidade de se obter novas ou melhores propriedades com a diminuição da escala dos materiais tem impulsionado o desenvolvimento de nanomateriais.[1,3,17,90]

A nanotecnologia, por meio da engenharia de customização de nanopartículas (NPs) e materiais nanoestruturados (MNEs), tem disponibilizado uma gama de NPs e MNEs com tamanhos, formas e origens diversificados.[89,91,92] Em princípio, os MNEs são descritos como materiais com comprimento de 1–1000 nm em pelo menos uma dimensão. No entanto, eles são comumente definidos como sendo de tamanho na faixa de 1 a 100 nm e exibem fenômenos dependentes do tamanho.[91]

NPs são categorizadas de acordo com o tipo de material base, ou seja, podem ser encontradas NPs baseadas em carbono, metal, cerâmica, polímeros,

semicondutores e lipídios. Podem ser obtidas através de dois métodos principais: *bottom-up* e *top-down*. Além disso, esses métodos podem ser divididos em sínteses mecânica, química e biológica.[89,93]

As NPs são de qualquer formato em pequenas dimensões e podem ser classificadas em estrutura 0D, 1D, 2D ou 3D. As partículas 0D são aquelas que apresentam as suas três dimensões na escala nanométrica são, por exemplo os pontos quânticos e as NPs esféricas. As partículas 1D são aquelas que apresentam uma de suas dimensões na escala nanométrica, como os nanotubos, nanofibras e nanofios. As partículas 2D possuem duas dimensões na escala nanométrica, por exemplo as nanoplacas e nanofolhas. Por fim, os nanomateriais 3D, assim como os 0D, apresentam as três dimensões na escala nanométrica, mas as partículas 3D podem apresentar maior anisotropia em sua estrutura.[94,95] A Figura 3.7 apresenta estas estruturas e outros exemplos de nanomateriais.

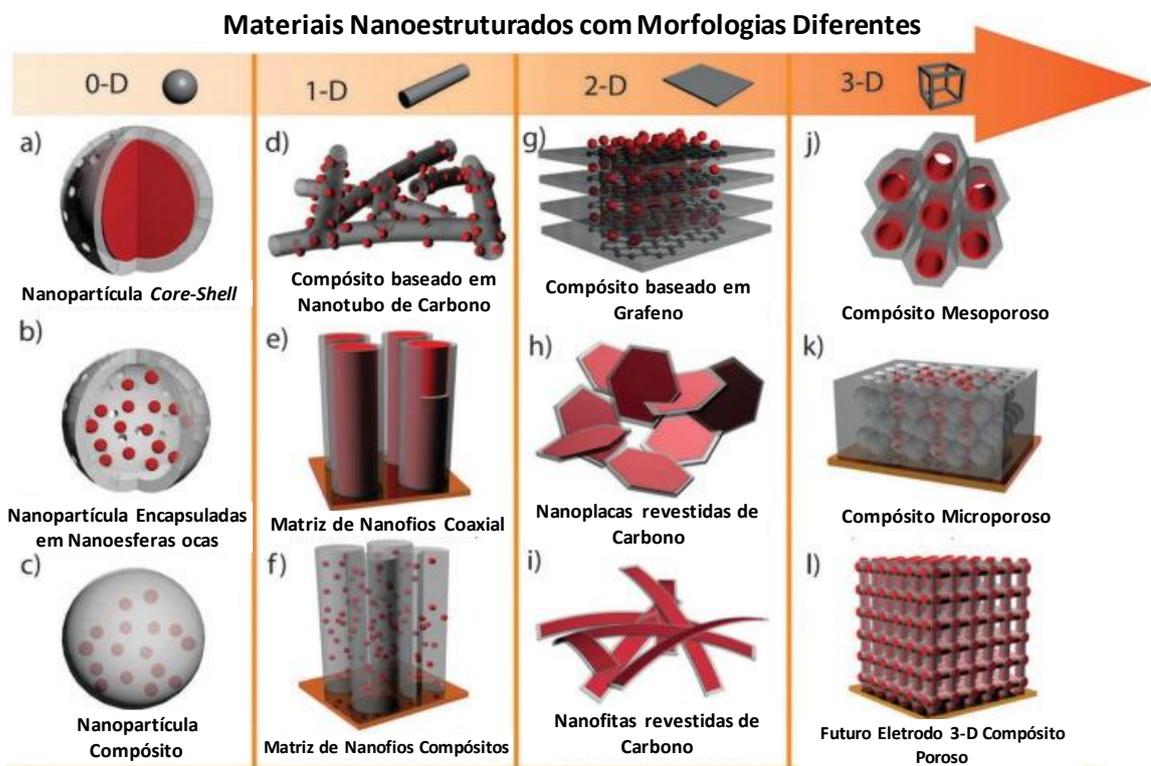


Figura 3.7. Exemplos de materiais nanoestruturados com morfologias diferentes. Fonte: Adaptado de Tiwari et al. (2013). [95]

A tecnologia de fabricação que emprega o uso desses nanomateriais está permitindo a produção mais rápida e barata de materiais exclusivos, abrindo portas para uma ampla gama de aplicações na indústria biomédica e auxiliando no aprimoramento da qualidade de vida.[59] A Figura 3.8 ilustra alguns dos tipos de NPs e nanoestruturas utilizadas na pesquisa biomédica.

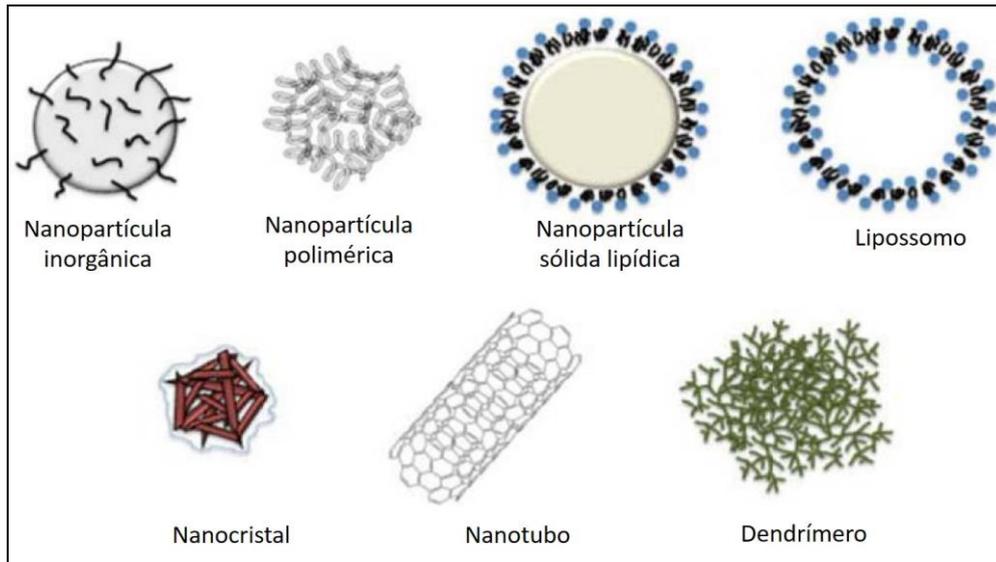


Figura 3.8. Vários tipos de nanopartículas / nanoestruturas utilizadas na pesquisa biomédica. Fonte: Khanbabaie e Jahanshahi, 2012. [96]

As nanofibras têm 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 a pele, ossos, nervos, dentina, colágeno e cartilagem.[17,97] 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 biomaterial pelo organismo.[14,17] A área e a energia de superfície das nanofibras permitem uma melhor aderência de células, proteínas e fármacos na sua superfície.[17,18]

Os principais fatores que afetam as propriedades dos biomateriais compósitos e nanocompósitos são as características dos materiais constituintes, assim como o percentual, o tamanho, a distribuição e orientação das partículas (cargas) na matriz e as interações interfaciais.[1,98] Partículas e NPs podem ser

adicionadas a uma matriz para melhorar as propriedades mecânicas, como tenacidade e dureza. Outras propriedades, como estabilidade, isolamento elétrico e condutividade térmica, também são controladas pela presença das mesmas.[1]

Partículas de hidroxiapatita é um exemplo de carga com propriedades mecânicas inadequadas. Porém, serve mais como um componente bioativo do que para reforço, sendo amplamente utilizada em matrizes cerâmicas para aplicações em tecido ósseo.[1] Quando utilizadas em dimensões nanométricas estimulam respostas mais efetivas da atividade osteoblástica e cicatrização óssea.[99] Vários estudos utilizando NPs de biovidro em diferentes matrizes poliméricas demonstraram melhorar a interação material-célula, aumentando a adesão e disseminação celular, sem alteração na morfologia natural das células. As células aderentes muitas vezes não se ligam em polímeros não modificados, exibindo uma morfologia esférica não natural.[71] A Figura 3.9 apresenta um exemplo do comportamento de uma célula quando em contato com um filme polimérico qualquer sem e com NPs bioativas.

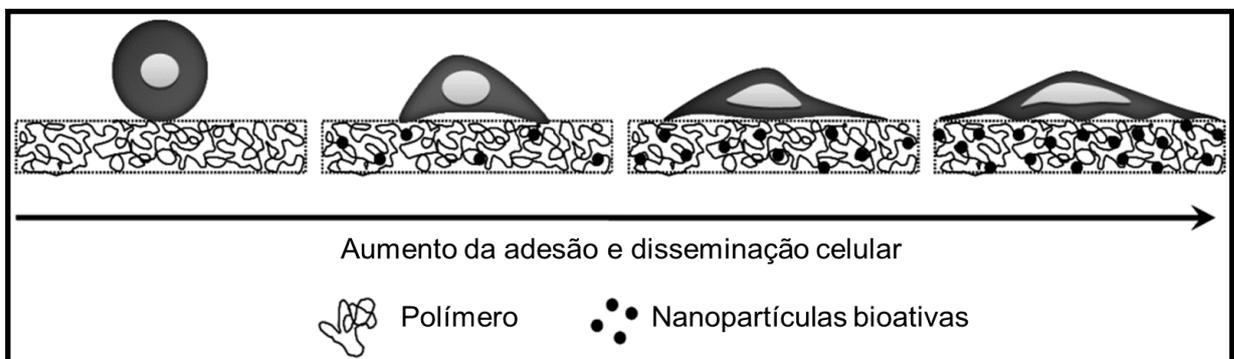


Figura 3.9. Exemplo do comportamento de uma célula quando em contato com um filme polimérico qualquer sem e com nanopartículas bioativas. Fonte: Adaptado de Wu et al. (2010)[71].

Lv et al. (2017) [100] prepararam suportes de nanofibras de PLGA com nanotubos de carbono de multi-paredes (MWCNTs) por eletrofiação para avaliar o crescimento de células neurais. As nanofibras apresentaram boas propriedades mecânicas devido a presença dos MWCNTs e as células neurais apresentaram uma melhor sobrevivência após oito dias de cultura, especialmente para o crescimento de astrócitos. Isto é um resultado promissor para o futuro tratamento da doença de

esclerose múltipla que causa a desmielinização do sistema nervoso e lesão axonal.[100]

3.3.2. Materiais/Nanomateriais baseados em Polímeros Condutores Intrínsecos

Os polímeros condutores intrínsecos (PCIs) são materiais orgânicos que apresentam propriedades elétricas e ópticas similares àquelas apresentadas pelos metais e semicondutores inorgânicos (à temperatura ambiente), e ao mesmo tempo exibem as propriedades atraentes dos polímeros convencionais, tais como a facilidade de síntese e flexibilidade no processamento.[20] Desde 1980 estudos com PCIs para fins biomédicos expandiram devido as descobertas de compatibilidade com muitas moléculas biológicas.[20,101] Pesquisas envolvendo nervos, ossos, músculos e células cardíacas revelaram que os PCIs se mostram, através de estimulação elétrica, com atividades de modulador celular sobre a adesão e migração celular, síntese de ácido desoxirribonucléico - ADN (do inglês *deoxyribonucleic acid* - DNA) e secreção de proteínas.[20]

Os tecidos biológicos respondem a campos e estímulos elétricos e isto faz dos PCIs materiais atraentes para inúmeras aplicações biomédicas.[20,101]. Os PCIs vêm sendo utilizados para o desenvolvimento de biosensores (dispositivos com biomoléculas como elementos sensores integrados com transdutores elétricos), como bio-atuadores (por exemplo, músculos artificiais), na entrega de fármacos para armazenamento e liberação controlada de fármacos, como sondas neurais para registro ou estimulação de neurônios e na ET como *scaffolds* para melhorar a regeneração dos tecidos.[20,101–111] Nanotubos, nanofios, nanofitas e nanofibras de PCIs podem ser preparados por diferentes métodos [90], conforme está apresentado no Quadro 3.1.

Atualmente muitas investigações tem buscado a compreensão da interação dos PCIs com os tecidos biológicos através de ensaios *in vitro*, bem como estratégias para melhorar a biocompatibilidade dos mesmos. A incorporação de nanopartículas condutoras em PCIs, bem como em polímeros não condutores, tem sido a estratégia mais útil para superar algumas limitações, e adequar o

desempenho mecânico e a biocompatibilidade desta classe de polímeros para biomateriais clinicamente úteis.[112]

Quadro 3.1. Alguns métodos de preparação de nanotubos, nanofios, nanofitas e nanofibras de PCIs (Long et al., 2011)[90].

Métodos ou Técnicas		Vantagens	Desvantagens	Exemplos
Químico	Síntese de molde químico mole (do inglês <i>soft chemical template synthesis</i>) ex: Polimerização Interfacial	Processo de auto-montagem simples sem um modelo externo	Controle relativamente pobre da uniformidade da morfologia (forma, diâmetro) Nanoestruturas 1D pobremente ou não orientadas	Variedade de micro/nanoestruturas PAni e PPy: tubos, fios, microesferas ocas, junção de nanofios/tubos e dendritos
Físico	Síntese guiada por molde físico duro (do inglês <i>hard physical template-guided synthesis</i>)ex: Filmes Porosas	Matrizes alinhadas de tubos e fios com comprimento e diâmetro controláveis	Processo pós-síntese é necessário para remover o modelo	Nanotubos/Nanofios de PAni, PPy, P3MT, PEDOT e PPV Nanofios coaxiais CdS-PPy, Au-PEDOT, MnO ₂ /PEDOT e Ni/PPV.
Eletrofiação (do inglês <i>electrospinning</i>)		Fabricação em massa de fibras poliméricas contínuas	Geralmente em forma de teia não tecida, alinhamento possível	PAni/PEO, PPy/PEO, PAni, PPy, P3HT/PEO
Litografia ou gravação em relevo de nanoimpressão		Rápido e de baixo custo	Micro-molde é necessário	Nanofios, PEDOT, nanopontos 2D de polímero semiconductor e matrizes de PCIs alinhadas
Outra Técnicas e/ou informações				
Outros exemplos de Síntese de molde químico mole (do inglês <i>soft chemical template synthesis</i>): Método isento de molde (do inglês <i>template-free</i>); Polimerização diluída; Polimerização em emulsão inversa; Reações de mistura rápida.				

Ainda que muitos questionamentos continuam sem respostas, particularmente em relação aos mecanismos pelos quais a condução elétrica afeta as células por meio dos PCIs, existem evidências favoráveis ao uso destes materiais, em especial do polipirrol (PPy), no campo biomédico.[109,113]

3.3.2.1. Polipirrol (PPy)

Entre os PCIs, os baseados em Polipirrol (PPy) têm atraído interesse especial devido à alta condutividade elétrica, estabilidade ambiental e boas propriedades térmicas. É obtido facilmente por diferentes rotas de síntese, as quais são

economicamente viáveis, e devido a isso tornou-se um promissor candidato há várias aplicações industriais.[105,114–119] A Figura 3.10 ilustra a estrutura química do monômero pirrol (Py) e do polímero PPy.

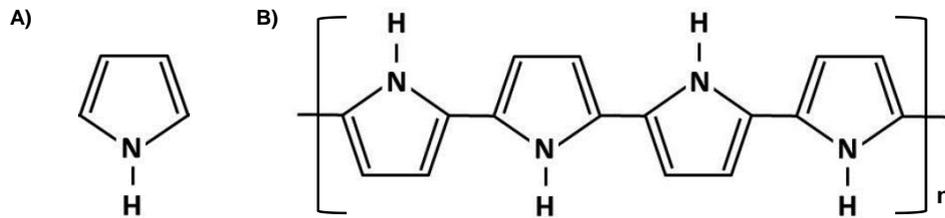


Figura 3.10. Estruturas químicas: (A) Pirrol e (B) Polipirrol. Fonte: Adaptado de Lima et al., 2018.[120]

A cadeia polimérica do PPy apresenta uma estrutura constituída por uma alternância de ligações simples e duplas (conjugação) entre os átomos de carbono, oferecendo um caminho para o fluxo de elétrons responsável pela boa condução elétrica.[120,121] PPy foi sintetizado pela primeira vez em 1916 pelo método de oxidação química do monômero Py. Em 1968, uma fina camada de PPy foi sintetizada pelo método de oxidação eletroquímica.[20,21] Filmes de PPy sintetizados por este método podem apresentar diferenças em suas características e propriedades físico-químicas, dependendo dos parâmetros de síntese (dopante, substrato e espessura, etc.).[122]

Desde então, o PPy não parou mais de ser investigado e provou ser promissor para várias aplicações, incluindo biosensores, atuadores baterias e revestimentos antiestáticos. Por apresentar boa característica de biocompatibilidade com vários tecidos biológicos e baixa toxicidade, também vem ganhando espaço e destaque em aplicações da área médica, como na ET e sistemas de entrega de fármacos.[20,21,101,111] Para usar efetivamente o PPy como biomaterial, é importante entender e controlar as propriedades elétricas, a topografia física e a química da superfície do polímero. Ainda que muitas pesquisas acerca do uso de PPy na área biomédica tenham sido publicadas, há poucos estudos sistemáticos ligando as metodologias de síntese de PPy às propriedades poliméricas básicas de

PPy (por exemplo, hidrofiliçidade, rugosidade superficial) e aos efeitos biol3gicos que essas propriedades t3m sobre as c3lulas.[122]

A polimerizaç3o qu3mica oxidativa do mon3mero Py por agentes oxidantes qu3micos em solventes aquosos ou n3o aquosos, 3 bastante usada quando se requer maiores quantidades de PPy.[116,123] Neste m3todo 3 comum a utilizaç3o de agentes oxidantes fortes (por exemplo, cloreto f3rrico (FeCl_3), permanganato de pot3ssio (KMnO_4), dicromato de pot3ssio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), etc.) e por esta raz3o, a aplicaç3o biom3dica de tais part3culas pode ser problem3tica, uma vez que estes agentes podem ficar retidos no pol3mero formado devido ao processo de dopagem e aos residuais de s3ntese.[124] A partir deste m3todo, o PPy 3 obtido na forma s3lida como um p3 fino e preto.[116,123,125].

A Figura 3.11 ilustra a estequiometria do PPy sendo dopado com os 3ons do agente oxidante (FeCl_3) e/ou outros materiais que podem ser adicionados durante o processo de polimerizaç3o.[116,123]

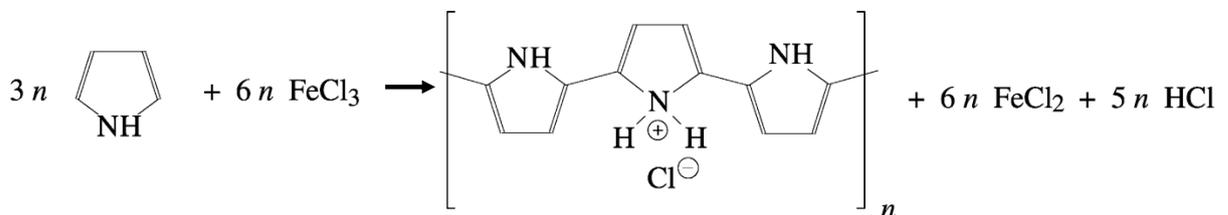


Figura 3.11. Estequiometria global da oxidaç3o do pirrol com cloreto f3rrico como agente oxidante formando polipirrol. Para cada tr3s unidades constitu3das uma 3 protonada. Adaptado de: Omastov3 et al., 2003.[117]

Neste processo, h3 a incorporaç3o concomitante de uma mol3cula dopante carregada negativamente (D^-) quando presente no processo de s3ntese, no lugar do 3on cloro (Cl^-). Ao selecionar mol3culas bioativas como dopantes carregados negativamente (D^-), o produto, pode em seguida, ser modificado para uma funcionalidade espec3fica, por meio da incorporaç3o de prote3nas, pept3deos ou de componentes da matriz extracelular (MEC).[126] As principais vantagens da s3ntese qu3mica s3o: produç3o em grande escala de PCIs e diversas rotas sint3ticas poss3veis de obter PCIs por meio de uma s3rie de produtos qu3micos.[105] Al3m

disso, o método químico é um processo simples e rápido, por isso é mais utilizado que o método eletroquímico, o qual ainda requer o uso de instrumentos especiais. Devido a estes fatores, a rota convencional mais utilizada para a obtenção do PPy continua sendo o método químico.[105,125]

Na literatura, PPy e seus compostos já foram evidenciados como promotores do crescimento de neurites em células PC12 por estimulação elétrica [103,109], bem como sistemas de entrega de fármacos controlados eletricamente [102] ou como músculos artificiais.[107,110] Ensaio em ratos *Sprague-Dawley* (linhagem de ratos albinos) por testes eletrofisiológicos e histológicos demonstraram que a regeneração do nervo ciático, utilizando tubos de silicone revestidos com PPy, apresentaram uma melhora significativa em relação ao grupo de animais que usaram somente o tubo de silicone.[127] Os resultados da pesquisa mostraram uma boa biocompatibilidade do PPy com o tecido nervoso periférico dos ratos, indicando que o PPy pode ser aplicado na regeneração de nervos periféricos danificados.

Upadhyay et al. (2015) [128] investigaram a atividade antioxidante pelo método dos radicais livres DPPH (α , α -difeníl- β -picrilhidrazil) de nanotubos de polipirrol (NTs-PPy) de diâmetros variados, os quais foram obtidos pelo método químico. Ensaio de hemólise foi realizado nos NTs-PPy, que apresentaram melhor atividade antioxidante, para avaliar a sua biocompatibilidade com eritrócitos humanos. O aumento da atividade antioxidante foi observado com a diminuição do diâmetro dos NTs, podendo ser atribuído ao aumento da área superficial por unidade de volume dos NTs. O teste de hemólise comprovou que os NTs-PPy foram biocompatíveis até uma concentração de 2,5 mg/ml, evidenciando o PPy como um material candidato interessante para aplicação como antioxidante.

Bauquier et al. (2017) [129] investigaram a biocompatibilidade do PPy para potencial aplicação na liberação controlada intracraniana de fármacos antiepilépticos. Dispositivos de PPy, sintetizados pelo método eletroquímico, foram implantados subduralmente em seis ratos fêmeas adultas de Estrasburgo com ausência genética de epilepsia. Cada rata teve o polímero implantado em um lado do córtex e uma craniotomia simulada realizada no outro lado. Após um período de

sete semanas, as ratas foram eutanasiadas e séries paralelas de secções coronais foram cortadas em todo o local do implante. Quatro séries de 15 secções foram histológica (hematoxilina e eosina) e imunohistoquimicamente (proteína nuclear neuronal específica, proteína ácida fibrilar glial e anticorpo anti-CD68) coradas e avaliadas por três pesquisadores. Os resultados mostraram que os filmes de PPy implantados não induziram inflamação, trauma, gliose e toxicidade neuronal evidentes. Os autores concluíram que o PPy oferece boa histocompatibilidade com as células do sistema nervoso central, e que poderá ser utilizado como dispositivo intracraniano para liberação controlada de fármacos antiepiléticos.

Liu et al. (2018) [113] preparou eletrodos de PPy por eletropolimerização que foram utilizados para estimulação elétrica de células MC3T3-E1 (linhagem clonal de células pré-osteoblásticas derivadas da calvaria de ratos recém-nascidos) e avaliação da sua diferenciação osteogênica. Quando foi aplicado a estimulação elétrica, ocorreu espalhamento e migração celular no eletrodo de PPy. Eles descobriram que o potencial de diferenciação osteogênica, desencadeado por estimulação elétrica, estava relacionado ao estágio inicial de crescimento celular. Portanto, os eletrodos de PPy apresentaram biocompatibilidade com as células testadas, pois foram adequados para adesão, espalhamento e proliferação celular, bem como para regular a diferenciação osteogênica. Além disso, o estudo apresentou pela primeira vez um possível mecanismo para o efeito da estimulação elétrica no comportamento celular.[113]

Mais recentemente, Costa et al. (2019)[125] avaliaram pela primeira vez os efeitos biológicos do PPy no modelo *zebrafish*. Neste trabalho, o PPy foi obtido pela polimerização química oxidativa na presença do surfactante APTS. O polímero obtido (PPy/APTS) foi suspenso na água do sistema de manutenção dos animais em quatro diferentes concentrações (25, 100, 250 e 500 µg/mL). Os parâmetros toxicológicos (mortalidade, eclosão, movimento espontâneo, frequência cardíaca, morfologia) e comportamentais dos embriões e larvas de *zebrafish* foram avaliados durante 6 dias de exposição. A interação do polímero com o coriön dos embriões e a expressão gênica do marcador relacionado à hipóxia também foram avaliados. A mortalidade dos animais não se mostrou alterada quando expostos às diferentes

concentrações de PPy/APTS. No entanto, observou-se aumento expressivo na taxa de eclosão dos embriões, principalmente para 500 µg/mL. Além disso, a frequência cardíaca, a morfologia e o comportamento dos animais mostraram-se alteradas nas maiores concentrações. Os autores sugerem uma afinidade biológica dose-dependente entre o polímero e o sistema *in vivo*, pois as partículas do PPy/APTS promoveram o envelopamento com o córion dos ovos, sem alteração do marcador de hipóxia hif1- α . Sendo assim, os autores confirmam sutis efeitos adversos da exposição ao PPy/APTS durante a embriogênese do *zebrafish*.

Ainda que o PPy venha sendo bastante explorado na área biomédica, existem poucos estudos focados na biocompatibilidade do PPy [129–131], especialmente na forma de pós.[49,125,132,133] Outro aspecto importante que vale ressaltar, é que os estudos *in vivo* do PPy têm sido limitados e focados principalmente na avaliação de toxicidade a curto prazo. Portanto, considerando suas desvantagens, como a sua baixa solubilidade e rigidez, mais estudos *in vivo* são necessários para confirmar a viabilidade do PPy como biomaterial seguro.[112]

Filmes de nanocompósitos de quitosana/nanotubos de polipirrol (quitosana/NTs-PPy) foram sintetizados com diferentes concentrações de NTs-PPy, e suas propriedades físicas e biológicas foram investigadas. Os NTs-PPy atuaram como uma barreira de transporte de massa para os componentes termicamente degradados do nanocompósito, o que resultou na diminuição da taxa de degradação com o aumento da concentração de NTs-PPy. A diminuição do ângulo de contato dos filmes com o aumento da concentração de NTs-PPy foi atribuída ao aumento da rugosidade superficial dos filmes. Os nanocompósitos apresentaram aumento da citotoxicidade, e conseqüentemente da atividade de hemólise, com o aumento da quantidade de NTs-PPy, exibindo efeito biológico de dose-dependência aos NTs-PPy. [128]

A modificação de superfícies de implantes de titânio biomédico com revestimentos baseados em NTs-PPy via polimerização eletroquímica isenta de molde foi destinada a melhorar a neurogênese entre implantes metálicos e o tecido ósseo.[134] NTs-PPy apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, que

foi melhorada ainda mais após a introdução de NPs de prata (Ag)[135] ou paládio.[136]

3.3.2.2. Polipirrol com Prata (PPy/Ag)

Os compósitos de polímeros condutores com Prata ganharam atenção apenas nos últimos anos. A prata (Ag) exibe a mais alta condutividade elétrica entre todos os metais, $\sigma = 6,3 \times 10^5$ S/cm (20 °C), e é relativamente barata em comparação com outros metais nobres.[26] Sua ação antibacteriana é mencionada na literatura desde o século 19, e foi relacionada aos íons de Ag. Atualmente, muitas cepas bacterianas são resistentes aos antibióticos, e devido a estes fatores a Ag tem sido utilizada na forma iônica ou nanoparticulada como revestimentos, em muitos casos para desinfecção. Por isso, tem sido proposto a sua utilização em implantes e instrumentos médicos para a prevenção de infecções [27], bem como em processos de cicatrização de feridas, porque reduz a inflamação, impede a contração e melhora a epitelização celular.[137]

A condutividade elétrica de PPy quimicamente sintetizado é tipicamente na faixa de 10^{-2} a 1 S/cm, enquanto a incorporação de grandes quantidades de Ag (70-80% por peso) na matriz de PPy pode melhorar a condutividade das composições de PPy/Ag até, aproximadamente, 3 a 5 ordens de magnitude (1000 S/cm). Em materiais compósitos, a Ag pode ser incorporada como nanoesferas, nanocubos, nanofibras, nanobastões, nanofios ou micropartículas por diferentes métodos. Polimerização química direta de pirrol com nitrato de prata (AgNO_3) como o oxidante é geralmente a maneira mais eficiente de preparar compostos condutores de PPy/Ag. Devido às suas propriedades antimicrobianas, a incorporação de Ag melhora ainda mais o efeito antimicrobiano do PPy.[26]

Através do revestimento da superfície de polímeros com pequenas partículas metálicas de Ag via pulverização catódica (*sputtering*) também é possível melhorar a propriedade elétrica da matriz desejada, além de imbuir ação antimicrobiana. Esta técnica tem a vantagem de ser um processo ecologicamente correto e que muda apenas a superfície da matriz desejada pelo bombardeamento direto de átomos do

metal de interesse que são depositados na matriz.[138] A otimização deste processo é essencial para obter-se produtos com melhores revestimentos e propriedades antibacterianas. Conseqüentemente, o campo das tecnologias de *sputtering* e a produção de nanocompósitos estão progredindo paralelamente, e possibilitam a obtenção de materiais diferenciados para várias aplicações biomédicas.[137–140]

3.3.2.3. Polipirrol com Grafeno e seus derivados (PPy/G, PPy/OG e PPy/OGR)

Outros materiais que têm sido utilizados são os nanomateriais baseados em carbono, como nanotubos de carbono (NTCs), grafeno (G), óxido de grafeno (OG) e óxido de grafeno reduzido (OGR), a fim de aumentar a estabilidade térmica, condutividade elétrica e fornecer alta área superficial.[141] O grafeno é considerado uma nanocarga de carbono bidimensional como uma folha plana de um átomo de espessura de átomos de carbono ligados por sp^2 , os quais são densamente empacotados em uma rede cristalina como favo de mel. É considerado como o “material mais fino do universo”, com enorme potencial de aplicação em diversas áreas industriais.[142] A Figura 3.12 apresenta as estruturas do grafeno, OG e OGR.

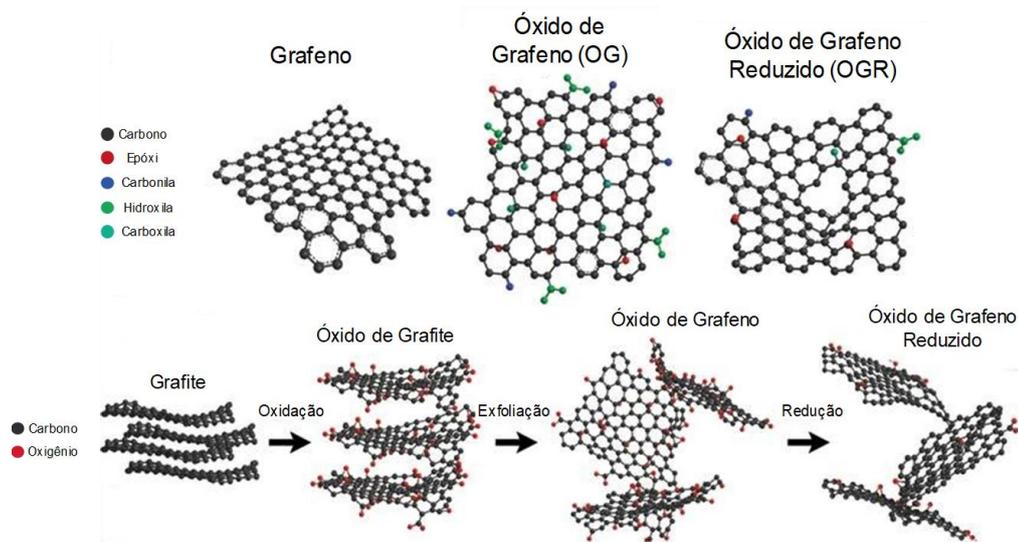


Figura 3.12. Estruturas treliçadas de grafeno, OG e OGR. Adaptado de Raval (2018).[143]

A descoberta do grafeno como nanocarga abriu uma nova dimensão para a produção de materiais compósitos leves, de baixo custo e de alto desempenho para uma variedade de aplicações.[143] Dentre os grafenos quimicamente modificados, o OGR é o mais importante, pois sua estrutura e propriedades elétrica, mecânica e térmica são semelhantes ao do grafeno puro.[144] Para o OGR, existem várias evidências que o mesmo apresenta boa biocompatibilidade, além de melhorar as propriedades mecânicas da matriz polimérica.[142] NTCs e OG podem ser utilizados como dopantes de PPy, a fim de melhorar a eficiência do carregamento de fármacos do PPy, pois facilitam a absorção dos fármacos por atração física, uma vez que exibem uma elevada área superficial.[145]

Schirmer et al. (2016) [104] produziram fibras compósitas contínuas de NPs de PPy e OGR em diferentes proporções de massa, usando a técnica de fiação por via úmida em uma única etapa. A condutividade elétrica das fibras compósitas aumentou significativamente com a adição de OGR. As propriedades mecânicas das fibras compósitas também melhoraram pela adição das folhas de OGR em comparação com fibras contendo apenas PPy. O alongamento na ruptura foi maior para a fibra compósita contendo proporções de massa iguais de NPs de PPy e folhas de OGR. Para avaliar a toxicidade das fibras, as células de fibroblastos L929 foram expostas a meios que tinham sido utilizados para extrair quaisquer lixiviados solúveis em água do material desenvolvido. Os fibroblastos cultivados nas fibras não apresentaram alteração significativa na viabilidade ou número celular, enquanto a viabilidade e o número de células foram afetados quando cultivadas em altas concentrações de lixiviados das fibras, com as fibras compósitas apresentando menor toxicidade. A alta condutividade e propriedades mecânicas, assim como a citotolerância, tornam essas fibras compósitas adequadas para uma ampla gama de aplicações na área biomédica, inclusive como componentes de *scaffolds* ou como dispositivos implantáveis de suporte e condutor para a estimulação elétrica.[104]

Embora o PPy já seja amplamente utilizado em eletrodos para estimulação celular, muitos pesquisadores também relataram que o PPy tem biocompatibilidade insuficiente para adesão celular. Devido a isto, a incorporação de moléculas bioativas no PPy tem crescido com o objetivo de melhorar a interação do PPy com

os tecidos biológicos alvos. Alguns exemplos de moléculas bioativas são a heparina, celulose, polidopamina, fatores de crescimento, vidro bioativo, hidroxiapatita, entre outras.[15,16,26,145–147]

3.3.3. Biomateriais Compósitos Híbridos e Nanocompósitos Híbridos

As estratégias que vêm sendo mais utilizadas na busca de melhores resultados terapêuticos dos biomateriais, são a produção de biomateriais baseados em compósitos e nanocompósitos, junto com a combinação de diversas técnicas de fabricação e de modificação superficial. Por meio delas, é possível integrar as funções e as propriedades dos componentes adicionados e obter biomateriais multifuncionais e/ou híbridos, para adaptação da bioatividade, integridade estrutural e mecânica.[1,5,7,42,59,72]

Misra et al. (2007) [147] incorporou pela primeira vez nanotubos de carbono de multi-paredes (MWCNTs) num compósito biodegradável e bioativo de Poli-3-Hidroxi-butilato (P(3HB)) e partículas esféricas de Bioglass® (material derivado de uma massa fundida de pó de vidro - grau 45S5). Eles foram combinados com os MWCNT para o desenvolvimento de um *scaffold* baseado em um nanocompósito ternário híbrido pela técnica da evaporação do solvente. Devido a adição dos MWCNTs, obteve-se um material altamente condutor. Além disso, o estudo verificou que ocorreu um melhor crescimento de hidroxiapatita sobre a superfície dos filmes nanocompósitos ternários quando comparado as amostras de P(3HB) puro e do nanocompósito de P(3HB)/MWCNTs. Os autores demonstraram ser possível a obtenção de um nanocompósito ternário híbrido com alto potencial para futuras aplicações na engenharia do tecido ósseo.[147]

Wang et al. (2011) [148] demonstraram que a fibroína de seda misturado com filmes nanofibrosos alinhados de PLLA/PCL, promoveu a regeneração do nervo periférico significativamente melhor do que o PLLA/PCL puro. Lee et al. (2012)[146] desenvolveram *scaffolds* com características submicrométricas, com atividade elétrica e neurotrófica simultaneamente. Por meio da técnica de eletrofiação, foi confeccionado filmes fibrosos biodegradáveis baseados em PLGA. As fibras

receberam um revestimento nanométrico de um composto intrinsecamente condutor, PPy, e a imobilização do fator de crescimento do nervo (NGF – do inglês *nerve growth factor*) na estrutura final, assim disponibilizando uma superfície fibrosa com a presença de composto bioativo e condutor. O *scaffold* de PLGA/PPy/NGF promoveu de forma mais eficiente o crescimento de neurites de células PC12 em comparação com o de PLGA/PPy em ensaios *in vitro*. A estimulação elétrica através do *scaffold* favoreceu ainda mais a resposta de crescimento das células. Portanto, foi obtido um *scaffold* multifuncional híbrido de estrutura fibrosa submicrométrica, bioativo pelo fator de crescimento e com atividade eletrocondutora, devido o revestimento com polímero condutor, para potencial uso na regeneração de nervos lesados.[146]

Bobber et al. (2014) [26] sintetizaram pela primeira vez filmes compósitos flexíveis e independentes de celulose nanofibriladas/polipirrol (CNF/PPy) e CNF/PPy/nanopartículas de prata (CNF/PPy/Ag) via polimerização química *in situ* em uma única etapa para aplicações biomédicas. A incorporação de PPy em CNF melhorou significativamente suas propriedades mecânicas e elétricas. Os filmes de CNF/PPy/Ag apresentaram forte efeito de inibição contra o crescimento de bactérias Gram-positivas (por exemplo *S. aureus*), o qual foi correlacionado com a presença de Ag nos filmes. Em comparação com a CNF pura, a incorporação de nanopartículas de PPy e Ag aumentou a rugosidade superficial e diminuiu levemente as propriedades mecânicas dos filmes compósitos, sendo ainda suficiente para aplicações como filmes independentes. Os filmes compósitos são, portanto, candidatos promissores para adesivos antimicrobianos na cicatrização de feridas e possivelmente também em aplicações de liberação de fármacos.[26]

Weaver et al. (2014) [149] investigaram a liberação eletricamente controlada de dexametasona através de um *scaffold* baseado no nanocompósito de PPy com nanofolhas de OG, obtidos por eletropolimerização. A liberação foi controlada pela intensidade da estimulação elétrica e a mesma não ocorreu na ausência desta estimulação. Experimentos de cultura celular *in vitro* demonstraram que o fármaco liberado reteve sua bioatividade e que nenhum subproduto tóxico foi liberado do filme durante a estimulação elétrica. A diminuição do tamanho e da espessura das

nanofolhas de OG, por meio do tratamento de ultrassom antes da deposição no nanocompósito, altera a morfologia do filme, a quantidade de fármaco carregado e o perfil de liberação, criando uma oportunidade de ajustar as propriedades do sistema de liberação de fármacos a uma variedade de necessidades terapêuticas. O estudo mostrou um alto nível de controle do processo de liberação eletricamente controlada da dexametasona a partir do *scaffold* baseado no nanocompósito de PPy/OG.[149]

Yan et al. (2016) [150] preparam grafeno (G) incorporado com PPy por uma nova polimerização aprimorada de moagem de bolas e obtiveram um material com melhor capacitância para a estimulação elétrica. PLGA foi eletrofiado com G/PPy (grafeno/polipirrol) para obtenção de um *scaffold* híbrido de nanofibras alinhadas do nanocompósito híbrido PLGA/G/PPy para estimulação elétrica. Este material foi aplicado como eletrodo para estimulação do crescimento de células ganglionares da retina (CGR) e seus axônios. Tais células quando lesionadas causam o glaucoma, principal doença ocular que gera cegueira irreversível. O crescimento *in vitro* das CGR no *scaffold* híbrido estimulado eletricamente, conduziu a uma melhoria de 137% no comprimento celular, com um efeito antienvhecimento significativamente melhorado para as CGR. Os autores proporcionam um novo biomaterial baseado em um nanocompósito híbrido como uma nova alternativa eficiente para a terapia clínica de doenças relacionadas ao nervo óptico, como o glaucoma.[150]

Singu e Yoon (2018) [151] sintetizaram um nanocompósito ternário altamente esfoliado de óxido de grafeno/polipirrol/Ag (OG/PPy/Ag) usando OG, nitrato de prata e pirrol em um único vaso. Com base na morfologia da superfície, foi observado que as NPs de PPy/Ag estavam uniformemente distribuídas nas nanofolhas de OG altamente esfoliadas. A partir do estudo eletroquímico, o nanocompósito ternário OG/PPy/Ag exibiu uma capacitância específica mais alta de 370,6 F/g do que o nanocompósito binário correspondente PPy/Ag (103,4 F/g). O nanocompósito ternário OG/PPy/Ag mostrou um desempenho de alta taxa de 87,4% a uma densidade de corrente de 1 a 10 A/g. As propriedades eletroquímicas melhoradas são atribuídas ao bom contato entre as NPs de PPy/Ag e as nanofolhas de OG. Os autores demonstraram que o nanocompósito ternário é um material ativo como um eletrodo eficiente para alta densidade de energia e supercapacitores.[151]

Mais recentemente, Ferreira et al. (2019) [152] prepararam compósitos poliméricos na forma de filmes à base de blendas de PCL/PLGA com nanofibras de polipirrol (PPy), a fim de auxiliar na regeneração de nervos periféricos. O PPy foi sintetizado por polimerização química oxidativa na presença do APTS como agente de dopagem. Blendas de PCL/PLGA (100: 0, 90:10, 80:20 e 70:30) (m/m) e compósitos de PCL/PLGA com 10% de nanofibras de PPy foram preparados pelo método da evaporação de solvente. Além disso, os filmes compósitos foram avaliados quanto sua biocompatibilidade, e as linhagens celulares RAW 264.7 (células semelhantes a macrófagos de ratos), MRC-5 e HGF (células semelhantes a fibroblastos de pulmão de feto e gengivais humano) foram utilizadas. As fibras de PPy apresentaram diâmetro de 88–974 nm e condutividade elétrica na ordem de grandeza de 10^{-1} S/cm. Os filmes dos compósitos de PCL/PLGA/PPy apresentaram morfologia fibrosa e rugosa, contendo poros interconectados e com superfície hidrofílica, bem como comportamento térmico estável e boa condutividade elétrica. Os resultados de citotoxicidade dos filmes compósitos mostraram que a presença de PPy fibroso não induziu toxicidade nas linhagens celulares avaliadas. Portanto, filmes de PCL/PLGA/PPy apresentaram biocompatibilidade, e são promissores para aplicações na ET.[152]

Os relatos dos pesquisadores têm demonstrado a importância no desenvolvimento de novos biomateriais a partir de compósitos e nanocompósitos híbridos, a fim de obter recursos mais adequados para tratar os variados problemas crescentes na área da saúde.[1,5,42,59,72] Portanto, é essencial introduzir materiais mais condutores e robustos, como o polipirrol, prata, grafeno e seus derivados, na estrutura final de suportes poliméricos com fins de aplicações biomédicas que possam ou não utilizar de estimulação elétrica no processo terapêutico.[150]

Uma alternativa pode ser a adição de OGR na síntese *in situ* do PPy dopado com APTS, e outra é o revestimento da superfície do PPy com pequenas partículas metálicas de Ag via pulverização catódica, ambas técnicas com possibilidades de fabricação de materiais híbridos com melhores propriedades elétricas. Além do

mais, a dispersão dessas nanocargas condutivas híbridas em matrizes poliméricas pode resultar em um material com propriedades mecânicas, elétricas e biológicas promissoras para diversas aplicações. Nesse sentido, justifica-se a obtenção de biomateriais multifuncionais baseados em nanocompósitos híbridos de matriz de PCL/PLGA com PPy/OGR ou PPy/Ag com superfície microestruturada e padronizada para aplicação na ET, principalmente para regeneração de tecidos do sistema nervoso central e periférico. A incorporação destas nanocargas híbridas ainda não foi descrita na literatura para matrizes de PCL/PLGA, bem como não há relatos da fabricação de filmes nanocompósitos de PCL/PLGA/PPy ou PCL/PLGA com PPy modificado, e com microtopografia padronizada por evaporação de solvente.

Neste trabalho foram desenvolvidas metodologias de preparo de nanocargas híbridas baseadas em PPy com OGR ou Ag. Três metodologias de polimerização *in situ* do pirrol empregando o ácido p-toluenosulfônico como dopante principal junto de nanofolhas de OGR foram utilizados para preparar nanocargas híbridas de PPy/OGR. Pulverização catódica foi utilizada para obtenção de nanocargas híbridas de PPy com NPs de Ag. A influência do OGR e da Ag nas propriedades físico-químicas e biológicas finais do PPy foram investigadas. PCL, PLGA e blendas de PCL/PLGA foram utilizados para preparar filmes poliméricos sem e com microtopografias padronizadas de canais longitudinais por evaporação de solvente. A influência da adição de PLGA em matriz de PCL, bem com a presença de canais padronizados nas propriedades físico-químicas e biológicas finais dos filmes foram investigados. As nanocargas híbridas (PPy, PPy/OGR e PPy/Ag) foram adicionadas na blenda de PCL/PLGA e filmes nanocompósitos foram obtidos sem e com microcanais padronizados por evaporação de solvente, então caracterizados.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

No presente capítulo, serão apresentados os aspectos associados aos materiais e reagentes utilizados nos procedimentos experimentais, as técnicas de caracterização dos produtos obtidos, informações dos equipamentos utilizados e os laboratórios e parcerias que foram envolvidos durante o desenvolvimento deste trabalho. A Figura 4.1 mostra o fluxograma das etapas do trabalho que foram realizadas, juntamente com as etapas de trabalho que serão submetidas para revistas de Qualis A ou B e que serão detalhadas nos itens que seguem.

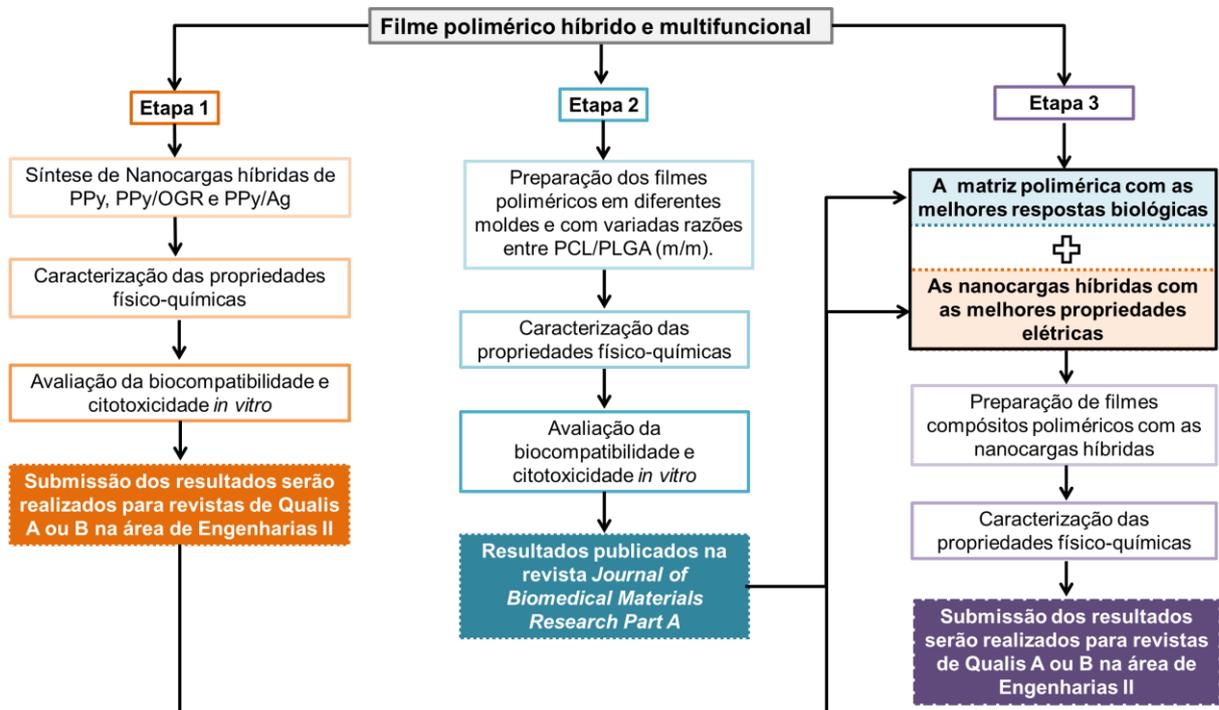


Figura 4.1. Fluxograma das etapas de trabalho que foram realizadas durante quatro anos no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais da PUCRS.

4.1. Obtenção de Polipirrol (PPy), Óxido de Grafeno Reduzido (OGR) e das Nanocargas Híbridas PPy/OGR e PPy/Ag

A preparação das nanocargas híbridas foi realizada em diferentes laboratórios localizados no campus da PUCRS.

4.1.1. Síntese de Polipirrol (PPy)

O preparo do polipirrol (PPy) foi realizado no Laboratório de Organometálicos e Resinas (LOR) localizado na Escola de Ciências/PUCRS. A síntese do PPy com estrutura de nanofibras foi realizada via polimerização química oxidativa em meio aquoso [115,153], de acordo com o protocolo adaptado de Xia et al. (2011) [115] e as melhores condições de síntese foram estabelecidas previamente segundo estudo anterior [154]. O monômero pirrol (Py, 98%, Sigma-Aldrich) foi primeiramente destilado até obtenção do líquido incolor para a remoção de impurezas. Os demais reagentes foram utilizados como recebidos.

Uma solução A, contendo $7,2 \times 10^{-3}$ mol do Py e $3,2 \times 10^{-2}$ mol do dopante ácido p-toluenosulfônico monohidratado (APTS, 98,50%, Sigma-Aldrich) em 20 mL de água deionizada, permaneceu sob agitação magnética á 0 °C por 60 minutos. Posteriormente, a solução A recebeu gota a gota uma solução B, a qual continha $12,3 \times 10^{-3}$ mol do agente oxidante cloreto férrico (FeCl_3 , 98%, Sigma-Aldrich) em 5 mL de água deionizada (Figura 4.2). Após 24 h de reação, o produto foi filtrado e lavado com água destilada e etanol para a remoção do residual de síntese. Foi obtido um sólido preto de PPy, o qual foi seco em estufa (80°C) por 8 h e armazenado em dessecador com sílica.

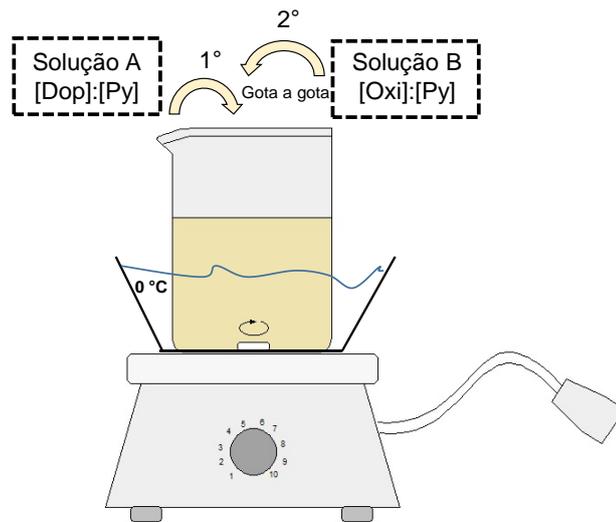


Figura 4.2. Esquema da síntese padrão do polipirrol. Fonte: Autora.

4.1.2. Obtenção do Óxido de Grafeno Reduzido (OGR)

Óxido de Grafeno Reduzido (OGR) foi doado pelo Grupo de Pesquisa de Nanomateriais da professora Dra. Nara Regina de Souza Basso. OGR foi obtido pelo Método *Staudenmaier* modificado, seguido de redução térmica de acordo com o protocolo adaptado de Herrera-Alonso et al. (2007)[155]. Os detalhes técnicos e metodológicos, assim como as melhores condições estabelecidas para obtenção do OGR podem ser encontrados na dissertação de mestrado de Thuany Garcia Maraschin intitulado “Preparação de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido e dispersão em matriz polimérica biodegradável”. [156]

4.1.3. Sínteses das Nanocargas Híbridas de PPy/OGR

A síntese das nanocargas híbridas de PPy/OGR foi realizada via polimerização química oxidativa *in situ* em meio aquoso [115,153] na presença do OGR [157–159]. Foi avaliada a influência de três metodologias de síntese, as quais se diferenciam pelo uso de banho de ultrassom e/ou ultrassom de ponteira, nas propriedades físico-químicas das nanocargas preparadas. As razões molares utilizadas para os três métodos foram de [1]:[4]:[1,7] entre [Py]:[dopante]:[oxidante], respectivamente. Os volumes das soluções A e B também foram mantidos conforme descrito no item 4.1.1. Para cada método foi obtido um PPy controle, bem como as

nanocargas híbridas de PPy/OGR com as seguintes razões mássicas de OGR: 0,1%, 1%, 3%, 5%, 10% e 20% m/m.

A Figura 4.3 ilustra o esquema da obtenção das nanocargas híbridas de PPy/OGR via polimerização química *in situ*.

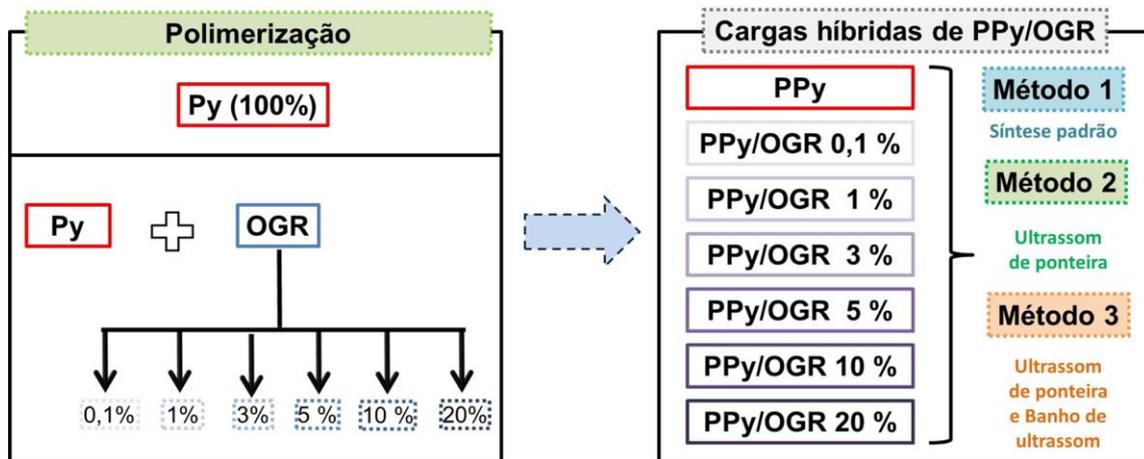


Figura 4.3. Fluxograma das nanocargas híbridas obtidas via polimerização química *in situ*. Fonte: Autora.

4.1.3.1. Síntese de PPy/OGR pelo Método 1

No método 1 (MET1), a solução aquosa inicial (A) contendo o dopante, OGR e Py (solução A) foram dispersos sob agitação magnética por 1 h à 0 °C. Após, a solução B (oxidante) foi adicionada gota a gota e a reação transcorreu por 24 h. O produto foi lavado, seco e armazenado conforme os mesmos procedimentos realizados na obtenção do PPy padrão deste estudo, descrito anteriormente no item 4.1.1.

A Figura 4.4 ilustra um esquema das etapas de síntese das nanocargas híbridas de PPy/OGR preparadas pelo método 1 pela adição de 1% OGR, e tais etapas foram realizadas da mesma forma para os outros percentuais de OGR definidos para este estudo.

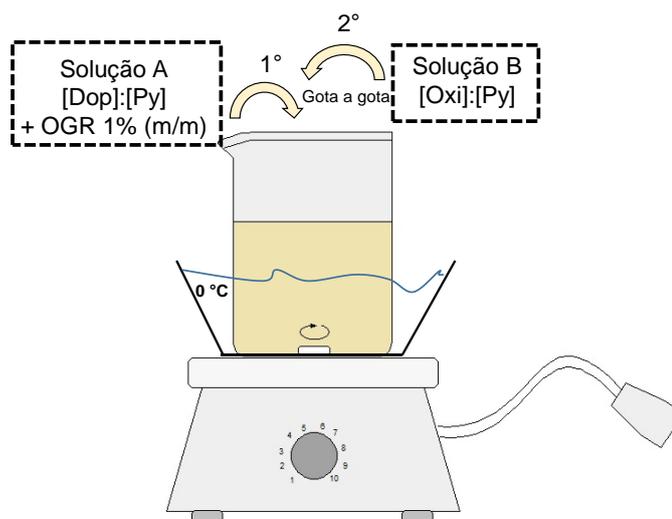


Figura 4.4. Esquema das etapas de síntese da nanocarga híbrida de PPy/OGR (1%) pelo método 1.

Fonte: Autora.

4.1.3.2. Síntese de PPy/OGR pelo Método 2

No método 2 (MET2), ultrassom de ponteira foi utilizado a fim de disponibilizar um OGR mais esfoliado, com área superficial livre para interagir com o monômero.[151] O dopante e OGR (solução A) foram dispersos inicialmente sob agitação magnética (1 h à 0 °C). Após a adição do Py na solução A, foi realizado o tratamento com ultrassom de ponteira por 20 minutos (frequência 20 kHz, potência 70%, modelo QR500, Ultronique). Em seguida, foi realizado a adição gota a gota da solução B (oxidante) e a reação transcorreu até o fim conforme metodologia do PPy padrão deste estudo (item 4.1.1).

A Figura 4.5 ilustra um esquema das etapas de síntese das nanocargas híbridas de PPy/OGR preparadas pelo método 2 pela adição de 1% OGR, e tais etapas foram realizadas da mesma forma para os outros percentuais de OGR definidos para este estudo.

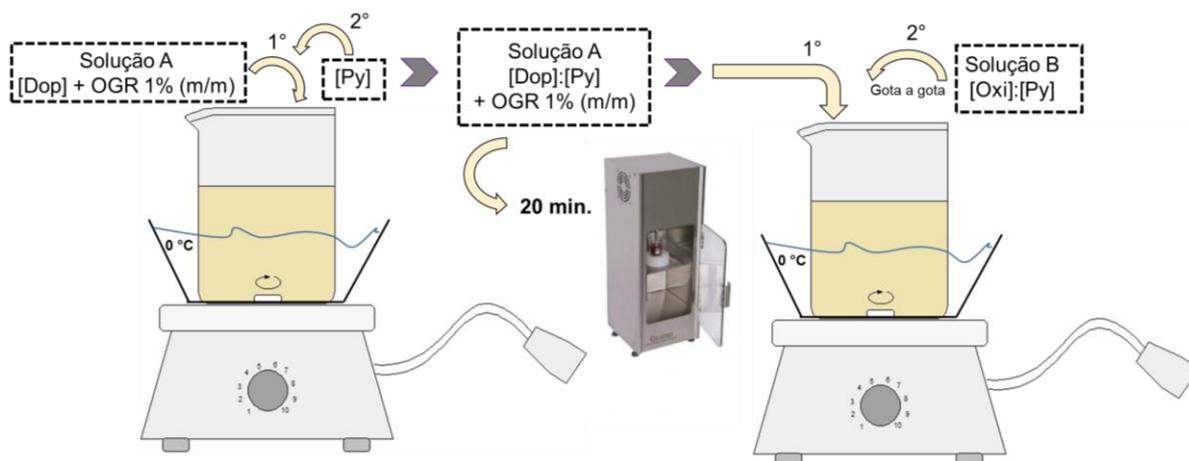


Figura 4.5. Esquema das etapas de síntese da nanocarga híbrida de PPy/OGR (1%) pelo método 2.

Fonte: Autora.

4.1.3.3. Síntese de PPy/OGR pelo Método 3

No método 3 (MET3), ultrassom de ponteira e banho ultrassônico foram combinados a fim de disponibilizar um OGR altamente esfoliado.[151] A solução aquosa inicial (A) contendo o dopante e OGR foram previamente dispersos com ultrassom de ponteira por 10 minutos (frequência 20 kHz, potência 70%, modelo QR500, Ultronique) e banho ultrassônico por 30 minutos (frequência 40 kHz, modelo Q5.9L, Ultronique). Após, foi adicionado $7,2 \times 10^{-3}$ mol do Py na solução A e as mesmas condições de uso do ultrassom de ponteira e banho ultrassônico foram realizadas novamente. Após 60 min de agitação magnética à 0 °C, a solução A recebeu gota a gota a solução B, a qual continha o agente oxidante. A reação ocorreu por 24 h, após este tempo, o produto foi lavado, seco e armazenado conforme os mesmos procedimentos realizados na obtenção do PPy padrão deste estudo (item 4.1.1).

A Figura 4.6 ilustra um esquema das etapas de síntese das nanocargas híbridas de PPy/OGR preparadas pelo método 3 pela adição de 1% OGR, e tais etapas foram realizadas da mesma forma para os outros percentuais de OGR definidos para este estudo.

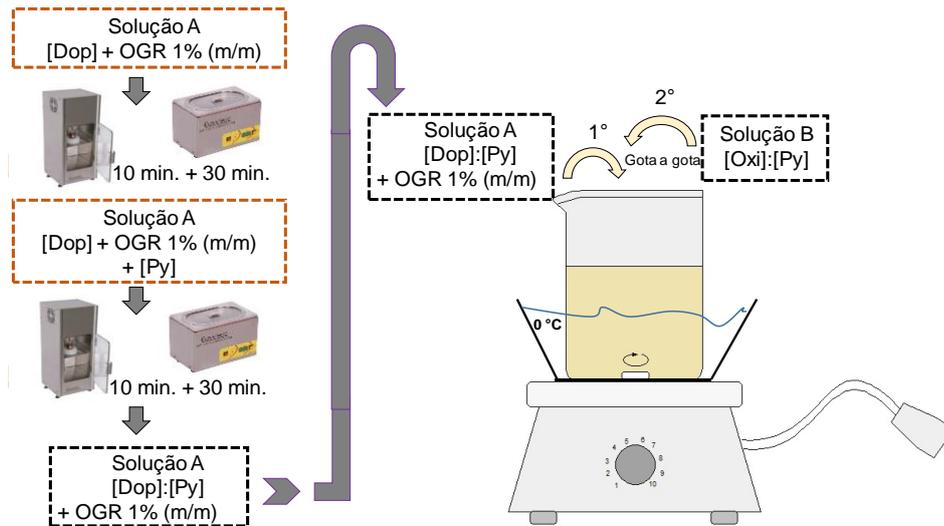


Figura 4.6. Esquema das etapas de síntese da nanocarga híbrida de PPy/OGR (1%) pelo método 3.
Fonte: Autora.

4.1.4. Obtenção das Nanocargas Híbridas de Polipirrol/Prata (PPy/Ag)

O preparo das nanocargas híbridas de polipirrol/prata (PPy/Ag) foi realizado no Centro Interdisciplinar de Nanociências e Micro-Nanotecnologia – NanoPUC localizado no Parque Científico e Tecnológico (TECNO PUC) da PUCRS. O material foi preparado em colaboração com o professor Dr. Dario Eberhardt, docente da Escola de Ciências da PUCRS. Previamente um lote de PPy foi preparado via polimerização química oxidativa de acordo com metodologia descrita anteriormente (item 4.1.1). As razões molares utilizadas na síntese deste lote foram de [1]:[2]:[1,7] entre [Py]:[dopante]:[oxidante], respectivamente. As nanocargas híbridas de PPy/Ag foram obtidas por deposição da Ag diretamente sobre o pó preto de PPy por meio de pulverização catódica (do inglês *sputtering deposition*) utilizando uma câmara de vácuo.

Diferentes quantidades de Ag foram depositadas em 300 mg de PPy variando-se o tempo de exposição. Todas as deposições por *sputtering* foram realizadas a 30 W sob pressão de trabalho de argônio (99,99%, White Martins-Brasil) fixadas em 2×10^{-2} mbar, distância do alvo de Ag de 12 cm e os tempos de 50, 100, 500 e 1000 s para uma exposição gradativa do PPy às NPs de Ag. Durante a deposição, a frequência de vibração do agitador foi mantida a 17 Hz por uma

geração de onda senoidal. Após o processo de deposição, todas as amostras foram armazenadas em dessecador com sílica. Outros detalhes teóricos e técnicos experimentais do equipamento podem ser encontrados nos trabalhos científicos de Gonçalves et al. (2017) e Gonçalves et al. (2015).[160,161] A Figura 4.7 ilustra um breve esquema da obtenção das nanocargas híbridas de PPy/Ag preparados por *sputtering*.

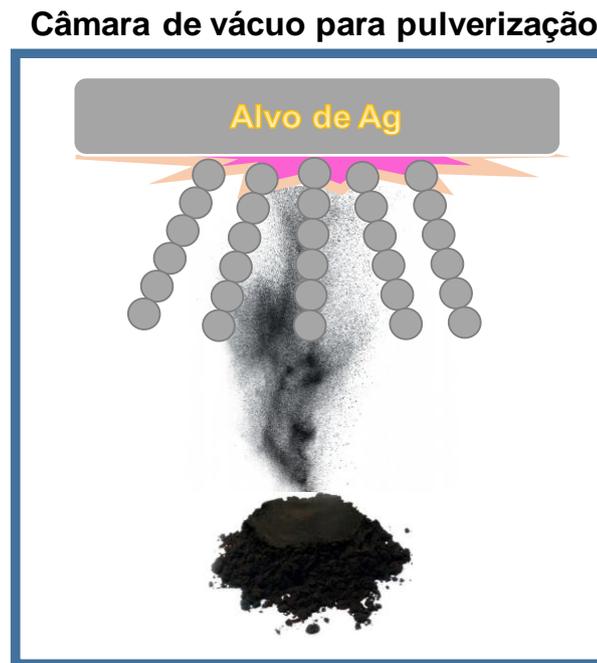


Figura 4.7. Esquema ilustrativo da obtenção das nanocargas híbridas de PPy/Ag por meio do processo de *sputtering deposition* em câmara de vácuo. Fonte: Autora.

4.2. Caracterização das Nanocargas de PPy, OGR e Nanocargas Híbridas (PPy/OGR e PPy/Ag)

O estudo das propriedades físico-químicas do PPy e das nanocargas híbridas obtidas (PPy/OGR e PPy/Ag) é de extrema importância para compreensão das características dos produtos obtidos. A Figura 4.8 mostra o fluxograma das técnicas de caracterização que foram realizadas nos produtos na forma de pós e que serão detalhadas nos itens que seguem.

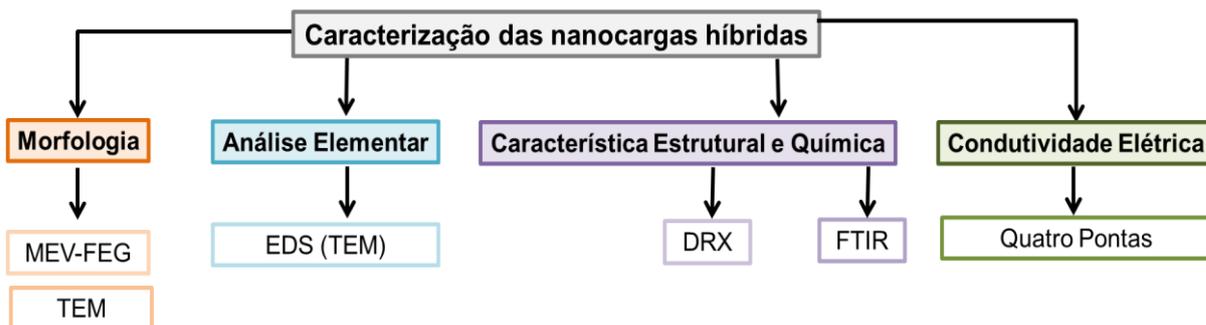


Figura 4.8. Fluxograma das técnicas utilizadas para caracterização das nanocargas híbridas. Fonte: Autora.

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

A estrutura química do PPy e das nanocargas híbridas obtidas (PPy/OGR e PPy/Ag) foram determinadas por FTIR e o equipamento está localizado na Escola de Ciência da PUCRS. Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos no espectrômetro da Perkin-Elmer Instruments (modelo *Spectrum One FT-IR Spectrometer*) na faixa espectral de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e 4 varreduras. Foram confeccionadas pastilhas em forma de disco (1 x 10 mm) da amostra com KBr (brometo de potássio) sob pressão de 10 toneladas, em uma prensa Perkin-Elmer Instruments. As pastilhas foram secas em estufa (100 °C) por 12 h antes da análise.

4.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG)

A morfologia do PPy e das nanocargas híbridas obtidas (PPy/OGR e PPy/Ag) foram analisadas por MEV-FE no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise (LabCEMM) da PUCRS em um microscópio modelo Inspect F50 (FEI Company). As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro por um metalizador (BALTEC SCD 005). As imagens foram registradas no modo de elétrons secundários usando uma onda elétrica de 20 keV (tensão de aceleração) em variados aumentos de magnificação. O diâmetro médio das estruturas formadas do PPy e das nanocargas híbridas foram medidos com o programa *ImageJ* (Fiji).

4.2.3. Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

A morfologia do PPy e das nanocargas híbridas obtidas (PPy/OGR e PPy/Ag) também foi analisada por TEM no LabCEMM/PUCRS em um microscópio modelo Tecnai G2 T20 (FEI *Company*) equipado com espectrômetro de raios-X por dispersão de energia (EDS) com detector de desvio de silício (SDD, Apollo SDD, EDAX® *products*). As amostras foram dispersas em acetona por 1 h em banho de ultrassom (frequência de 40 kHz, modelo Q5.9L, Ultronique). Uma pequena alíquota foi gotejada no suporte de amostra (*grid* de cobre), e após a evaporação do solvente, o material foi armazenado em estufa à vácuo por 12 h antes da análise. As imagens foram captadas com aceleração de elétrons de 200 keV em variados aumentos de magnificação. A análise química (microanálise elementar) da superfície das amostras foi realizada por EDS após a captura das imagens por TEM. O diâmetro médio das partículas de Ag nas nanocargas híbridas de PPy/Ag foram medidos no programa *ImageJ* (Fiji).

4.2.4. Condutividade Elétrica (CE)

A condutividade elétrica do PPy e das nanocargas híbridas obtidas (PPy/OGR e PPy/Ag) foi determinada pelo método da sonda de quatro pontas [162,163] na Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira (FEIS) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP) em Ilha Solteira (São Paulo) em parceria com o grupo de pesquisas do professor Dr. Jose Antonio Malmonge, docente da UNESP/ Campus Ilha Solteira. As amostras foram analisadas em pastilhas na forma de disco (13,4 mm de diâmetro e <1 mm de espessura) preparadas por compactação do pó de PPy ou da carga híbrida com auxílio de um pastilhador de aço inox sob pressão de 10 toneladas, em uma prensa Perkin-Elmer Instruments. Uma fonte de tensão modelo 236 (Keithley *Instruments*) e um Multímetro (modelo HP34401) foram usados para medição elétrica na configuração de quatro sondas. Os valores estão apresentados como a média de três medições feitas na superfície das pastilhas de cada amostra.

4.2.5. Difração de Raios-X (DRX)

Os padrões de difração de raios-X (DRX) foram realizados em um difratômetro (modelo XRD 7000, Shimadzu) com radiação de geometria de cobre $K\alpha$ ($CuK\alpha$) operando com voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA, varredura do 2θ de 3° a 60° , passo de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 2,0 s. As amostras foram analisadas na forma de pó seco em temperatura ambiente, sob condições operacionais constantes. O equipamento faz parte do Laboratório de Materiais e Nanoestruturas localizado no NanoPUC (TECNO PUC/PUCRS).

Os padrões de difração de raios-X (DRX) também foram realizados na FEIS-UNESP/ Campus Ilha Solteira em um difratômetro (modelo XRD 6000, Shimadzu) no modo de radiação de $Cu K\alpha$ (comprimento de onda: $1,5418 \text{ \AA}$). As varreduras foram realizadas do $2\theta = 5^\circ$ a 55° , a uma taxa de varredura de $1^\circ/\text{min}$. As amostras foram analisadas na forma de pó seco em temperatura ambiente, sob condições operacionais constantes. Os ensaios foram realizados em parceria com o grupo de pesquisas do professor Dr. Jose Antonio Malmonge, docente da UNESP/ Campus Ilha Solteira.

4.3. Avaliação das Propriedades Biológicas do PPy e das nanocargas híbridas (PPy/OGR e PPy/Ag)

As nanocargas desenvolvidas neste trabalho foram analisadas quanto à viabilidade celular e citotoxicidade por meio do ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio). Os ensaios foram conduzidos em duas etapas:

1ª etapa (MTT 1): foram testados os extratos brutos das nanocargas;

2ª etapa (MTT 2): as nanocargas foram testadas na forma de pó em diferentes concentrações.

A 1ª etapa foi realizada no Laboratório de Neurociências do Instituto do Cérebro da PUCRS em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Daniel Marinowic, docente da Escola de Medicina da PUCRS, e a 2ª etapa foi realizada no Laboratório de Farmacologia Aplicada (LAFAP) da Escola de Ciências /PUCRS.

A Figura 4.9 mostra o fluxograma da avaliação biológica que foi realizada nos produtos em forma de pós e que será detalhada nos itens que seguem.

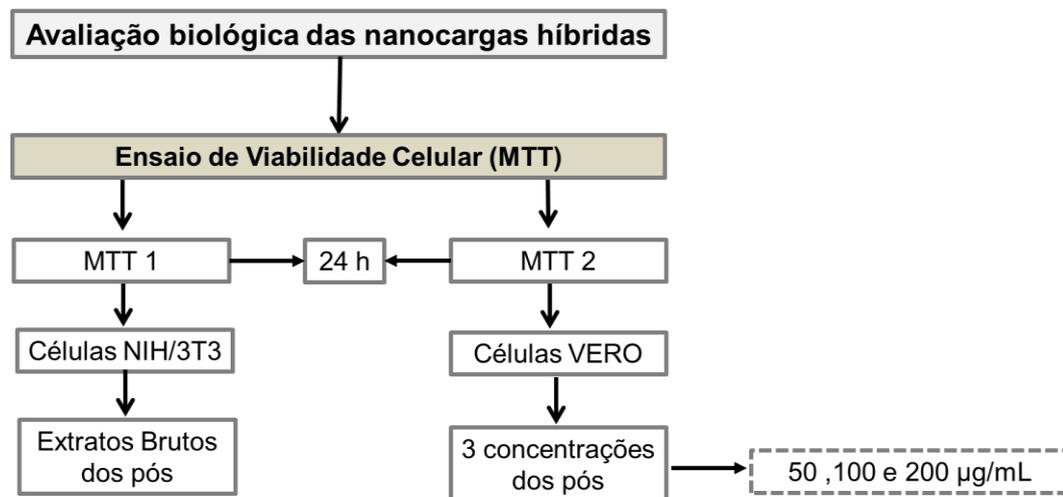


Figura 4.9. Fluxograma da avaliação biológica realizada nas nanocargas híbridas. Fonte: Autora.

4.3.1. Cultura e Manutenção das Células (MTT 1)

Fibroblastos de camundongos da linhagem celular NIH/3T3 (ATCC®-American Type Culture Collection-TCC, Old Town, Maryland, USA) foram cultivados em garrafas de cultura de 25 cm² (TPP®, Zollstrasse, Suíça) até atingir confluência ideal (80%) com meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Invitrogen®, Carlsbad, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de gentamicina e 100 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco®) em estufa a 37 °C com atmosfera controlada e umedecida com 5% CO₂.

4.3.2. Preparação dos Extratos Brutos das Nanocargas (MTT 1)

O processo de extração foi realizado de acordo com o estudo de Humpolíček et al. (2018) [164], o qual foi baseado na norma ISO 10993-5 com algumas

modificações necessárias para avaliação de amostras em pó. A extração foi realizada em recipiente quimicamente inerte e fechado, no qual o pó foi exposto a 2 mL de meio de cultivo por 24 h a 37 ± 1 °C. Para cada 1 mL de meio de cultivo foi utilizado 50 mg de pó de cada amostra. Os extratos brutos foram separados dos pós por centrifugação a 5000 rpm por 10 min. Antes do processo de extração, cada amostra foi lavada com 4 L de água destilada intercalada com 200 mL de etanol e secas a 80 °C por 8 horas. Algumas amostras não foram analisadas, pois não foi possível fazer a separação dos extratos dos pós.

4.3.3. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT 1)

A avaliação citotoxicológica dos extratos obtidos a partir das nanocargas híbridas de PPy/OGR e PPy/Ag, e seus respectivos controles (PPy), foi realizada por meio do ensaio MTT, método colorimétrico útil para avaliar a viabilidade e proliferação celular de células viáveis. Enzimas desidrogenases mitocondriais em células viáveis reduzem os sais de MTT (cor amarela) em Cristais de Formazan (cor violeta), o qual pode ser quantificado por meio da leitura da densidade ótica (DO) no comprimento de onda de 590 nm utilizando um espectrofotômetro de microplacas. A porcentagem de viabilidade celular foi calculada através da Equação 4.1 (Neisi et al., 2019 [165]):

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{DO_{amostras}}{DO_{controle}} \times 100 \quad (4.1)$$

A linhagem celular NIH/3T3 foi plaqueada em placas de 96 poços com 200 µL de meio DMEM suplementado numa densidade de 3×10^4 células por poço, sendo incubadas por 24 h em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Após esse período, foram lavadas com DPBS® (Solução Fosfato-Salina de Dulbecco). Então, as células foram expostas aos extratos brutos (PPy; PPy/OGR e PPy/Ag) e a placa foi armazenada por 24 h em estufa (37 °C e 5% CO₂). Ao término desse período, os tratamentos de cada poço foram aspirados e 200 µL de solução MTT na concentração de 5 mg/mL em meio DMEM suplementado foram adicionados, e a placa foi armazenada por 4 h em estufa a 37 °C e 5% CO₂. Por último, os cristais de Formazan foram eluídos em

200 µL de Dimetil Sulfoxido (DMSO) a temperatura ambiente para posterior realização da leitura. Um experimento independente em triplicata para cada extrato das amostras foi realizado para este ensaio, também foi utilizado um grupo sem tratamento como controle do experimento.

4.3.4. Cultura e Manutenção das Células (MTT 2)

A linhagem celular utilizada neste estudo foi as células renais de macaco verde africano (VERO) obtidas da Coleção de Cultura do Tipo Americana (do inglês *American Type Culture Collection* – ATCC; Rockville, MD). As células da linhagem VERO foi cultivada em meio DMEM suplementado e mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera controlada e umedecida com 5% CO₂. Para a realização dos experimentos as células foram tripsinizadas e plaqueadas conforme a necessidade.

4.3.5. Ensaio de Viabilidade Celular (MTT 2)

A viabilidade celular de diferentes concentrações das nanorcargas também foram determinadas pelo ensaio de MTT. Para avaliação da viabilidade celular, a linhagem celular VERO foi plaqueada numa densidade de 5x10³ células por poço em placas de 96 poços. Após a confluência, as células foram expostas a diferentes concentrações de PPy, PPy/OGR e PPy/Ag (Quadro 4.1) e incubadas por 24 horas. Os ensaios foram realizados em três experimentos independentes em triplicata para cada concentração, também foi utilizado um grupo sem tratamento como controle do experimento.

Quadro 4.1. Concentrações e linhagem celular utilizadas no ensaio MTT 2.

Amostras	Concentrações	Linhagem celular
PPy (controle MET 1)	50, 100 e 200 µg/mL	VERO
PPy (controle MET 3)		
PPy/OGR 10% (MET 3)		
PPy/OGR 20% (MET 3)		
PPy (controle Ag)		
PPy/Ag (1000 s)		

Após 24 horas de incubação, as células foram lavadas com PBS e a elas foram adicionados 100 μ L de solução de MTT 0,5% por poço. Após 3 horas de incubação, o meio foi removido e na sequência, os cristais de Formazan foram eluídos em 100 μ L de DMSO. A densidade óptica de coloração foi determinada por espectrofotômetro (SpectraMax Plus) a 570 nm.[166] Os resultados foram determinados em percentual da absorbância dos tratados em relação ao grupo que não recebeu tratamento (controle). As nanocargas híbridas foram lavadas com 4 L de água destilada intercalada com 200 mL de etanol e secas por 8 horas a 80 °C para serem avaliadas por ensaio MTT. As nanocargas selecionadas para este ensaio foram as que apresentaram melhores resultados de CE e com maior razão mássica de carga de refoço (OGR ou Ag) utilizada na sua preparação.

4.3.6. Análise Estatística (MTT 1 e MTT 2)

Os dados da viabilidade celular (MTT 1 e MTT 2) foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido do pós-teste de Tukey, usando o software Graph-Pad (San Diego, CA), onde $p < 0,05$ foi indicativo de significância estatística.

4.4. **Preparação dos filmes poliméricos sem e com microtopografias padronizadas**

O preparo das matrizes poliméricas, sem e com microtopografias padronizadas, foi realizado no LOR, localizado na Escola de Ciências/PUCRS. Os filmes foram preparados por evaporação de solvente.[7,39,66,152,167] As condições de mistura e as razões (m/m%) utilizadas entre policaprolactona/poli (ácido láctico-co-glicólico) (PCL/PLGA) foram escolhidas para este trabalho com base no estudo anterior realizado por Giovanna Ramos Garcez em sua dissertação de mestrado intitulada “Condutores poliméricos microestruturados longitudinalmente para o reparo do nervo periférico” (Garcez, 2015). [168]

Soluções poliméricas (33 mg/ mL) de PCL ($M_n = 80.000$, Sigma-Aldrich), PLGA (Purasorb® PLG8523, copolímero [85/15] de poli (ácido L-láctico/glicólico),

viscosidade inerente = 2,38 dL/g em clorofórmio, Holanda) e blends de PCL/PLGA (90/10, 80/20 e 70/30) foram preparadas em clorofórmio (CHCl_3 , Synth, Brasil) e solubilizadas por 4 h em banho de ultrassom (frequência 40 kHz, modelo Q5.9L, Ultronique). Após isto, as soluções foram vertidas em placas de vidro Petri (5,5 cm de diâmetro) para evaporação de solvente à temperatura ambiente, a qual foi realizada por 48 h.

Os filmes com microtopografias padronizadas (ou microestruturados) foram confeccionados nas mesmas razões (m/m%) entre PCL/PLGA e nas mesmas condições mencionadas anteriormente. Entretanto, as soluções foram vertidas em um molde microestruturado de silício com canais longitudinais de 5, 10, 15 e 20 μm de largura e altura constante (25 μm). Neste trabalho, o tempo da solubilização das matrizes foi ampliado, passando de 3 h para 4 h o tempo de banho de ultrassom, bem como o procedimento final aplicado na etapa da evaporação de solvente foi alterado, com relação a metodologia aplicada por Garcez (2015).[168] Neste trabalho os filmes obtidos foram secos à vácuo por 8 h, assim alterando e ampliando o tempo final de secagem das amostras.

A Figura 4.10 ilustra a fotografia do molde de silício fabricado pelo processo de fotolitografia no *Centre Inter-universitaire de Recherche et d'Ingénierie des Matériaux* (CIRIMAT) e cedido pela pesquisadora da *Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne* (EPFL), Dra. Amelie Bédurier. O molde microestruturado padronizado (8 cm de comprimento por 2,5 cm de largura) é composto por canais longitudinais de quatro tamanhos (5, 10, 15 e 20 μm) e cada tamanho está distribuído no formato de um retângulo de 0,9 x 1,2 mm. Todos os canais tem altura fixa de 25 μm .

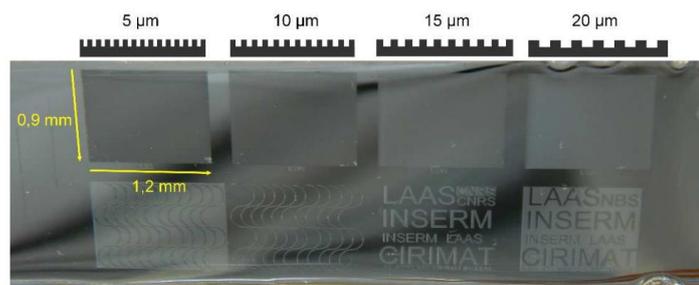


Figura 4.10. Fotografia do molde de silício microestruturado por fotolitografia. Fonte: Garcez, 2015.[168]

A Figura 4.11 ilustra um esquema das etapas de preparação dos filmes poliméricos, sem e com microtopografias padronizada, via evaporação de solvente.

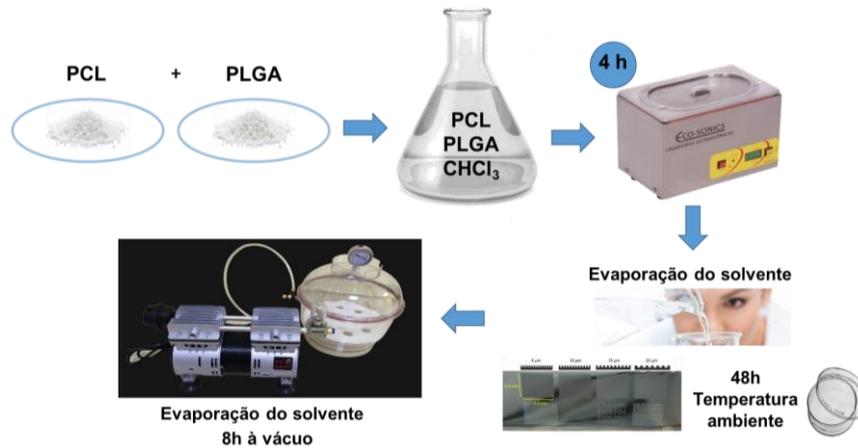


Figura 4.11. Fluxograma das etapas de preparação dos filmes poliméricos via evaporação de solvente com e sem microtopografias padronizadas. Fonte: Autora.

A Figura 4.12 ilustra o fluxograma dos tipos de filmes poliméricos (sem e com microtopografia) obtidos via evaporação de solvente. Os filmes confeccionados sem microtopografia padronizada foram considerados do grupo filmes lisos.

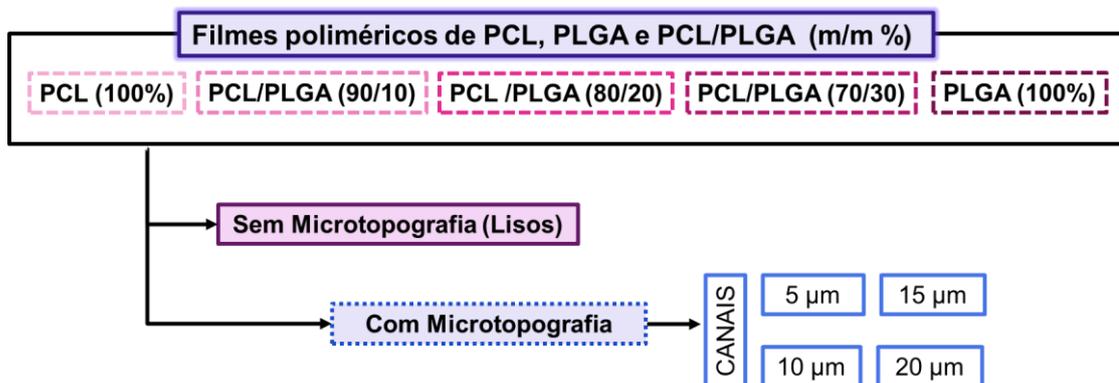


Figura 4.12. Fluxograma dos tipos de filmes poliméricos preparados. Fonte: Autora.

4.5. Caracterização dos filmes poliméricos sem e com microtopografias padronizadas

A caracterização dos filmes poliméricos, sem e com microtopografias, foi realizada em diferentes laboratórios localizados na PUCRS. A Figura 4.13 mostra o

fluxograma das técnicas de caracterização que foram realizadas nos filmes obtidos e que serão detalhadas nos itens que seguem.

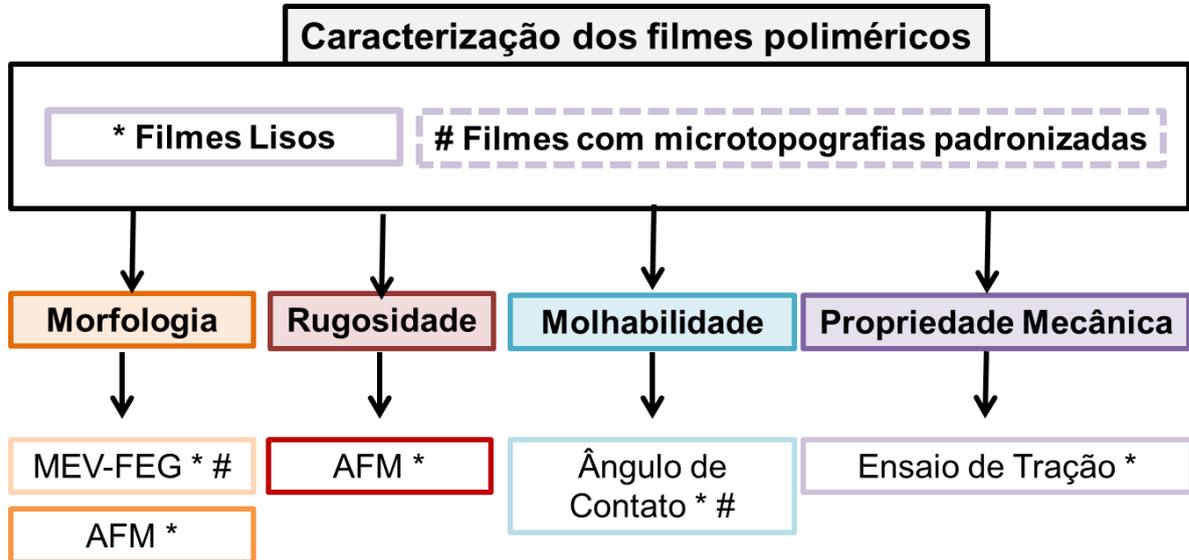


Figura 4.13. Fluxograma das técnicas de caracterização realizadas nos filmes poliméricos lisos e com microtopografia padronizada. Fonte: Autora.

4.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura por Emissão de Campo (MEV-FEG)

A morfologia da superfície dos filmes confeccionados foi analisada MEV-FEG no LabCEMM/PUCRS, em um microscópio modelo Inspect F50 (FEI Company). As amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro por um metalizador. As imagens foram registradas no modo de elétrons secundários usando uma onda elétrica de 10 KeV ou 20 KeV (tensão de aceleração) em variados aumentos de magnificação. O tamanho médio dos canais nas amostras com microestruturação superficial foi medido com o auxílio do programa *ImageJ* (Fiji).

4.5.2. Microscopia de Força Atômica (AFM)

A nanotopografia e rugosidade superficial dos filmes lisos foram avaliadas por AFM. As análises foram obtidas no modo de *Peak Force* utilizando um equipamento modelo PT Dimension Icon (Brucker) equipado com uma sonda TAP150A (frequência de ressonância de 150 kHz e constante de mola de 5 N/m), o qual está localizado no LabCEMMm/PUCRS. A área escaneada das imagens foi de 30 x 30

μm^2 com uma resolução de 512 linhas por área. Os valores de rugosidade média (Ra), rugosidade média quadrática (Rq) e altura máxima de rugosidade (Rmax) foram avaliados em triplicata. As imagens de AFM e as medidas de rugosidade (Ra, Rq e Rmax com $n = 3$) foram determinadas com o auxílio do *software NanoScope Analysis*.

4.5.3. Determinação de Ângulo de Contato

As medidas do ângulo de contato estático da água foram realizadas usando um goniômetro (Phoenix 300, SEO - *Surface Electro Optics Co., Ltd.*) que está localizado na Escola de Ciência/PUCRS. Todas as imagens foram capturadas 5 s após as gotículas de água tocarem a superfície da amostra, a fim de obter medições a partir de gotículas de água sésseis inalteradas. Três gotas de água deionizada foram aplicadas em diferentes pontos de cada filme para calcular o valor médio dos ângulos.

4.5.4. Ensaio de Tração (Tensão x Deformação)

Ensaio de tração foi realizado nos filmes lisos utilizando uma Máquina de Teste Universal (modelo LR5K Plus, Lloyd Instruments) equipada com garras para filmes finos (25 mm de largura) a uma distância de 600 mm e uma célula de carga de 500 N. A velocidade do teste foi de 50 mm/min à temperatura ambiente de acordo com a norma ASTM D882-12 [169] e os valores médios ($n = 3$) de Módulo de Young foram obtidos.

4.6. **Avaliação das propriedades biológicas dos filmes poliméricos sem e com microtopografias padronizadas**

Os filmes poliméricos sem e com microtopografias desenvolvidos neste trabalho foram analisados quanto a toxicidade, viabilidade, proliferação, adesão, propagação e orientação de células de mamíferos, a fim de ampliar a compreensão sobre a biocompatibilidade das blendas poliméricas e dos polímeros isolados. Os

ensaios foram conduzidos no Instituto de Toxicologia e Farmacologia (INTOX) da PUCRS em colaboração com o grupo de pesquisa coordenado pela professora Dra. Maria Martha Campos, docente da Escola de Ciências da Saúde/PUCRS.

A Figura 4.14 mostra o fluxograma da avaliação biológica que foi realizada nos filmes poliméricos. A seguir são descritos os procedimentos de cada ensaio, bem como o procedimento para cultura e manutenção celular, e as análises estatísticas utilizadas no tratamento dos resultados.

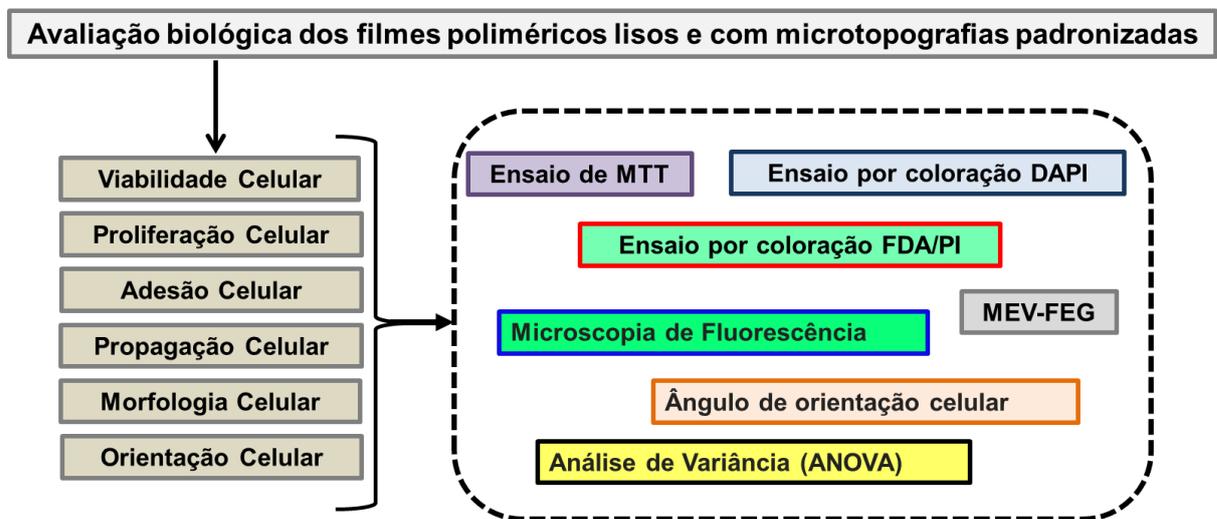


Figura 4.14. Fluxograma das técnicas e dos ensaios de avaliação biológica realizados nos filmes poliméricos lisos e com microtopografias padronizadas. Fonte: Autora.

4.6.1. Protocolos Gerais de Cultura Celular

Para avaliação das propriedades biológicas dos filmes foram utilizadas 5 linhagens celulares de origem animal e/ou humana: VERO (células epiteliais do rim de macaco verde africano), RAW 264.7 (células semelhantes a macrófagos de ratos), células HaCaT (queratinócitos humanos) e células HGF e MRC-5 (fibroblastos gengivais humanos e do pulmão de feto humano, respectivamente) provenientes da ATCC. As células foram cultivadas em meio DMEM suplementado, a uma temperatura de 37 °C, uma umidade relativa mínima de 95% e uma atmosfera de 5% CO₂ no ar. Os filmes poliméricos foram desinfetados com 1 mL de etanol 70% por 3 min e expostos à luz ultravioleta germicida por 30 min cada lado, em cabine de segurança classe II. As linhagens celulares foram plaqueadas

inicialmente com uma densidade de 4×10^3 células por poço e sob os filmes em placas de 96 poços para as análises de viabilidade celular e do índice mitótico. Elas foram semeadas em uma densidade de 20×10^3 células por poço e sob os filmes em placas de 24 poços para todas as outras análises. Todas as experiências foram realizadas em triplicata e repetidas três vezes.

4.6.1.1. Isolamento e cultura de células do gânglio da raiz dorsal (DRG)

Células dos gânglios da raiz dorsal (DRG) foram dissecadas de ratos machos Wistar (4-6 semanas de idade, 180-200 g), após a eutanásia por uma overdose de sevoflurano inalado. A medula espinhal foi cirurgicamente exposta e os gânglios foram isolados manualmente e transferidos para DMEM suplementado. Pelo menos 16 gânglios foram isolados por rato. Após lavagem com PBS, os gânglios removidos foram submetidos à digestão enzimática com 1 mg/ml de colagenase tipo 1 (Sigma - Aldrich) por 40 min a 37 °C, seguida de centrifugação a 900 rpm por 10 min e uma etapa de digestão adicional com 0,1% de solução de tripsina-EDTA por 15 min a 37 °C. Em seguida, as células foram transferidas para um tubo cônico de 15 mL com 5 mL de meio DMEM contendo 10% de soro fetal bovino. A dissociação adicional foi realizada mecanicamente usando uma pipeta Pasteur de plástico estéril. As células foram centrifugadas a 900 rpm por 10 min. O sedimento foi ressuspensão em meio Neurobasal suplementado com 2% do suplemento B27 e 100 ng/ml de fator de crescimento nervoso 7S (ThermoFisher Scientific), contendo 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 0,45 µg/ml de sulfato de gentamicina. As células foram plaqueadas na superfície dos filmes microestruturados de 15 e 20 µm ou em lamínulas de vidro previamente tratadas com Geltrex™ (ThermoFisher) de acordo com as instruções do fabricante, em poços de uma placa de 24 poços. Geltrex é uma matriz rica em laminina usada para facilitar a fixação celular. Células DRG foram cultivadas por 3 dias com mudança de média a cada 24 h após o plaqueamento, e posteriormente foram imunocoradas com anticorpo β - tubulina classe III.

4.6.2. Efeitos funcionais da incubação com filmes lisos e com microtopografias padronizadas

As linhagens celulares foram incubadas com os filmes lisos ou microestruturados (15 e 20 μm) de PCL, PCL/PLGA (90/10, 80/20 e 70/30) e PLGA por 24 h. Amostras de silicone foram usadas como controle de toxicidade em alguns experimentos. Os polímeros foram incubados por contato indireto (método de extração) ou direto na proporção de 6 cm^2/mL , conforme preconiza a norma ISO 10993 (2009) [170] para a avaliação biológica de dispositivos médicos estéreis que entram em contato direto ou indireto com o corpo humano.

4.6.2.1. Viabilidade Celular por MTT dos filmes lisos e com microtopografias padronizadas

A viabilidade celular dos filmes foi avaliada pelo ensaio de MTT para 5 linhagens celulares de mamíferos (VERO, RAW 264.7, HaCaT, HGF e MRC-5). As células na densidade de 4×10^3 células por poço foram incubadas com os diferentes filmes lisos e microestruturados (15 e 20 μm) de PCL, PCL/PLGA (90/10, 80/20 e 70/30) e PLGA por 24 h, como descrito acima. A densidade óptica de coloração foi determinada por espectrofotômetro (Spectramax – Molecular Devices) a 595 nm. Para os filmes lisos poliméricos, os resultados foram expressos como percentual da viabilidade celular em relação aos seguintes controles: placa de cultura de tecido e filme liso de silicone. Para os filmes microestruturados, os resultados da viabilidade celular foram comparados com controles de superfície microestruturada, para isto, foi considerado como controles os filmes de PCL puro e de silicone, ambos com microtopografia padronizada (canais de 15 e 20 μm). Foi necessário adaptar o controle para os filmes com microtopografia padronizada, pois não há placa de cultura de tecidos com microtopografia padronizada.

4.6.2.2. Proliferação Celular e Morfologia Nuclear por DAPI dos filmes lisos

A coloração de 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) foi realizada para estabelecer o índice mitótico como parâmetro de proliferação celular para 5 linhagens celulares

(VERO, RAW 264.7, HaCaT, HGF e MRC-5). As células foram semeadas em placas de 24 e 96 poços e incubadas com os filmes poliméricos lisos dos puros e das blendas por 24 h. Após a incubação, as células foram lavadas três vezes em PBS e fixadas com formaldeído 4% à temperatura ambiente, durante 15 min. As células fixadas foram então lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% em PBS e coradas com 300 nM da solução DAPI (Santa Cruz, CA) à temperatura ambiente, por 10 min. Para avaliar a existência de danos nucleares, a morfologia nuclear das células foi examinada sob um microscópio fluorescente (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Alemanha). A coloração DAPI permite a visualização dos eventos mitóticos, os quais podem ser contados e convertidos em valores (números de eventos mitóticos), então sendo possível determinar o índice mitótico para cada contagem automática de células. O índice mitótico foi calculado como o número de eventos mitóticos em 10 campos por poço, três vezes em triplicata.

4.6.2.3. Viabilidade e Adesão Celular por FDA/PI dos filmes lisos

As linhagens celulares HGF, MRC-5 e RAW 264.7 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^4 células/poço na superfície dos filmes lisos de silicone, PCL, PCL/PLGA (70/30) e PLGA, e foram cultivadas durante 24 ou 72 h. A análise das células vivas e mortas foi realizada utilizando diacetato de fluoresceína (FDA) e iodeto de propídio (PI), respectivamente. Na coloração FDA/PI, as células vivas coram com FDA ganhando a cor verde, enquanto que células mortas coram com o PI em vermelho. As células foram incubadas por 30 min com 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de FDA e 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PI em DMEM. Em seguida, as células foram analisadas por microscopia de fluorescência (Olympus). Imagens fluorescentes foram feitas para avaliar qualitativamente a viabilidade e adesão celular.

4.6.2.4. Morfologia e Propagação Celular nos filmes lisos e com microtopografias padronizadas

As linhagens celulares HGF, MRC-5 e RAW 264.7 foram plaqueadas em uma densidade de 5×10^4 células/poço na superfície dos filmes lisos e microestruturados (15 e 20 μm) de silicone, PCL puro, PCL/PLGA (70/30) e PLGA puro, e foram

cultivadas durante 24 ou 72 h. As células foram fixadas durante 30 min com paraformaldeído 4% (PFA) e sequencialmente desidratadas em concentrações crescentes de etanol (50, 70, 85, 95 e 100%), durante 30 min cada. As amostras foram deixadas durante 1 h em etanol a 100% e secas à temperatura ambiente. A análise da morfologia e proliferação celular foi avaliada por MEV-FEG com tensão de aceleração de 10 kV, após metalização com uma fina camada de ouro.

4.6.2.5. Orientação celular nos filmes com microtopografias padronizadas

Inicialmente, para avaliar a capacidade de orientação das células, foram escolhidas as linhagens celulares de fibroblastos MRC-5 e HGF, que foram cultivadas na superfície dos filmes microestruturados (15 e 20 μm) de PCL, PCL/PLGA (70/30) e PLGA. O ângulo de orientação das células foi representado pelo parâmetro de ordem de orientação S (Equação 4.2),

$$S = (\langle 3 \cos^2 \theta - 1 \rangle) / 2 \quad (4.2)$$

Onde θ é o ângulo que as células assumem, em relação ao ângulo medido para canais do filme.

Células distribuídas aleatoriamente apresentam valores de S próximos de zero, enquanto células com orientação paralela apresentam valores próximos a 1.[171] Os ângulos foram determinados manualmente usando o *software* NIH ImageJ 1.36b. Sessenta medições por imagem foram tiradas de três regiões diferentes de um filme.

A capacidade de orientação dos neurônios também foi avaliada qualitativamente utilizando-se de cultura de células DRG nos filmes microestruturados (15 ou 20 μm) ou em lamínulas de vidro, previamente tratadas com Geltrex de acordo com as instruções do fabricante. Após 3 dias, as células foram fixadas em 4% de PFA durante 30 min e lavadas três vezes com PBS. As células foram bloqueadas e permeabilizadas com solução PBS contendo 1% de Albumina do soro bovino (BSA) e 0,1% de Triton X-100 durante 30 min à

temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas com anticorpo classe III β - tubulina de rato (T8578, Sigma-Aldrich, diluído 1: 500) durante 2 h a 37 °C para identificar neurônios. O anticorpo secundário Alexa 555 conjugados correspondente (Invitrogen, Carlsbad, CA, diluído 1: 500) e DAPI (Invitrogen, Carlsbad, CA) foram adicionados para visualizar as células. Imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Olympus).

4.6.3. Análise estatística

Os dados foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de uma via seguido do pós-teste de Tukey, usando o software SPSS ® ou o software Graph-Pad (San Diego, CA), onde $p < 0,05$ foi indicativo de significância estatística.

4.7. Preparação dos filmes nanocompósitos poliméricos híbridos sem e com microtopografia padronizada

O preparo dos filmes nanocompósitos poliméricos foram realizados no LOR localizado na Escola de Ciências/PUCRS. Os filmes foram preparados por evaporação de solvente conforme descrito no item 4.4.

Os nanocompósitos foram preparados pela adição de 10% (m/m) de nanocarga de PPy ou híbrida (PPy/OGR ou PPy/Ag) na blenda de PCL/PLGA (70/30). A carga foi dispersa por 8 h com banho de ultrassom (frequência 40 kHz, modelo Q5.9L, Ultronique) nas matrizes poliméricas conforme estudos anteriores (Valente, 2014) [154]. Após dispersão da nanocarga, o conteúdo foi vertido na placa Petri ou no molde microestruturado. No final da preparação, os filmes nanocompósitos lisos e microestruturados foram secos à vácuo por 8h.

A Figura 4.15 ilustra um esquema das etapas de preparação dos filmes de PCL/PLGA com as nanocargas (PPy, PPy/OGR ou PPy/Ag) via evaporação de solvente.

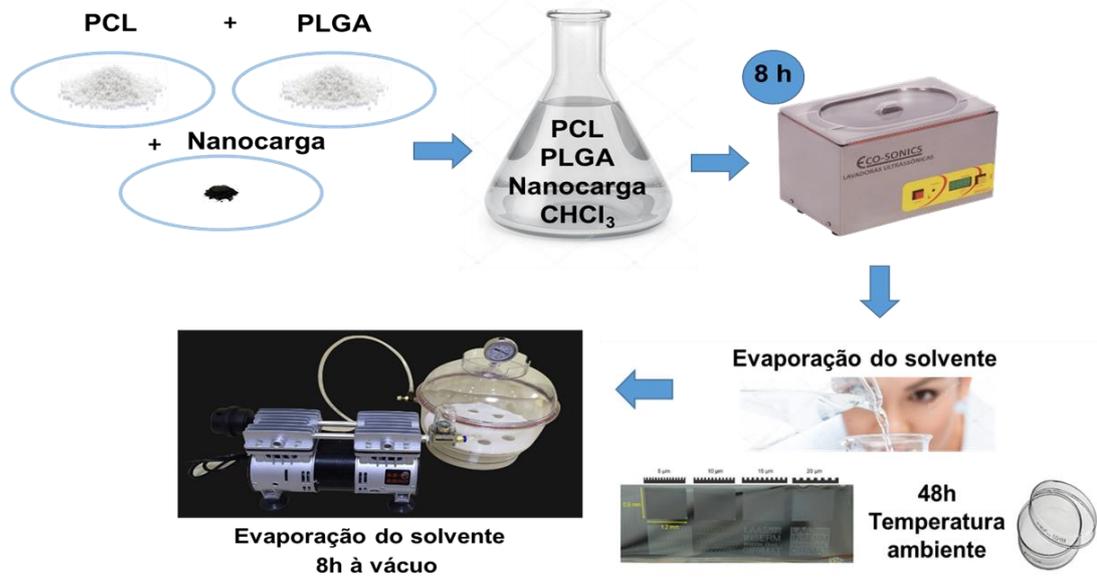


Figura 4.15. Fluxograma das etapas de preparação dos nanocompósitos como filmes via evaporação de solvente sem e com microtopografia. Fonte: Autora.

A Figura 4.16 ilustra o fluxograma dos tipos de filmes compósitos poliméricos (sem e com microtopografia) obtidos via evaporação de solvente. Os filmes confeccionados sem microtopografia padronizada serão considerados do grupo: filmes lisos.

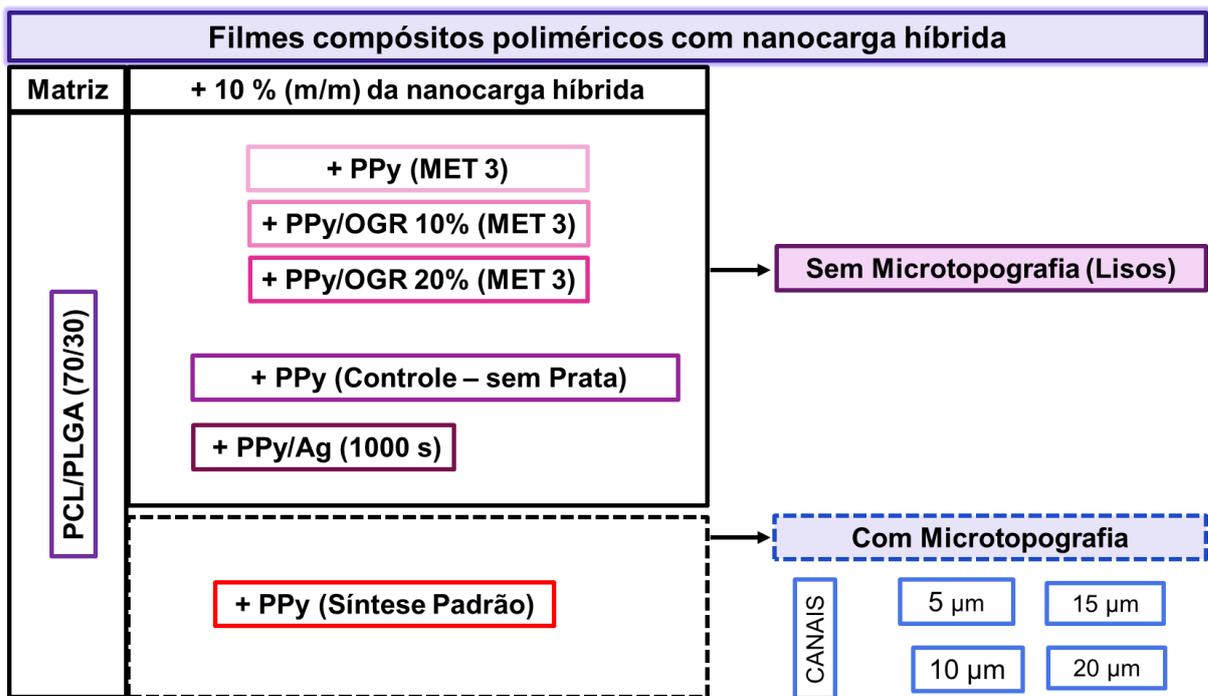


Figura 4.16. Fluxograma dos tipos de filmes nanocompósitos poliméricos preparados. Fonte: Autora.

4.8. Caracterização dos filmes nanocompósitos poliméricos híbridos sem e com microtopografia padronizada

Os nanocompósitos foram caracterizados através das técnicas de MEV-FEG (item 4.5.1), AFM (item 4.5.2) e ângulo de contato (4.5.3) e os detalhes técnicos são os mesmos utilizados como mencionados neste trabalho a partir do item 4.5.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesse capítulo, primeiramente serão abordados e discutidos os resultados obtidos para as nanocargas híbridas basedas em PPy com OGR e PPy com Ag (5.1 e 5.2). Na sequência serão apresentados e debatidos os resultados alcançados para os filmes de matrizes poliméricas de PCL, PLGA e das blendas de PCL/PLGA, sem e com microtopografia padronizada (5.3 e 5.4). Por último, os resultados da mistura entre as melhores nanocargas híbridas com a melhor matriz polimérica serão exibidos (5.5).

5.1. Caracterização das Nanocargas Híbridas

Nesse capítulo, serão abordados os resultados obtidos em relação às propriedades físico-químicas, morfológicas e elétricas, assim como a citotoxicidade in vitro das nanocargas híbridas obtidas via polimerização química oxidativa in situ e pulverização catódica. A obtenção de nanocompósitos de PPy/OGR e PPy/Ag teve por finalidade seu uso como nanocargas híbridas em matrizes poliméricas biodegradáveis e biocompatíveis, a fim de otimizar propriedades físico-químicas, biológica e elétrica de matrizes poliméricas.

5.1.1. Nanocargas Híbridas de PPy/OGR

Dentre os OGR obtidos pelo estudo prévio de Maraschin [156], o OGR escolhido foi aquele que apresentou maior valor de condutividade elétrica (55,4 S/cm). A Figura 5.1 ilustra imagens de TEM e o espectro EDS do OGR escolhido.

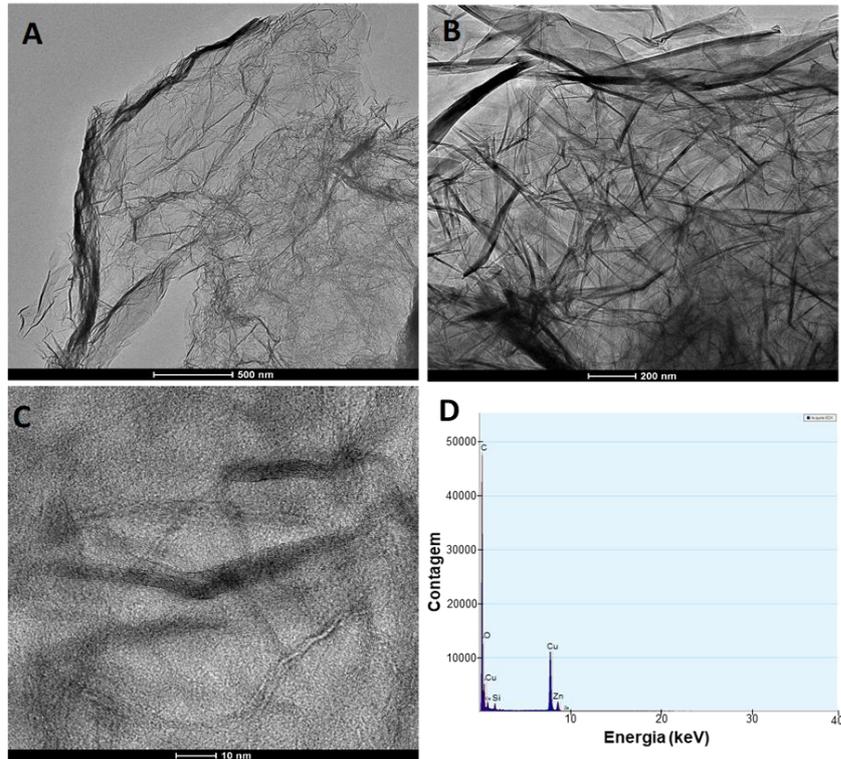


Figura 5.1. Imagens de MET (A-C) e o espectro EDS do OGR (D).

Nas imagens de MET (Fig. 5.1A – 5.1C), observou-se que o OGR apresenta morfologia típica de folhas amassadas, as quais são resultantes do processo de redução térmica. Neste processo grande parte dos grupos funcionais oxigenados são removidos.[172] O espectro EDS indicou a presença de picos dos elementos base da constituição do OGR: carbono (C) e oxigênio (O).

A Figura 5.2 apresenta os espectros de FTIR das nanocargas de PPy/OGR obtidas pelos três métodos utilizados neste estudo. Observam-se vários picos comuns a todos os espectros dos PPy/OGR sintetizados, independentemente do método. Suaves deslocamentos dos picos são quase imperceptíveis. Porém, é comum que estes deslocamentos ocorram, devido ao processo de dopagem do PPy, o qual é dependente da estrutura dos reagentes participantes da síntese, bem como do método em si. [117]

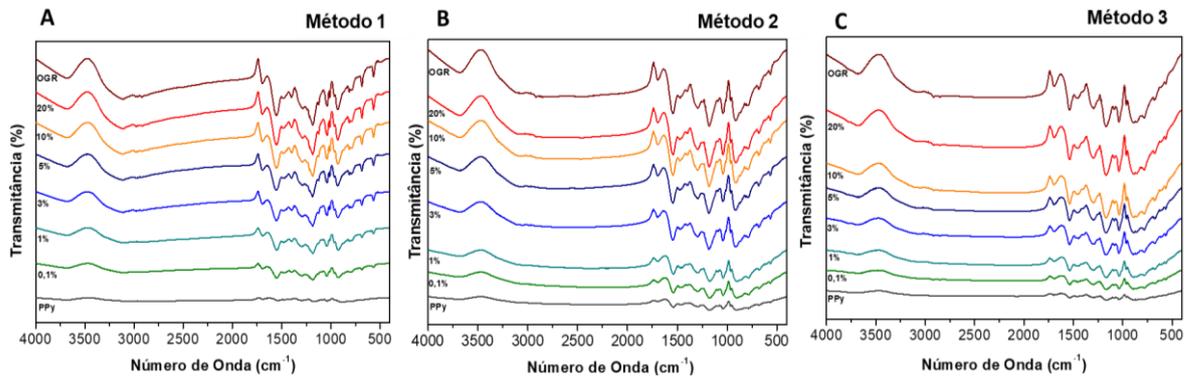


Figura 5.2. Espectros de FTIR das nanocargas de PPy/OGR: a) MET1, b) MET2 e c) MET3.

O espectro de FTIR do OGR apresenta uma banda larga de absorção em 3668 cm^{-1} e outras bandas com picos acentuados em 1693 , 1557 , 1412 , 1257 e 1102 cm^{-1} . A banda em 3668 cm^{-1} pode ser atribuída ao estiramento dos grupos O-H, enquanto os picos acentuados em 1693 e 1557 cm^{-1} são referentes ao estiramento da ligação C=C da vibração das cadeias do grafeno. Os picos observados na região entre 1500 e 1000 cm^{-1} provavelmente são atribuídos ao estiramento e às deformações das ligações C-O, bem como às deformações na ligação O-H.[173].

Os espectros de PPy controle de cada método apresentam os picos característicos do PPy no estado dopado com agente de dopagem APTS (Costa et al., 2019). Os picos característicos em 1539 e 1474 cm^{-1} correspondem a vibração de estiramento das ligações C=C e C-N do PPy, respectivamente (vibrações fundamentais do anel pirrol). O pico em 3675 cm^{-1} foi atribuído a vibração de estiramento da ligação N-H e o pico de 1401 cm^{-1} a deformação no plano da ligação C-H ou C-N [115,125,153]. A banda na região $3500\text{-}3700\text{ cm}^{-1}$ e os picos mais agudos na região de $1700\text{-}600\text{ cm}^{-1}$ se apresentam pouco intensos para os PPy (controles).

Nos espectros de todas as nanocargas de PPy-OGR, foi observado aumento na intensidade das bandas de absorção com o aumento da quantidade OGR na composição da nanocarga. A intensidade do pico em 1557 cm^{-1} é aumentada significativamente, na medida que aumentou a quantidade de OGR no produto. A diferença de intensidade pode ocorrer devido as mudanças no processo de

polimerização, isto está diretamente relacionado ao aumento gradativo do OGR no sistema de cada método, bem como um indicativo de aglomeração do PPy e OGR [173–175]. No geral, os espectros apresentaram comportamento similar dos grupos funcionais característicos do PPy. A banda referente ao estiramento da ligação N-H ocorreu em 3668 cm^{-1} , e os picos referentes ao estiramento da ligação C=C foram em 1693 e 1557 cm^{-1} , enquanto que a deformação da ligação C-N ocorreu em 1451 cm^{-1} .

A Figura 5.3 apresenta as imagens de MEV-FEG das nanocargas de PPy/OGR e PPy controle obtidas pelo método 1, bem como do OGR puro utilizado na síntese. Em relação ao PPy controle, é possível observar morfologia de fibras e partículas globulares. As folhas do OGR apresentam aspecto típico de folhas amassadas, conforme observado nas imagens de MET (Fig. 5.12). Além disso, as nanocargas de PPy/OGR obtidas por este método apresentaram, em geral, morfologia mista de fibras, folhas e de aglomerados de partículas globulares irregulares.

Para as nanocargas com 0,1%, 1% e 3%, houve a predominância de partículas globulares com algumas folhas, as quais podem ser atribuídas tanto ao OGR quanto ao PPy. A partir de 5%, as folhas de OGR se tornaram mais evidentes, bem como o preenchimento e revestimento das mesmas por partículas globulares de PPy. Portanto, as folhas de OGR foram recobertas pelo PPy em todas as porcentagens e sua presença no meio reacional alterou a morfologia do PPy, uma vez que PPy fibroso foi observado no controle e este tipo de morfologia não foi visualizado nas amostras das nanocargas híbridas de PPy/OGR obtidas pelo método 1.

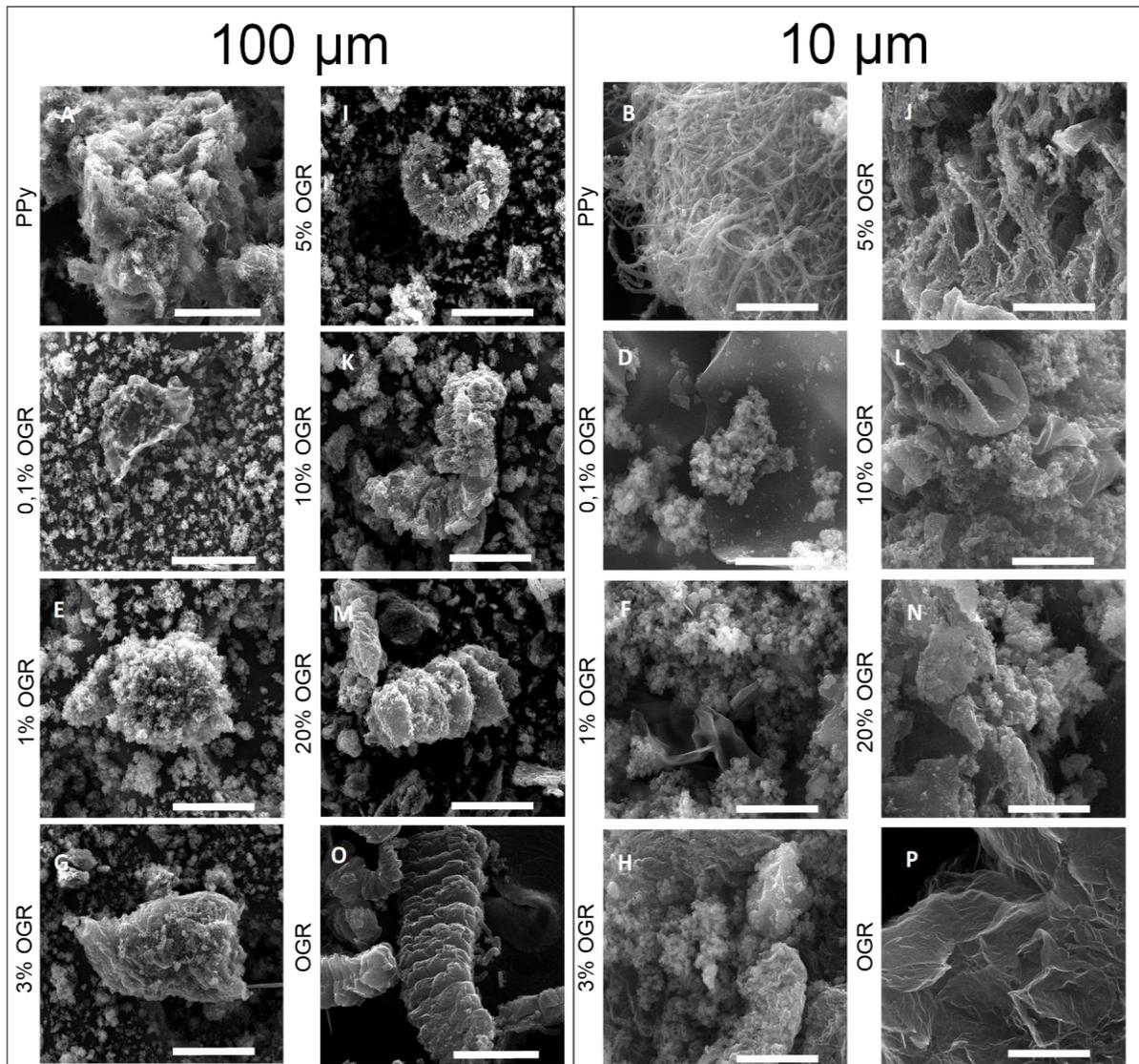


Figura 5.3. Imagens de MEV-FEG das nanocargas de PPy/OGR, PPy (método 1) e OGR.

A Figura 5.4 apresenta as imagens de MEV-FEG das nanocargas de PPy/OGR e PPy controle obtidas pelo método 2, bem como do OGR puro utilizado na síntese. Em relação ao PPy controle, é possível observar morfologia de folhas e partículas globulares. Na nanocarga com 0,1% OGR, houve a predominância de partículas globulares com algumas folhas, as quais podem ser atribuídas tanto ao OGR quanto ao PPy. Alguns aglomerados de folhas apresentavam forma do tipo pétalas. Na nanocarga com 1% OGR, houve a predominância de partículas globulares, folhas e fitas. Nas nanocargas com 3% e 5% OGR, as folhas de OGR estavam recobertas pelo PPy e as morfologias predominantes foram partículas globulares e folhas. Já na nanocarga com 10% OGR, as folhas de OGR estavam

recobertas pelo PPy e as morfologias predominantes foram folhas e partículas globulares com muitas fitas. E na nanocarga com 20% OGR foi observado que as folhas de OGR estavam preenchidas e recobertas com partículas globulares de PPy.

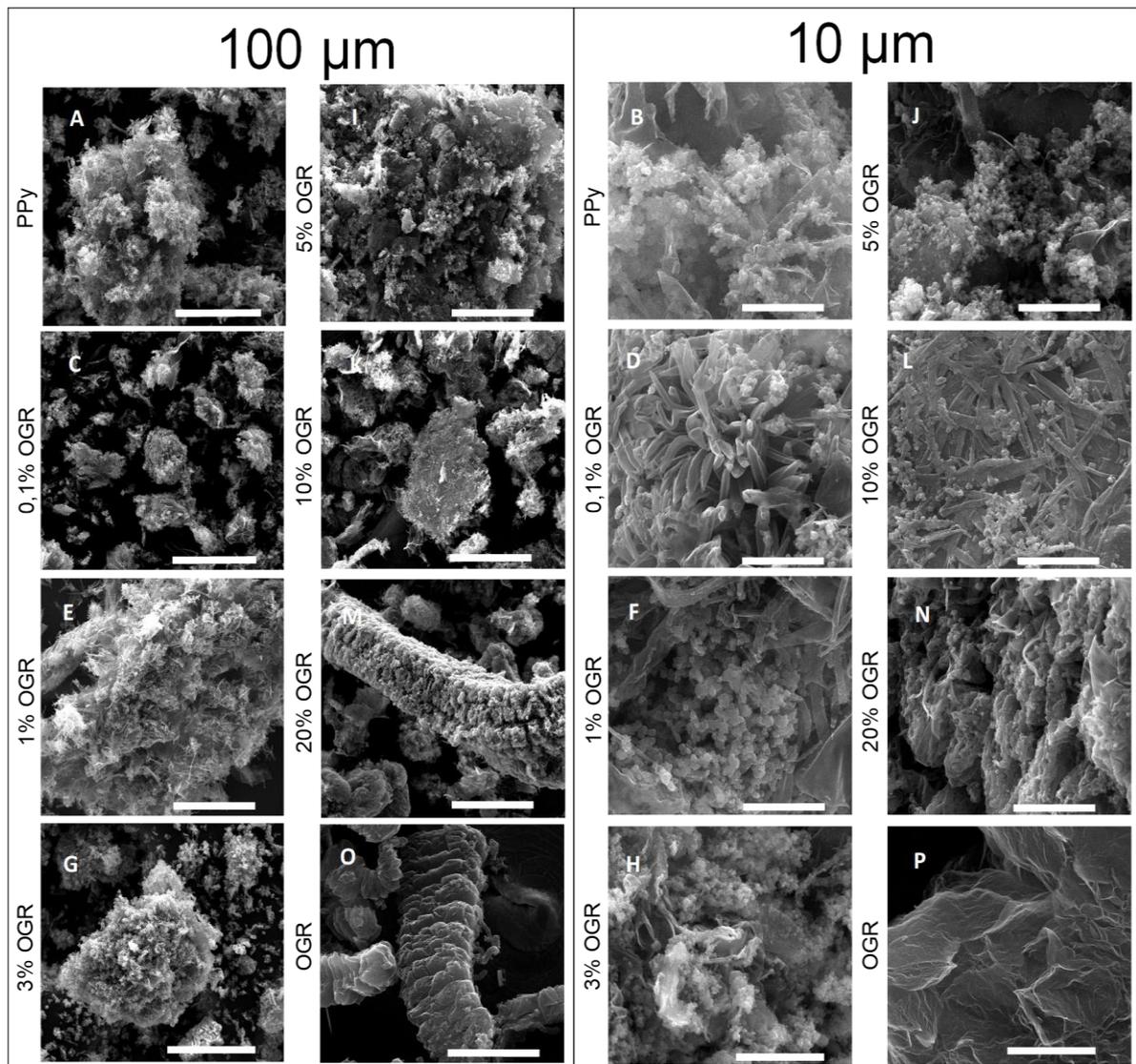


Figura 5.4. Imagens de MEV-FEG das nanocargas de PPy/OGR, PPy (método 2) e OGR.

A Figura 5.5 apresenta as imagens de MEV-FEG das nanocargas de PPy/OGR e do o PPy controle obtidos pelo método 3, bem como do OGR puro utilizado na síntese. Em relação ao PPy controle, é possível observar morfologia de folhas, fibras e partículas globulares. Na nanocarga com 0,1% OGR, houve a predominância de muitas fibras de PPy. Na nanocarga com 1% OGR, houve a predominância de folhas e partículas globulares, ainda que houvessem algumas

fibras de PPy presentes na amostra. Nas nanocargas com 3%, 5% e 10% OGR, as folhas de OGR estavam recobertas por fibras de PPy. Na de 10% OGR, algumas partículas globulares pequenas foram observadas. E na nanocarga com 2% OGR foi observado que as folhas de OGR estavam preenchidas e recobertas com fibras de PPy.

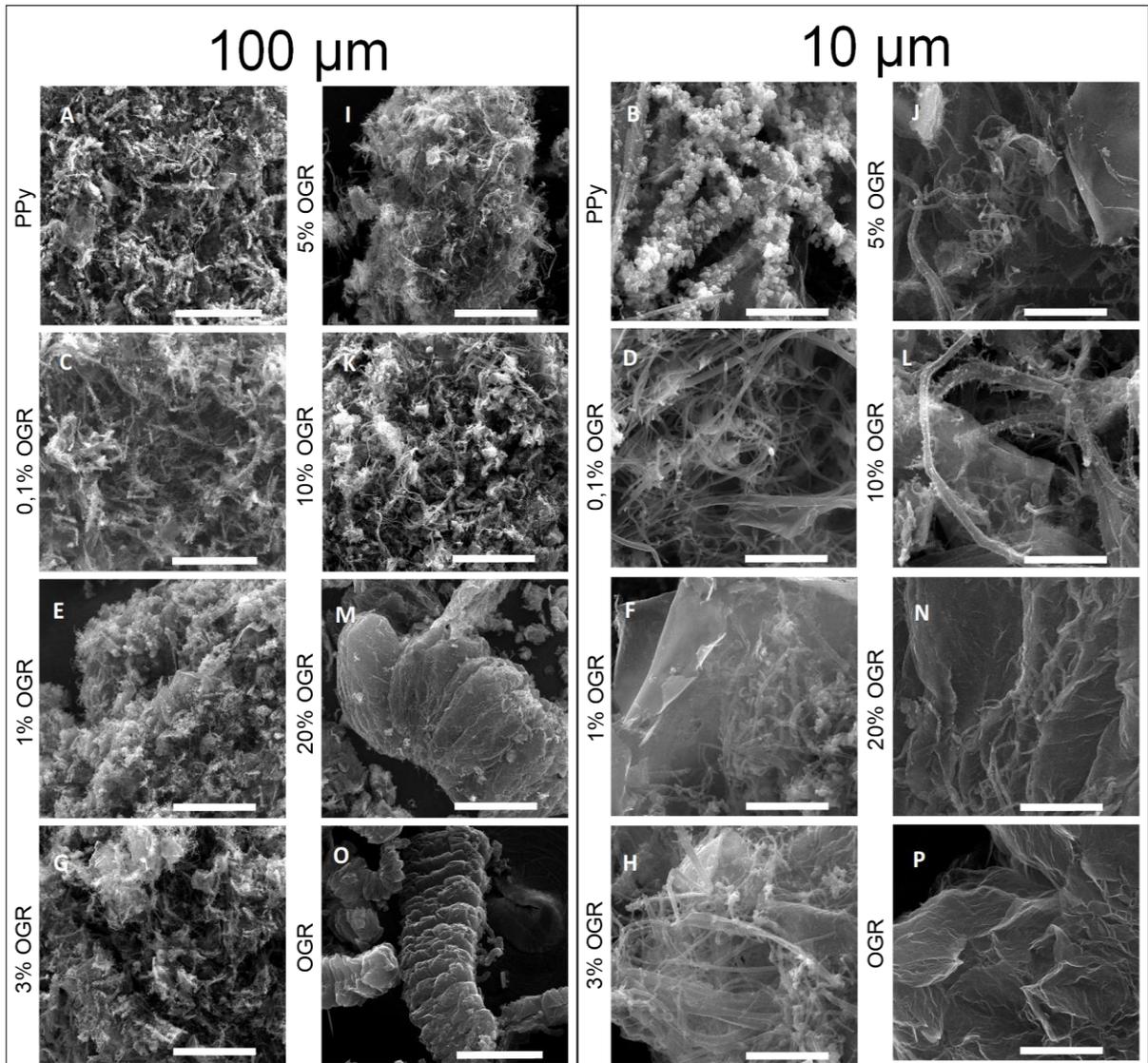


Figura 5.5. Imagens de MEV-FEG das nanocargas de PPy/OGR, PPy (método 3) e OGR.

Quando comparamos as morfologias obtidas em cada método, constata-se que a partir do método 3 foram obtidos materiais com morfologia predominantemente fibrosa do PPy, ainda que somente o PPy controle do método 1 também tenha apresentado esta característica. A morfologia de fibras é uma característica bastante explorada e almejada na fabricação de biomateriais, devido

a sua similaridade com a organização estrutural de tecidos biológicos. Além disso, este tipo de morfologia pode favorecer o tratamento, bem como a aceitação deste material pelo corpo humano.[152]

A Figura 5.6 apresenta os valores obtidos para a condutividade elétrica das nanocargas de PPy/OGR. Ocorreu um aumento na condutividade elétrica das nanocargas de PPy/OGR obtidas pelos métodos 2 e 3, os quais foram aplicados o uso de sonicação. Os métodos 2 e 3 quando realizados com 10 e 20% de OGR aumentaram significativamente seus valores de condutividade elétrica quando comparados com o método 1. Quando comparamos as amostras apenas dentro dos seus métodos, os valores mais baixos de condutividade elétrica foram das nanocargas obtidas pelo método 1. As condutividades mais elevadas foram observadas para as nanocargas com 10 e 20% de OGR obtidas pelos métodos 2 e 3. As nanocargas obtidas pelo método 3 foi apresentaram valores de condutividade elétrica mais elevados em comparação aos valores das nanocargas obtidas pelos outros métodos.

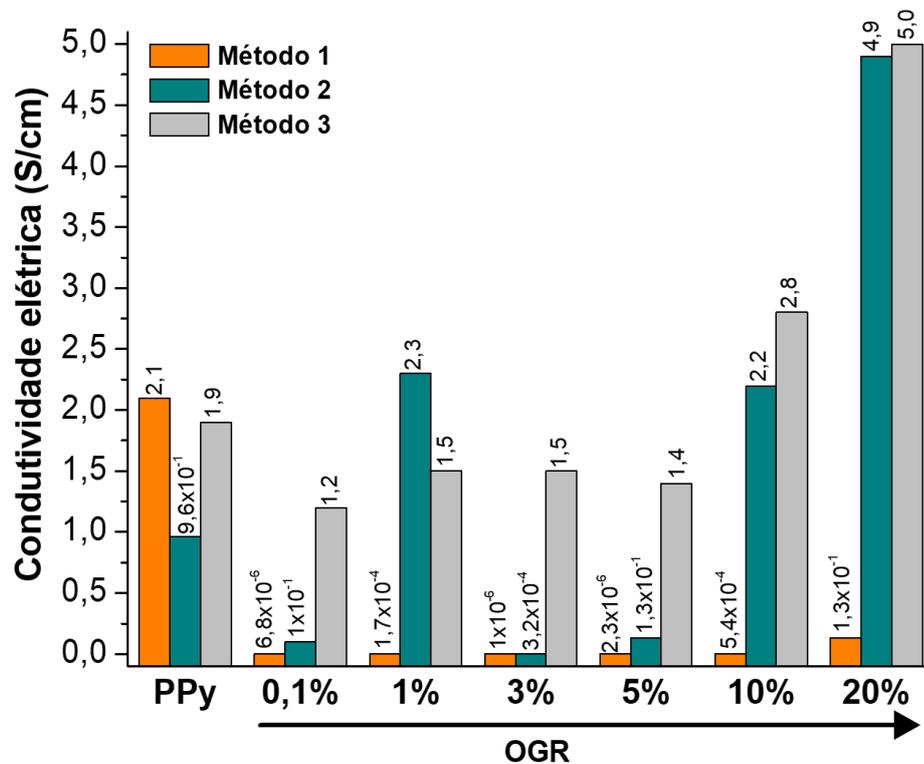


Figura 5.6. Condutividade elétrica dos PPy e das nanocargas de PPy/OGR.

Na literatura é comum o uso da sonicação para auxiliar no alto esfoliamento das nanofolhas de OG e OGR. Com esta técnica, é possível promover a separação das folhas, a fim de disponibilizá-las para interagir com o sistema de reação através da sua ampla área superficial.[151] A condutividade elétrica melhorada pode ser atribuída pela formação de vias interconectadas criadas pela presença das nanofolhas de OGR, estando de acordo com o relato de Schimer que obteve nanocompósitos na forma de fibras condutivas após adição de 50% e 80% (m/m) de OGR.[104]

A grande área superficial das estruturas baseadas em carbono, NTCs e OGR, atuam como pontes condutoras conectando os domínios do PPy[176] e quando ocorre o empilhamento π - π de elétrons entre as nanofolhas de OGR e o anel do PPy, então a transferência eletrônica é facilitada e mais eficiente.[175] A Figura 5.7. mostra as possíveis interações π - π quando ocorre a combinação entre as camadas de OGR com os anéis aromáticos de PPy, consequentemente aumentado a condutividade elétrica e a estabilidade térmica do compósito resultante.[177][178]

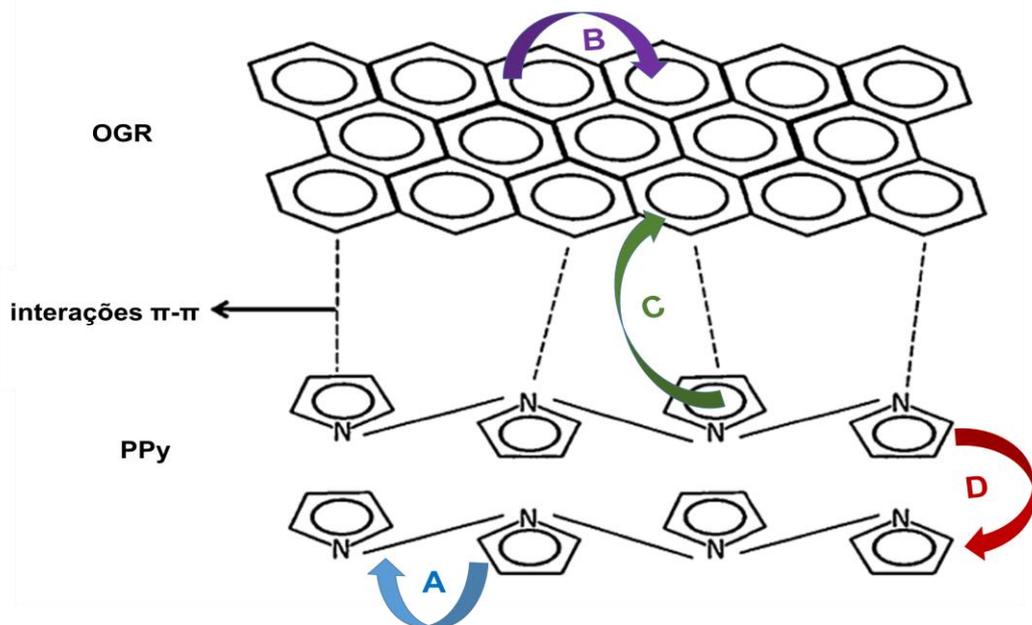


Figura 5.7. Formação da interação π - π (ou camada de empilhamento π) entre camadas de OGR e anéis de PPy. Tipos de transferência de carga entre OGR e PPy: (A) transferência intra-carga no PPy; (B) transferência intra-carga no OGR; (C) transferência inter-carga entre PPy e OGR; e (D) transferência inter-carga entre camadas de PPy. Adaptado de Berendjchi et al. 2016.[177]

A interação π - π entre OGR e PPy aumenta o número de caminhos condutores para as cargas elétricas (Fig. 5.7). As vias de caminho incluíam a transferência inter-carga entre as camadas de OGR e as cadeias de PPy, a transferência inter-carga nas camadas OGR e a transferência inter e intra-carga na cadeia e entre as cadeias de PPy, respectivamente. [177] O uso de ultrassom de ponteira e banho ultrassônico no método 3, auxiliaram em uma melhor esfoliação e disposição das nanofolhas de OGR no sistema reacional e, conseqüentemente, foram as nanocargas com os melhores resultados de condutividade elétrica.

Nas Figuras 5.8, 5.9 e 5.10 estão apresentadas as imagens de MET dos controles (PPy) e das nanocargas de PPy/OGR (20% OGR). Podemos observar que as folhas de OGR e/ou PPy estão cobertas pelas partículas de PPy com diferentes formas e tamanhos. Além disso, um escurecimento da superfície das folhas de OGR também é observado, devido ao depósito do PPy sob a sua superfície (Fig. 5.8D - 5.8F) e (Fig. 5.10D e 5.10F). É possível diferenciar o aspecto denso e escuro das folhas do PPy obtido (Fig. 5.8A e 5.8B; Fig. 5.9A; e Fig. 5.10A) das folhas de OGR, as quais se caracterizam por uma estrutura de folha com aspecto mais amassado de laminas finas e com coloração clara (Fig. 5.1A – 5.1C).

As folhas do OGR possuem uma transparência característica em imagens de MET, pois estão organizadas em pequenas quantidades empilhadas de suas folhas.[172] Quando comparamos as folhas de OGR após a polimerização com o PPy, observa-se que a superfície do OGR escurece (Fig 5.8, 5.9 e 5.10; colunas 20% OGR). Isto é atribuído ao acúmulo e ao depósito do PPy sob as folhas de OGR. Resultados semelhantes foram obtidos em outros estudos.[179,180]

Nas imagens de MET dos controles de cada método, observa-se a obtenção de estruturas mistas, como fibras de interior oco e preenchido (Fig. 5.8B e 5.8C; e Fig 5.10B e 5.10C), bem como nanopartículas (NPs) esféricas com tamanho médio de 166 nm (Fig. 5.9A, 5.9B e 5.9C). Na Figura 5.8F, observa-se que na folha de OGR ocorreu o depósito de algumas NPs esféricas irregulares de PPy com tamanho médio de 200 nm (Fig. 5.8F). Todas as imagens de TEM para os três métodos

evidenciam que o OGR foi recoberto pelo PPy (Figuras 5.8, 5.9 e 5.10; colunas 20% OGR).

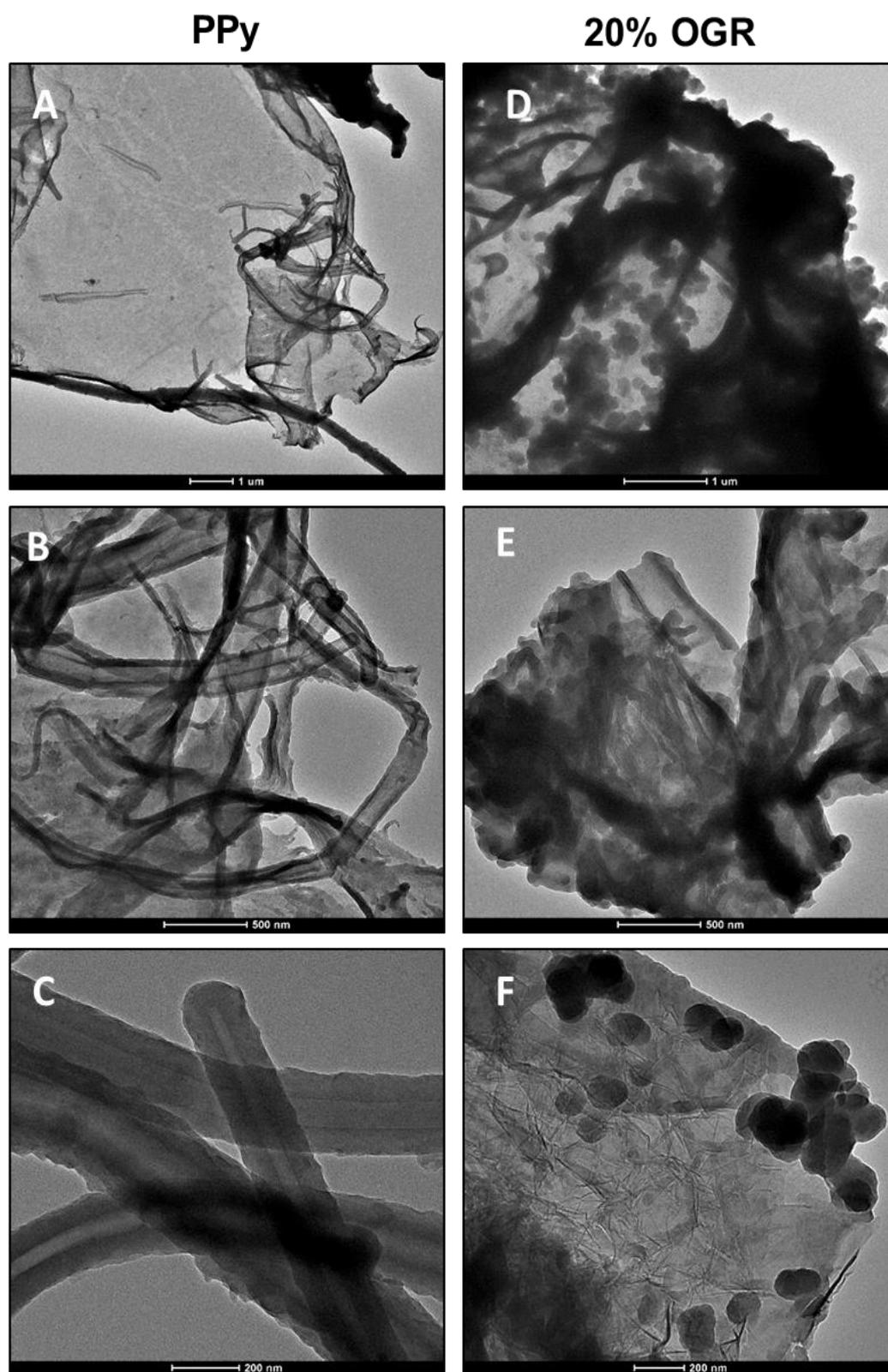


Figura 5.8. Imagens de MET das nanocargas de PPy (A-C) e PPy/OGR 20% (D-F) obtidas pelo método 1.

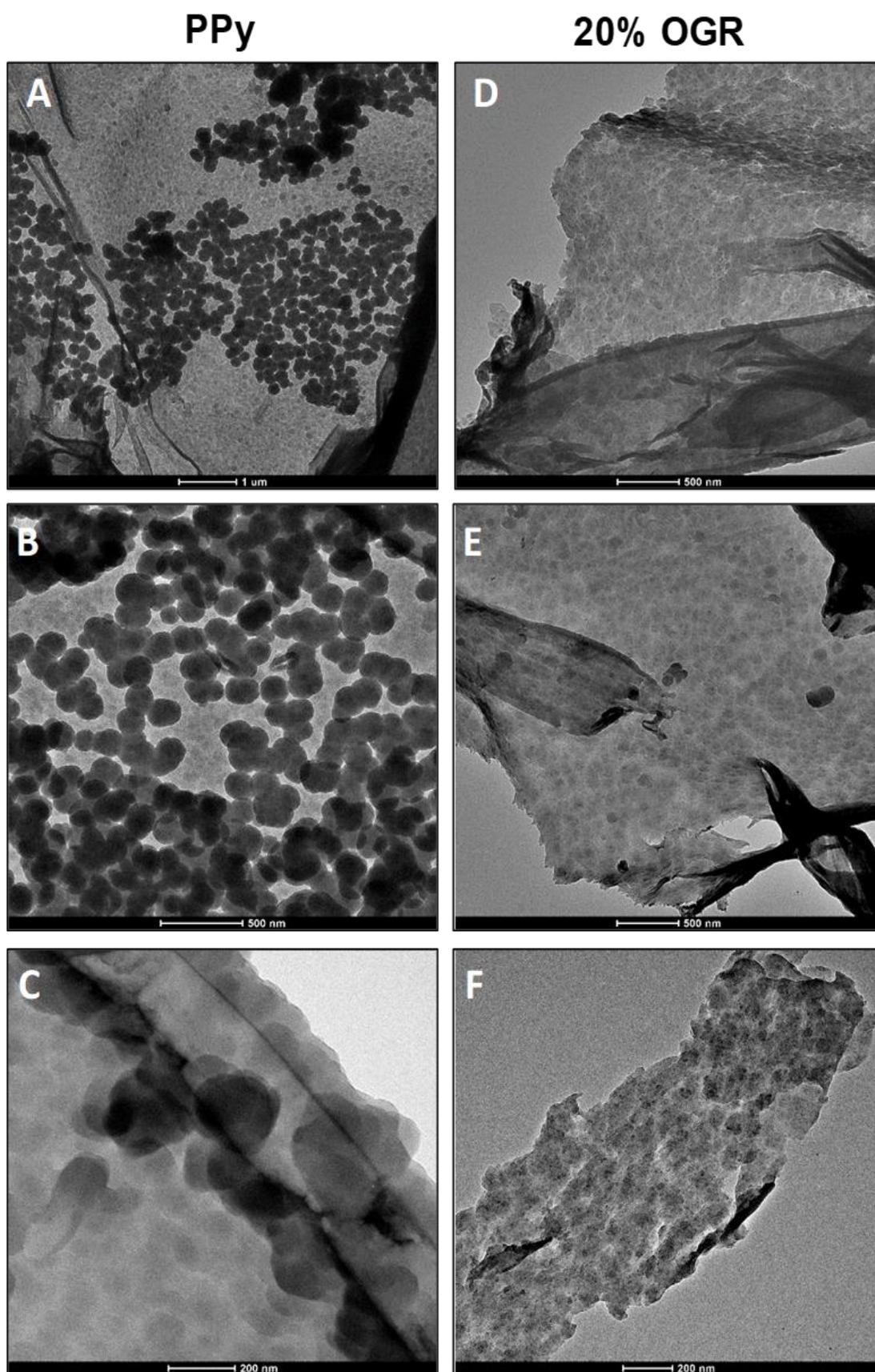


Figura 5.9. Imagens de MET das nanocargas de PPy (A-C) e PPy/OGR 20% (D-F) obtidas pelo método 2.

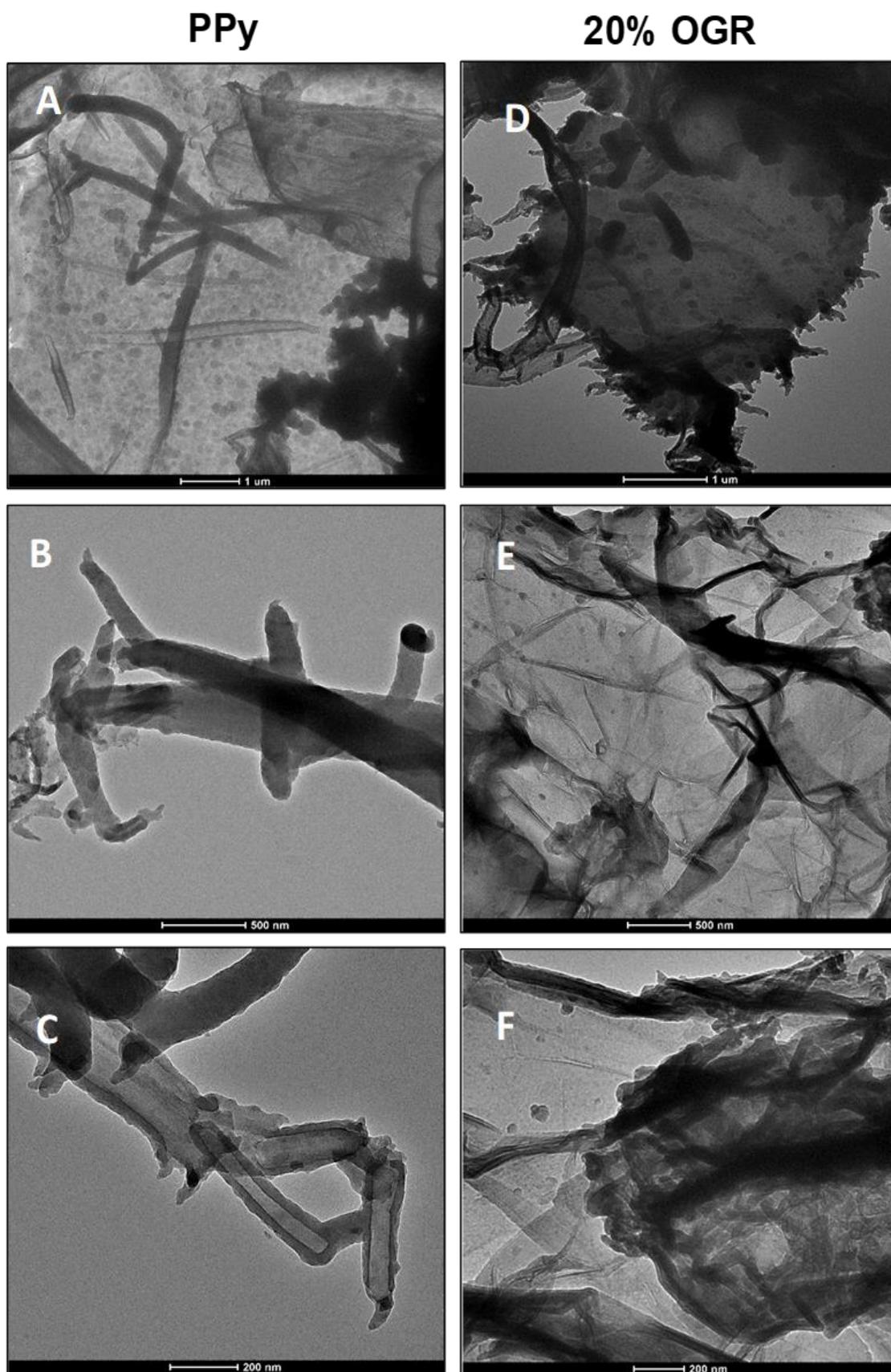


Figura 5.10. Imagens de MET das nanocargas de PPy (A-C) e PPy/OGR 20% (D-F) obtidas pelo método 3.

A Figura 5.11 apresenta imagens de TEM em alta resolução, nas quais observa-se a estrutura cristalina da nanofolha de OGR (setas azuis na Fig. 5.11A), a estrutura amorfa do PPy (Fig. 5.11B) e na Figura 5.11C do PPy/OGR-20% é possível identificar uma mistura das duas estruturas.

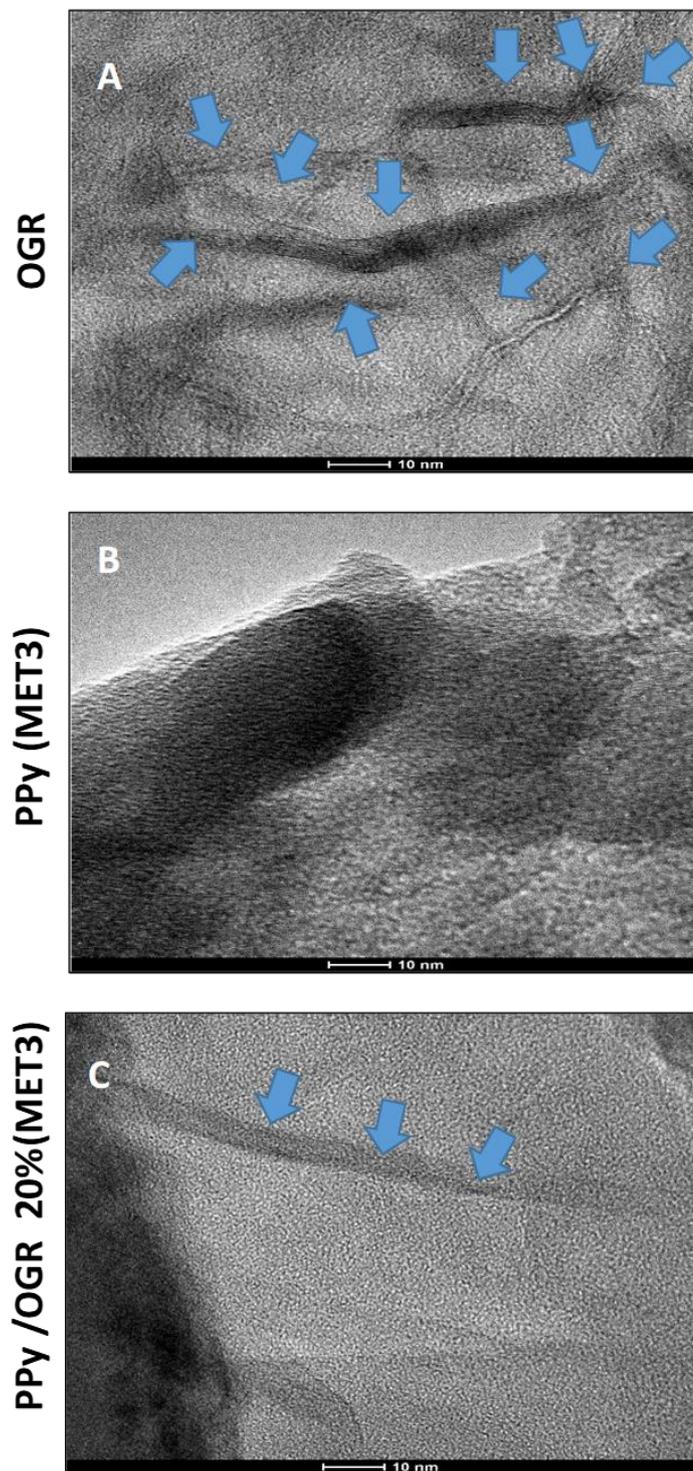


Figura 5.11. Imagens de MET (alta resolução) do OGR (A), PPy (B) e da PPy/OGR 20% (C) obtida pelo método 3.

Outros estudos de obtenção de nanocompósitos de PPy com derivados de carbono, apontam que a formação do nanocompósito ocorre na superfície das nanofolhas de óxido de grafeno. Esta formação ocorre devido às interações de empilhamento π - π entre as nanofolhas bidimensionais de átomos de carbono ligados sp^2 e as estruturas eletrônicas da cadeia conjugada do PPy.[151,177] Foi realizado EDS (Fig. 5.12) via análise de TEM nas regiões observadas das nanofolhas de OGR nas nanocargas de PPy/OGR-20%, a fim de avaliar a deposição de PPy na superfície das nanofolhas. A imagem de TEM em alta resolução (Fig. 5.11C) e os resultados de EDS (Fig. 5.12) são sugestivos que a nanocarga híbrida de PPy/OGR foi formada na superfície das nanofolhas de OGR.

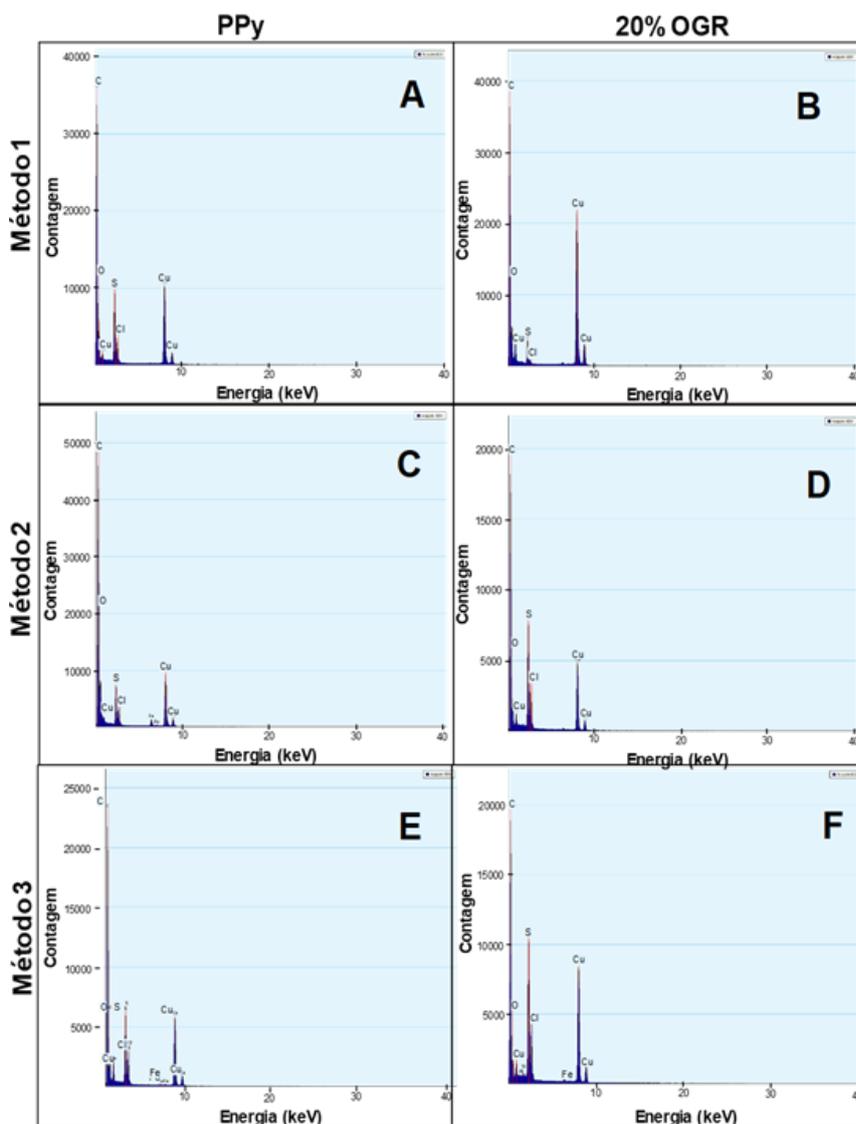


Figura 5.12. Imagens dos espectros EDS (por MET-EDS) dos PPy e nanocargas PPy/OGR 20%: (A, B) método 1, (C, D) método 2 e (E, F) método 3.

Como já apresentado na Figura 5.1D, os elementos identificados em abundância para o OGR foram C e O. Nos espectros de EDS das nanocargas de PPy/OGR-20% (Fig. 5.12B, 5.12D e 5.12F) observa-se, além do C e O, a presença dos elementos enxofre (S) e cloro (Cl), os quais são elementos presentes apenas no PPy controle de cada método (Fig. 5.12A, 5.12C e 5.12E). A detecção do elemento S sugere que o PPy foi depositado sobre as nanofolhas de OGR, pois nos métodos de síntese deste estudo foi utilizado o agente dopante APTS, o qual possui S em sua estrutura e pode estar presente na estrutura final do PPy devido o processo de dopagem.[125]

Os padrões de DRX do OGR, PPy e das nanocargas de PPy/OGR obtidas pelo método 3 foram realizados no Laboratório de Materiais e Nanoestruturas do TECNOPUC/PUCRS e estão ilustrados na Figura 5.13. Observam-se os picos característicos do OGR em 2θ em torno de 20-29° e 41- 48° com pico largo em 24° e um pico menor em 43°, os quais são atribuídos aos planos (0 0 2) e (1 0 0) da estrutura gráfica[181], enquanto para o PPy amorfo o pico característico é em 23°.[182–185]

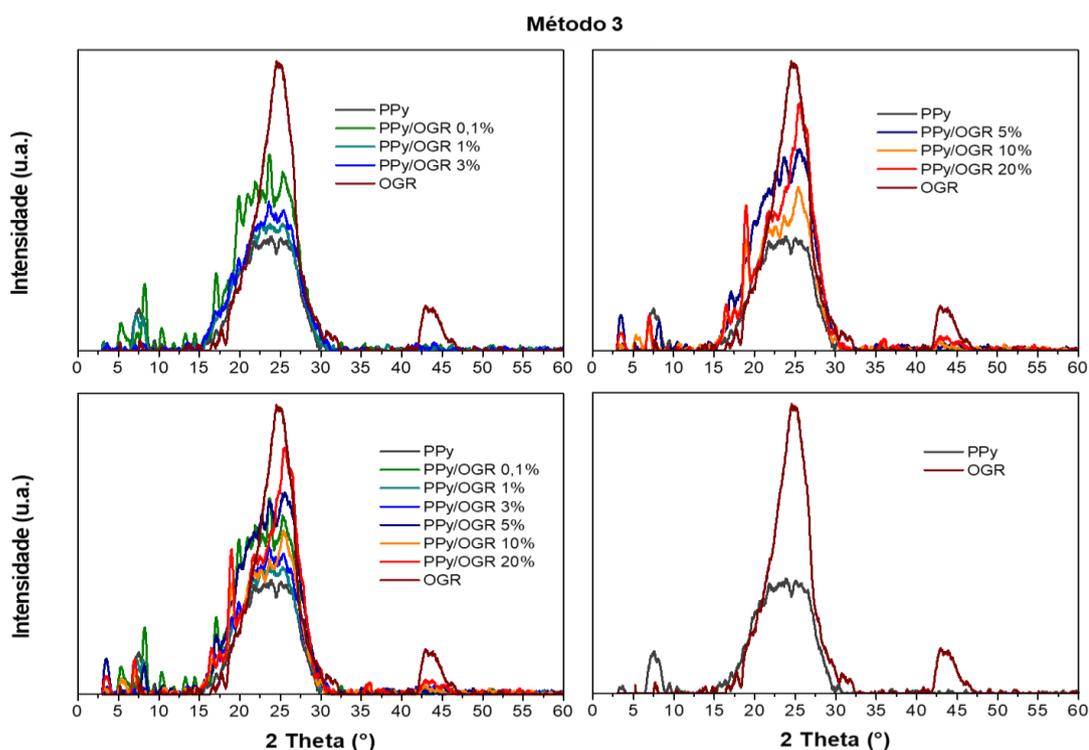


Figura 5.13. Difractogramas de raio-X do OGR, do PPy e do PPy/OGR obtido pelo método 3. Análises de DRX realizadas no Laboratório de Materiais e Nanoestruturas do TECNOPUC/PUCRS.

Os picos característicos de PPy e OGR aparecem na mesma região, mas com diferentes intensidades. Para as nanocargas, observa-se nessa região comum (20-29°), que o pico a 25° aumenta a intensidade com a adição progressiva de OGR, confirmando a presença dos planos ordenados do OGR.[181] A perda da característica da banda amorfa do PPy com a adição do OGR, indica que as nanocargas diminuíram a desordem do seu sistema, pois o OGR possui uma estrutura mais organizada que o PPy amorfo. O pico do OGR com o pico do PPy em $2\theta = 25^\circ$ foi fundido para formar os picos das nanocargas. Essa fusão de sinal foi observada em outros estudos para compósitos de PPy com derivados do carbono.[186]

Em $2\theta = 18^\circ$, observa-se um novo e intenso pico para algumas nanocargas. Para a nanocarga de PPy/OGR 20%, o pico é mais fácil de visualizar, e tal comportamento também foi observado em estudos com compósitos de PAni/OGR [181] e PPy/OG.[159] Este resultado sugere que as nanofolhas de OGR estão revestidas pelas partículas do PPy através de interações eletrostáticas e empilhamentos π - π entre elas.[181,187] A diferença nas intensidades dos picos está diretamente relacionando com a razão mássica entre PPy e OGR. [176,188]

A Figura 5.14 apresenta um esquema representativo da ocorrência da polimerização in situ das nanocargas de PPy/OGR e as propostas das possíveis interações ocorridas entre o PPy e as nanofolhas de OGR que foram interpretadas a partir dos resultados apresentados neste trabalho, principalmente pelo DRX, FTIR e TEM-EDS de que as NPs de PPy estão depositadas nas nanofolhas de OGR e interagindo por interações, predominantemente, eletrostáticas e empilhamentos π - π entre elas.[181,187] Esta proposta tem por base outros estudos de compósitos de PPy e PAni com derivados do carbono, como o OGR, os quais apresentaram resultados similares com os achados neste estudo.[125,159,175,177–187,189]

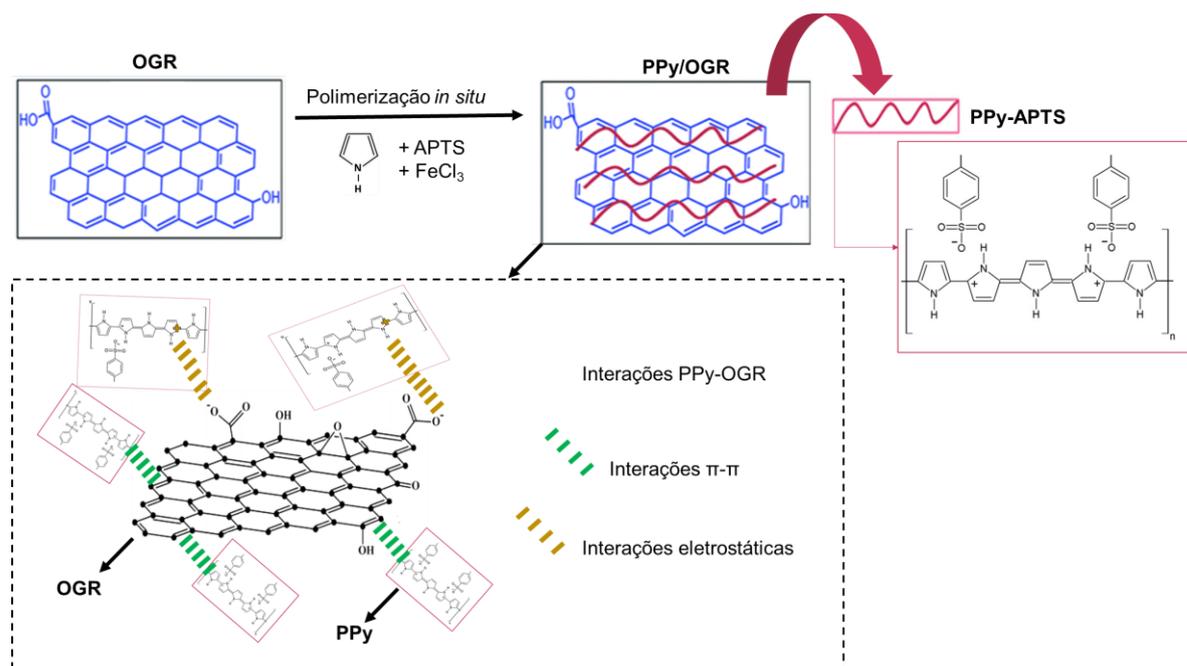


Figura 5.14. Esquema representativo da polimerização *in situ* das nanocargas híbridas de PPy/OGR e a proposta das possíveis interações entre PPy e as nanofolhas de OGR. Adaptado de: Costa et al. (2019), Pattanayak et al. (2019) e Gnana Kumar et al. (2014).[125,189,190]

5.1.2. Nanocargas Híbridas de PPy/Ag

MEV-FEG e MET foram utilizados para avaliar a morfologia das amostras de PPy e das nanocargas (nanocompósitos) PPy/Ag preparadas. A Figura 5.15 mostra obtenção de morfologia mista de nanofibras com predominância de aglomerados de nanopartículas (NPs) globulares e irregulares. Não foi notado por MEV-FEG alterações na morfologia do PPy pós processo de exposição a Ag para todos os tempos utilizados (imagens não apresentadas). Portanto, as imagens do PPy puro – antes da exposição – (imagens não apresentadas) são similares ao do nanocompósito pós 1000 s de exposição a Ag (Fig. 5.15).

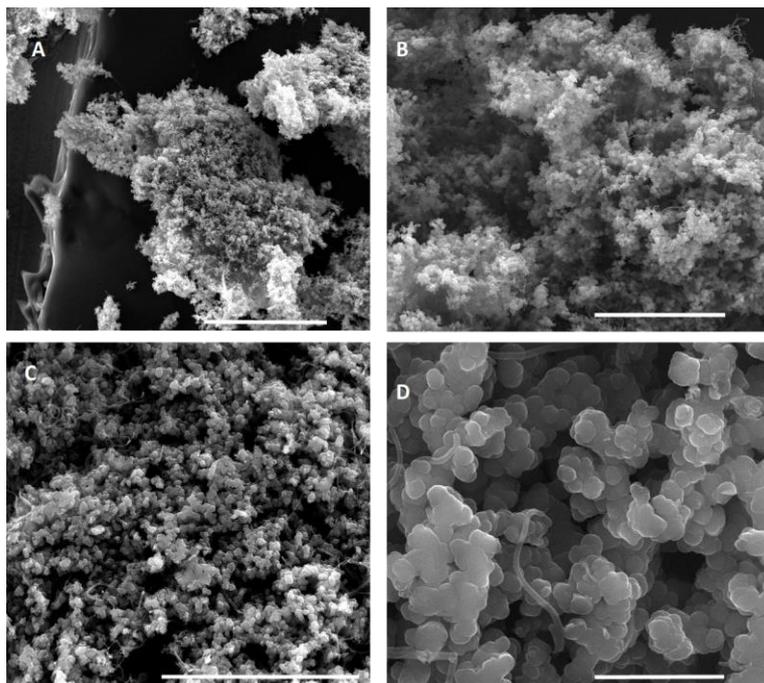


Figura 5.15. Imagens de MEV-FEG da nanocarga de PPy/Ag (1000 s de exposição a Ag). Barra de escala: (A) 100 μm (B) 50 μm (C) 40 μm (D) 5 μm.

A Figura 5.16 mostra as imagens de MET do pó de PPy pós 1000 s de exposição a Ag. Para o PPy observa-se uma morfologia com estruturas de nanofibra (~ 200 nm) e agregação das partículas globulares irregulares, as quais apresentam-se com seu interior homogêneo e preenchido (Fig. 5.16A – 5.16B). Também se observa a presença de pequenos pontos escurecidos e esféricos na região mais superficial do PPy, que são referentes às nanopartículas (NPs) de Ag depositadas no PPy (indicadas por setas azuis na Fig. 5.16). Não foi observado regiões de agregação das NPs de Ag na superfície do polímero (Fig. 5.16A - 5.16C).

Nas imagens com alta resolução (Fig. 5.16D - 5.16F) é possível visualizar as regiões da organização cristalina da Ag (indicadas por pontilhados amarelos) diferentemente da organização amorfa do PPy. O diâmetro das NPs de Ag depositadas foi de $7,33 \pm 6,23$ nm (média \pm desvio padrão; $n = 44$), com tamanho mínimo de 2,83 nm e máximo de 32,01 nm. Para todos os outros nanocompósitos (nanocargas) que tiveram o tempo inferior a 1000 s para pulverização da Ag, os mesmos pontos escuros com forma esférica e tamanho similar também foram observados (imagens não apresentadas). Portanto, as imagens da nanocompósito de PPy pós 1000 s de exposição a Ag são similares e representativas dos demais

nanocompósitos. A Figura 5.17A apresenta os espectros de FTIR do PPy e das nanocargas PPy/Ag. Todos os espectros apresentam os picos característicos do PPy no estado dopado. Os picos característicos em 1538 e 1472 cm^{-1} correspondem ao estiramento das ligações de C=C e C-N do PPy, respectivamente (vibrações fundamentais do anel pirrol). O pico em 3690 cm^{-1} foi atribuído ao estiramento da ligação de N-H e o pico de 1401 cm^{-1} referente à deformação no plano das ligações C-H ou C-N.[115,125,153]

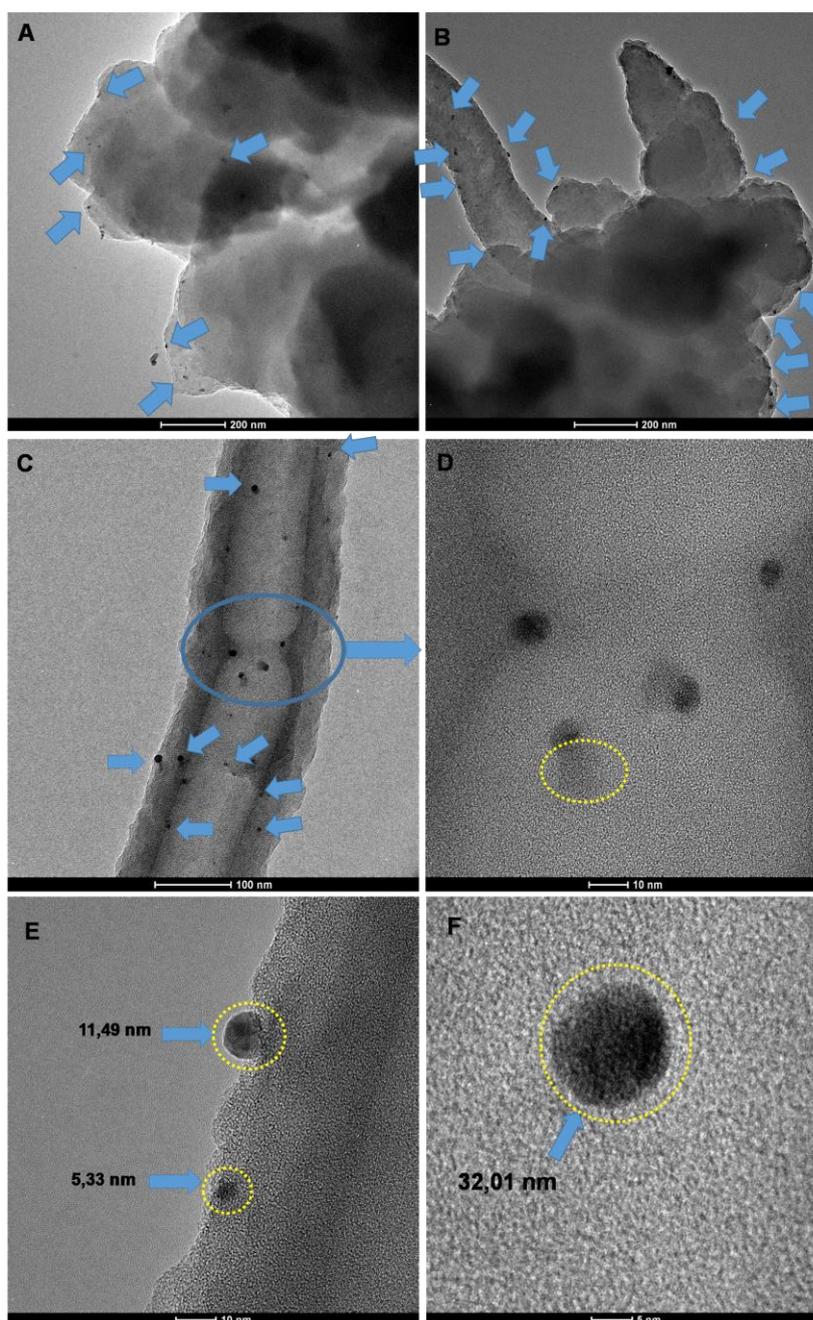


Figura 5.16. Imagens de MET da nanocarga compósito PPy/Ag (1000 s de exposição a Ag) (A-F).
Imagens em alta resolução (D-F).

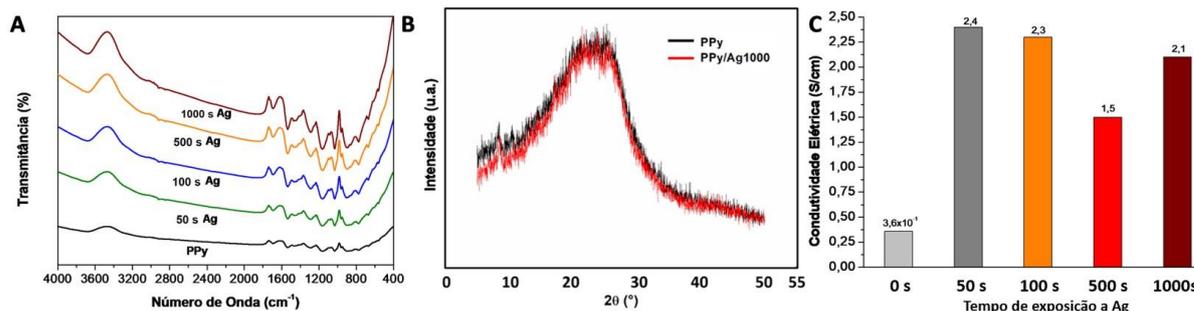


Figura 5.17. (A) Espectros de FTIR, (B) Difratoograma de raio-X (realizado na FEIS-UNESP/ Campus Ilha Solteira) e (C) Condutividade elétrica do PPy e nanocargas de PPy/Ag (com 50 s, 100 s, 500 s e 1000 s de exposição a Ag).

A Figura 5.17B apresenta os difratogramas de raios-X das amostras, os quais foram realizados na FEIS-UNESP/ Campus Ilha Solteira. Nota-se um pico largo com 2θ em torno de $20-29^\circ$ com intensidade máxima em 26° , o que é relacionado à difração característica de PPy amorfo.[183,185,191] O perfil de DRX da nanocarga de PPy/Ag (1000 s de exposição a Ag) apresentou-se similar ao do PPy puro, sugerindo que a Ag não está em quantidade suficiente para detecção, pois não foi observado os picos característicos esperados (2θ igual a $32,4^\circ$, $38,2^\circ$ e $45,6^\circ$) para as NPs de Ag em nenhuma das amostras.[192,193]

Na Figura 5.17C mostra que os valores de condutividade elétrica (CE) de todos as nanocargas aumentaram cerca de 10^2 vezes com relação ao PPy puro, indicando que a presença da Ag contribuiu para melhorar a propriedade elétrica da matriz polimérica. Segundo Ghadim et al.[192] as NPs de Ag funcionam como pontes condutoras que conectam as estruturas condutoras do PPy, assim melhorando a condução dos elétrons pelo polímero. A adição da Ag no PPy através de uma pulverização de Ag e com o tempo mínimo de 50 s de exposição foi o suficiente para melhorar a CE do PPy pós síntese.

5.1.3. Biocompatibilidade das Nanocargas Híbridas de PPy/OGR e PPy/Ag

O PPy vem sendo bastante explorado no campo biomédico devido a boa biocompatibilidade com vários tipos de células [20,127], porém as respostas biológicas são influenciadas diretamente pelas propriedades físico-químicas do

produto e, conseqüentemente, dependentes das condições de síntese.[122] Portanto, é importante a realização de ensaios de citotoxicidade *in vitro* a cada nova e diferente rota de síntese proposta.

A viabilidade celular das nanocargas híbridas de PPy com OGR ou Ag foi determinada pelo número de células metabolicamente ativas através da avaliação da redução do sal de tetrazólio em cristal de Formazan, via atividade mitocondrial (ensaio de MTT) em células NIH/3T3 (MTT 1) e VERO (MTT 2) para avaliar o potencial uso dos materiais em aplicações biomédicas.

Os ensaios de biocompatibilidade foram realizados em duas etapas (MTT 1 e MTT 2). A fim de otimizar os ensaios biológicos, algumas nanocargas foram selecionadas, aquelas com elevados resultados para a condutividade elétrica, para avançarem a segunda etapa dos ensaios de citotoxicidade com concentrações pré-definidas (MTT 2).

5.1.3.1. Viabilidade Celular pelo ensaio MTT 1

Os resultados relacionados à viabilidade celular dos extratos brutos das nanocargas híbridas avaliadas (Figura 5.18), apresentaram valores reduzidos de viabilidade para todos os grupos no período de 24 h, ocorrendo um decréscimo, principalmente para o lote do grupo das nanocargas com Prata (Fig. 5.18D). Apesar desta queda da viabilidade para todos os grupos, podemos observar que o resultado relacionado à viabilidade celular melhorou para as nanocargas de PPy/OGR, pois os valores estão aumentados quando comparados com seus respectivos controles (PPy puro) – principalmente para os grupos MET 1 e MET 2 (Fig. 5.18A e 5.18B). Observa-se que as porcentagens de viabilidade celular nos grupos MET 3 e PRATA (Fig. 5.18C e 5.18D) não foram significativas entre as nanocargas híbridas e seus respectivos controles. Comparando os 3 métodos de síntese das nanocargas de PPy/OGR, o MET 1 foi o grupo que menos reduziu a viabilidade celular de modo geral para todas as nanocargas híbridas independentemente da porcentagem de OGR, seguido pelo MET 2 e por último o MET 3. As nanocargas do grupo da PRATA mantiveram o mesmo comportamento

de redução da viabilidade que seu controle, sugerindo que a Ag não influenciou na resposta celular, contrario do que foi observado para os grupos (MET 1 e MET 2) com OGR.

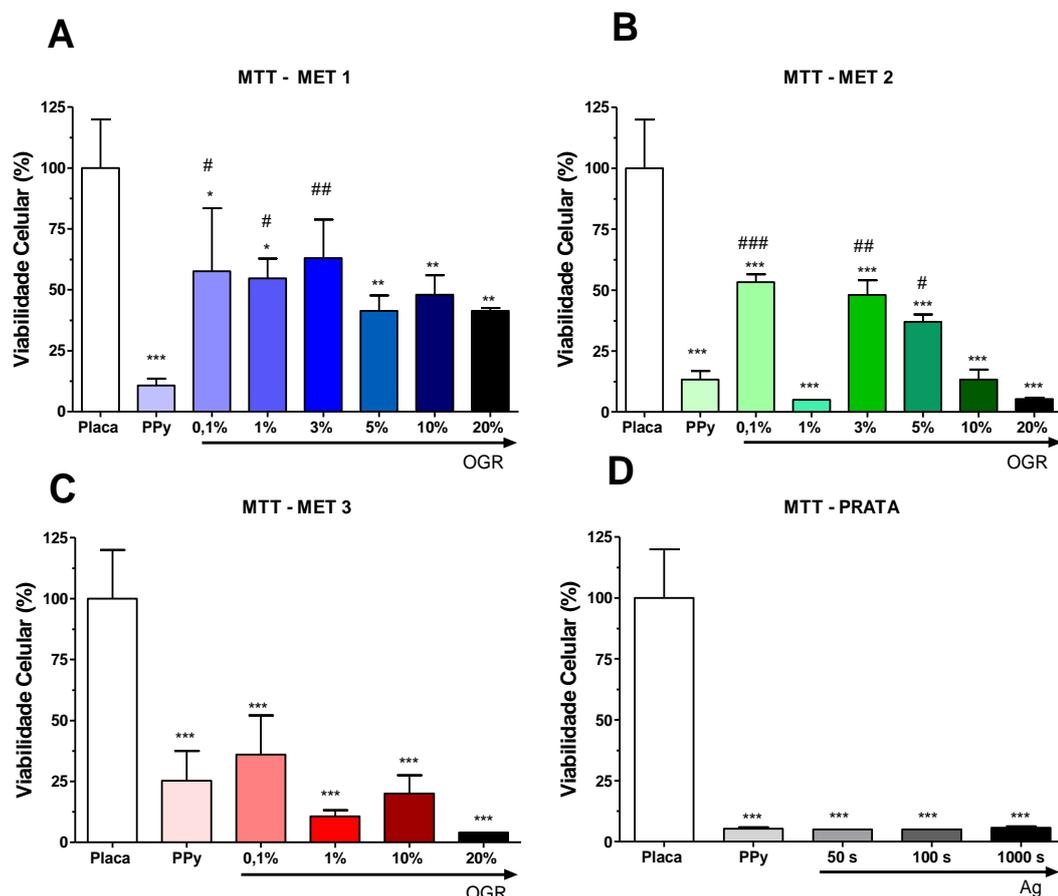


Figura 5.18. Gráficos da atividade metabólica medida por ensaio MTT para linhagem celular NIH/3T3 após 24 h de incubação com os extratos das nanocargas híbridas: (A) PPy e PPy/OGR pelo MET 1, (B) PPy e PPy/OGR pelo MET 2, (C) PPy e PPy/OGR pelo MET 3 e (D) PPy e PPy/Ag. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ versus Placa, # $p < 0,05$, ## $p < 0,001$, ### $p < 0,0001$ versus PPy (respectivo do seu grupo); Análise de Variância Simples (ANOVA) seguido pelo teste Post hoc de Tukey, ($n = 3$).

Kim et al. (2018)[194] modularam a efetividade de adesão e proliferação dos fibroblastos sob eletrodos de PPy controlando as características do dopante incorporado a cadeia do polímero. Portanto, PPy pode ter sua biocompatibilidade melhorada através de escolhas adequadas do tipo de dopante a ser utilizado no seu processo de síntese.[194] Ryoo et al. (2010) [195] já relataram alta biocompatibilidade das células de fibroblastos NIH/3T3 com superfícies nanoestruturadas a base de carbono (NTCs, OG e OGR), bem como uma melhoria

de 250% na eficiência da transfecção gênica das células. Podemos atribuir que a viabilidade melhorada observada para as nanocargas de PPy/OGR (MET 1 e MET 2) pode ter ocorrido pela presença do OGR na composição final das nanocargas.

As diferentes repostas de viabilidade celular para materiais de mesma base de formação indicam o quanto a biocompatibilidade do produto é sensível as condições envolvidas no seu processo de obtenção e purificação. [21,124,127,132,133,164,196] Assim, o OGR mostrou-se interessante ao propósito de otimizar o PPy, pois melhorou a viabilidade celular quando presente nas rotas de sínteses adotadas neste estudo. Enquanto a Ag, por esse ensaio, não demonstrou acarretar mudanças na resposta biológica do PPy.

5.1.3.2. Viabilidade Celular pelo ensaio MTT 2

Para avaliação de citotoxicidade nesta segunda etapa, inicialmente foram selecionadas seis amostras (PPy controle – método 1 e 3; PPy com 10 e 20% de OGR – método 3; PPy/Ag (1000 s) e PPy controle do grupo prata - sem prata) com o intuito de determinar o perfil de toxicidade/biocompatibilidade em modelo *in vitro* (Figura 5.19). Para isso, o primeiro passo foi avaliar a metodologia de preparo do PPy (método 1 e 3) com a finalidade de verificar o perfil atóxico descrito na literatura, além de gerar dados que possibilitem uma melhor compreensão do perfil de resposta após a introdução de diferentes porcentagens das cargas de OGR e Ag.

Nesta etapa, as células foram incubadas com diferentes concentrações do material sintetizado (0, 50, 100 e 200 µg/mL) por 24 h para avaliar a viabilidade celular das nanocargas híbridas em contato direto com as células VERO.

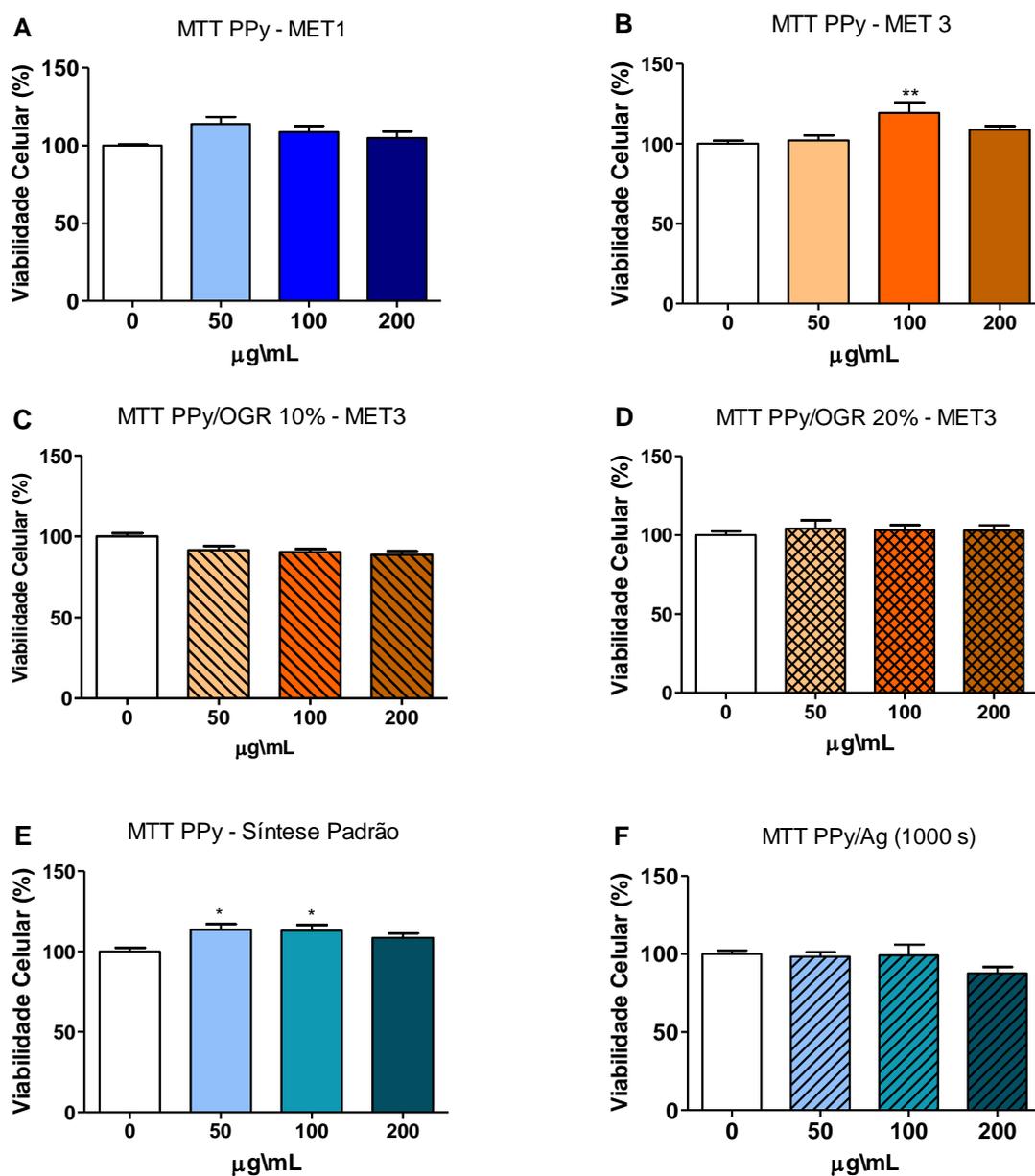


Figura 5.19. Gráficos da atividade metabólica medida por ensaio MTT para linhagem celular VERO após 24 h de incubação com as nanocargas híbridas: (A) PPy pelo MET 1, (B) PPy pelo MET 3, (C) PPy/OGR 10% pelo MET 3, (D) PPy/OGR 20% pelo MET 3, (E) PPy - Síntese Padrão (base para deposição da Ag) e (F) PPy/Ag (1000 s). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ versus Controle (0); Análise de Variância Simples (ANOVA) seguido pelo teste Post hoc de Tukey, ($n = 3$).

O efeito do PPy sintetizado pelo método 1 e 3 (Fig. 5.19A e Fig. 5.19B) não promoveu redução da viabilidade das células Vero, além disso foi possível observar que o PPy pelo método 3 promoveu aumento da viabilidade celular na concentração de 100 µg/mL, enquanto o PPy pelo método 2 não promoveu nenhum

efeito sobre as células Vero. Na avaliação do PPy sem prata (Fig. 5.19E) foi possível observar um aumento da viabilidade nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Uma vez que foi mostrado o perfil atóxico do polímero veicular, o próximo passo foi verificar se a introdução de nanocarga (OGR e Ag) alteraria este perfil. Como observado na Figura 5.19, os materiais de PPy com 10 e 20% de OGR (Fig. 5.19C e Fig. 5.19D) não foram capazes de reduzir a viabilidade das células Vero em nenhuma das concentrações testadas, além disso a amostra de PPy com Ag também não promoveu nenhum efeito na linhagem Vero.

Nos últimos anos, materiais com PPy tem sido explorado em diversos estudos como biomaterial com características favoráveis de biocompatibilidades para aplicações biomédicas.[131,164,197] Kim et al. (2011) [131] verificaram em células de mamíferos *in vitro* e descobriram que as NPs de PPy com diferentes diâmetros (20, 40, 60, 80 e 100 nm) afetam a viabilidade, o estresse oxidativo e a apoptose / necrose das células quando foram tratadas com o PPy, e os efeitos foram dependentes do tamanho e da dose. As NPs de PPy com diâmetro de 60 nm em concentrações mais elevadas (500 µg/mL) desencadearam o maior efeito adverso nas células. Vaitkuvienė et al. (2013)[197] também avaliaram a biocompatibilidade de NPs de PPy sintetizadas por polimerização química oxidativa em diferentes linhagens celulares. Os resultados obtidos pelos autores mostraram que a citotoxicidade das NPs de PPy também foi dependente da dose, e que baixas concentrações das NPs de PPy (abaixo de 78 µg/mL) foram biocompatíveis, enquanto concentrações mais altas (acima de 78 µg/mL) se tornavam mais citotóxicas. Ainda também, Humpolíček et al. (2018) [164] testaram a biocompatibilidade de extratos do PPy por ensaios de citotoxicidade e embriotoxicidade. Neste estudo, o PPy foi preparado pelo método químico oxidativo com FeCl₃ e os autores reportaram uma faixa de citotoxicidade para os extratos de PPy, geralmente associado a altas concentrações.[164]

Os resultados mostrados na Figura 5.19, ao contrário do que foi reportado na literatura, mostrou-se biocompatível em concentrações mais altas (100 a 200 µg/mL), possivelmente associado a morfologia das nanocargas avaliadas e outros fatores, como as condições de síntese, a escolha do dopante e a purificação do

produto, pois são fatores que afetam fortemente a química e a topografia superficial resultante.[22,122,197] Devido às infindáveis combinações possíveis, os resultados relatados com esses fatores variam amplamente na literatura. [22]

5.1.4. Conclusão Parcial – Nanocargas Híbridas

Os resultados obtidos na síntese e caracterização das nanocargas híbridas de PPy com OGR e Ag, por polimerização química oxidativa *in situ* e pulverização catódica, respectivamente, mostraram que o OGR e a Ag foram bem incorporados na matriz de PPy. Portanto, nanocargas híbridas de PPy/OGR e PPy/Ag na forma de pós foram obtidas com sucesso.

Inicialmente foram obtidas as nanocargas de PPy/OGR por três metodologias de síntese, as quais se diferenciavam pelo uso de banho de ultrassom e/ou ultrassom de ponteira para aumentar a esfoliação das nanofolhas de OGR no momento de síntese. A adição do OGR provocou alterações na morfologia, condutividade elétrica, características químicas e estruturais do PPy. Nas nanocargas híbridas de PPy/OGR obtidas pelo método 3, foi observada por meio das análises de MEV-FEG e MET a presença de PPy com estrutura fibrosa, a qual é desejada devido a similaridade com a estrutura organizacional dos tecidos biológicos.[152] Além disso, as nanocargas com 10% e 20% de OGR obtidas por este método, apresentaram os valores mais elevados de condutividade elétrica, cerca de 47% e 163% maior que o controle, respectivamente. Tal fato pode ser relacionado a melhor disponibilidade das nanofolhas de OGR pelo tratamento de sonicação (banho de ultrassom e ponteira) que foi utilizado para uma alta esfoliação do OGR, e assim foi melhor disponibilizado para interagir com o Py. A alta esfoliação favoreceu interações π - π entre as nanofolhas de OGR e os anéis de PPy [177,178], conseqüentemente aumentando a condutividade elétrica, especialmente para as nanocargas do método 3. O DRX mostrou que ocorreu a diminuição da desordem do sistema híbrido, pois em $2\theta = 25^\circ$ o pico foi fundido para formar os picos das nanocargas [186], além de um novo pico em $2\theta = 18^\circ$ que sugere que as nanofolhas de OGR estão revestidas pelas partículas do PPy através de interações

eletrostáticas e empilhamentos π - π entre elas.[181,187] Suaves deslocamentos no FTIR também sugerem que ocorreu aglomeramento entre o OGR e PPy, assim como o EDS que detectou a presença do PPy nas nanofolhas de OGR.

Na sequência, nanocargas híbridas de PPy/Ag foram obtidas por pulverização catódica. Dos quatro tempos de exposição à prata testados, foi observado que a partir do tempo mínimo de 50 s de exposição à prata, a condutividade elétrica do PPy aumentou sem diferença significativa com relação aos demais tempos. No entanto, quando se avaliou a morfologia das nanocargas obtidas por TEM, foi observado que a nanocarga de PPy/Ag (1000 s – tempo máximo) apresentou uma quantidade visualmente maior de prata. Independente do tempo de exposição, o tamanho de nanopartícula médio da Ag foi de 7 nm. Por FTIR e DRX não foram observadas mudanças significativas em todas as nanocargas com Ag.

O presente estudo também fornece evidências da biocompatibilidade do PPy pelo método de síntese *in situ* utilizado neste estudo, como também das amostras do PPy com as diferentes nanocargas híbridas (OGR e Ag). O conjunto de resultados obtidos através da avaliação da citotoxicidade dos materiais obtidos (PPy, PPy/OGR e PPy/Ag) sugere que as nanocargas híbridas não apresentam toxicidade até concentração de 200 $\mu\text{g/mL}$, e podem constituir uma excelente ferramenta para aplicações na área biomédica.

Portanto, após a análise de todos os resultados desta etapa de trabalho, é possível concluir que se pode preparar nanocompósitos de PPy/OGR por polimerização química oxidativa *in situ*. Comparando os resultados obtidos entre os 3 métodos de síntese, o pelo método 3 percebe-se um ganho na propriedade elétrica, bem como uma estrutura com fibras no produto e biocompatibilidade com células VERO em concentrações até 200 $\mu\text{g/mL}$. Logo, as nanocargas híbridas de PPy/OGR (10 e 20% OGR, especialmente) do método 3, evidenciam como as nanocargas condutivas mais adequadas para o uso futuro em matrizes poliméricas, a fim de otimizar propriedades elétricas e biológicas. Também se pode preparar nanocargas híbridas de PPy/Ag por pulverização catódica, com propriedade elétrica melhorada com apenas 50 s de exposição a Ag e sem evidências de toxicidade a

células VERO em concentrações até 200 $\mu\text{g/mL}$. Portanto, as nanocargas híbridas de PPy/Ag também demonstram ser nanocargas condutivas e biocompatíveis adequadas para uso em matrizes poliméricas.

Não existe na literatura até o momento qualquer publicação a respeito da incorporação de material híbrido, condutivo e biocompatível composto por PPy/OGR ou PPy/Ag em blendas poliméricas de PCL/PLGA.

5.2. Caracterização da superfície dos filmes poliméricos sem e com microtopografia padronizada

Como já descrito no item 4.2, filmes de PCL, PLGA e blendas de PCL/PLGA foram obtidos via evaporação de solvente, utilizando-se dois moldes diferentes, sem e com microtopografias padronizadas. A Figura 5.20 ilustra imagens do aspecto visual dos filmes poliméricos obtidos nos diferentes moldes.

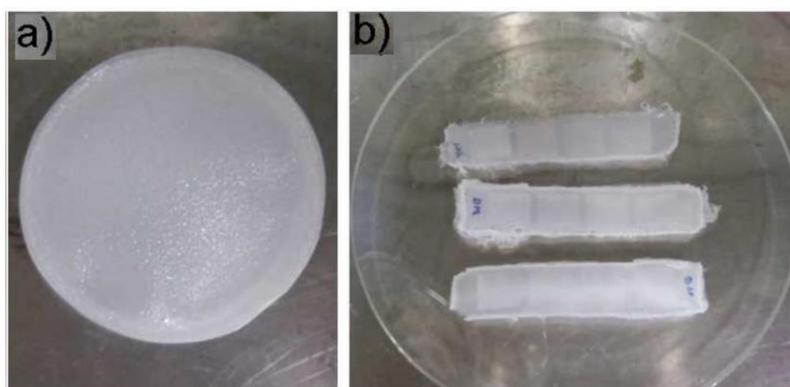


Figura 5.20. Filmes de PCL e PCL/PLGA (70:30) obtidos: a) na placa de petri (Liso) e b) no molde microestruturado. Fonte: Adaptado de Garcez, 2015.[168]

A Figura 5.21 apresenta as imagens de MEV-FEG das superfícies dos filmes obtidos sem e com microestruturação. Observa-se a presença de agregados esféricos típicos de polímeros semicristalinos (domínios esferulíticos) na superfície do filme de PCL puro (Fig. 5.21a).[66,167] Em contraste, a superfície do PLGA puro apresenta-se plana e lisa, sem evidências de poros e irregularidades (Fig. 5.21e). Nas blendas de PCL/PLGA observam-se domínios esféricos de PLGA, os quais

apresentam-se mais evidentes com a adição deste polímero (Fig. 5.21b, 5.21c e 5.21d), indicando que estes dois polímeros são imiscíveis entre si. Resultados similares da dispersão e imiscibilidade entre os polímeros PLGA e PCL também foi observado por Barbanti et al. (2008) e Tang et al. (2005).[66,167]

Os filmes microestruturados obtidos (Fig. 5.21f – 5.21o) apresentaram canais com alinhamento longitudinal com as seguintes larguras médias: $5,3 \pm 0,1 \mu\text{m}$; $9,8 \pm 0,2 \mu\text{m}$; $14,0 \pm 0,9 \mu\text{m}$; e $19,3 \pm 1,2 \mu\text{m}$. Estes valores estão próximos do tamanho esperado para os moldes utilizados (5, 10, 15 e 20 μm).

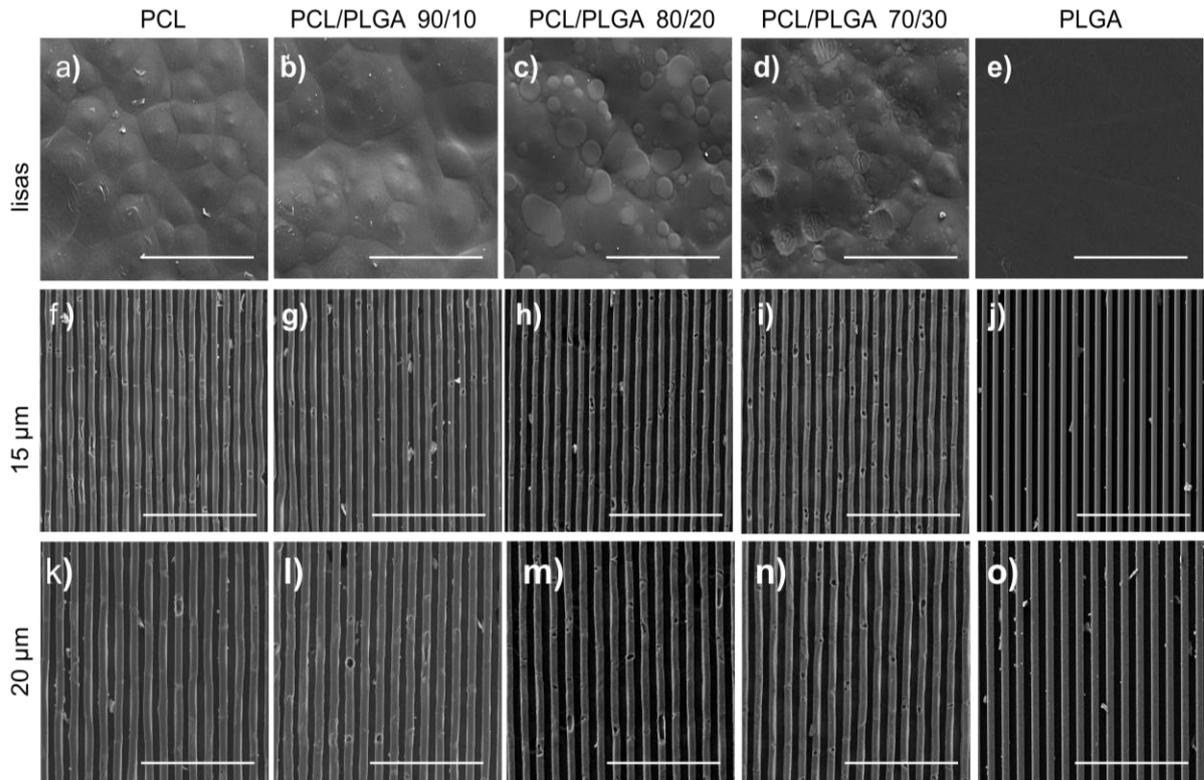


Figura 5.21. Imagens de MEV-FEG dos filmes de PCL, PLGA e das blends PCL/PLGA sem e com microestruturação (canais de 15 e 20 μm). Barra de escala: 300 μm . Magnificação: 500 x.

A Figura 5.22 apresenta uma imagem de MEV-FEG do filme de PLGA com microestruturação de 20 μm na posição lateral para verificação da altura dos canais. Não foram observadas diferenças significativas na largura e na altura dos canais do filme ($25,1 \pm 1,9 \mu\text{m}$), bem como entre todos os outros grupos (imagens não ilustradas). A imagem da Figura 5.22 é representativa da morfologia lateral dos

demais filmes (imagens não ilustradas), pois a altura dos canais foi fixada em 25 μm para todos os tamanhos de canais.

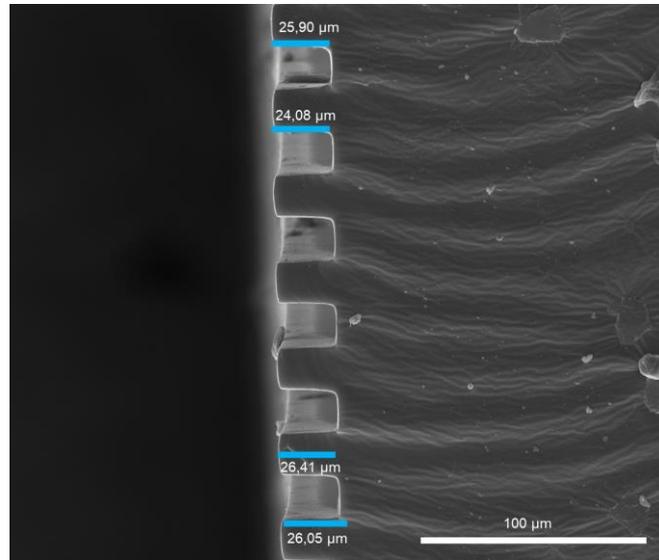


Figura 5.22. Imagem de MEV-FEG da fratura lateral do filme de PLGA com microestruturação (20 μm). Magnificação: 1000 x.

A Figura 5.23 apresenta a rugosidade superficial dos filmes lisos avaliados por AFM e a propriedade mecânica pelo Módulo de Young. Foi possível observar regiões de imiscibilidade do PLGA na matriz PCL em todas as blendas (Fig. 5.23b - 5.23d). A blenda de PCL/PLGA (70/30) apresentou uma superfície mais rugosa em comparação aos filmes de PCL (Fig. 5.23a) e das blendas (90/10 e 80/20). Ondulações também foram observadas na superfície de todos os filmes, e com o aumento da quantidade de PLGA na matriz de PCL, foi mais facilmente observado as mudanças topográficas devido uma maior formação dos domínios esféricos de PLGA que favoreceram a modificação da matriz de PCL. Na Figura 5.23 (f-h) são apresentados os gráficos dos parâmetros de rugosidade superficial avaliados: Rugosidade Média (R_a), Rugosidade Média Quadrática (R_q) e Altura Máxima de Rugosidade (R_{max}), bem como as características topográficas por imagens 2D (Figura 5.23a-e). Valores mais altos destes parâmetros foram observados para o filme da blenda de PCL/PLGA (70/30), os quais foram semelhantes aos valores apresentados pelo filme de PLGA e significativamente maiores que os valores apresentados pelos filmes de PCL e das outras blendas. As imagens por AFM também evidenciam para as blendas a formação de domínios esféricos com

diferentes diâmetros, os quais são atribuídos ao PLGA disperso na matriz de PCL, apoiando o comportamento de imiscibilidade dos polímeros demonstrado nas imagens de MEV-FEG.

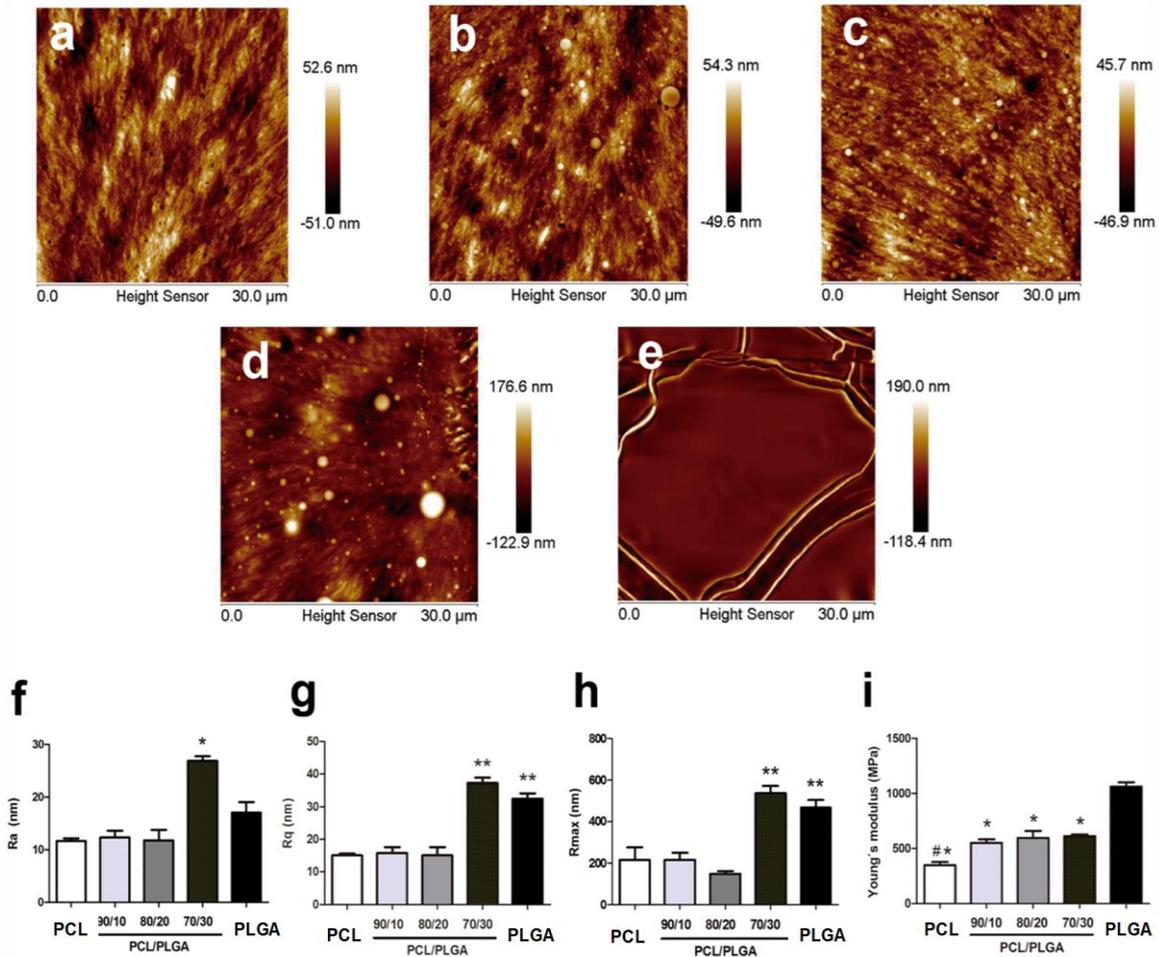


Figura 5.23. Imagens de AFM 2D dos filmes lisos variando a relação PCL e PLGA: (a) PCL, (b) PCL90 / PLGA10, (c) PCL80 / PLGA20, (d) PCL70 / PLGA30, e (e) PLGA. Parâmetros de rugosidade da superfície (tamanho de área: $30 \mu\text{m}^2$): (f) rugosidade média (Ra); g) Rugosidade média quadrática (Rq) e (h) Altura máxima de rugosidade (Rmax). Análise feita na superfície do filme que permaneceu em contato com o ar (superfície superior). * $p < 0,0001$ versus todos os outros grupos, ** $p < 0,0001$ versus PCL puro, 90/10 e 80/20. Análise de Variância Simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste *Post hoc* de Tukey; (i) Módulo de Young dos filmes lisos. * $p < 0,0001$ vs. PCL puro, # $p < 0,05$ versus todos os outros grupos, One-way ANOVA seguido pelo teste *Post hoc* de Tukey.

Pelas análises de MEV-FEG e AFM, o PCL e o PLGA mostraram claramente ser imiscíveis, pois apresentam separação de fases, o que ocasiona às topografias parcialmente ou muito rugosas, conforme as composições de misturas. A

miscibilidade entre os polímeros no mesmo solvente é dependente de sua solubilidade, vinculado às características do próprio peso molecular e sua razão molar no caso de copolímero.[39,42,55,60,198,199] O polímero PCL e o copolímero PLGA utilizados neste estudos são da mesma família dos polímeros biodegradáveis, mas apresentam essas características próprias e distintas que ocasionam a separação de fases entre si. Outros estudos também evidenciaram a separação por fase independentes entre PCL e PLGA na razão mássica 70/30, resultando em uma rede polimérica com porosidade não homogênea.[200] Níveis elevados de rugosidade superficial para filmes poliméricos produzidos a partir de dois polímeros por evaporação de solvente também foram relacionados à formação de bolhas microscópicas superficiais causadas pelo vapor de solvente em fuga, as quais são formadas durante o processo de secagem dos filmes.[201] Atualmente, a mistura de PLGA e PCL é uma das combinações que vem mostrando ser cada vez mais atraente, porque Tang et al. (2005 e 2006) relataram um aumento da adesão e crescimento de células de osteoblastos em filmes de PCL/PLGA, fato favorecido pela imiscibilidade entre os polímeros que, conseqüentemente, causou mudanças na morfologia da superfície dos filmes quando aplicado em variadas razões mássicas entre eles.[66,202]

O Módulo de Young dos filmes lisos também foi avaliado. De acordo com os resultados da Figura 5.23i, observa-se que as blendas de PCL/PLGA apresentaram valores maiores que o filme de PCL, e sem diferença significativa entre as blendas. Isto indica que uma pequena razão mássica de 10% de PLGA foi o suficiente para modificar a propriedade mecânica da matriz de PCL. A partir da mínima adição de PLGA na matriz de PCL resultou em filmes mais rígidos, uma vez que o filme de PLGA apresentou um módulo ~3 vezes maior que o filme de PCL. O Módulo de Young para os filmes lisos de PCL, PCL/PLGA (90/10, 80/20 e 70/30) e PLGA foi de 348 ± 51 , 549 ± 60 , 596 ± 113 , 612 ± 26 e 1062 ± 68 MPa, respectivamente. O PCL é um material mais flexível e adequado para a preparação de suportes comparado ao PLGA. Uma desvantagem de aplicar o PLGA isoladamente é a sua alta rigidez, enquanto o PCL apresenta menor afinidade pelas células. Portanto, aplicar a mistura dos dois polímeros pode resultar em novos biomateriais com vantagens biológicas e mecânicas ajustáveis.[203,204]

A hidrofobicidade da superfície de biomateriais é um fator chave e relevante para o controle da resposta celular, que pode ser avaliada medindo-se o ângulo de contato (WCA do inglês *Water Contact Angle*) através da distribuição de uma gota de água na superfície do biomaterial.[32] A Figura 5.24 apresenta o gráfico com o comportamento dos ângulos de contato dos filmes sem e com microtopografias e algumas imagens de uma gota de água que foi formada na superfície de um filme sem e com microcanais padronizados. A Tabela 5.1 também apresenta os valores de ângulo de contato de todos os filmes avaliados.

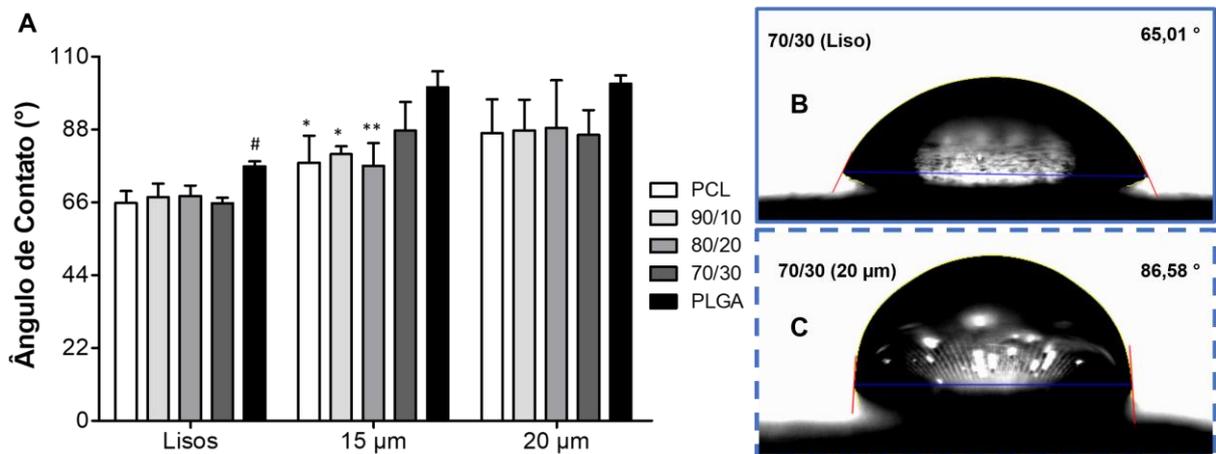


Figura 5.24. Gráfico dos valores médios do ângulo de contato das gotas formadas na superfície dos filmes sem e com microtopografias (A). Imagens da gota de água na superfície lisa (B) e microestruturada com canais de 20 µm (C) de filmes com composição de 70/30 entre PCL/PLGA. Análise feita na superfície do filme que permaneceu em contato com o ar para o grupo de filmes lisos e na superfície com microcanais (15 e 20 µm) para o grupo de filmes microestruturados. # p < 0,05 versus todos os outros filmes dentro do grupo; *p < 0,05 versus PLGA e **p < 0,001 versus PLGA dentro do grupo. Análise de Variância Simples *One-way ANOVA*) seguido pelo teste *Post hoc* de *Tukey*.

Tabela 5.1. Valores do ângulo de contato dos filmes sem e com microtopografias (média ± desvio padrão).

Ângulo de Contato	Biomaterial	PCL	90/10	80/20	70/30	PLGA
	Liso	65,8° ± 5,6°	67,5° ± 4,1°	67,9° ± 3,1°	65,7° ± 1,7°	76,8° ± 1,5°
	15 µm	77,9° ± 8,1°	80,5° ± 2,4°	77,0° ± 6,8°	77,0° ± 6,8°	101° ± 4,8°
	20 µm	86,8° ± 10,3°	87,7° ± 9,2°	88,4° ± 14,3°	86,3° ± 7,5°	102° ± 1,4°

Mudanças bruscas na topografia e na rugosidade da superfície podem ter um efeito significativo no ângulo de contato, bem como influenciam diretamente no

comportamento das interações entre as células e a superfície do biomaterial.[201,205] Todos os filmes lisos indicaram ter superfícies com hidrofiliidade moderada, valores menores que 90° e maiores que 40° .[206] Os valores de WCA de todas as blendas não apresentaram diferença significativa entre si e em relação a matriz de PCL do grupo de filmes lisos, sugerindo que a quantidade de PLGA utilizada não teve efeito na hidrofiliidade da matriz majoritariamente de PCL. O ângulo de contato do filme liso de PLGA foi ligeiramente maior quando comparado aos demais do grupo, porém apresentando ângulo inferior a 90° . A literatura mostra que os ângulos de contato com a água aumentam gradualmente com a presença de grupamentos metila ($-\text{CH}_3$) em superfícies.[206] Portanto, a leve hidrofobicidade exibida pelo PLGA em relação ao PCL pode ser atribuída ao grupamento $-\text{CH}_3$ presente na sua estrutura química, enquanto o PCL não possui. Todos os filmes lisos podem ser considerados hidrofílicos, uma vez que o ângulo de contato foram $< 90^\circ$ e são atribuídos à superfície com hidrofiliidade.

Os filmes com microcanais de $15 \mu\text{m}$ apresentaram WCA na sua maioria menores que 90° , com exceção do PLGA ($>100^\circ$). Observa-se um aumento significativo dos valores de WAC das composições de PLGA e da blenda 70/30 com relação aos demais filmes do grupo microestruturado ($15 \mu\text{m}$). Comparando os valores deste grupo com o grupo dos filmes lisos, todos os valores WCA foram mais elevados, indicando uma influência das características topográficas no comportamento de molhabilidade da superfície de matrizes de mesma composição. Os filmes com canais de $20 \mu\text{m}$ apresentaram WCA similar ao grupo de $15 \mu\text{m}$, sem diferença estatística dentro do grupo. Do mesmo modo que o grupo de $15 \mu\text{m}$, os valores de WAC ($20 \mu\text{m}$) também são mais elevados que o grupo de filmes lisos. Os valores de WAC, apesar de não apresentarem diferença estatística entre os grupos microestruturados (15 e $20 \mu\text{m}$), os filmes com canais maiores apresentaram suave tendência de exibirem valores médios de WCA maiores que aqueles com canais menores. Assim como para o grupo de filmes com canais de $15 \mu\text{m}$, apenas o filme de PLGA do grupo microestruturado de $20 \mu\text{m}$ apresentou valor superior a 90° , indicando uma superfície de caráter hidrofóbico.

No geral, os filmes com microcanais padronizados apresentaram seus WCA mais elevados que o grupo dos filmes lisos, porém a maioria ainda exibindo valores inferiores a 90° . Os filmes com microestruturação mantiveram uma característica favorável de molhabilidade hidrofílica de suas superfícies, apesar da mudança topográfica significativa com relação ao grupo dos filmes lisos. A literatura reporta valores mais elevados para o WCA de matrizes fibrosas quando comparadas com a mesma matriz densa.[207] Esse comportamento é atribuído a morfologia da superfície, rugosidade, porosidade e tamanho das estruturas, as quais podem reter diferentes volumes de ar na interface sólido-água e modificar essa relação.[207,208] Existem vários modelos teóricos de ângulo de contato para explicar a interface sólido-líquido. Com base no modelo de Wenzel, o qual considera que o líquido preenche todas as ranhuras, a área de contato real sólido-líquido é maior que a área de contato geométrica aparente e por isso a hidrofobicidade é aumentada. A medida que a taxa de estrutura da superfície diminui, a hidrofobicidade aumenta gradualmente.[208] Logo, os resultados de WCA para os filmes microestruturados com relação as matrizes sem estruturas vem de encontro com a teoria de Wenzel, que os canais foram preenchidos pelo líquido, alterando a relação de área entre sólido-líquido, e resultando nos aumentados valores de WCA.

As características superficiais de hidrofiliabilidade e morfológica em escala micro e nanométrica, assim como a composição química, influenciam diretamente a efetividade da adsorção de proteínas séricas no material.[206,209–211] O aumento da rugosidade é um outro parâmetro importante que também está diretamente relacionado na adsorção de proteínas nas superfícies dos biomateriais.[210] Além disso, a literatura mostra que superfícies hidrofílicas facilitam a adesão e a proliferação de células nos suportes.[212–214] A literatura também ressalta que trabalhar com blendas poliméricas tem permitido que cada componente compense a fraqueza inerente do outro, bem como apresentem características físico-químicas e mecânicas intermediária aos seus componentes isolados, com efeitos diretos na efetividade das respostas biológicas.[203,206] Portanto, a blenda 70/30 de PCL/PLGA proposta neste estudo apresenta características superficiais necessárias como rugosidade elevada e hidrofiliabilidade moderada para aplicações na ET, bem

como foi possível de modelar sua superfície através de molde com estruturas padronizadas

5.2.1. **Biocompatibilidade dos filmes poliméricos sem e com micropografias padronizadas**

Os ensaios de biocompatibilidade foram realizados para todos os filmes lisos nas diferentes razões mássicas entre PCL/PLGA. A fim de otimizar os ensaios biológicos, apenas as blendas que não apresentaram citotoxicidade celular pelo ensaio MTT avançaram para outros ensaios de biocompatibilidade e foram avaliados na condição de filmes microestruturados com canais de 15 e 20 μm . A escolha do tamanho dos canais foi baseada no estudo de Miller et al. (2001)[36], que avaliou o crescimento de células de Schwann em superfícies com topografias padronizadas de PDLA e concluiu que canais muito pequenos (5 μm) não demonstraram efeitos de guiamento favoráveis quanto aqueles com estruturação de tamanhos entre 10 - 20 μm . [36]

5.2.1.1. Viabilidade Celular pelo ensaio MTT

Os efeitos dos filmes lisos foram avaliados pelo ensaio MTT em cinco linhagens celulares distintas (Figura 5.25). Os filmes de PCL e da blenda PCL/PLGA (90/10) causaram uma diminuição significativa na viabilidade celular das células HaCaT e RAW 264.7 (Fig. 5.25a e 5.25b). Além disso, o filme de PCL também desencadeou uma diminuição significativa da viabilidade das células VERO e HGF (Fig. 5.25c e 5.25d). O efeito antiproliferativo máximo para células VERO foi observado em filmes de PCL (Fig. 5.25c), enquanto que a redução máxima da viabilidade celular com a blenda PCL/PLGA (90/10) foi observada em células RAW 264.7. Os filmes de PLGA e das blendas de PCL/PLGA não alteraram significativamente a viabilidade das células HGF e MRC-5 (Fig. 5.25d e 5.25e). A blenda PCL/PLGA (70/30) causou um aumento significativo na viabilidade celular para todas as linhagens celulares quando comparadas a matriz pura de PCL (Fig. 5.25a-e). As blendas PCL/PLGA (80/20 e 70/30) não apresentaram citotoxicidade

em todas as linhagens testadas, e devido a isso, foram selecionadas para a continuação da avaliação biológica na forma de filmes microestruturados.

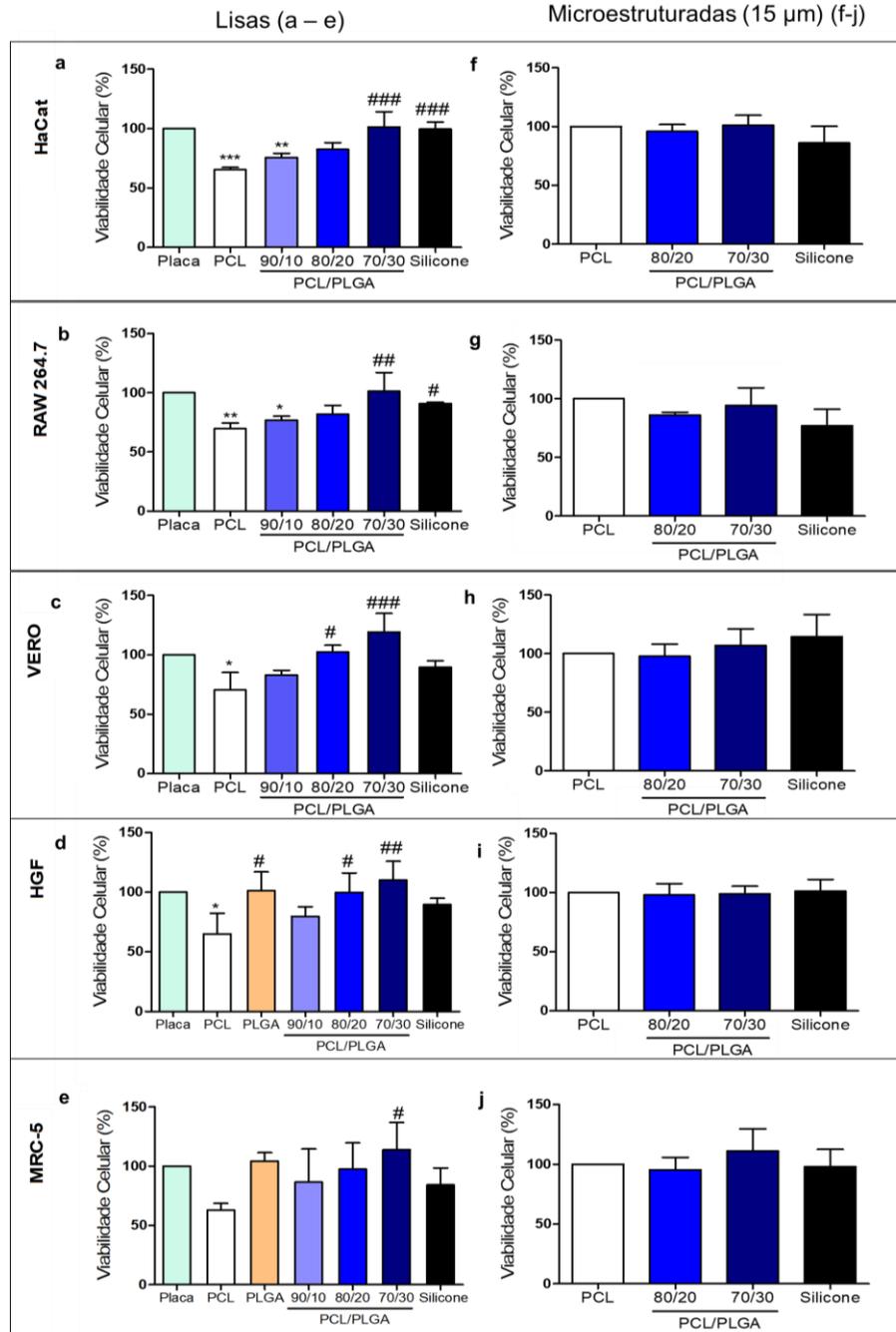


Figura 5.25. Gráficos da atividade metabólica medida por ensaio MTT para linhagens celulares HaCaT (a, f), RAW 264.7 (b, g), VERO (c, h), HGF (d, i) e MRC-5 (e, j) após 24 h de incubação com filmes lisos (a – e) e microestruturados de 15 μm (f – j). Placa de cultura de tecidos e silicone foram utilizados como controles para comparações com os filmes lisos, enquanto PCL puro microestruturado foi utilizado como controle para as comparações dos filmes microestruturados. * p<0,05, ** p<0,001, *** p<0,0001 versus Placa; # p<0,05, ## p<0,001, ### p<0,0001 versus PCL, Análise de Variância Simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste Post hoc de Tukey, (n = 3).

Os resultados encontrados para as blendas microestruturadas de PCL/PLGA (80/20 e 70/30) foram semelhantes aos obtidos para as blendas lisas e nenhuma citotoxicidade foi observada, mesmo para o filme microestruturado de PCL (Fig. 5.25f–j), indicando o efeito positivo da modificação superficial (microtopografia padronizada) no aumento da bicompatibilidade de matrizes de baixa adesão celular

5.2.1.2. Proliferação Celular e Morfologia Nuclear por DAPI

Para avaliar o perfil celular proliferativo nos filmes lisos, o índice mitótico (IM) foi determinado pela coloração com DAPI (Fig. 5.26). Este experimento revelou que apenas o PCL reduziu marcadamente o IM em todas as linhagens celulares testadas, bem como a blenda de PCL/PLGA (90/10) (Fig. 5.26a-e). Notou-se que as células HGF expostas a blenda PCL/PLGA (70/30) mostraram uma frequência de eventos mitóticos semelhantes ao grupo controle negativo (silicone) (Fig. 5.26d). Observa-se que a blenda PCL/PLGA (70/30) é a matriz que melhor preservou a capacidade de proliferação para todas as linhagens celulares avaliadas, pois é o grupo com os valores mais elevados para o IM em todas as linhagens celulares (Fig. 5.26a-e).

No presente estudo, não foi observado diferenças morfológicas significativas entre as células RAW 264.7 do controle (Fig.5.26f) e as células RAW 264.7 que foram tratadas com os filmes poliméricos lisos (Fig.5.26g-h) no tempo de 24 h. Para todas as outras linhagens celulares avaliados também não foi evidenciado diferenças morfológicas expressivas (imagens não apresentadas).

Os eventos mitóticos estão identificados por setas brancas nas Figuras 5.26f e 5.26h, confirmando que as células cultivadas em placa de cultura de tecido (controle) e no filme da blenda de PCL/PLGA (70/30) mostraram um perfil proliferativo favorável quando comparados com o filme de PCL (Fig.26g).

A incorporação de 30% (m/m) de PLGA preservou a viabilidade das linhagens celulares, bem como melhorou a capacidade de proliferação da blenda em comparação ao PCL, sendo semelhante ao controle e ao filme de PLGA (dados

e imagens não apresentados). Estes resultados estão de acordo com estudos anteriores.[8,66,202,215,216]

Os resultados favoráveis de proliferação celular apresentados pela blenda de PCL/PLGA (70/30) com as 5 linhagens celulares (VERO, RAW 264.7, HaCaT, HGF e MRC-5) correlacionam-se com a alta rugosidade superficial apresentada por esse filme, uma vez que a literatura atribui as melhoras na proliferação celular a sinais topográficos promovidos pela rugosidade superficial.[19,217]

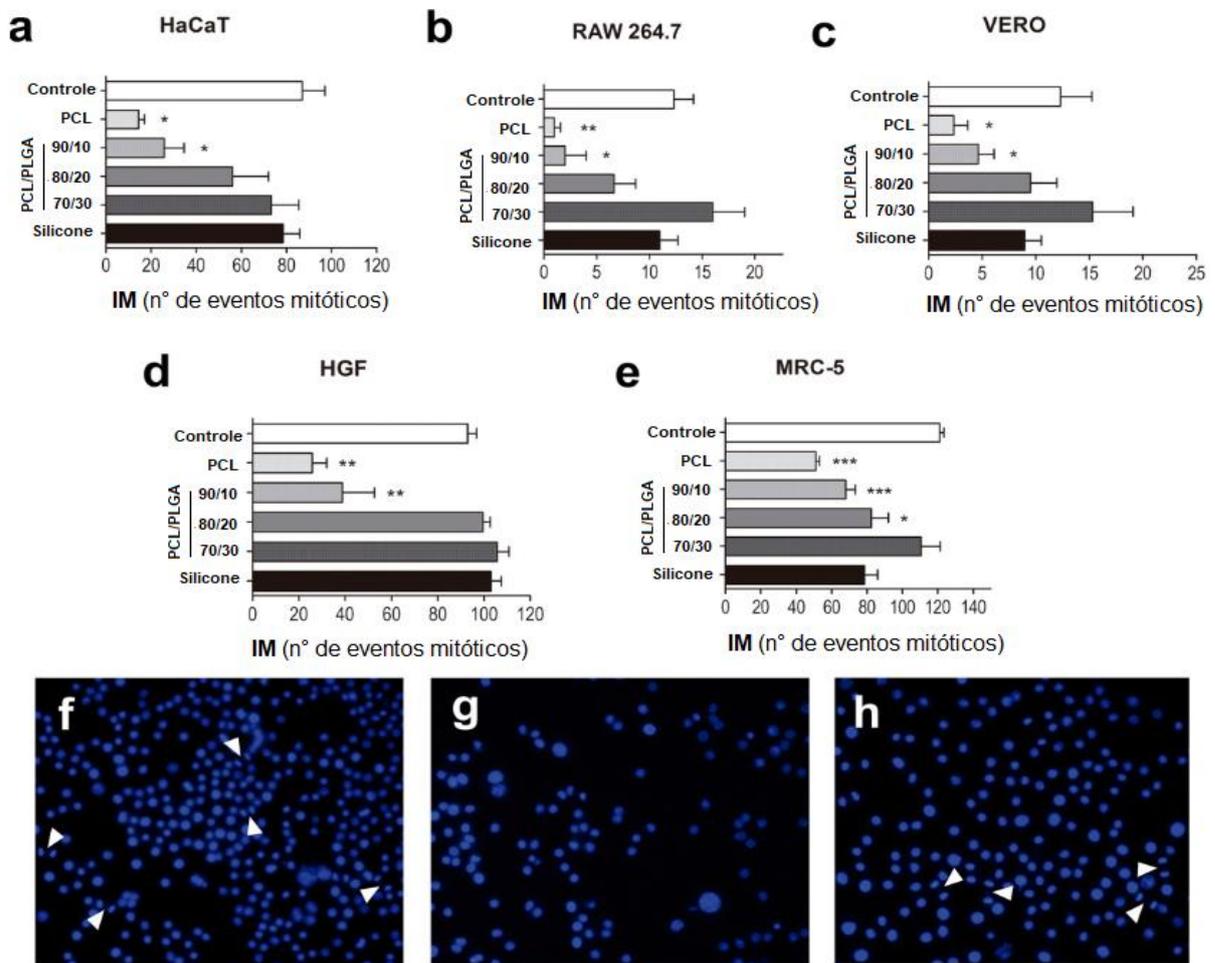


Figura 5.26. Frequência de células mitóticas como parâmetro de proliferação celular após 24 h de incubação com filmes lisos. O índice mitótico foi estabelecido para linhagens celulares HaCaT (a), RAW 264.7 (b), VERO (c), HGF (d) e MRC-5 (e). Imagens representativas de células RAW 264.7 mostrando figuras mitóticas (setas brancas) para células em controle (f), PCL (g) e PCL/PLGA (70/30) (h). * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$, *** $p < 0,0001$ versus controle, Análise de Variância Simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste Post hoc de Tukey, ($n = 3$).

5.2.1.3. Viabilidade e Adesão Celular por FDA/PI

Os ensaios de viabilidade usando FDA com PI presupoem que células vivas (verdes) são células viáveis com robusta atividade de esterase no citoplasma e as células mortas ou danificadas (vermelhas) apresentam pouca ou nenhuma atividade de esterase.[218] A viabilidade e adesão celular das linhagens celulares HGF, MRC-5 e RAW 264.7 com alguns filmes poliméricos lisos estão apresentadas na Figura 5.27, Figura 5.28 e Figura 5.29, respectivamente. Qualitativamente observa-se que todas as linhagens celulares aderiram e cresceram na superfície dos filmes lisos, pois há presença de muitas partículas verdes, as quais representam as células com suas membranas intactas e atividade de esterase, enquanto as partículas vermelhas são representativas de células mortas.

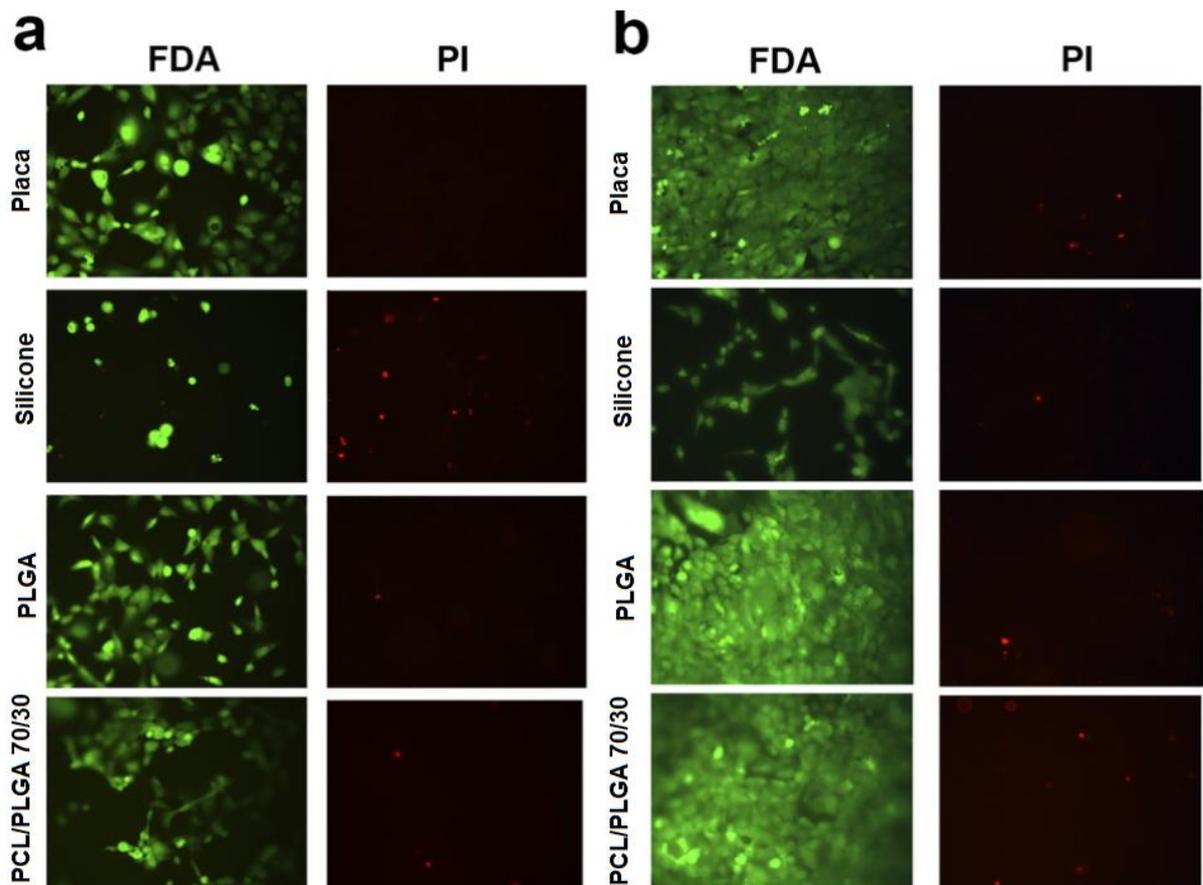


Figura 5.27. Microscopia de fluorescência da viabilidade de células de fibroblastos (linhagem HGF). Imagens de células vivas (verdes) e mortas (vermelhas) cultivadas em placa de cultura de tecidos, silicone, filmes lisos de PLGA puro e da blenda PCL/PLGA 70/30, após 24 h (a) e 72 h (b).

Ampliação original x 100.

Nota-se uma viabilidade celular aumentada para as células HGF (Fig. 5.27b) e RAW 264.7 (Fig. 5.29b) no tempo de 72 h, o que representa uma boa sobrevivência das células quando em contato com os filmes lisos, especialmente para a blenda de PCL/PLGA (70/30). Observa-se uma adesão celular similar entre o PLGA e a blenda PCL/PLGA (70/30) para todas as linhagens, tal comportamento é mais uma evidência que a alta rugosidade superficial é capaz de favorecer a proliferação celular.[19,217] Há hipótese para o comportamento similar de adesão celular notado entre os filmes de PLGA e a blenda 70/30, pode ser atribuído aos valores altos e similares de rugosidade superficial que tais filmes apresentaram, os quais foram evidenciados por AFM neste estudo. O aumento da rugosidade implica em mais proteínas adsorvidas nas superfícies dos biomateriais.[210] Esta hipótese explica o aumento da capacidade dos fibroblastos e macrófagos em aderir nos filmes lisos de PLGA puro e da blenda PCL/PLGA (70/30), como observado pelos resultados de microscopia de fluorescência (Fig. 5.27, Fig. 5.28 e Fig. 5.29).

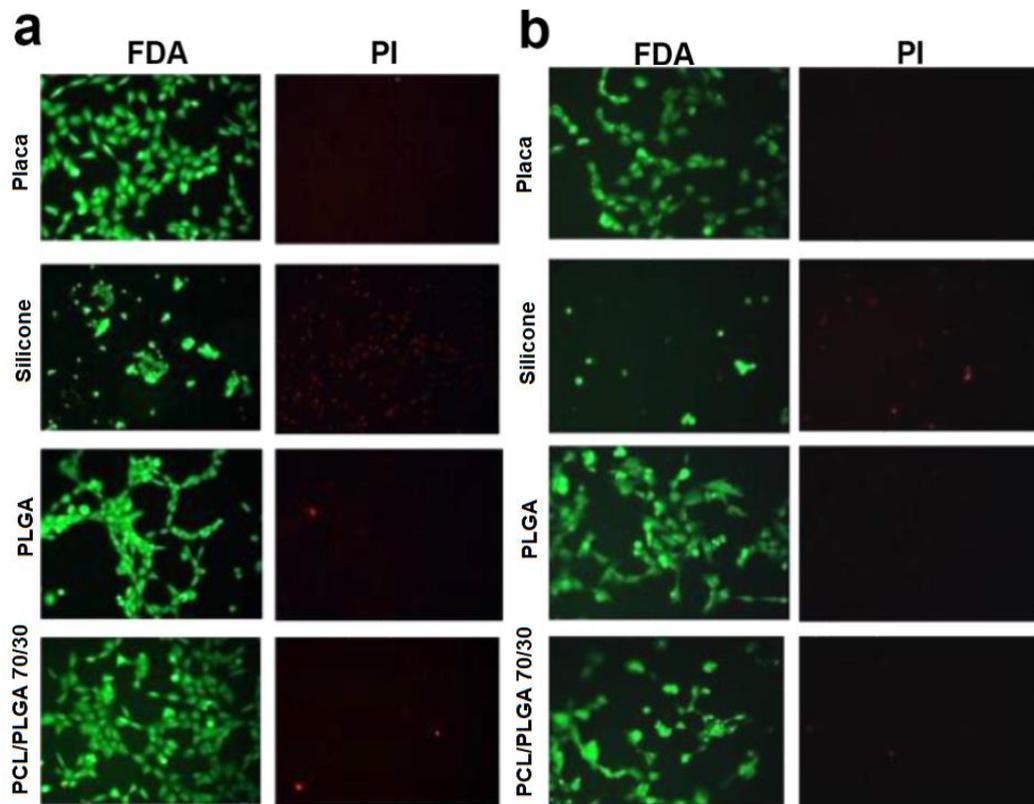


Figura 5.28. Microscopia de fluorescência da viabilidade de células de fibroblastos (linhagem MRC-5). Imagens de células vivas (verdes) e mortas (vermelhas) cultivadas em placa de cultura de tecidos, silicone, filmes lisos de PLGA puro e da blenda PCL/PLGA 70/30, após 24 h (a) e 72 h (b).

Ampliação original $\times 100$.

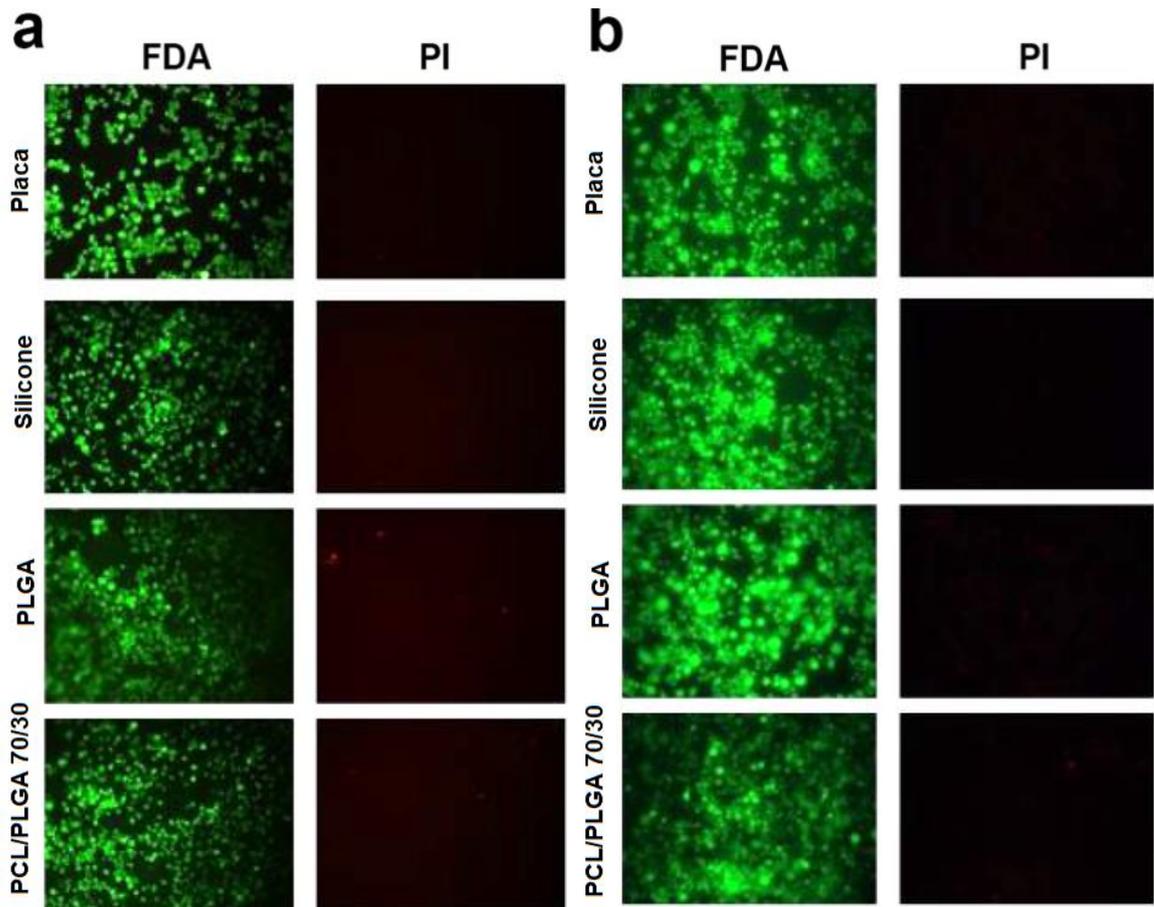


Figura 5.29. Microscopia de fluorescência da viabilidade de macrófagos (linhagem RAW 264.7). Imagens de células vivas (verdes) e mortas (vermelhas) cultivadas em placa de cultura de tecidos, silicone, filmes lisos de PLGA puro e da blenda PCL/PLGA 70/30, após 24 h (a) e 72 h (b).

Ampliação original $\times 100$.

5.2.1.4. Morfologia e Propagação Celular

A Figura 5.30 ilustra a morfológica e a adesão celular por MEV-FEG. As imagens do MEV-FEG mostraram que os fibroblastos aderiram na superfície dos filmes lisos de PLGA após 24h e permaneceram ligados por pelo menos 72 h (Fig. 5.30). Em contraste, os filmes lisos de PCL não permitiram uma fixação muito eficiente de fibroblastos, como evidenciado pela imagem de MEV-FEG (Fig. 5.30). A adição de PLGA na matriz de PCL para a blenda de PCL/PLGA (70/30) restaurou a capacidade de adesão e propagação dos fibroblastos (Fig. 5.30).

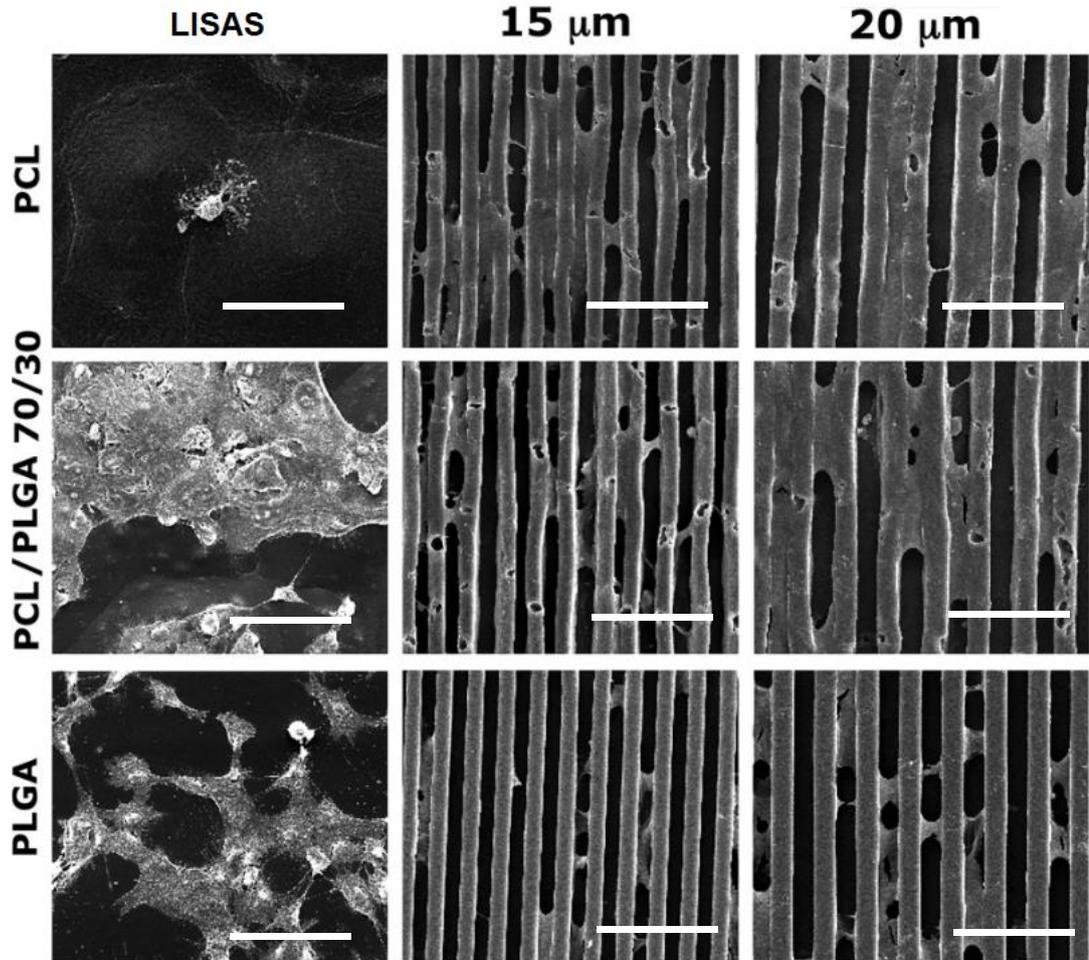


Figura 5.30. Imagens de MEV-FEG das células HGF nos filmes lisos e microestruturados (15 μm e 20 μm) que permaneceram aderidas nos filmes de PCL, PLGA e PCL/PLGA (70/30) após 72 horas.

Magnificação original $\times 1000$; barra de escala: 100 μm .

As células MRC-5 e RAW 264.7 também foram capazes de aderir a todos os grupos dos filmes lisos (dados não apresentados), também apresentando adesão celular favorecida para a blenda 70/30. Os resultados com os filmes microestruturados mostraram os fibroblastos no interior das ranhuras e ligados a ambos os lados das paredes dos canais de 15 e 20 μm de largura. A morfologia dos fibroblastos não mostrou diferenças aparentes entre os grupos dos filmes lisos e microestruturados avaliados (Fig. 5.30). A rugosidade elevada é a hipótese que explica o aumento da capacidade dos fibroblastos em aderir nos filmes lisos de PLGA e na blenda de PCL/PLGA (70/30), como observado pelos resultados de MEV-FEG (Fig. 5.30) e microscopia de fluorescência (Fig. 5.27a, Fig. 5.28a e Fig. 5.29a).

5.2.1.5. Adesão e Orientação Celular

Para verificar a interação física entre os filmes da blenda PCL/PLGA (70/30) e as células, a orientação das células em filmes microestruturados em canais paralelos foi medida. Após 72 h, as células HGF e MRC-5 foram fixadas à superfície do filme, alongadas e dispostas nos filmes ao longo da superfície com os canais de 15 e 20 μm , conforme imagens na Figura 5.31. A quantificação da orientação celular foi realizada em células vivas (verdes) coradas com FDA. Todos os grupos dos filmes microestruturados apresentaram valores de orientação que diferem significativamente da placa de cultura de tecidos aleatória usada como controle (Fig. 5.31m – 5.31p). Ambas as linhagens celulares apresentaram altos índices de orientação para o grupo PLGA com canais de 15 μm ($0,963 \pm 0,02$ para HGF e $0,981 \pm 0,004$ para MRC - 5) e com canais de 20 μm ($0,96 \pm 0,006$ para HGF e $0,97 \pm 0,01$ para MRC - 5).

O Índice S para a blenda PCL/PGLA (70/30) com canais de 15 μm foi de $0,95 \pm 0,01$ e $0,93 \pm 0,01$ para HGF e MRC-5, respectivamente, e para 20 μm foi de $0,92 \pm 0,01$ e $0,92 \pm 0,01$ para HGF e MRC-5, indicando que essa blenda preserva a capacidade de orientação das células em comparação com o PLGA (Fig. 5.31o e 5.31p). O grupo PCL apresentou índices S para os canais de 15 μm ($0,84 \pm 0,03$ para HGF e $0,81 \pm 0,02$ para MRC-5) e 20 μm ($0,82 \pm 0,004$ para HGF e $0,84 \pm 0,01$ para MRC-5) significativamente menores em comparação com os outros grupos dos filmes com microestruturas (Fig. 5.31o e 5.31p).

Orientações aleatórias foram observadas para as células cultivadas na placa de cultura de tecidos ($0,32 \pm 0,04$ para HGF e $0,35 \pm 0,06$ para MRC-5) (Fig. 5.31m – 5.31p). Não foram observadas diferenças de valores de orientação celular entre 15 e 20 μm , dentro de cada grupo.

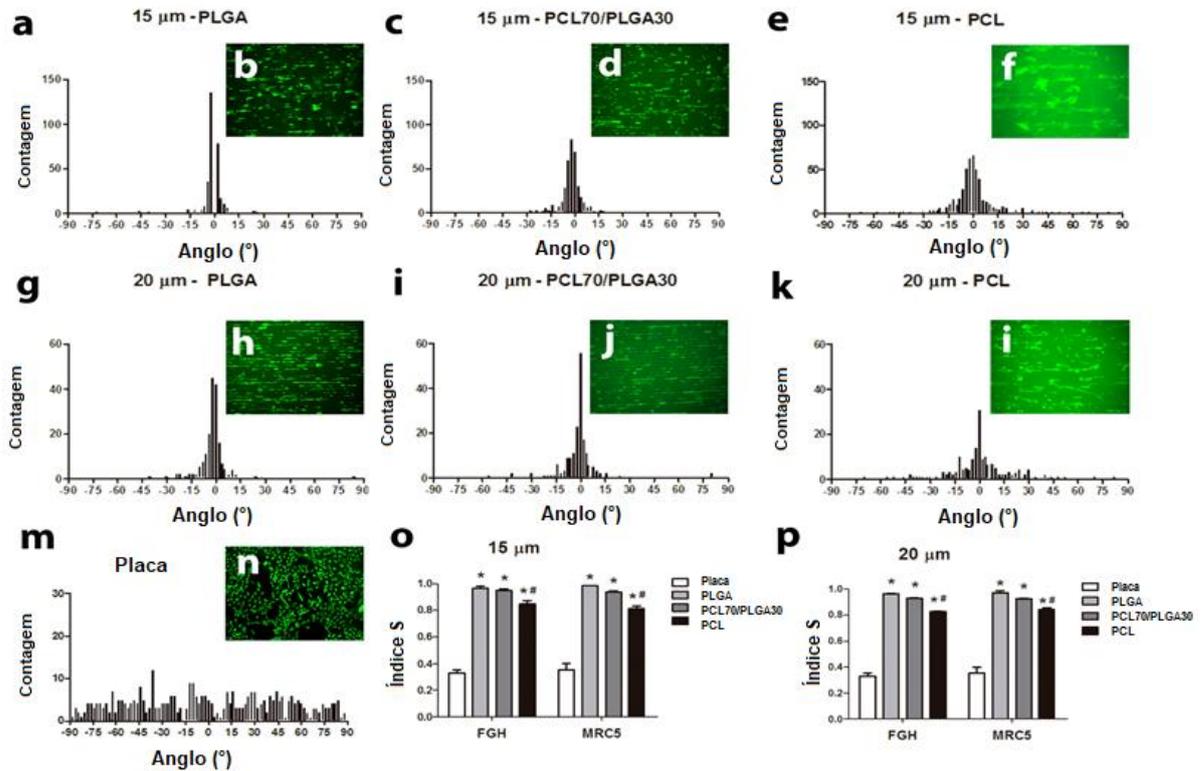


Figura 5.31. Morfologia celular e orientação em filmes microestruturados (canais de 15 e 20 μm). Os fibroblastos foram cultivados por 3 dias em PGLA puro (a, b, g, h), PCL70 / PLGA30 (c, d, i, j), PCL puro (e, f, k, l) e na placa de cultura de tecido (m n). Os desvios angulares (a, c, e, g, i, k, m) e a respectiva morfologia após coloração com FDA (b, d, f, h, j, i, n) foram traçados para cada grupo. O índice S foi comparado entre os grupos para células HGF e MRC-5 (15 μm) (o) e (20 μm) (p). Ampliação original $\times 100$. * $p < 0,05$ versus placa e # $p < 0,05$ versus PLGA puro e PCL70 / PLGA30, Análise de Variância Simples (One-way ANOVA) seguido pelo teste Post hoc de Tukey, ($n = 3$).

Para avaliar a capacidade das células nervosas de aderirem e se orientarem nos filmes microestruturados, foi realizado o experimento com células isoladas dos gânglios da raiz dorsal (DRG). Após 72 h, foi possível observar que todos os filmes promoveram a orientação e o crescimento de axônios em regeneração em comparação com células cultivadas em lamínulas de vidro, que apresentaram crescimento axonal aleatório (Figura 5.32). Nenhuma diferença aparente foi observada na orientação axonal dos neurônios entre os canais 15 e 20 μm .

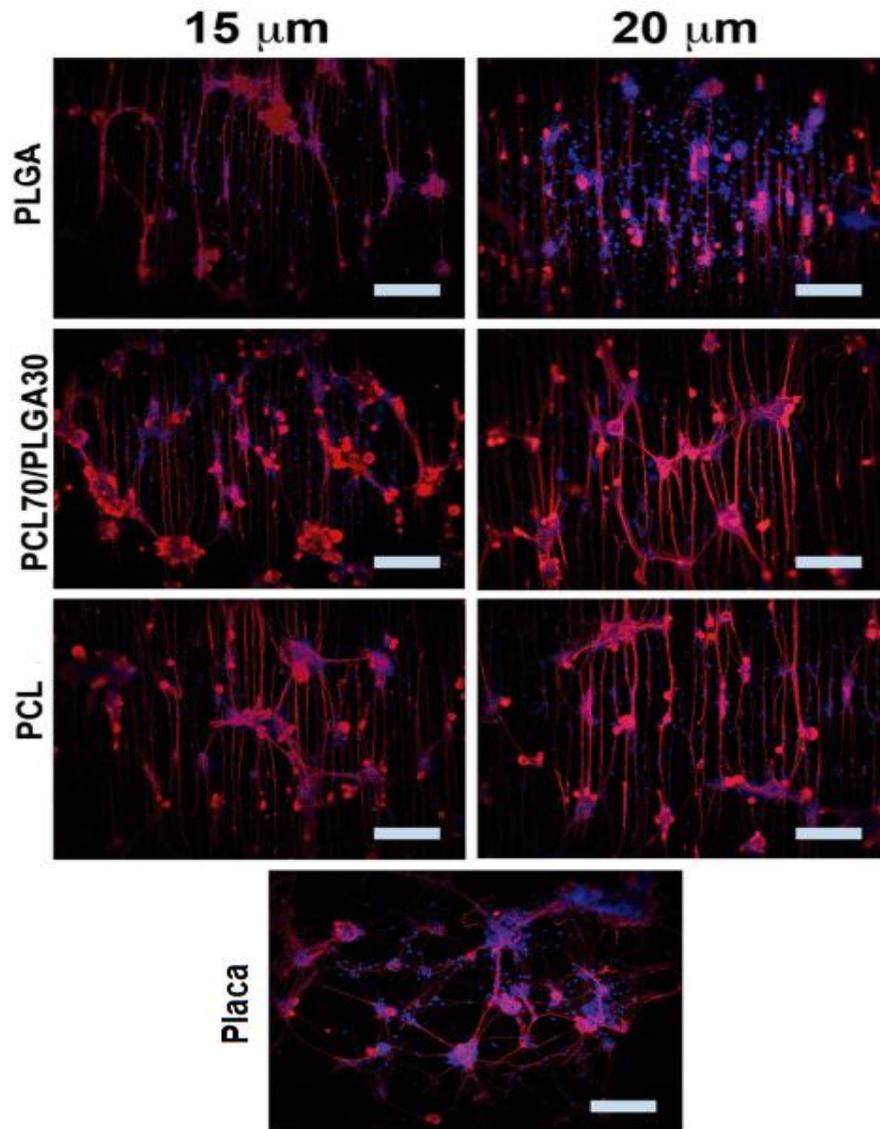


Figura 5.32. Imagens da morfologia celular e orientação de neurônios derivados de β - tubulina - III positivos para gânglios da raiz dorsal crescendo em filmes microestruturados de 15 e 20 μm . As células DRG foram cultivadas por 3 dias com os filmes microestruturados de PLGA, PCL/ PLGA (70/30) e PCL e lamínulas de vidro (usadas como controle). Ampliação original $\times 1000$; barra de escala: 200 μm .

É relatado que a taxa média de regeneração axonal em humanos varia de 1 a 2 mm por dia. Portanto, blendas poliméricas são boas escolhas para a produção de novos suportes para aplicações médicas, principalmente, dedicados a processos regenerativos de longo prazo. Uma das vantagens de se trabalhar com blendas é a possibilidade de modular o tempo de degradação pela combinação de diferentes polímeros. Considerando que o tempo para a completa regeneração nervosa

depende da complexidade das lesões, os polímeros isolados e as blendas biodegradáveis propostos nesta etapa do estudo são candidatos interessantes para casos em que o processo regenerativo é lento.[219,220] O processo natural de regeneração nervosa envolve a desmielinização e proliferação de células de Schwann no local da lesão, como um componente da degeneração walleriana. Essas células se alinham longitudinalmente à direção de crescimento do axônio e formam as bandas de Büngner que são responsáveis pela orientação dos neurônios.[74]

Estudos anteriores mostraram que as células respondem a características topográficas da superfície.[35–37,74,76] A introdução de ranhuras/canais nas superfícies dos filmes tem sido eficientemente usada para melhorar o direcionamento das células.[35,36,74,76,205] A orientação celular foi observada para neurônios DRG em filmes de PDLA microestruturados e com a cocultura de células de Schwann melhorou o crescimento e a orientação das neurites.[36,37] Resultados semelhantes foram observados para glioma e células de Schwann em filmes microestruturados de quitosana/PLA na proporção de 1:10 [35] e em filmes revestidos com laminina.[74,76] A largura e a profundidade dos canais também influenciam a orientação e o alinhamento do destino da célula.[30,74,76,221] Neste trabalho, foram produzidos canais de largura de 15 e 20 μm , e ambos foram capazes de promover a orientação das células, corroborando os resultados encontrados neste estudo com outros estudos. Outros tipos celulares também se tornaram orientados em filmes com microtopografias, como as células-tronco mesenquimais de ratos diferenciadas para células de Schwann [222] e células precursoras musculares.[223]

Foi utilizado uma população heterogênea de neurônios, células satélites e células de Schwann isoladas do DRG para cultura nos filmes microestruturados. Os resultados semelhantes observados entre os filmes de PCL, PLGA e PCL/PLGA (70/30) na promoção da adesão celular e do crescimento axonal podem ser explicados pelo revestimento de superfície com Geltrex. Apesar disso, independentemente da composição polimérica, as pistas topográficas dos canais promoveram eficientemente a orientação axonal das células neuronais,

corroborando os resultados obtidos para os fibroblastos (Fig. 5.31). Devido a boa biocompatibilidade dos filmes baseados na blenda PCL/PLGA (70/30), sem e com microtopografia padronizada, e da sua elevada rugosidade superficial, esta composição foi escolhida como a melhor matriz biodegradável e biocompatível para a produção dos filmes nanocompósitos na terceira etapa deste trabalho.

5.2.2. Conclusão Parcial – Filmes sem e com microtopografia padronizada

Filmes de PCL, PLGA e das blendas de PCL/PLGA foram obtidos com sucesso sem e com microtopografia padronizada de canais longitudinais, utilizando-se da técnica de evaporação de solvente. Todos os filmes poliméricos lisos apresentaram molhabilidade favorável, indicando superfícies com características hidrofílicas. Por MEV-FEG observou-se a presença de micro e nanoesferas de PLGA nas superfícies das blendas e quanto maior foi sua porcentagem na matriz, mais evidentes ficavam as estruturas esféricas do PLGA. A literatura sugere que a formação das esferas ocorreu devido à imiscibilidade dos polímeros envolvidos. Por AFM verificou-se que a blenda 70/30 de PCL/PLGA foi a mistura que originou o filme com maior valor de rugosidade superficial, isto também atribuído à imiscibilidade dos polímeros entre si. Obteve-se com sucesso filmes de PCL, PLGA e blendas de PCL/PLGA com microtopografias padronizadas com valores de tamanho e estrutura bem próximos ao molde planejado (canais longitudinais de 5, 10, 15 e 20 μm). Quase todos os filmes microestruturados dos grupos de 15 e 20 μm indicaram hidrofiliabilidade superficial favorável (WCA menores que 90°), apenas aqueles constituídos de PLGA apresentaram valores de WCA superiores a 100° . Através das análises de MEV-FEG e AFM foi possível evidenciar a imiscibilidade dos polímeros, pois o PLGA se organizou como domínios aleatórios de micro e nanoesferas na matriz majoritária de PCL. Devido as evidências da literatura que indicam que são os materiais com mudanças bruscas na topologia que mais influenciam nos resultados de ângulos de contato e respostas celulares[201], que a blenda 70/30 é sugerida como a melhor matriz deste estudo, a qual apresentou características de rugosidade superficiais elevadas e quando confeccionada com microestruturação padronizada teve sua superfície amplamente alterada.

PCL puro foi o filme que mais apresentou efeito citotóxico com todos as linhagens celulares avaliadas, seguido da blenda de PCL/PLGA 90/10. Os resultados obtidos indicaram que a incorporação do PLGA aumentou a compatibilidade biológica e a rugosidade superficial dos filmes de PCL/PLGA foi correlacionada com o aumento da viabilidade e fixação das células nos ensaios biológicos para as blendas 80/20 e 70/30 (PCL/PLGA), especialmente a 70/30. Os filmes microestruturados da blenda 70/30 promoveram a orientação dos fibroblastos semelhante ao PLGA puro e melhor que o PCL puro, e não houve diferença óbvia na orientação das células entre o filme da blenda 70/30 microestruturado com microcanais de 15 e 20 μm e os filmes puros microestruturados. Além disso, os dados indicaram um perfil de biocompatibilidade dos filmes da blenda de PCL/PLGA (70/30) para promoverem o crescimento, proliferação e orientação celular da célula DRG quando aplicados com microcanais padronizados. A microestrutura na superfície do filme pode ser usada como uma opção adicional para potencializar a produção de suportes, condutos guias ou outros dispositivos, a fim de guiar e orientar o desenvolvimento das células.

5.3. Caracterização da superfície dos filmes nanocompósitos poliméricos híbridos sem e com microtopografia padronizada

As nanocargas híbridas PPy/OGR-10% e PPy/OGR-20% obtidas pelo método 3, e a nanocarga PPy/Ag-10% que apresentaram bons resultados para condutividade elétrica e biocompatibilidade *in vitro*, e devido a isto, foram escolhidas para a preparação dos filmes nanocompósitos lisos via evaporação de solvente nesta última etapa. A fim de comparação também foram preparados filmes com as nanocargas controle: o PPy sem OGR obtido pelo método 3 e com o PPy sem Ag (filmes controles), bem como um filme liso apenas da blenda PCL/PLGA (70/30) sem carga. Lembrando que a matriz polimérica escolhida para esta etapa foi somente a blenda PCL/PLGA (70/30), matriz mais biocompatível deste estudo conforme resultados apresentados no item 5.2 deste trabalho.

A Figura 5.33 ilustra imagens do aspecto visual dos filmes nanocompósitos obtidos na placa petri (filmes lisos). Observa-se que os filmes apresentam uma

coloração preta, devido a adição da nanocarga para todos os grupos preparados. Visualmente a nanocarga PPy/OGR 10%, seguida da PPy/OGR 20% e PPy MET 3 apresentou melhor dispersão na matriz de PCL/PLGA. No grupo Prata, visualmente não houve diferença significativa na dispersão das nanocargas. O grupo das nanocargas com OGR apresentaram uma melhor dispersão com relação ao grupo das nanocargas com Prata.

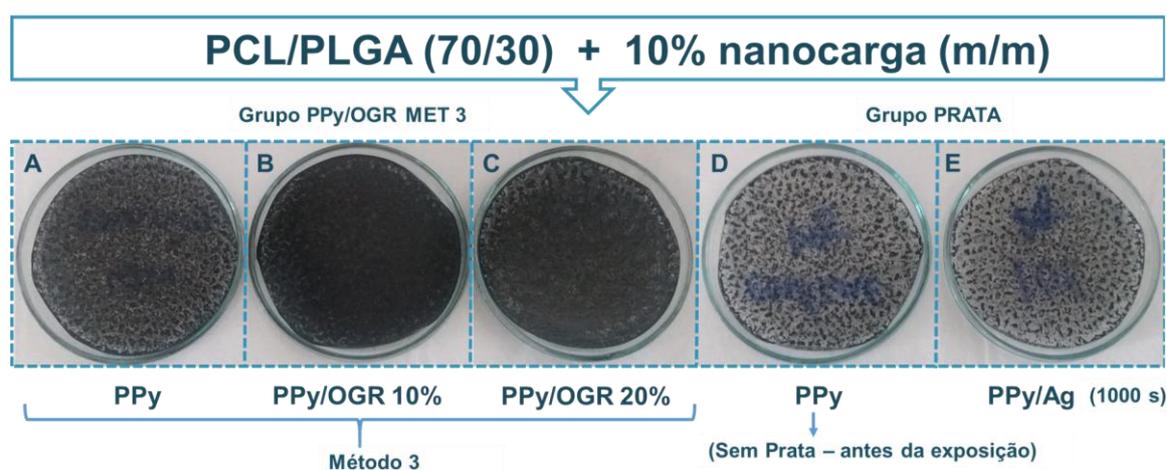


Figura 5.33. Aspecto visual dos filmes nanocompósitos lisos de PCL/PLGA (70/30) com 10% (m/m) de nanocarga híbrida: A) de PPy (controle do MET3), B) de PPy/OGR 10% (MET3), C) de PPy/OGR 20% (MET3), D) de PPy (controle - sem Ag), e E) de PPy/Ag (1000 s).

As diferentes respostas observadas para a dispersão das nanocargas na matriz polimérica podem ser atribuídas as interações intermoleculares que os polímeros conseguem estabelecer entre si, as quais estabelecem e controlam a eficiência da dispersão.[224] A Figura 5.34 mostra a provável interação intermolecular que ocorre entre o PPy e a matriz de PCL/PLGA através de ligações de hidrogenio entre a carbonila dos grupos esteres do PCL e PLGA com o grupo – N- do PPy. [224] A presença do OGR sugere favorecer as interações intermoleculares da nanocarga híbrida com a matriz de PCL/PLGA, pois o grupo apresentou melhor dispersão na matriz.

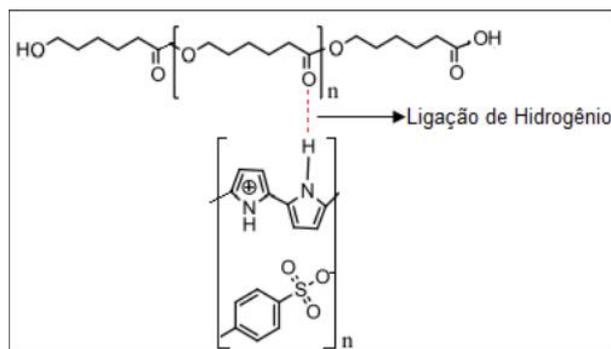


Figura 5.34. Interação intermolecular por ligação de Hidrogênio entre a carbonila do PCL e o grupo –NH– do PPy. Fonte: [224]

A Figura 5.35 apresenta as imagens de MEV-FEG das superfícies dos filmes nanocompósitos obtidos sem microestruturação (lisos). Na blenda de PCL/PLGA observam-se domínios esféricos ocios de PLGA (Fig. 5.35A-B), indicando que estes dois polímeros são imiscíveis entre si. Resultados de imiscibilidade entre esses polímeros já foram discutidos neste trabalho no item 5.2. Observa-se que todas as nanocargas híbridas incorporadas na matriz de PCL/PLGA modificaram significativamente a superfície da mesma (Fig. 5.35C-M). Observa-se micro poros, algumas NPs aglomeradas de PPy cobertas pela matriz e outras nem tanto, como também são vistos micro e nano esferas de PLGA. Ferreira et al (2019)[152] observou mudanças topográficas similares, devido a adição de nanofibras de PPy em matrizes de PCL/PLGA.

A Figura 5.36 mostra as imagens das fraturas dos filmes nanocompósitos. Nas regiões capturadas observam-se micro e nanoesferas de PLGA, indicando que elas também estão presentes no interior da matriz (Fig. 5.35A-B). A adição de PLGA e das nanocargas proporcionou estrutura porosa na parte interna dos filmes (Fig. 5.36D e 5.36I), enquanto outras regiões parecem mais compactas e densas (Fig. 5.36E, 5.36L e 5.36M). Pela análise de MEV-FEG observa-se claramente que as nanocargas modificaram significativamente a superfície e a estrutura interna da matriz de PCL/PLGA. A literatura tem chamado atenção para mudanças bruscas na topologia de biomateriais, as quais são responsáveis por proporcionar efetivas respostas biológicas [201]

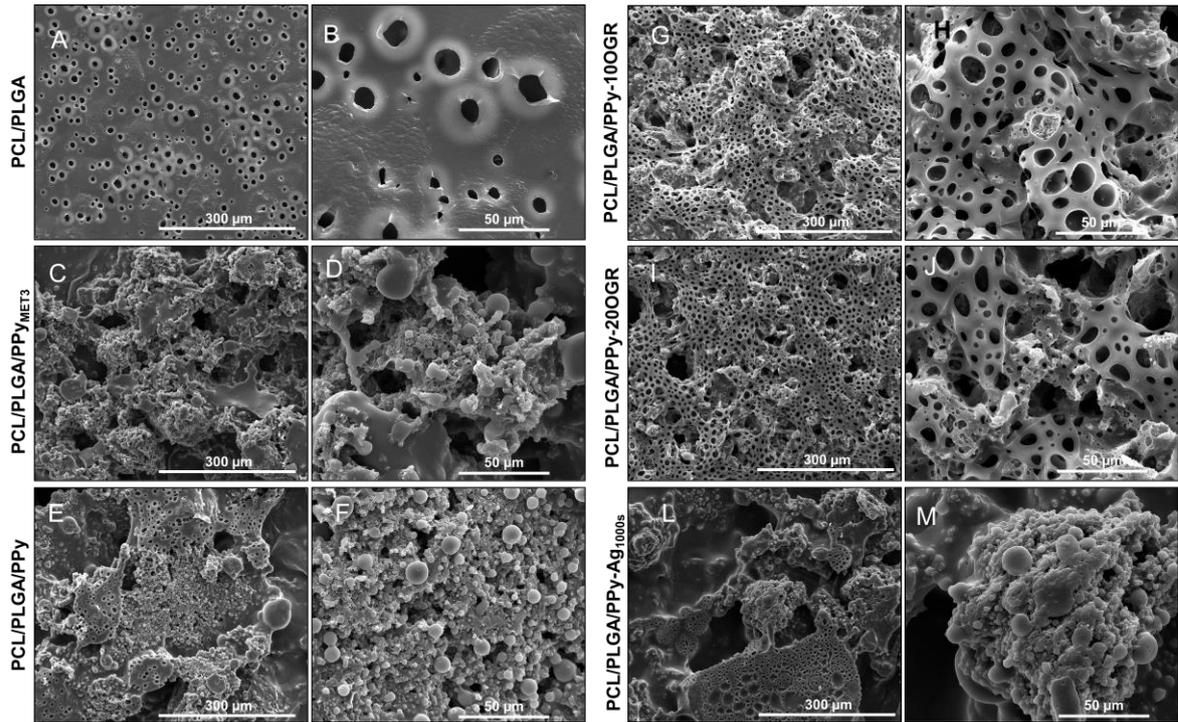


Figura 5.35. Imagens de MEV-FEG dos filmes da blenda PCL/PLGA (70/30) e dos nanocompósitos de PCL/PLGA (70/30) com 10% (m/m) de nanocarga híbrida.

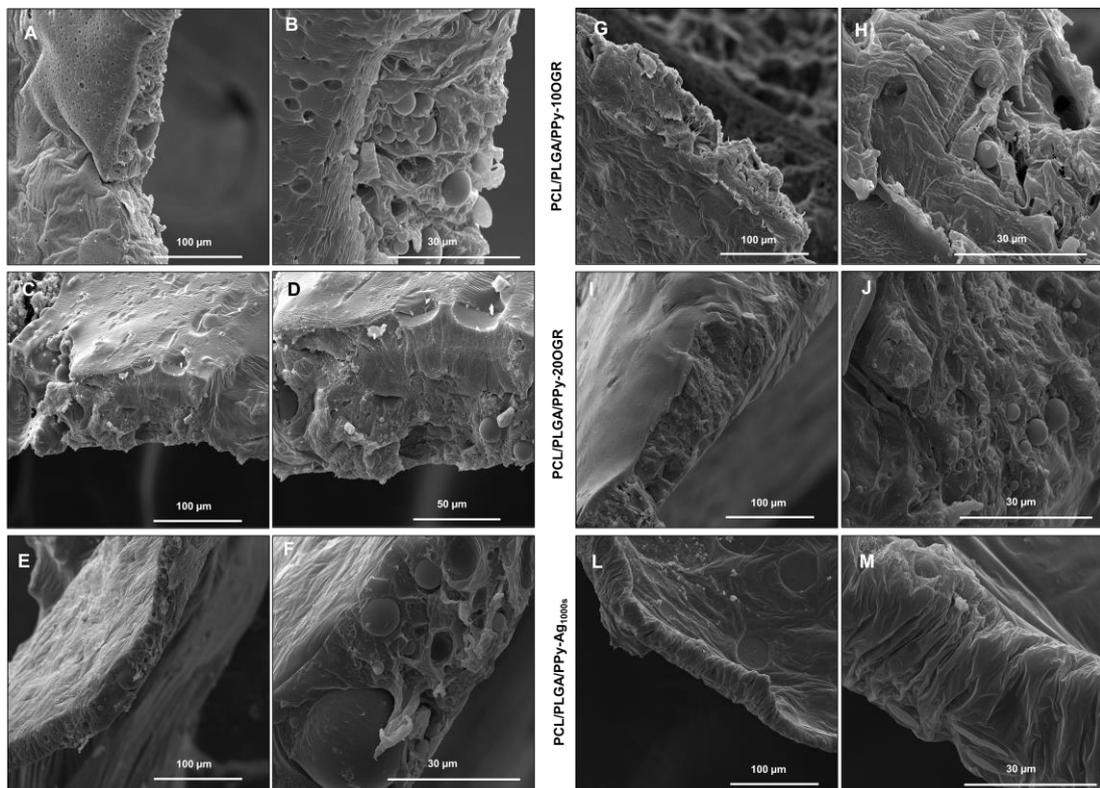


Figura 5.36. Imagens de MEV-FEG das fraturas dos filmes da blenda PCL/PLGA (70/30) e dos nanocompósitos de PCL/PLGA (70/30) com 10% (m/m) de nanocarga híbrida.

A Figura 5.37 apresenta a rugosidade superficial dos filmes nanocompósitos lisos avaliados por AFM. Foi possível observar regiões de imiscibilidade do PLGA na matriz PCL (Fig. 37 – coluna esquerda). Algumas de imagens AFM mostram as regiões com microporos nas superfícies dos filmes (Fig. 37 – coluna direita), característica bem evidenciada por MEV-FEG. Todas as superfícies apresentaram parâmetros de rugosidade similares (Fig. 37 – Gráficos). Sem apresentarem significância estatística, observa-se que há uma tendência para elevar os parâmetros de rugosidade pela adição das nanocargas na matriz de PCL/PLGA (Fig. 37 – Gráficos). Comparando estes resultados com os filmes sem cargas do capítulo anterior (Fig. 23) nota-se que os valores de rugosidade são mais elevados, estando de acordo com as evidências de MEV-FEG e AFM que mudanças topográficas bruscas foram alcançadas com sucesso pela presença das nanocargas.

A hidrofobicidade da superfície é um fator importante e como já mencionado, pode ser avaliada medindo-se o ângulo de contato de gotas de solventes sob a superfície de interesse.[32] A Figura 5.38 apresenta as imagens das gotas de água formadas na superfície dos filmes nanocompósitos e do gráfico com os valores médios do ângulo de contato.

Todos os filmes nanocompósitos lisos indicaram hidrofiliabilidade favorável e exibiram os seguintes ângulos de contato com a água: $79,5^\circ \pm 2,1^\circ$ (PCL/PLGA 70:30); $81,4^\circ \pm 3,7^\circ$ (PCL/PLGA/PPy-MET3); $78,6^\circ \pm 2,6^\circ$ (PCL/PLGA/PPy-10OGR); $76,7^\circ \pm 1,5^\circ$ (PCL/PLGA/PPy-20OGR); $69,9^\circ \pm 6,9^\circ$ (PCL/PLGA/PPy) e $72,9^\circ \pm 3,8^\circ$ (PCL/PLGA/PPy-Ag 1000 s). Os valores de ângulo de contato dos compósitos com o PPy (controle da Ag) e PPy/Ag (1000 s) apresentaram diferença significativa em relação a matriz controle de PCL/PLGA (70/30), sugerindo que a quantidade de PPy do lote utilizada teve efeito na hidrofiliabilidade dos filmes. O ângulo de contato do filme compósito com a nanocarga do lote de PPy do MET 3 foi ligeiramente maior que o filme com PPy de outro lote similar de síntese, sugerindo que o mesmo produto conforme o seu lote de síntese pode provocar suaves modificações conforme seu lote de produção. Todos os filmes nanocompositos lisos podem ser consideradas hidrofílicos, uma vez que ângulo de contato é $< 90^\circ$. [201,205]

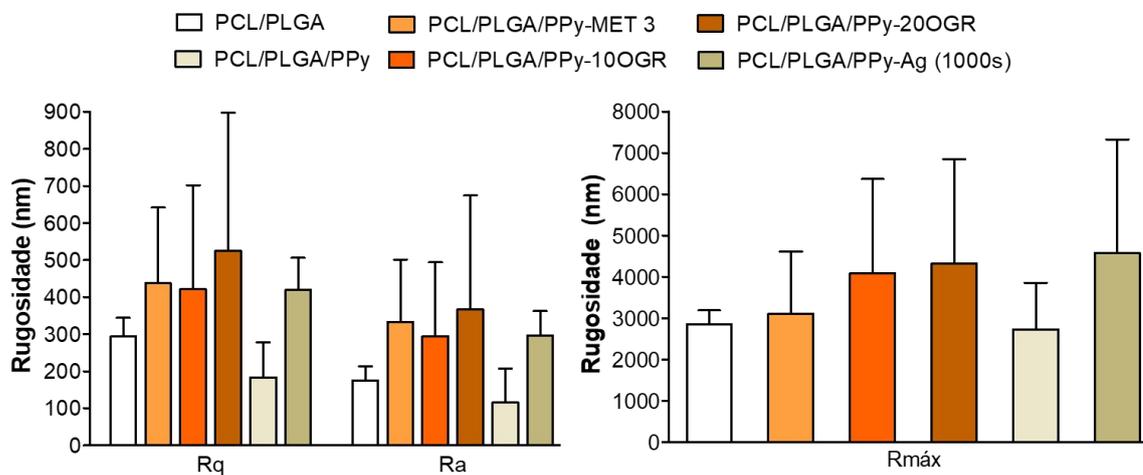
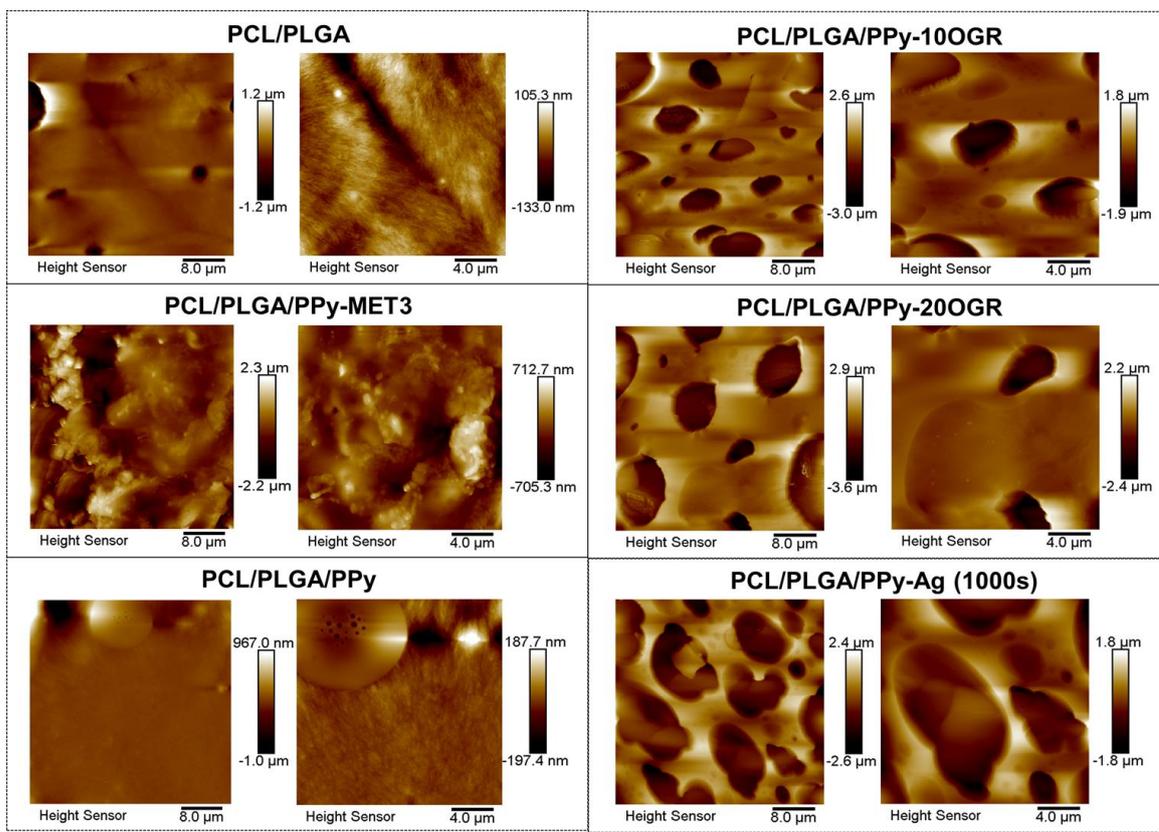


Figura 5.37. Imagens de AFM 2D dos filmes nanocompositos lisos com as nanocargas híbridas em matriz de PCL/PLGA (70/30). Gráficos dos parâmetros Ra, Rq e Rmáx (tamanho de área: 40 e 20 μm^2). Análise feita na superfície que permaneceu em contato com o ar (superfície superior). One-way ANOVA seguido teste Post hoc de Tukey.

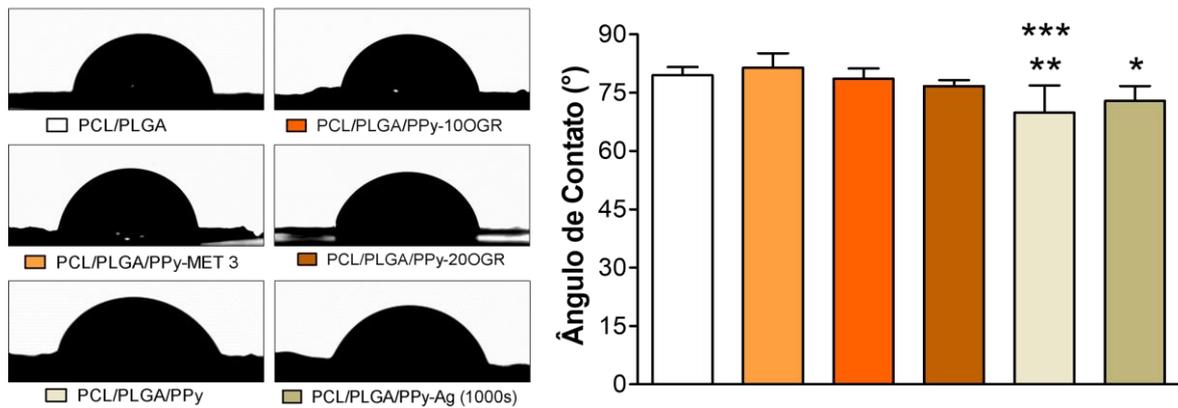


Figura 5.38. Imagens das gotas formadas na superfície dos filmes de PCL/PLGA (70/30) e nanocompósitos. Gráfico com os valores médios do ângulo de contato. Análise feita na superfície do filme que permaneceu em contato com o ar. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ versus PCL/PLGA, *** $p < 0,0001$ versus PCL/PLGA/PPy (MET3), One-way ANOVA seguido do teste post hoc deTukey

A literatura aponta que a morfologia da superfície, rugosidade e a porosidade, características que podem favorecer a retenção de diferentes volumes de ar na interface sólido-água, podem influenciar nas características de hidrofiliabilidade de biomateriais.[207,208] As superfícies por MEV-FEG e AFM se apresentaram bastante similares, consequentemente refletindo em resultados similares também para a molhabilidade superficial.

A Figura 5.39 apresenta a foto e imagens de MEV-FEG do filme nanocompósito com NPs de PPy (síntese padrão). Obteve-se com sucesso as microestruturas esperadas pelo molde padronizado, mesmo com adição da nanocarga. Os canais se mantiveram e não apresentaram diferença significativas quando comparados com os filmes microestruturados sem cargas. Na superfície não se observou as NPs de PPy e na fratura observou-se que elas não entraram nos canais.

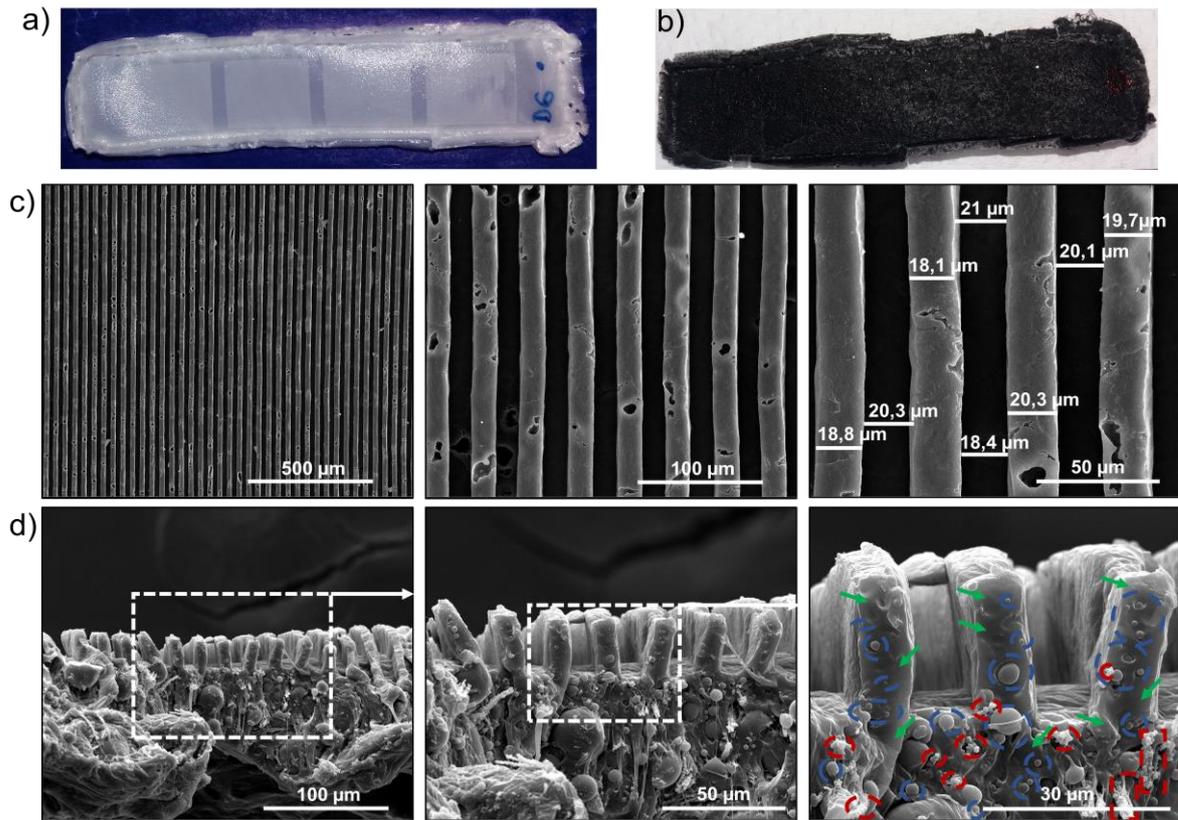


Figura 5.39. Imagem do aspecto visual da blenda de PCL/PLGA (70/30) sem carga confeccionada no molde microestruturado (a). Imagens do aspecto visual (b) e de MEV-FEG (c e d) dos filmes nanocompósitos com 10% (m/m) de nanocarga (PPy – síntese padrão). Imagens da linha (c): região da superfície com canais de 20 μm . Imagens da linha (d): fratura do filme com canais de 10 μm (legenda: setas verdes - região de PCL; pontilhado azul – esferas de PLGA e pontilhado vermelho – NPs de PPy).

5.3.1. Conclusão Parcial - Filmes nanocompósitos poliméricos híbridos sem e com microtopografia padronizada

A adição das nanocargas híbridas proporcionaram filmes de nanocompósitos com características de alta porosidade e rugosidade, com hidrofiliabilidade favorável para aplicações na área médica. As nanocargas com OGR demonstraram ser mais favoráveis no preparo dos filmes, pois apresentaram uma melhor dispersão na matriz polimérica. A adição de NPs nos filmes com microestruturas não alteraram os microcanais padronizados esperados. Ademais, biomateriais com características superficiais diversificadas estão cada vez mais em prospecção no meio científico, pois são promessas de biomateriais mais efetivos.[203,209–214]

6. CONCLUSÃO

Os resultados da obtenção de nanocargas híbridas de PPy com OGR e Ag mostraram-se satisfatórios na forma de pós, e o OGR ou a Ag foram bem incorporados na matriz de PPy. A incorporação do OGR (10 e 20%) na estrutura do PPy pelo método 3 provocou alterações favoráveis, elevando a condutividade elétrica do produto, assim como a formação morfológica de estrutura fibrosa, deste modo favorecendo uma similaridade com a estrutura organizacional dos tecidos biológicos. Já para as nanocargas híbridas de PPy/Ag, a presença da Ag aumentou os valores da condutividade elétrica do nanocompósito com efetivas NPs de Ag (diâmetro médio de 7 nm). Ambas as nanocargas híbridas apresentaram resultados aceitáveis de biocompatibilidade para concentrações de até 200 µg/mL.

Os filmes de PCL, PLGA e blendas de PCL/PLGA obtidos via evaporação de solvente produzidos em diferentes moldes apresentaram morfologias com alta rugosidade em suas superfícies, principalmente para a blenda na proporção 70/30 e para o PLGA puro. Os filmes microestruturados foram obtidos com os tamanhos de canais padronizados, de acordo com os tamanhos pré-definidos do molde. Todos os filmes lisos produzidos apresentaram superfícies com molhabilidade moderada, resultado desejável para materiais biocompatíveis. A blenda 70/30 apresentou melhor perfil de biocompatibilidade com todas as células de mamíferos avaliadas. A blenda com microestruturação aplicada as células de fibroblastos e DRG, além do crescimento e proliferação celular, ocasionou uma orientação celular efetiva.

Os filmes nanocompósitos das blendas de PCL/PLGA (70/30) e as nanocargas híbridas de PPy/OGR (10% e 20% OGR) e PPy/Ag (1000 s) apresentaram superfícies hidrofílicas com morfologia de microporos e alta rugosidade. A adição de nanocarga na confecção de filmes nanocompósitos em molde microestruturado padronizado não alterou as características dos microcanais. Portanto, nanocompósitos baseados em matriz de PCL/PLGA com PPy/OGR ou PPy/Ag, sem ou com microcanais padronizados, são novas alternativas biocompatíveis para aplicação na Engenharia de Tecidos.

7. PROPOSTAS

Avaliação da biocompatibilidade e citotoxicidade *in situ* dos filmes nanocompósitos de PCL/PLGA com nanocargas híbridas sem e com microtopografia padronizada;

Avaliação da atividade antimicrobiana das nanocargas híbridas, bem como dos filmes nanocompósitos de PCL/PLGA com as nanocargas híbridas sem e com microtopografia padronizada;

Avaliação quantitativa por cromatografia das impurezas dos extratos brutos das nanocargas híbridas

Avaliações *in vivo* dos filmes de PCL/PLGA sem e com microestruturação, bem como os nanocompósitos com as nanocargas híbridas sem e com microtopografia padronizada;

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Pires, A.L.R.; Bierhalz, A.C.K.; Moraes, Â.M. BIOMATERIALS: TYPES, APPLICATIONS, AND MARKET. *Química Nova*, v. 17, p.957–71, 2015.
- [2] Lee, E.J.; Kasper, F.K.; Mikos, A.G. Biomaterials for Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 42, p.323–37, 2014.
- [3] Kawachi, E.Y.; Bertran, C.A.; Dos Reis, R.R.; Alves, O.L. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*, v. 23, p.518–22, 2000.
- [4] Rodríguez-Vázquez, M.; Vega-Ruiz, B.; Ramos-Zúñiga, R.; Saldaña-Koppel, D.A.; Quiñones-Olvera, L.F. Chitosan and Its Potential Use as a Scaffold for Tissue Engineering in Regenerative Medicine. *BioMed Research International*, v. 2015, p.1–15, 2015.
- [5] Keane, T.J.; Badylak, S.F. Biomaterials for tissue engineering applications. *Seminars in Pediatric Surgery*, v. 23, p.112–8, 2014.
- [6] Ikada, Y. Challenges in tissue engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 3, p.589–601, 2006.
- [7] Gerzson, A. da S.; Machado, D.C.; da Silva, R.R.; Valente, C.A.; Pagnoncelli, R.M. Assessment of the Viability of NIH3T3 Fibroblast Cells Cultured in Polymer Matrices with rhGH. *Journal of Polymers and the Environment*, v. 26, p.906–12, 2018.
- [8] Hiep, N.T.; Lee, B.T. Electro-spinning of PLGA/PCL blends for tissue engineering and their biocompatibility. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, p.1969–78, 2010.
- [9] Kim, J.Y.; Cho, D.W. Blended PCL/PLGA scaffold fabrication using multi-head deposition system. *Microelectronic Engineering*, v. 86, p.1447–50, 2009.
- [10] Khan, F.; Tanaka, M.; Ahmad, S.R. Fabrication of polymeric biomaterials: a strategy for tissue engineering and medical devices. *Journal of Materials*

- Chemistry B, v. 3, p.8224–49, 2015.
- [11] Hasirci, V.; Arslantunali, D.; Dursun, T.; Yucel, D.; Hasirci, N. Peripheral nerve conduits: technology update. *Medical Devices: Evidence and Research*, v. 7, p.405, 2014.
- [12] Limongi, T.; Tirinato, L.; Pagliari, F.; Giugni, A.; Allione, M.; Perozziello, G.; et al. Fabrication and Applications of Micro/Nanostructured Devices for Tissue Engineering. *Nano-Micro Letters*, v. 9, p.1–13, 2017.
- [13] Béduer, A.; Vieu, C.; Arnauduc, F.; Sol, J.C.; Loubinoux, I.; Vaysse, L. Engineering of adult human neural stem cells differentiation through surface micropatterning. *Biomaterials*, v. 33, p.504–14, 2012.
- [14] 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.4264–76, 2012.
- [15] Sheikh, F.A.; Ju, H.W.; Moon, B.M.; Lee, O.J.; Kim, J.-H.; Park, H.J.; et al. Hybrid scaffolds based on PLGA and silk for bone tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 10, p.209–21, 2016.
- [16] Ju, H.W.; Sheikh, F.A.; Moon, B.M.; Park, H.J.; Lee, O.J.; Kim, J.H.; et al. Fabrication of poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds containing silk fibroin scaffolds for tissue engineering applications. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 102, p.2713–24, 2014.
- [17] Leung, V.; Ko, F. Biomedical applications of nanofibers. *Polymers for Advanced Technologies*, v. 22, p.350–65, 2011.
- [18] 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.1033–42, 2009.
- [19] Balint, R.; Cassidy, N.J.; Cartmell, S.H. Conductive polymers: towards a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta biomaterialia*, v. 10, p.2341–53, 2014.
- [20] Guimard, N.K.; Gomez, N.; Schmidt, C.E. Conducting polymers in biomedical engineering. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 32, p.876–921, 2007.
- [21] Stirke, A.; Apetrei, R.M.; Kirsnyte, M.; Dedelaite, L.; Bondarenka, V.; Jasulaitiene, V.; et al. Synthesis of polypyrrole microspheres by *Streptomyces* spp. *Polymer*, v. 84, p.99–106, 2016.

- [22] 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.741–52, 2006.
- [23] Zagho, M.M.; Hussein, E.A.; Elzatahry, A.A. Recent overviews in functional polymer composites for biomedical applications. *Polymers*, v. 10, 2018.
- [24] Ege, D.; Kamali, A.R.; Boccaccini, A.R. Graphene Oxide/Polymer-Based Biomaterials. *Advanced Engineering Materials*, v. 19, p.16–34, 2017.
- [25] Johnsen, G.K.; Knaapila, M.; Martinsen, G.; Helgesen, G. Conductivity enhancement of silver filled polymer composites through electric field alignment. *Composites Science and Technology*, v. 72, p.1841–7, 2012.
- [26] Bober, P.; Liu, J.; Mikkonen, K.S.; Ihalainen, P.; Pesonen, M.; Plumed-Ferrer, C.; et al. Biocomposites of Nanofibrillated cellulose, polypyrrole, and silver nanoparticles with electroconductive and antimicrobial properties. *Biomacromolecules*, v. 15, p.3655–63, 2014.
- [27] Chernousova, S.; Epple, M. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 52, p.1636–53, 2013.
- [28] Morones, J.R.; Elechiguerra, J.L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J.B.; Ramírez, J.T.; et al. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, v. 16, p.2346–53, 2005.
- [29] Simitzi, C.; Ranella, A.; Stratakis, E. Controlling the morphology and outgrowth of nerve and neuroglial cells: The effect of surface topography. *Acta Biomaterialia*, v. 51, p.21–52, 2017.
- [30] Mobasser, A.; Faroni, A.; Minogue, B.M.; Downes, S.; Terenghi, G.; Reid, A.J. Polymer Scaffolds with Preferential Parallel Grooves Enhance Nerve Regeneration. *Tissue Engineering Part A*, v. 21, p.1152–62, 2015.
- [31] Shen, H.; Zhang, L.; Liu, M.; Zhang, Z. Biomedical applications of graphene. *Theranostics*, v. 2, p.283–94, 2012.
- [32] Yang, J.; Wan, Y.; Tu, C.; Cai, Q.; Bei, J.; Wang, S. Enhancing the cell affinity of macroporous poly(L-lactide) cell scaffold by a convenient surface modification method. *Polymer International*, v. 52, p.1892–9, 2003.
- [33] Cui, L.; Li, J.; Long, Y.; Hu, M.; Li, J.; Lei, Z.; et al. Vascularization of LBL

- structured nanofibrous matrices with endothelial cells for tissue regeneration. *RSC Advances*, v. 7, p.11462–77, 2017.
- [34] Faroni, A.; Mobasser, S.A.; Kingham, P.J.; Reid, A.J. Peripheral nerve regeneration: Experimental strategies and future perspectives. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 82, p.160–7, 2015.
- [35] Hsu, S.H.; Lu, P.S.; Ni, H.C.; Su, C.H. Fabrication and evaluation of microgrooved polymers as peripheral nerve conduits. *Biomedical Microdevices*, v. 9, p.665–74, 2007.
- [36] Miller, C.; Shanks, H.; Witt, A.; Rutkowski, G.; Mallapragada, S. Oriented Schwann cell growth on micropatterned biodegradable polymer substrates. *Biomaterials*, v. 22, p.1263–9, 2001.
- [37] Miller, C.; Jętkin, S.; Mallapragada, S. Micropatterned Schwann Cell–Seeded Biodegradable Polymer Substrates Significantly Enhance Neurite Alignment and Outgrowth. *Tissue Engineering*, v. 7, p.705–15, 2001.
- [38] O’Brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*, v. 14, p.88–95, 2011.
- [39] Barbanti, S.H.; Zavaglia, C.A.C.; Duek, E.A.R. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polímeros*, v. 15, p.13–21, 2005.
- [40] Reddy, S.; Xu, X.; Guo, T.; Zhu, R.; He, L.; Ramakrishna, S. Allotropic carbon (graphene oxide and reduced graphene oxide) based biomaterials for neural regeneration. *Current Opinion in Biomedical Engineering*, v. 6, p.120–9, 2018.
- [41] Gupta, B.; Revagade, N.; Hilborn, J. Poly(lactic acid) fiber: An overview. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 32, p.455–82, 2007.
- [42] Martino, S.; D’Angelo, F.; Armentano, I.; Kenny, J.M.; Orlicchio, A. Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine. *Biotechnology Advances*, v. 30, p.338–51, 2012.
- [43] Edwards, S.L.; Mitchell, W.; Matthews, J.B.; Ingham, E.; Russell, S.J. Design of nonwoven scaffold structures for tissue engineering of the anterior cruciate ligament. *Autex Research Journal*, v. 4, p.86–94, 2004.
- [44] Alves, A.R. *Engenharia de tecidos: Válvulas Cardíacas*. 2013.
- [45] Thompson, B.C.; Murray, E.; Wallace, G.G. Graphite Oxide to Graphene. *Biomaterials to Bionics. Advanced Materials*, v. 27, p.7563–82, 2015.

- [46] Makadia, H.K.; Siegel, S.J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as Biodegradable Controlled Drug Delivery Carrier. *Polymers*, v. 3, p.1377–97, 2011.
- [47] Kohane, D.S.; Langer, R. Polymeric biomaterials in tissue engineering. *Pediatric Research*, v. 63, p.487–91, 2008.
- [48] Williams, D.F. There is no such thing as a biocompatible material. *Biomaterials*, v. 35, p.10009–14, 2014.
- [49] Bober, P.; Li, Y.; Acharya, U.; Panthi, Y.; Pfleger, J.; Humpolíček, P.; et al. Acid Blue dyes in polypyrrole synthesis: The control of polymer morphology at nanoscale in the promotion of high conductivity and the reduction of cytotoxicity. *Synthetic Metals*, v. 237, p.40–9, 2018.
- [50] Graham, J.; Peck, J. FDA Regulation of Polyaryletheretherketone Implants. In: *PEEK Biomaterials Handbook*, Elsevier; p. 277–92 2012.
- [51] Song, R.; Murphy, M.; Li, C.; Ting, K.; Soo, C.; Zheng, Z. Current development of biodegradable polymeric materials for biomedical applications. *Drug Design, Development and Therapy*, v. 12, p.3117–45, 2018.
- [52] Aamodt, J.M.; Grainger, D.W. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials*, v. 86, p.68–82, 2016.
- [53] Jaganathan, S.K.; Balaji, A.; Vellayappan, M.V.; Subramanian, A.P.; John, A.A.; Asokan, M.K.; et al. Review: Radiation-induced surface modification of polymers for biomaterial application. *Journal of Materials Science*, v. 50, p.2007–18, 2015.
- [54] Yadav, P.; Yadav, H.; Shah, V.G.; Shah, G.; Dhaka, G. Biomedical biopolymers, their origin and evolution in biomedical sciences: A systematic review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 9, p.21–5, 2015.
- [55] Mundargi, R.C.; Babu, V.R.; Rangaswamy, V.; Patel, P.; Aminabhavi, T.M. Nano/micro technologies for delivering macromolecular therapeutics using poly(D,L-lactide-co-glycolide) and its derivatives. *Journal of Controlled Release*, v. 125, p.193–209, 2008.
- [56] Mann, J.L.; Yu, A.C.; Agmon, G.; Appel, E.A. Supramolecular polymeric biomaterials. *Biomaterials Science*, v. 6, p.10–37, 2018.
- [57] Stratton, S.; Shelke, N.B.; Hoshino, K.; Rudraiah, S.; Kumbar, S.G. Bioactive

- polymeric scaffolds for tissue engineering. *Bioactive Materials*, v. 1, p.93–108, 2016.
- [58] Weil, T.; Barz, M. From Polymers to Functional Biomaterials. *Macromolecular Bioscience*, v. 17, p.1700307, 2017.
- [59] Teo, A.J.T.; Mishra, A.; Park, I.; Kim, Y.J.; Park, W.T.; Yoon, Y.J. Polymeric Biomaterials for Medical Implants and Devices. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, v. 2, p.454–72, 2016.
- [60] Monika; Kumar, R.; Chauhan, R.P.; Kumar, R.; Chakarvarti, S.K. Synthesis of conducting polymers and their characterization. *Indian Journal of Pure and Applied Physics*, v. 48, p.524–6, 2010.
- [61] Alfredo, N. V.; Rodríguez-Hernández, J. Antimicrobial Polymeric Nanostructures. *Nanostructures for Antimicrobial Therapy: Nanostructures in Therapeutic Medicine Series*. 85–115 p. 2017.
- [62] Cho, D.D.; Yoo, H.J. *Microfabrication Methods for Biodegradable.pdf*. v. 24, p.10–8, 2015.
- [63] Shim, J.H.; Won, J.Y.; Sung, S.J.; Lim, D.H.; Yun, W.S.; Jeon, Y.C.; et al. Comparative efficacies of a 3D-printed PCL/PLGA/ β -TCP membrane and a titanium membrane for guided bone regeneration in beagle dogs. *Polymers*, v. 7, p.2061–77, 2015.
- [64] Pillai, O.; Panchagnula, R. Polymers in drug delivery Omathanu Pillai and Ramesh Panchagnula. *Current opinion in chemical Biology*, v. 5, p.447–51, 2001.
- [65] Niu, G.; Criswell, T.; Sapoznik, E.; Lee, S.; Soker, S. The influence of cross-linking methods on the mechanical and biocompatible properties of vascular scaffold. *Journal of Science and Applications: Biomedicine*, v. 1, p.1–7, 2013.
- [66] Tang, Z.G.; Callaghan, J.T.; Hunt, J.A. The physical properties and response of osteoblasts to solution cast films of PLGA doped polycaprolactone. *Biomaterials*, v. 26, p.6618–24, 2005.
- [67] Chou, S.F.; Woodrow, K.A. Relationships between mechanical properties and drug release from electrospun fibers of PCL and PLGA blends. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 65, p.724–33, 2017.
- [68] Peng, C.; Zheng, J.; Chen, D.; Zhang, X.; Deng, L.; Chen, Z.; et al. Response

- of hPDLSCs on 3D printed PCL/PLGA composite scaffolds in vitro. *Molecular Medicine Reports*, v. 18, p.1335–44, 2018.
- [69] Alpaslan, E.; Webster, T.J. Nanotechnology and picotechnology to increase tissue growth: A summary of in vivo studies. *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p.7–12, 2014.
- [70] Govindarajan, T.; Shandas, R. A survey of surface modification techniques for next-generation shape memory polymer stent devices. *Polymers*, v. 6, p.2309–31, 2014.
- [71] Wu, C.J.; Gaharwar, A.K.; Schexnailder, P.J.; Schmidt, G. Development of biomedical polymer-silicate nanocomposites: A materials science perspective. *Materials*, v. 3, p.2986–3005, 2010.
- [72] Daly, W.; Yao, L.; Zeugolis, D.; Windebank, A.; Pandit, A. A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 9, p.202–21, 2012.
- [73] Pan, Z.; Ding, J. Poly(lactide-co-glycolide) porous scaffolds for tissue engineering and regenerative medicine. *Interface Focus*, v. 2, p.366–77, 2012.
- [74] Hsu, S.H.; Chen, C.Y.; Lu, P.S.; Lai, C.S.; Chen, C.J. Oriented Schwann cell growth on microgrooved surfaces. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 92, p.579–88, 2005.
- [75] Mobasser, S.A.; Terenghi, G.; Downes, S. Micro-structural geometry of thin films intended for the inner lumen of nerve conduits affects nerve repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 24, p.1639–47, 2013.
- [76] Miller, C.; Jeftinija, S.; Mallapragada, S. Synergistic Effects of Physical and Chemical Guidance Cues on Neurite Alignment and Outgrowth on Biodegradable Polymer Substrates. *Tissue Engineering*, v. 8, p.367–78, 2002.
- [77] Nedela, O.; Slepicka, P.; Švorčík, V. Surface modification of polymer substrates for biomedical applications. *Materials*, v. 10, 2017.
- [78] Beheshty, M.H.; Vafayan, M.; Poorabdollah, M. Low profile unsaturated polyester resin-clay nanocomposite properties. *Polymer Composites*, v. 30, p.629–38, 2009.
- [79] Hussain, F.; Hojjati, M.; Okamoto, M.; Gorga, R.E. Review article: Polymer-

- matrix Nanocomposites, Processing, Manufacturing, and Application: An Overview. *Journal of Composite Materials*, v. 40, p.1511–75, 2006.
- [80] Iftekhhar, A. *Standard Handbook of Biomedical Engineering and Design Chapter 23 Sterile Medical Device Package Development*. Federal Register, p.1–34, 2004.
- [81] Farkas, B.; Rodio, M.; Romano, I.; Diaspro, A.; Intartaglia, R. Fabrication of hybrid nanocomposite scaffolds by incorporating ligand-free hydroxyapatite nanoparticles into biodegradable polymer scaffolds and release studies. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, v. 6, p.2217–23, 2015.
- [82] Habraken, W.J.E.M.; Wolke, J.G.C.; Jansen, J.A. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 59, p.234–48, 2007.
- [83] Wang, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials*, v. 24, p.2133–51, 2003.
- [84] Davis, H.E.; Leach, J.K. *Hybrid and Composite Biomaterials in Tissue Engineering. Topics in Multifunctional Biomaterials and Devices e-book*, p.1–26, 2009.
- [85] Liu, Y.; Zheng, Z.; Zara, J.N.; Hsu, C.; Soofer, D.E.; Lee, K.S.; et al. The antimicrobial and osteoinductive properties of silver nanoparticle/poly (dl-lactic-co-glycolic acid)-coated stainless steel. *Biomaterials*, v. 33, p.8745–56, 2012.
- [86] Boccaccini, A.R.; Erol, M.; Stark, W.J.; Mohn, D.; Hong, Z.; Mano, J.F. Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review. *Composites Science and Technology*, v. 70, p.1764–76, 2010.
- [87] Camargo Pedro Henrique Cury; Satyanarayana Kestur Gundappa; Wypych Fernando. *Nanocomposites: Synthesis, Structure, Properties and New Application Opportunities*. *Materials Research*, v. 12, p.1–39, 2009.
- [88] Ribeiro, S.; Ribeiro, T.; Ribeiro, C.; Correia, D.; Farinha, J.; Gomes, A.; et al. Multifunctional Platform Based on Electroactive Polymers and Silica Nanoparticles for Tissue Engineering Applications. *Nanomaterials*, v. 8, p.933, 2018.
- [89] Hasan, A.; Morshed, M.; Memic, A.; Hassan, S.; Webster, T.; Marei, H.

- Nanoparticles in tissue engineering: applications, challenges and prospects. *International Journal of Nanomedicine*, v. Volume 13, p.5637–55, 2018.
- [90] Long, Y.Z.; Li, M.M.; Gu, C.; Wan, M.; Duvail, J.L.; Liu, Z.; et al. Recent advances in synthesis, physical properties and applications of conducting polymer nanotubes and nanofibers. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 36, p.1415–42, 2011.
- [91] Jeevanandam, J.; Barhoum, A.; Chan, Y.S.; Dufresne, A.; Danquah, M.K. Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations. *Beilstein Journal of Nanotechnology*, v. 9, p.1050–74, 2018.
- [92] Balkan, T.; Kizir, S.; Tuncel, D. One-Pot Synthesis of Hybrid Conjugated Oligomer-Ag Nanoparticles. *ACS Omega*, v. 2, p.5470–7, 2017.
- [93] Iravani, S. Bacteria in Nanoparticle Synthesis: Current Status and Future Prospects. *International Scholarly Research Notices*, v. 2014, p.1–18, 2014.
- [94] Mohamed, E.F. Nanotechnology: Future of Environmental Air Pollution Control. *Environmental Management and Sustainable Development*, v. 6, p.429, 2017.
- [95] Tiwari, J.N.; Tiwari, R.N.; Kim, K.S. Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices. *Progress in Materials Science*, v. 57, p.724–803, 2012.
- [96] Khanbabaie, R.; Jahanshahi, M. Send Orders of Reprints at reprints@benthamscience.org Revolutionary Impact of Nanodrug Delivery on Neuroscience. *Current Neuropharmacology*, v. 10, p.370–92, 2012.
- [97] Lu, P.; Ding, B. Applications of electrospun fibers. *Recent patents on nanotechnology*, v. 2, p.169–82, 2008.
- [98] Staiger, M.P.; Pietak, A.M.; Huadmai, J.; Dias, G. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review. *Biomaterials*, v. 27, p.1728–34, 2006.
- [99] Pepla, E.; Besharat, L.K.; Palaia, G.; Tenore, G.; Migliau, G. Nano-hydroxyapatite and its applications in preventive, restorative and regenerative dentistry: a review of literature. *Annali di stomatologia*, v. 5, p.108–14, 2014.
- [100] Lv, Z.J.; Liu, Y.; Miao, H.; Leng, Z.Q.; Guo, J.H.; Liu, J. Effects of multiwalled

- carbon nanotubes on electrospun poly(lactide-co-glycolide)-based nanocomposite scaffolds on neural cells proliferation. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, v. 105, p.934–43, 2017.
- [101] Ravichandran, R.; Sundarrajan, S.; Venugopal, J.R.; Mukherjee, S.; Ramakrishna, S. Applications of conducting polymers and their issues in biomedical engineering. *Journal of the Royal Society Interface*, v. 7, 2010.
- [102] George, P.M.; Lyckman, A.W.; Lavan, D.A.; Hegde, A.; Leung, Y.; Avasare, R.; et al. Fabrication and biocompatibility of polypyrrole implants suitable for neural prosthetics. *Biomaterials*, v. 26, p.3511–9, 2005.
- [103] Kotwal, A.; Schmidt, C.E. Electrical stimulation alters protein adsorption and nerve cell interactions with electrically conducting biomaterials. *Biomaterials*, v. 22, p.1055–64, 2001.
- [104] Schirmer, K.S.U.; Esrafilzadeh, D.; Thompson, B.C.; Quigley, A.F.; Kapsa, R.M.I.; Wallace, G.G. Conductive composite fibres from reduced graphene oxide and polypyrrole nanoparticles. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 4, p.1142–9, 2016.
- [105] Nguyen, D.N.; Yoon, H. Recent advances in nanostructured conducting polymers: From synthesis to practical applications. *Polymers*, v. 8, 2016.
- [106] Alvarez-Mejia, L.; Morales, J.; Cruz, G.J.; Olayo, M.G.; Olayo, R.; Díaz-Ruiz, A.; et al. Functional recovery in spinal cord injured rats using polypyrrole/iodine implants and treadmill training. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 26, 2015.
- [107] Aznar-Cervantes, S.; Roca, M.I.; Martinez, J.G.; Meseguer-Olmo, L.; Cenis, J.L.; Moraleda, J.M.; et al. Fabrication of conductive electrospun silk fibroin scaffolds by coating with polypyrrole for biomedical applications. *Bioelectrochemistry*, v. 85, p.36–43, 2012.
- [108] Park, J.Y.; Lee, D.H.; Lee, E.J.; Lee, S.H. Study of cellular behaviors on concave and convex microstructures fabricated from elastic PDMS membranes. *Lab on a Chip*, v. 9, p.2043–9, 2009.
- [109] Kim, S.; Jeong, J.O.; Lee, S.; Park, J.S.; Gwon, H.J.; Jeong, S.I.; et al. Effective gamma-ray sterilization and characterization of conductive polypyrrole biomaterials. *Scientific Reports*, v. 8, p.1–10, 2018.

- [110] Mirfakhrai, T.; Oh, J.; Kozlov, M.; Fok, E.C.W.; Zhang, M.; Fang, S.; et al. Electrochemical actuation of carbon nanotube yarns. *Smart Materials and Structures*, v. 16, p.S243–9, 2007.
- [111] Ateh, D.D.; Vadgama, P.; Navsaria, H.A. Culture of Human Keratinocytes on Polypyrrole-Based Conducting Polymers. *Tissue Engineering*, v. 12, p.645–55, 2006.
- [112] Kaur, G.; Adhikari, R.; Cass, P.; Bown, M.; Gunatillake, P. Electrically conductive polymers and composites for biomedical applications. *RSC Advances*, v. 5, p.37553–67, 2015.
- [113] Liu, Z.; Dong, L.; Cheng, K.; Luo, Z.; Weng, W. Charge injection based electrical stimulation on polypyrrole planar electrodes to regulate cellular osteogenic differentiation. *RSC Advances*, v. 8, p.18470–9, 2018.
- [114] Jeeju, P.P.; Varma, S.J.; Francis Xavier, P.A.; Sajimol, A.M.; Jayalekshmi, S. Novel polypyrrole films with excellent crystallinity and good thermal stability. *Materials Chemistry and Physics*, v. 134, p.803–8, 2012.
- [115] Xia, X.; Yin, J.; Qiang, P.; Zhao, X. Electrorheological properties of thermo-oxidative polypyrrole nanofibers. *Polymer*, v. 52, p.786–92, 2011.
- [116] Ansari, R. Polypyrrole Conducting Electroactive Polymers: Synthesis and Stability Studies. *E-Journal of Chemistry*, v. 3, p.186–201, 2006.
- [117] 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.447–55, 2003.
- [118] Yang, Y.; Liu, J.; Wan, M. Self-assembled conducting polypyrrole micro/nanotubes. *Nanotechnology*, v. 13, p.771–3, 2002.
- [119] 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.
- [120] Lima, P.H.C.; Fonseca, D.F.; Braz, C.J.F.; Cunha, C.T.C. Polímeros Condutores com Propriedades Eletrocromáticas: Uma Revisão. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 13, p.1–17, 2018.
- [121] Rocha-filho, R.C. ATUALIDADES EM QUÍMICA Nobel 2000 Descoberta e Aplicações. *Química Nova na Escola*, v. 12, 2000.

- [122] Fonner, J.M.; Forciniti, L.; Nguyen, H.; Byrne, J.D.; Kou, Y.F.; Syeda-Nawaz, J.; et al. Biocompatibility implications of polypyrrole synthesis techniques. *Biomedical Materials*, v. 3, 2008.
- [123] Kaynak, A.; Foitzik, R. Synthesis and Characterization of Soluble Conducting Polymers and. *Research Journal of Textile and Apparel*, v. 14, p.45–52, 2010.
- [124] Leonavicius, K.; Ramanaviciene, A.; Ramanavicius, A. Polymerization model for hydrogen peroxide initiated synthesis of polypyrrole nanoparticles. *Langmuir*, v. 27, p.10970–6, 2011.
- [125] Costa, K.M.; Pereira, T.C.B.; Valente, C.A.; Pissinate, K.; Soares, J.C.; Cruz, F.F.; et al. Adverse effects of p-TSA-doped polypyrrole particulate exposure during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 177, p.58–67, 2019.
- [126] Gilmore, K.J.; Kita, M.; Han, Y.; Gelmi, A.; Higgins, M.J.; Moulton, S.E.; et al. Skeletal muscle cell proliferation and differentiation on polypyrrole substrates doped with extracellular matrix components. *Biomaterials*, v. 30, p.5292–304, 2009.
- [127] Wang, X.; Gu, X.; Yuan, C.; Chen, S.; Zhang, P.; Zhang, T.; et al. Evaluation of biocompatibility of polypyrrole. *Science*, 2003.
- [128] Upadhyay, J.; Kumar, A.; Gogoi, B.; Buragohain, A.K. Antibacterial and hemolysis activity of polypyrrole nanotubes decorated with silver nanoparticles by an in-situ reduction process. *Materials Science and Engineering C*, v. 54, p.8–13, 2015.
- [129] Bauquier, S.H.; McLean, K.J.; Jiang, J.L.; Boston, R.C.; Lai, A.; Yue, Z.; et al. Evaluation of the Biocompatibility of Polypyrrole Implanted Subdurally in GAERS. *Macromolecular Bioscience*, v. 17, p.1–8, 2017.
- [130] Ramtin, A.; Seyfoddin, A.; Coutinho, F.P.; Waterhouse, G.I.N.; Rupenthal, I.D.; Svirskis, D. Cytotoxicity considerations and electrically tunable release of dexamethasone from polypyrrole for the treatment of back-of-the-eye conditions. *Drug Delivery and Translational Research*, v. 6, p.793–9, 2016.
- [131] Kim, S.; Oh, W.K.; Jeong, Y.S.; Hong, J.Y.; Cho, B.R.; Hahn, J.S.; et al. Cytotoxicity of, and innate immune response to, size-controlled polypyrrole nanoparticles in mammalian cells. *Biomaterials*, v. 32, p.2342–50, 2011.

- [132] Fahlgren, A.; Bratengeier, C.; Gelmi, A.; Semeins, C.M.; Klein-Nulend, J.; Jager, E.W.H.; et al. Biocompatibility of polypyrrole with human primary osteoblasts and the effect of dopants. *PLoS ONE*, v. 10, p.1–17, 2015.
- [133] Ramanaviciene, A.; Kausaite, A.; Tautkus, S.; Ramanavicius, A. Biocompatibility of polypyrrole particles: an in-vivo study in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 59, p.311–5, 2007.
- [134] Liao, J.; Ning, C.; Tan, G.; Ni, G.; Pan, H. Conducting polypyrrole nanotube arrays as an implant surface: Fabricated on biomedical titanium with fine-tunability by means of template-free electrochemical polymerization. *ChemPlusChem*, v. 79, p.524–30, 2014.
- [135] Upadhyay, J.; Kumar, A. Conducting Polymer Hybrids [Internet]. 2017.
- [136] Salabat, A.; Mirhoseini, F.; Mahdih, M.; Saydi, H. A novel nanotube-shaped polypyrrole-Pd composite prepared using reverse microemulsion polymerization and its evaluation as an antibacterial agent. *New Journal of Chemistry*, v. 39, p.4109–14, 2015.
- [137] Irfan, M.; Perero, S.; Miola, M.; Maina, G.; Ferri, A.; Ferraris, M.; et al. Antimicrobial functionalization of cotton fabric with silver nanoclusters/silica composite coating via RF co-sputtering technique. *Cellulose*, v. 24, p.2331–45, 2017.
- [138] Kadavil, H.; Zagho, M.; Elzatahry, A.; Altahtamouni, T. Sputtering of Electrospun Polymer-Based Nanofibers for Biomedical Applications: A Perspective. *Nanomaterials*, v. 9, p.77, 2019.
- [139] Upadhyay, J.; Kumar, A. Investigation of structural, thermal and dielectric properties of polypyrrole nanotubes tailoring with silver nanoparticles. *Composites Science and Technology*, v. 97, p.55–62, 2014.
- [140] Liu, J.; Wang, J.; Yu, X.; Li, L.; Shang, S. One-pot synthesis of polypyrrole/AgCl composite nanotubes and their antibacterial properties. *Micro & Nano Letters*, v. 10, p.50–3, 2015.
- [141] Chowdhury, A.; Kunjiappan, S.; Panneerselvam, T.; Somasundaram, B.; Bhattacharjee, C. Nanotechnology and nanocarrier-based approaches on treatment of degenerative diseases. *International Nano Letters*, v. 7, p.91–122, 2017.

- [142] Affatato, S.; Ruggiero, A.; Merola, M. Advanced biomaterials in hip joint arthroplasty. A review on polymer and ceramics composites as alternative bearings. *Composites Part B: Engineering*, v. 83, p.276–83, 2015.
- [143] Raval, S. Ultrafast Pump-Probe spectroscopy of Graphene Oxide (GO) and Reduced Graphene Oxide (RGO) Shivam Raval under the guidance of Prof . Prasanta Kumar Datta. 2018.
- [144] Wang, J.; Salihi, E.C.; Šiller, L. Green reduction of graphene oxide using alanine. *Materials Science and Engineering C*, v. 72, p.1–6, 2017.
- [145] Xie, C.; Li, P.; Han, L.; Wang, Z.; Zhou, T.; Deng, W.; et al. Electroresponsive and cell-affinitive polydopamine/polypyrrole composite microcapsules with a dual-function of on-demand drug delivery and cell stimulation for electrical therapy. *NPG Asia Materials*, v. 9, p.e358-9, 2017.
- [146] 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.
- [147] Misra, S.K.; Watts, P.C.P.; Valappil, S.P.; Silva, S.R.P.; Roy, I.; Boccaccini, A.R. Poly(3-hydroxybutyrate)/Bioglass® composite films containing carbon nanotubes. *Nanotechnology*, v. 18, 2007.
- [148] Wang, C.Y.; Zhang, K.H.; Fan, C.Y.; Mo, X.M.; Ruan, H.J.; Li, F.F. Aligned natural-synthetic polyblend nanofibers for peripheral nerve regeneration. *Acta Biomaterialia*, v. 7, p.634–43, 2011.
- [149] Weaver, C.L.; Larosa, J.M.; Luo, X.; Cui, X.T. Electrically controlled drug delivery from graphene oxide nanocomposite films. *ACS Nano*, v. 8, p.1834–43, 2014.
- [150] Yan, L.; Zhao, B.; Liu, X.; Li, X.; Zeng, C.; Shi, H.; et al. Aligned Nanofibers from Polypyrrole/Graphene as Electrodes for Regeneration of Optic Nerve via Electrical Stimulation. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 8, p.6834–40, 2016.
- [151] Singu, B.S.; Yoon, K.R. Highly exfoliated GO-PPy-Ag ternary nanocomposite for electrochemical supercapacitor. *Electrochimica Acta*, v. 268, p.304–15, 2018.

- [152] Ferreira, C.L.; Valente, C.A.; Zanini, M.L.; Sgarioni, B.; Ferreira Tondo, P.H.; Chagastelles, P.C.; et al. Biocompatible PCL/PLGA/Polypyrrole Composites for Regenerating Nerves. *Macromolecular Symposia*, v. 383, p.1–8, 2019.
- [153] Goel, S.; Mazumdar, N.A.; Gupta, A. Synthesis and characterization of polypyrrole nanofibers with different dopants. *Polymers for Advanced Technologies*, v. 21, p.205–10, 2010.
- [154] Valente, C.A. Síntese de nanofibras de polipirrol para potencial aplicação em conduto biodegradável para regeneração nervosa. *Dissertação em Engenharia e Tecnologia de Materiais /PUCRS*. Porto Alegre, Março, 2014.
- [155] Herrera-Alonso, M.; Abdala, A.A.; McAllister, M.J.; Aksay, I.A.; Prud'homme, R.K. Intercalation and Stitching of Graphite Oxide with Diaminoalkanes. *Langmuir*, v. 23, p.10644–9, 2007.
- [156] Garcia, M.T. Preparação De Óxido De Grafeno E Óxido De Grafeno Reduzido E Dispersão Em Matriz Polimérica Biodegradável. *Dissertação em Engenharia e Tecnologia de Materiais /PUCRS*. Porto Alegre, Novembro, 2016. 2016.
- [157] Zhong, J.; Gao, S.; Xue, G.; Wang, B. Study on enhancement mechanism of conductivity induced by graphene oxide for Polypyrrole nanocomposites. *Macromolecules*, v. 48, p.1592–7, 2015.
- [158] Lingappan, N.; Gal, Y.S.; Lim, K.T. Synthesis of reduced graphene oxide/polypyrrole conductive composites. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*, v. 585, p.60–6, 2013.
- [159] Konwer, S.; Boruah, R.; Dolui, S.K. Studies on conducting polypyrrole/graphene oxide composites as supercapacitor electrode. *Journal of Electronic Materials*, v. 40, p.2248–55, 2011.
- [160] Gonçalves, R. V.; Wender, H.; Migowski, P.; Feil, A.F.; Eberhardt, D.; Boita, J.; et al. Photochemical Hydrogen Production of Ta₂O₅ Nanotubes Decorated with NiO Nanoparticles by Modified Sputtering Deposition. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 121, p.5855–63, 2017.
- [161] Gonçalves, R. V.; Wojcieszak, R.; Wender, H.; Sato B. Dias, C.; Vono, L.L.R.; Eberhardt, D.; et al. Easy access to metallic copper nanoparticles with high activity and stability for CO oxidation. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 7, p.7987–94, 2015.

- [162] Alves Araújo, O.; Botter Júnior, W.; Freitas Carvalho, J.; Lima Verde, E. Construção de uma fonte de corrente e de uma sonda para medida de condutividade pelo método da sonda de quatro pontas. *Quimica Nova*, v. 26, p.754–6, 2003.
- [163] Giroto, E.M.; Santos, I.A. Medidas de resistividade elétrica DC em sólidos: Como efetuá-las corretamente. *Quimica Nova*, v. 25, p.639–47, 2002.
- [164] Humpolíček, P.; Kašpárková, V.; Pacherník, J.; Stejskal, J.; Bober, P.; Capáková, Z.; et al. The biocompatibility of polyaniline and polypyrrole: A comparative study of their cytotoxicity, embryotoxicity and impurity profile. *Materials Science and Engineering C*, v. 91, p.303–10, 2018.
- [165] Neisi, Z.; Ansari-Asl, Z.; Jafarinejad-Farsangi, S.; Tarzi, M.E.; Sedaghat, T.; Nobakht, V. Synthesis, characterization and biocompatibility of polypyrrole/Cu(II) metal-organic framework nanocomposites. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 178, p.365–76, 2019.
- [166] Nicoletti, N.F.; Erig, T.C.; Zanin, R.F.; Roxo, M.R.; Ferreira, N.P.; Gomez, M.V.; et al. Pre-clinical evaluation of voltage-gated calcium channel blockers derived from the spider *P. nigriventer* in glioma progression. *Toxicon*, v. 129, p.58–67, 2017.
- [167] Barbanti, S.H.; Zavaglia, C.A.C.; Duek, E.A. de R. Effect of salt leaching on PCL and PLGA(50/50) resorbable scaffolds. *Materials Research*, v. 11, p.75–80, 2008.
- [168] Garcez, G.R. Porto Alegre Agosto , 2011 Porto Alegre Agosto , 2011 [Internet]. Vol. 0. 2015.
- [169] ASTM. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. v. 14, p.1–11, 2012.
- [170] ISO. 10993-5. International Standards Organization, v. 3 Ed, p.42, 2009.
- [171] Sperling, L.E.; Reis, K.P.; Pozzobon, L.G.; Girardi, C.S.; Pranke, P. Influence of random and oriented electrospun fibrous poly(lactic-co-glycolic acid) scaffolds on neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v. 105, p.1333–45, 2017.
- [172] Pathak, A.K.; Kumar, V.; Sharma, S.; Yokozeki, T.; Dhakate, S.R. Improved thermomechanical and electrical properties of reduced graphene oxide

- reinforced polyaniline – dodecylbenzenesulfonic acid/divinylbenzene nanocomposites. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 533, p.548–60, 2019.
- [173] Umar, M.F.; Nasar, A. Reduced graphene oxide/polypyrrole/nitrate reductase deposited glassy carbon electrode (GCE/RGO/PPy/NR): biosensor for the detection of nitrate in wastewater. *Applied Water Science*, v. 8, p.1–10, 2018.
- [174] Fan, X.; Yang, Z.; He, N. Hierarchical nanostructured polypyrrole/graphene composites as supercapacitor electrode. *RSC Advances*, v. 5, p.15096–102, 2015.
- [175] Harpale, K.; Bansode, S.; More, M.; Late, D.J. Field emission investigation of composites of Polypyrrole with graphene oxide, reduced graphene oxide and graphene nanoribbons. 2016 29th International Vacuum Nanoelectronics Conference, IVNC 2016, p.1–2, 2016.
- [176] Imani, A.; Farzi, G.; Ltaief, A. Facile synthesis and characterization of polypyrrole-multiwalled carbon nanotubes by in situ oxidative polymerization. *International Nano Letters*, v. 3, p.1–8, 2013.
- [177] Berendjchi, A.; Khajavi, R.; Yousefi, A.A.; Yazdanshenas, M.E. Improved continuity of reduced graphene oxide on polyester fabric by use of polypyrrole to achieve a highly electro-conductive and flexible substrate. *Applied Surface Science*, v. 363, p.264–72, 2016.
- [178] Berendjchi, A.; Khajavi, R.; Yousefi, A.A.; Yazdanshenas, M.E. Surface characteristics of coated polyester fabric with reduced graphene oxide and polypyrrole. *Applied Surface Science*, v. 367, p.36–42, 2016.
- [179] Sun, W.; Chen, L.; Wang, Y.; Zhou, Y.; Meng, S.; Li, H.; et al. Synthesis of Highly Conductive PPy/Graphene/MnO₂ Composite Using Ultrasonic Irradiation. *Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry*, v. 46, p.437–44, 2016.
- [180] Ramasamy, M.S.; Mahapatra, S.S.; Cho, J.W. Functionalization of graphene with self-doped conducting polypyrrole by click coupling. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 455, p.63–70, 2015.
- [181] Mitra, M.; Kulsi, C.; Chatterjee, K.; Kargupta, K.; Ganguly, S.; Banerjee, D.; et al. Reduced graphene oxide-polyaniline composites - Synthesis,

- characterization and optimization for thermoelectric applications. *RSC Advances*, v. 5, p.31039–48, 2015.
- [182] Yang, X.; Li, L.; Yan, F. Polypyrrole/silver composite nanotubes for gas sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 145, p.495–500, 2010.
- [183] Jing, S.; Xing, S.; Yu, L.; Zhao, C. Synthesis and characterization of Ag/polypyrrole nanocomposites based on silver nanoparticles colloid. *Materials Letters*, v. 61, p.4528–30, 2007.
- [184] Suvina, V.; Krishna, S.M.; Nagaraju, D.H.; Melo, J.S.; Balakrishna, R.G. Polypyrrole-reduced graphene oxide nanocomposite hydrogels: A promising electrode material for the simultaneous detection of multiple heavy metal ions. *Materials Letters*, v. 232, p.209–12, 2018.
- [185] Dallas, P.; Georgakilas, V. Interfacial polymerization of conductive polymers: Generation of polymeric nanostructures in a 2-D space. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 224, p.46–61, 2015.
- [186] Chakraborty, G.; Gupta, K.; Meikap, A.K.; Babu, R.; Blau, W.J. Synthesis, electrical and magnetotransport properties of polypyrrole-MWCNT nanocomposite. *Solid State Communications*, v. 152, p.13–8, 2012.
- [187] Qian, T.; Yu, C.; Wu, S.; Shen, J. A facilely prepared polypyrrole-reduced graphene oxide composite with a crumpled surface for high performance supercapacitor electrodes. *Journal of Materials Chemistry A*, v. 1, p.6539–42, 2013.
- [188] Zhang, B.; Xu, Y.; Zheng, Y.; Dai, L.; Zhang, M.; Yang, J.; et al. A facile synthesis of polypyrrole/carbon nanotube composites with ultrathin, uniform and thickness-tunable polypyrrole shells. *Nanoscale Research Letters*, v. 6, p.1–9, 2011.
- [189] Pattanayak, P.; Papiya, F.; Kumar, V.; Pramanik, N.; Kundu, P.P. Deposition of Ni-NiO nanoparticles on the reduced graphene oxide filled polypyrrole: Evaluation as cathode catalyst in microbial fuel cells. *Sustainable Energy and Fuels*, v. 3, p.1808–26, 2019.
- [190] Gnana Kumar, G.; Kirubakaran, C.J.; Udhayakumar, S.; Ramachandran, K.; Karthikeyan, C.; Renganathan, R.; et al. Synthesis, structural, and morphological characterizations of reduced graphene oxide-supported

- polypyrrole anode catalysts for improved microbial fuel cell performances. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, v. 2, p.2283–90, 2014.
- [191] Yang, X.; Li, L.; Yan, F. Polypyrrole/silver composite nanotubes for gas sensors. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 145, p.495–500, 2010.
- [192] Ghadim, M.F.; Imani, A.; Farzi, G. Synthesis of PPy–silver nanocomposites via in situ oxidative polymerization. *Journal of Nanostructure in Chemistry*, v. 4, p.1–5, 2014.
- [193] Panigrahi, R.; Srivastava, S.K. Trapping of microwave radiation in hollow polypyrrole microsphere through enhanced internal reflection: A novel approach. *Scientific Reports*, v. 5, p.1–10, 2015.
- [194] Kim, S.; Jang, Y.; Jang, M.; Lim, A.; Hardy, J.G.; Park, H.S.; et al. Versatile biomimetic conductive polypyrrole films doped with hyaluronic acid of different molecular weights. *Acta Biomaterialia*, v. 80, p.258–68, 2018.
- [195] Ryoo, S.; Kim, Y.; Kim, M.; Min, D. Behaviors of NIH-3T3 Fibroblasts on. *ACS Nano*, v. 4, p.6587–98, 2010.
- [196] Thompson, B.C.; Moulton, S.E.; Richardson, R.T.; Wallace, G.G. Effect of the dopant anion in polypyrrole on nerve growth and release of a neurotrophic protein. *Biomaterials*, v. 32, p.3822–31, 2011.
- [197] Vaitkuvienė, A.; Kasetė, V.; Voronovic, J.; Ramanauskaitė, G.; Biziuleviciene, G.; Ramanaviciene, A.; et al. Evaluation of cytotoxicity of polypyrrole nanoparticles synthesized by oxidative polymerization. *Journal of Hazardous Materials*, v. 250–251, p.167–74, 2013.
- [198] Kim, S.W.; Hwangbo, K.; Lee, J.H.; Cho, K.Y. Microfluidic Fabrication of Microparticles with Multiple. p.4–7, 2014.
- [199] Tang, Z.G.; Rhodes, N.P.; Hunt, J.A. Control of the domain microstructures of PLGA and PCL binary systems: Importance of morphology in controlled drug release. *Chemical Engineering Research and Design*, v. 85, p.1044–50, 2007.
- [200] Diban, N.; Haimi, S.; Bolhuis-Versteeg, L.; Teixeira, S.; Miettinen, S.; Poot, A.; et al. Hollow fibers of poly(lactide-co-glycolide) and poly(ϵ -caprolactone) blends for vascular tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*, v. 9, p.6450–8, 2013.
- [201] Croll, T.I.; O'Connor, A.J.; Stevens, G.W.; Cooper-White, J.J. Controllable

- surface modification of poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) by hydrolysis or aminolysis I: Physical, chemical, and theoretical aspects. *Biomacromolecules*, v. 5, p.463–73, 2004.
- [202] Tang, Z.G.; Hunt, J.A. The effect of PLGA doping of polycaprolactone films on the control of osteoblast adhesion and proliferation in vitro. *Biomaterials*, v. 27, p.4409–18, 2006.
- [203] Shim, J.-H.; Huh, J.-B.; Park, J.Y.; Jeon, Y.-C.; Kang, S.S.; Kim, J.Y.; et al. Fabrication of Blended Polycaprolactone/Poly (Lactic-Co-Glycolic Acid)/ β -Tricalcium Phosphate Thin Membrane Using Solid Freeform Fabrication Technology for Guided Bone Regeneration. *Tissue Engineering Part A*, v. 19, p.317–28, 2013.
- [204] Won, J.Y.; Park, C.Y.; Bae, J.H.; Ahn, G.; Kim, C.; Lim, D.H.; et al. Evaluation of 3D printed PCL/PLGA/ β -TCP versus collagen membranes for guided bone regeneration in a beagle implant model. *Biomedical Materials (Bristol)*, v. 11, 2016.
- [205] Cai, K.; Yao, K.; Cui, Y.; Yang, Z.; Li, X.; Xie, H.; et al. Influence of different surface modification treatments on poly(D,L-lactic acid) with silk fibroin and their effects on the culture of osteoblast in vitro. *Biomaterials*, v. 23, p.1603–11, 2002.
- [206] Hao, L.; Yang, H.; Du, C.; Fu, X.; Zhao, N.; Xu, S.; et al. Directing the fate of human and mouse mesenchymal stem cells by hydroxyl–methyl mixed self-assembled monolayers with varying wettability. *Journal of Materials Chemistry B*, v. 2, p.4794, 2014.
- [207] Cerna Nahuis, L.E.; Alvim Valente, C.; de Freitas Oliveira, D.; de Souza Basso, N.R.; Antonio Malmonge, J. Preparation and Characterization of Polymeric Microfibers of PLGA and PLGA/PPy Composite Fabricated by Solution Blow Spinning. *Macromolecular Symposia*, v. 383, p.2–7, 2019.
- [208] Wang, Z.; Xu, L.; Wu, X.; Chen, J. A designable surface via the micro-molding process. *Microsystems & Nanoengineering*, v. 4, p.1–8, 2018.
- [209] Sun, M.; Kingham, P.J.; Reid, A.J.; Armstrong, S.J.; Terenghi, G.; Downes, S. In vitro and in vivo testing of novel ultrathin PCL and PCL/PLA blend films as peripheral nerve conduit. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, v.

- 93, p.1470–81, 2010.
- [210] Scopelliti, P.E.; Borgonovo, A.; Indrieri, M.; Giorgetti, L.; Bongiorno, G.; Carbone, R.; et al. The effect of surface nanometre-scale morphology on protein adsorption. *PLoS ONE*, v. 5, p.1–9, 2010.
- [211] Elbert, D.L.; Hubbell, J.A. Surface Treatments of Polymers for Biocompatibility. *Annual Review of Materials Science*, v. 26, p.365–94, 1996.
- [212] Zhang, F.; Qian, Y.; Chen, H.; Xu, Y.; Yang, J.; Zhou, X.; et al. The preosteoblast response of electrospinning PLGA/PCL nanofibers: effects of biomimetic architecture and collagen I. *International Journal of Nanomedicine*, v. Volume 11, p.4157–71, 2016.
- [213] Jing, X.; Mi, H.Y.; Wang, X.C.; Peng, X.F.; Turng, L.S. Shish-Kebab-structured poly(ϵ -caprolactone) nanofibers hierarchically decorated with chitosan-poly(ϵ -caprolactone) copolymers for bone tissue engineering. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 7, p.6955–65, 2015.
- [214] Chen, W.; Shao, Y.; Li, X.; Zhao, G.; Fu, J. Nanotopographical surfaces for stem cell fate control: Engineering mechanobiology from the bottom. *Nano Today*, v. 9, p.759–84, 2014.
- [215] Adriana, M.; Duarte, T.; Motta, A.C. In Vitro Degradation of Poly (L-co-D , L lactic acid) Containing PCL-T TECHNICAL-SCIENTIFIC PAPERS. v. 24, p.1–8, 2014.
- [216] Ouyang, H.W.; Goh, J.C.H.; Mo, X.M.; Teoh, S.H.; Lee, E.H. Characterization of anterior cruciate ligament cells and bone marrow stromal cells on various biodegradable polymeric films. *Materials Science and Engineering: C*, v. 20, p.63–9, 2002.
- [217] Díaz, E.; Puerto, I.; Ribeiro, S.; Lanceros-Mendez, S.; Barandiarán, J.M. The Influence of Copolymer Composition on PLGA/nHA Scaffolds' Cytotoxicity and In Vitro Degradation. *Nanomaterials*, v. 7, p.173, 2017.
- [218] Boyd, V.; Cholewa, O.M.; Papas, K.K. Limitations in the Use of Fluorescein Diacetate/Propidium Iodide (FDA/PI) and Cell Permeable Nucleic Acid Stains for Viability Measurements of Isolated Islets of Langerhans. *Current trends in biotechnology and pharmacy*, v. 2, p.66–84, 2008.
- [219] M.F, G.; M, M.; S, H.; Khan, W.S. *Peripheral Nerve Injury: Principles for Repair*

- and Regeneration. *The Open Orthopaedics Journal*, v. 8, p.199–203, 2014.
- [220] Grinsell, D.; Keating, C.P. Peripheral Nerve Reconstruction after Injury: A Review of Clinical and Experimental Therapies. *BioMed Research International*, v. 2014, p.1–13, 2014.
- [221] Chua, J.S.; Chng, C.-P.; Moe, A.A.K.; Tann, J.Y.; Goh, E.L.K.; Chiam, K.-H.; et al. Extending neurites sense the depth of the underlying topography during neuronal differentiation and contact guidance. *Biomaterials*, v. 35, p.7750–61, 2014.
- [222] Sharma, A.D.; Zbarska, S.; Petersen, E.M.; Marti, M.E.; Mallapragada, S.K.; Sakaguchi, D.S. Oriented growth and transdifferentiation of mesenchymal stem cells towards a Schwann cell fate on micropatterned substrates. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 121, p.325–35, 2016.
- [223] Flaibani, M.; Boldrin, L.; Cimetta, E.; Piccoli, M.; Coppi, P. De; Elvassore, N. Muscle Differentiation and Myotubes Alignment Is Influenced by Micropatterned Surfaces and Exogenous Electrical Stimulation. *Tissue Engineering Part A*, v. 15, p.2447–57, 2009.
- [224] Ferreira, C.L. SÍNTESE DE NANOCOMPÓSITOS POLIMÉRICOS PCL / PLGA / NANOFIBRAS DE POLIPIRROL PARA APLICAÇÃO. Dissertação em Engenharia e Tecnologia de Materiais /PUCRS. Porto Alegre, Março,. 2017.

9. APÊNDICES

9.1 Produção Científica

9.1.1 Artigos publicados em periódicos

Alvim Valente, C, Cesar Chagastelles, P, Fontana Nicoletti, N, Ramos Garcez, G, Sgarioni, B, Herrmann, F, Pesenatto, G, Goldani, E, Zanini, ML, Campos, MM, Meurer Papaléo, R, Braga da Silva, J, de Souza Basso, NR. Design and optimization of biocompatible polycaprolactone/poly(L-lactic-co-glycolic acid) scaffolds with and without microgrooves for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res Part A* 2018; 106A: 1522– 1534.



Design and optimization of biocompatible polycaprolactone/poly (L-lactic-co-glycolic acid) scaffolds with and without microgrooves for tissue engineering applications

Cristhiane Alvim Valente,¹ Pedro Cesar Chagastelles,^{2,3} Natália Fontana Nicoletti,^{2,3} Giovanna Ramos Garcez,¹ Bruna Sgarioni,⁴ Fábio Herrmann,⁵ Gustavo Pesenatto,⁵ Eduardo Goldani,^{2,3} Mara Lise Zanini,⁶ Maria Martha Campos,³ Ricardo Meurer Papaléo,^{1,6,7} Jefferson Braga da Silva,^{2,5} Nara Regina de Souza Basso^{1,4,7}

¹Graduate Program in Materials Engineering and Technology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
²Graduate Program in Medicine and Health Sciences, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
³Institute of Toxicology and Pharmacology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
⁴Faculty of Chemistry, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
⁵Faculty of Medicine, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
⁶Faculty of Physics, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil
⁷Interdisciplinary Center of Nanoscience and Micro-nanotechnology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 17 July 2017; revised 4 January 2018; accepted 24 January 2018
 Published online 16 February 2018 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jbm.a.36355

Abstract: This study investigated the effects of smooth and microgrooved membrane blends, with different polycaprolactone (PCL)/ poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) ratios on the viability, proliferation, and adhesion of different mammalian cell types. The polymer matrices with and without microgrooves, obtained by solvent casting, were characterized by field-emission scanning electron microscopy, atomic force microscopy, contact angle and Young's modulus. Blend characterization showed an increase in roughness and stiffness of membranes with 30% PLGA, without any effect on the contact angle value. Pure PCL significantly decreased the viability of Vero, HaCaT, RAW 264.7, and human fetal lung and gingival fibroblast cells, whereas addition of increasing concentrations of PLGA led to a reduced cytotoxicity. Increased proliferation rates were observed for all cell lines. Fibroblasts adhered efficiently to smooth membranes of the PCL70/PLGA30 blend and pure PLGA, compared to pure PCL and silicone. Microgrooved membranes promoted similar cell adhesion for all groups. Microstructured membranes (15 and 20- μ m wide grooves) promoted suitable orientation of fibroblasts in both PCL70/PLGA30 and pure PLGA, as compared to pure PCL. Neuronal cells of the dorsal root ganglion exhibited an oriented adhesion to all the tested microgrooved membranes. Data suggest a satisfactory safety profile for the microgrooved PCL70/PLGA30 blend, pointing out this polymer combination as a promising biomaterial for peripheral nerve regeneration when cell orientation is required. © 2018 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part A*: 106A: 1522–1534, 2018.

Key Words: PCL, PLGA, blend, orientation, microgrooves

How to cite this article: Alvim Valente C, Cesar Chagastelles P, Fontana Nicoletti N, Ramos Garcez G, Sgarioni B, Herrmann F, Pesenatto G, Goldani E, Zanini ML, Campos MM, Meurer Papaléo R, Braga da Silva J, de Souza Basso NR. 2018. Design and optimization of biocompatible polycaprolactone/poly(L-lactic-co-glycolic acid) scaffolds with and without microgrooves for tissue engineering applications. *J Biomed Mater Res Part A* 2018;106A:1522–1534.

Costa, K M, Pereira, T C B, Valente, C A, Pissinate, K., Soares, J C, Cruz, F F, Corte, T W F, Machado, P, Basso, N R S, Bogo, M R. Adverse effects of p-TSA-doped polypyrrole particulate exposure during zebrafish (*Danio rerio*) development. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2019; 177: 58 – 67.

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 177 (2019) 58–67



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Colloids and Surfaces B: Biointerfaces

journal homepage: www.elsevier.com/locate/colsurfb





Adverse effects of p-TSA-doped polypyrrole particulate exposure during zebrafish (*Danio rerio*) development

Kesiane M. Costa^{a,b}, Talita C.B. Pereira^{a,c,*}, Cristhiane A. Valente^{d,e}, Kenia Pissinate^f,
Jéssica C. Soares^{a,c}, Fernanda F. Cruz^c, Temis W.F. Corte^g, Pablo Machado^{c,f}, Nara R.S. Basso^{d,e},
Maurício R. Bogo^{a,b,c,*}

^aLaboratory of Genomics and Molecular Biology, School of Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil
^bGraduate Program in Medicine and Health Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil
^cGraduate Program in Cellular and Molecular Biology, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil
^dOrganometallic Compounds and Resins Laboratory, School of Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil
^eGraduate Program in Materials Engineering and Technology, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil
^fNational Institute of Science and Technology in Tuberculosis, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil
^gCosmetology Laboratory, School of Health Sciences, PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 PPy
 PPy/p-TSA
 Nanomaterials
 Nanotoxicity
 Zebrafish development
 Behavior

ABSTRACT

Nanomaterials have been attracting attention due to the wide range of applications in nanomedicine. Polypyrrole (PPy), a conductive polymer, has been employed in the biomedical field due to its stimulus-responsive properties, although *in vivo* studies to assess its potential undesirable effects are limited. This study evaluated the effects of PPy doped with p-toluene sulfonic acid (p-TSA); PPy/p-TSA exposure (at 25, 100, 250 and 500 µg/mL) during six consecutive days on mortality, hatching, spontaneous movement, heart rate, morphology and locomotion behavior of zebrafish embryos/larvae. Additionally, PPy/p-TSA envelopment of developing embryo chorions and gene expression of a hypoxia-related marker in this context were also evaluated. No significant mortality was found; however, altered heart rate and early hatching was identified in all exposed groups at 48 hours post-fertilization (hpf). Surprisingly, with the 500 µg/mL dose, hatching initiated as early as 24 hpf. PPy/p-TSA adhered to and enveloped the chorion of embryos in a time- and dose-dependent fashion; morphological changes in body length and ocular distance were found with higher concentrations. PPy/p-TSA-exposed animals showed locomotor behavioral alterations compatible with hypoactivity. A significant increase in the turn angle with a concomitant reduction in meander was also verified at higher concentrations. Taken together, these results emphasize the adverse effects of PPy/p-TSA on zebrafish development and behavior. Some effects of PPy/p-TSA exposure were dose-dependent, and indicate specific adverse effects of PPy/p-TSA on zebrafish development and behavior.

1. Introduction

Conductive polymers are used in a number of applications. Their physical properties and biocompatibility have drawn attention in terms of applications in the biomedical field, taking advantage of their electrical stimuli potential [1]. Among several types of conductive polymers, polypyrrole (PPy), as a planar array of pyrrole (Py) monomers [2], has been studied and employed in drug delivery systems, nerve regeneration and biosensor coatings for neural probes [3]. Interest in PPy applications in nanomedicine is increasing and PPy biocompatibility has been reported with promising *in vivo* scaffold results regarding nervous tissue regeneration [4,5], substrates for different purposes where maintaining the adhesion and proliferation of *in vitro* cells is required [6] and as drug delivery systems. For instance, it has been reported that PPy doped during its synthesis with ciprofloxacin, an antibiotic, is able to release the drug by switching the redox state of the conductive polymer [7]. Furthermore, titanium-based implants containing another antimicrobial agent, torularhodine, in a PPy film resulted in a corrosion-protective coating with antibacterial activity [8], which may fulfill an interesting alternative in terms of implant longevity.

Although the biocompatibility of PPy has been documented, some

* Corresponding authors at: Laboratory of Genomics and Molecular Biology, School of Sciences, PUCRS, Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 12C - sala 134, CEP: 90619-900, Porto Alegre, RS, Brazil.
 E-mail addresses: talitapereira@gmail.com (T.C.B. Pereira), mbogo@pucrs.br (M.R. Bogo).

<https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.041>
 Received 23 November 2018; Received in revised form 17 January 2019; Accepted 21 January 2019
 Available online 24 January 2019
 0927-7765/ © 2019 Elsevier B.V. All rights reserved.

Ferreira, C L, Valente, C A, Zanini, M L, Sgarioni, B, Tondo, P H F, Chagastelles, P C, Braga, J, Campos, M M, Malmonge, J A, Basso, N R S. Biocompatible PCL/PLGA/Polypyrrole Composites for Regenerating Nerves *Macromol. Symp.* 2019; 383: 1800028.

FULL PAPER

Polycaprolactone



Macromolecular Symposia

www.ms-journal.de

Biocompatible PCL/PLGA/Polypyrrole Composites for Regenerating Nerves

*Cristina Lorenski Ferreira, Cristhiane Alvim Valente, Mara Lise Zanini, Bruna Sgarioni, Pedro Henrique Ferreira Tondo, Pedro Cesar Chagastelles, Jefferson Braga, Maria Martha Campos, José Antonio Malmonge, and Nara Regina de Souza Basso**

In the field of regenerative medicine, many studies have focused on regenerating peripheral nerves because clinical problems and functional loss of organs are affecting an increasing number of people. Biocompatible polymers can be potentially used for producing biocompatible tubes in order to aid the regeneration of peripheral nerves. This study aims to prepare polymeric composites based on polycaprolactone (PCL), poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), and polypyrrole fibers (PPy) capable of acting as a conduit for regenerating peripheral nerves. Polypyrrole is synthesized by oxidative chemical polymerization with p-toluenesulfonic acid monohydrate (PTSA) as a doping agent. PCL/PLGA blends (100:0, 90:10, 80:20, and 70:30) (m/m) and PCL/PLGA composites with 10% PPy fibers were prepared by the solvent casting method. PPy with a diameter of 88–974 nm showed electrical conductivity of $2.0 \times 10^{-1} \text{ S cm}^{-1}$. The nontoxic composite films with hydrophilic and porous surfaces presented a thermal stability and degradation period that were suitable for potential use in the regeneration of peripheral nerves.

1. Introduction

In the field of tissue engineering, studies are actively developing polymeric biomaterials for regenerating peripheral nerves.^[1–3] Several biocompatible tubular products approved by the US Food and Drug Administration (FDA) are commercially available for repairing nerve tissues, including NeuroTube[®] made of polyglycolic acid and Neurolac[™] made of poly (D, L-lactic acid-co-ε-caprolactone).^[4]

Biodegradable polyesters such as poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA), polycaprolactone (PCL), and their blends have been widely used for preparing biocompatible tubes.^[2,4–7] PLGA is widely used as a substrate for nerve regeneration owing to its biodegradability, nontoxicity, and film-forming ability.^[4] PLGA-based materials show micropores on the surface that

increase nutrient permeability, thus favoring cell adhesion and proliferation.^[8,9] PCL, too, is suitable for manufacturing such tubes because it has low toxicity, good mechanical properties, slow degradation (>1 year), and excellent compatibility for preparing blends with other biocompatible polymers.^[3,4,10] Polymers are combined to obtain biocompatible tubes that show properties not attainable by any of the constituents alone.^[11] PCL/PLGA blends with different ratios have been considered promising for medical applications owing to their biocompatibility, slow degradability, and surface topography that favors cell adhesion and proliferation.^[1,12,13]

Conductive polymers are also considered attractive materials for medical applications because various biological tissues respond to electric fields and stimuli. Studies have shown that conductive polymers have good ability to support and modulate the growth of several types of cells such as nerve cells and bone cells.^[6,14]

Polypyrrole (PPy) is the most studied conductive polymer in vitro and in vivo owing to its biocompatibility and easy synthesis route.^[4,6] However, polypyrrole has poor mechanical properties and is not biodegradable. On the other hand, biodegradable PCL/PLGA blends have suitable mechanical properties (flexibility) for preparing biocompatible tubes, but they are insulating materials. Thus, the addition of a small amount of the PPy conducting polymer to the PCL/PLGA blends results in a

C. L. Ferreira, C. A. Valente, N. R. de Souza Basso
Programa de Pós-graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais,
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS, Brazil
E-mail: xnr Basso@pucrs.br

M. L. Zanini, N. R. de Souza Basso
Escola de Ciências
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS, Brazil

B. Sgarioni, P. H. Ferreira Tondo
Escola Politécnica
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS, Brazil

P. C. Chagastelles, M. M. Campos
Instituto de Toxicologia e Farmacologia
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS, Brazil

J. Braga
Programa de Pós-graduação em Medicina e Ciências da Saúde
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS, Brazil

J. A. Malmonge
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Faculdade de Engenharia
Campus de Ilha Solteira
SP, Brazil

DOI: 10.1002/masy.201800028

Nahuis, L E C, Valente, C A, Oliveira, D F, Basso, N R S, Malmonge, J A. Preparation and Characterization of Polymeric Microfibers of PLGA and PLGA/PPy Composite Fabricated by Solution Blow Spinning *Macromol. Symp.* 2019: 383: 1800030.

FULL PAPER

Solution Blow Spinning



Macromolecular Symposia

www.ms-journal.de

Preparation and Characterization of Polymeric Microfibers of PLGA and PLGA/PPy Composite Fabricated by Solution Blow Spinning

Liesel E. Cerna Nahuis, Cristhiane Alvim Valente, Danilo de Freitas Oliveira, Nara R. de Souza Basso, and José Antonio Malmonge*

In this study, microfibers of poly(L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) and PLGA/polypyrrole (PPy) composite (90/10 wt%) are produced by using the solution blow spinning (SBS) technique. PPy is synthesized by the oxidative polymerization method using *p*-toluenesulfonic acid (*p*-TSA) as the dopant and FeCl₃ as the oxidant. The prepared PPy showed microfibers with globular particles morphology. Mixtures of porous and nonporous microfibers and microfibers incorporated with PPy are obtained. A wettability test shows that the PLGA and PLGA/PPy fibrous mats are hydrophobic. The electrical conductivity of the PLGA/PPy composite is of the same order as that of pure PLGA ($\approx 10^{-10}$ S cm⁻¹), indicating that the electrical percolation threshold is not reached for PPy loading of 10 wt%. The incorporation of PPy into PLGA microfibers improved the thermal stability of the composite and also increases the PLGA crystalline phase.

structures.^[5,6] Poly(L-lactic-co-glycolic acid) (PLGA) is one such synthetic biodegradable polymer that has been approved by the Food and Drug Administration (FDA) for used in therapeutic devices. PLGA is used commonly owing to its easy of manufacture, adjustable degradation rate, and low inflammatory response.^[7]

Fiber polymeric mats are used in biomedical applications such as wound dressing, tissue engineering, and enzyme immobilization.^[8,9] Their porous structure results in a high surface-to-volume ratio that makes them suitable for medical applications.^[9] Various processing techniques have been developed to fabricate micro- and nanofiber mats.^[10] Electrospinning has been very well established for this purpose. Recently,

Medeiros et al.^[11] introduced solution blow spinning (SBS) as a simple alternative to electrospinning. SBS affords advantages such as higher fiber production rate, low production cost, and easy implementation. Furthermore, it can be used with various polymeric solutions regardless of their dielectric constant.^[12] In SBS, a polymer solution is dragged toward a collector by a gas flow, and the solvent is evaporated during this process, and creates a non-woven webs of polymer micro- and nanofibers, similar to those of the electrospinning technique. The fiber morphology, such as thickness and surface roughness, depends on variables such as carrier gas pressure, solution viscosity, and polymer type.^[12]

In this work, SBS was used to produce microfibers mats of PLGA and PLGA/PPy composite. The mats were then examined using scanning electron microscopy (SEM), water contact angle, differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric analysis (TG), X-ray diffraction (XRD), and electrical conductivity measurements by the two- and four-probe methods. Surprisingly, the PLGA and PLGA/PPy mats showed a mixture of porous and nonporous microfibers. The existence of pores favors cell growth and proliferation guide by PPy fibers and thus facilitates the formation of new biological tissues in tissue engineering.

1. Introduction

Conductive and biodegradable polymers have attracted considerable research attention worldwide because of their various industrial applications.^[1,2] One such polymer is polypyrrole (PPy); PPy and its composites have attracted interest owing to their intrinsic conductivity, low toxicity, and good biocompatibility. Therefore, they enable biomedical applications involving the electrical stimulation of cells and tissues.^[3,4] Furthermore, PPy is considered very promising for applications such as the regeneration of nerves and spinal cord tissues.

Several polymers, copolymers, and biodegradable polymer blends are used to produce and design polymeric biodegradable products for biomedical applications with varied life cycles and

2. Experimental Section

2.1. Materials

PLGA (Purasorb PLG8523 (85/15) L-lactide/glycolide copolymer; inherent viscosity = 2.38 dL g⁻¹ in chloroform) was supplied by Corbion Purac (Gorinchem, The Netherlands). Pyrrole (Py, purity: 98%), *p*-toluenesulfonic acid monohydrate (*p*-TSA), and

L. E. Cerna Nahuis, D. de Freitas Oliveira, J. Antonio Malmonge
Universidade Estadual Paulista (UNESP)
Faculdade de Engenharia
Campus de Ilha Solteira
Ilha Solteira, SP, Brazil
E-mail: mal@dfq.feis.unesp.br

C. Alvim Valente
Programa de Pós-graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (PGETEMA)

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS, Brazil

N. R. de Souza Basso
Escola de Ciências
Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Porto Alegre, RS, Brazil

DOI: 10.1002/masy.201800030

Gerzson, A S, Machado, D C, Da Silva, R R, Valente, C A, Pagnoncelli, R M. Assessment of the Viability of NIH3T3 Fibroblast Cells Cultured in Polymer Matrices with rhGH *J Polym Environ* 2018; 26: 906–912.

J Polym Environ (2018) 26:906–912
DOI 10.1007/s10924-017-0984-7



ORIGINAL PAPER

Assessment of the Viability of NIH3T3 Fibroblast Cells Cultured in Polymer Matrices with rhGH

Alexandre da Silveira Gerzson^{1,2} · Denise Cantarelli Machado³ ·
Rafaela Radomski da Silva³ · Cristhiane Alvim Valente⁴ ·
Rogério Miranda Pagnoncelli¹

Published online: 1 April 2017
© Springer Science+Business Media New York 2017

Abstract Developing a biomaterial that functions as a scaffold (osteoconductor), combined with a growth factor (osteoinductor), is of great interest for clinical application in oral and maxillofacial surgery. Growth hormone (GH) is a good candidate, as it is a major regulator of postnatal bone growth and remodeling. Pure PLGA and 70/30 PLGA/PCL matrices were prepared by the solvent evaporation method, combined or not with GH, and tested for toxicity and cell viability using an MTT assay with NIH3T3 mouse cells (ATCC). Cell toxicity was assessed at 24, 48, 72 h, and 7 days of biomaterial exposure to culture medium. All polymers had high cell viability rates. However, from 48 h onwards, the groups with GH-polymer combinations had better results than the polymer groups without association with GH when compared to the control group. At 7 days of culture, only the pure PLGA matrix showed a significant difference from the control group. These results may suggest a preference of cells for the presence of GH in the biomaterial in culture medium, especially in the PLGA matrix. GH appeared to contribute to the increase in cell viability

observed at some assessment time points, especially when combined with PLGA as compared to pure PLGA.

Keywords Biocompatible materials · Growth hormone · Polymers · PLGA · Tissue Scaffolds

Introduction

Procedures for augmenting or maintaining bone tissue may be required to treat bone loss associated with oral and maxillofacial trauma, periodontal lesions, cystic lesions, bone grafts, and implant bed preparation [1]. Significant research is currently being conducted to develop an ideal bone substitute, which has osteoinductive and osteoconductive properties, is easy to handle and has a resorption time that is compatible with bone formation.

A biomaterial that is as similar as possible to bone tissue could be of great benefit for treatments requiring bone grafting, because the inherent advantages of autogenous bone would be associated with lower morbidity, availability of large amounts of material, and better graft acceptance. In this context, growth factors represent an excellent alternative for osteoinduction in biomaterials [2–5].

Among growth factors, the growth hormone (GH) is a good candidate, as it is a major regulator of postnatal bone growth and bone remodeling. GH exerts an effect on osteoclasts and more sharply on osteoblasts, providing the theoretical basis for its potential anabolic effect on bone [6–9].

The literature has showed that local administration of GH at the osteotomy site before implant placement resulted in increased formation of rabbits' trabecular bone within the implant threads as assessed by histomorphometric analysis after 2 weeks [10]. In oral and maxillofacial surgery, the use of GH could be associated with a biomaterial, used

✉ Alexandre da Silveira Gerzson
alexandregerzson@gmail.com

¹ Oral and Maxillofacial Surgery, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

² School of Dentistry, Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), Canoas, RS, Brazil

³ Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Biomedical Research Institute, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

⁴ Materials Engineering and Technology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

9.1.2 Resumos publicados em Anais de Congressos

Valente, C. A.; Eberhardt, D.; Dias, L. W.; Malmonge, J. A. ; Basso, N. R. S. Preparação de polipirrol decorado com nanopartículas de prata via pulverização catódica. In: 15º Congresso Brasileiro de Polímeros (15º CBPOL), 2019, Bento Gonçalves/RS. Anais do 15º CBPOL, 2019.

Costa K.M.; Pereira, T. C. B.; Valente, C. A.; Soares, J. C.; Cruz, F. F.; Basso, N. R. S.; Bogo, M. R. Biocompatibility evaluation of PPy/*p*-TSA using zebrafish as a model organism. In: II Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology - Modern Toxicology for Health and Prevention, 2018, Porto Alegre/RS. Anais do II Latin American Congress of Clinical and Laboratorial Toxicology, 2018.

Costa K.M.; Pereira, T. C. B.; Valente, C. A.; Soares, J. C.; Cruz, F. F.; Basso, N. R. S.; Bogo, M. R. Biocompatibility evaluation of particulate PPy/*p*-TSA using zebrafish as a model organism. In: 1ST TERMIS-AM Workshop, 2018, Porto Alegre/RS. Anais do 1ST TERMIS-AM Workshop, 2018.

Valente, C. A.; Tondo, P. H. F.; Sgarioni, B.; Santos, S. A. M.; Malmonge, J. A. ; Papaleo, R. M.; Basso, N. R. S. Filmes poliméricas microestruturadas e condutoras para aplicação na Engenharia de Tecidos. In: 1ST TERMIS-AM Workshop, 2018, Porto Alegre/RS. Anais do 1ST TERMIS-AM Workshop, 2018.

Costa K.M.; Pereira, T. C. B.; Valente, C. A.; Soares, J. C.; Corte, T. W. F.; Basso, N. R. S.; Bogo, M. R. Adverse effects of polypyrrole particulate exposure in zebrafish (*danio rerio*) development. In: 11th FENS Forum of Neuroscience, 2018, Berlim/Alemanha. Anais do 11th FENS Forum of Neuroscience, 2018.

Pereira, T. C. B.; Costa K.M.; Valente, C. A.; Soares, J. C.; Cruz, F. F.; Basso, N. R. S.; Bogo, M. R. Zebrafish model in nanotoxicity evaluation: effects of polypyrrole (PPy/*p*-TSA) exposure on zebrafish early development. In: V Simpósio zebrafish

como modelo animal de pesquisa, 2018, Natal/RN. Anais do V Simpósio zebrafish como modelo animal de pesquisa, 2018.

Valente, C. A.; Tondo, P. H. F.; Sgarioni, B.; Santos, S. A. M.; Malmonge, J. A. ; Papaleo, R. M.; Basso, N. R. S. Preparação e caracterização de filmes de PCL/PLGA/PPY microestruturadas e semicondutoras para aplicação na Engenharia de Tecidos. In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais, 2018, Foz do Iguaçu/PR. Anais do 23º CBECiMat 2018.

Valente, C. A.; Santos, S. A. M.; Maraschin, T. G.; Correa, R. S.; Malmonge, J. A.; Basso, N. R. S. Síntese e caracterização de compósitos de polipirrol e óxido de grafeno reduzido. In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais, 2018, Foz do Iguaçu/PR. Anais do 23º CBECiMat 2018.

Oliveira, E. M. N.; Valente, C. A.; Maraschin, T. G.; Santos, S. A. M.; Selli, G. I.; Papaleo, R. M.; Corte, T. W. F.; Basso, N. R. S.; Correa, R. S. estudo da dispersão e estabilidade de partículas de polipirrol e óxido de grafeno em suspensões aquosas com variados agentes surfactantes. In: 23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais, 2018, Foz do Iguaçu/PR. Anais do 23º CBECiMat 2018.

Ferreira, C. L.; Valente, C. A.; Basso, N. R. S.; Zanini, M. L.; Sgarioni, B.; Tondo, P. H. F.; Chagastelles, P. C.; Campos, M. M.; Malmonge, J. A.; Silva, J. L. B. Síntese de nanocompósitos poliméricos PCL/PLGA/nanofibras de polipirrol para aplicação em conduto biocompatível para regeneração nervosa. In: 14º Congresso Brasileiro de Polímeros (14º CBPOL), 2017, Águas de Lindóia/SP. Anais do 14º CBPOL, 2017.

Oliveira, D. F.; Nahuis, L. E. C.; Malmonge, J. A.; Basso, N. R. S.; Valente, C. A. Fabricação e caracterização de microfibras poliméricas de PLGA e de compósito PLGA/PPY. In: 14º Congresso Brasileiro de Polímeros (14º CBPOL), 2017, Águas de Lindóia/SP. Anais do 14º CBPOL, 2017.

Costa K.M.; Pereira, T. C. B.; Valente, C. A.; Soares, J. C.; Cruz, F. F.; Basso, N. R. S.; Bogo, M.R. Biocompatibility evaluation of polypyrrole polymer using zebrafish as a model organism. In: 49th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE), 2017, Ribeirão Preto/SP. Anais do 49thSBFTE, 2017.

Valente, C. A.; Ferreira, C. L.; Sgarioni, B.; Tondo, P. H. F.; Zanini, M. L.; Malmonge, J. A.; Basso, N. R. S. The development of electrically conductive polycaprolactone/poly(L-lactic-co-glycolic acid)/polypyrrole composites for Tissue Engineering applications. In: XVI Brazil MRS Meeting (XVI Encontro da SBPMat), 2017, Gramado/ RS, 2017. Anais do XVI Brazil MRS Meeting 2017.

Costa K.M.; Valente, C. A.; Soares, J. C.; Cruz, F. F.; Basso, N. R. S.; Pereira, T. C. B.; Bogo, M. R. Biocompatibility evaluation of particulate polypyrrole using zebrafish as a model organism. In: XVI Brazil MRS Meeting (XVI Encontro da SBPMat), 2017, Gramado/ RS, 2017. Anais do XVI Brazil MRS Meeting 2017.

Valente, C. A.; Oliveira, E. M. N.; Selli, G. I.; Malmonge, J. A.; Basso, N. R. S.; Papaleo, R. M. Synthesis and Characterization of polypyrrole nanofibers with iron oxide nanoparticles. In: XVI Brazil MRS Meeting (XVI Encontro da SBPMat), 2017, Gramado/ RS, 2017. Anais do XVI Brazil MRS Meeting 2017.

Goncalves, R. V.; Liposki, I. Q. Valente, C. A.; Zanini, M. L.; Malmonge, J. A. ; Basso, N. R. S. Effects to the Cashew Nut Liquid Shell as Primary Dopant on the Morphology and electrical conductivity of Polyaniline. In: XVI Brazil MRS Meeting (XVI Encontro da SBPMat), 2017, Gramado/ RS, 2017. Anais do XVI Brazil MRS Meeting 2017.

Ferreira, C. L.; Valente, C. A.; Borsoi, A. F.; Sgarioni, B.; Zanini, M. L.; Malmonge, J. A.; Basso, N. R. S. Degradation of PCL/PLGA and PCL/PLGA/PPY membranes exposed to saline solution. In: Brazilian Conference on Composite Materials

Brazilian Conference on Composite Materials (BCCM-3), 2016, Gramado/RS. Anais do BCCM-3, 2016.

Costa K.M.; Soares, J. C.; Valente, C. A.; Cruz, F. F.; Basso, N. R. S.; Bogo, M. R. Biocompatibility evaluation of polypyrrole using Zebrafish as a model organism. In: 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE) and 21th Latin American Congress Pharmacology, 2016, Foz do Iguaçu /PR. Anais do 48th do SBFTE 2016.

Nicoletti, N. F.; Amaral, M. E. A.; Valente, C. A.; Basso, N. R. S.; Campo, M. M.; Silva, J. L. B. Polymer blending systems as strategies for nerve regeneration: biocompatibility evaluation. In: 48th Brazilian Congress of Pharmacology and Experimental Therapeutics (SBFTE) and 21th Latin American Congress Pharmacology, 2016, Foz do Iguaçu /PR. Anais do 48th do SBFTE 2016.

Valente, C. A.; Malmonge, J. A.; Zanini, M. L.; Basso, N. R. S. Avaliação das condições de síntese de nanofibras de polipirrol na presença do ácido p-toluenossulfônico. In: I Congresso Internacional sobre Nanotecnologia (I CINA) & IV Simpósio sobre Nanobiotecnologia e suas Aplicações, 2016, Novo Hamburgo/RS. Anais do I CINA, 2016.

Dias, L. W.; Garcez, G. R.; Valente, C. A.; Basso, N. R. S. Influence of polypyrrole nanofibers in the process of chitosan membranes degradation. In: XIV Brazilian MRS Meeting (XIV Encontro da SBPMat), 2015, Rio de Janeiro/RJ. Anais do XIV SBPMat 2015.

Garcez, G. R.; Basso, N. R. S.; Papaleo, R. M.; Valente, C. A.; Felippi, A. F. S. Degradation of microstructured PCL/PLGA films exposed to saline solutions. In: XIV Brazilian MRS Meeting (XIV Encontro da SBPMat), 2015, Rio de Janeiro/RJ. Anais do XIV SBPMat 2015.

Valente, C. A.; Pilar, F. D.; Dias, L. W.; Basso, N. R. S ; Matte, L. C.; Moura, C. S.; Silva, J. L. B. Influência da incorporação de nanofibras de polipirrol no processo de degradação de filmes de PLGA. In: 13º Congresso Brasileiro de Polímeros (13º CBPOL), 2015, Natal/RN. Anais do 13º CBPOL, 2015.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br