



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE MATERIAIS

Vanessa Oliveira Castro

Conduítes eletrofiados constituídos de fibras alinhadas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) com nanopartículas condutoras para a regeneração de nervos periféricos

Florianópolis
2022

Vanessa Oliveira Castro

Conduítes eletrofiados constituídos de fibras alinhadas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) com nanopartículas condutoras para a regeneração de nervos periféricos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Ciência e Engenharia de Materiais
Orientador: Profa. Dra. Claudia Merlini.
Coorientador: Prof. Dr. Sébastien Livi

Florianópolis
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Oliveira Castro, Vanessa

Conduítes eletrofiados constituídos de fibras alinhadas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) com nanopartículas condutoras para a regeneração de nervos periféricos / Vanessa Oliveira Castro ; orientadora, Profa. Dra. Claudia Merlini , 2022.
127 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciência e Engenharia de Materiais. 2. Conduítes. 3. Aditivos condutores. 4. eletrofiação. 5. nervos periféricos. I. , Profa. Dra. Claudia Merlini. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais. III. Título.

Vanessa Oliveira Castro

Conduítes eletrofiados constituídos de fibras alinhadas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) com nanopartículas condutoras para a regeneração de nervos periféricos

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Dra. Laura-Elena Sperling.
UNISINOS

Profa. Dra. Jhenifer Karvat Lorbiéski.
Universidade regional de Blumenau (FURB)

Profa. Dra. Andrea Cristiane Krause Bierhalz
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Ciência e Engenharia de Materiais .

Coordenação do Programa de
Pós-Graduação

Profa. Dra. Claudia Merlini.
Orientador

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado a todos que acreditam na ciência.

AGRADECIMENTOS

É imprescindível o meu agradecimento à rede de apoio mais constante e significativa que possuo: minha família. Com destaque aos meus pais, Rejane e Luíz, minhas tias, Aninha, Bernadete e Inês, e minha avó Marília, que fazem de tudo para que eu realize meus sonhos. Muito obrigada por proporcionarem suporte e carinho em todos os momentos.

Agradeço imensamente à Profa. Dra. Claudia Merlini, não apenas por ter sido uma excelente orientadora, presente e disponível, mas também por ter topado o desafio de embarcar comigo na pesquisa em Engenharia de Biomateriais. Obrigada pelo seu acolhimento, atenção, profissionalismo, suporte e dedicação durante todo esse tempo, nas orientações e ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Sebastien Livi pelo apoio durante o doutorado sanduíche em Lyon, pela ajuda no desenvolvimento de todo o trabalho e contribuições.

Agradeço aos colegas do laboratório Policom e aos colegas que fiz durante o doutorado sanduíche em Lyon, pela amizade, companheirismo e apoio em todos os momentos.

A todas as professoras da banca, pelas contribuições e disponibilidade.

Institucionalmente, agradeço ao Departamento À CAPES e ao Programa CAPES-PRINT pela concessão da bolsa de doutorado e doutorado sanduíche, respectivamente.

A todos que me apoiaram ao longo desse tempo.

*“Nunca tenha certeza de nada,
porque a sabedoria começa com a dúvida”*
(Sigmund Freud)

Parte desta tese foi publicada no seguinte periódico:

CASTRO, VANESSA OLIVEIRA; MERLINI, CLAUDIA . Aligned electrospun nerve conduits with electrical activity as a strategy for peripheral nerve regeneration. ARTIFICIAL ORGANS, v. 00, p. 1-6, 2021.

Parte desta tese foi publicada nos seguintes congressos científicos:

CASTRO, V. O.; MERLINI, C; LIVI, S; Effect of the ionic liquid Choline Bitartrate and the conductive filler polypyrrole on thermal stability and mechanical properties of PLGA electrospun mats,. In: XX B-MRS Meeting, in Foz Iguaçu-PR - Brazil, from 25th to 29th of September 2022.

CASTRO, V. O.; MERLINI, C; LIVI, S; Influence of Choline Bitartrate Ionic liquid on thermal and mechanical properties of PLGA/CNTs electrospun mats – GEP – SLAP in Donostia San Sebastián - Spain, from 8th -12th May, 2022.

CASTRO, V. O. ; MERLINI, C; Investigating electrical conductivity and morphology of aligned PPy-PLGA electrospun conduits for peripheral nerve regeneration,. In: the XIX Brazilian MRS Meeting, held in online format, from August 30th to September 03rd, 2021.

CASTRO, V. O. ; MERLINI, C: Electrical and Morphological properties of aligned PLGA/NTCs mats for tissue engineering,. In: 16th Brazilian Polymer Congress, in Ouro Preto – Brazil, from 24–28th, October, 2021.

RESUMO

Lesões em nervos periféricos podem causar inúmeros problemas na vida dos pacientes, tais como alterações sensoriais, dor e paralisias. O autoenxerto é considerado o reparo mais eficaz em casos de lesões graves em que a sutura direta não é aplicável. No entanto, o autoenxerto causa a perda de funcionalidade do sítio doador, e ainda, existe uma limitada disponibilidade de nervos doadores. Os conduítes de nervos surgem como uma alternativa ao autoenxerto. Alguns conduítes encontram-se disponíveis para o uso clínico, no entanto, ainda precisam ser otimizados para uma melhor resposta funcional do nervo. Assim, nesta tese, foram desenvolvidas membranas eletrofiadas constituídas de fibras alinhadas de poli (ácido láctico-co-ácido glicólico (PLGA) contendo três tipos de aditivos condutores, polipirrol (PPy), montmorilonita-polipirrol (Mt-PPy) e nanotubos de carbono (NTC), com microestrutura, propriedades elétricas, mecânicas e biológicas favoráveis para serem utilizados como conduítes de nervos. As membranas eletrofiadas foram preparadas a partir de duas rotas distintas: i) recobrimento da membrana eletrofiada de PLGA com PPy a partir da polimerização oxidativa *in situ* do monômero; ii) eletrofição direta, em que as membranas foram obtidas a partir da eletrofição de uma solução contendo o PLGA e os aditivos PPy, Mt-PPy dopados com ácido dodecil benzeno sulfônico (DBSA) e os NTC. Foi investigado os parâmetros apropriados para a eletrofição do PLGA, as condições apropriadas para um recobrimento homogêneo das fibras de PLGA com PPy e o efeito de diferentes frações mássicas de PPy, Mt-PPy e NTC na microestrutura, nas propriedades e na viabilidade celular *in vitro* das membranas eletrofiadas. Ademais, foi investigada a degradação *in vitro* das membranas de PLGA e PLGA/NTC. As rotas utilizadas no preparo das membranas eletrofiadas influenciaram diretamente nas propriedades elétricas e na citotoxicidade das membranas. As membranas de PLGA recobertas com polipirrol (PLGA-rec) apresentaram os maiores valores de condutividade elétrica, com aumento de 15 ordens em relação as membranas de PLGA. Também apresentaram aumento da hidrofiliçidade e nas propriedades mecânicas. No entanto, foram citotóxicas pelos resultados de viabilidade celular *in vitro*. As membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC degradaram-se *in vitro* em até 60 % em 12 semanas. Membranas eletrofiadas de PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-DBSA e PLGA/NTC obtidas por eletrofição direta apresentaram propriedades mecânicas e biológicas apropriadas para a aplicação. O aumento da fração mássica dos aditivos contribuiu para o aumento das propriedades térmicas e mecânicas das membranas. Os três grupos apresentaram viabilidade celular, entretanto, não houve diferença significativa na resposta biológica entre os grupos. Os maiores valores de condutividade elétrica foram apresentados pela membrana de PLGA/Mt-PPy.DBSA contendo 5 e 7,5 %m de Mt-PPy.DBSA, com aumento de 6 e 7 ordens de grandeza, respectivamente. Essa resposta foi atribuída à formação de uma rede condutora facilitada pela alta razão de aspecto do aditivo Mt-PPy.DBSA. Considerando as significativas mudanças na condutividade elétrica e as satisfatórias propriedades mecânicas e biológicas, as membranas eletrofiadas de PLGA/Mt-DBSA contendo 5 e 7,5 %m de Mt-PPy.DBSA apresentam grande potencial para serem utilizadas como conduítes eletrofiados para a regeneração de nervos periféricos.

Palavras-chave: Eletrofição, conduítes de nervos, polipirrol, montmorilonita, polimerização oxidativa *in situ*, nanotubo de carbono.

ABSTRACT

Peripheral nerve injuries can cause numerous problems in patients' lives, such as sensory changes, pain, and paralysis. Autograft is considered the most effective repair in cases of severe injuries where direct suturing is not applicable. However, autograft causes loss of functionality at the donor site, and still, there is limited availability of the donor nerves. Nerve conduits appear as an alternative to autograft. Some conduits are available for clinical use, however, still need to be optimized for a better functional nerve response. Thus, in this thesis, were developed electrospun membranes with aligned fibers, based on poly (lactic-co-glycolic acid) (PLGA) containing three types of conductive additives, polypyrrole (PPy), montmorillonite-polypyrrole (Mt-PPy) and carbon nanotubes (NTC) with microstructure, electrical and mechanical properties and biologically favorable to be used as nerves conduits in peripheral nerve regeneration. The electrospun membranes were prepared from two different routes: i) coating the electrospun PLGA membrane with PPy from the in situ oxidative polymerization of the monomer; ii) direct electrospinning technique, in which the membranes were obtained from the electrospinning of a mixture containing PLGA and the additives PPy, Mt-PPy doped with dodecyl benzene acid sulfonic acid (DBSA) and NTC. The appropriate electrospinning parameters of the PLGA were investigated, as well as, the appropriate conditions for a homogeneous coating of PLGA fibers with PPy and the effect of the amount of PPy, Mt-PPy and NTC, on the microstructure, on the properties and cell viability of the electrospun membranes. Additionally, it was investigated the degradation in vitro of PLGA and PLGA/NTC membranes. The route of preparation of the electrospun membranes directly influenced on the electrical properties and the cytotoxicity of membranes. Polypyrrole-coated PLGA membranes (PLGA-rec) showed the highest electrical conductivity values among all groups, with an increase of 15 orders compared to PLGA membranes. Also, showed increase in hydrophilicity, and mechanical properties suitable for this application. However, they were cytotoxic according to in vitro cell viability results. Electrospun PLGA and PLGA/NTC membranes degraded by up to 60% in 12 weeks. Electrospun PLGA/PPy.DBSA and PLGA/Mt-DBSA and PLGA/NTC membranes obtained by direct electrospinning showed appropriate mechanical and biological properties for application as nerve conduits. The increase in the mass fraction of the conductive additives contributed to an increase in the thermal and mechanical properties of the membranes. All three groups presented cellular viability, however, there was no significant difference in the biological response between the groups. The highest values of electrical conductivity were obtained by PLGA/Mt-PPy.DBSA membrane containing 5 and 7.5 wt% of Mt-PPy.DBSA, with an increase of 6 and 7 orders of magnitude, respectively. This behavior was attributed to the formation of a conductive network facilitated by the high aspect ratio of the additive Mt-PPy.DBSA. Considering the significant changes in electrical conductivity and satisfactory mechanical and biological properties, electrospun PLGA/Mt-DBSA membranes containing 5 and 7.5 wt% of Mt-PPy.DBSA have great potential to be used as electrospun nerve conduits in peripheral nerve regeneration.

Keywords: Electrospinning, nerve conduits, polypyrrole, montmorillonite, in situ oxidation polymerization, carbon nanotube.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Anatomia da medula espinal e de suas raízes (WRIGHT, 2016).	25
Figura 2 – Anatomia do nervo periférico, adaptada de (GRINSELL; KEATING, 2014).	26
Figura 3 – Representação esquemática das principais técnicas utilizadas no reparo de nervos periféricos (TUTUROV, 2019).	29
Figura 4 – Gerações de conduítes de nervo, adaptado de (GAUDIN <i>et al.</i> , 2016).	30
Figura 5 – Processo de regeneração dentro do conduíte, adaptado (DALY <i>et al.</i> , 2011).	33
Figura 6 – Representação esquemática da configuração básica de um equipamento de eletrofiação, desenvolvido pela autora.	35
Figura 7 – Micrografia MEV de fibras eletrofiadas: a) aleatoriamente distribuídas e b) alinhadas. (STACHEWICZ <i>et al.</i> , 2015)	37
Figura 8 – Efeito da concentração polimérica em fibras eletrofiadas de PCL. a) 12 %m/v, b) 15 %m/v, c) 18 %m/v, d) 20 %m/v, (LIVERANI; BOCCACCINI, 2016).	38
Figura 9 – Ilustração da cadeia conjugada do polímero condutor poliacetileno, adaptada de (PALZA; ZAPATA; ANGULO-PINEDA, 2019).	40
Figura 10 – Estrutura química de alguns polímeros condutores, adaptado de (BHADRA <i>et al.</i> , 2009).	41
Figura 11 – Diagrama eletrônico de energia (a) PPy.DBSA neutro, (b) polaron, (c) bipolaron e (d) PPy completamente dopado, adaptado de (S.H. CHO; LEE, J.Y., 2010).	43
Figura 12 – Estrutura eletrônica do (a) PPy neutro, (b) polaron e (c) bipolaron, adaptado de (S.H. CHO; LEE, J.Y., 2010).	43
Figura 13 – Reação convencional da síntese química oxidativa do polipirrol com o oxidante FeCl ₃ , adaptado de (GREEN <i>et al.</i> , 2010).	44
Figura 14 – Estrutura dos nanotubos em função da quiralidade (zigzag, chiral e armchair), adaptado de (TÎLMACIU; MORRIS, 2015).	46
Figura 15 – Estrutura química do L-PLGA.	47
Figura 16 – Conduíte comercial aprovado pela FDA, Neuragen®, adaptado de (TAN; RAJADAS; SEIFALIAN, 2012).	51
Figura 17 – Conduíte comercial aprovado pela FDA, Neurotube®, adaptado de (TAN; RAJADAS; SEIFALIAN, 2012).	52
Figura 18 – Conduíte comercial aprovado pela FDA, Neurolac®, adaptado de (TAN; RAJADAS; SEIFALIAN, 2012).	53
Figura 19 – Fibras alinhadas de PLLA, obtidas por eletrofiação (ZOU <i>et al.</i> , 2016).	54

Figura 20 – Microscopia confocal de células PC12 aderidas após 1 dia de cultura em fibras eletrofiadas de PLGA (a) aleatoriamente distribuídas e (b) alinhadas, adaptado (KIM <i>et al.</i> , 2016).	55
Figura 21 – Microscopia confocal de células de Schwann (SC) aderidas após 3 dias de cultura em fibras eletrofiadas de PCL (a) aleatoriamente distribuídas e (b) alinhadas, adaptado (CHEW <i>et al.</i> , 2008).	55
Figura 22 – Microscopia MET da espessura da bainha de mielina, em 8 semanas pós operatório: (a) conduíte de proteína da seda/P(LLA-CL) e (b) autoenxerto, (WANG, C. Y. <i>et al.</i> , 2011).	56
Figura 23 – Esquema ilustrativo da síntese oxidativa do pirrol para obtenção do aditivo condutor PPy.DBSA.	63
Figura 24 – Esquema ilustrativo da síntese oxidativa do pirrol na presença da argila montmorilonita (Mt) para a obtenção do aditivo condutor Mt-PPy.DBSA.	64
Figura 25 – Fluxograma da metodologia utilizada na preparação das membranas eletrofiadas de PLGA e aditivos nanoestruturados condutores.	65
Figura 26 – Esquema ilustrativo da polimerização oxidativa <i>in situ</i> do pirrol (Py) na presença da membrana eletrofiada de PLGA.	66
Figura 27 – Esquema ilustrativo da preparação da solução de PLGA contendo aditivos nanoestruturados condutores.	67
Figura 28 – Procedimento realizado para obter o conduíte eletrofiado (KIM <i>et al.</i> , 2016).	68
Figura 29 – Equipamento DMA/SDTA 861E, Mettler Toledo, durante o ensaio de DMA.	70
Figura 30 – Equipamento MTS/2M durante o ensaio de tração.	71
Figura 31 – Fotografia do dispositivo para medição da condutividade elétrica pelo método de 4 pontas.	72
Figura 32 – Fotografia do dispositivo para medição da resistividade elétrica pelo método de 2 pontas.	73
Figura 33 – (a-b) Micrografia MEV das fibras de PLGA e (c-d) PLGA recobertas com polipirrol via polimerização <i>in situ</i> do pirrol.	76
Figura 34 – (a) Curva de distribuição dos diâmetros e (b) Box-plot da distribuição dos diâmetros das fibras de PLGA e PLGA-rec (n = 100).	76
Figura 35 – (a) Histograma da média do ângulo de contato das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/PPy recoberto (dados apresentados como média \pm desvio padrão, n = 5), (b) PLGA e (c) PLGA-rec.	77
Figura 36 – Espectro FTIR das membranas de PLGA, PLGA-rec e do aditivo condutor PPy.DBSA.	78

Figura 37 – Curvas de (a) TG e (b) DrTG do aditivo condutor PPy.DBSA e das membranas de PLGA e PLGA-rec.	79
Figura 38 – Curvas de DMA (a) módulo de armazenamento e (b) $\tan \delta$ em função da temperatura para as membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec.	80
Figura 39 – Curva de tração das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec.	81
Figura 40 – Viabilidade celular das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec nos dias 1, 3 e 7 após o cultivo celular.	82
Figura 41 – Morfologia das células de linhagem neural PC12 semeadas após 7 dias sobre as membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec (histoquímica).	82
Figura 42 – Micrografia MEV dos aditivos condutores nanoestruturados. (a) PPy.DBSA e (b) Mt-PPy.DBSA.	84
Figura 43 – Micrografia MET dos aditivos condutores nanoestruturado. (a) PPy.DBSA e (b) Mt-PPy.DBSA.	85
Figura 44 – Micrografia MEV e MEV-FEG das membranas eletrofiadas. (a-b) PLGA, (c-d) PLGA/PPy.DBSA_2,5, (e-f) PLGA/PPy.DBSA_5 e (g-h) PLGA/PPy.DBSA_7,5. Aumentos de 2000x e 20000x.	86
Figura 45 – Micrografia MEV e MEV-FEG das membranas eletrofiadas. (a-b) PLGA, (c-d) PLGA/Mt-PPy.DBSA_2,5, (e-f) PLGA/Mt-PPy.DBSA_5 e (g-h) PLGA/Mt-PPy.DBSA_7,5. Aumentos de 2000x e 20000x. . . .	87
Figura 46 – (a) Curva de distribuição dos diâmetros e (b) Box-plot da distribuição dos diâmetros das fibras de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DSBA (n = 100).	88
Figura 47 – Micrografia MET de uma única fibra (a) PLGA, (b) PLGA/PPy.DBSA_5 e (c) PLGA/Mt-PPy.DBSA_5.	88
Figura 48 – Ângulo de contato das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.	89
Figura 49 – Curvas de DSC referente ao primeiro ciclo de aquecimento das membranas eletrofiadas de (a) PLGA, (b) PLGA/PPy.DBSA e (c) PLGA/Mt-PPy.DBSA.	90
Figura 50 – Curvas de DSC referente ao segundo ciclo de aquecimento das membranas eletrofiadas de (a) PLGA, (b) PLGA/PPy.DBSA e (c) PLGA/Mt-PPy.DBSA.	90
Figura 51 – Curvas de (a) TG e (b) DrTG dos aditivos condutores PPy.DBSA, Mt-PPy.DBSA e das membranas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.	92
Figura 52 – Curvas de DMA (a) módulo de armazenamento e (b) $\tan \delta$ em função da temperatura para as membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.	93

Figura 53 – Propriedades mecânicas das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA, PLGA/Mt-PPy.DBSA.	94
Figura 54 – Viabilidade celular das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA, nos dias 1, 3 e 7 após o cultivo celular.	97
Figura 55 – Morfologia das células PC12 semeadas após 7 dias sobre as membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA (histoquímica). As setas representam o direcionamento das células.	97
Figura 56 – Micrografias (a) MEV e (b) MET do aditivo condutor nanotubo de carbono.	100
Figura 57 – Micrografias MEV e MEV-FEG das membranas eletrofiadas. (a-b) PLGA, (c-d) PLGA/NTC_0,25, (e-f) PLGA/NTC_0,5 e (g-h) PLGA/NTC_0,75. Aumentos de 2000x e 20000x.	101
Figura 58 – (a) Curva de distribuição de diâmetros das fibras e (b) Box-plot da distribuição dos diâmetros das fibras de PLGA e PLGA/NTC (n = 100).	102
Figura 59 – Micrografia MET de uma fibra de PLGA/NTC_0,5.	102
Figura 60 – Ângulo de contato das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.	103
Figura 61 – Curvas DSC referente ao primeiro ciclo de aquecimento das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.	104
Figura 62 – Curvas DSC referente ao segundo ciclo de aquecimento das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.	104
Figura 63 – Curvas de (a) TG e (b) DrTG do aditivo condutor NTC e das membranas de PLGA e PLGA/NTC.	105
Figura 64 – Curvas de DMA (a) módulo de armazenamento e (b) tan δ em função da temperatura para as membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.	107
Figura 65 – Propriedade mecânicas, módulo de elasticidade (E), resistência máxima à tração (σ) e deformação na ruptura, das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.	108
Figura 66 – Variação de massa molar Mw das membranas de PLGA e PLGA/NTC obtidos pelo método SEC.	109
Figura 67 – Viabilidade celular das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC, nos dias 1, 3 e 7 após o cultivo celular.	110
Figura 68 – Morfologia das células de linhagem neural PC12 semeadas após 7 dias sobre as membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC (histoquímica). As setas representam o direcionamento das células.	111
Figura 69 – Processo de obtenção do protótipo do conduíte eletrofiado, realizado previamente ao procedimento cirúrgico.	113
Figura 70 – Micrografia MEV de um conduíte eletrofiado de PLGA. (a) com aumento de 40x e (b) com aumento de 200x.	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Conduítes obtidos por diferentes materiais e processamentos.	34
Tabela 2 – Valores de condutividade elétrica de alguns polímeros condutores, adaptado de (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014).	42
Tabela 3 – Principais conduítes biodegradáveis aprovados pela FDA.	50
Tabela 4 – Diferentes conduítes eletrofiados com aditivos condutores, analisados por ensaios biológico, com estímulo elétrico externo.	58
Tabela 5 – Diferentes conduítes eletrofiados com aditivos condutores, analisados em ensaios biológicos, sem estímulo elétrico externo.	60
Tabela 6 – Algumas propriedades dos nanotubos de paredes múltiplas.	62
Tabela 7 – Propriedades mecânicas, módulo de elasticidade (E), resistência máxima à tração (σ) e deformação na ruptura, das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA-rec e de um nervo humano.	81
Tabela 8 – Resultados de DSC referente ao primeiro ciclo de aquecimento das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.	91
Tabela 9 – Resumo dos resultados obtidos pelas curvas de TG e DrTG.	92
Tabela 10 – Resumo dos resultados obtidos pelas curvas DMA para as membranas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.	94
Tabela 11 – Valores de condutividade elétrica das membranas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.	96
Tabela 12 – Resultados de DSC referente ao primeiro e segundo ciclos de aquecimento das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.	105
Tabela 13 – Resumo dos resultados obtidos pelas curvas de TG e DrTG.	106
Tabela 14 – Módulo de armazenamento (E'), intervalo de temperatura com E' constante e transição vítrea (Tg) obtidos pelo ensaio de DMA para as membranas de PLGA e PLGA/NTC.	106
Tabela 15 – Valores de condutividade elétrica das membranas de PLGA e PLGA/NTC.109	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATR	Reflexão Total atenuada
Cloreto Ferrico	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DBSA	Ácido dodecil benzeno sulfônico
DCE	Dicloroetano
DMA	Análise Termodinâmica-Mecânica
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
E'	Módulo de armazenamento
FDA	Food and Drug Administration
FTIR	Espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier
HCl	Ácido Clorídrico
LABMAT	Laboratório de Materiais
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MEC	Matriz extracelular
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
Mt	Montmorilonita
Mt-PPy.DBSA	Montmorilonita-Polipirrol
MTT	(3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Brometo de difeniltetrazólio
NPs	Nervos Periféricos
NTC	Nanotubos de Carbono
P(LLA-CL)	Poli(L-lactídeo-co-epsilon-caprolactona)
PBS	Solução tampão fosfato-salino
PC12	Linhagem celular derivada de feocromocitoma de rato
PCL	Policaprolactona
PFA	Paraformaldeído
PGA	Poli (ácido glicólico)
pH	Potencial Hidrogeniônico
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
POLICOM	Laboratório de Polímeros e Compósitos
PPy.DBSA	Polipirrol
SCs	células de Schwann
SEC	Cromatografia por exclusão de tamanho
SNC	Sistema Nervoso Central

SNP	Sistema Nervoso periférico
TEM	Microscópio eletrônico de transmissão
Tf	Temperatura de fusão
Tg	Temperatura de transição vítrea
TGA	Análise Termogravimétrica
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
Xc	Grau de cristalinidade

LISTA DE SÍMBOLOS

S/cm	Siemens por centímetro
mV	milivolts
$\%m$	Fração mássica
σ	Condutividade elétrica
ρ	Resistividade elétrica
μL	microlitro
$^{\circ}$	Graus
$^{\circ}C$	Graus Celsius
$\%$	Porcentagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
1.1	OBJETIVOS	23
1.1.1	Objetivo Geral	23
1.1.2	Objetivos Específicos	23
2	NERVOS PERIFÉRICOS	25
2.1	ANATOMIA DE NERVOS PERIFÉRICOS	25
2.2	LESÕES EM NERVOS PERIFÉRICOS	26
2.3	ESTRATÉGIAS PARA O REPARO DE NERVOS PERIFÉRICOS LESIONADOS	27
3	CONDUÍTES DE NERVOS	30
4	ELETROFIAÇÃO	35
5	ADITIVOS NANOESTRUTURADOS CONDUTORES	40
5.1	POLÍMEROS INTRINSECAMENTE CONDUTORES	40
5.1.1	Polipirrol e Polipirrol/montmorilonita	42
5.2	NANOTUBO DE CARBONO	45
6	PLGA	47
7	TRABALHOS CORRELATOS	50
7.1	CONDUÍTES COMERCIAIS APROVADOS PELA FDA	50
7.2	TERCEIRA GERAÇÃO DE CONDUÍTES	54
7.2.1	Conduítes eletrofiados com estrutura alinhada	54
7.2.2	Conduítes eletrofiados condutores	57
7.3	DESAFIOS NO DESENVOLVIMENTO DE CONDUÍTES	60
8	MATERIAIS E MÉTODOS	62
8.1	MATERIAIS	62
8.2	SÍNTESE DO POLÍMERO CONDUTOR PPY.DBSA	62
8.3	SÍNTESE DO POLÍMERO CONDUTOR MT-PPY.DBSA	63
8.4	MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA	65
8.5	PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA COM ADITIVOS NANOESTRUTURADOS CONDUTORES	65
8.5.1	Membranas eletrofiadas de PLGA recobertas com PPy	66
8.5.1.1	Membranas eletrofiadas de PLGA/PPy.DBSA, PLGA/Mt-PPy.DBSA e PLGA/NTC	67
8.6	DESENVOLVIMENTO DO CONDUÍTE DE NERVO	68
8.7	CARACTERIZAÇÃO	68
8.7.1	Microscopia eletrônica de varredura - MEV	68
8.7.2	Microscopia eletrônica de transmissão - MET	69
8.7.3	Ângulo de contato	69

8.7.4	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR	69
8.7.5	Calorimetria exploratória diferencial - DSC	69
8.7.6	Análise termogravimétrica - TGA	70
8.7.7	Análise termodinâmica-mecânica - DMA	70
8.7.8	Teste de tração	71
8.7.9	Condutividade elétrica pelo método de 4 pontas	71
8.7.10	Condutividade elétrica pelo método de 2 pontas	72
8.8	DEGRADAÇÃO	73
8.9	ENSAIO <i>IN VITRO</i>	73
8.9.1	Ensaio de viabilidade celular	74
8.9.2	Histoquímica	74
8.9.3	Análise estatística	74
9	RESULTADOS E DISCUSSÕES	75
9.1	MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA RECOBERTAS COM PPY	75
9.1.1	Considerações parciais	82
9.2	MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA/PPY.DBSA E PLGA/MT-PPY.DBSA	84
9.2.1	Considerações parciais	98
9.3	MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA/NTC	100
9.3.1	Considerações parciais	111
9.4	DESENVOLVIMENTO DO CONDUÍTE ELETROFIADO	113
10	CONCLUSÕES	114
11	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	116
	REFERÊNCIAS	117

1 INTRODUÇÃO

Lesão em nervos periféricos é um problema que prejudica a qualidade de vida de pacientes em todo o mundo (BELKAS *et al.*, 2004). Estima-se que anualmente um milhão de pessoas no mundo são afetadas com esta lesão (DALY *et al.*, 2011). Identifica-se, dentre as causas que podem gerar danos aos nervos, acidentes automobilísticos, lacerações, desastres naturais e demais traumas. Esse tipo de lesão, frequentemente, resulta em dolorosas neuropatias, que são ocasionadas pela redução da função motora e da percepção sensorial do paciente. Em casos graves, em que há a completa ruptura do nervo, um reparo cirúrgico torna-se necessário para restabelecer a funcionalidade do nervo (ARSLANTUNALI *et al.*, 2014).

A estratégia de reparo cirúrgico adotada relaciona-se ao tamanho do defeito do nervo. Quando é possível a aproximação dos segmentos rompidos sem gerar tensão no nervo, a técnica de sutura direta é utilizada para religar os segmentos (CHIONO; TONDA-TURO, 2015). No entanto, em caso de defeitos largos (> 5 mm) ou quando existe tensão durante a sutura, a técnica mais eficaz a ser empregada é o autoenxerto (BELKAS *et al.*, 2004). Nesta técnica, uma seção de nervo, que é retirada do próprio paciente (nervo autólogo), é inserida com o objetivo de atuar como uma ponte entre os segmentos rompidos. Utiliza-se o autoenxerto em defeitos de até 5 cm de comprimento (ARSLANTUNALI *et al.*, 2014). Devido às características de nervo autólogo, o autoenxerto provém propriedades que biomimetizam o ambiente, favorecendo a regeneração do nervo. Contudo, o nervo autólogo é retirado de outra parte do corpo do paciente, submetendo-o a mais um procedimento cirúrgico. Esta retirada ocasiona na perda da função do sítio doador e outras complicações pós-operatórias. Adicionalmente, existe a disponibilidade limitada de sítios doadores e a incompatibilidade de diâmetros entre o nervo do sítio doador e do sítio receptor (GAUDIN *et al.*, 2016).

Para superar as desvantagens provenientes do autoenxerto, o uso de conduítes de nervos surgiu como uma proposta promissora na regeneração de nervos periféricos. Os conduítes foram inicialmente baseados em tubos ocos não porosos ou tubos ocos porosos, os quais tinham a finalidade de religar os segmentos de nervo e fornecer suporte estrutural para a regeneração. Estes conduítes são classificados como conduítes de primeira e segunda geração, respectivamente. A FDA aprovou o uso de alguns destes conduítes, sendo considerados os mais relevantes o NeuraGen®, o Neurotube® e o Neurolac® (KEHOE; ZHANG, X. F.; BOYD, 2012). Estes conduítes comerciais, apresentam resultados clínicos comparáveis com o autoenxerto em defeitos de até 2 cm. Entretanto, apresentam algumas desvantagens, tais como, relacionadas ao tempo de degradação e a microestrutura. No caso do NeuraGen®, que possui um longo tempo de degradação (36 - 48 meses), há a possibilidade de compressão do nervo e consequente reação inflamatória (KEHOE; ZHANG, X. F.; BOYD, 2012). Por outro lado,

em curto tempo de degradação como no Neurotube® (3 meses), há a redução das propriedades mecânicas, podendo comprometer a função estrutural do conduíte. Estes conduítes apresentam microestrutura de tubos ocos não porosos ou tubos ocos porosos. No entanto, essa microestrutura apresenta limitações na biomimetização do ambiente em regeneração. Essas limitações restringem suas aplicações e podem resultar em uma recuperação funcional limitada quando comparada ao autoenxerto (DALY *et al.*, 2011).

Para suprir as limitações dos conduítes comerciais, e além disso, atingir ou ultrapassar a eficácia do autoenxerto, diferentes combinações de materiais e técnicas de processamento são consideradas na produção de conduítes. Isto caracteriza a chamada terceira geração de conduítes (GAUDIN *et al.*, 2016). No que diz respeito ao material utilizado na obtenção destes conduítes, primeiramente espera-se que o mesmo seja biocompatível e biodegradável. Dessa maneira, evita-se uma resposta inflamatória exacerbada e elimina-se a necessidade de uma segunda cirurgia para a retirada do conduíte (GAUDIN *et al.*, 2016). Outro fator importante é o tempo de degradação do material. As primeiras 10 - 12 semanas após a lesão do nervo são consideradas críticas para uma recuperação funcional satisfatória. Assim, o material deve ter tempo de degradação de no mínimo 12 semanas (YU *et al.*, 2011). Portanto, deve ser considerado um material com tempo de degradação compatível com o processo de regeneração. Quanto à técnica de processamento, é interessante que seja capaz de produzir estruturas flexíveis, para assim evitar que haja a compressão do nervo. A estrutura obtida também deve ser porosa, a fim de possibilitar a difusão de biomoléculas essenciais, e ao mesmo tempo, atuar como barreira celular, impedindo a infiltração de tecidos fibrosos. Ainda, a estrutura deve ser mecanicamente resistente para suportar a regeneração e o procedimento cirúrgico (YU *et al.*, 2011). Espera-se que o conduíte apresente resistência mecânica próxima a de um nervo autólogo humano (6,5 - 8,5 MPa) (CHIONO; TONDA-TURO, 2015). Além destes fatores, estudos na literatura, consideram promissor o desenvolvimento de conduítes com estrutura alinhada e com propriedades elétricas (LEE, Jae *et al.*, 2009; WANG, J. *et al.*, 2018).

Os materiais comumente utilizados na terceira geração de conduítes são os polímeros sintéticos biodegradáveis, como o poli (ácido láctico) (PLA), o poli (ácido glicólico) e o poli (ácido láctico-co- ácido glicólico) (PLGA). Estes materiais são considerados principalmente por apresentarem biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas satisfatórias (ARSLANTUNALI *et al.*, 2014). Dentre eles, o PLGA destaca-se em virtude de possuir tempo de degradação ajustável de acordo com a isomeria e proporção de seus monômeros. O tempo de degradação do PLGA pode variar de semanas até vários meses, o que o torna um material relevante para aplicação em regeneração de nervos periféricos (LUIS *et al.*, 2007).

A respeito das técnicas de processamento, identifica-se como as mais recorrentes no desenvolvimento de conduíte de terceira geração, as técnicas de lixiviação (KOKAI *et al.*, 2009), liofilização (HUANG, J. *et al.*, 2012) e eletrofiação (PANSERI *et al.*, 2008). Dentre elas, a técnica de eletrofiação destaca-se devido principalmente a versatilidade em eletrofiar diversos polímeros naturais e sintéticos, além de prover microestrutura em micro e nano escala. A eletrofiação possibilita a produção de conduítes constituídos de fibras com estrutura altamente porosa e mecanicamente resistente. Além disso, essa técnica ainda permite o alinhamento das fibras eletrofiadas, o que é favorável para a regeneração de nervos periféricos. Segundo o que é apresentado em Kim *et al.* (2016), verificou-se que fibras alinhadas de PLGA apresentaram maior alongamento celular em comparação com fibras não alinhadas. Em um estudo similar, foi verificada uma maior maturação de quando semeadas sobre fibras alinhadas de PCL (CHEW *et al.*, 2008). Dessa maneira, o uso de fibras eletrofiadas alinhadas contribui positivamente no processo de regeneração do nervo.

A terceira geração de conduítes considera também como uma estratégia relevante agregar propriedades elétricas aos conduítes. As células neurais são suscetíveis à estímulos elétricos, assim conduítes condutores apresentam potencial em propagar estes estímulos elétricos e, conseqüentemente, estimular a regeneração de nervos. Isto porque os estímulos elétricos podem favorecer a diferenciação e proliferação celular (SHRESTHA, B. K. *et al.*, 2018). Ainda, é possível aplicar estímulos elétricos provenientes de uma fonte externa, com intuito de potencializar a resposta elétrica dos conduítes. Para a obtenção de conduítes condutores são utilizados materiais condutores em combinação com polímeros biodegradáveis. Essa combinação é necessária devido à natureza frágil dos materiais condutores (SUN *et al.*, 2018). Dentre os materiais condutores mais empregados, destacam-se o PPy.DBSA e o NTC, por apresentarem excelentes propriedades elétricas e biocompatibilidade (SUDWILAI *et al.*, 2014; WANG, J. *et al.*, 2018). Já para a obtenção de conduítes eletrofiados condutores, duas rotas são comumente utilizadas: o recobrimento das fibras via polimerização química oxidativa *in situ* do pirrol ou a incorporação de aditivos condutores, como o PPy.DBSA ou NTC, à solução polimérica e posterior eletrofiação.

Lee *et al.* (2009) analisaram o efeito da combinação de fibras alinhadas de PLGA recobertas com PPy.DBSA submetidas ao estímulo elétrico externo em teste *in vitro*. Foi observado o aumento da extensão e proliferação celular com a aplicação de estímulo elétrico externo. No entanto, não foi localizado estudo posterior *in vivo*. Wang *et al.* (2018), incorporaram NTC em fibras eletrofiadas alinhadas de PLGA e as submeteram ao estímulo elétrico externo em teste *in vitro*. Houve um aumento da diferenciação celular e da mielinização de SCs com aplicação de estímulo elétrico externo. Da mesma maneira, não foi localizado estudo posterior *in vivo*. Outros estudos obtiveram resultados promissores em conduíte eletrofiados condutores sem estímulo

elétrico externo (SHAFEI *et al.*, 2017; SHRESTHA, B. K. *et al.*, 2018; JING *et al.*, 2018). Por esse motivo, não existe um consenso da necessidade do uso do estímulo elétrico externo. Shafei *et al.* (2017), constataram o aumento da diferenciação e crescimento celular em fibras eletrofiadas alinhadas de PCL recobertas com PPy.DBSA sem estímulo elétrico externo. Jing *et al.* (2018) inseriram fibras eletrofiadas alinhadas de PLGA recobertas com PPy.DBSA dentro um condúite tubular oco não poroso de PLGA /PPy.DBSA . Os resultados dos ensaios *in vivo*, sem estímulo elétrico externo, foram comparáveis ao autoenxerto. Apesar deste condúite ser constituído internamente de fibras eletrofiadas alinhadas, sua estrutura exterior é rígida e não porosa. E como discutido anteriormente, uma estrutura flexível e porosa é essencial para potencializar a regeneração. No entanto, não foram identificados estudos detalhados sobre o uso condúite constituídos apenas de fibras eletrofiadas alinhadas de PLGA recobertas com PPy.DBSA. Também foi identificada a ausência de estudos que consideram a incorporação de aditivos condutores em fibras eletrofiadas, principalmente os aditivos PPy.DBSA e Mt-PPy.DBSA.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver membranas eletrofiadas de PLGA contendo aditivos nanoestruturados condutores com microestrutura, propriedades físico-químicas, elétricas, mecânicas e biológicas favoráveis para serem utilizados como condúites para a regeneração de nervos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Investigar os parâmetros apropriados para a obtenção de fibras eletrofiadas de PLGA alinhadas, homogêneas e sem defeitos.
- Avaliar a viabilidade de revestimento de membranas eletrofiadas alinhadas de PLGA com PPy através da polimerização oxidativa *in situ* do pirrol e mensurar as mudanças de propriedades térmicas, elétricas, mecânicas e biológicas ocasionadas pelo revestimento de polipirrol na superfície das fibras de PLGA.
- Avaliar a influência do uso de diferentes tipos e frações mássicas dos aditivos condutores, PPy.DBSA, Mt-PPy.DBSA e NTC, em membrana obtidas a partir da eletrofiação direta da solução de PLGA contendo os aditivos condutores, na microestrutura, nas propriedades térmicas, elétricas, mecânicas e biológicas das membranas.

- Avaliar a influência da rota de processamento nas propriedades, na microestrutura e na resposta biológica das membranas eletrofiadas.
- Investigar o tempo de degradação *in vitro* das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA contendo nanotubos de carbono por ensaios de cromatografia por exclusão de tamanho (SEC).
- Avaliar a citotoxicidade de todos os grupos de membranas eletrofiadas.
- Desenvolver um protótipo de um condúite eletrofiado de acordo com os dimensões obtidas de condúite comercial.

2 NERVOS PERIFÉRICOS

2.1 ANATOMIA DE NERVOS PERIFÉRICOS

Os nervos periféricos (NPs) estabelecem a conexão entre o corpo e o sistema nervoso central (SNC). Esses nervos estendem-se por todo o corpo, sendo componentes essenciais do sistema nervoso autônomo e somático. As terminações dos NPs encontram-se em músculos, tecido conectivo, pele e outros órgãos. Sendo assim, sem os NPs não existiriam movimentos ou sensações (ZOCHODNE, 2008). No entanto, como os NPs estão presentes em tecidos por todo corpo, são frequentemente lesionados devido à traumas ou doenças (CIRILLO *et al.*, 2018).

O SNC é formado pelo encéfalo e pela medula espinal, enquanto o SNP é formado por nervos, gânglios e terminações nervosas. Os nervos são classificados em dois tipos: nervos cranianos e nervos espinais. Nervos cranianos estão ligados ao encéfalo, e nervos espinais, estão ligados à medula espinal (WRIGHT, 2016). Quanto a sua constituição, os nervos são constituídos por longas fibras nervosas ¹ que podem estender-se a mais de um metro de distância do núcleo do neurônio (CIRILLO *et al.*, 2018). Os núcleos dos neurônios motores espinais localizam-se dentro da medula espinal, enquanto os núcleos dos neurônios sensoriais espinais localizam-se dentro de gânglios. Os nervos espinais são nervos mistos, ou seja, constituídos de axônio motores, provenientes de uma raiz ventral e axônios sensoriais, provenientes de uma raiz dorsal, conforme apresentado na Figura1 (MACHADO; HAERTEL, 2014).

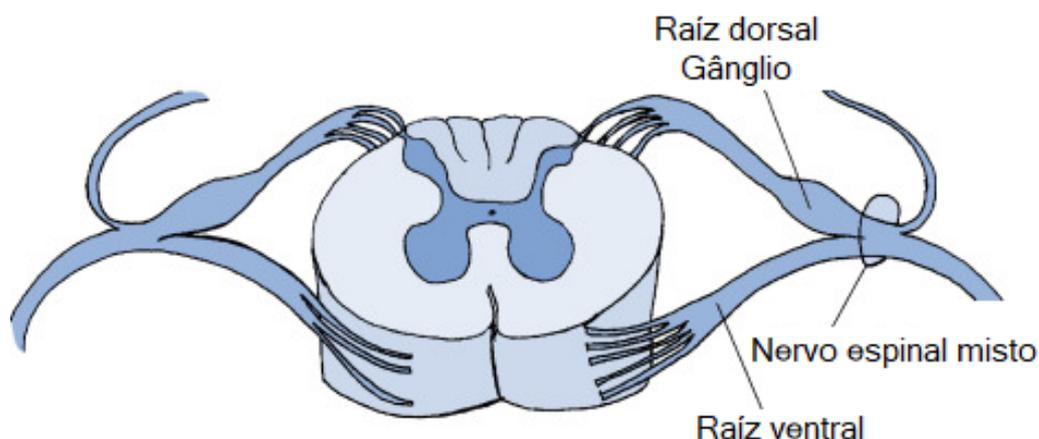


Figura 1 – Anatomia da medula espinal e de suas raízes (WRIGHT, 2016).

¹ As fibras nervosas são formadas pelo prolongamento citoplasmático de neurônio motores ou sensoriais, chamado axônio, que por sua vez são envoltos por camadas de bainha de mielina

A seção transversal de um nervo periférico é apresentada na Figura 2. Os nervos apresentam um envoltório de tecido conjuntivo rico em vasos sanguíneos, chamado epineuro. Em seu interior, fibras nervosas agrupadas em feixes, denominados fascículos, são envoltas por uma camada de tecido conjuntivo chamada perineuro (GRINSELL; KEATING, 2014). A quantidade de fascículos em um nervo pode variar de um a mais de 100, dependendo do tamanho e da complexidade do nervo (CIRILLO *et al.*, 2018). Dentro de cada fascículo o endoneuro envolve cada fibra nervosa. As fibras nervosas, por sua vez são envoltas por camadas de bainha de mielina. No SNP a bainha de mielina é sintetizada pelas SCs, que são espaçadas entre si por nódulos de Ranvier. As células de Schwann (SCs) juntamente com os nódulos de Ranvier facilitam a rápida condução do impulso nervoso (CIRILLO *et al.*, 2018).

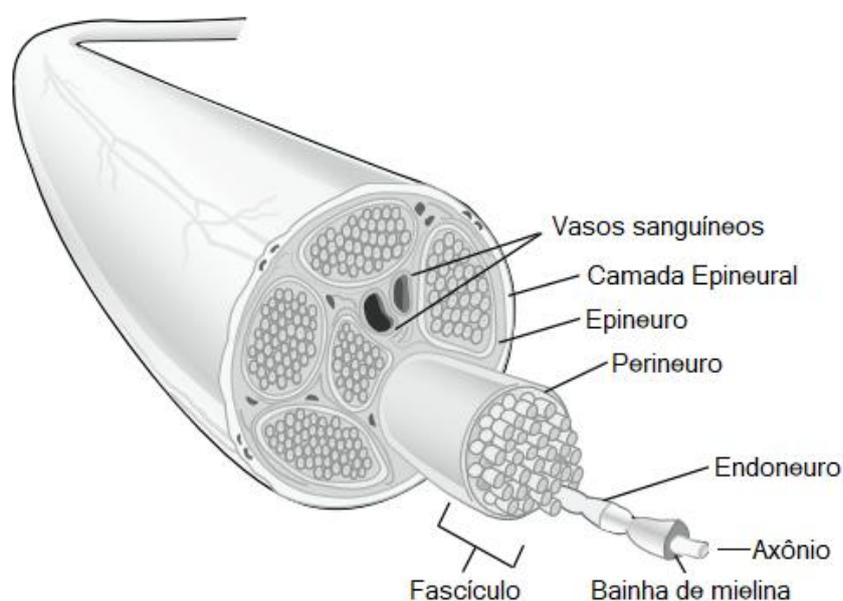


Figura 2 – Anatomia do nervo periférico, adaptada de (GRINSELL; KEATING, 2014).

2.2 LESÕES EM NERVOS PERIFÉRICOS

Os NPs, diferentemente do SNC, não estão protegidos pela caixa craniana ou pela coluna vertebral, sendo assim, estão mais susceptíveis a lesões. As causas mais comuns de lesões nos nervos são acidentes automobilísticos, lacerações procedimentais iatrogênicos² (BRAGA SILVA *et al.*, 2017). Essas condições resultam em dolorosas neuropatias, redução ou perda da função motora e da percepção sensorial, o que pode afetar consideravelmente a qualidade de vida dos pacientes (MOBINI *et al.*, 2017).

² Procedimentos iatrogênicos efeitos adversos ou complicações causadas por ou resultantes do tratamento médico

As lesões podem ser classificadas em: neuropraxia, axonotmese e neurotme. A neuropraxia caracteriza-se pela desmielinização da bainha de mielina, normalmente devido a esforços de compressão, o que compromete a transmissão dos impulsos nervosos. Nesse tipo de lesão a continuidade do axônio é preservada. Já na axonotmese ocorre o rompimento do axônio, e conseqüentemente ocasiona a degeneração Walleriana (LEE, S. K.; WOLFE, 2000). A neurotme é a lesão com maior grau de severidade. Nesse tipo de lesão há ruptura completa do nervo, formando um defeito no nervo (ARSLANTUNALI *et al.*, 2014). Em lesão neurotme, não há regeneração espontânea do nervo sem intervenção cirúrgica (LEE, S. K.; WOLFE, 2000).

Quando um nervo periférico sofre uma lesão do tipo axonotmese ou neurotme, todos os axônios distais ao sítio da lesão sofrerão degeneração Walleriana. A degeneração Walleriana acontece em 24 - 48 horas após a lesão do nervo periférico e caracteriza-se principalmente pela degeneração dos segmentos distais do axônio e da bainha de mielina (GRINSELL; KEATING, 2014). O segmento proximal também se degenera, de maneira retrógrada, em direção ao nódulo de Ranvier adjacente. Esse nódulo de Ranvier será o sítio que subseqüentemente brotará o axônio. Os eventos de degeneração Walleriana ocorrem devido a separação do axônio do corpo celular do neurônio, que é sua fonte trófica (nutritiva), localizada na medula espinal ou nos gânglios (BELKAS *et al.*, 2004). Após esta etapa, as SCs e os macrófagos infiltrantes surgem para a remoção de detritos axonais, mielínicos e teciduais. Além disso, as SCs proliferam-se e alinham-se com a lâmina basal para formar as bandas de Büngner, que servem como guias para o crescimento axonal até o seu alvo. O processo de regeneração do axônio é lento, cerca de 1 - 2 mm/dia, e usualmente incompleto (GRINSELL; KEATING, 2014). No caso de neurotme, se os axônios em crescimento não atingirem o tubo endoneural distal, ou seja, não cruzarem o local da lesão, isso levará a formação de neuroma³ e a fibra muscular desnervada torna-se atrofica. Sendo assim, em caso de lesão do tipo neurotme, para garantir a passagem dos axônios para o coto distal, é necessária uma estratégia cirúrgica (GAUDIN *et al.*, 2016).

2.3 ESTRATÉGIAS PARA O REPARO DE NERVOS PERIFÉRICOS LESIONADOS

O objetivo principal no reparo de NPs é direcionar as fibras nervosas em regeneração para os tubos endoneurais distais, o qual levarão as fibras nervosas para os alvos finais (BELKAS *et al.*, 2004). A literatura apresenta um período entre 12 - 18 meses para que ocorra a reinervação muscular, a fim de obter a recuperação funcional antes que ocorra degeneração irreversível da placa terminal motora (GRINSELL; KEATING, 2014).

³ Neuroma é um espessamento do tecido nervoso ou a formação de um tumor nervoso.

A lesão gerada em caso de neurotmeose divide o nervo em dois segmentos (ou cotos). O reparo cirúrgico mais simples consiste na sutura direta ponta a ponta de ambos os cotos via sutura epineural e/ou sutura fascicular. A sutura é recomendada para defeitos menores que 5 mm. Neste caso é necessário que os cotos possuam comprimento suficiente para serem religados e estejam livres de tensão (HUANG, Y. C.; HUANG, Y. Y., 2006). Em casos de defeitos mais largos (> 5 mm), em que a sutura não é possível, a técnica de autoenxerto é a mais utilizada (BRAGA SILVA *et al.*, 2017).

O autoenxerto atua como ponte entre os cotos e também como suporte para o crescimento axonal. Usualmente são utilizados em defeitos de até 5 cm (GRINSELL; KEATING, 2014). Nessa técnica uma seção de nervo autólogo é retirada de um sítio doador, para então ser utilizada no sítio danificado. Nervos doadores utilizados, geralmente, são nervos cutâneos de pequeno diâmetro (2 a 3 mm) retirados do braço ou da perna (por exemplo, o nervo sural). As seções de nervo autólogo contêm SCs e tubos endoneurais da lâmina basal que fornecem fatores neurotróficos⁴, assim como moléculas de adesão⁵ da superfície celular e do tubo endoneurial (BELKAS *et al.*, 2004). Por esse motivo, são capazes de biomimetizar o ambiente e favorecer a regeneração. Entretanto, existem diversas desvantagens no uso do autoenxerto dentre elas: (i) submete o paciente a uma segunda cirurgia de retirada, criando uma segunda lesão no sítio doador; (ii) a remoção da seção de nervo autólogo causa morbidade do sítio doador e perda de sua função; (iii) incompatibilidade no diâmetro do nervo doador com o receptor; (iv) possíveis dores decorrentes da formação de neuromas; (v) existe uma limitada fonte de sítios doadores e (vi) aumento do tempo de recuperação do paciente devido à segunda cirurgia (KEHOE; ZHANG, X. F.; BOYD, 2012). Os conduítes de nervo surgiram como uma alternativa promissora ao autoenxerto. A Figura 3, apresenta esquematicamente a sutura direta, o autoenxerto e o conduíte de nervo.

⁴ Fatores neurotróficos são proteínas que apoiam o crescimento, sobrevivência e diferenciação dos neurônios tanto em desenvolvimento como maduros.

⁵ Moléculas de adesão são moléculas que permitem a ligação entre as células ou entre células e a matriz extracelular.

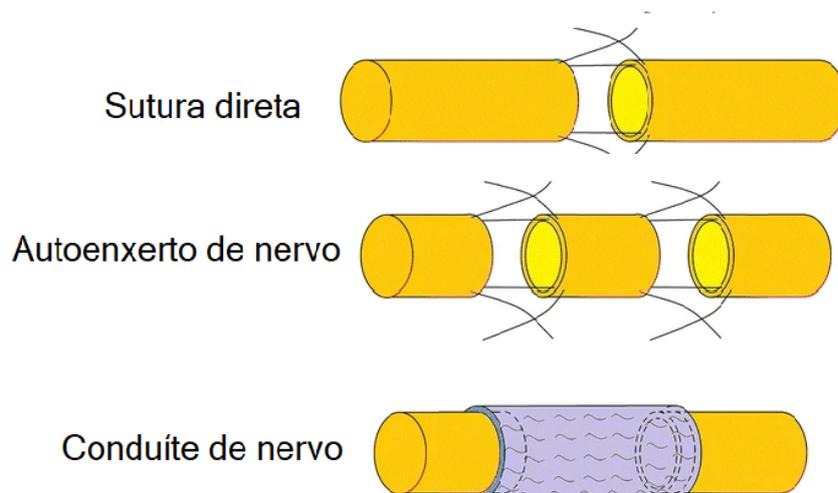


Figura 3 – Representação esquemática das principais técnicas utilizadas no reparo de nervos periféricos (TUTUROV, 2019).

3 CONDUÍTES DE NERVOS

Os conduítes de nervos são tubos suturados nos cotos proximais e distais do nervo transecionado, com o intuito de dar suporte estrutural e estimular a regeneração do nervo periférico. O uso de conduítes foi originalmente proposto em 1881. Sua primeira aplicação bem sucedida foi em 1882, em que um tubo de osso descalcificado foi aplicado como conduíte à um defeito de 30 mm em um cachorro (IJPMA; VAN DE GRAAF; MEEK, M. F., 2008). Atualmente, o uso de conduítes é clinicamente aprovado como uma alternativa ao autoenxerto. Alguns conduítes de tubo oco foram aprovados pela *Food and Drug Administration* FDA e já são utilizados clinicamente. Dentre eles, destacam-se o NeuraGen®, o Neurotube® e o Neurolac® (SO; XU, 2015). Entretanto, o uso clínico destes conduítes é limitado ao reparo de defeitos relativamente curtos (menores que 3 cm) e a recuperação funcional é limitada quando comparada com ao autoenxerto (DALY *et al.*, 2011). Pesquisas buscam desenvolver novos conduítes a partir de diferentes materiais e técnicas de processamento. O intuito é ampliar o uso clínico de conduítes no reparo de defeito mais longos e com recuperação funcional comparável ou maior ao autoenxerto. O desenvolvimento de conduítes evoluiu em diferentes gerações, conforme apresentado de maneira resumida na Figura 4.

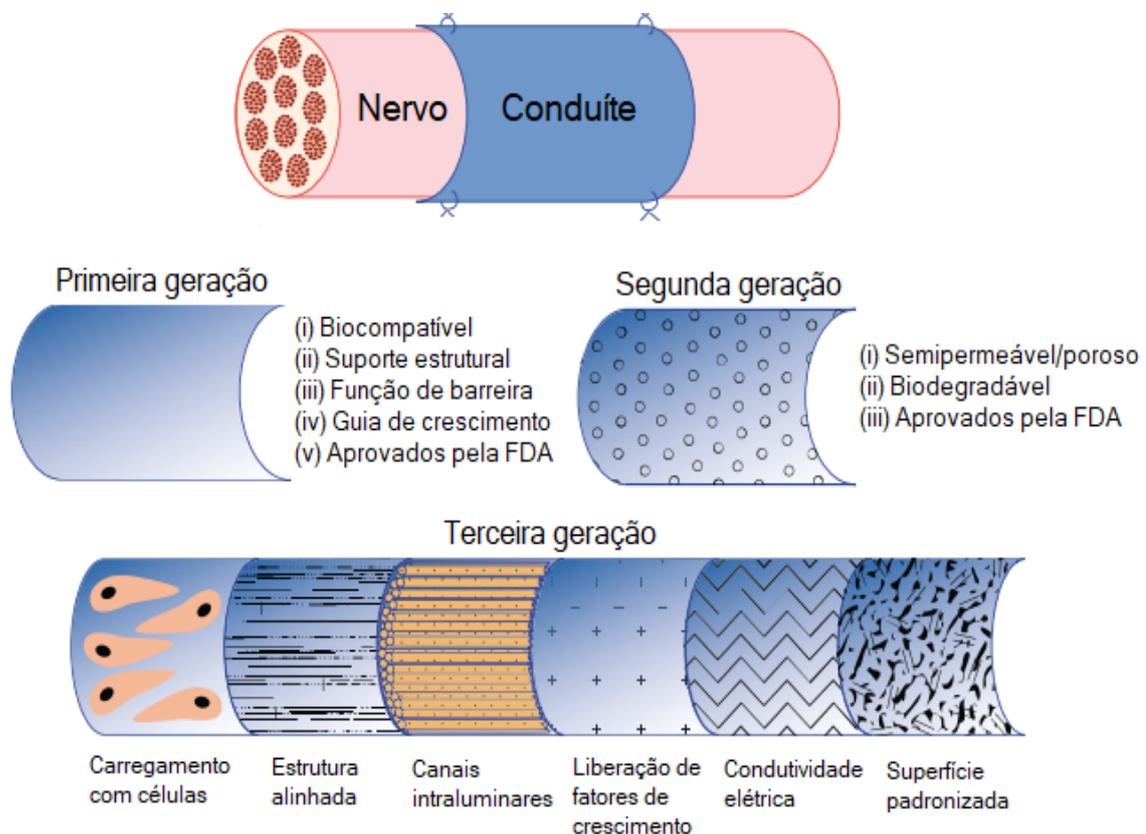


Figura 4 – Gerações de conduítes de nervo, adaptado de (GAUDIN *et al.*, 2016).

Os conduítes da primeira geração foram tubos ocos e rígidos de silicone ou politetrafluoretileno não reabsorvível (ePTFE, Gore-Tex®). A estratégia inicial focou em desenvolver conduítes biocompatíveis e com resistência mecânica suficiente para fornecer suporte estrutural. A biocompatibilidade é uma propriedade importante para que o conduíte não provoque resposta inflamatória exacerbada. Já a resistência mecânica para que o conduíte não rompa durante o processo de regeneração. Além disso, estes conduítes visam oferecer uma barreira estável contra a invasão de tecidos fibrosos, e adicionalmente, objetivam guiar o crescimento axonal. A principal desvantagem dessa geração de conduítes é a necessidade de uma segunda cirurgia de retirada, devido a compressão do nervo e o encapsulamento fibrótico do conduíte (GAUDIN *et al.*, 2016).

A segunda geração de conduíte fez uso de polímeros biodegradáveis e objetivou o aprimoramento da biocompatibilidade e da topografia do conduíte, através do desenvolvimento de conduítes semipermeáveis ou porosos de tubo oco. Foi nessa geração que surgiram os conduítes NeuraGen® (colágeno), o Neurotube® (PGA) e o Neurolac® (PLCL). A biodegradabilidade é uma propriedade importante, visto que elimina a necessidade de uma segunda cirurgia de retirada, assim como preveni inflamações e dores crônicas causadas pela compressão do nervo. Entretanto, deve ser levada em consideração a taxa de degradação do material. O conduíte deve manter uma arquitetura mecanicamente estável e degradar-se em uma taxa compatível com a taxa de formação do novo tecido.

O processo de degradação de poliestéres como o PLGA ocorre através da hidrólise. A hidrólise, por sua vez, é evidenciada por dois principais estágios de degradação: erosão da superfície e degradação em massa (LINS *et al.*, 2016). O mecanismo de degradação para os *scaffolds* é dependente da velocidade de penetração da água nas fibras, caracterizada como erosão superficial e da quebra de ligações químicas do polímero, caracterizada como degradação em massa. A quebra de ligações químicas do PLGA é através da quebra de ligações ésteres.

Outra característica importante considerada nesta geração de conduítes é a permeabilidade/porosidade. Essa característica permite a angiogênese¹ e a difusão de biomoléculas essenciais. No entanto, a permeabilidade/porosidade deve ser seletiva a fim de impedir a infiltração de tecidos fibrosos. Tamanhos de poros de até 30 μm são capazes de realizar função de barreira celular (CHIONO; TONDA-TURO, 2015). Embora os conduítes de segunda geração tenham apresentado um avanço em relação aos conduítes de primeira geração, resultados da literatura apresentam recuperação funcional limitada, principalmente para defeitos longos e quando comparados ao autoenxerto (GAUDIN *et al.*, 2016).

Para desenvolver conduítes mais eficazes é importante entender como o processo de regeneração ocorre dentro do conduíte de tubo oco das primeiras gerações.

¹ Angiogênese é a formação e o crescimento de novos vasos sanguíneos.

O processo de regeneração pode ser dividido em cinco principais partes, como pode ser observado na Figura 5 e na sequência a seguir (DALY *et al.*, 2011):

1. Fase fluídica: na fase fluídica existe o influxo de plasma no conduíte. O plasma é constituído de fatores neurotróficos² e moléculas da matriz extracelular (MEC). A maior concentração desse fluído ocorre entre 3 - 6 horas pós-cirúrgica.
2. Fase matriz: nesta fase existe a formação de um cabo acelular de fibrina entre ambos os cotos de nervo. O cabo é formado a partir de moléculas de MEC da fase fluídica e facilita a migração coordenada de fibroblastos, SCs, células endoteliais e perineuriais. Acontece entre 2 - 6 dias pós-cirúrgico.
3. Fase celular: nesta fase as SCs surgem de ambos os segmentos de nervo. Posteriormente as SCs proliferam-se e alinham-se através do cabo de fibrina, formando as bandas de Büngner. Ocorre entre 7 - 14 dias pós-cirúrgico.
4. Fase axonal: na fase axonal novos brotos de axônio surgem. Esses brotos são guiados pelo cabo formado em direção ao alvo. Após esse processo o cabo de fibrina degrada-se. Essa fase acontece entre 15 - 21 dias pós-cirúrgico.
5. Fase de mielinização: nesta fase ocorre a maturação das SCs ao redor dos axônios, formando a bainha de mielina.

O processo de regeneração dentro de conduítes de tubo oco, anteriormente descrito, considera defeitos de até 4 cm em humanos e 1,5 cm em ratos (DALY *et al.*, 2011). Uma regeneração considerada bem sucedida envolve uma adequada formação do cabo de fibrina. Como consequência disso, há a migração de SCs e crescimento axonal. Os axônios devem atingir corretamente seu alvo, com alta densidade de fibras e com espessa bainha de mielina. Dessa maneira existe uma maior recuperação funcional do nervo. No entanto, a regeneração dentro de tubos ocos é limitada. Estes baixos níveis podem ser atribuídos à formação inadequada de componentes da MEC durante os estágios iniciais de regeneração, o que inclui a formação inadequada do cabo de fibrina. Sem a formação desse cabo alinhado, há uma limitada migração de SCs nativas para o local da lesão e para os cotos nervosos proximal e distal. Como consequência há uma redução na formação de bandas Büngner, o qual apresenta topográfica essencial para a regeneração dos axônios. Portanto, sem a formação correta dos cabos de fibrina há uma ineficiente recuperação funcional do nervo (DALY *et al.*, 2011). Baseado nas desvantagens de conduítes de tubo oco, estudos identificam algumas características relevantes para a obtenção de um conduíte mais eficaz, chamado de terceira geração (Figura 4).

² Fatores neurotróficos são fatores de crescimento que apoiam o crescimento, sobrevivência e diferenciação dos neurônios

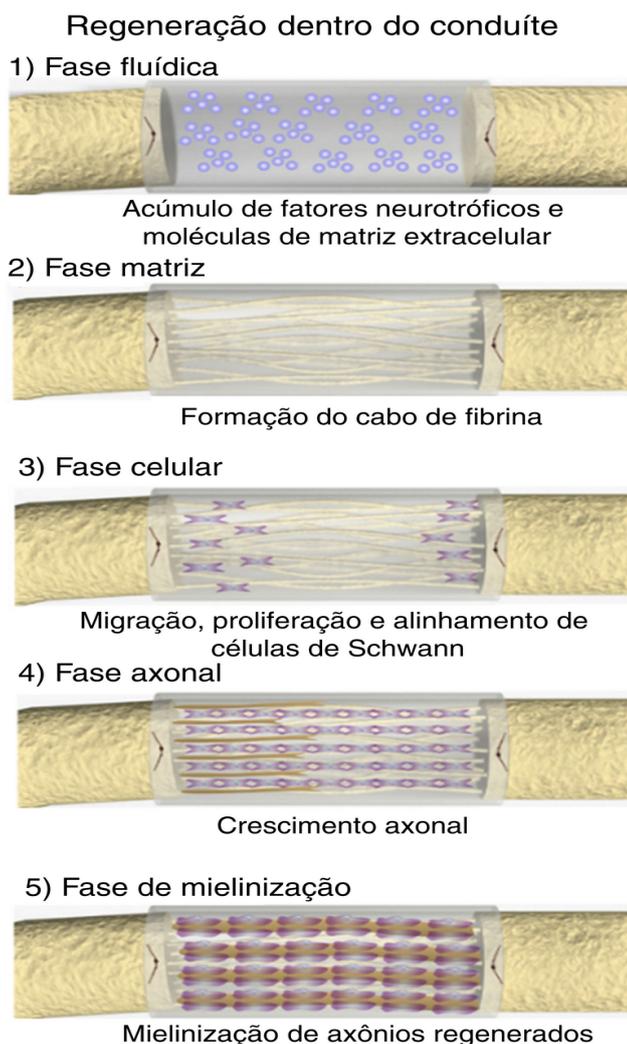
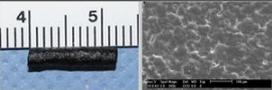
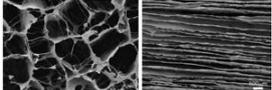
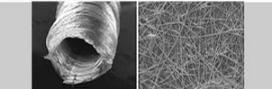
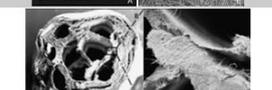
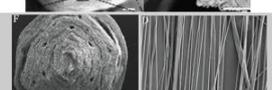


Figura 5 – Processo de regeneração dentro do conduíte, adaptado (DALY *et al.*, 2011).

A terceira geração de conduítes, a qual não é aprovada pelo FDA, é o atual foco de pesquisa da engenharia tecidual e da engenharia de materiais. Essa nova geração visa desenvolver conduítes com eficácia comparável ou superior ao autoenxerto. Essa categoria inclui conduítes com carregamento de células, com estrutura alinhada, com canais intraluminares, com liberação de fatores de crescimento, com condutividade elétrica e com superfície padronizada (Figura 4). Diversas estratégias focam na escolha de diferentes materiais e métodos para o desenvolvimento de conduítes de terceira geração. Polímeros sintéticos biodegradáveis, como PCL, proteína da seda, PLA, PGA e PLGA, têm recebido considerável atenção, pois oferecem biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas satisfatórias. Quanto aos métodos de processamento de conduítes, os mais utilizados são revestimento por imersão (XU *et al.*, 2014), liofilização (HUANG, J. *et al.*, 2012), lixiviação (KOKAI *et al.*, 2009) e eletrofiação (PANSERI *et al.*, 2008; DINIS *et al.*, 2014; FROST *et al.*, 2018), e a combinação de métodos (JING *et al.*, 2018), como apresentado na Tabela 1. O método de revestimento por imersão (*dip-coating*) consiste na imersão de um mandril

cilíndrico em uma solução polimérica. Esse processo é repetido por diversas vezes até o revestimento atingir a espessura desejada, logo em seguida, o conduíte é retirado do mandril (XU *et al.*, 2014). A principal desvantagem deste método é a formação de um conduíte não poroso. Já a liofilização consiste no congelamento de uma solução polimérica solúvel em água, com posterior sublimação do gelo formado. Neste método existe a formação de uma estrutura porosa. No entanto, o tamanho dos poros normalmente situa-se entre 50 - 100 μm , excedendo assim o limite de 30 μm para exercer a função de barreira celular. Além disso, este método limita seu uso à polímeros naturais solúveis em água, os quais normalmente apresentam baixas propriedades mecânicas (CHIONO; TONDA-TURO, 2015). No que diz respeito a lixiviação, este método consiste na mistura de um polímero com um agente porogênico, como o NaCl. Em seguida, o agente porogênico é removido do meio por dissolução em um solvente apropriado, resultando em um material poroso. No entanto, existe uma baixa interconexão dos poros, ademais, o tamanho dos poros situa-se entre 10 - 300 μm , podendo assim também exceder o limite de tamanho de poro para função de barreira celular (CHIONO; TONDA-TURO, 2015). A eletrofiação apresenta o uso promissor, por diversos motivos, dentre eles, a possibilidade em utilizar diversos polímeros naturais e sintéticos, a formação de uma microestrutura tridimensional capaz de mimetizar a MEC e o tamanho de poros formado menor que 30 μm . Por esses motivos a eletrofiação será o método de processamento considerado no presente estudo.

Tabela 1 – Conduítes obtidos por diferentes materiais e processamentos.

Material	Método	Conduíte	Fonte
PDLLA/PPy	Imersão		(Xu, H. <i>et al.</i> 2014)
Quitosana/PPy	Liofilização		(HUANG <i>et al.</i> 2012)
PLGA/PCL	Eletrofiação		(PANSERI <i>et al.</i> 2008)
Proteína da Seda	Eletrofiação		(DINIS <i>et al.</i> 2014)
PCL ou PLA	Eletrofiação		(FROST <i>et al.</i> 2018)
PLGA/PPy	Imersão e eletrofiação		(JING <i>et al.</i> 2018)

4 ELETROFIAÇÃO

Membranas eletrofiadas são empregadas na engenharia tecidual e na engenharia de materiais devido, principalmente, a microestrutura obtida por essa técnica. A eletrofiação possibilita a produção de fibras com uma microestrutura porosa e tridimensional. Essa técnica permite a produção de fibras com diâmetros que variam de cerca de décimos de nanômetros até vários micrômetros. Além disso, as fibras apresentam alta área de superfície específica ($1 - 100 \text{ m}^2/\text{g}$), alta porosidade 60 - 95 %, tamanhos de poro que varia entre 1 - 10 μm , alta permeabilidade e fácil funcionalização da superfície (CHIONO; TONDA-TURO, 2015). Na regeneração de nervos periféricos, todas essas características favorecem, principalmente, a adesão e a proliferação celular. Conseqüentemente, aumenta a probabilidade de melhor recuperação funcional de um nervo lesionado (QUAN *et al.*, 2019).

A configuração básica de um equipamento utilizado para a eletrofiação inclui quatro partes principais: (i) uma fonte de tensão elétrica, (ii) uma seringa contendo a solução polimérica e acoplada a uma agulha metálica, (iii) uma bomba de infusão e (iv) um coletor metálico, como apresentado na Figura 6.

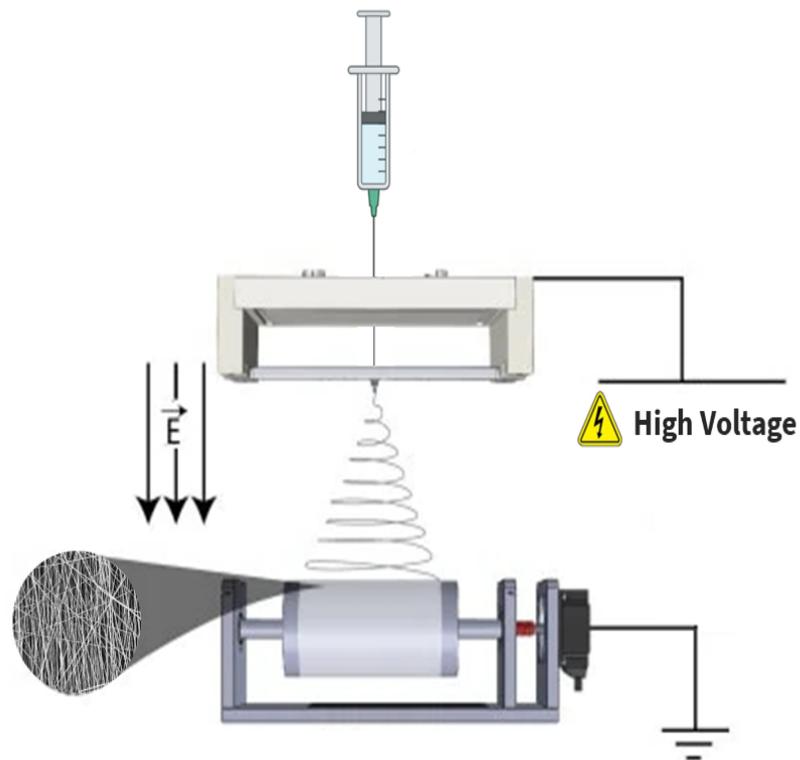


Figura 6 – Representação esquemática da configuração básica de um equipamento de eletrofiação, desenvolvido pela autora.

O princípio básico para a eletrofiação de uma solução polimérica é a sua capacidade em portar cargas elétricas, e além disso, ter uma viscosidade suficiente para que a solução seja estirada sem que haja o gotejamento da solução. A eletrofiação de uma solução polimérica inicia-se com a aplicação de uma alta tensão elétrica (10 - 50kV), a qual é aplicada entre a ponta da agulha e o coletor metálico. Em um primeiro momento uma gota pendente de solução polimérica permanece na ponta da agulha devido a sua tensão de superfície. A medida em que se aumenta o campo elétrico, a gota pendente torna-se altamente eletricamente carregada e, então, alonga-se em um formato cônico, chamado Cone de Taylor, conforme apresentado na Figura 6. O progressivo aumento no campo elétrico alcança um valor limiar, sendo que após esse limiar existe o estiramento da gota polimérica, conseqüentemente formando um jato polimérico. Isso acontece devido as forças eletrostáticas superarem a tensão superficial da gota polimérica. Assim, um jato polimérico é ejetado diretamente do cone de Taylor em direção ao coletor metálico. Antes de atingir o coletor, o jato é submetido a uma série de instabilidades, e gradualmente o solvente evapora-se e a fibra é depositada sobre o coletor metálico (JIANG *et al.*, 2015).

A morfologia das fibras obtidas por eletrofiação é influenciada por diferentes parâmetros: parâmetros de processo, de solução e parâmetros ambientais. Dessa maneira, a compreensão do efeito de cada um desses parâmetros é necessária para a obtenção de fibras com morfologia e orientação adequados para a aplicação.

Os parâmetros de processo incluem a tensão elétrica, a distância entre a agulha e o coletor, a vazão de alimentação e o tipo de coletor. Esses parâmetros influenciam no rendimento do processo, assim como na morfologia, no diâmetro e na orientação das fibras eletrofiadas. Dessa maneira, estas variáveis devem ser ajustadas adequadamente para cada sistema.

A intensidade do campo elétrico é determinada pela tensão elétrica aplicada a uma distância entre a agulha e o coletor. Quanto maior a intensidade do campo elétrico, maior é a velocidade do jato. Normalmente são utilizadas tensões elétricas entre 5 e 30kV. A tensão elétrica aplicada na solução é um fator crítico na formação das fibras, visto que o processo de eletrofiação inicia-se somente após ser atingida uma tensão limiar. O valor de tensão limiar é inerente para cada sistema polímero-solvente. Para valores de tensão elétrica abaixo do limiar, uma gota de solução polimérica fica suspensa na ponta da agulha pela tensão de superfície da gota, ou pode ocorrer o gotejamento da solução. Com o aumento da tensão elétrica o volume da gota reduz até o cone de Taylor ser formado dentro da agulha. Altos valores de tensão elétrica estão associados a fibras com defeitos *beads* (SILL; RECUM, 2008).

A distância entre a agulha e o coletor influencia na intensidade do campo elétrico e no tempo de evaporação do solvente. Portanto, a distância deve ser suficiente para que ocorra a evaporação do solvente e as fibras secas sejam depositadas no coletor. Caso isso não ocorra, pode haver o coalescimento das fibras. Ademais, em distâncias muito pequenas ou muito grandes há formação de defeitos *beads*. Normalmente são utilizadas distâncias entre 5 e 30 centímetros (MERLINI, Claudia, 2014).

A distribuição das fibras pode ser controlada através do tipo de coletor e da velocidade de rotação do coletor. Há dois tipos principais de coletores: os estáticos e os rotatórios. Os coletores estáticos permitem a produção de fibras aleatoriamente distribuídas (Figura 7. a), enquanto os coletores rotatórios tendem a produzir fibras alinhadas, Figura 7. b), (STACHEWICZ *et al.*, 2015).

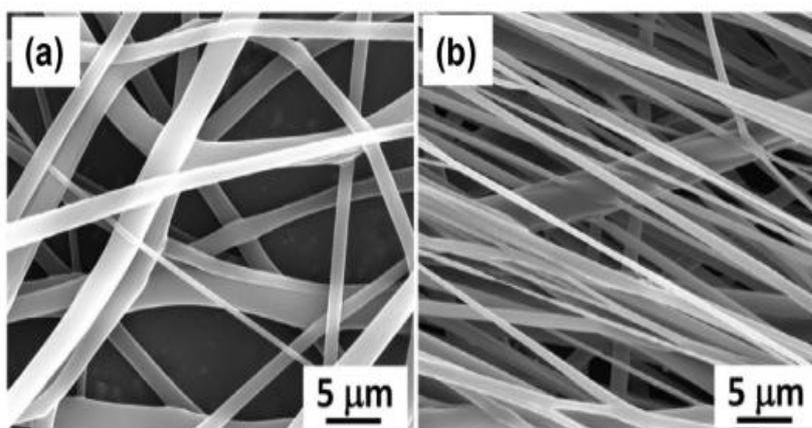


Figura 7 – Micrografia MEV de fibras eletrofiadas: a) aleatoriamente distribuídas e b) alinhadas. (STACHEWICZ *et al.*, 2015)

A vazão polimérica determina a taxa de material transferido e a velocidade do jato polimérico. Conseqüentemente, influencia no diâmetro da fibra. Foi constatado que em baixos valores de vazão (0,5 mL/h) as fibras apresentaram menores diâmetros (BHARDWAJ; KUNDU, 2010). Isso foi justificado pela menor quantidade de material expelido e maior estiramento das fibras. Entretanto, um mínimo de vazão é necessário para que não haja interrupções no jato polimérico. Em geral, maiores vazões são mais desejadas por permitir maiores taxas de produção. Porém, o aumento da vazão causa um aumento no diâmetro das fibras, assim como a incidência de defeitos. Além disso, em altas vazões pode não haver tempo suficiente para a evaporação do solvente, resultando em fibras úmidas no coletor (BHARDWAJ; KUNDU, 2010).

Os parâmetros da solução estão relacionados com a interação polímero-solvente, assim como a influência da presença de aditivos em solução. Por isso, a concentração polimérica da solução, a volatilidade do solvente e a condutividade elétrica da solução são alguns dos principais parâmetros a serem considerados na eletrofiação.

Altas concentrações poliméricas apresentam um maior grau de emaranhamento de cadeias poliméricas, como isso o jato carregado torna-se mais estável, o que possibilita a produção de fibras. Além disso, quanto maior é a concentração polimérica, maior é o diâmetro da seção transversal da fibra. Para baixas concentrações poliméricas, os emaranhados de cadeias poliméricas não são fortes o suficiente para estabilizar o jato carregado, aumentando assim a instabilidade, o que pode gerar gotas de polímeros ou fibras com *beads* (LASPRILLA-BOTERO; ÁLVAREZ-LÁINEZ; LAGARON, 2018). A Figura 8, apresenta a influência da concentração polimérica na formação de fibras uniformes e sem defeitos *beads*.

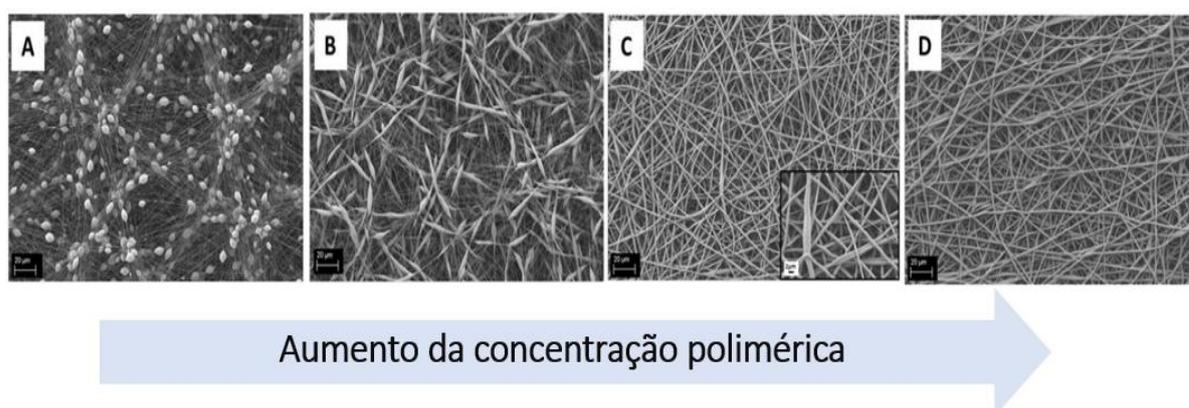


Figura 8 – Efeito da concentração polimérica em fibras eletrofiadas de PCL. a) 12 %m/v, b) 15 %m/v, c) 18 %m/v, d) 20 %m/v, (LIVERANI; BOCCACCINI, 2016).

A escolha de um solvente apropriado para o sistema polímero-solvente é essencial para a formação de fibras, para a produtividade e morfologia das fibras. Duas considerações devem ser feitas na escolha do solvente. A primeira consideração é que o solvente deve solubilizar completamente o polímero escolhido. A segunda, é que o solvente deve apresentar ponto de ebulição moderado. Solventes com baixos pontos de ebulição são altamente voláteis, como consequência podem ocasionar a secagem do jato polimérico na ponta da agulha, bloqueando o processo de eletrofiação. De maneira similar, solventes com altos pontos de ebulição também devem ser evitados. O alto ponto de ebulição reduz a taxa de evaporação do solvente, e isto pode atrapalhar a secagem do jato polimérico durante sua trajetória até o coletor e favorecer a formação de fibras com defeitos (HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, 2018).

A condutividade da solução afeta a formação do cone de Taylor e o diâmetro das fibras. Soluções com baixa condutividade elétrica não podem ser eletrofiadas, visto que a superfície da gota polimérica não porta cargas suficientes para que o cone de Taylor seja formado. Com o aumento da condutividade elétrica existe uma redução do diâmetro das fibras produzidas. No entanto, soluções com condutividade elétricas acima do valor crítico são instáveis sob o alto valor de campo elétrico, o que resulta em valores variáveis de diâmetro das fibras (HAIDER, A.; HAIDER, S.; KANG, 2018).

Os parâmetros ambientais incluem a temperatura e a umidade relativa do ar. O aumento da temperatura reduz a viscosidade da solução polimérica e, consequentemente, reduz o diâmetro das fibras (MIT-UPPATHAM; NITHITANAKUL; SUPAPHOL, 2004). Já o aumento da umidade relativa do ar (geralmente maior que 60%) influencia no aparecimento de poros na superfície da fibra, ou até mesmo a coalescência de fibras (CASPER *et al.*, 2004). Por outro lado, baixos valores de umidade influencia no aumento da taxa de evaporação do solvente, que por sua vez, pode ocasionar na solidificação do polímero na agulha e o interrompimento da eletrofiação.

5 ADITIVOS NANOESTRUTURADOS CONDUTORES

O desenvolvimento de biomateriais que respondam a estímulos elétricos e, além disso, com propriedades de fácil ajuste é um desafio na engenharia tecidual e engenharia de materiais. Materiais condutores, como os polímeros condutores e os nanotubos de carbono influenciam no comportamento celular de células neurais. Assim, apresentam uso potencial em regeneração de nervos periféricos.

5.1 POLÍMEROS INTRINSECAMENTE CONDUTORES

Os polímeros condutores, combinam as propriedades dos metais e dos polímeros convencionais, ou seja, apresentam propriedades elétricas, ópticas e magnéticas. Os polímeros condutores já são atualmente utilizados em células de combustível, supercapacitores, blindagem eletromagnética, e agora encontram aplicações no campo de biomateriais. Esses polímeros podem ser desenvolvidos para serem biocompatíveis e biodegradáveis. Ademais, a capacidade intrínseca condutora desses polímeros permite que células ou tecidos cultivados sobre eles sejam estimuladas. Dessa maneira, os polímeros condutores tornaram-se materiais importantes em aplicações como biosensores, dispositivos para liberação controlada de fármacos e dispositivos em Engenharia tecidual.

Os polímeros intrinsecamente condutores são polímeros conjugados, ou seja, apresentam ligações simples (C - C) e duplas (C = C) alternadas. A Figura 9, ilustra, de maneira geral, uma cadeia conjugada de um polímero condutor, enquanto a Figura 10, apresenta exemplos das estruturas químicas de alguns polímeros condutores. Ambas as ligações, simples e duplas, possuem forte ligações σ , enquanto as ligações duplas possuem uma ligação mais fraca, a ligação π (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014). A capacidade intrínseca condutora dos polímeros intrinsecamente condutores é devido a presença de elétrons π em sua estrutura.

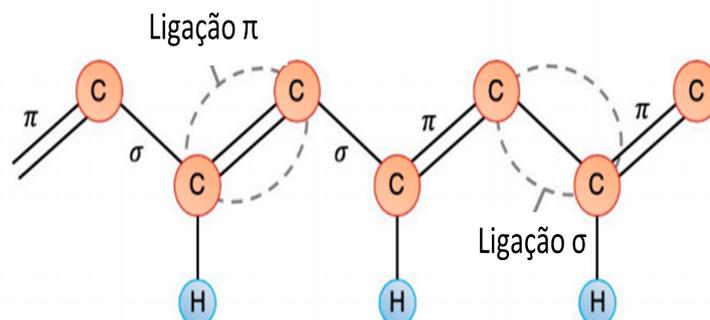


Figura 9 – Ilustração da cadeia conjugada do polímero condutor poliacetileno, adaptada de (PALZA; ZAPATA; ANGULO-PINEDA, 2019).

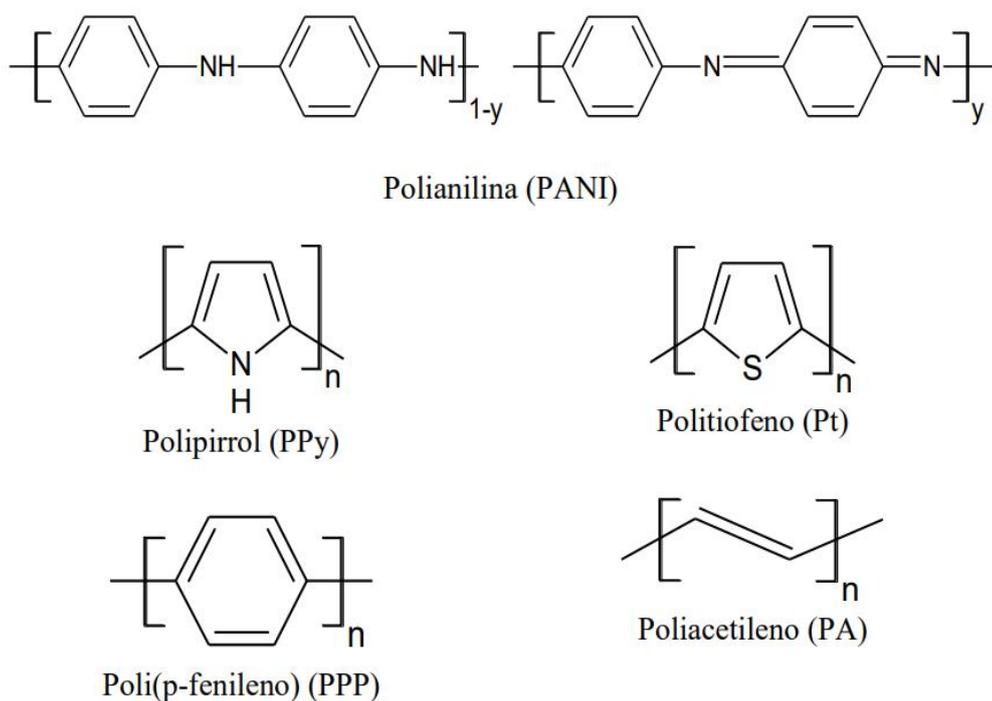


Figura 10 – Estrutura química de alguns polímeros condutores, adaptado de (BHADRA *et al.*, 2009).

A condutividade também é influenciada pela presença de dopantes. O mecanismo de exposição do polímero a agentes oxidantes ou redutores é conhecido como dopagem. Um dopante, geralmente é um contraíon, que tende a balancear as cargas, positivas ou negativas, formadas durante uma reação de oxidação ou redução. O dopante, adicionalmente, introduz cargas ao sistema, através da remoção de elétrons da cadeia (oxidação do tipo-p) ou da adição de elétrons na cadeia (redução do tipo-n). Essas cargas armazenadas são chamadas de polaron ou bipolaron, que por sua vez, causam distorções na rede cristalina. Dessa maneira, quando um potencial elétrico é aplicado, os dopantes movimentam-se e permitem a passagem de cargas através do polímero na forma de polaron e bipolaron (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014). Diferentemente da dopagem em semicondutores inorgânicos, em polímeros, a concentração de dopante incorporada é extremamente alta e em alguns casos correspondem a 50 % da composição final. A Tabela 2, apresenta valores de condutividade elétrica de alguns polímeros condutores dopados.

Tabela 2 – Valores de condutividade elétrica de alguns polímeros condutores, adaptado de (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014).

Polímero	Condutividade elétrica ($S.cm^{-1}$)
Polianilina	300 - 200
Polipirrol	$10^2 - 7,5 \times 10^3$
Politiofeno	$10 - 10^3$
Poli (p-fenileno)	$10^2 - 10^3$
Poliacetileno	$10^3 - 1,7 \times 10^5$

5.1.1 Polipirrol e Polipirrol/montmorilonita

O polipirrol (PPy) é extensivamente estudado para aplicações biológicas e médicas, devido principalmente à sua boa biocompatibilidade e condutividade elétrica (SUN *et al.*, 2018). Sua condutividade elétrica varia entre $10^2 - 7,5 \times 10^3$, dependendo do nível de dopagem, tipo do dopante utilizado e condições de polimerização (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014). Entretanto, o PPy é insolúvel, infusível e quebradiço, e por esse motivo é utilizado com copolímero, ou em misturas e compósitos com vários polímeros biocompatíveis e biodegradáveis (SHAFEI *et al.*, 2017).

Polímeros conjugados são suscetíveis à distorções estruturais. A estrutura eletrônica pode ser alterada reversivelmente com a dopagem. A Figura 11 representa o diagrama de energia do PPy. O PPy, em seu estado neutro, apresenta estrutura benzóide e é classificado como um material isolante devido ao seu elevado *gap* de energia (3,16 eV). O elevado *gap* dificulta a transferência de elétrons da banda de valência para a banda de condução (Figura 11 (a)).

Após a oxidação (remoção de π elétrons da banda de valência) do PPy neutro, ocorre o relaxamento local da estrutura benzóide para um tipo quinóide, que cria radicais cátions (polarons). A formação de polarons induz dois novos níveis de energia (Figura 11 (b)) que são simetricamente posicionados dentro do intervalo de banda. A oxidação subsequente resulta na formação de bipolarons (Figura 11 (c)). À medida que o polímero é oxidado ainda mais, os estados de energia bipolarônicos se sobrepõem e formam estruturas de banda intermediárias estreitas (Figura 11 (d)). A Figura 12 representa a estrutura eletrônica do PPy.

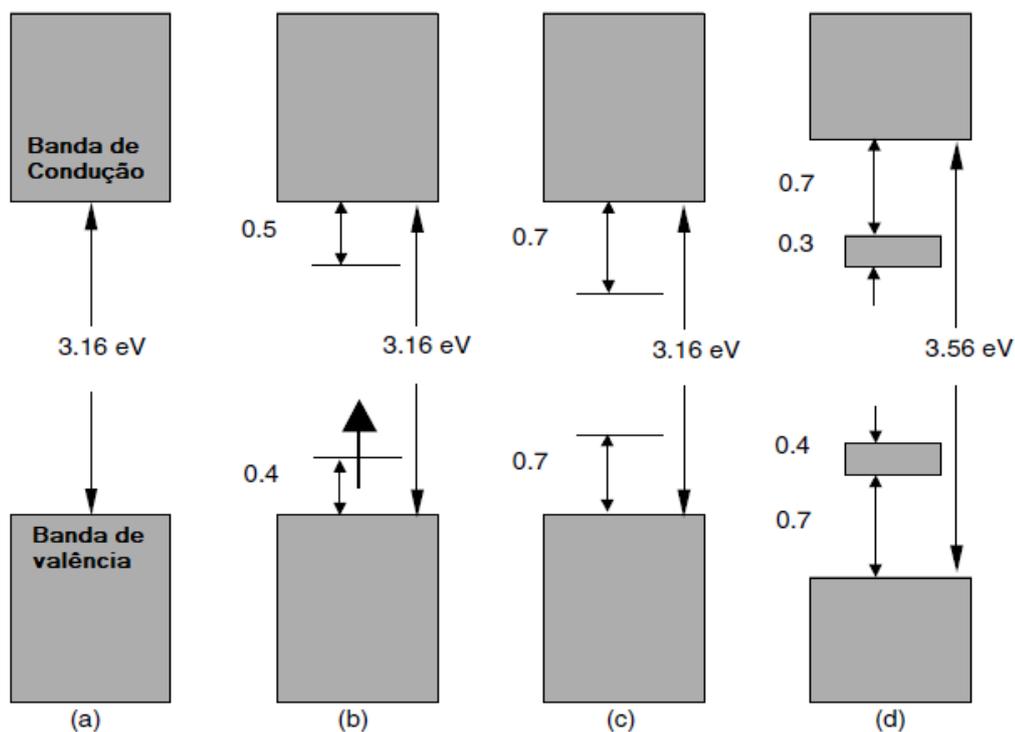


Figura 11 – Diagrama eletrônico de energia (a) PPy.DBSA neutro, (b) polaron, (c) bipolaron e (d) PPy completamente dopado, adaptado de (S.H. CHO; LEE, J.Y., 2010).

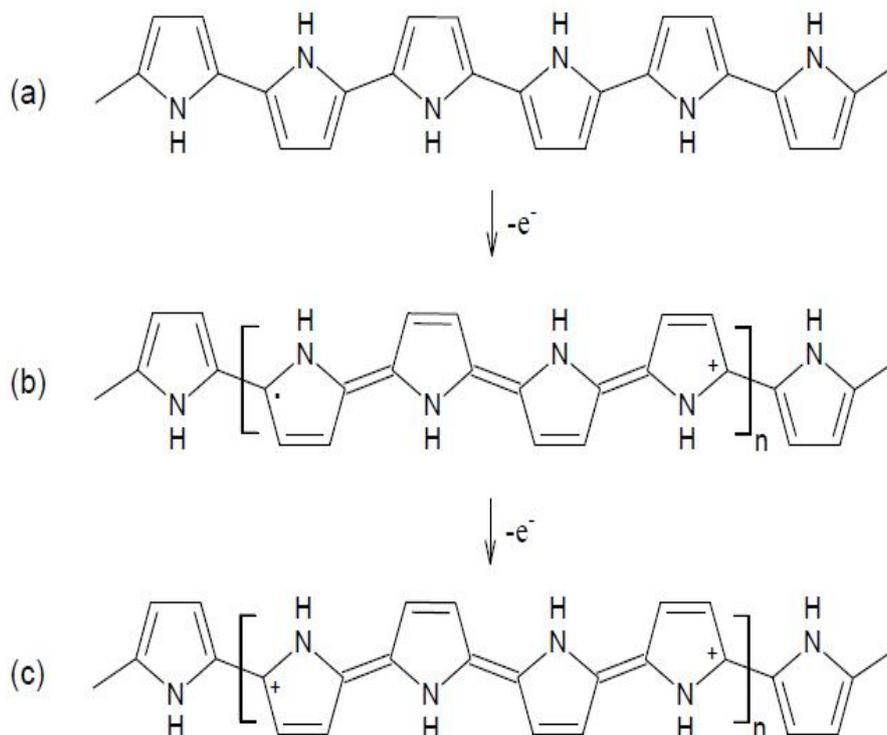


Figura 12 – Estrutura eletrônica do (a) PPy neutro, (b) polaron e (c) bipolaron, adaptado de (S.H. CHO; LEE, J.Y., 2010).

O PPy é sintetizado convencionalmente por polimerização química oxidativa ou eletroquímica do pirrol. A polimerização química oxidativa oferece a vantagem em permitir a fabricação de PPy.DBSA em pó ou em qualquer superfície de deposição. Além disso, proporciona maior controle sobre a estrutura da cadeia principal do PPy.DBSA (GREEN *et al.*, 2010). Agentes oxidantes, tais como sais de FeCl_3 ou $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, são adicionados à uma solução aquosa resultando em um pó precipitado na solução. No caso de PPy produzido por oxidação na presença de FeCl_3 , são formados como subprodutos da polimerização FeCl_2 e HCl , conforme apresentado na Figura 13 (GREEN *et al.*, 2010). Uma quantidade excessiva de oxidante é usada para compensar as moléculas de oxidante que são consumidas pelo subproduto ácido HCl . Os ânions Cl atuam como dopantes e são responsáveis pela oxidação da cadeia principal do polímero e pela formação de polarons e bipolarons, que são os portadores de carga responsáveis pela condutividade do PPy.

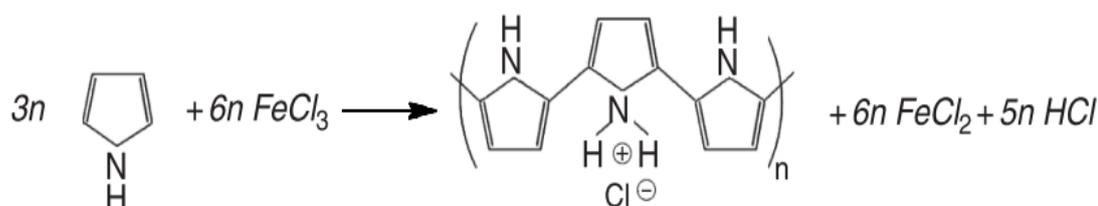


Figura 13 – Reação convencional da síntese química oxidativa do polipirrol com o oxidante FeCl_3 , adaptado de (GREEN *et al.*, 2010).

O PPy ainda pode ser sintetizado via polimerização oxidativa *in situ* na presença da argila montmorillonita, contendo Ácido Dodecil Benzeno Sulfônico (DBSA) como surfactante e FeCl_3 como agente oxidante. Nesse processo, o monômero pirrol é polimerizado entre as camadas da argila. A argila atua como um suporte para a polimerização do pirrol, induzindo uma maior orientação do PPy entre as camadas da argila. Somado a isso, o surfactante DBSA contribui na intercalação e esfoliação parcial da argila. Essa estratégia resulta em um aditivo com estrutura intercalada ou parcialmente esfoliada, com alta área de superfície e alta condutividade elétrica, denominado Mt-PPy.DBSA (RAMOA *et al.*, 2018; MOUČKA *et al.*, 2011). Acredita-se que a dispersão do Mt-PPy.DBSA em matrizes poliméricas seja favorecida em comparação com o aditivo PPy.DBSA puro. Ademais, menores quantidades de Mt-PPy.DBSA são necessárias para alcançar altos valores de condutividade elétrica (RAMOA *et al.*, 2018).

5.2 NANOTUBO DE CARBONO

Nanotubos de carbono (NTC) apresentam uso promissor no campo da regeneração de nervos periféricos, devido à suas excelentes propriedades térmicas, elétricas e mecânicas. Somado a isso, apresentam características topográficas em nanoescala. Podem ser utilizados como reforço estrutural em conduítes biodegradáveis e para aumentar a proliferação celular (WANG, J. *et al.*, 2018; SHRESTHA, S. *et al.*, 2019).

Um ponto a ser considerado no uso de NTC para aplicações biomédicas é a sua toxicidade. Ao comparar NTC à outros materiais, os nanomateriais têm algumas características significativas devido ao aumento da área de superfície em relação ao tamanho. A alta razão de aspecto dos NTC os tornam mais reativos e mais tóxicos. Além disso, a alta área total de superfície dos NTC, possibilita uma área de contato com as membranas celulares aumentada ou então uma maior absorção/transporte de toxinas. Apesar dessa desvantagem, a literatura apresenta resultados bem sucedidos do uso de NTC em aplicações biomédicas com diferentes estratégias de funcionalização (RAPHEY *et al.*, 2019; OPRYCH *et al.*, 2016).

Os nanotubos de carbono são materiais carbonáceos, formados a partir de uma folha de grafeno enrolada em estrutura cilíndrica, como hibridização sp² dos átomos de carbono (RAPHEY *et al.*, 2019). São produzidos por uma variedade de técnicas, mais comumente por deposição química de vapor que envolve a reestruturação de átomos de carbono usando catalisadores metálicos. Dependendo do número de paredes, os nanotubos podem ser classificados em nanotubos de paredes simples (NTCPs), quando formados por apenas uma camada cilíndrica de grafeno, e nanotubos de paredes múltiplas (NTCPMs), quando formados de múltiplos cilindros coaxiais de grafeno (LEE, J. K. Y. *et al.*, 2018).

Os NTC apresentam elevada razão de aspecto (valores entre 100 e 1000) com diâmetros e que podem variar de 0,4 a 100 nm e comprimentos de poucos nanômetros a 0,5 m. Baseado na orientação do eixo do tubo em relação à rede hexagonal, a estrutura do nanotubo pode ser definida por um vetor quiral, (n,m). Dessa maneira, os NTCPs apresentam três formas quirais (armchair, zig-zag e chiral). Sendo, a maioria quiral ($m \neq n$), alguns armchair ($m = n$) ou zigzag ($m = 0$), conforme apresentado na Figura 14.

A quiralidade, o arranjo atômico, a morfologia e a nanoestrutura influenciam diretamente na condutividade elétrica dos NTC. Os NTC podem ser condutores, com valores de condutividade elétrica entre 10^5 e 10^8 S/cm ou podem ser semicondutores com valores de condutividade em torno de 10 S/cm (CHOUDHARY; GUPTA, 2001). Apresentam excelentes propriedades mecânicas, como módulo de elasticidade de 0,2 – 1 TPa e resistência de 200 – 900 MPa, além de serem leves e flexíveis (OPRYCH *et al.*, 2016). A superfície dos NTC é considerada hidrofóbica, o que dificulta sua dispersão em solução aquosa. Métodos de funcionalização de NTC são empregados para melhorar sua dispersão e reduzir sua toxicidade (OPRYCH *et al.*, 2016).

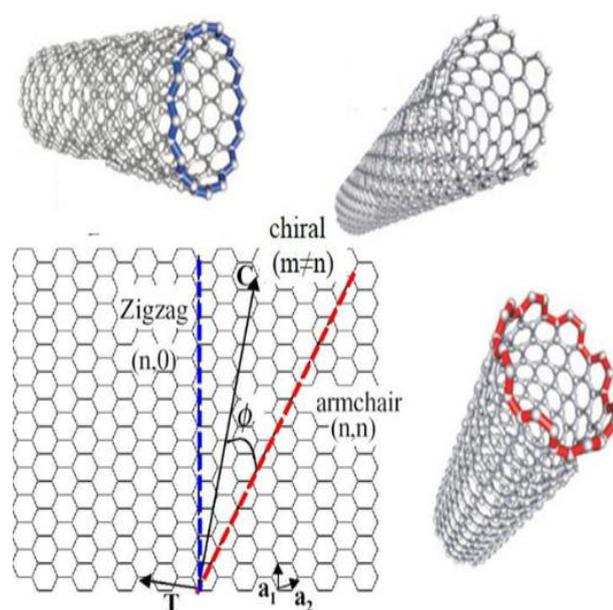


Figura 14 – Estrutura dos nanotubos em função da quiralidade (zigzag, chiral e armchair), adaptado de (TÎLMACIU; MORRIS, 2015).

6 PLGA

O PLGA é um poliéster alifático sintético, biocompatível, biodegradável e bioabsorvível, pertencente ao grupo dos poli (α -hidróxi ésteres) saturados, conforme a estrutura química apresentada na Figura 15. O PLGA é um polímero aprovado pela FDA e utilizado em diversas aplicações em engenharia tecidual, principalmente devido sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades mecânicas satisfatórias (SANTOS, F. P. dos *et al.*, 2019). Por esse motivo, estudos focam no emprego de PLGA em diferentes contextos da engenharia tecidual, incluindo a regeneração de nervos periféricos (NUNE; KRISHNAN; SETHURAMAN, 2016; WANG, J. *et al.*, 2018).

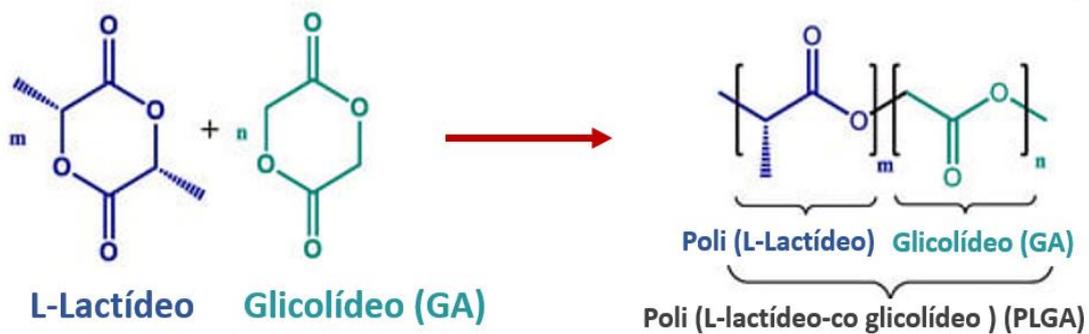


Figura 15 – Estrutura química do L-PLGA.

A versatilidade em propriedades físico-químicas, mecânicas e taxa de degradação do PLGA, provém principalmente da proporção de seus monômeros ácido láctico (LA) e ácido glicólico (GA) (LA/GA) e da a composição estereoisomérica do ácido láctico, L ou DL (mistura racêmica) (AVGOUSTAKIS, 2008). Como exemplo, o PLGA formado pode ser o poli (DL-ácido láctico-co-ácido glicólico) (DL-PLGA) ou poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) (L-PLGA).

O PLGA pode ser sintetizado via policondensação do ácido láctico e ácido glicólico ou pela abertura de anel de lactídeos e glicolídeos. A reação de policondensação direta do ácido láctico e do ácido glicólico, obtém-se um copolímero de baixa massa molar. Por esse motivo, preferencialmente, a polimerização por abertura de anel é escolhida pelo fato de produzir polímeros de maiores massas molares e, conseqüentemente, melhores propriedades mecânicas (AVGOUSTAKIS, 2008).

Polímeros com alta massa molar (cerca de 160 kDa) podem ser sintetizados por uma variedade de catalizadores, como os ácidos de Lewis e compostos organometálicos, ambos seguem o mecanismo de reação por coordenação. Na produção de polímeros para aplicações médicas, dois sais de estanho, cloreto de estanho(II) e 2-etilhexanoato de estanho(II), abreviado como octanoato de estanho [Sn(Oct)₂], têm sido usados como iniciadores.

O iniciador $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ é usualmente utilizado como iniciador da reação de polimerização via abertura dos anéis dos dímeros cíclicos, visto que apresenta alta taxa de reação, baixo grau de racemização. Ademais, esse composto é comercialmente disponível, fácil de manusear e solúvel em solventes orgânicos comuns e monômeros de éster cíclicos. O uso do $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ é permitido como aditivo alimentar em muitos países, o que significa que a sua toxicidade é muito baixa quando comparada a outros sais de metais pesados (GENTILE *et al.*, 2014).

O mecanismo de degradação do PLGA acontece pela hidrólise das ligações ésteres, através de erosão heterogênea ou em massa. A degradação pode ser descrita em quatro etapas: (i) hidratação, em que há penetração de água nas regiões amorfas, reduzindo a temperatura de transição vítrea (T_g); (ii) degradação inicial, através da clivagem de ligações covalentes, com redução da massa molar; (iii) degradação, clivagem por autocatálise, resultando perda de integridade e (iv) solubilização, gerando fragmentos ainda menores. A degradação no meio extracelular do PLGA, gera como subprodutos metabólicos o ácido láctico e ácido glicólico. Estes subprodutos são posteriormente hidrolizados em lactado e glicolato, e então fagocitados. Assim, os subprodutos são convertidos em piruvato dentro das células, posteriormente entram no Ciclo de Krebs e terminam sua rota metabólica em gás carbônico e água, que podem ser eliminados através da urina e da respiração (LINS *et al.*, 2016; SANTOS, V. I. dos *et al.*, 2020).

A taxa de degradação do PLGA é influenciada por diversos fatores, dentre eles: i) a massa molar: o aumento da massa molar aumenta o tempo de degradação; ii) a proporção LA/GA: PLGA com maior percentual de LA é mais hidrofóbico devido a presença do grupo metil (CH_3), o que dificulta o acesso de água por impedimento estérico, absorvendo menos água e conseqüentemente, degradando mais lentamente, iii) a estereoquímica: regiões amorfas permitem a penetração de água, o que acelera a degradação do PLGA; iv) os grupos finais: os grupos ésteres possuem maior tempo de degradação de meia vida quando comparados com grupos finais carboxílicos; v) as características do produto: tamanho, forma e porosidade, influenciam na área de contato do material com o meio; vi) o ambiente de degradação: a temperatura e o pH do meio também podem interferir na taxa de degradação (AVGOUSTAKIS, 2008).

A biodegradabilidade do PLGA elimina a necessidade de segunda cirurgia para a retirada do condúite, previne inflamações e dores crônicas causadas pela compressão do nervo. O PLGA sofre reações de hidrólise através da clivagem de ligações éster, produzindo os ácidos láctico e glicólico como produtos de degradação. Esses ácidos, por sua vez, são finalmente absorvidos pelo corpo humano (LI; NEMES; GUO, 2018). O tempo de degradação do polímero deve ser compatível com a regeneração, dessa maneira, é mantida a integridade estrutural do material sem que haja a compressão do nervo. Para que a recuperação funcional seja satisfatória é necessário que o material

tenha no mínimo tempo de degradação de 3 meses. Isso porque as primeiras 10 - 12 semanas após a lesão são consideradas críticas para uma recuperação funcional satisfatória (YU *et al.*, 2011). Uma vantagem notável do PLGA é o tempo de degradação ajustável, podendo variar de semanas à vários meses e até vários anos (LUIS *et al.*, 2007). Como exemplo, o L-PLGA 82:18 apresenta tempo de degradação que varia entre 1 - 2 anos, conforme valores dado pelo fabricante (Evonik Industries).

7 TRABALHOS CORRELATOS

7.1 CONDUÍTES COMERCIAIS APROVADOS PELA FDA

Nos últimos 20 anos, a FDA aprovou diversos conduítes baseados em polímeros naturais e sintéticos para o reparo de defeitos de nervos decorrentes de lesões em nervos periféricos. A investigação realizada nesta seção foi focada em três conduítes considerados pela literatura como sendo os mais relevantes (NeuraGen®, Neurotube® e Neurolac®). Ademais, existe uma ampla disponibilidade de dados pré-clínicos (em animais) e clínicos (em humanos) destes conduítes. A Tabela 3 apresenta comparativamente as principais características destes conduítes comerciais, incluindo as suas vantagens e desvantagens.

Tabela 3 – Principais conduítes biodegradáveis aprovados pela FDA.

Produto	Material	Estrutura	Degradação	Vantagens	Desvantagens
Neurogen®	Colágeno do tipo I	Semipermeável fibrilar	36 - 48 meses	Comparável ao autoenxerto em defeitos de até 2 cm	Longo tempo de degradação; Imunogenicidade
Neurotube®	Poli (ácido glicólico)	Malha absorvível	3 meses	Comparável ao autoenxerto em defeito de até 2 cm	Curto tempo de degradação; Produtos de degradação ácidos
Neurolac®	Poli (ácido láctico-co-caprolactona)	Tubo transparente	16 meses	Comparável ao autoenxerto em defeitos de até 2 cm	Inchamento; Alta rigidez

Conduítes naturais têm a principal vantagem de fornecer sítios ativos para células e moléculas de adesão, ou seja, apresentam alta biocompatibilidade. Dentre eles, o colágeno é extensamente utilizado para a aplicação no reparo de nervos periféricos (ANGIUS *et al.*, 2012). Conduítes de colágeno são produzidos a partir da purificação do colágeno tipo I, derivado de tendões bovinos. Quando purificado, o colágeno reduz sua antigenicidade, que pode ser ainda mais reduzida via remoção enzimática ou por *crosslinking* (HARDIN-YOUNG *et al.*, 1996). O colágeno é um importante componente da MEC, o que favorece a adesão e proliferação celular e, por isso, utilizado como um biomaterial (DI SUMMA *et al.*, 2014; SHI *et al.*, 2007).

O uso de conduíte de colágeno tem sido utilizado em estudos com modelos animais e também em humanos. Archibald *et. al* (1991) demonstram a viabilidade do uso de conduítes de colágeno em defeitos de 5 mm em primatas não humanos. Em 2001, foi criado o primeiro conduíte semi-permeável de colágeno aprovado pela FDA, chamado NeuraGen®. O NeuraGen® é composto de colágeno do tipo I tratado via *crosslinking*, com tempo de degradação de 36 - 48 meses (BLILEY; MARRA, 2015). O conduíte encontra-se disponível em dois comprimentos, 2 e 3 cm, com diâmetros internos variando de 1,5 - 7 mm. A Figura 16 apresenta o conduíte comercial NeuraGen®. O uso de NeuraGen® em humanos foi analisado por Farole e Jamal (2008). O conduíte foi

usado para reparar 9 lesões de 15 mm do nervo alveolar inferior e lesões linguais de 8 pacientes. Os resultados apresentaram o melhoramento sensorial de 8 em um total de 9 lesões (FAROLE; JAMAL, 2008). A principal vantagem do Neuragen® identificada na literatura são os resultados clínicos comparáveis com o autoenxerto e pré-clínicos apresentando boa eficácia em defeitos até 4 cm. No entanto, as principais desvantagens são o longo tempo de degradação (36 - 48 meses), que pode ocasionar compressão no nervo e indesejáveis respostas imunes (KEHOE; ZHANG, X. F.; BOYD, 2012).

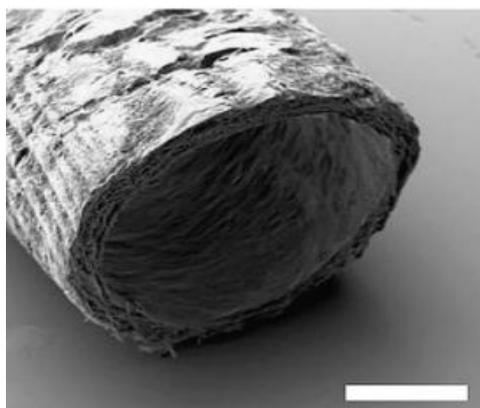


Figura 16 – Conduíte comercial aprovado pela FDA, Neuragen®, adaptado de (TAN; RAJADAS; SEIFALIAN, 2012).

O PGA é um polímero comumente utilizado como material de suturas. Ele apresenta excelentes propriedades mecânicas e degrada-se *in vivo* com a completa clivagem dos componentes ésteres em 3 meses (BLILEY; MARRA, 2015). Conduítes de PGA alcançaram resultados positivos na recuperação motora e sensorial de nervos lesionados. Dellon e Mackinnon (1988) realizaram experimentos *in vivo* com conduítes de PGA. Neste estudo foram apresentadas evidências de regeneração motora, por análises morfométricas e eletrofisiológicas, em defeitos de 3 cm em nervo ulnar de macacos.

Um dos primeiros estudos clínicos com o uso do Neurotube®, que é composto de PGA, foi reportado por Mackinnon e Dellon (1990). Neste estudo, 15 pacientes com defeitos entre 0,5 - 3 cm foram avaliados. Os resultados apresentaram recuperação sensorial excelente em 5 pacientes (33%), boa recuperação em 8 pacientes (53%) e resultados ruins em 2 pacientes (14%).

O Neurotube®, apresentado na Figura 17, foi o primeiro conduíte sintético aprovado pela FDA, em 1999. O conduíte encontra-se disponível em comprimento de 4 cm e diâmetro interno de 2,3 mm, e comprimento de 2 cm com diâmetro internos de 4 e 8 mm. É preferencialmente escolhido pelos cirurgiões para uso clínico, em termos de conduítes sintéticos, principalmente devido ao comprimento disponível, ao preço e ao vasto número de uso clínico (KEHOE; ZHANG, X. F.; BOYD, 2012). No entanto, em estudo realizado por Richard et. al (2009), investigou-se alguns conduítes aprovados

pela FDA e os resultados obtidos para regeneração de defeitos de 1 cm em ratos não foram satisfatórios para o conduíte Neurotube®. Em 12 semanas de pós operatório, o conduíte havia colapsado completamente, apresentando regeneração axonal e funcional limitadas (SHIN *et al.*, 2009). Pode ser identificado na literatura como vantagem do Neurotube® os resultados clínicos comparáveis ao autoenxerto em defeitos de até 2 cm e resultados pré-clínicos apresentando boa eficácia em defeitos até 3 cm. No entanto, as principais desvantagens são o curto tempo de degradação (3 meses), o que reduz as propriedades mecânicas do conduíte e a liberação de produtos ácidos de degradação, que podem ocasionar em resposta inflamatória (KEHOE; ZHANG, X. F.; BOYD, 2012).

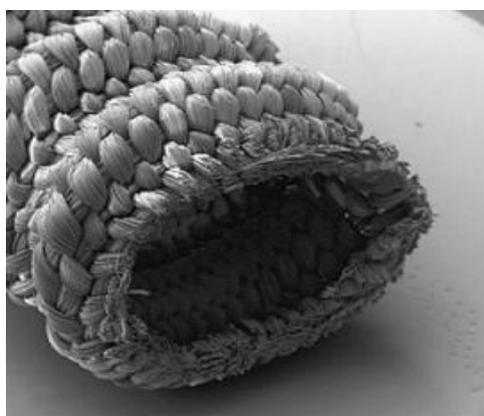


Figura 17 – Conduíte comercial aprovado pela FDA, Neurotube®, adaptado de (TAN; RAJADAS; SEIFALIAN, 2012).

Um dos primeiros relatos na literatura do uso do PCL foram realizados por Den Dunnen, Meek e Robinson (1998), com o uso do poli (50/50 (85/15 L/D lactídeo-co-caprolactona) em defeitos de 10 mm em ratos. Os pesquisadores investigaram a influência da espessura da parede do conduíte na degradação e no inchamento *in vivo*. Segundo os resultados, se a parede do conduíte for muito fina o conduíte pode se colapsar facilmente. Por outro lado, quando a parede é muito delgada ocorre o inchamento polimérico. O inchamento pode resultar na compressão do nervo em regeneração, e até no total bloqueio do interior do tubo. No entanto, se há controle da espessura da parede do conduíte, os resultados de regeneração podem ser satisfatórios (DUNNEN; MEEK, M.; ROBISON, 1998). Estudo posterior investigou o potencial uso de conduítes de poli (65/35(85/15 L/D lactídeo-co-caprolactona)). Devido ao aumento de lactídeo presente no copolímero, houve redução do inchamento do polímero (MEEK, Marcel F. *et al.*, 2004).

Em 2003, a FDA aprovou o conduíte Neurolac®, composto de poli (65/35 (85/15 L/D) lactídeo-co-caprolactona), apresentado na Figura 18. O conduíte encontra-se com a dimensão de 1,5 - 3 mm de diâmetro interno. Já em 2005, foi aprovado o conduíte Neurolac® com diâmetro interno de 4 - 10 mm. Ambos com comprimentos de 3 cm e tempo de degradação de cerca de 16 meses (KEHOE; ZHANG, X. F.; BOYD, 2012).

No estudo desenvolvido por Luis *et al.* (2007), foi comparado o uso do PLGA 90:10 (razão monômero lactídeo e glicolídeo) com estrutura fibrosa e do comercial Neurolac® com o método de sutura ponta a ponta e autoenxerto, em teste *in vivo* com ratos. Após 20 semanas o grupo com sutura ponta a ponta apresentou melhor recuperação de função motora quando comparado com os outros grupos. O nível de recuperação motora do grupo PLGA foi similar ao grupo Neurolac® e autoenxerto. O grupo PLGA apresentou vantagens em termos de biodegradação, degradando-se mais rapidamente em relação ao grupo Neurolac®, em 20 semanas. Isso foi justificado devido ao tempo de biodegradação do PLGA variar entre semanas e meses, enquanto que a do Neurolac® é de aproximadamente 16 meses.

As vantagens do uso do Neurolac® incluem a transparência, o que facilita a visualização no procedimento cirúrgico. Além disso, apresenta resultados clínicos comparáveis com autoenxerto para defeitos de até 2 cm e resultados pré-clínicos em defeitos de até 1,5 cm. Contudo, os fatores limitantes incluem a ausência de porosidade, a alta rigidez, o inchamento do polímero, a degradação incompleta e o colapso do conduíte. Como resultado disso, existe a formação de neuroma, formação de poucas fibras mielinizadas e em casos pré-clínicos a automutilação dos membros dos animais testados (MEEK, Marcel F.; JANSEN, 2008; VAREJÃO *et al.*, 2003).

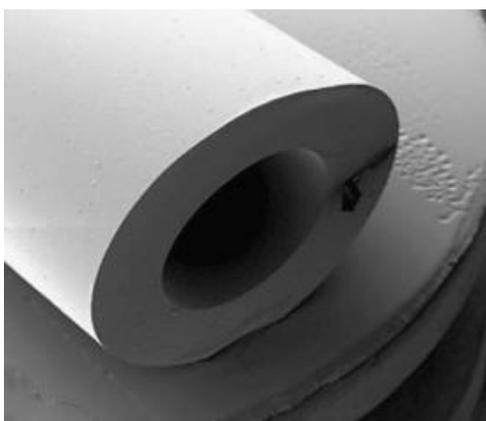


Figura 18 – Conduíte comercial aprovado pela FDA, Neurolac®, adaptado de (TAN; RAJADAS; SEIFALIAN, 2012).

7.2 TERCEIRA GERAÇÃO DE CONDUÍTES

A terceira geração de conduítes foca em desenvolver conduítes comerciais com propriedades e recuperação funcional igual ou superior ao autoenxerto. Como já foi visto, os atuais conduítes comerciais de tubo oco, apresentam sucesso comparável ao autoenxerto para defeitos de 2 cm. No entanto, existem muitas desvantagens a serem superadas, como a microestrutura rígida e o tempo de degradação não compatível com a regeneração. Diversas estratégias na literatura utilizam diferentes polímeros biodegradáveis e métodos de processamento para superar as desvantagens dos atuais conduítes comerciais. Esta seção discutirá o potencial de duas estratégias consideradas relevantes na regeneração de nervos periféricos, sendo elas, a obtenção de conduítes eletrofiados com estrutura alinhada e a obtenção de conduítes eletrofiados condutores.

7.2.1 Conduítes eletrofiados com estrutura alinhada

Guiar fisicamente e linearmente o crescimento do axônio aumenta a probabilidade de recuperação funcional do nervo lesionado (QUAN *et al.*, 2019). O uso de conduítes eletrofiados com estrutura alinhada apresentam vantagens em relação aos conduítes de tubos ocos, tais como: (i) são altamente flexíveis, porosos e estão bem adaptados para uso em sistemas biológicos; (ii) alta área de superfície específica, aumentando a área disponível para absorção de proteínas, migração de SC e regeneração de axônios; (iii) o alinhamento promove proliferação e crescimento de SC, e crescimento axonal guiado (DALY *et al.*, 2011). A Figura 19 apresenta a microestrutura de fibras eletrofiadas alinhadas de PLLA (ZOU *et al.*, 2016).

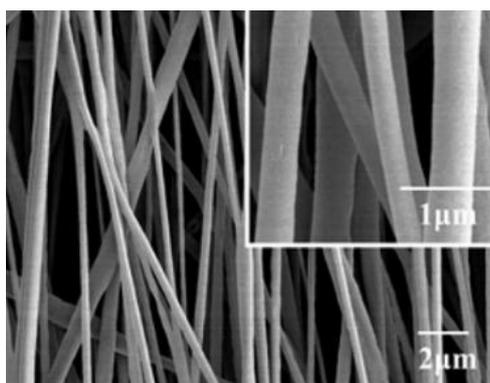


Figura 19 – Fibras alinhadas de PLLA, obtidas por eletrofiação (ZOU *et al.*, 2016).

Em estudo *in vitro* realizado por Kim *et al.* (2016), foi analisado o alongamento de células PC12 quando semeadas em fibras eletrofiadas de PLGA alinhadas e aleatoriamente distribuídas. Verificou-se já após o primeiro dia de cultura o maior alongamento dessas células quando semeadas sobre fibras alinhadas em comparação com fibras aleatoriamente distribuídas, como pode ser observado na Figura 20. Em estudo similar, fibras eletrofiadas alinhadas de PCL, foram testadas para verificar o efeito do alinha-

mento na maturação de SCs (CHEW *et al.*, 2008). O alinhamento das SCs objetiva mimetizar a formação de bandas de Büngner. Os resultados indicaram que as fibras alinhadas estimularam o alongamento das SCs (Figura 21). Além disso, as fibras alinhadas promoveram uma maturação superior das SCs quando comparadas com as fibras aleatoriamente distribuídas, mimetizando assim as bandas de Büngner.

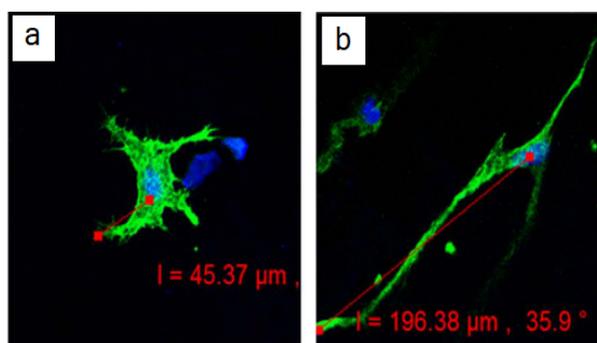


Figura 20 – Microscopia confocal de células PC12 aderidas após 1 dia de cultura em fibras eletrofiadas de PLGA (a) aleatoriamente distribuídas e (b) alinhadas, adaptado (KIM *et al.*, 2016).

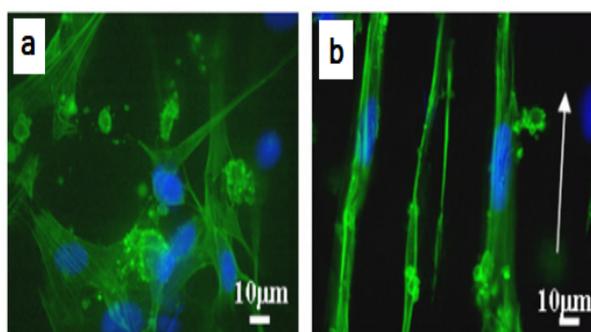


Figura 21 – Microscopia confocal de células de Schwann (SC) aderidas após 3 dias de cultura em fibras eletrofiadas de PCL (a) aleatoriamente distribuídas e (b) alinhadas, adaptado (CHEW *et al.*, 2008).

Em estudo *in vivo* realizado por Wang C. Y. *et al.* (2011), conduítes constituídos de fibras eletrofiadas de proteína da seda/P(LLA-CL) foram comparadas com o autoenxerto, em defeito de 10 mm do nervo isquiático de ratos. Os resultados indicaram que, embora tenham obtido resultados favoráveis quando comparado com o grupo negativo (P(LLA-CL) puro), quando comparado com o autoenxerto não foram satisfatórios. Resultados histológicos apresentaram um maior número de fibras mielizadas para o autoenxerto em comparação com o grupo proteína da seda/P(LLA-CL), em 4 semanas pós operatório. Assim como pelos resultados da micrografia MET, em 8 semanas pós operatório, é possível verificar que a espessura da bainha de mielina é significativamente maior para o autoenxerto em comparação com o grupo proteína da seda/P(LLA-CL), Figura 22.

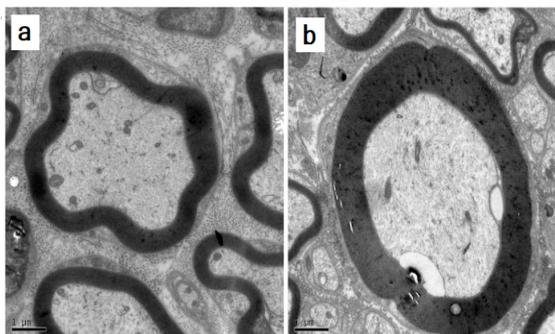


Figura 22 – Microscopia MET da espessura da bainha de mielina, em 8 semanas pós operatório: (a) conduíte de proteína da seda/P(LLA-CL) e (b) autoenxerto, (WANG, C. Y. *et al.*, 2011).

Em estudo recente *in vivo* realizado por Quan *et al.* (2019), foram comparados conduítes constituídos de fibras eletrofiadas alinhadas de PCL/quitosana e autoenxerto, em defeitos de 15 mm de nervo isquiático de ratos. Após 9 e 12 semana pós operatório, os resultados de IFC mostraram similaridade para todos os grupos (em torno de - 60). Através de análise de imunofluorescência, verificou-se que o número total de axônios mielinizados regenerados, diâmetro do axônio, diâmetro da fibra e espessura da mielina não foram significativamente diferentes entre os grupos. Assim, os resultados indicam que fibras eletrofiadas, de uma maneira geral, apresentam resultados similares ao autoenxerto, que ainda é considerado o *gold standard*.

Um fator importante a ser considerado é a resistência mecânica dos conduítes eletrofiados. Os conduítes devem apresentar resistência mecânica suficiente, principalmente, para suportar o processo de regeneração sem se romper e garantir sua função de barreira celular. A resistência mecânica de fibras eletrofiadas alinhadas foi avaliada em (KIM *et al.*, 2016). Foi encontrado o valor de 8 MPa de resistência máxima à tração em fibras eletrofiadas de PLGA. Esse valor é considerado satisfatório quando comparado com a resistência máxima à tração do nervo humano, que varia de 6,5-8,5MPa (CHIONO; TONDA-TURO, 2015). Estudos obtiveram valores ainda superiores em resistência mecânica de fibras eletrofiadas através de blendas com o polímero da seda e com adição de NTC (ZHANG, K. *et al.*, 2010; SHRESTHA, S. *et al.*, 2019).

Em alguns estudos é abordada a dificuldade na inserção cirúrgica de conduítes eletrofiados (FROST *et al.*, 2018; JING *et al.*, 2018). Com o objetivo de obter estabilidade para suportar o manuseio durante o procedimento cirúrgico, conduítes eletrofiados foram inseridos em tubos ocos de silicone (FROST *et al.*, 2018). Apesar dessa estratégia facilitar o procedimento cirúrgico, as principais desvantagens são a perda da porosidade e aumento da rigidez do conduíte. Além disso, em Frost *et al.* (2018), verificaram que houve a movimentação do conduíte eletrofiados dentro do tubo de silicone, comprometendo a reprodutibilidade dos resultados.

7.2.2 Conduítes eletrofiados condutores

O estímulo elétrico é capaz de promover a diferenciação e a proliferação celular, contribuindo assim na regeneração, especialmente para tecidos suscetíveis às alterações elétricas, como o tecido nervoso. Devido à natureza responsiva do tecido nervoso a sinais elétricos, a condução em conduítes condutores é estudada. Materiais condutores como o PPy.DBSA e o NTC são comumente utilizados por apresentarem excelentes propriedades elétricas e biocompatibilidade (SUDWILAI *et al.*, 2014; WANG, J. *et al.*, 2018). Como consequência da fragilidade destes aditivos, os mesmos são utilizados em combinação com polímeros biodegradáveis para a obtenção de conduítes condutores para o reparo de nervos (LEE, Jae *et al.*, 2009; WANG, J. *et al.*, 2018). Para a obtenção de conduítes eletrofiados condutores, duas rotas são comumente utilizadas: o recobrimento das fibras ou a incorporação de aditivos condutores, como o PPy.DBSA ou NTC, à solução polimérica e posterior eletrofição. Os conduítes obtidos podem ser estimulados eletricamente através de uma fonte externa de tensão elétrica, com intuito de potencializar a resposta elétrica dos conduítes. Os estímulos normalmente variam entre 40 mV/cm até 200 mV/cm (WANG, J. *et al.*, 2018; SUDWILAI *et al.*, 2014). No entanto, há estudos que consideram satisfatórios os sinais elétricos gerados entre as próprias células neurais durante o processo de regeneração do nervo (SUN *et al.*, 2018). Os estudos abordados nessa subseção são apresentados de maneira comparativa nas Tabelas 4 e 5, sendo separados em trabalhos que consideram a aplicação de estímulo elétrico externo e que não consideram estímulo externo, respectivamente.

Em estudo realizado por Lee *et al.* (2009), fibras eletrofiadas alinhadas de PLGA foram recobertas com PPy via polimerização oxidativa *in situ*. Neste estudo, em teste *in vitro*, células PC12 e neurônios hipocâmpais foram estimulados eletricamente com um potencial de 10 mV/cm à 100 mV/cm. Estímulos de 10 mV/cm foram mais eficazes, exibindo neuritos entre 40 - 50% mais longos e proliferação de 40 - 90% maior, quando comparados com neuritos que não foram estimulados. Em outro estudo, foram obtidas fibras eletrofiadas alinhadas de PLGA contendo 8 %m de NTC (WANG, J. *et al.*, 2018). Em teste *in vitro*, foram semeadas células PC12 e SCs nas fibras e estimuladas com 40 mV/cm. Os resultados *in vitro* demonstraram que o estímulo elétrico favoreceu a diferenciação e crescimento de células PC12, além do crescimento e mielinização de SCs.

Fibras eletrofiadas alinhadas de PLA foram recobertas com PPy via polimerização admicelar e recobertas com laminina como molécula bioativa em (SUDWILAI *et al.*, 2014). Neste estudo foi considerada a razão 1:1 (agente oxidante/monômero), e adicionalmente, foi utilizado o surfactante DBSA, com resultados de condutividade elétrica na razão 1:8 (DBSA/monômero) de 10 S/cm. Já em testes *in vitro* realizados neste estudo, células tronco hipocâmpais de ratos foram semeadas nas fibras produzidas e estimuladas à 200 mV/cm. Os resultados apresentaram um aumento na expressão

gênica das células estimuladas em comparação com as células não estimuladas. Em estudo similar, fibras eletrofiadas alinhadas de PLA foram recobertas com PPy via recobrimento eletroquímico (ZHOU *et al.*, 2017). Diferentes moléculas bioativas foram adicionadas à superfície das fibras, dentre elas, laminina, fibronectina e colágeno. Em teste *in vitro* realizados neste estudo, células PC12 foram semeadas nas fibras e estimuladas à 100 mV/cm. Os resultados indicaram que o estímulo elétrico aumentou a adesão celular, o alinhamento e o comprimento dos neuritos. Assim, existiu um efeito sinérgico entre as moléculas bioativas e o estímulo elétrico.

Conduítes eletrofiados de PCL recobertos com PPy via polimerização oxidativa *in situ* foram analisados por ensaios *in vivo*, com estímulo elétrico externo (SONG *et al.*, 2016). Defeitos de 15 mm foram feitos no nervo isquiático de ratos. Os conduítes condutores foram inseridos e estimulados eletricamente através da aplicação direta de uma corrente de 100 mV/cm durante 1h, após 1, 3 e 5 dias pós-operatório. Após 8 semanas pós-operatório o IFC dos conduítes condutores estimulados eletricamente foi de $-23,5 \pm 1,2$, não apresentando diferença significativa em relação ao autoenxerto ($-21,4 \pm 1,1$). Os resultados eletrofisiológicos dos conduítes condutores estimulados também foram similares ao autoenxerto, sendo $61,34 \pm 4,21$ m/s e $63,32 \pm 2,54$ m/s, respectivamente. Sendo assim, o estímulo elétrico externo favoreceu a regeneração do nervo e a sua recuperação funcional.

Tabela 4 – Diferentes conduítes eletrofiados com aditivos condutores, analisados por ensaios biológico, com estímulo elétrico externo.

Material	Condutividade elétrica	Estímulo elétrico	Ensaio biológico	Resultados relevantes	Fonte
PLGA/PPy	-	10 mV/cm	<i>in vitro</i>	Aumento da extensão e proliferação de neuritos	(LEE, Jae <i>et al.</i> , 2009)
PLGA/NTC	-	40 mV/cm	<i>in vitro</i>	Aumento da diferenciação de células PC12 e da mielinização de SC	(WANG, J. <i>et al.</i> , 2018)
PLA/PPy	10 S/cm	200 mV/cm	<i>in vitro</i>	Aumento da expressão gênica	(SUDWILAI <i>et al.</i> , 2014)
PLA/PPy	10 S/cm	100 mV/cm	<i>in vitro</i>	Aumento da adesão, alinhamento e comprimento dos neuritos	(ZHOU <i>et al.</i> , 2017)
PLCL/PPy	10^{-5} S/cm	100 mV/cm	<i>in vivo</i> defeito de 15 mm	IFC e velocidade de condução similares ao autoenxerto	(SONG <i>et al.</i> , 2016)

Outros estudos não consideram o estímulo elétrico externo e apresentam resultados relevantes Tabela *in vitro* e *in vivo*, 5. Em Shafei *et al.* (2017), fibras de PCL foram recobertas com PPy via polimerização em fase de vapor. Devido à baixa velocidade do coletor rotatório, as fibras produzidas no respectivo trabalho não se alinharam. Neste estudo foi encontrado o valor de condutividade elétrica de 1,9 S/cm. Os resultados dos testes *in vitro* (sem estímulo elétrico externo) apresentaram a diferenciação de células PC12, que foi observada por crescimento de neuritos após 4 dias de cultura nas fibras. Além disso, as áreas cobertas por células foram significativamente maiores nas fibras de PCL revestidas com PPy em comparação com PCL sem revestimento. Comprovando-se assim, que o PPy estimulou a diferenciação celular, além do crescimento e migração de neuritos.

Fibras eletrofiadas alinhadas de PU/quitosana contendo 0,2 %m de NTC foram recobertas com PPy em (SHRESTHA, B. K. *et al.*, 2018). Os resultados mecânicos mostraram que a adição de NTC aumentou a resistência máxima à tração de 8 MPa para 14 MPa. Devido ao recobrimento com PPy, foi observado a superhidrofilicidade da superfície, sendo este um fator importante para a adesão celular. Testes *in vitro*, sem estímulo elétrico externo, apresentaram maior diferenciação, adesão e proliferação de células PC12 e SCs, em relação às fibras aleatoriamente distribuídas. Assim, foi confirmado o efeito sinérgico dos NTC e do recobrimento das fibras.

Em estudo realizado por Sun *et al.* (2018), foram desenvolvidos conduítes constituídos de fibras de PCL/proteína da seda recobertas com PPy via polimerização oxidativa *in situ*. Estes conduítes foram submetidos a estudo *in vivo* sem estímulo elétrico externo. Foi observado que a densidade de SCs e a espessura da bainha de mielina foram maiores para o grupo PCL/proteína de seda recobertos em comparação com o grupo sem recobrimento. Adicionalmente não houve diferença significativa em relação ao grupo autoenxerto em 12 semanas.

Conduítes de tubo oco não poroso de PLGA/PPy foram preenchidos internamente com fibras eletrofiadas alinhadas de PLGA recobertas com PPy em (JING *et al.*, 2018). Estes conduítes foram testados em defeitos de 8 mm em ratos, sem estímulo elétrico externo. Em relação ao resultado de IFC, em 12 semanas, o autoenxerto apresentou valores próximos a -40 (melhor resultado), seguido do conduíte condutor, o qual apresentou valores próximos a -50, no entanto, não houve diferença significativa em relação ao autoenxerto. Já os resultados eletrofisiológicos, em 12 semanas, a velocidade de condução foi maior para o grupo autoenxerto ($40 \pm 5,3$ m/s), seguido do conduíte condutor ($32 \pm 4,1$ m/s), no entanto, não houve diferença significativa em relação ao autoenxerto. Como informação complementar, os autores afirmam que as fibras condutoras alinhadas promovem um microambiente favorável à regeneração. Isso é justificado devido à capacidade das fibras condutoras alinhadas transmitirem entre as células estímulos elétricos por elas produzidas.

Tabela 5 – Diferentes conduítes eletrofiados com aditivos condutores, analisados em ensaios biológicos, sem estímulo elétrico externo.

Material	Condutividade elétrica	Ensaio biológico	Resultados relevantes	Fonte
PCL/PPy	1,9 S/cm	<i>in vitro</i>	Aumento da diferenciação de PC12, crescimento e migração de neuritos	(SHAFEI <i>et al.</i> , 2017)
Quitosana/PU/NTC/PPy	-	<i>in vitro</i>	Aumento da diferenciação, adesão e proliferação de PC12 e SC	(SHRESTHA, B. K. <i>et al.</i> , 2018)
PLCL/Proteína da seda/PPy	-	<i>in vivo</i> defeito de 10 mm	Densidade e espessura da bainha de mielina similares ao autoenxerto	(SUN <i>et al.</i> , 2018)
PLGA/PPy	0,1 S/cm	<i>in vivo</i> defeito de 8 mm	IFC e velocidade de condução comparáveis com o autoenxerto	(JING <i>et al.</i> , 2018)

7.3 DESAFIOS NO DESENVOLVIMENTO DE CONDUÍTES

Os conduítes comerciais Neuragen®, Neurotube® e Neurolac® estão a cerca de 20 anos no mercado, e apesar das suas desvantagens, ainda não foram substituídos por conduítes mais eficazes. Nota-se que estes conduítes apresentam resultados clínicos e pré-clínicos comparáveis com o autoenxerto em defeitos de até 2 cm (FAROLE; JAMAL, 2008; SHIN *et al.*, 2009). Entretanto, possuem desvantagens correlacionadas principalmente a estrutura rígida, ao tempo de degradação e falta de características estruturais que biomimetizem o ambiente em regeneração. Essas desvantagens devem ser superadas a fim de desenvolver conduítes com características estruturais mais flexíveis e com tempo de degradação compatível com a regeneração. Além disso, desenvolver estratégias que biomimetizem o ambiente em regeneração e estimulem a regeneração do nervo, para que assim consigam em um futuro próximo superar as limitações dos conduítes comerciais, e além disso, apresentem resultados comparáveis ou superiores ao autoenxerto.

A escolha do material e do método de processamento é uma etapa importante para determinar as características desejadas. Para a escolha do material deve-se considerar, principalmente, a biocompatibilidade, biodegradabilidade e tempo de degradação. Atendendo estes requisitos, o PLGA é um polímero promissor. Isto porque é biocompatível, biodegradável e sua taxa de degradação pode ser ajustada com a proporção de seus monômeros na síntese (LUIS *et al.*, 2007). Quanto ao método de processamento, deve ser considerado um método que permita a obtenção de estruturas flexíveis, porosas e ao mesmo tempo resistentes mecanicamente. A eletrofiação é uma técnica que permite a obtenção de estruturas fibrosas, altamente porosas e com resistência mecânica satisfatória (CHIONO; TONDA-TURO, 2015).

Como foi discutido nesse capítulo, através da eletrofiação é possível fabricar conduítes constituídos de fibras alinhadas. Foi comprovado que essa estratégia estimula a diferenciação e o direcionamento celular, com bons resultados *in vitro* e resultados *in vivo* comparáveis com o autoenxerto (KIM *et al.*, 2016; WANG, C. Y. *et al.*, 2011). Ademais, foi constatado que a resistência mecânica de fibras alinhadas de PLGA apresentaram valores próximos ao nervo humano (CHIONO; TONDA-TURO, 2015). Uma outra estratégia também discutida, foi agregar propriedade elétricas em conduítes eletrofiados, em destaque àqueles com fibras alinhadas. As propriedades elétricas influenciam na diferenciação, proliferação e migração celular. Foram considerados, preferencialmente, os métodos de obtenção deste conduíte: via polimerização oxidativa *in situ* e pela incorporação de aditivos condutores à solução polimérica com posterior eletrofiação. Adicionalmente foram analisados estudos que propõem o estímulo elétrico externo e sem estímulo elétrico externo.

A necessidade do estímulo elétrico externo ainda não é um consenso na literatura. Alguns estudos apontam que o estímulo elétrico externo em conduítes eletrofiados condutores estimula a diferenciação e proliferação celular *in vitro*. E adicionalmente aumenta o IFC e a velocidade de condução *in vivo* (SONG *et al.*, 2016). Todavia, outros estudos obtiveram resultados favoráveis *in vitro* e *in vivo* comparáveis com o autoenxerto, sem a aplicação de um estímulo elétrico externo (SHAFEI *et al.*, 2017; JING *et al.*, 2018). Assim, partindo da análise que em ambos os casos os resultados são promissores, identifica-se que é clinicamente mais viável não utilizar estímulos elétricos externos em um paciente com lesão.

8 MATERIAIS E MÉTODOS

8.1 MATERIAIS

O polímero utilizado neste trabalho foi o PLGA (LA:GA = 82:18) Resomer® LG 824S, fornecido gentilmente pela empresa Evonik Industries - Germany. Os nanotubos de carbono (NANOCYL™ NC7000 series) de paredes múltiplas foram produzidos via deposição química de vapor de carbono pela empresa Nanocyl S.A. Outras informações a respeito destes nanotubos estão apresentadas na Tabela 6.

O monômero de pirrol (Py) (Sigma - Aldrich 99%) com massa molar de 67,09 g.mol⁻¹ foi previamente destilado sob vácuo e armazenado em frasco âmbar em atmosfera de N₂ a 4%. A argila montmorilonita (Mt) (VULGEL CN 45), de alta pureza, foi produzida pela Aliança Latina Indústrias e Comércio Ltda. O agente oxidante Cloreto Ferrico (Vetec) apresenta massa molar de 270,3 g/mol, enquanto o surfactante DBSA (Aldrich) apresenta massa molar de 326,54 g/mol. Os solventes, DCE e DMF, com grau de pureza (P.A.), foram procedentes da empresa VETEC, e foram utilizados como fornecidos.

Tabela 6 – Algumas propriedades dos nanotubos de paredes múltiplas.

Propriedades	Valores	Unidades
Pureza	90 ^a	%
Densidade	2,3 ^b	g/cm ³
Comprimento médio (L)	1,5 ^a	μm
Diâmetro médio (D)	9,5 ^a	nm
Razão de aspecto (L/D)	157,89	-
Área superficial	250 - 300 ^a	m ² /g
Condutividade	100 ^b	S.cm ⁻¹

^a Valores fornecidos pelo fabricante

^b Valores obtidos em laboratório

8.2 SÍNTESE DO POLÍMERO CONDUTOR PPy.DBSA

A síntese do polímero condutor (PPy.DBSA) foi obtida através da polimerização oxidativa *in situ* do monômero pirrol em solução aquosa. No processo de polimerização foi utilizado o surfactante aniônico (DBSA) e o agente oxidante cloreto férrico hexahidratado (FeCl₃ .6H₂O), seguindo o procedimento descrito por (MERLINI, C. *et al.*, 2014). O procedimento experimental está representado esquematicamente na Figura 23.

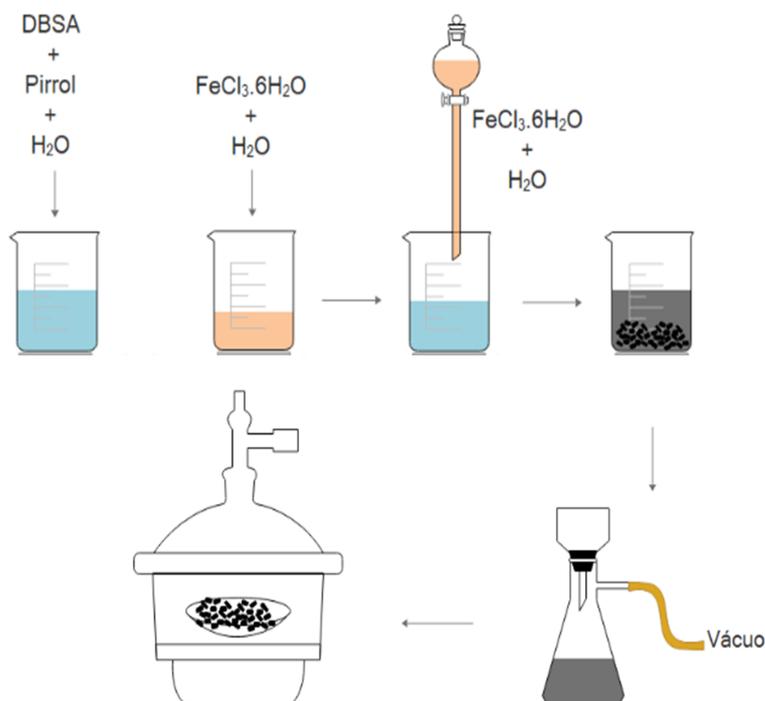


Figura 23 – Esquema ilustrativo da síntese oxidativa do pirrol para obtenção do aditivo condutor PPy.DBSA.

Inicialmente o surfactante aniônico (1,88 g) foi disperso em 0,05 L de água destilada em um béquer de 250 mL, em seguida foram adicionados 2 g (0,3 mol/L) de pirrol (Py). Após 10 minutos, 16,2 g de FeCl₃.6H₂O previamente dissolvidos em 0,05 L de água destilada foram adicionados gota a gota à dispersão aquosa contendo pirrol e DBSA. A razão molar oxidante/monômero e monômero/surfactante utilizada foi de 2/1 e 5/1, respectivamente. A polimerização foi mantida sob agitação magnética durante 1h a temperatura ambiente de 21 ± 2 °C. Após 24 h de repouso o PPy.DBSA foi filtrado e lavado diversas vezes com água destilada para extrair resíduos e subprodutos da reação. Após a lavagem o PPy.DBSA foi secado em uma estufa a vácuo a 60 °C, até a sua massa permanecer constante. Como última etapa, o PPy.DBSA foi cominuído em um almofariz e peneirada em malha com abertura de 75 mm/ μ m (200 mesh, marca Bertel) e armazenado à temperatura ambiente.

8.3 SÍNTESE DO POLÍMERO CONDUTOR MT-PPY.DBSA

A síntese do polímero condutor Mt-PPy.DBSA foi realizada através da polimerização oxidativa *in situ* do monômero pirrol, em solução aquosa, na presença da argila Mt, conforme descrito por (RAMOA *et al.*, 2018; SCHIEFFERDECKER *et al.*, 2019). No processo foi utilizado o surfactante aniônico DBSA e o agente oxidante, FeCl₃.6H₂O, como representado esquematicamente na Figura 24.

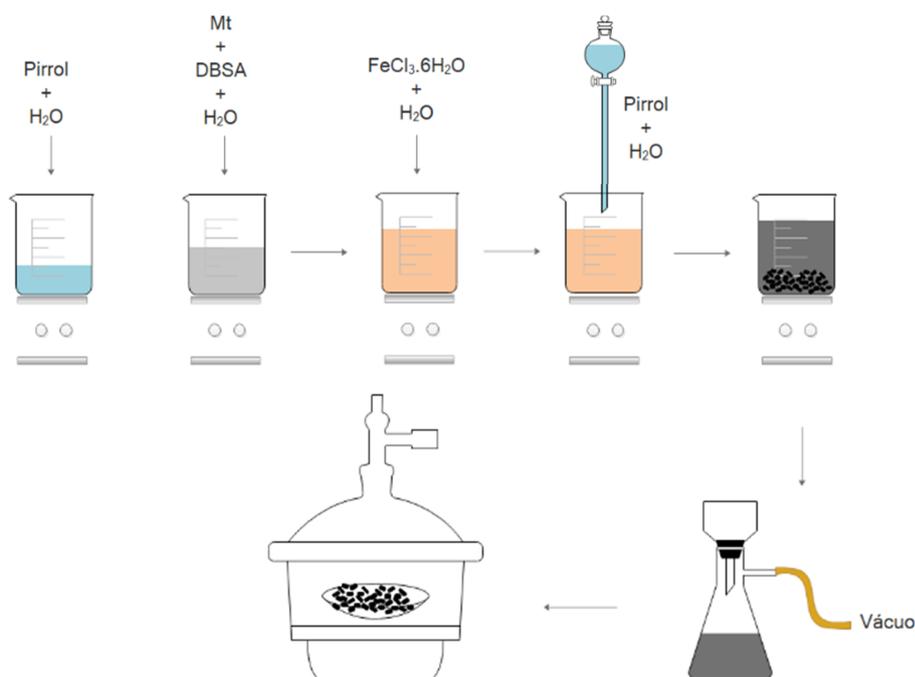


Figura 24 – Esquema ilustrativo da síntese oxidativa do pirrol na presença da argila montmorilonita (Mt) para a obtenção do aditivo condutor Mt-PPy.DBSA.

Primeiramente 1 g da argila Mt e 2,86 g do surfactante DBSA foram adicionados em 100 mL de água destilada, que representa uma razão molar monômero/surfactante de 5/1. Paralelamente, 27,57 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ foi dissolvido em 50 mL de água destilada (razão molar oxidante/Py: 2/1). Ambas as dispersões foram agitadas magneticamente a temperatura ambiente por 1 h. Logo após, a dispersão contendo a argila Mt foi dispersa em um processador de ultrassom (Sonis VCX 750), com potência de 35% (263W), durante 20 min. Em seguida, ambas as dispersões foram misturadas sob agitação magnética por 1h. Foi preparada também, uma solução aquosa de pirrol, contendo 20 mL de água destilada e 2,96 g de pirrol, sob agitação magnética por 30 min. A solução de pirrol foi adicionada gota a gota na dispersão final obtida e posteriormente agitada magneticamente durante 1h a temperatura ambiente. A solução final tem concentração molar de 0,3 mol/L de pirrol. Após 24 h de repouso, o aditivo condutor Mt-PPy.DBSA foi filtrado e lavado diversas vezes com água destilada. Posteriormente foi secado em uma estufa a vácuo a 60 °C, até a sua massa permanecer constante. Como etapa final, o aditivo Mt-PPy.DBSA foi cominuído em um almofariz e peneirado em malha com abertura de 75 μm (200 mesh, marca Bertel) e armazenado à temperatura ambiente.

8.4 MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA

Para a eletrofição da solução de PLGA e obtenção de fibras alinhadas, primeiramente foi preparada uma solução de 7,4 %m de PLGA (1,129 g para 12 mL de solução no total). Os solventes DCE e DMF foram utilizados na proporção de 3:1 v/v (9 mL/3 mL). A solução polimérica foi solubilizada a 50 °C durante 2 h. A solução de PLGA foi eletrofiada utilizando-se uma seringa de 5 mL e uma agulha metálica de 0,6 mm de diâmetro interno. A seringa foi acoplada em uma bomba de infusão (Instor Apparatus). O coletor metálico rotatório foi recoberto com folha de alumínio e aterrada, enquanto o polo positivo foi conectado à agulha. Uma fonte de alimentação de alta tensão com corrente contínua de até 30 kV foi utilizada para gerar o campo elétrico (Instor Apparatus). A solução de PLGA foi eletrofiada com uma vazão de 1 mL/h, tensão elétrica de 18 kV, distância entre a agulha e o coletor de 25 cm e velocidade do coletor rotatório de 2500rpm. A eletrofição da solução foi realizada a temperatura de 25 °C e umidade relativa de 60 %, conforme estudo realizado previamente por (CASTRO *et al.*, 2020).

8.5 PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA COM ADITIVOS NANOESTRUTURADOS CONDUTORES

As membranas eletrofiadas de PLGA e aditivos nanoestruturados condutores foram preparadas por duas rotas distintas, de acordo com o esquema apresentado na Figura 25.

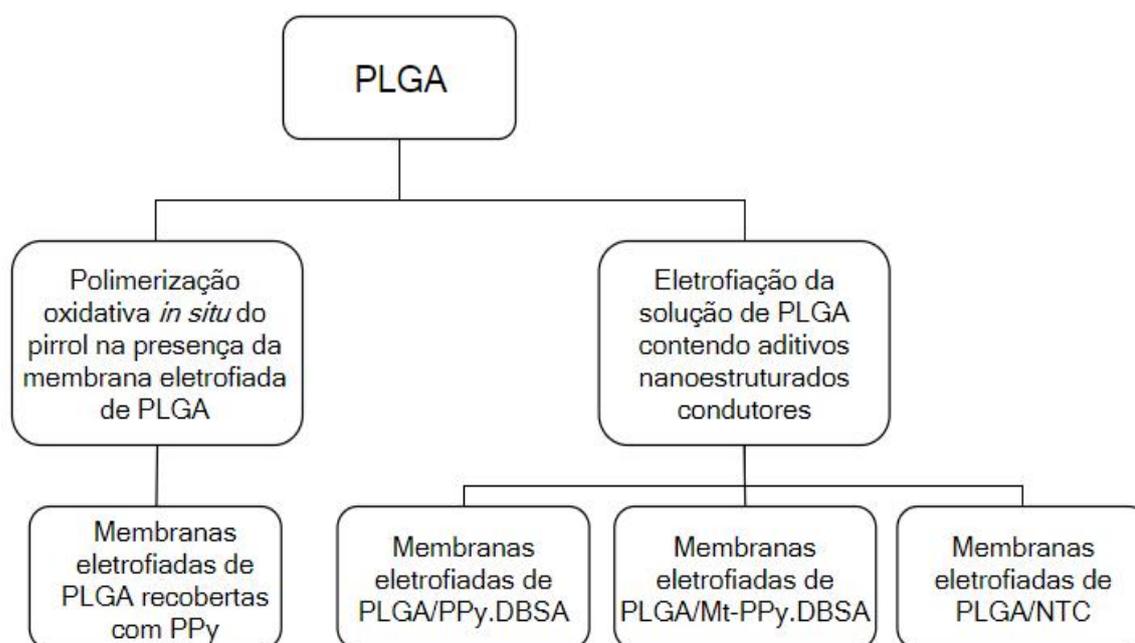


Figura 25 – Fluxograma da metodologia utilizada na preparação das membranas eletrofiadas de PLGA e aditivos nanoestruturados condutores.

8.5.1 Membranas eletrofiadas de PLGA recobertas com PPy

As fibras eletrofiadas de PLGA foram recobertas com PPy através da polimerização oxidativa *in situ* do pirrol na presença da membrana eletrofiada de PLGA. Foi utilizado o $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ como oxidante, conforme apresentado na Figura 26.

Em um primeiro momento, foram preparadas duas soluções: pirrol (0,1675 g) em 25 mL de água destilada e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1,35 g) em 25 mL de água destilada, ambas sob agitação magnética durante 10 minutos. A razão molar oxidante/monômero foi de 2/1 e a concentração de PPy foi de $0,05 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. A polimerização oxidativa *in situ* foi realizada de acordo com o estudo realizado por (MERLINI, C. *et al.*, 2014).

Posteriormente, a membrana com área de 30 mm^2 foi imersa em uma solução contendo $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Subsequentemente, a solução contendo o monômero pirrol foi gotejada na solução de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ com a presença da membrana eletrofiada. A polimerização foi realizada em um período de 5 horas sob agitação magnética branda. Após esse período, a membrana foi lavada com água destilada e seca em um dessecador à vácuo. As membranas de PLGA recobertas com PPy foram denominadas PLGA-rec.

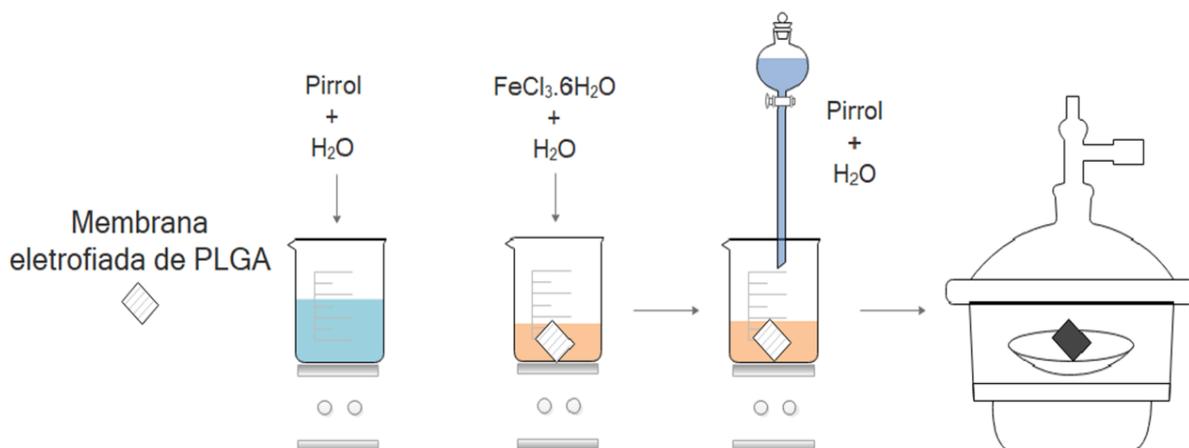


Figura 26 – Esquema ilustrativo da polimerização oxidativa *in situ* do pirrol (Py) na presença da membrana eletrofiada de PLGA.

8.5.1.1 Membranas eletrofiadas de PLGA/PPy.DBSA, PLGA/Mt-PPy.DBSA e PLGA/NTC

Membranas eletrofiadas de PLGA contendo aditivos nanoestruturados condutores foram preparadas de acordo com o esquema da Figura 27. Primeiramente foi preparada uma solução polimérica de PLGA (1,129g). Foram utilizados os solventes DCE/DMF 3:1 v/v (6 mL/2 mL). A solução foi mantida sob agitação magnética por 2h à 50 °C. Paralelamente foi preparada uma dispersão contendo os aditivos nanoestruturados condutores. Os aditivos foram adicionados com suas respectivas frações mássicas em DCE/DMF 3:1 v/v (3 mL/ 1 mL). A dispersão foi mantida sob agitação magnética por 30 min e subsequentemente sonicada durante 5 min. Ambas as soluções foram misturadas, resultando em uma solução de PLGA 7,4 %m contendo aditivos nanoestruturados condutores. Esta solução final foi sonicada por 5 min e eletrofiada.

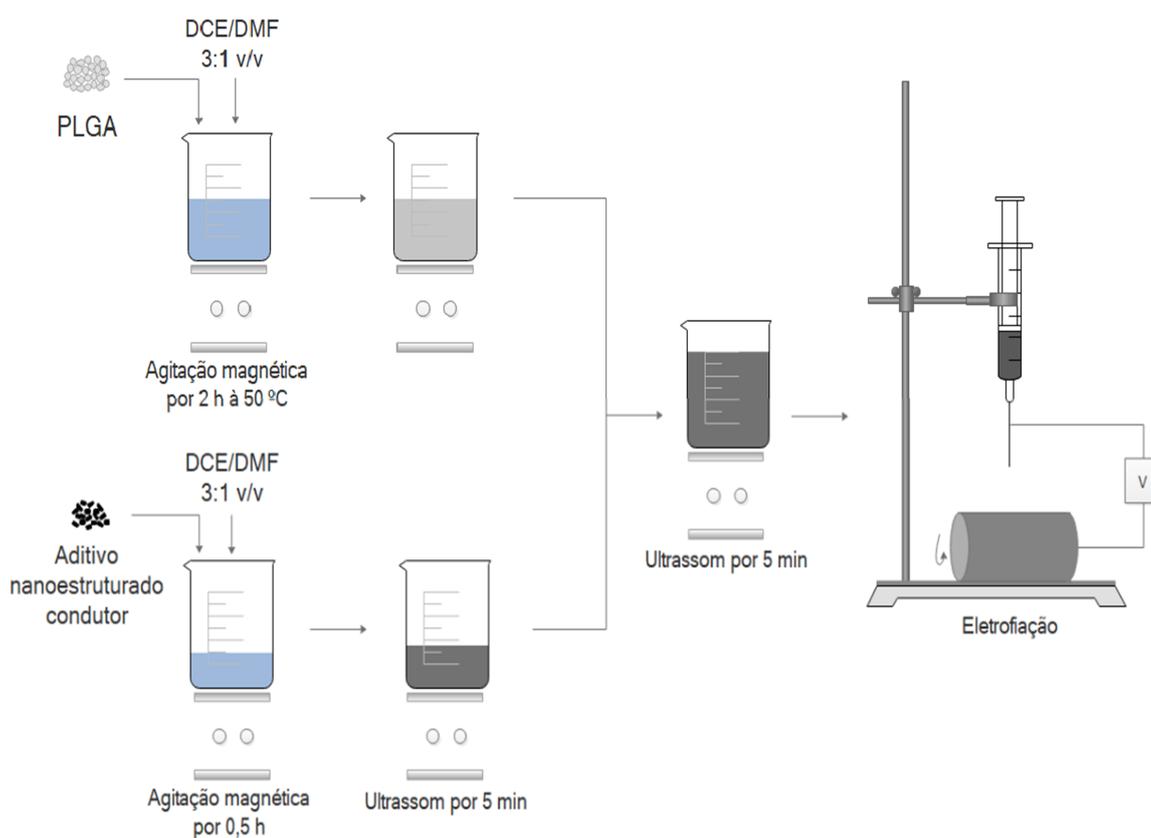


Figura 27 – Esquema ilustrativo da preparação da solução de PLGA contendo aditivos nanoestruturados condutores.

Os aditivos nanoestruturados condutores PPy.DBSA e Mt-PPy.DBSA foram adicionados na solução polimérica de PLGA nas frações mássicas 2,5, 5 e 7,5 %m. Essas frações foram definidas baseadas em estudo anterior, em que frações maiores que 7,5% de aditivos foram citotóxicas (MERLINI, C. *et al.*, 2018). Já os NTC foram adicionados na solução polimérica nas frações mássicas 0,25, 0,5 e 0,75 %m. Em testes preliminares realizado por este estudo, foi observado que em frações de

NTC acima de 0,75 %m a viscosidade da solução aumenta muito, inviabilizando o processo de eletrofição. As soluções foram eletrofiadas com uma vazão de 1 mL/h, tensão elétrica de 18 kV, distância entre a agulha e o coletor de 25 cm e velocidade do coletor rotatório de 2500 rpm. A eletrofição foi realizada a temperatura de 25 °C e umidade relativa de 60%. Foram obtidas membranas eletrofiadas contendo diferentes frações mássicas dos aditivos, denominadas como PLGA/PPy_x, PLGA/Mt-PPy_x ou PLGA/NTC_x, onde x representa a fração mássica do aditivo condutor.

8.6 DESENVOLVIMENTO DO CONDUÍTE DE NERVO

A membrana eletrofiada, com dimensões (14 mm x 50 mm), deve ser enrolada em torno de um capilar polimérico ou metálico (diâmetro 1,5 mm), resultando um conduíte de comprimento 14 mm e diâmetro externo de 1,7 mm, conforme pode ser observado na Figura 28.

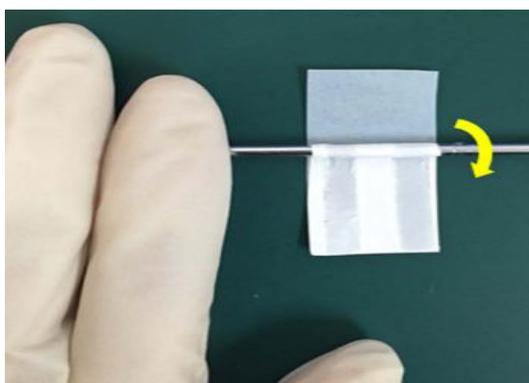


Figura 28 – Procedimento realizado para obter o conduíte eletrofiado (KIM *et al.*, 2016).

8.7 CARACTERIZAÇÃO

8.7.1 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

A microestrutura das membranas eletrofiadas de PLGA recoberta, membranas eletrofiadas de PLGA contendo aditivos nanoestruturados condutores PPy.DBSA, Mt-PPy.DBSA e NTC, e dos aditivos em pó PPy.DBSA, Mt-PPy.DBSA e NTC, foram avaliadas pelo MEV (Joel, modelo JSM-6390LV) e pelo microscópio eletrônico de varredura por emissão de campo (MEV-FEG), da marca Jeol modelo JSM6701F, ambos localizados no LCME, na UFSC. As amostras foram coladas com fitas de carbono dupla face em um porta amostra (*stub*), posteriormente recobertas com ouro e analisadas em tensões elétricas de 10 kV. A partir das imagens de MEV das membranas eletrofiadas foi calculado o diâmetro médio das fibras, utilizando-se o software livre ImageJ, sendo que para cada amostra foram realizadas 100 medidas.

8.7.2 Microscopia eletrônica de transmissão - MET

A microestrutura das membranas eletrofiadas de PLGA contendo aditivos nanoestruturados condutores e dos aditivos em pó, e a dispersão destes aditivos dentro das fibras foram avaliadas pelo TEM. As amostras foram eletrofiadas diretamente em um porta amostra (grid) de carbono com malha de cobre de 300 mesh (CF300-Cu) e examinadas em um microscópio JEM-1011 com uma aceleração de tensão de 100 kV localizado no LCME, na UFSC.

8.7.3 Ângulo de contato

A hidrofiliabilidade das membranas de PLGA contendo aditivos condutores nanoestruturados foram avaliadas pelo ângulo de contato. Os valores de ângulo de contato foram obtidos pelo goniômetro da marca Krüss, modelo DSA25, localizado no laboratório LABMAT, na UFSC. Foi utilizada água deionizada em volume de gota de 5 μL . O ângulo foi medido após 5 segundos após o contato com a superfície do material.

8.7.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier - FTIR

A caracterização estrutural química das membranas eletrofiadas de PLGA contendo aditivos nanoestruturados condutores e dos aditivos em pó foram avaliadas pela FTIR, utilizando-se o modo de reflexão total atenuada (ATR) em um espectrômetro Bruker, modelo TENSOR 27. As amostras dos aditivos em pó foram previamente prensadas e analisadas em forma de pastilhas. Os espectros foram obtidos em número de onda de 4000 a 600 cm^{-1} , por acúmulo de 32 varreduras, com uma resolução de 4 cm^{-1} . As análises foram realizadas no laboratório LABMAT, na UFSC.

8.7.5 Calorimetria exploratória diferencial - DSC

O ensaio DSC foi realizado para analisar a influência dos aditivos condutores PPy.DBSA, Mt-PPy.DBSA e NTC nas membranas eletrofiadas de PLGA. O equipamento utilizado para esta análise foi o Q20 TA instruments, localizado no laboratório IMP, INSA-Lyon. Aproximadamente 5 mg da membrana a ser analisada foram encapsulados em cadinhos de alumínio, com atmosfera de gás nitrogênio de 60 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As amostras foram submetidas a um primeiro aquecimento aquecimentos de 25 à 200°C, seguido de um resfriamento de 200 à 25°C, então reauecido novamente de 25 à 200°C (2º aquecimento). O primeiro ciclo objetivou analisar a influência do processamento no material. Já o segundo ciclo, analisar o comportamento do material após apagado seu histórico térmico. O instrumento foi calibrado com índio para o fluxo de calor e temperatura.

O grau de cristalinidade do polímero foi calculado a partir da Eq. (1). ΔH_{exp} é a entalpia de fusão experimental, o ΔH_c é o valor teórico da entalpia de fusão estimada a partir do polímero 100% cristalino (94.7 J/g) e $\%m$ é a porcentagem de massa do polímero.

$$Cristalinidade = \frac{\Delta H_{exp}}{\Delta H_c \%m} \times 100 \quad (1)$$

8.7.6 Análise termogravimétrica - TGA

A análise TGA foi realizada em um analisador termogravimétrico TGA550 TA Instruments, localizado no laboratório IMP, INSA-Lyon. As análises foram realizadas em uma faixa de temperatura de 35 a 700 °C, a uma taxa de aquecimento de 10°C.min⁻¹, utilizando-se fluxo de nitrogênio de 60 mL.min⁻¹. A quantidade de amostra analisada foi de aproximadamente 5 mg.

8.7.7 Análise termodinâmica-mecânica - DMA

A DMA das membranas eletrofiadas de PLGA contendo aditivos nanoestruturados condutores foi realizada para verificar suas propriedades mecânicas em função da temperatura. Foi utilizado o equipamento DMA/SDTA 861E, Mettler Toledo, sob o modo de tração, localizado no laboratório IMP, INSA-Lyon, conforme pode ser observado na Figura 29. Para a realização das análises, foram utilizados corpos de prova com largura de 3 mm e comprimento de 9 mm, que foram ensaiados utilizando-se frequência de 1Hz, em uma faixa de temperatura de 20 a 120 °C, a uma taxa de aquecimento de 5°C.min⁻¹ e deslocamento de pico a pico de 60 μm.



Figura 29 – Equipamento DMA/SDTA 861E, Mettler Toledo, durante o ensaio de DMA.

8.7.8 Teste de tração

Os ensaios mecânicos de tração foram realizados em máquina de ensaios eletromecânicos MTS 2/M à temperatura ambiente (22 ± 1 ° C) e sob umidade relativa de $30 \pm 5\%$, localizado no laboratório IMP, INSA-Lyon, conforme a Figura 30. As membranas eletrofiadas foram cortadas em dimensões de 10 mm x 30 mm. A espessura das membranas foi medida com um micrômetro para cada ensaio. O ensaio mecânico foi realizado com deslocamento constante de $5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$.

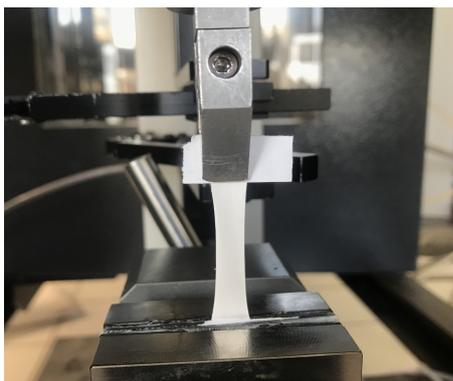


Figura 30 – Equipamento MTS/2M durante o ensaio de tração.

8.7.9 Condutividade elétrica pelo método de 4 pontas

A condutividade elétrica obtida pelo método padrão de 4 pontas foi utilizada para avaliar a condutividade elétrica das membranas eletrofiadas contendo aditivos nanoestruturados condutores e dos aditivos em pó, com condutividade acima 10^{-7} S/cm . As amostras de aditivos em pó foram prensadas, para a obtenção de um corpo de prova em forma de pastilha com diâmetro de 2,5 cm. Para cada amostra foram realizadas 5 medidas de condutividade. As análises de resistividade elétrica foram realizadas no laboratório POLICOM, na UFSC.

Neste método a corrente é aplicada entre os terminais externos e a diferença de potencial é medida entre os terminais internos, com um eletrômetro da Keithley, modelo 2400, como ilustrado na Figura 31. A condutividade elétrica (σ) ($\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$) foi calculada a partir da Equação (2).

$$\sigma = \frac{I}{V} \times \frac{\ln 2}{\pi} \times \frac{1}{w} \quad (2)$$

onde: I é a corrente (A); V é diferença de potencial elétrico (V), w a espessura (cm) e $(\ln 2)/\pi$ é um fator de correção.

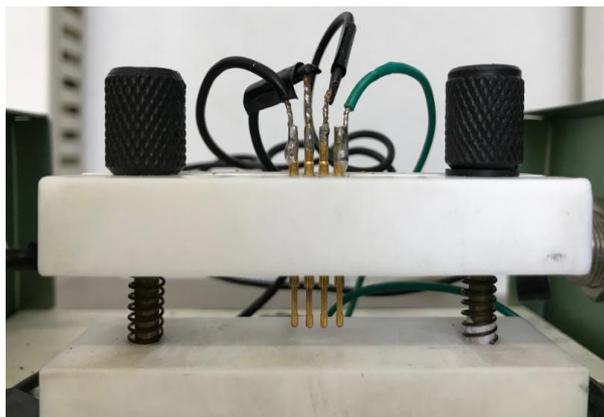


Figura 31 – Fotografia do dispositivo para medição da condutividade elétrica pelo método de 4 pontas.

8.7.10 Condutividade elétrica pelo método de 2 pontas

A condutividade elétrica obtida pelo método padrão de 2 pontas foi utilizada para avaliar a condutividade elétrica das membranas eletrofiadas contendo aditivos nanoestruturados condutores, com condutividade abaixo 10^{-7} S/cm. As análises foram realizadas utilizando-se um eletrômetro Keithley 6517A conectado a dispositivo de ensaio Keithley 8009, localizado no laboratório POLICOM, na UFSC. A Figura 32 ilustra a fotografia do dispositivo. Primeiramente foi calculada a resistividade elétrica (ρ) ($\omega \cdot \text{cm}$) de acordo com Equação (3), segundo (GIROTTI; SANTOS, I. A., 2002).

$$\rho = \frac{(d + g)^2 \pi}{4w} \times \frac{V}{I} \quad (3)$$

onde, w é a espessura da amostra (cm), V é a diferença de potencial elétrico (V), I é a corrente elétrica (A), d é o diâmetro do suporte da amostra (cm) e g é a distância entre o suporte da amostra e o anel de segurança (cm), conforme identificado na Figura 32.

Posteriormente, foi calculada a condutividade elétrica σ ($\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$), de acordo com a Equação (4).

$$\sigma = \frac{1}{\rho} \quad (4)$$



Figura 32 – Fotografia do dispositivo para medição da resistividade elétrica pelo método de 2 pontas.

8.8 DEGRADAÇÃO

As membranas eletrofiadas foram cortadas em retângulos (10×10 mm) para testes de degradação *in vitro*. As amostras foram cortadas e suas respectivas massas iniciais foram registradas. Após essa etapa de pesagem as amostras foram colocadas em tubos contendo 2 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,1 M, pH 7,4) para estudo de degradação *in vitro*. Os tubos foram colocados em banho de incubadora e mantidos a 37°C durante 12 semanas. Em intervalos predeterminados, semanas 1, 3 e 12, amostras para cada tipo de membrana foram recuperadas, lavadas com água destilada para remover os sais tampão residuais e secas até o peso permanecer constante em dessecador a vácuo.

A massa molar das membranas eletrofiadas foi determinada utilizando o método SEC. Para tal, as membranas foram dissolvidas em solvente DMF e filtradas para remover resíduos insolúveis. Ambos os eluentes foram usados com uma taxa de fluxo de $1 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$. As colunas foram conectadas a um detector RI. A concentração da amostra foi de $5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ e o volume de injeção foi de $100 \mu\text{L}$.

8.9 ENSAIO *IN VITRO*

Os ensaios *in vitro* de viabilidade celular MTT ((3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Brometo de difeniltetrazólio) foram realizados em parceria com o Laboratório de Hematologia e células-tronco da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), seguindo o protocolo dado.

8.9.1 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a citocompatibilidade das membranas eletrofiadas foi realizado ensaio de viabilidade celular MTT. Pedacos circulares das membranas eletrofiadas foram cortados e posicionados no fundo de placas de 48 poços e 5000 células da linhagem PC12. Um modelo neural amplamente utilizado proveniente de um tumor da medula da adrenal de ratos, foram semeadas sobre os biomateriais. As células foram cultivadas no material durante 1, 3 ou 7 dias a 37 °C e 5% de CO₂ e a viabilidade celular foi avaliada nos 3 tempos de acordo com o protocolo padrão do ensaio MTT. O meio de cultura celular foi retirado do poço e foi adicionado 400 µL de uma solução 5 mg/mL de (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-Brometo de difeniltetrazólio) em PBS. As células foram incubadas com essa solução a 37 °C e 5% de CO₂ por 2 horas. Após, a solução foi retirada e substituída por dimetilsulfóxido (DMSO) para lisar as células e solubilizar os cristais produzidos a partir da metabolização do MTT pelas células viáveis. Em seguida, 200 µL dessa solução foi transferido para uma placa de 96 poços e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro com comprimentos de onda de 540 nm e 620 nm. Somente as células viáveis são capazes de reduzir o MTT, aumentando a absorvância da amostra.

8.9.2 Histoquímica

A morfologia celular foi analisada por meio de histoquímica, utilizando os marcadores DAPI e faloidina para avaliar o núcleo celular e o citoesqueleto, respectivamente. Para isso, as células foram cultivadas nos materiais conforme descrito na seção anterior, por 7 dias. Após esse tempo, o meio de cultura foi retirado e as células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% (Sigma-Aldrich, Brasil) por 20 minutos e posteriormente lavadas com PBS. As amostras foram incubadas com faloidina conjugada com rodamina B (1:100, Thermo-Fisher, Brasil) por 40 minutos e nos últimos 4 minutos foi adicionado solução de DAPI (1:1000). Após a incubação as amostras foram lavadas 3 vezes com PBS e as imagens foram adquiridas utilizando o microscópio confocal Leica TCS SP5. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ.

8.9.3 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP) e calculados a partir de pelo menos três amostras para cada condição. A normalidade dos dados foi testada pelo teste Shapiro-Wilk. A análise estatística foi realizada usando ANOVA de fator único e a diferença significativa foi considerada estatisticamente para $p < 0,05$.

9 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Membranas de PLGA foram produzidas pela técnica de eletrofição com os seguintes parâmetros: tensão elétrica de 18 kV, distância entre agulha e coletor de 25 cm, vazão de alimentação 1 mL.h^{-1} e velocidade do coletor rotatório de 2500 rpm. Estes parâmetros foram ajustados previamente, de acordo com estudos realizados por (CASTRO, 2018; MERLINI, C. *et al.*, 2018).

Visando a aplicação destas membranas eletrofiadas para o desenvolvimento de conduítes para a regeneração de nervos periféricos, foram abordadas características microestruturais, mecânicas, propriedades elétricas e biológicas, as quais são apresentadas pela literatura como potencializadoras do processo regenerativo neural (LEE, Jae *et al.*, 2009; SUN *et al.*, 2018; SHRESTHA, S. *et al.*, 2019).

Membranas eletrofiadas de PLGA contendo aditivos condutores foram obtidas de duas maneiras distintas: (i) método indireto, o qual a membrana de PLGA puro é recoberta com PPy através da polimerização *in situ* do pirrol e (ii) método direto, a partir do qual é eletrofiada uma solução de PLGA contendo os aditivos condutores PPy.DBSA, Mt-PPy.DBSA e NTC dispersos.

Para a análise dos resultados as próximas seções foram separadas da seguinte maneira. Primeiramente, foram avaliadas as propriedades físico-químicas, mecânicas e biológicas das membranas de PLGA puro recobertas com PPy. Em seguida, foram avaliadas as propriedades das membranas de PLGA/PPy e PLGA/Mt-PPy. E por fim, foram avaliadas propriedades das membranas de PLGA/NTC.

9.1 MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA RECOBERTAS COM PPy

O recobrimento de fibras eletrofiadas com PPy é uma estratégia já difundida para o desenvolvimento de fibras eletrofiadas condutoras (CASTRO; MERLINI, Claudia, 2021; LEE, Jae *et al.*, 2009). O controle do processo de recobrimento de fibras é relativamente complexo. Como a polimerização do polímero é realizada diretamente sobre as fibras, existem vários fatores como tempo de reação e proporção monômero/oxidante que influenciam no processo.

As micrografias MEV das fibras de PLGA e PLGA recobertas com PPy estão apresentadas na Figura 33. Curvas de distribuição e box-plot da distribuição do diâmetros das fibras de PLGA e PLGA-rec estão apresentados na Figura 34. Foram obtidas membranas de PLGA altamente porosas, com fibras alinhadas unidirecionalmente e sem defeitos do tipo *beads*. As fibras de PLGA-rec apresentam superfície rugosa, resultante da deposição *in situ* de partículas de PPy sobre a fibra. Sendo assim, as fibras são compostas por um núcleo de PLGA revestido de PPy, com completa uniformidade de deposição e poucos agregados. Além disso, pode-se observar que o alinhamento das fibras após o recobrimento foi mantido. As fibras de PLGA apresentam diâme-

tros de $561,6 \pm 149,0$ nm, enquanto as fibras de PLGA-rec apresentam diâmetros de $827,2 \pm 247,9$ nm. O aumento do diâmetro das fibras de PLGA-rec está diretamente relacionado com a camada de deposição de PPy sobre as fibras de PLGA.

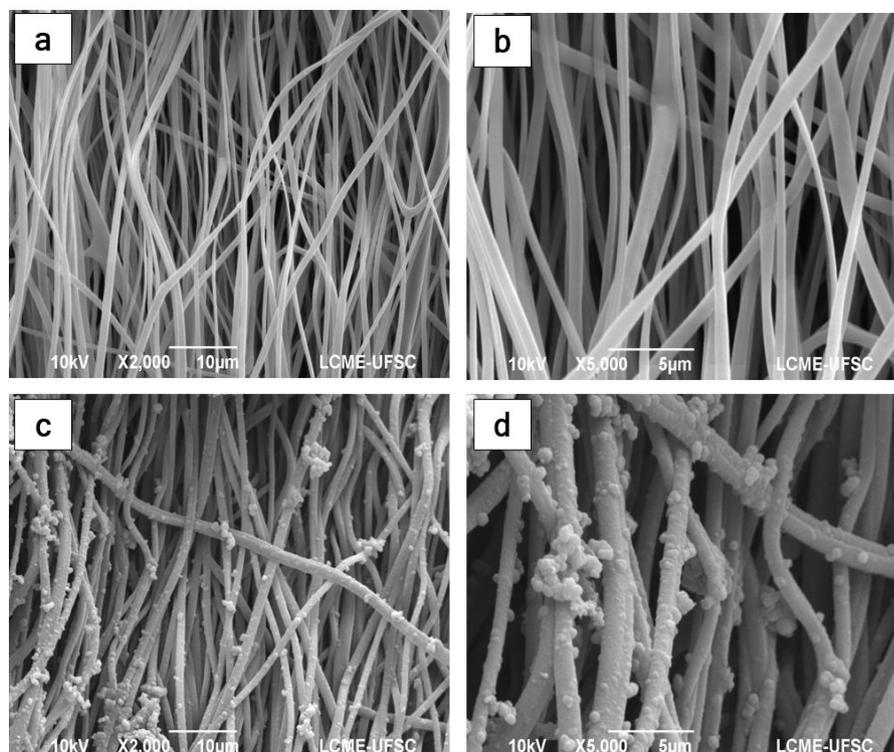


Figura 33 – (a-b) Micrografia MEV das fibras de PLGA e (c-d) PLGA recobertas com polipirrol via polimerização *in situ* do pirrol.

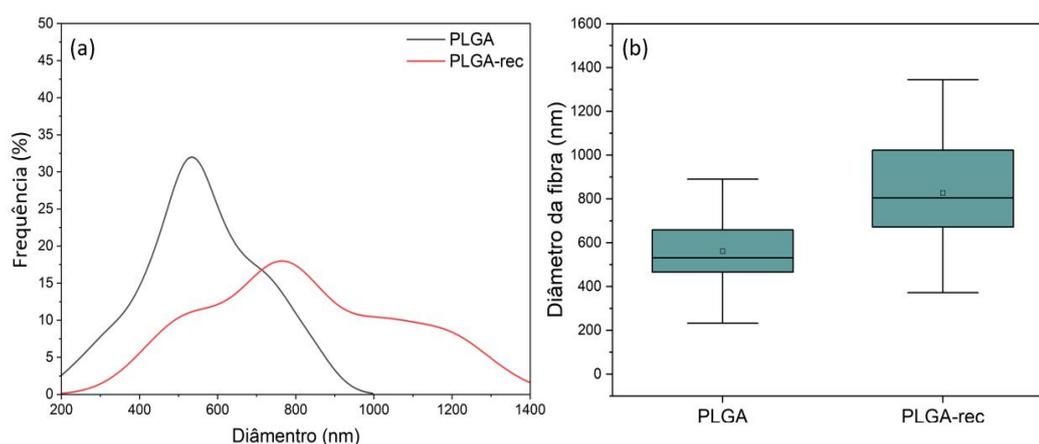


Figura 34 – (a) Curva de distribuição dos diâmetros e (b) Box-plot da distribuição dos diâmetros das fibras de PLGA e PLGA-rec ($n = 100$).

O PPy puro apresenta altos valores condutividade elétrica, cerca de $10^2 - 10^3$ S.cm⁻¹, além de boa biocompatibilidade e afinidade celular (BALINT; CASSIDY; CARTMELL, 2014; JING *et al.*, 2018). O valor de condutividade elétrica encontrado para a membrana de PLGA puro foi de $(2,94 \pm 1,43) \times 10^{-17}$ S.cm⁻¹, enquanto para a membrana de PLGA-rec foi de $(5,6 \pm 0,03) \times 10^{-2}$ S.cm⁻¹. Dessa maneira, o recobrimento

com PPy aumentou 15 ordens de grandeza em relação a membrana sem recobrimento, e este valor está dentro do esperado pela literatura para aplicação em regeneração de nervos periféricos (SONG *et al.*, 2016; ZHAN *et al.*, 2016). Os valores de condutividade elétrica considerados suficientes para estimular a proliferação de células neurais variam entre 10^{-5} e 10 S.cm⁻¹ (SONG *et al.*, 2016; SUDWILAI *et al.*, 2014). Do ponto de vista da influência das propriedades elétricas na regeneração *in vivo*, pode-se destacar o aumento da proliferação de células de Schwann, da espessura da bainha de mielina e da recuperação funcional do nervo (SUN *et al.*, 2018). Resultados similares foram obtidos em estudo realizado nas mesmas condições de recobrimento em membranas eletrofiadas de PVDF recobertas com polipirrol para aplicação como sensores de pressão (MERLINI, Claudia *et al.*, 2014).

A propriedade da superfície, incluindo a química da superfície e a hidrofobicidade, é um fator importante que influencia a adesão celular inicial e, conseqüentemente, afeta a proliferação e viabilidade celular do material (GERTZ *et al.*, 2008; SHRESTHA, B. K. *et al.*, 2018). Uma maneira de estimar a hidrofobicidade ou hidrofobicidade de um material é pelo ensaio de ângulo de contato. A Figura 35, apresenta os valores de ângulo de contato das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec. Os valores de ângulo de contato para as membranas de PLGA puro foram de $148 \pm 3,5^\circ$, indicando uma superfície hidrofóbica. Os valores de ângulo de contato reduziram de $148 \pm 3,5^\circ$ para $82 \pm 7,6^\circ$ com o recobrimento com polipirrol. Visto que os valores são inferiores a 90° , a membrana PLGA-rec é considerada hidrofílica. Isso pode ser explicado pelo fato de que o único par de elétrons de valência do nitrogênio do pirrol pode induzir a ligação de hidrogênio entre o pirrol heterocíclico e as moléculas de água, resultando no aumento de hidrofobicidade.

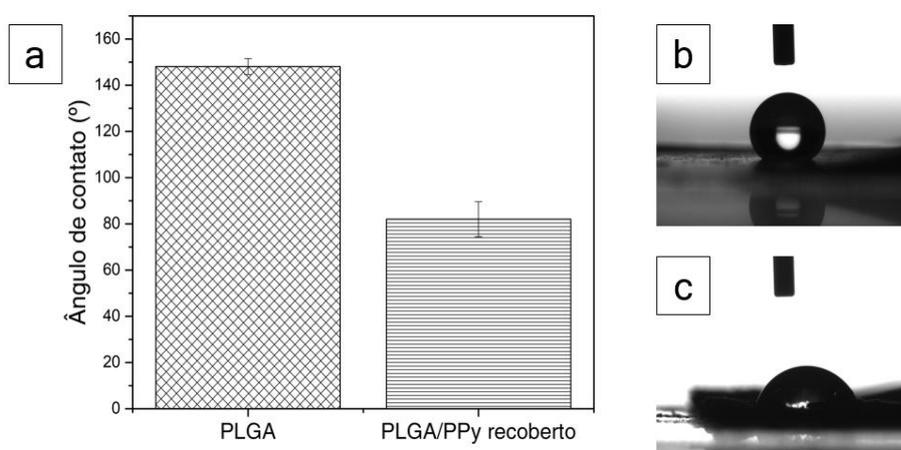


Figura 35 – (a) Histograma da média do ângulo de contato das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/PPy recoberto (dados apresentados como média \pm desvio padrão, $n = 5$), (b) PLGA e (c) PLGA-rec.

Para confirmar a presença qualitativamente do PPy sobre as fibras de PLGA foi realizado a espectroscopia FTIR, sendo que os espectros de PLGA, PLGA-rec e do aditivo condutor PPy.DBSA estão apresentados na Figura 36. Para o PLGA observa-se a banda de absorção em 1751 cm^{-1} atribuída ao estiramento C=O do COO. A banda em 1454 , por sua vez, é atribuída a deformação CH₃ e CH₂. Já a banda em 1181 cm^{-1} é atribuída a deformação C-O do COO. Para o PPy.DBSA, observam-se as bandas de absorção em 1530 cm^{-1} e 1441 cm^{-1} que são atribuídas à vibração de estiramento C-C e C-N do anel pirrol. Já a banda de absorção em 1288 cm^{-1} é atribuída aos modos de deformação no plano C-H ou C-N, enquanto as bandas 1146 cm^{-1} são atribuídos aos modos de dobramento C-H. As bandas em 1012 e 768 cm^{-1} estão relacionadas com a deformação vibracional C-H fora do plano do anel pirrol. As bandas de absorção obtidas estão em boa concordância com as bandas relatadas na literatura para o polipirrol (MERLINI, C. *et al.*, 2014). As membranas de PLGA-rec apresentaram a predominância das bandas do PPy e pequenos deslocamentos de bandas, como de 1288 cm^{-1} e 1146 cm^{-1} do PPy.DBSA para 1258 cm^{-1} e 1110 cm^{-1} referente ao PLGA-rec. Esses deslocamentos indicam uma possível interação química entre o PPy.DBSA e o PLGA.

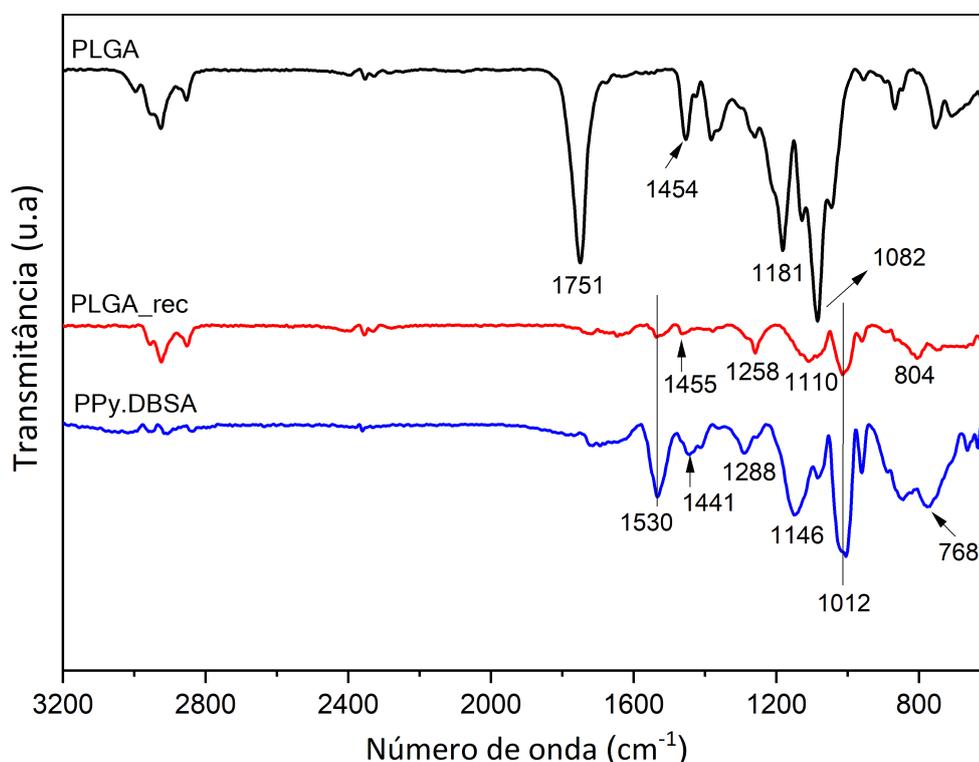


Figura 36 – Espectro FTIR das membranas de PLGA, PLGA-rec e do aditivo condutor PPy.DBSA.

As curvas termogravimétricas (TG) das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec estão apresentadas na Figura 37. A membrana de PLGA puro apresenta perda de massa com início em 284,9 °C e fim em 354,2 °C, com pico de degradação máxima em 343,0 °C. O PPy.DBSA apresenta duas perdas de massa, sendo a primeira em temperaturas abaixo de 100 °C e é justificada pela eliminação de água residual existente no aditivo PPy.DBSA. A partir de 330 °C o PPy.DBSA inicia o processo de degradação da cadeia polimérica, com pico de degradação máxima em 377 °C, apresentando 48% de resíduo à 600 °C. A membrana de PLGA-rec iniciou o processo de degradação em temperatura superior a membrana de PLGA puro, com onset de 332 °C e fim em 365 °C. Ademais a membrana de PLGA-rec apresentou pico de degradação máxima em 551 °C e 10 % resíduo à 600 °C. A presença do recobrimento das partículas do PPy.DBSA sobre as fibras de PLGA pode agir como uma camada protetora, fazendo com que a degradação térmica da membrana PLGA-rec seja deslocada para maiores temperaturas, aumentando assim a estabilidade térmica do material.

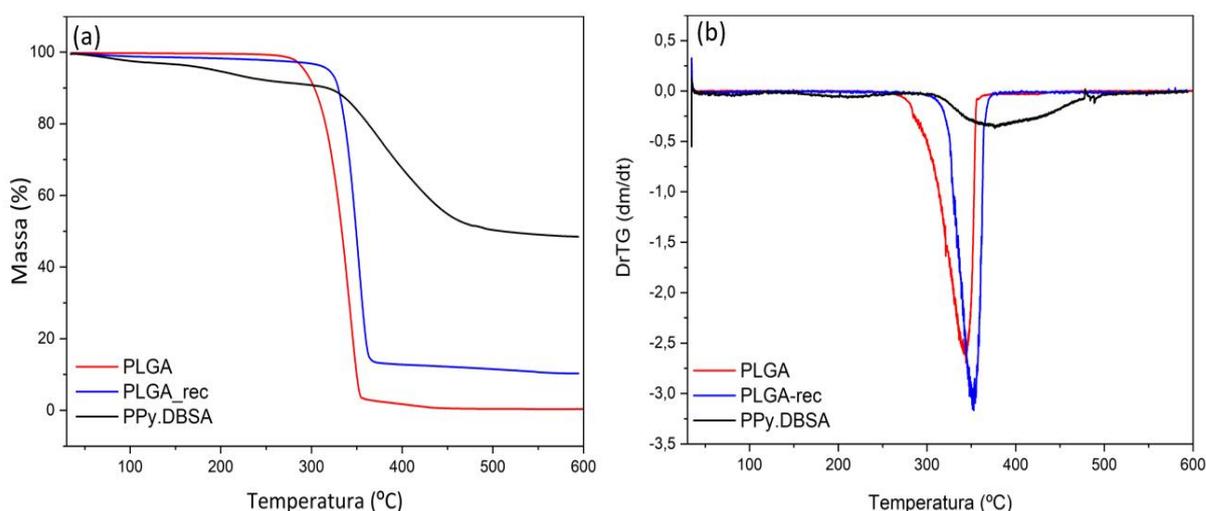


Figura 37 – Curvas de (a) TG e (b) DrTG do aditivo condutor PPy.DBSA e das membranas de PLGA e PLGA-rec.

Para suportar o crescimento axonal, é importante que o condúite de nervo tenha propriedades mecânicas suficientes para suportar não apenas o seu manuseio e sutura durante a cirurgia, mas também os movimentos do paciente ao longo do tempo de regeneração do tecido. Por esse motivo foram realizados os ensaios DMA e Tração para as membranas de PLGA e PLGA-rec.

As curvas de módulo de armazenamento (E') em função da temperatura para as membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec estão apresentadas na Figura 38 (a). O valor de E' reduziu após o recobrimento de 237 MPa (PLGA) para 85 MPa (PLGA-rec). Este efeito pode ser explicado pela presença do aditivo sobre as fibras de PLGA, podendo atuar assim na formação de defeitos e conseqüentemente reduzindo significativamente o módulo de armazenamento.

As curvas da tangente de perda ($\text{Tan } \delta$) em função da temperatura das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec estão apresentadas na Figura 38 (b). O deslocamento da T_g para maiores temperaturas, de $69,6^\circ\text{C}$ (PLGA) para $72,4^\circ\text{C}$ para o PLGA-rec, pode ser explicado pela redução da mobilidade das cadeias do PLGA devido a presença do aditivo condutor PPy sobre as fibras de PLGA. Outro efeito observado pela presença do PPy é uma redução ligeira do pico $\text{Tan } \delta$.

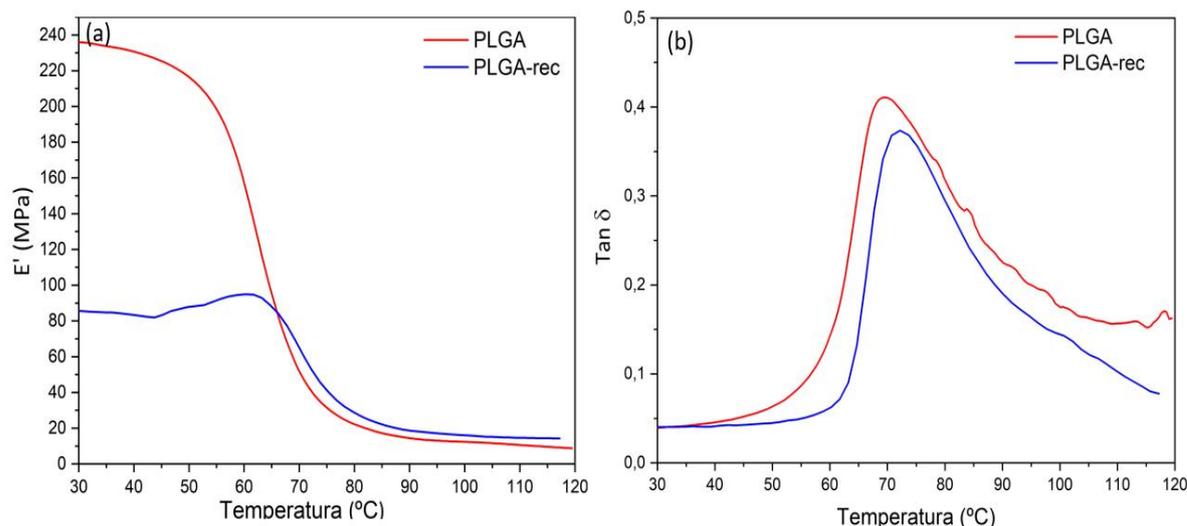


Figura 38 – Curvas de DMA (a) módulo de armazenamento e (b) $\text{tan } \delta$ em função da temperatura para as membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec.

A Figura 39 e Tabela 7 apresentam os valores obtidos no ensaio de tração das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA-rec e de um nervo humano (CHIONO; TONDA-TURO, 2015). Como pode ser observado as membranas de PLGA puro apresentam comportamento mais dúctil e tenaz em relação às membranas de PLGA-rec. Apesar disso, após o recobrimento os valores de módulo de elasticidade e tensão máxima à tração foram superiores para as membranas de PLGA-rec. Ou seja, o recobrimento aumentou a resistência mecânica, no entanto aumentou a fragilidade das membranas pela presença do PPy. De todo modo, em comparação com os valores de um nervo humano, as propriedades mecânicas foram satisfatórias para a aplicação como condúite de nervo, com valores acima daqueles obtidos pelo nervo humano. Já em comparação com outros estudos encontrados na literatura, as propriedades mecânicas obtidas são superiores ou equivalentes. Como em estudo realizado por Ghasemi *et al.* (2009), em que foi obtido valor de resistência máxima à tração para membrana de PCL de $5,87 \pm 1,26$ MPa (GHASEMI-MOBARAKEH *et al.*, 2009). Em outro estudo, também em membranas eletrofiadas de PCL, foi obtido valor de resistência a tração de cerca de 9 MPa (QUAN *et al.*, 2019). Sendo assim, ambas as membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec, de acordo com o ensaio de tração, atendem as propriedades mecânicas desejadas para a aplicação como condúite de nervo.

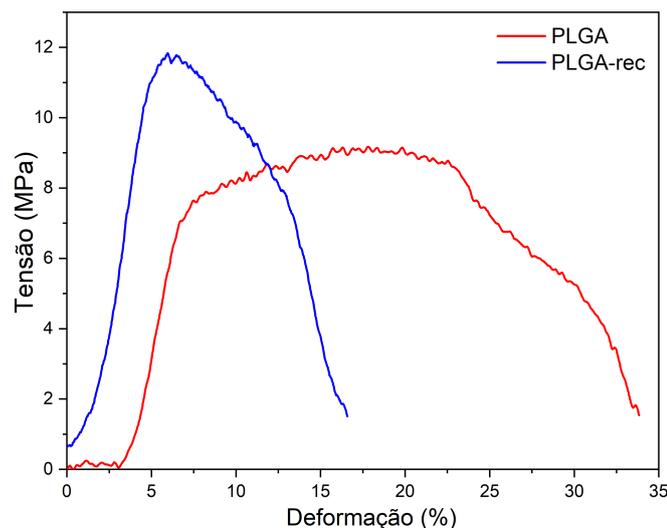


Figura 39 – Curva de tração das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec.

Tabela 7 – Propriedades mecânicas, módulo de elasticidade (E), resistência máxima à tração (σ) e deformação na ruptura, das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA-rec e de um nervo humano.

Membrana	E (MPa)	σ (MPa)	Deformação (%)
PLGA	147,7 \pm 1,3	6,2 \pm 0,05	21 \pm 4
PLGA-rec	264,1 \pm 77,1	10,6 \pm 2,6	8 \pm 2
Nervo Humano	15,8 \pm 2,2	6,7 \pm 0,5	6 \pm 2

A Figura 40 apresenta os resultados de viabilidade celular das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec após 1, 3 e 7 dias de cultura celular. A análise de viabilidade celular indicou que no dia 1 após a semeadura o grupo PLGA-rec apresentou redução na viabilidade celular significativa. Nos dias 3 e 7 após o cultivo celular, as membranas de PLGA-rec apresentaram menos de 50% de células metabolicamente ativas em comparação ao controle, portanto consideradas citotóxicas. Esse resultado não foi o esperado, visto que o PPy é considerado um polímero biocompatível. Além disso, outros trabalhos obtiveram sucesso em níveis de viabilidade celular de fibras recobertas com PPy (LEE, Jae *et al.*, 2009; ZHOU *et al.*, 2017; SONG *et al.*, 2016). A presença de resíduos do agente oxidante cloreto férrico, o qual foi utilizado na polimerização oxidativa do pirrol sobre as fibras de PLGA, pode ser um fator que tenha contribuído para a toxicidade do material.

A Figura 41, apresenta as morfologias das células PC12 semeadas sobre as membranas de PLGA e PLGA-rec no sétimo dia de cultivo celular. Como pode ser observado, as células cultivadas sobre as fibras alinhadas de PLGA apresentaram-se preferencialmente alinhadas em direção ao sentido das fibras. O mesmo efeito não foi observado para as fibras recobertas com PPy.

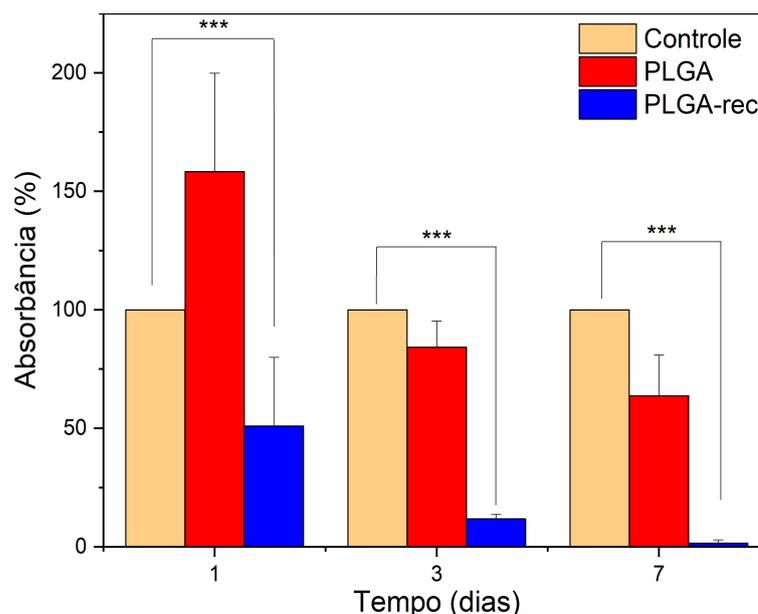


Figura 40 – Viabilidade celular das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec nos dias 1, 3 e 7 após o cultivo celular.

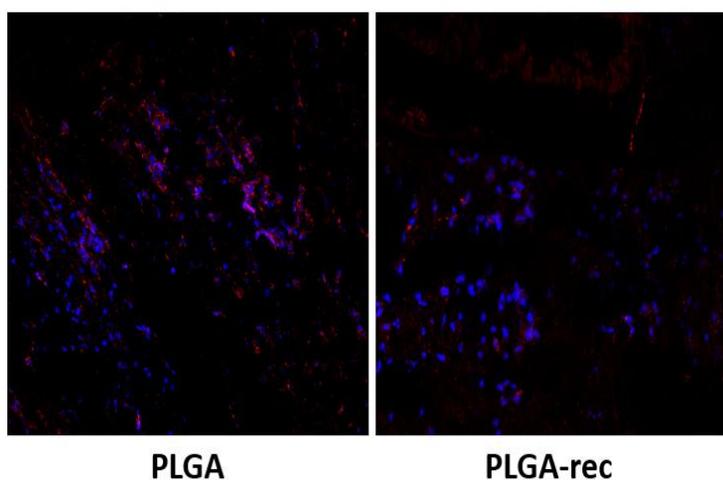


Figura 41 – Morfologia das células de linhagem neural PC12 semeadas após 7 dias sobre as membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA-rec (histoquímica).

9.1.1 Considerações parciais

Foram obtidas membranas eletrofiadas condutoras de PLGA recobertas com polipirrol através da polimerização oxidativa *in situ* do pirrol. As membranas de PLGA puro apresentaram condutividade na ordem de 10^{-17} S.cm⁻¹, enquanto as membranas de PLGA-rec apresentaram valores de condutividade elétrica da ordem de 10^{-2} S.cm⁻¹. Estes valores obtidos após o recobrimento são satisfatórios para o estímulo da proliferação de células, de acordo com a literatura.

As micrografias MEV revelaram que as membranas de PLGA são constituídas de fibras homogêneas, sem defeitos, alinhadas e com diâmetros de $561,6 \pm 149,0$ nm. Após o recobrimento das fibras de PLGA, através da polimerização oxidativa *in situ*,

as fibras foram recobertas por uma camada de partículas de PPy. A camada de PPy formada foi contínua e uniforme, apresentando diâmetros de $827 \pm 247,9$ nm. O recobrimento das fibras de PLGA com PPy alterou as propriedades de superfície da membrana, que tornou-se hidrofílica após o recobrimento, com ângulo de contato reduzido de $148 \pm 3,5^\circ$ (PLGA) para $82 \pm 7,6^\circ$ (PLGA-rec).

Para a verificação das propriedades térmicas, foi realizado um ensaio complementar de TGA, visto que para a aplicação em nervos periféricos não é um resultado usualmente considerado. No entanto, foi observado que o recobrimento das fibras de PLGA com pirrol aumentou a estabilidade térmica das fibras, devido ao efeito protetivo do pirrol sobre as fibras de PLGA.

Os ensaios de DMA revelaram uma redução do Módulo E' e um pequeno aumento nos valores de Tg após o recobrimento das fibras de PLGA com PPy. Esse efeito foi devido a redução da mobilidade das cadeias poliméricas de PLGA na presença do PPy sobre a superfície das fibras de PLGA.

Os ensaios de tração revelaram que as membranas de PLGA-rec apresentaram maiores valores de módulo de elasticidade e de resistência máxima à tração em relação a membrana de PLGA puro. No entanto, houve uma redução nos valores de deformação na ruptura. Esse resultado pode ser justificado pela fragilização das fibras de PLGA após o recobrimento.

Ensaio *in vitro* de viabilidade celular revelaram que as membranas de PLGA-rec foram citotóxicas a partir do terceiro dia de cultura. Dessa forma, estas membranas nas condições que foram desenvolvidas não poderão ser consideradas para uso em conduítes eletrofiados de nervos.

9.2 MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA/PPY.DBSA E PLGA/MT-PPY.DBSA

Outra estratégia para o desenvolvimento de conduítes eletrofiados condutores é eletrofição de uma solução polimérica contendo aditivos condutores dispersos nesta solução. Dentre os aditivos condutores mais usados está o PPy.DBSA, inclusive para aplicações em Engenharia de tecidos (SUN *et al.*, 2018; JING *et al.*, 2018). Já o aditivo Mt-PPy.DBSA começa a ganhar importância na literatura na obtenção de fibras condutoras (SCHIEFFERDECKER *et al.*, 2019; MERLINI, C. *et al.*, 2018). Esses aditivos apresentam potencial para aplicação na regeneração de nervos, devido ao estímulo elétrico favorecido por eles para a proliferação e extensão de células neurais (XU *et al.*, 2014; SONG *et al.*, 2016).

As membranas de PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA foram preparadas a partir da eletrofição de uma solução de PLGA contendo dois tipos distintos de aditivos condutores, sendo eles, o PPy.DBSA e o Mt-PPy.DBSA. A morfologia dos aditivos condutores está apresentada nas micrografias MEV da Figura 42. É possível observar que o aditivo PPy.DBSA apresenta morfologia esférica (Figura 42(a)). Já o aditivo Mt-PPy.DBSA (Figura 42(b)) apresenta uma morfologia constituída de partículas lamelares, devido a polimerização do pirrol ter sido realizada sobre as lamelas da argila Mt. Além disso, a morfologia lamelar do Mt-PPy.DBSA apresenta uma maior razão de aspecto quando comparadas às partículas esféricas do PPy.DBSA.

A Figura 43 apresenta as micrografias MET dos aditivos PPy.DBSA e Mt-PPy.DBSA. Por essa micrografia é possível ver de maneira mais nítida a morfologia esférica das partículas de PPy.DBSA. O PPy.DBSA apresenta diâmetros médios de $95,13 \pm 24,72$ nm e uma maior tendência a formar aglomerados, quando comparado com o aditivo Mt-PPy.DBSA, o qual apresenta uma morfologia constituída de partículas lamelares parcialmente esfoliada, como discutido anteriormente.

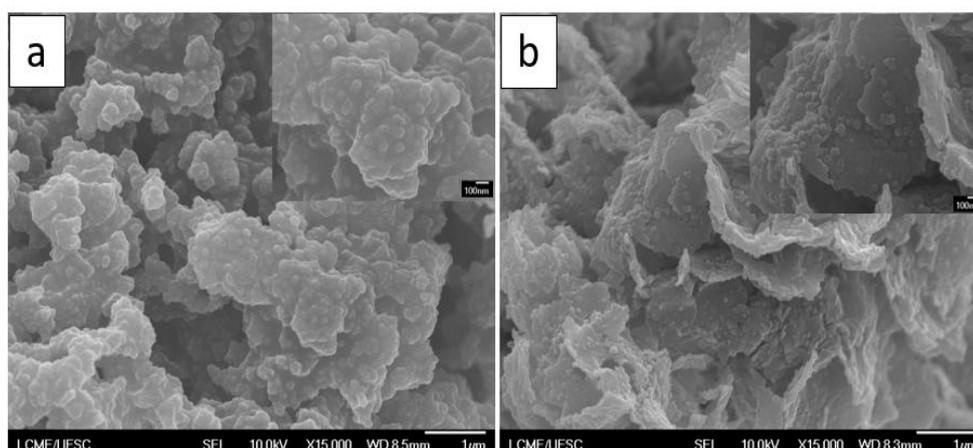


Figura 42 – Micrografia MEV dos aditivos condutores nanoestruturados. (a) PPy.DBSA e (b) Mt-PPy.DBSA.

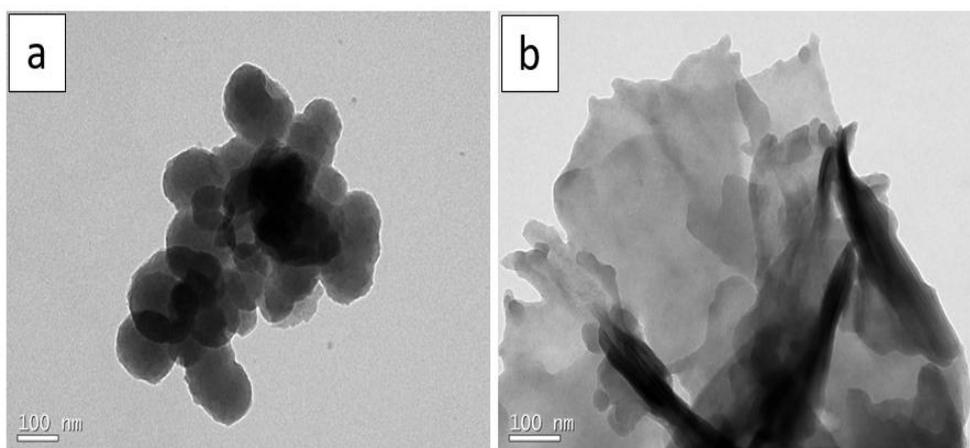


Figura 43 – Micrografia MET dos aditivos condutores nanoestruturado. (a) PPy.DBSA e (b) Mt-PPy.DBSA.

As micrografias MEV das membranas de PLGA e PLGA/PPy.DBSA estão apresentadas na Figura 44. A membrana de PLGA apresenta fibras uniformes, alinhadas e sem defeitos do tipo *beads*, conforme discutido anteriormente. A partir da análise das micrografias da membrana de PLGA/PPy.DBSA é possível observar que as fibras mantiveram-se alinhadas e sem a presença de defeitos. Na superfície das fibras observam-se poucos aglomerados de PPy.DBSA, que por sua vez encontram-se encapsulados dentro das fibras, conforme observa-se nas micrografias de maior magnificação (20000x). A quantidade de aglomerados aumenta ligeiramente com o aumento da fração mássica do aditivo.

A Figura 45 apresenta as micrografias MEV das membranas de PLGA e PLGA/Mt-PPy.DBSA. De forma similar às micrografias de PLGA/PPy.DBSA, as fibras de PLGA/Mt-PPy.DBSA mantiveram-se alinhadas e sem defeitos. Os aditivos também encontram-se encapsulados dentro das fibras, e com o aumento da fração mássica do aditivo é possível ver o aumento ligeiro da quantidade de aglomerados. A Figura 46, apresenta a distribuição dos diâmetros das fibras de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA. Como pode ser observado, a presença dos aditivos condutores não alterou de maneira significativa o diâmetro das fibras.

Para visualizar de maneira mais nítida a dispersão dos aditivos na parte interna das fibras de PLGA, foi realizado a microscopia de transmissão (MET), Figura 47. Nesta figura é possível visualizar uma fibra de PLGA puro na Figura 47 (a). Na Figura 47 (b)) está apresentada uma fibra de PLGA/PPy.DBSA_5, em que é possível observar o aditivo PPy.DBSA distribuído uniformemente dentro da fibra e visualizar sua morfologia esférica. Já na Figura 47 (c) está apresentada uma fibra de PLGA/Mt-PPy.DBSA_5, sendo possível visualizar o aditivo Mt-PPy.DSBA, o qual apresenta estrutura lamelar.

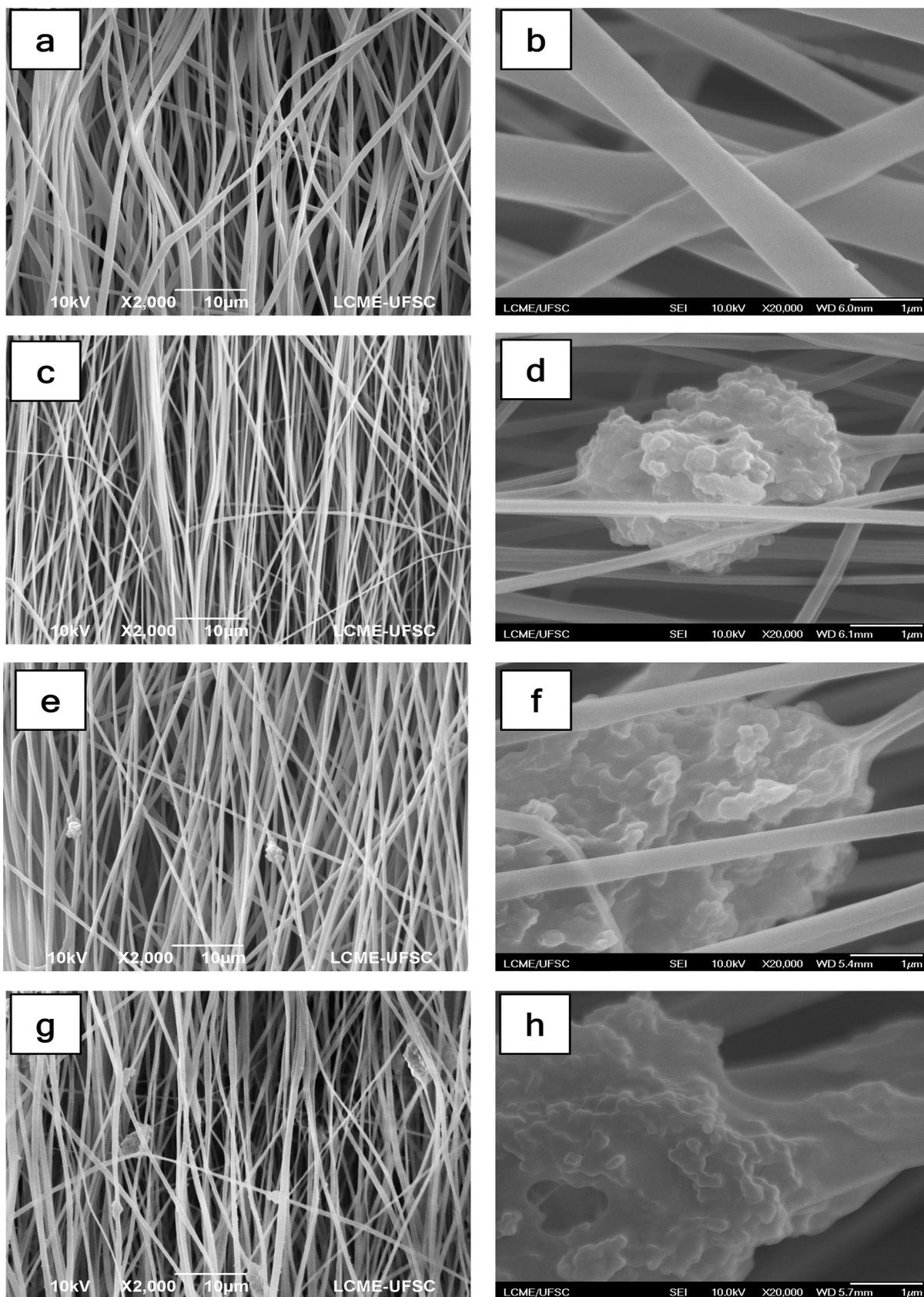


Figura 44 – Micrografia MEV e MEV-FEG das membranas eletrofiadas. (a-b) PLGA, (c-d) PLGA/PPy.DBSA_2,5, (e-f) PLGA/PPy.DBSA_5 e (g-h) PLGA/PPy.DBSA_7,5. Aumentos de 2000x e 20000x.

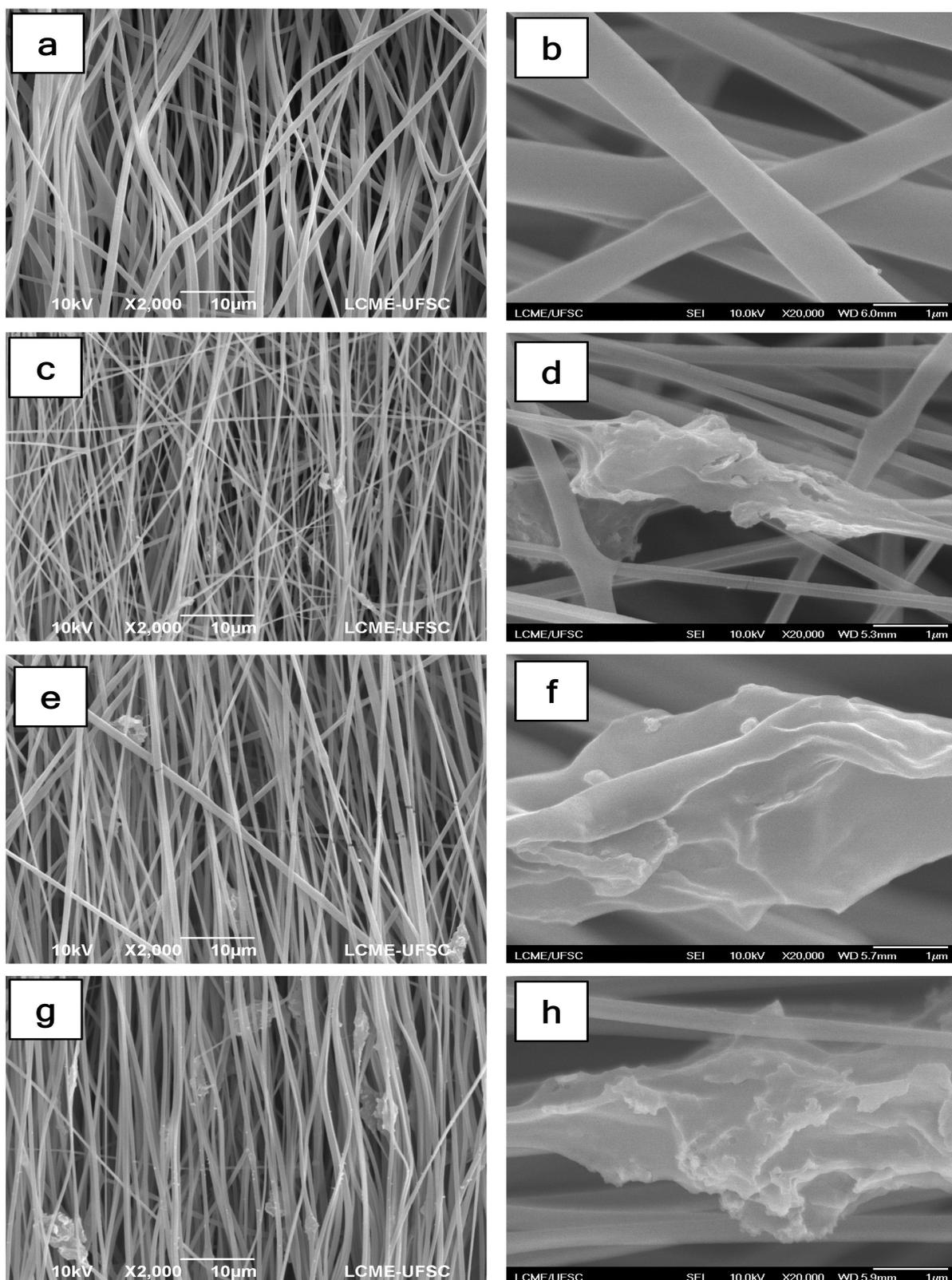


Figura 45 – Micrografia MEV e MEV-FEG das membranas eletrofiadas. (a-b) PLGA, (c-d) PLGA/Mt-PPy.DBSA_2,5, (e-f) PLGA/Mt-PPy.DBSA_5 e (g-h) PLGA/Mt-PPy.DBSA_7,5. Aumentos de 2000x e 20000x.

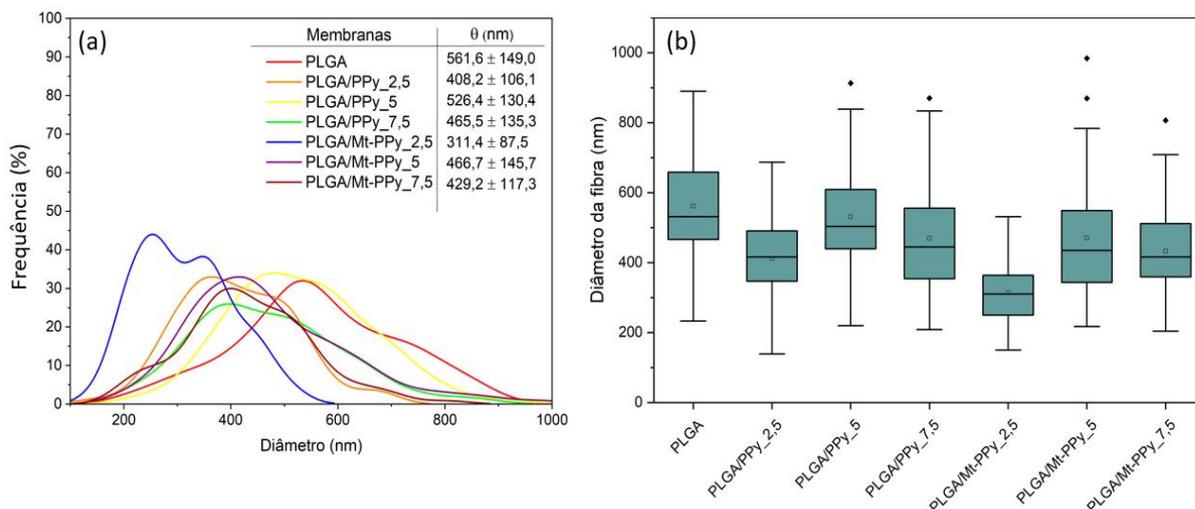


Figura 46 – (a) Curva de distribuição dos diâmetros e (b) Box-plot da distribuição dos diâmetros das fibras de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA (n = 100).

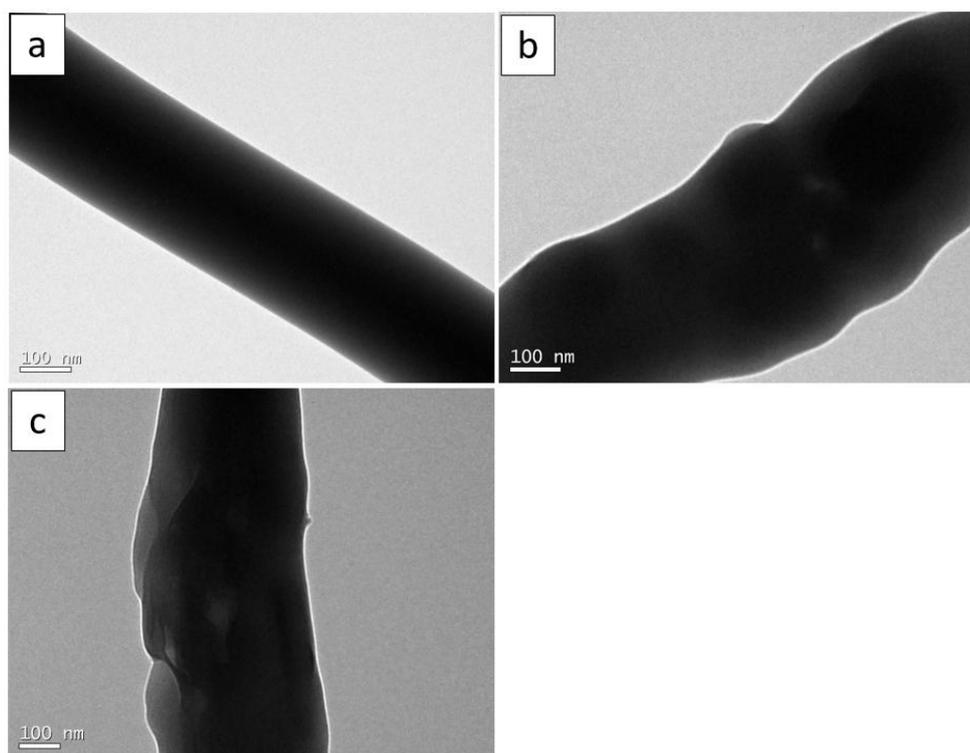


Figura 47 – Micrografia MET de uma única fibra (a) PLGA, (b) PLGA/PPy.DBSA_5 e (c) PLGA/Mt-PPy.DBSA_5.

Além de uma microestrutura que favoreça a regeneração tecidual, as características físico-químicas da superfície das fibras influenciam diretamente na adesão celular (KIM *et al.*, 2016). Dessa maneira, foi verificada a influência da presença dos aditivos condutores PPy.DBSA e Mt-PPy.DBSA na hidrofiliicidade das membranas eletrofiadas. A Figura 48 apresenta os ângulos de contatos obtidos das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA. Como pode ser observado, as

membranas de PLGA apresentam ângulo de contato de $148 \pm 3^\circ$, sendo o PLGA considerado um polímero hidrofóbico, devido principalmente a presença do grupo metila, que por sua vez é apolar. Os valores de ângulo de contato reduzem ligeiramente com a presença do aditivo PPy.DBSA e um pouco mais acentuado para o aditivo Mt-PPy.DBSA. No entanto, todos os valores encontram-se acima de 130° . Sendo assim, as membranas são consideradas hidrofóbicas mesmo com a presença dos aditivos condutores, uma vez que uma superfície é considerada hidrofóbica em valores de ângulo de contato acima de 90° .

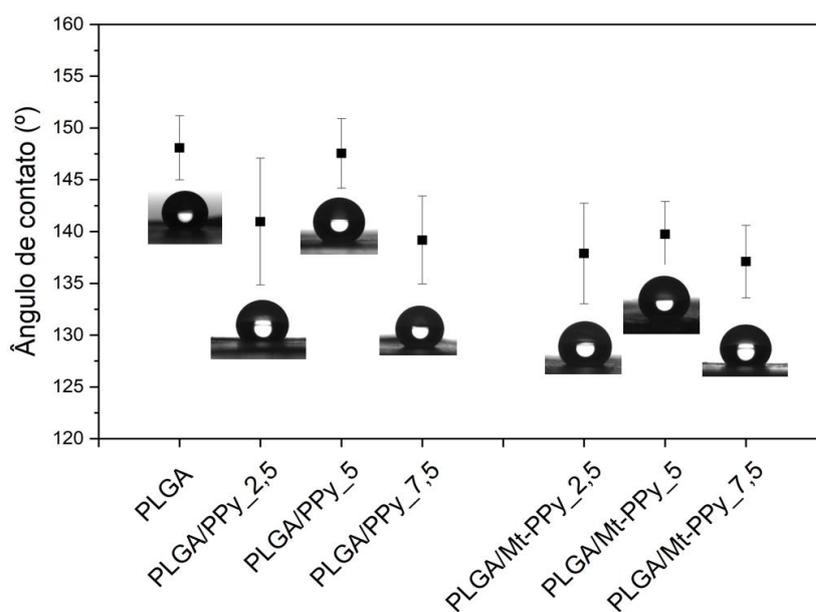


Figura 48 – Ângulo de contato das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.

Para verificar a influência dos aditivos PPy.DBSA e Mt-PPy.DBSA nas transições térmicas das membranas eletrofiadas foram realizados ensaios DSC. Os termogramas de DSC das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA estão apresentados na Figura 49 e 50. A Tabela 8 apresenta os valores resumidos obtidos pelos termogramas, assim como a entalpia de fusão (ΔH_f) e cristalinidade (X_c) das membranas eletrofiadas. Os estudos de DSC revelaram no primeiro ciclo de aquecimento que as membranas de PLGA apresentaram transição vítrea (T_g) de 61°C e temperatura de fusão (T_f) de 155°C . Já para as membranas contendo os aditivos PPy.DBSA e Mt-PPy.DBSA, a presença dos aditivos não alterou significativamente as transições térmicas destas membranas. Ainda no primeiro aquecimento foi observado um pico de cristalização. Este pico é decorrente da inabilidade de formação total da fase cristalina durante o processo de fabricação. O grau de cristalinidade X_c (%) aumentou significativamente para as membranas de PLGA/Mt-PPy_7,5. Esse resultado indica que nessa fração mássica a Mt-PPy.DBSA agiu como agente nucleante, aumentando assim o grau de cristalinidade das membranas. No segundo ciclo de

aquecimento todas as membranas que antes eram semi-cristalinas tornam-se amorfas. O estado semi-cristalino está presente no primeiro ciclo de aquecimento devido a influência do processo de fabricação do polímero e do processo de eletrofição, o qual possibilita a orientação das cadeias poliméricas pela ação do campo elétrico. Adicionalmente, há uma redução da T_g de 61°C para aproximadamente 57°C no segundo aquecimento.

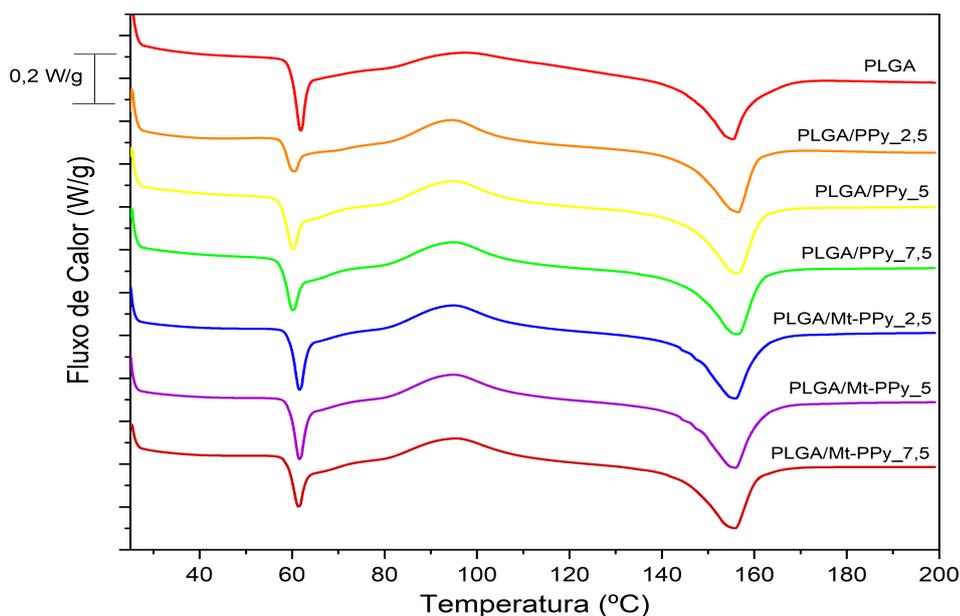


Figura 49 – Curvas de DSC referente ao primeiro ciclo de aquecimento das membranas eletrofiadas de (a) PLGA, (b) PLGA/PPy.DBSA e (c) PLGA/Mt-PPy.DBSA.

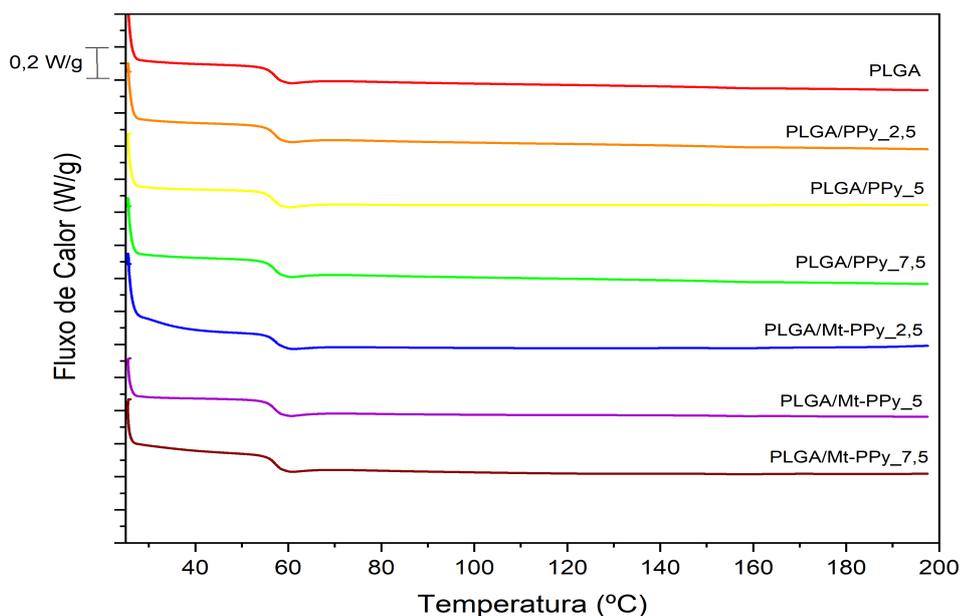


Figura 50 – Curvas de DSC referente ao segundo ciclo de aquecimento das membranas eletrofiadas de (a) PLGA, (b) PLGA/PPy.DBSA e (c) PLGA/Mt-PPy.DBSA.

Tabela 8 – Resultados de DSC referente ao primeiro ciclo de aquecimento das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.

Membrana	1º Ciclo				2º Ciclo	
	Tg (°C)	Tc (°C)	Tf (°C)	ΔH_f (J/g)	Xc(%)	Tg (°C)
PLGA	61,1	97,3	155,4	24,1	25,4	57,1
PLGA/PPy_2,5	58,8	94,5	156,5	21,2	23,0	57,0
PLGA/PPy_5	59,1	95,0	156,4	22,9	25,5	56,7
PLGA/PPy_7,5	60,3	94,9	156,3	23,6	26,9	57,2
PLGA/Mt-PPy_2,5	60,9	94,8	155,9	23,2	25,2	56,5
PLGA/Mt-PPy_5	60,6	95,5	155,8	22,2	24,6	56,9
PLGA/Mt-PPy_7,5	59,1	94,8	156,6	24,7	28,2	57,0

As curvas termogravimétricas dos aditivos condutores PPy.DBSA e Mt-PPy.DBSA e das membranas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA estão apresentadas na Figura 51. A membrana de PLGA apresenta um único estágio de perda de massa com início (Tonset) em 284,9 °C e pico de degradação máxima em 343 °C, que pode ser atribuído a decomposição da cadeia polimérica, com 0,4% de resíduo a 600°C. O mecanismo de degradação do PLGA envolve a cisão da cadeia polimérica que se inicia de modo aleatório em baixas temperaturas e de modo específico em maiores temperaturas. É relatado na literatura que em temperaturas mais baixas, o principal mecanismo de degradação do PLGA envolve uma reação de troca de éster não radical envolvendo as extremidades da cadeia OH, gerando principalmente oligômeros cíclicos em vez de lineares. A degradação também gera os monômeros do copolímero, ácido láctico/acetaldéido (para PLA), ácido glicólico/metil glicolato (para PGA) e dióxido de carbono, sendo este último obtido por descarboxilação de grupos carboxílicos terminais nas cadeias. À medida que a temperatura aumenta, a liberação de monóxido de carbono, metilceteno (no caso de PLA), ceteno e formaldeído (para PGA) é produzida como consequência de um mecanismo de cisão da cadeia radical (SILVA *et al.*, 2015).

O aditivo PPy.DBSA apresenta uma pequena perda de massa em temperaturas abaixo de 100 °C, correspondente a eliminação de água residual no material. A partir de 331 °C o PPy.DBSA inicia o processo de degradação da cadeia polimérica, com pico de degradação máxima em 379 °C, apresentando 48% de resíduo à 600 °C. As membranas de PLGA/PPy.DBSA iniciaram o processo de degradação a temperaturas ligeiramente maiores em relação a membrana de PLGA puro, conforme a Tabela 9. Esse comportamento pode ser atribuído a interação entre os componentes e ao efeito protetivo do PPy que atua como uma barreira à degradação térmica do PLGA. A 600°C todas as membranas de PLGA_PPy.DBSA apresentaram resíduos próximos a zero, indicando a completa decomposição do composto.

O aditivo Mt-PPy.DSBA, por sua vez, apresentou uma pequena perda de massa em temperaturas abaixo de 100 °C, assim como o PPy.DBSA, correspondente a eliminação de água residual no material. A partir de 295 °C o Mt-PPy.DBSA inicia o processo de degradação, apresentando 29% de resíduo à 600 °C. As membranas de PLGA/Mt-PPy.DBSA iniciaram o processo de degradação a temperaturas maiores em relação a membrana de PLGA e também em relação a membranas de PLGA/PPy.DBSA. Esse comportamento pode ser justificado pela presença da argila Mt no aditivo Mt-PPy.DBSA, que sendo um composto inorgânico, pode agir como uma barreira protetiva para a degradação térmica do PLGA.

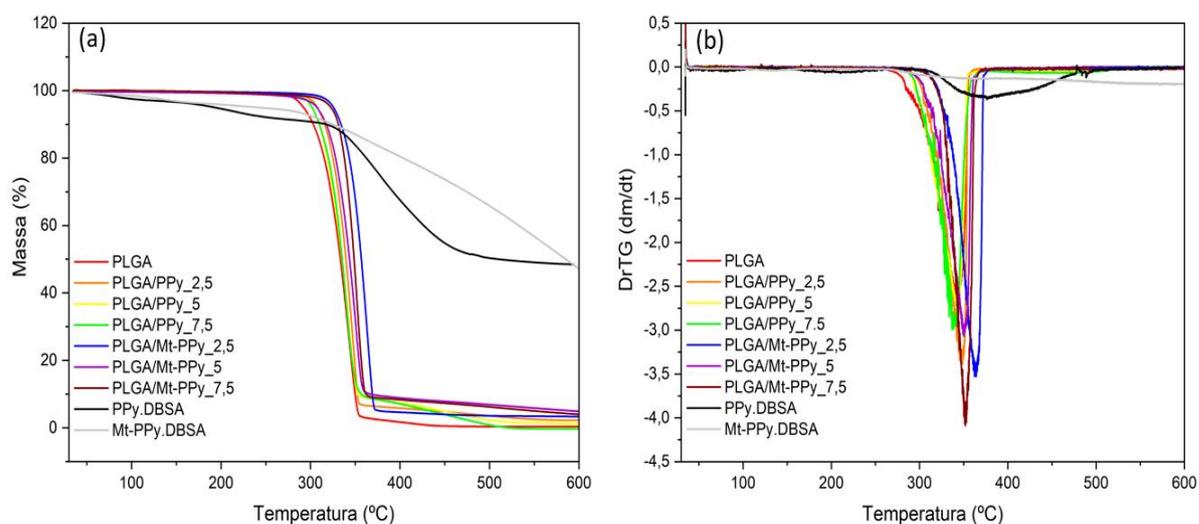


Figura 51 – Curvas de (a) TG e (b) DrTG dos aditivos condutores PPy.DBSA, Mt-PPy.DBSA e das membranas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.

Tabela 9 – Resumo dos resultados obtidos pelas curvas de TG e DrTG.

Membrana	Td onset (°C)	Td máx. (°C)	Td outset (°C)
PLGA	284,9	343,0	354,2
PLGA/PPy_2,5	305,4	348,1	355,0
PLGA/PPy_5	301,6	343,2	353,0
PLGA/PPy_7,5	301,7	339,4	356,0
PLGA/Mt-PPy_2,5	323,1	363,6	371,5
PLGA/Mt-PPy_5	306,5	350,1	360,2
PLGA/Mt-PPy_7,5	322,0	351,5	363,0
PPy. DBSA	331,0	379,3	471,0
Mt-PPy. DBSA	295,2	-	-

As curvas de módulo de armazenamento (E') em função da temperatura para as membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA estão apresentadas na Figura 52 (a). As curvas da tangente de perda ($\text{Tan } \delta$) em função da temperatura das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA estão apresentadas na Figura 52 (b). E os valores de E' , ΔT constante e T_g encontram-se resumidos na Tabela 10.

As membranas de PLGA apresentaram E' de 237,4 MPa e T_g de 69,6 °C. Com a adição do aditivo condutor PPy.DBSA as membranas PLGA/PPy_7,5 apresentaram um aumento mais significativo do módulo E' (515 MPa). Já com a adição do aditivo condutor Mt-PPy.DBSA, as membranas PLGA/Mt-PPy_5 foram as que apresentaram aumento significativo dos valores E' . Quanto aos valores de T_g obtidos pelas curvas de $\text{Tan } \delta$, houve redução significativa nos valores de T_g apenas para as membranas de PLGA/Mt-PPy.DBSA. Foi observado que próximo à temperatura de 55 °C houve o início da transição vítrea, o qual é finalizada próximo ao valor de T_g das membranas de PLGA (69,6 °C). Isso pode ser justificado pela atuação do aditivo Mt-PPy.DBSA como facilitador da mobilidade da fase amorfa, a qual se inicia antecipadamente.

Outro ponto importante a ser considerado é a faixa de temperatura na qual o módulo E' é constante e, portanto, a faixa a qual a membrana pode ser aplicada sem comprometimento mecânico. Considerando a temperatura do corpo humano é de 37°C, todas as membranas avaliadas estão dentro da faixa de temperatura na qual E' é constante e podem ser aplicadas sem comprometimento mecânico.

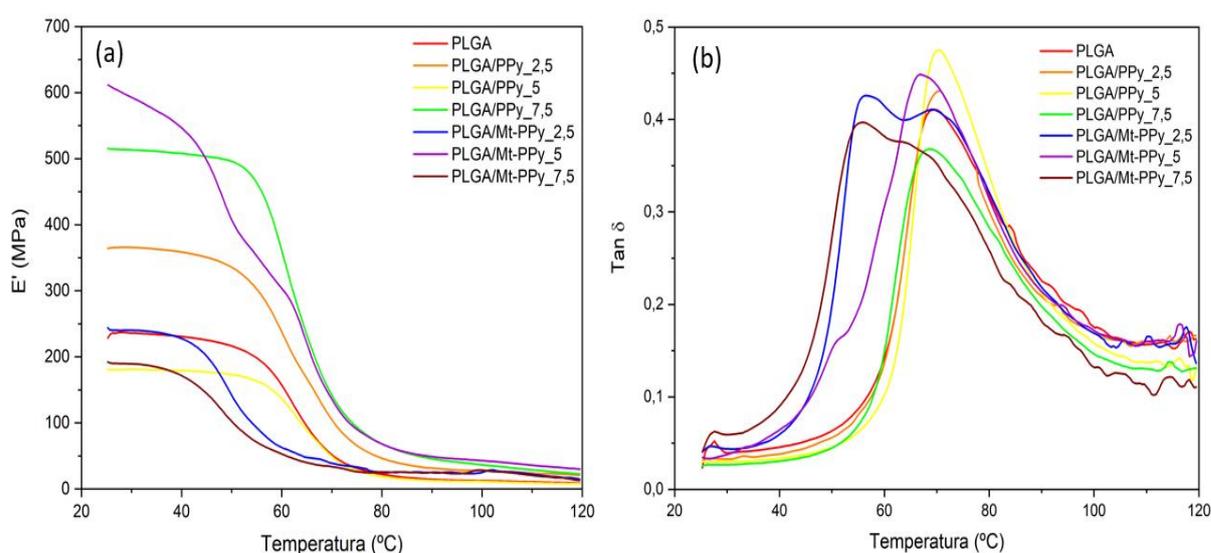


Figura 52 – Curvas de DMA (a) módulo de armazenamento e (b) $\text{tan } \delta$ em função da temperatura para as membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.

Tabela 10 – Resumo dos resultados obtidos pelas curvas DMA para as membranas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.

Membrana	Módulo E' (MPa)	$\Delta T_{E' constante}$ (°C)	Tg (°C)
PLGA	237,4	25 à 55,5	69,6
PLGA/PPy_2,5	364,7	25 à 52,4	70,5
PLGA/PPy_5	179,6	25 à 56,9	70,3
PLGA/PPy_7,5	515,0	25 à 54,2	68,3
PLGA/Mt-PPy_2,5	239,0	25 à 41,3	56,6
PLGA/Mt-PPy_5	607,6	25 à 41,7	66,9
PLGA/Mt-PPy_7,5	191,0	25 à 40,4	55,6

As propriedades mecânicas dos conduítes de nervo devem ser próximas às propriedades de um nervo humano, para que assim o conduíte seja capaz de suportar as cargas fisiológicas. A Figura 53, apresenta as propriedades mecânicas das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.

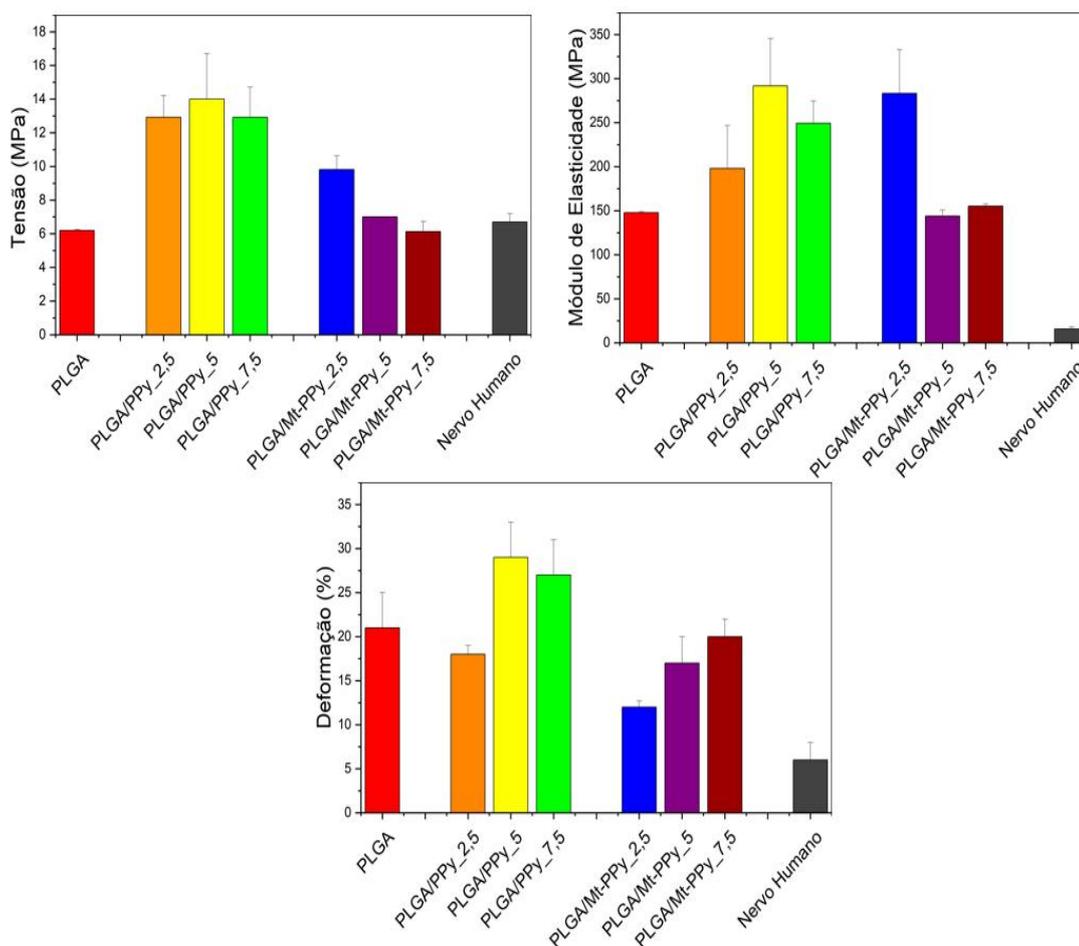


Figura 53 – Propriedades mecânicas das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA, PLGA/Mt-PPy.DBSA.

As membranas de PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA apresentaram valores de propriedades mecânicas superiores em comparação com as membranas de PLGA puro, como pode ser observado no aumento do módulo de elasticidade e da tensão máxima à tração. Os valores obtidos pelas membranas de PLGA/PPy.DBSA foram, de uma maneira geral, superiores aos valores obtidos pelas membranas de PLGA/Mt-PPy.DBSA. Quando comparado com o nervo humano, as propriedades de todas as membranas eletrofiadas possuem valores superiores que os valores obtidos pelo nervo humano. Assim sendo, todas as membranas eletrofiadas produzidas foram satisfatórias para a aplicação como condúite de nervos.

A condutividade elétrica das fibras eletrofiadas é outra propriedade muito relevante na regeneração celular. O principal interesse para o uso de de aditivos condutores, como PPy.DBSA e Mt-PPy.DBSA é a estimulação de células eletricamente excitáveis à medida que a corrente passa pelas fibras, para que as células assim cresçam. Uma maior condutividade da superfície das fibras, pode resultar em uma sinalização celular mais eficiente e, conseqüentemente, um maior estímulo para o crescimento celular. Os valores obtidos de condutividade elétrica, pelo método de 2 pontas, das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA estão apresentadas na Tabela 11.

A presença do aditivo PPy.DBSA não alterou significativamente os valores de condutividade elétrica das membranas. No entanto, a presença do aditivo Mt-PPy.DBSA aumentou em até 7 ordens de grandeza o valor de condutividade elétrica em comparação com as membranas de PLGA puro, passando de $2,94 \times 10^{-17} \text{ S.cm}^{-1}$ (PLGA puro) para $6,94 \times 10^{-10} \text{ S.cm}^{-1}$ (PLGA/Mt-PPy_7,5). A literatura apresenta uma grande gama de estudos abordando fibras condutoras para aplicação em nervos periféricos, sendo estas, fibras recobertas pelo aditivo polipirrol (PPy). Todavia, existe uma escassez de pesquisas que abordam o potencial de fibras condutoras em que o aditivo encontra-se dentro das fibras. Os valores de condutividade elétrica reduzem significativamente quando os aditivos encontram-se dentro das fibras, devido principalmente ao encapsulamento do aditivo e a presença de porosidade nas membranas. A porosidade, por sua vez, limita o contato entre as fibras, dificultando a formação de caminhos condutores (MERLINI, C. *et al.*, 2014). No entanto, existem algumas vantagens em membranas contendo aditivos condutores no interior das fibras em relação à membranas recobertas com o PPy, como por exemplo, o melhor controle do processamento e a menor toxicidade.

Tabela 11 – Valores de condutividade elétrica das membranas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.

Membrana	Condutividade elétrica (S.cm⁻¹)
PLGA	$(2,94 \pm 1,43) \times 10^{-17}$
PLGA/PPy.DBSA_2,5	$(2,46 \pm 0,80) \times 10^{-16}$
PLGA/PPy.DBSA_5	$(5,11 \pm 0,09) \times 10^{-16}$
PLGA/PPy.DBSA_7,5	$(5,55 \pm 5,44) \times 10^{-16}$
PLGA/Mt-PPy.DBSA_2,5	$(5,74 \pm 2,35) \times 10^{-16}$
PLGA/Mt-PPy.DBSA_5	$(1,28 \pm 1,18) \times 10^{-11}$
PLGA/Mt-PPy.DBSA_7,5	$(6,94 \pm 6,51) \times 10^{-10}$

Ensaio de viabilidade celular foram realizados nas membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA com o intuito de verificar a toxicidade das membranas na presença dos aditivos, assim como para verificar se as células foram estimuladas pela presença destes aditivos. Como pode ser observado na Figura 54, no primeiro dia de cultura celular, todas as membranas não se apresentaram viáveis metabolicamente, com valores de absorvância acima do grupo controle. No terceiro e sétimo dia após a semeadura, todos os grupos apresentaram mais de 50% de células metabolicamente ativas em comparação ao controle. As membranas de PLGA/Mt-PPy.DBSA apresentaram valores ligeiramente superiores ao demais grupo no primeiro dia de cultivo celular. No entanto, no sétimo dia de cultivo celular as membranas de PLGA/PPy.DBSA apresentaram valores médios ligeiramente maiores. Todavia, não houve diferença significativa entre os grupos.

A Figura 55 apresenta as morfologias das células PC12 semeadas sobre as membranas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA no sétimo dia de cultivo celular. As células PC12 apresentam-se alinhadas e alongadas sobre as fibras alinhadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA, como pode ser observado pelas setas indicadas. O alinhamento das fibras eletrofiadas mimetizam as bandas de Büngner naturalmente formadas pelo corpo durante o processo de reparação do nervo, como discutido anteriormente (CHEW *et al.*, 2008). Como pode ser verificado, as células semeadas beneficiaram-se desta estrutura alinhada para se guiarem e se prolongarem. Guiar o crescimento das células em regeneração promove uma recuperação funcional mais rápida e eficiente do nervo lesionado.

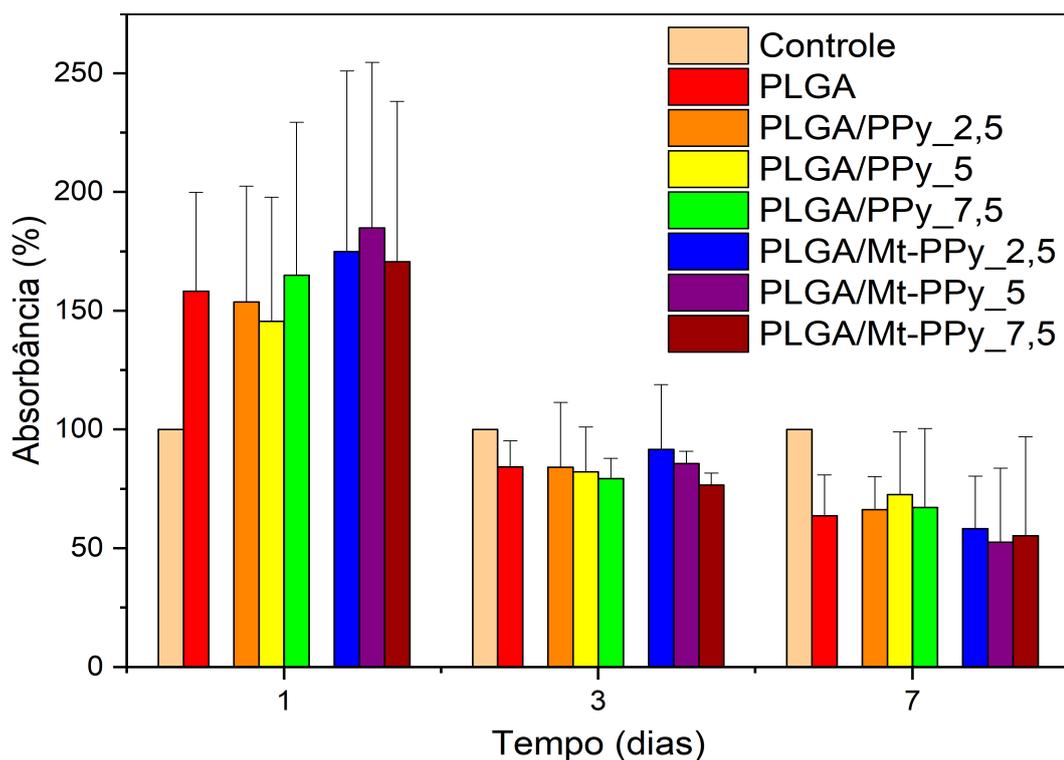


Figura 54 – Viabilidade celular das membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA, nos dias 1, 3 e 7 após o cultivo celular.

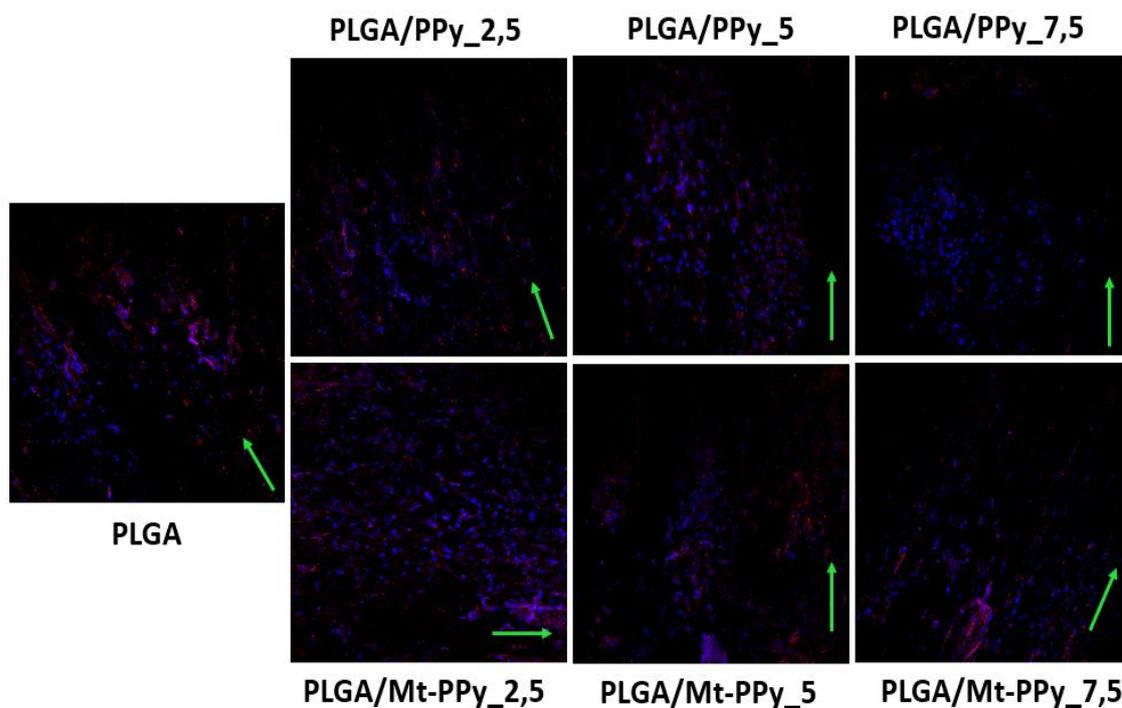


Figura 55 – Morfologia das células PC12 semeadas após 7 dias sobre as membranas eletrofiadas de PLGA, PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA (histoquímica). As setas representam o direcionamento das células.

9.2.1 Considerações parciais

Membranas eletrofiadas alinhadas de PLGA contendo os aditivos condutores PPy.DBSA e Mt-PPy.DBSA foram obtidas através da eletrofição direta da solução de PLGA contendo os aditivos condutores em diferentes frações mássica, 2,5, 5 e 7,5%*m*. A adição de PPy.DBSA não alterou significativamente a condutividade elétrica das membranas. Entretanto, a adição de 5 e 7,5%*m* Mt-PPy.DBSA aumentou em 6 e 7 ordens de grandeza os valores de condutividade elétrica, respectivamente, em relação ao PLGA puro, obtendo-se valores na ordem de 10^{-17} S.cm⁻¹ para o PLGA puro, 10^{-11} S.cm⁻¹ para as membranas de PLGA/Mt-PPy_5 e 10^{-10} S.cm⁻¹ para as membranas de PLGA/Mt-PPy_7,5.

As micrografias MEV revelaram que as membranas de PLGA são constituídas de fibras homogêneas, sem defeitos, alinhadas e com diâmetros de $561,6 \pm 149,0$ nm. Já para as membranas contendo os aditivos condutores não houve variação significativa nos valores de diâmetros das fibras, assim como as fibras mantiveram-se sem defeitos e alinhadas. Os aditivos encontram-se encapsulados dentro das fibras como foi possível observar pelas micrografias MET.

As propriedades de superfície das membranas não foram alteradas significativamente na presença dos aditivos, sendo observados pelos valores de ângulo de contato acima de 130°. Portanto, as membranas mantiveram-se hidrofóbicas na presença dos aditivos condutores.

O ensaio de DSC revelou que não houve variação significativa das transições térmicas na presença dos aditivos condutores no primeiro aquecimento. Foi observado apenas um ligeiro aumento no grau de cristalinidade para as membranas de PLGA/Mt-PPy_7,5. Já no segundo aquecimento as membranas foram amorfas, indicando que o processamento interferiu na formação de regiões cristalinas.

A estabilidade térmica das membranas contendo os aditivos condutores aumentou ligeiramente em relação as membranas de PLGA puro, observado pelo ensaio TGA. Foi observado um pequeno deslocamento para maiores temperaturas, da temperatura inicial de degradação térmica e temperatura máxima de degradação das membranas contendo aditivos condutores. As membranas contendo Mt-PPy.DBSA apresentaram valores ligeiramente superiores em relação as membranas contendo PPy.DBSA.

O ensaio de DMA revelou de uma maneira geral um aumento das propriedades mecânicas das membranas eletrofiadas na presença dos aditivos condutores, sendo mais pronunciada para a membrana de PLGA/Mt-PPy_5. Houve uma ligeira redução dos valores de T_g para as membranas contendo o aditivo Mt-PPy.DBSA. Todas as membranas mantiveram constante o módulo E' acima da temperatura corporal humana de 37°C, indicando que podem ser utilizadas nessa temperatura sem comprometimento mecânico.

As propriedades mecânicas, obtidas pelo ensaio de tração, das membranas contendo os aditivos condutores aumentaram em relação as membranas de PLGA puro. As membranas de PLGA/PPy.DBSA apresentaram valores superiores em relação as membranas de PLGA/Mt-PPy.DBSA. No entanto, todos os valores obtidos são superiores aos valores encontrados na literatura para aplicação em nervos periféricos.

Ensaio *in vitro* de viabilidade celular revelaram que as membranas não são citotóxicas para todos os grupos. Adicionalmente, as membranas de PLGA/Mt-PPy.DBSA apresentaram valores de absorvância ligeiramente maiores no primeiro dia de cultura celular. Já no sétimo dia de cultura celular os valores foram ligeiramente maiores para as membranas de PLGA/PPy.DBSA. As células apresentaram-se alinhadas e alongadas sobre as fibras eletrofiadas alinhadas, indicando um direcionamento preferencial de crescimento e adesão celular.

9.3 MEMBRANAS ELETROFIADAS DE PLGA/NTC

As micrografias MEV e MET do aditivo condutor nanotubo de carbono (NTC) estão apresentadas na Figura 56. Os nanotubos de carbono de multicamadas apresentam alta razão de aspecto e diâmetro de $7,5 \pm 3,0$ nm. O diâmetro obtido por imagens do software ImageJ foi de $7,5 \pm 3,0$ nm, o qual está de acordo com o valor indicado pelo fabricante de 9,5 nm.

As micrografias MEV e MEV-FEG das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC estão apresentadas na Figura 57. Já as curvas de distribuição e box-plot da distribuição dos diâmetros das fibras de PLGA e PLGA/NTC estão apresentadas na Figura 58. Como pode ser observado, as fibras de PLGA estão alinhadas e sem a presença de defeitos, apresentando diâmetro de $561,6 \pm 149,0$ nm. Após a adição do aditivo condutor NTC as membranas mantiveram-se alinhadas e sem defeitos. Além disso, pode ser observado que não houve aglomerados do aditivo. O diâmetro das fibras na presença do NTC não foi alterado de maneira significativa.

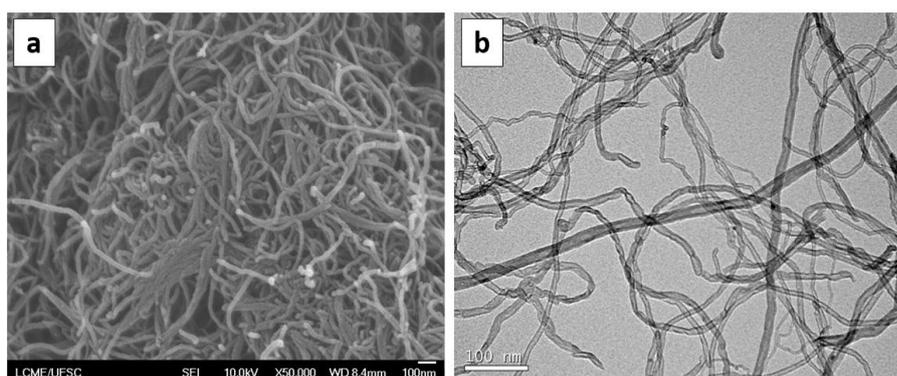


Figura 56 – Micrografias (a) MEV e (b) MET do aditivo condutor nanotubo de carbono.

A micrografia MET de uma fibra de PLGA/NTC_0,5 está apresentada na Figura 59. Foi verificado que os NTC encontram-se preferencialmente alinhados dentro da fibra. Este alinhamento pode ser explicado pelo campo elétrico aplicado durante o processo de eletrofição, o qual é capaz de esticar e orientar os nanotubos no interior das fibras. Esse alinhamento, segundo a literatura influencia diretamente no aumento das propriedades mecânicas e elétricas do material (AMANI *et al.*, 2018). Segundo estudo realizado por Amami *et al.* (2018), o mecanismo de alinhamento dos NTC se dá, devido à aplicação do campo elétrico, ao surgimento um momento de dipolo induzido nas extremidades dos NTC, o que resulta em sua rotação para um determinado ângulo. A partir dessa rotação, os NTC são alinhados na direção do campo elétrico.

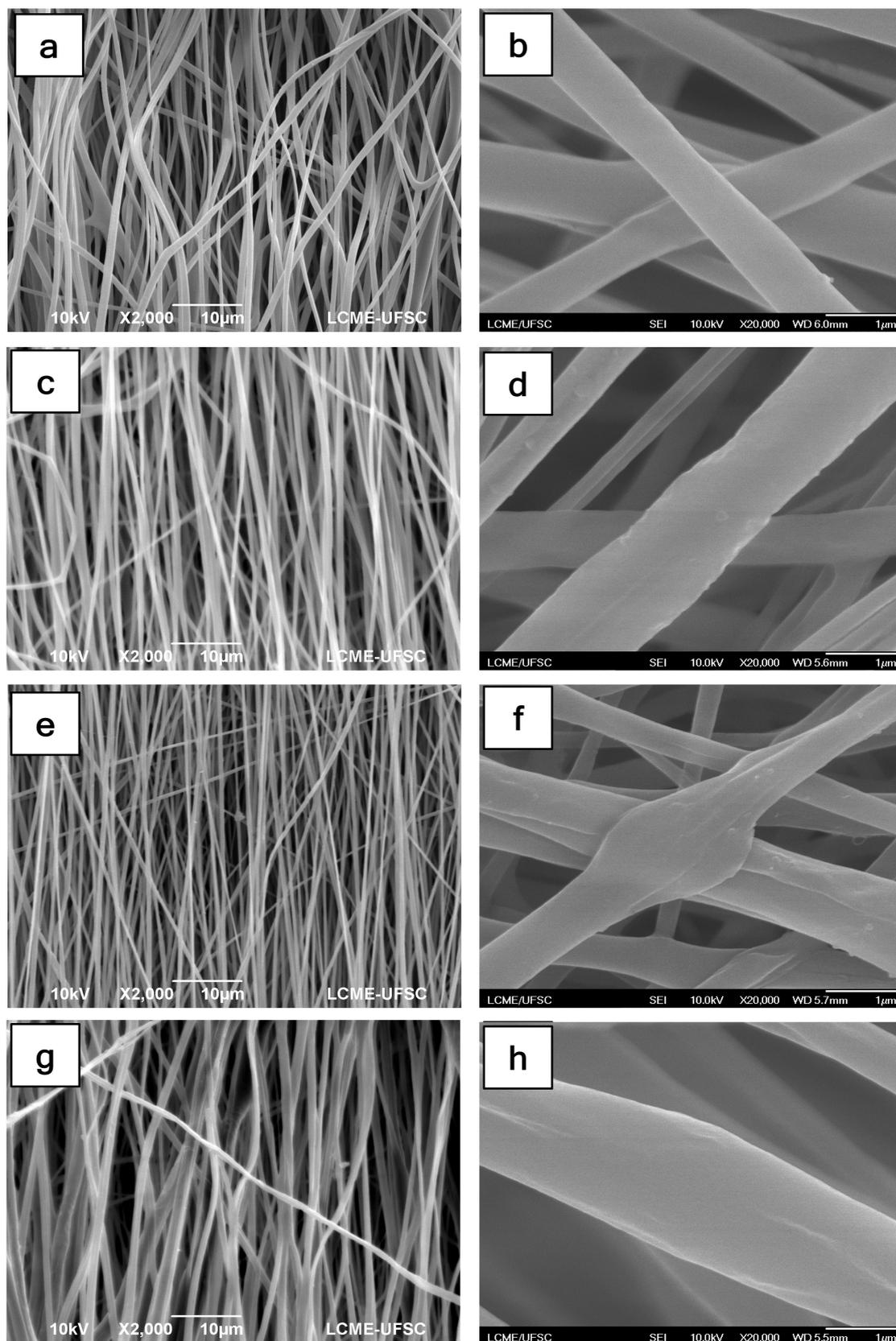


Figura 57 – Micrografias MEV e MEV-FEG das membranas eletrofiadas. (a-b) PLGA, (c-d) PLGA/NTC_0,25, (e-f) PLGA/NTC_0,5 e (g-h) PLGA/NTC_0,75. Aumentos de 2000x e 20000x.

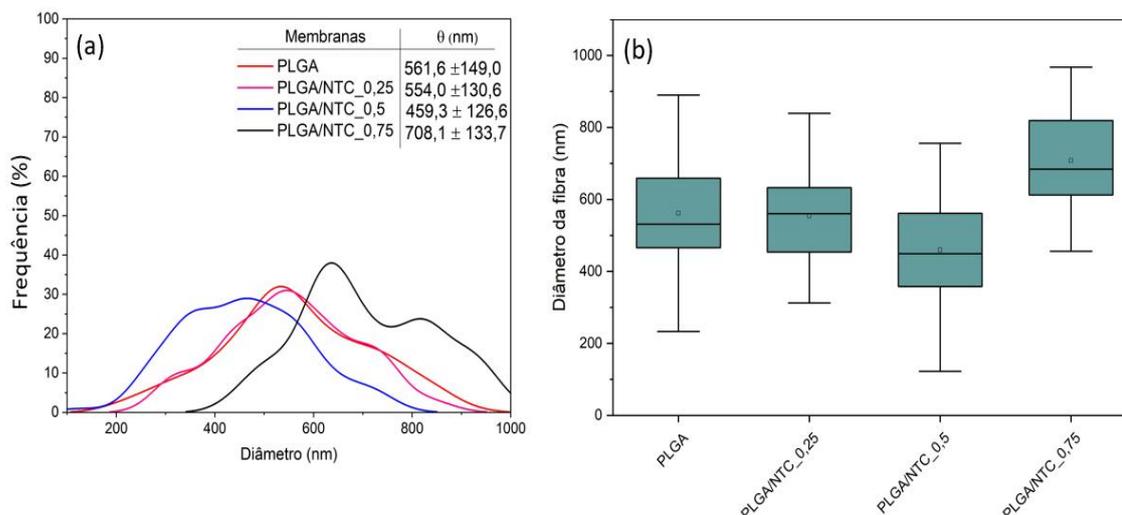


Figura 58 – (a) Curva de distribuição de diâmetros das fibras e (b) Box-plot da distribuição dos diâmetros das fibras de PLGA e PLGA/NTC (n = 100).

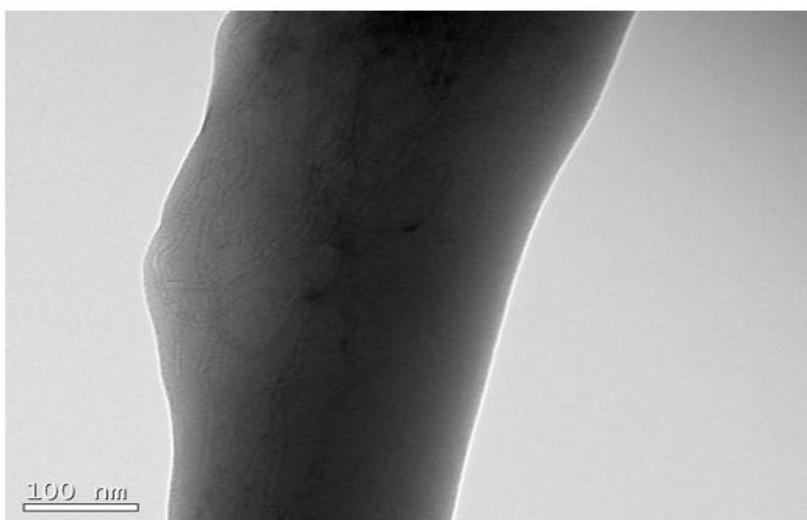


Figura 59 – Micrografia MET de uma fibra de PLGA/NTC_0,5.

Como apresentado no capítulo anterior, as características físico-químicas da superfície das fibras influenciam diretamente na adesão celular (KIM *et al.*, 2016). Assim, foi verificada a influência da presença do aditivo condutor NTC na hidrofobicidade das membranas eletrofiadas. A Figura 60 apresenta os ângulos de contatos obtidos das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC. As membranas de PLGA apresentam ângulo de contato de $148 \pm 3^\circ$. Os valores de ângulo de contato reduzem ligeiramente com a presença do aditivo NTC e de maneira uma pouco mais acentuada para as membranas de PLGA/NTC_0,5 ($125 \pm 3^\circ$). No entanto, todos os valores encontram-se acima de 130° , como apresentado no capítulo anterior para as membranas de PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA. Sendo assim, as membranas são consideradas hidrofóbicas, uma vez que uma superfície é considerada hidrofóbica em valores de ângulo de contato acima de 90° .

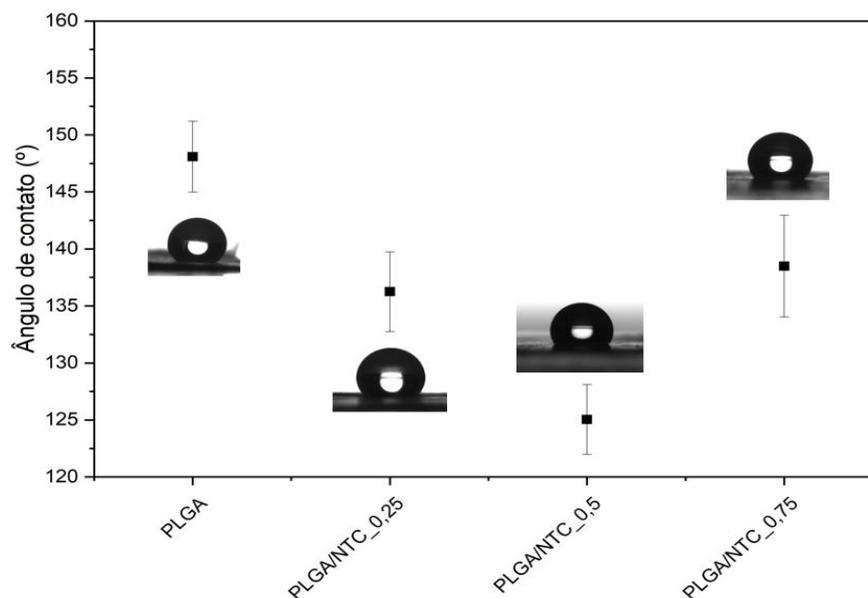


Figura 60 – Ângulo de contato das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.

Para verificar a influência do aditivo NTC nas transições térmicas das membranas eletrofiadas foram realizados ensaios DSC. Os termogramas de DSC das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC estão apresentados na Figura 61 e 62. A Tabela 12 apresenta os valores resumidos obtidos pelos termogramas referente ao primeiro e segundo ciclos de aquecimento, assim como a entalpia de fusão (ΔH_f) e cristalinidade (X_c) das membranas eletrofiadas. Em relação ao primeiro ciclo de aquecimento, uma transição endotérmica em 61°C pode ser observado no termograma do PLGA. Essa transição já foi reportada na literatura para o PLGA, sendo atribuída à transição vítrea do PLGA (SANTOS, V. I. dos *et al.*, 2020). Para as membranas de PLGA/NTC essa transição vítrea não sofreu deslocamento significativo, indicando que a presença do aditivo NTC não interferiu na mobilidade molecular da fase amorfa. A transição exotérmica, com pico em 155°C , também está de acordo com o valor obtido anteriormente na literatura (SANTOS, V. I. dos *et al.*, 2020). Essa transição é atribuída a fusão (T_f) da fase cristalina do PLGA. Já para as membranas de PLGA/NTC essa transição também não sofreu deslocamento significativo, indicando assim, que a presença do NTC não influencia significativamente na fusão da fase cristalina da membrana eletrofiada de PLGA/NTC. Uma transição exotérmica é observada em 97°C para a membrana de PLGA, denominado pico de cristalização a frio (T_c). A presença deste pico de cristalização é decorrente da inabilidade de formação total da fase cristalina durante o processo de eletrofiação. Apesar do estiramento do jato polimérico na eletrofiação, a formação dos domínios cristalinos foi reestabelecida e finalizada durante o primeiro ciclo de aquecimento realizado no ensaio de DSC. O grau de cristalinidade X_c (%) das membranas eletrofiadas calculado a partir da entalpia de fusão do PLGA foi de 25,4%. Para as membranas de PLGA/NTC o grau de cristalinidade não sofreu

alteração significativa. Em relação ao segundo ciclo de aquecimento, a transição vítrea reduziu ligeiramente de 61 °C para em média 57 °C tanto para as membranas de PLGA quanto para as membranas de PLGA/NTC. Isso indica que sem o histórico térmico resultante do processamento a mobilidade da fase amorfa foi atingida em menores valores. Outro efeito observado é ausência do pico de cristalização a frio e do pico de fusão. A ausência deste picos indica que o material tornou-se amorfo.

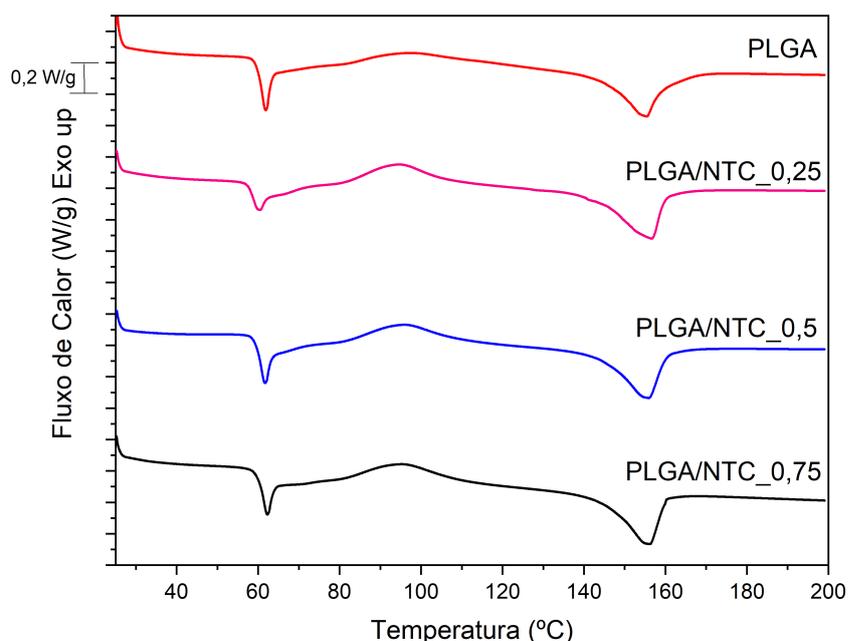


Figura 61 – Curvas DSC referente ao primeiro ciclo de aquecimento das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.

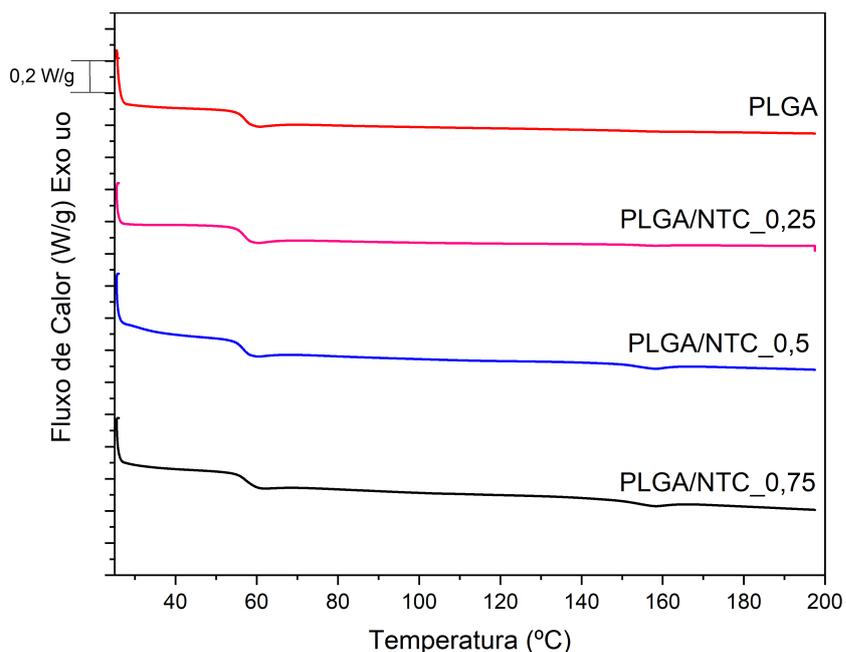


Figura 62 – Curvas DSC referente ao segundo ciclo de aquecimento das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.

Tabela 12 – Resultados de DSC referente ao primeiro e segundo ciclos de aquecimento das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.

Membrana	1º Ciclo			ΔH_f (J/g)	Xc (%)	2º Ciclo
	Tg (°C)	Tc (°C)	Tf (°C)			Tg (°C)
PLGA	61,1	97,3	155,4	24,1	25,4	57,1
PLGA/NTC_0,25	60,8	96,1	155,8	23,9	25,3	57,0
PLGA/NTC_0,5	61,0	95,4	156,0	23,6	25,0	56,8
PLGA/NTC_0,75	61,2	97,2	155,2	21,4	22,7	57,0

As curvas termogravimétricas das membranas de PLGA e PLGA/NTC e do aditivo condutor NTC estão apresentadas na Figura 63. Os valores resumidos obtidos pelas curvas estão apresentados na Tabela 13. A membrana de PLGA apresenta um único estágio de perda de massa com início (Tonset) em 284,9 °C e pico de degradação máxima em 343,0 °C, que pode ser atribuído a decomposição da cadeia polimérica, com resíduos próximos a zero a 700 °C. Para as membranas de PLGA/NTC não houve alteração significativa dos valores de Tdonset. No entanto, o pico de degradação sofre um leve aumento, sendo mais pronunciada para a membrana de PLGA/NTC_0,75 (349,2°C), demonstrando que a presença do aditivo condutor, aumentou a resistência térmica do material. Já o aditivo condutor NTC iniciou o processo de degradação térmica somente à 534 °C, e à 700 °C apresentou 76% de resíduo, demonstrando uma grande estabilidade térmica em relação aos demais aditivos PPy.DBSA e Mt-PPy.DBSA, os quais apresentam valores de Tdonset de 331 °C e 295 °C, respectivamente.

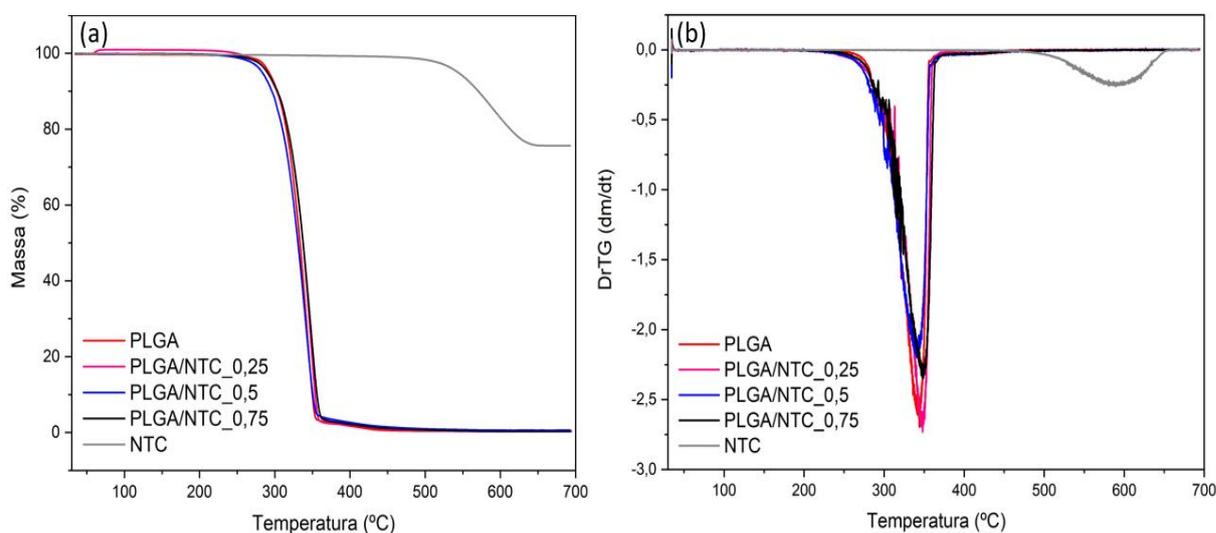


Figura 63 – Curvas de (a) TG e (b) DrTG do aditivo condutor NTC e das membranas de PLGA e PLGA/NTC.

Tabela 13 – Resumo dos resultados obtidos pelas curvas de TG e DrTG.

Membrana	Td onset (°C)	Td máx. (°C)	Td outset (°C)
PLGA	284,9	343,0	354,2
PLGA/NTC_0,25	284,0	347,4	358,8
PLGA/NTC_0,5	281,3	340,3	356,6
PLGA/NTC_0,75	283,8	349,2	362,6
NTC	534,4	591,3	631,9

As curvas de módulo de armazenamento (E') em função da temperatura para as membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC estão apresentadas na Figura 64 (a). As curvas da tangente de perda ($\tan \delta$) em função da temperatura das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC estão apresentadas na Figura 64 (b). Os valores resumidos do ensaio de DMA estão apresentados na Tabela 14. Os valores de E' para a membrana de PLGA foi de 237,4 MPa. Já para as membranas de PLGA/NTC houve um aumento significativo dos valores de E' para as membranas de PLGA/NTC_0,25 e PLGA/NTC_0,75, 430,3 e 390,4 MPa, respectivamente. Esses valores indicam que a presença de 0,25 %m e 0,75 %m de NTC aumentaram a capacidade de armazenamento de energia (portanto, melhor capacidade de manter a deformação imposta ao material). No entanto, para a membrana de PLGA/NTC_0,5 o módulo E' reduziu para 168,9 MPa. Essa redução pode ser explicada pela dispersão dos NTC dentro das fibras, a qual possivelmente pode gerar defeitos pontuais, agindo como concentradores de tensão e reduzindo conseqüentemente as propriedades mecânicas. Os valores de T_g não foram alterados significativamente, assim como apresentado pelo ensaio DSC. Outra característica importante a ser considerada é a faixa de temperatura na qual o módulo E' é constante e, portanto, a faixa a qual a membrana pode ser aplicada sem comprometimento mecânico. O módulo de armazenamento foi constante na faixa da temperatura do corpo humano (37 °C) para todas as membranas avaliadas.

Tabela 14 – Módulo de armazenamento (E'), intervalo de temperatura com E' constante e transição vítrea (T_g) obtidos pelo ensaio de DMA para as membranas de PLGA e PLGA/NTC.

Membrana	Módulo E' (MPa)	$\Delta T_{E' \text{ constante}}$ (°C)	T_g (°C)
PLGA	237,4	25 à 55,5	69,6
PLGA/NTC_0,25	430,3	25 à 52,3	70,5
PLGA/NTC_0,5	168,9	25 à 46,2	69,0
PLGA/NTC_0,75	390,4	25 à 46,8	65,7

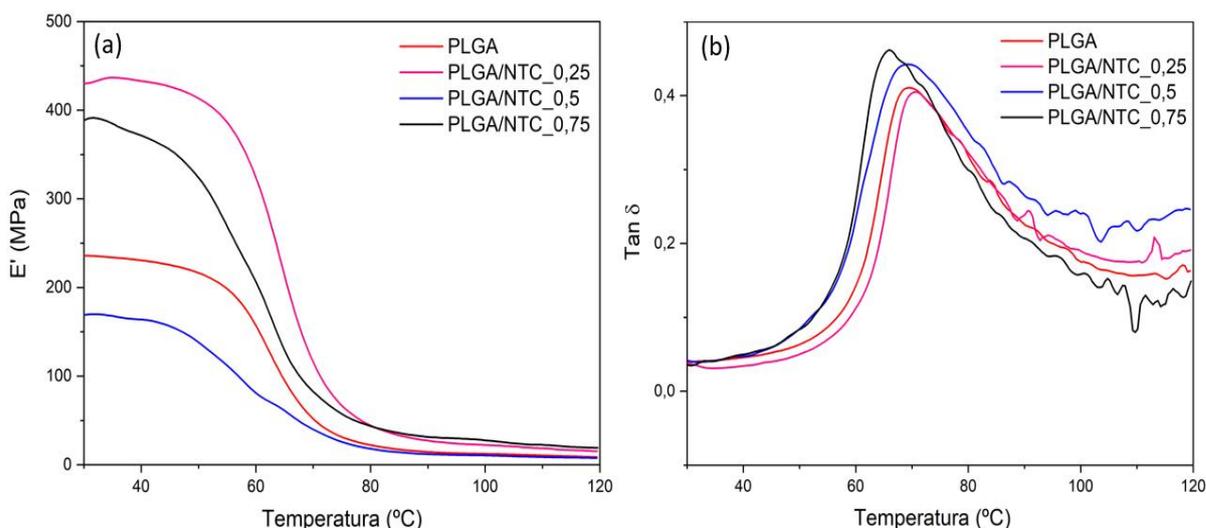


Figura 64 – Curvas de DMA (a) módulo de armazenamento e (b) $\tan \delta$ em função da temperatura para as membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.

Como discutido anteriormente, as propriedades mecânicas dos conduítes eletrofiados de nervo devem se aproximar das propriedades mecânicas de um nervo humano, para que assim sejam capazes de suportar as demandas fisiológicas e mecânicas. A Figura 53, apresenta as propriedades mecânicas das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC. De maneira similar como aconteceu com as membranas de PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA, a presença do aditivo condutor NTC aumentou as propriedades mecânicas em comparação com a membrana de PLGA, como pode ser observado no aumento do módulo de elasticidade e da tensão máxima à tração. Em relação de deformação na ruptura apenas as membranas de PLGA/NTC_0,5 reduziram os valores de deformação. Esse efeito pode ser explicado pela redução da ductilidade do material pela presença do aditivo NTC. De uma maneira geral todas as membranas apresentaram valores superiores àqueles apresentados pelo nervo humano. Sendo assim todas estão aptas mecanicamente para a aplicação como conduítes de nervos periféricos.

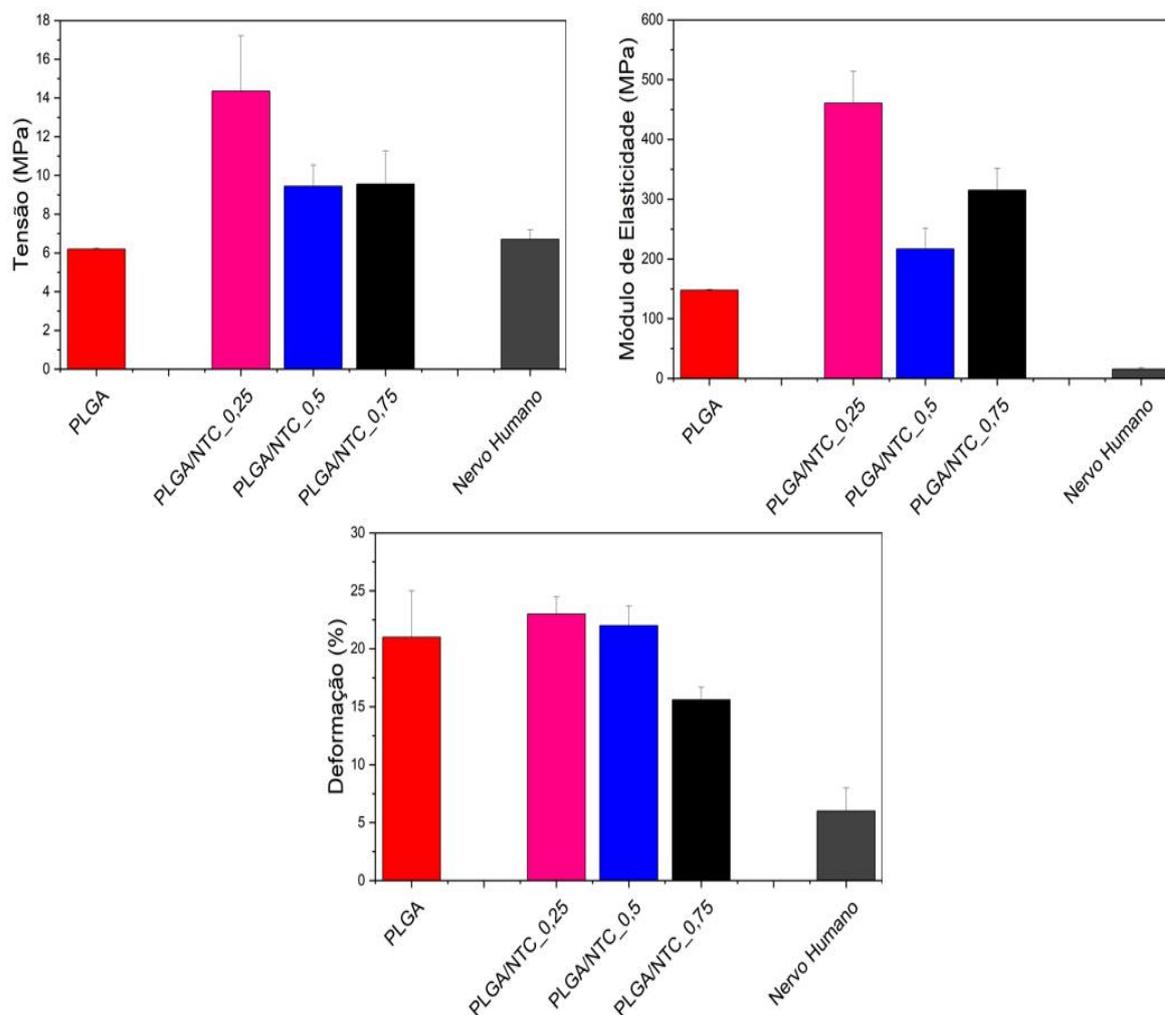


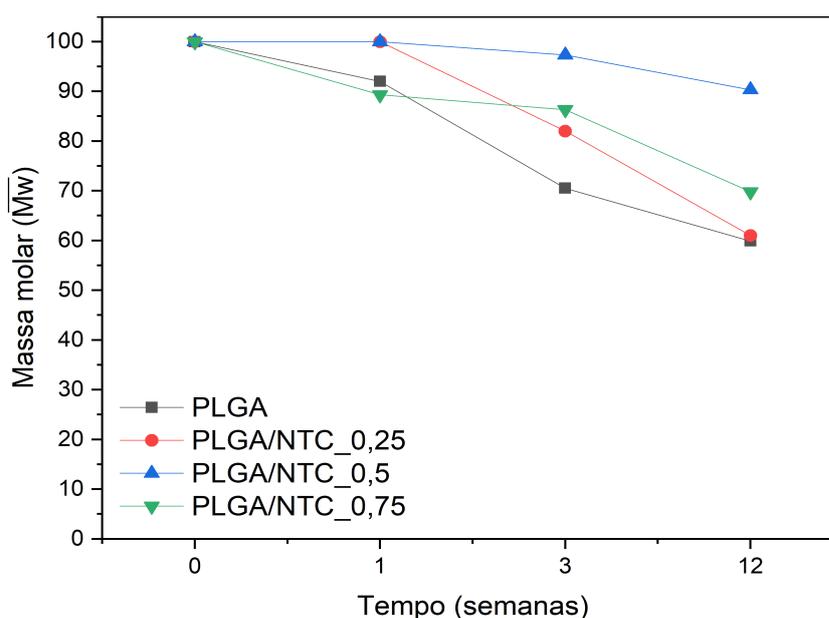
Figura 65 – Propriedade mecânicas, módulo de elasticidade (E), resistência máxima à tração (σ) e deformação na ruptura, das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC.

A condutividade elétrica das membranas eletrofiadas é uma propriedade relevante para o estímulo das células neurais, para assim estimular o prologamento e a diferenciação celular. Os valores de condutividade elétrica obtidos pelo método de 2 pontas das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC estão apresentadas na Tabela 15. As membranas de PLGA, apresentam um comportamento referente a materiais isolantes, apresentam valores de condutividade de $2,01 \times 10^{-17} \text{ S.cm}^{-1}$. A presença do aditivo NTC não alterou significativamente os valores de condutividade elétrica das membranas eletrofiadas. Cabe ressaltar que para o grupo PLGA/NTC, a quantidade de aditivo condutor foi relativamente baixa ($< 1\text{m}\%$), devido a toxicidade do NTC para valores superiores. A baixa quantidade de aditivo dificulta a formação de caminhos condutores. No entanto, isso não significa que a fibra não seja condutora. Devido a porosidade das membranas o contato entre as fibras é reduzido. Para esse tipo de caso, seria ideal realizar um ensaio de condutividade elétrica para uma fibra isoladamente.

Tabela 15 – Valores de condutividade elétrica das membranas de PLGA e PLGA/NTC.

Membrana	Condutividade elétrica ($S.cm^{-1}$)
PLGA	$(2,01 \pm 0,65) \times 10^{-17}$
PLGA/NTC_0,25	$(2,46 \pm 0,80) \times 10^{-16}$
PLGA/NTC_0,5	$(1,45 \pm 0,48) \times 10^{-17}$
PLGA/NTC_0,75	$(2,41 \pm 0,40) \times 10^{-17}$

A Figura 66, apresenta a variação da massa molar (M_w) das membranas de PLGA e PLGA/NTC obtidos pelo método SEC, como medida de avaliação da degradação em até 12 semanas destas membranas. Como pode ser observado, as membranas apresentaram uma redução de até aproximadamente 60% dos valores de massa molar em até 12 semanas. A presença do aditivo condutor NTC reduziu a taxa de degradação do polímero, sendo mais pronunciado para as membranas de PLGA/NTC_0,5. Isso pode ser justificado pela redução da degradação do tipo erosão superficial pela presença do NTC e conseqüentemente uma degradação em massa pela quebra de ligações ésteres de maneira mais tardia. O tempo de degradação do PLGA em meia vida (50%) está de acordo com a literatura, sendo aproximadamente 12 semanas (MILLER; BRADY; CUTRIGHT, 1977). Para a aplicação em nervos periféricos, o tempo de degradação está satisfatório, visto que os axônio em prolongamento dentro do condúite necessitam de em média 15 - 21 dias pós cirúrgico para atravessarem o condúite através do cabo de fibrina anteriormente formado durante o processo de regeneração (DALY *et al.*, 2011).

Figura 66 – Variação de massa molar M_w das membranas de PLGA e PLGA/NTC obtidos pelo método SEC.

Ensaio de viabilidade celular foram realizados nas membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC com o intuito de verificar a citotoxicidade na presença dos NTC, assim como para verificar se as células foram estimuladas pela presença deste aditivo. Como pode ser observado na Figura 67 no primeiro dia de cultura celular, todas as membranas apresentaram-se atóxicas e valores de absorbância acima do grupo controle. No terceiro e sétimo dia após a semeadura, todos os grupos apresentaram mais de 50% de células metabolicamente ativas em comparação ao controle.

A Figura 68 apresenta as morfologias das células PC12 semeadas sobre as membranas de PLGA e PLGA/NTC no sétimo dia de cultivo celular. As células PC12 apresentam-se alinhadas e alongadas sobre as fibras alinhadas de PLGA e PLGA/NTC, como pode ser observado pelas setas indicadas. O alinhamento das células é um resultado muito relevante, visto que em muitos estudos abordados pela literatura abordam este alinhamento é capaz de guiar o crescimento das células em regeneração promovendo uma recuperação funcional mais rápida e eficiente do nervo lesionado (DALY *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2016; CHEW *et al.*, 2008).

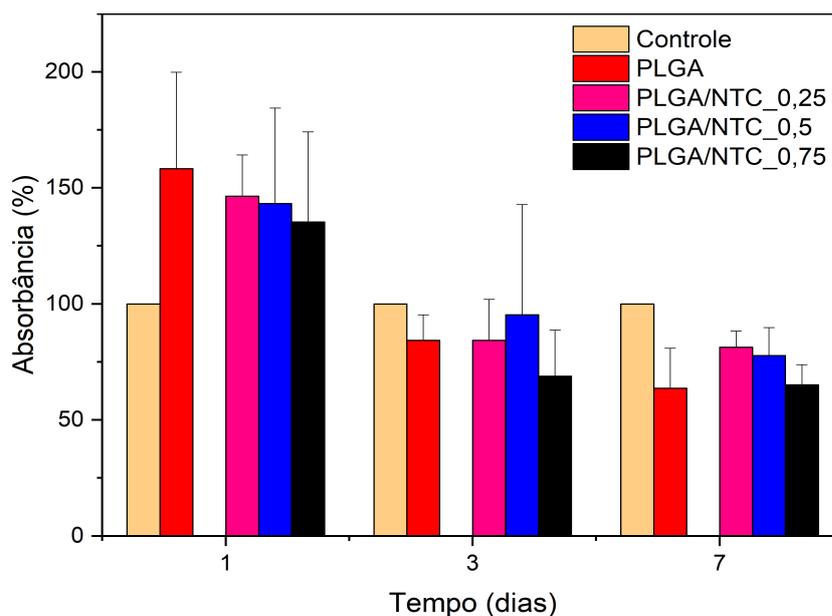


Figura 67 – Viabilidade celular das membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC, nos dias 1, 3 e 7 após o cultivo celular.

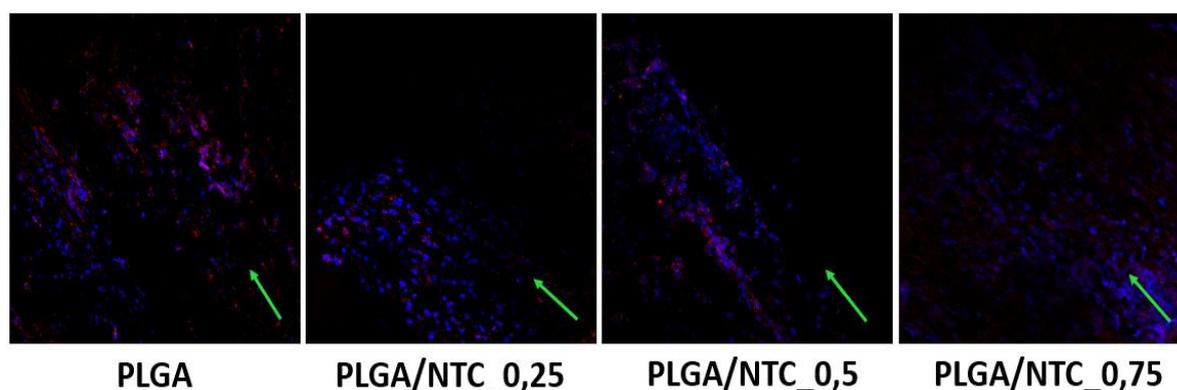


Figura 68 – Morfologia das células de linhagem neural PC12 semeadas após 7 dias sobre as membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA/NTC (histoquímica). As setas representam o direcionamento das células.

9.3.1 Considerações parciais

Membranas eletrofiadas alinhadas de PLGA contendo o aditivo condutor NTC foram obtidas através da eletrofição direta da solução de PLGA contendo os aditivos em diferentes frações mássica, 0,25, 0,5 e 0,75 %m. A presença de NTC nas membranas eletrofiadas não alterou significativamente a condutividade elétrica das membranas, possivelmente devido a influência da porosidade da membrana o que dificulta o contato entre as fibras para formação dos caminhos condutores.

As micrografias MEV revelaram que as membranas de PLGA são constituídas de fibras homogêneas, sem defeitos, alinhadas e com diâmetros de $561,6 \pm 149,0$ nm. Já para as membranas contendo NTC não houve variação significativa nos valores de diâmetros das fibras, assim como as fibras mantiveram-se sem defeitos e alinhadas. Os NTC encontram-se encapsulados, alinhados e orientados dentro das fibras, devido a ação do campo elétrico durante a eletrofição, como foi possível observar pelas micrografias MET.

O ângulo de contato não sofreu alteração para as membranas de PLGA/NTC em relação as membranas de PLGA puro. Esse resultado indica que as propriedades de superfície não foram alteradas e as membranas mantiveram-se hidrofóbicas, ou seja, ângulo de contato maior que 90° .

O ensaio de DSC revelou que não houve variação significativa das transições térmicas na presença dos aditivos condutor NTC no primeiro aquecimento. Foi observado apenas uma ligeira redução no grau de cristalinidade para as membranas de PLGA/NTC_0,75. Já no segundo aquecimento as membranas foram amorfas, indicando que o processamento interferiu na formação de regiões cristalinas.

A estabilidade térmica das membranas de PLGA/NTC aumentou com o aumento da fração mássica de NTC, como pode ser observado pelo aumento da temperatura máxima de degradação. Esse resultado apresenta o efeito protetivo do NTC no processo de degradação do material, aumentando sua estabilidade térmica.

O ensaio de DMA revelou de uma maneira geral um aumento das propriedades mecânicas das membranas eletrofiadas na presença dos aditivos condutores, com exceção das membranas de PLGA/NTC_0,5. Além disso, houve uma ligeira redução dos valores de Tg para as membranas de PLGA/NTC_0,75. Todas as membranas mantiveram constante o módulo E' na temperatura corporal humana de 37°C, indicando que podem ser utilizadas nessa temperatura sem comprometimento mecânico. As propriedades mecânicas, obtidas pelo ensaio de tração, das membranas de PLGA/NTC aumentaram significativamente em relação as membranas de PLGA puro. Todos os valores obtidos são superiores aos valores encontrados na literatura para aplicação em nervos periféricos.

O ensaio de degradação *in vitro* foi realizado durante 12 semanas. Houve uma redução da taxa de degradação com a presença de NTC, sendo mais pronunciada para as membranas de PLGA/NTC_0,5. As membranas de um modo geral, apresentaram perda de massa molar de até 60% em 12 semanas. Esse valor está de acordo com a literatura e possibilita o material ser utilizado como conduíte de nervos periféricos, visto que é capaz de manter sua estrutura e conseqüentemente propriedades mecânicas durante o processo de regeneração.

Ensaio *in vitro* de viabilidade celular revelaram não citotoxicidade das membranas de PLGA/NTC. Membranas contendo maiores frações de NTC apresentaram valores ligeiramente menores de absorbância. As células semeadas apresentaram-se alinhadas e alongadas sobre as fibras eletrofiadas alinhadas, indicando um direcionamento preferencial de crescimento e boa adesão celular.

9.4 DESENVOLVIMENTO DO CONDUÍTE ELETROFIADO

O protótipo de conduíte constituído de fibras alinhadas de PLGA foi obtido de maneira satisfatória de acordo com o processo ilustrado na Figura 69 . Para isso, uma membrana eletrofiada alinhada de PLGA, com dimensões (14 mm x 50 mm) foi enrolada em torno de um capilar polimérico (diâmetro 1,5 mm), resultando um conduíte de comprimento 14 mm e diâmetro externo de 1,7 mm. Também é possível observar pela micrografia MEV a microestrutura resultante do conduíte desenvolvido, conforme apresentado na Figura 70. Ressalta-se que este é um dos métodos de obtenção dos conduítes. Um segundo método de inserção considera a colagem da membrana eletrofiada nos cotos proximais e distais, seguido de envelopamento do nervo durante o procedimento cirúrgico.



Figura 69 – Processo de obtenção do protótipo do conduíte eletrofiado, realizado previamente ao procedimento cirúrgico.

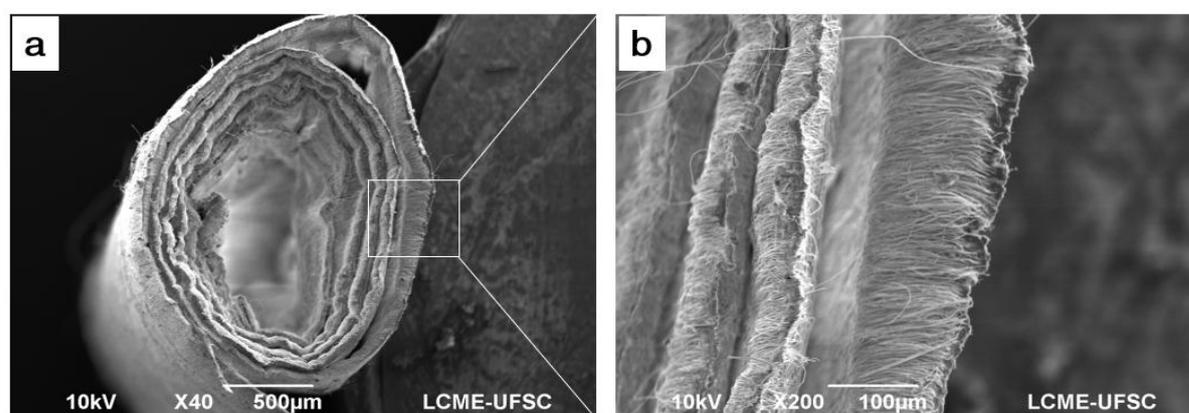


Figura 70 – Micrografia MEV de um conduíte eletrofiado de PLGA. (a) com aumento de 40x e (b) com aumento de 200x.

10 CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste trabalho, conclui-se que foram obtidas membranas eletrofiadas de PLGA e PLGA contendo os aditivos condutores PPy.DBSA, Mt-PPy.DBSA e NTC, constituídas de fibras homogêneas, alinhadas, em escala submicro-métrica e sem defeitos, pela rota de eletrofição direta.

Foram obtidas eficientemente membranas constituídas de fibras eletrofiadas de PLGA recobertas por uma camada contínua e homogênea de PPy, a partir da polimerização oxidativa *in situ* do monômero pirrol, resultando em uma membrana condutora de eletricidade. A camada de polipirrol sobre as membranas de PLGA aumentou a estabilidade térmica das fibras de PLGA e melhorou as propriedades de superfície das fibras, tornando-as hidrofílicas. O aumento da hidrofiliçidade da superfície é um resultado relevante, visto que viabiliza a adesão celular *in vivo*.

A rota de preparado das membranas eletrofiadas, via recobrimento da membrana eletrofiada de PLGA com PPy ou pela eletrofição direta da solução de PLGA contendo os aditivos condutores, influenciou diretamente nas propriedades das membranas, principalmente nas propriedades elétricas e na citotoxicidade. As membranas eletrofiadas obtidas pela rota de recobrimento das fibras de PLGA com PPy apresentaram maiores valores de condutividade elétrica, devido ao aditivo condutor PPy encontrar-se sobre as fibras de PLGA, o que facilita a formação de caminhos condutores. Entretanto, apresentaram resposta biológica insatisfatória. Os resultados obtidos pelo ensaio de viabilidade celular MTT demonstraram que as membranas de PLGA-rec foram citotóxicas. Conclui-se que possivelmente resíduos de agente oxidante tenha influenciado na citotoxicidade destas membranas.

As membranas de PLGA-rec apresentaram os melhores resultados de condutividade elétrica dentre todos os demais grupos, com aumento de 15 ordens de grandeza em relação as membranas de PLGA. Além disso, houve uma fragilização das fibras de PLGA após o recobrimento, resultando no aumento do módulo de elasticidade e da resistência máxima a tração, e uma redução na deformação na ruptura.

A partir de uma análise comparativa entre as membranas de PLGA/PPy.DBSA, PLGA/Mt-PPy.DBSA e PLGA/NTC, conclui-se que não houve alteração na hidrofiliçidade da superfície das membranas, mantendo-se hidrofóbicas mesmo na presença dos aditivos condutores. Dentre os três grupos, o grupo com melhores resultados foi o PLGA/Mt-PPy.DBSA. O grupo PLGA/Mt-PPy.DSBA apresentou os maiores valores de condutividade elétrica, com aumento de 7 ordens de grandeza para as membranas de PLGA/Mt-PPy_7,5, seguido das membranas de PLGA/Mt-PPy_5, com aumento de 6 ordens de grandeza. Esse comportamento foi atribuído a morfologia lamelar do aditivo Mt-PPy.DBSA, que por apresentar maior razão de aspecto em comparação com o PPy.DBSA, forma mais facilmente uma rede condutora, conseqüentemente

umentando a condutividade elétrica das membranas. Vale ressaltar que os aditivos condutores estão no interior das fibras, o que somado à porosidade da membrana, dificulta a formação de caminhos condutores, o que justifica os valores de condutividade elétrica das membranas obtidas pela eletrofiação direta, inferiores às membranas de PLGA-rec.

Conclui-se também que houve um aumento nas propriedades térmicas e mecânicas com o aumento da fração mássica dos aditivos PPy.DBSA, Mt-PPy.DBSA e NTC. Todavia o aditivo condutor que apresentou respostas térmicas e mecânicas mais satisfatórias foi o Mt-PPy.DBSA. Esse comportamento está relacionado com a presença da argila no aditivo condutor Mt-PPy.DBSA, bem como pela maior área de superfície do aditivo, que contribuem para a melhora nas propriedades mecânicas das fibras. Todos os três grupos foram viáveis biologicamente, apresentaram células alinhadas em direção as fibras eletrofiadas, sendo este um resultado relevante para aplicação como conduítes de nervos periféricos. Não houve diferença significativa da resposta biológica entre o tipo de aditivo condutor, assim como não houve diferença significativa quanto a fração mássica de aditivo condutor utilizada.

A partir dos resultados de degradação *in vitro*, conclui-se que o tempo de degradação em 12 semanas está de acordo com a literatura, ou seja, apresentam redução da massa molar em até 60% em 12 semanas. Adicionalmente, concluiu-se que a presença do aditivo NTC reduziu a taxa de degradação das membranas, possivelmente devido a interação entre o aditivo NTC e o polímero PLGA, o que dificultou a quebra das ligações ésteres do PLGA pela solução de PBS e conseqüentemente limitou a degradação das membranas.

Portanto, conclui-se o caráter inovador das membranas eletrofiadas constituídas de fibras alinhadas de PLGA contendo aditivos condutores via eletrofiação direta, sendo assim preenchida uma lacuna encontrada na literatura. Com base nas metodologias desenvolvidas por essa tese, as membranas que apresentaram melhor desempenho térmico, mecânico e elétrico, bem como viabilidade biológica, foram as membranas PLGA/Mt-PPy_5 e PLGA/Mt-PPy_7,5 que apresentam grande potencial para prosseguirem para a próxima etapa de realização dos ensaios *in vivo* para serem utilizadas como conduítes eletrofiados para a regeneração de nervos periféricos.

11 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Investigar o uso de outros agentes oxidantes para a polimerização oxidativa *in situ* do pirrol sobre as fibras de PLGA.
- Realizar ensaios de degradação *in vitro* para os grupos de PLGA/PPy.DBSA e PLGA/Mt-PPy.DBSA.
- Realizar ensaios *in vitro* com estímulos elétricos.
- Melhorar a dispersão dos aditivos condutores utilizando-se líquidos iônicos.
- Realizar ensaios *in vivo*.

REFERÊNCIAS

AMANI, Ali Mohammad; HASHEMI, Seyyed Alireza; MOUSAVI, Seyyed Mojtaba; POUYA, Haratipour; ARASH, Vojood. Electric Field Induced Alignment of Carbon Nanotubes: Methodology and Outcomes. **Carbon Nanotubes - Recent Progress**, 2018.

ANGIUS, Diana *et al.* A systematic review of animal models used to study nerve regeneration in tissue-engineered scaffolds. **Biomaterials**, Elsevier Ltd, v. 33, n. 32, p. 8034–8039, 2012.

ARCHIBALD, Simon J *et al.* A collagen-based nerve guide conduit for peripheral nerve repair an electrophysiological study of nerve regeneration in rodents and nonhuman primates. **The Journal of comparative neurology**, p. 685–696, 1991.

ARSLANTUNALI, D.; DURSUN, T.; YUCEL, D.; HASIRCI, N.; HASIRCI, V. Peripheral nerve conduits: Technology update. **Medical Devices: Evidence and Research**, v. 7, p. 405–424, 2014.

AVGOUSTAKIS, Konstantinos. Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA). **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, Second Edition - Four Volume Set**, Scheme 2, p. 2259–2269, 2008.

BALINT, Richard; CASSIDY, Nigel J.; CARTMELL, Sarah H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, Acta Materialia Inc., v. 10, n. 6, p. 2341–2353, 2014.

BELKAS, Jason S. *et al.* Peripheral nerve regeneration through guidance tubes. **Neurological Research**, v. 26, p. 151–160, 2004.

BHADRA, Sambhu; KHASTGIR, Dipak; SINGHA, Nikhil K.; LEE, Joong Hee. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 34, n. 8, p. 783–810, 2009.

BHARDWAJ, Nandana; KUNDU, Subhas C. Electrospinning: A fascinating fiber fabrication technique. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 325–347, 2010.

BLILEY, Jacqueline M.; MARRA, Kacey G. [S./]: Elsevier Inc., 2015. P. 149–161.

BRAGA SILVA, J.; MARCHESE, G. M.; CAUDURO, C. G.; DEBIASI, M. Nerve conduits for treating peripheral nerve injuries: A systematic literature review. **Hand Surgery and Rehabilitation**, SFCM, v. 36, n. 2, p. 71–85, 2017.

CASPER, Cheryl L. *et al.* Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers: Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. **Macromolecules**, v. 37, n. 2, p. 573–578, 2004.

CASTRO, Vanessa Oliveira. Membranas eletrofiadas de poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico)/ β -fosfato tricálcico para aplicação em regeneração óssea guiada, p. 1–107, 2018.

CASTRO, Vanessa Oliveira; FREDEL, Márcio Celso; ARAGONES, Águedo; DE OLIVEIRA BARRA, Guilherme Mariz; CESCO, Karina; MERLINI, Claudia. Electrospun fibrous membranes of poly (lactic-co-glycolic acid) with β -tricalcium phosphate for guided bone regeneration application. **Polymer Testing**, v. 86, 2020.

CASTRO, Vanessa Oliveira; MERLINI, Claudia. Aligned electrospun nerve conduits with electrical activity as a strategy for peripheral nerve regeneration. **Artificial Organs**, p. 1–6, 2021.

CHEW, Sing Yian; MI, Ruifa; HOKE, Ahmet; LEONG, Kam W. The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation. **Biomaterials**, v. 29, n. 6, p. 653–661, 2008.

CHIONO, Valeria; TONDA-TURO, Chiara. Trends in the design of nerve guidance channels in peripheral nerve tissue engineering. **Progress in Neurobiology**, Elsevier Ltd, v. 131, p. 87–104, 2015.

CHOUDHARY, Veena; GUPTA, Anju. [S.l.: s.n.], 2001. P. 65–90.

CIRILLO, Valentina; BUSHMAN, Jared; GUARINO, Vincenzo; KOHN, Joachim; AMBROSIO, Luigi. **3D conduits for peripheral nerve regeneration**. [S.l.]: Elsevier Ltd, 2018. P. 329–349.

DALY, W. *et al.* A biomaterials approach to peripheral nerve regeneration: bridging the peripheral nerve gap and enhancing functional recovery. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 9, n. 67, p. 202–221, 2011.

DELLON, A. Lee; MACKINNON, Susan E. **An alternative to the classical nerve graft for the management of the short nerve gap.** [*S.l.: s.n.*], 1988.

DI SUMMA, Pietro G. *et al.* Collagen (NeuraGen®) nerve conduits and stem cells for peripheral nerve gap repair. **Neuroscience Letters**, Elsevier Ireland Ltd, v. 572, p. 26–31, 2014.

DINIS, T. M. *et al.* 3D multi-channel bi-functionalized silk electrospun conduits for peripheral nerve regeneration. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, Elsevier, v. 41, p. 43–55, 2014.

DUNEN, Den; MEEK, M.F.; ROBISON, P.H. Peripheral nerve regeneration through P(DLLA-e-CL) nerve guides. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 9, p. 811–814, 1998.

FAROLE, Anthony; JAMAL, Basem T. A Bioabsorbable Collagen Nerve Cuff (NeuraGen) for Repair of Lingual and Inferior Alveolar Nerve Injuries: A Case Series. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 66, n. 10, p. 2058–2062, 2008.

FROST, Hanna K.; ANDERSSON, Tomas; JOHANSSON, Sebastian; ENGLUND-JOHANSSON, U.; EKSTRÖM, Per; DAHLIN, Lars B.; JOHANSSON, Fredrik. Electrospun nerve guide conduits have the potential to bridge peripheral nerve injuries in vivo. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–13, 2018.

GAUDIN, Robert *et al.* Approaches to Peripheral Nerve Repair : Generations of Biomaterial Conduits Yielding to Replacing Autologous Nerve Grafts in Craniomaxillofacial Surgery. **BioMed research international**, v. 2016, p. 1–18, 2016.

GENTILE, Piergiorgio; CHIONO, Valeria; CARMAGNOLA, Irene; HATTON, Paul V. An overview of poly(lactic-co-glycolic) Acid (PLGA)-based biomaterials for bone tissue engineering. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, p. 3640–3659, 2014.

GERTZ, Caitlyn C.; WANG, Bor-Shuen; FELDMAN, Eva L.; BIRRELL, Lisa K.; MARTIN, David C.; JOHNSON, Sara L.; COREY, Joseph M. The design of electrospun PLLA nanofiber scaffolds compatible with serum-free growth of primary motor and sensory neurons. **Acta Biomaterialia**, v. 4, n. 4, p. 863–875, 2008.

GHASEMI-MOBARAKEH, Laleh; PRABHAKARAN, Molamma P.; MORSHED, Mohammad; NASR-ESFAHANI, Mohammad Hossein; RAMAKRISHNA, Seeram. Electrical stimulation of nerve cells using conductive nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering. **Tissue Engineering - Part A**, v. 15, n. 11, p. 3605–3619, 2009.

GIROTTI, Emerson M.; SANTOS, Ivair A. Medidas de resistividade elétrica DC em sólidos: Como efetuá-las corretamente. **Química Nova**, v. 25, n. 4, p. 639–647, 2002.

GREEN, Rylie A.; BAEK, Sungchul; LOVELL, Nigel H.; POOLE-WARREN, Laura A. Nanostructured Conductive Polymers as Biomaterials. *In: NANOSTRUCTURED Conductive Polymers*. [S.l.: s.n.], 2010. P. 707–736.

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.

HAIDER, Adnan; HAIDER, Sajjad; KANG, Inn Kyu. A comprehensive review summarizing the effect of electrospinning parameters and potential applications of nanofibers in biomedical and biotechnology. **Arabian Journal of Chemistry**, King Saud University, v. 11, n. 8, p. 1165–1188, 2018.

HARDIN-YOUNG, Janet *et al.* Modification of native collagen reduces antigenicity but preserves cell compatibility. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 49, n. 6, p. 675–682, 1996.

HUANG, Jinghui *et al.* Electrical stimulation to conductive scaffold promotes axonal regeneration and remyelination in a rat model of large nerve defect. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, 2012.

HUANG, Yi Cheng; HUANG, Yi You. Biomaterials and strategies for nerve regeneration. **Artificial Organs**, v. 30, n. 7, p. 514–522, 2006.

IJPMA, F. F A; VAN DE GRAAF, R. C.; MEEK, M. F. The early history of tubulation in nerve repair. **Journal of Hand Surgery: European Volume**, v. 33, n. 5, p. 581–586, 2008.

JIANG, Tao *et al.* Electrospinning of polymer nanofibers for tissue regeneration. **Progress in Polymer Science**, v. 46, p. 1–24, 2015.

- JING, Wei *et al.* Constructing conductive conduit with conductive fibrous infilling for peripheral nerve regeneration. **Chemical Engineering Journal**, v. 345, p. 566–577, 2018.
- KEHOE, S.; ZHANG, X. F.; BOYD, D. FDA approved guidance conduits and wraps for peripheral nerve injury: A review of materials and efficacy. **Injury**, Elsevier Ltd, v. 43, n. 5, p. 553–572, 2012.
- KIM, Jeong In *et al.* A Controlled Design of Aligned and Random Nanofibers for 3D Bi-functionalized Nerve Conduits Fabricated via a Novel Electrospinning Set-up. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group, v. 6, December 2015, p. 1–12, 2016.
- KOKAI, Lauren E. *et al.* Diffusion of soluble factors through degradable polymer nerve guides: Controlling manufacturing parameters. **Acta Biomaterialia**, Acta Materialia Inc., v. 5, n. 7, p. 2540–2550, 2009.
- LASPRILLA-BOTERO, Juliana; ÁLVAREZ-LÁINEZ; LAGARON, J.M. The influence of electrospinning parameters and solvent selection on the morphology and diameter of polyimide nanofibers. **Materials Today Communications**, v. 14, p. 1–9, 2018.
- LEE, Jae *et al.* Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. **Biomaterials**, Elsevier Ltd, v. 30, n. 26, p. 4325–4335, 2009.
- LEE, Jeremy Kong Yoong *et al.* Polymer-based composites by electrospinning: Preparation & functionalization with nanocarbons. **Progress in Polymer Science**, Elsevier Ltd, v. 86, p. 40–84, 2018.
- LEE, S. K.; WOLFE, S. W. Peripheral nerve injury and repair. **The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons**, v. 8, n. 4, p. 243–252, 2000.
- LI, Jian; NEMES, Peter; GUO, Ji. Mapping intermediate degradation products of poly(lactic-co-glycolic acid) in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, v. 106, n. 3, p. 1129–1137, 2018.
- LINS, Luanda Chaves; WIANNY, Florence; LIVI, Sébastien; HIDALGO, Idalba Andreina; DEHAY, Colette; DUCHET-RUMEAU, Jannick; GÉRARD, Jean François. Development of Bioresorbable Hydrophilic-Hydrophobic Electrospun Scaffolds for Neural Tissue Engineering. **Biomacromolecules**, v. 17, n. 10, p. 3172–3187, 2016.

- LIVERANI, Liliana; BOCCACCINI, Aldo R. Versatile production of poly(Epsilon-caprolactone) fibers by electrospinning using benign solvents. **Nanomaterials**, v. 6, n. 4, 2016.
- LUIS, Ana L. *et al.* PLGA 90/10 and caprolactone biodegradable nerve guides for the reconstruction of the rat sciatic nerve. **Microsurgery**, 2007.
- MACHADO, Angelo; HAERTEL, Lucia Machado. Third Edit. [S.l.: s.n.], 2014. P. 344.
- MACKINNON, Susan E.; DELLON, A. Lee. **Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube**. [S.l.: s.n.], 1990.
- MEEK, Marcel F.; JANSEN, Koen. Two years after in vivo implantation of poly(DL-lactide- ϵ - caprolactone) nerve guides: Has the material finally resorbed? **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 89, n. 3, p. 734–738, 2008.
- MEEK, Marcel F.; JANSEN, Koen; STEENDAM, Rob; VAN OEVEREN, Wim; VAN WACHEM, Pauline B.; VAN LUYN, Marja J.A. In vitro degradation and biocompatibility of poly(DL-lactide- ϵ -caprolactone) nerve guides. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 68, n. 1, p. 43–51, 2004.
- MERLINI, C. *et al.* A comparative study of aligned and random electrospun mats of thermoplastic polyurethane and conductive additives based on polypyrrole. **Polymer Testing**, Elsevier, v. 70, p. 486–497, 2018.
- MERLINI, C.; BARRA, G. M.O.; MEDEIROS ARAUJO, T.; PEGORETTI, A. Electrically pressure sensitive poly(vinylidene fluoride)/polypyrrole electrospun mats. **RSC Advances**, v. 4, n. 30, p. 15749–15758, 2014.
- MERLINI, Claudia. **Desenvolvimento de membranas eletrofiadas de poli (fluoreto de vinilideno) com polipirrol para aplicação em sensores de compressão**. 2014. F. 1–171.
- MERLINI, Claudia; ALMEIDA, Rosemeire dos Santos; D'ÁVILA, Marcos Akira; SCHREINER, Wido Herwig; BARRA, Guilherme Marriz de Oliveira. Development of a novel pressure sensing material based on polypyrrole-coated electrospun poly (vinylidene fluoride) fibers. **Materials Science and Engineering B**, p. 52–59, 2014.

MILLER, Robert A.; BRADY, John M.; CUTRIGHT, Duane E. Degradation rates of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates): Rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 11, n. 5, p. 711–719, 1977.

MIT-UPPATHAM, Chidchanok; NITHITANAKUL, Manit; SUPAPHOL, Pitt. Ultrafine electrospun polyamide-6 fibers: Effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 205, n. 17, p. 2327–2338, 2004.

MOBINI, Sahba *et al.* Recent advances in strategies for peripheral nerve tissue engineering. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, Elsevier Ltd, v. 4, p. 134–142, 2017.

MOUČKA, Robert; MRAVČÁKOVÁ, Miroslava; VILČÁKOVÁ, Jarmila; OMASTOVÁ, Mária; SÁHA, Petr. Electromagnetic absorption efficiency of polypropylene/montmorillonite/polypyrrole nanocomposites. **Materials and Design**, v. 32, n. 4, p. 2006–2011, 2011. ISSN 02641275.

NUNE, Manasa; KRISHNAN, Uma Maheswari; SETHURAMAN, Swaminathan. PLGA nanofibers blended with designer self-assembling peptides for peripheral neural regeneration. **Materials Science and Engineering C**, Elsevier B.V., v. 62, p. 329–337, 2016.

OPRYCH, Karen M.; WHITBY, Raymond L.D.; MIKHALOVSKY, Sergey V.; TOMLINS, Paul; ADU, Jimi. Repairing Peripheral Nerves: Is there a Role for Carbon Nanotubes? **Advanced Healthcare Materials**, v. 5, n. 11, p. 1253–1271, 2016.

PALZA, Humberto; ZAPATA, Paula Andrea; ANGULO-PINEDA, Carolina. Electroactive smart polymers for biomedical applications. **Materials**, v. 12, n. 2, 2019.

PANSERI, Silvia; CUNHA, Carla; LOWERY, Joseph; DEL CARRO, Ubaldo; TARABALLI, Francesca; AMADIO, Stefano; VESCOVI, Angelo; GELAIN, Fabrizio. Electrospun micro- and nanofiber tubes for functional nervous regeneration in sciatic nerve transections. **BMC Biotechnology**, v. 8, p. 1–12, 2008.

QUAN, Qi *et al.* Aligned fibers enhance nerve guide conduits when bridging peripheral nerve defects focused on early repair stage. **Neural Regeneration Research**, v. 14, n. 5, p. 903–912, 2019.

RAMOA, Sílvia D.A.S.; BARRA, Guilherme M.O.; MERLINI, Claudia; LIVI, Sébastien; SOARES, Bluma G.; PEGORETTI, Alessandro. Electromagnetic interference shielding effectiveness and microwave absorption properties of thermoplastic polyurethane/montmorillonite-polypyrrole nanocomposites. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 29, n. 5, p. 1377–1384, 2018. ISSN 10991581.

RAPHEY, V. R.; HENNA, T. K.; NIVITHA, K. P.; MUFEEDHA, P.; SABU, Chinnu; PRAMOD, K. Advanced biomedical applications of carbon nanotube. **Materials Science and Engineering C**, Elsevier, v. 100, July 2018, p. 616–630, 2019.

S.H. CHO, K.T. Song; LEE, J.Y. Recent advances in polypyrrole. *In*: IN Handbook of Conducting Polymers. [S.l.]: Skotheim e J.R. Reynolds, 2010. P. 1009.

SANTOS, Franciele Pereira dos *et al.* Poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) Scaffold Induces Short-term Nerve Regeneration and Functional Recovery Following Sciatic Nerve Transection in Rats. **Neuroscience**, v. 396, p. 94–107, 2019.

SANTOS, Vivian Ines dos; MERLINI, Claudia; ARAGONES, Aguedo; CESCO, Karina; FREDEL, Marcio Celso. In vitro evaluation of bilayer membranes of PLGA/hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate for guided bone regeneration. **Materials Science and Engineering C**, Elsevier, v. 112, March, p. 110849, 2020.

SCHIEFFERDECKER, Vinicius de M.; BARRA, Guilherme M.O.; RAMÔA, Silvia D.A.S.; MERLINI, Claudia. Comparative Study of the Structure and Properties of Poly(Vinylidene Fluoride)/Montmorillonite-Polypyrrole Nanocomposites Prepared by Electrospinning and Solution Casting. **Frontiers in Materials**, v. 6, August, p. 1–12, 2019.

SHAFEI, Sajjad; FOROUGHI, Javad; STEVENS, Leo; WONG, Cynthia S.; ZABIHI, Omid; NAEBE, Minoo. Electroactive nanostructured scaffold produced by controlled deposition of PPy on electrospun PCL fibres. **Research on Chemical Intermediates**, Springer Netherlands, v. 43, n. 2, p. 1235–1251, 2017.

SHI, Dejin *et al.* Electrospun nanofibers immobilized with collagen for neural stem cells culture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 19, n. 2, p. 847–854, 2007.

SHIN, Richard H. *et al.* Treatment of a segmental nerve defect in the rat with use of bioabsorbable synthetic nerve conduits: A comparison of commercially available

conduits. **Journal of Bone and Joint Surgery - Series A**, v. 91, n. 9, p. 2194–2204, 2009.

SHRESTHA, Bishnu Kumar *et al.* Electrodeless coating polypyrrole on chitosan grafted polyurethane with functionalized multiwall carbon nanotubes electrospun scaffold for nerve tissue engineering. **Carbon**, Elsevier Ltd, v. 136, p. 430–443, 2018.

SHRESTHA, Sita; SHRESTHA, Bishnu Kumar; LEE, Joshua; JOONG, Oh Kwang; KIM, Beom Su; PARK, Chan Hee; KIM, Cheol Sang. A conducting neural interface of polyurethane/silk-functionalized multiwall carbon nanotubes with enhanced mechanical strength for neuroregeneration. **Materials Science and Engineering C**, Elsevier, v. 102, March, p. 511–523, 2019.

SILL, Travis J.; RECUM, Horst A. von. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, n. 13, p. 1989–2006, 2008.

SILVA, Marcela Fernandes; HECHENLEITNER, Ana Adelina Winkler; IRACHE, Juan Manuel; DE OLIVEIRA, Adilson Jesus Aparecido; PINEDA, Edgardo Alfonso Gómez. Study of thermal degradation of PLGA, PLGA nanospheres and PLGA/maghemite superparamagnetic nanospheres. v. 18, p. 1400–1406, 2015.

SONG, Jialin *et al.* Polymerizing Pyrrole Coated Poly (l-lactic acid-co- ϵ -caprolactone) (PLCL) Conductive Nanofibrous Conduit Combined with Electric Stimulation for Long-Range Peripheral Nerve Regeneration. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 9, November, p. 1–13, 2016.

STACHEWICZ, Urszula *et al.* 3D imaging of cell interactions with electrospun PLGA nanofiber membranes for bone regeneration. *Acta Materialia Inc.*, v. 27, p. 88–100, 2015.

SUDWILAI, Thitima; NG, Jun Jye; BOONKRAI, Chatikorn; ISRASENA, Nipan; CHUANGCHOTE, Surawut; SUPAPHOL, Pitt. Polypyrrole-coated electrospun poly(lactic acid) fibrous scaffold: Effects of coating on electrical conductivity and neural cell growth. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, Taylor & Francis, v. 25, n. 12, p. 1240–1252, 2014.

- SUN, Binbin *et al.* Polypyrrole-coated poly(l-lactic acid-co- ϵ -caprolactone)/silk fibroin nanofibrous nerve guidance conduit induced nerve regeneration in rat. **Materials Science and Engineering: C**, Elsevier, v. 94, August 2018, p. 190–199, 2018.
- TAN, Aaron; RAJADAS, Jayakumar; SEIFALIAN, Alexander M. Biochemical engineering nerve conduits using peptide amphiphiles. **Journal of Controlled Release**, Elsevier B.V., v. 163, n. 3, p. 342–352, 2012.
- TÎLMACIU, Carmen Mihaela; MORRIS, May. Carbon nanotube biosensor. **Frontiers in Chemistry**, v. 3, p. 1–21, 2015.
- TUTUROV, Alexander O. The role of peripheral nerve surgery in a tissue reinnervation. **Chinese Neurosurgical Journal**, Chinese Neurosurgical Journal, p. 1–5, 2019.
- VAREJÃO, Artur S.P. *et al.* Toe out angle: A functional index for the evaluation of sciatic nerve recovery in the rat model. **Experimental Neurology**, v. 183, p. 695–699, 2003.
- WANG, Chun Yang; ZHANG, Kui Hua; FAN, Cun Yi; MO, Xiu Mei; RUAN, Hong Jiang; LI, Feng Feng. Aligned natural-synthetic polyblend nanofibers for peripheral nerve regeneration. **Acta Biomaterialia**, Acta Materialia Inc., v. 7, n. 2, p. 634–643, 2011.
- WANG, Jing *et al.* The cellular response of nerve cells on poly-L-lysine coated PLGA-MWCNTs aligned nanofibers under electrical stimulation. **Materials Science and Engineering C**, Elsevier, v. 91, p. 715–726, 2018.
- WRIGHT, Randall. **Radiculopathy and degenerative spine disease**. Sixth Edit. [S./]: Elsevier, 2016. P. 95–102.
- XU, Haixing *et al.* Conductive PPY/PDLLA conduit for peripheral nerve regeneration. **Biomaterials**, Elsevier Ltd, v. 35, n. 1, p. 225–235, 2014.
- YU, Wenwen; ZHAO, Wen; ZHU, Chao; ZHANG, Xiuli; YE, Dongxia; ZHANG, Wenjie; ZHOU, Yong; JIANG, Xinquan; ZHANG, Zhiyuan. Sciatic nerve regeneration in rats by a promising electrospun collagen/poly(ϵ -caprolactone) nerve conduit with tailored degradation rate. **BMC Neuroscience**, v. 12, 2011.
- ZHAN, Jianchao; LIU, Junyi; WANG, Chunyang; FAN, Cunyi; EI-HAMSHARY, Hany A.; AL-DEYAB, Salem S.; MO, Xiumei. Electrospun silk fibroin-poly (lactic-co-glycolic acid)

membrane for nerve tissue engineering. **Journal of Bioactive and Compatible Polymers**, v. 31, n. 2, p. 208–224, 2016.

ZHANG, Kuihua; WANG, Hongsheng; HUANG, Chen; SU, Yan; MO, Xiumei; IKADA, Yoshito. Fabrication of silk fibroin blended P(LLA-CL) nanofibrous scaffolds for tissue engineering. **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, v. 93, n. 3, p. 984–993, 2010.

ZHOU, Xingxing; YANG, Anneng; HUANG, Zhongbing; YIN, Guangfu; PU, Ximing; JIN, Juan. Enhancement of neurite adhesion, alignment and elongation on conductive polypyrrole-poly(lactide acid) fibers with cell-derived extracellular matrix. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 149, p. 217–225, 2017.

ZOCHODNE, Douglas W. **Neurobiology of Peripheral Nerve Regeneration**. [S.l.: s.n.], 2008. P. 276.

ZOU, Yuanwen; QIN, Jiabang; HUANG, Zhongbing; YIN, Guangfu; PU, Ximing; HE, Da. Fabrication of Aligned Conducting PPy-PLLA Fiber Films and Their Electrically Controlled Guidance and Orientation for Neurites. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, p. 12576–12582, 2016.