



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

**PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA E PLGA COM  
POLIPIRROL PARA APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO NERVOSA**

**FABIANA DIAS PILAR**

LICENCIADA EM QUÍMICA E QUÍMICA INDUSTRIAL

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

**Porto Alegre**

**Agosto, 2014**



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

FACULDADE DE ENGENHARIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS

# **PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA E PLGA COM POLIPIRROL PARA APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO NERVOSA**

**FABIANA DIAS PILAR**

LICENCIADA EM QUÍMICA E QUÍMICA INDUSTRIAL

ORIENTADORA: PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. NARA REGINA DE SOUZA BASSO.

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO MEURER PAPALÉO.

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

**Porto Alegre  
Agosto, 2014**



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

## PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA E PLGA COM POLIPIRROL PARA APLICAÇÃO NA REGENERAÇÃO NERVOSA

**CANDIDATA: FABIANA DIAS PILAR**

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

  
DRA. NARA REGINA DE SOUZA BASSO - ORIENTADORA

  
DR. RICARDO MEURER PAPALEO - CO-ORIENTADOR

### BANCA EXAMINADORA

  
DRA. ADRIANA CURI AIUB CASAGRANDE - DO INSTITUTO DE QUÍMICA - UFRGS

  
DR. ADRIANO FRIEDRICH FEIL - DO PGETEMA/FENG - PUCRS

**PUCRS**

Campus Central  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 30 - Sala 103 - CEP: 90619-900  
Telefone: (51) 3353.4059 - Fax: (51) 3320.3625  
E-mail: engenharia.pg.materials@pucrs.br  
www.pucrs.br/feng

*“Cada pessoa deve trabalhar para o seu aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, participar da responsabilidade coletiva por toda a humanidade.”*

*(Marie Curie)*

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este mestrado à minha mãe, Ana Laure Dias Pilar, pela compreensão e apoio. Dedico também à minha família e amigos que entenderam a minha ausência em momentos importantes.

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Ana Laure Dias Pilar pela compreensão, companheirismo e pela motivação que sempre me deu forças para seguir nesta caminhada.

À minha orientadora Doutora Nara Regina de Souza Basso e ao meu co-orientador Doutor Ricardo M. Papaléo pelas essenciais e valorosas contribuições na execução deste trabalho.

Ao Professor Maurivan Güntzel Ramos por ter acreditado em mim desde o início da minha trajetória acadêmica. Agradeço pelo exemplo de profissional, de amigo e de ser humano que utilizarei como modelo em minha vida.

À Doutora Marlise A. Dos Santos por conceder materiais utilizados ao longo desta pesquisa.

À Mestra Manoela A. Prado, pelo constante incentivo e apoio durante os momentos mais difíceis desde a graduação, pela amizade e pelas muitas risadas durante todos estes anos de convivência.

À Mestra Cristhiane A. Valente pelo companheirismo, apoio e amizade durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus colegas de laboratório, em especial a Thuany Maraschini, Lucas weber, Giovanna Garcez, Gabrielly Carrão, Leonardo Moreira dos Santos, Wesley Formentin e Guilherme Dias.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de bolsa.

## SUMÁRIO

<b>DEDICATÓRIA</b> .....	<b>5</b>
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>6</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>7</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>9</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>12</b>
<b>LISTA DE SÍMBOLOS</b> .....	<b>13</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>15</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>16</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
2.1. Objetivos Específicos .....	<b>20</b>
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>21</b>
3.1. Nervos Periféricos.....	<b>21</b>
3.2. Quitosana.....	<b>23</b>
3.2.1. Quitosana na Engenharia de tecidos .....	<b>25</b>
3.3. PLGA - Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) .....	<b>28</b>
3.3.1. O PLGA aplicado à regeneração nervosa.....	<b>29</b>
3.3.2. Blendas e revestimentos de PLGA e QT.....	<b>30</b>
3.4. Polímeros condutores nanoestruturados .....	<b>31</b>
3.4.1. Polipirrol .....	<b>32</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>35</b>
4.1. Materiais.....	<b>35</b>
4.2. Métodos.....	<b>36</b>
4.2.1. Síntese do polipirrol .....	<b>36</b>
4.2.2 Preparação de filmes de quitosana em camadas com PLGA.....	<b>37</b>
4.2.3. Ensaio de degradação hidrolítica.....	<b>42</b>
4.3. Técnicas de Caracterização .....	<b>43</b>

4.3.1. Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	43
4.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	44
4.3.3. Análises Termogravimétricas (TGA) .....	44
4.3.4. Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE) .....	45
4.3.5. Eletrômetro.....	46
4.3.6. Microscopia de Força Atômica (AFM) .....	46
4.3.7. Microtomografia Computadorizada (Micro CT) de Raios X.....	46
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>47</b>
5.1. Preparação e Caracterização das nanofibras de PPy.....	47
5.2. Preparação dos filmes de quitosana, PLGA e compósitos .....	50
5.3. Ensaios de Degradação.....	58
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>75</b>
<b>7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>77</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>
<b>9. ANEXO A.....</b>	<b>92</b>
<b>10. ANEXO B .....</b>	<b>93</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Anatomia interna de um nervo periférico .....	21
Figura 3.2. Processo de regeneração nervosa .....	22
Figura 3.3. Representações da estrutura primárias da quitosana.....	23
Figura 3.4. Mecanismo da degradação da quitosana .....	25
Figura 3.5. Estrutura química do PLGA .....	28
Figura 3.6. Hidrólise da ligação Ester do PLGA.....	29
Figura 3.7. Estrutura química do polipirrol.....	32
Figura 4.1. Organograma da síntese do polipirrol.....	37
Figura 4.2. Reação <i>in situ</i> do PPy.....	40
Figura 4.3. Organograma dos sistemas poliméricos preparados.....	41
Figura 4.4. Etapas da preparação da amostra para a degradação.....	42
Figura 5.1: Imagem de MEV das nanofibras de PPy (5.000X).....	47
Figura 5.2. Espectro de FTIR das fibras de PPy.....	48
Figura 5.3. Termograma do PPy.....	49
Figura 5.4. Aspecto dos filmes confeccionados.....	51
Figura 5.5. Microscopia dos filmes de quitosana (10.000x): (A) Filme QT EM 02; (B) Filme QT EM 02 – PPy; (C) QT EM 04; (D) QT EM 04 – PPy; (E) QT EM 06; (F) QT EM 06-PPy.....	52
Figura 5.6. Imagem de MEV dos filmes de PLGA e PLGA – PPy (10.000x): (A) PLGA; (B) PLGA – PPy.....	53
Figura 5.7. Imagem de MEV do filme QT EM – PPy <i>in situ</i> (5.000x): (A) Filme QT EM – PPy <i>in situ</i> ; (B) Aglomerado de PPy recuperado na lavagem .....	54

- Figura 5.8. Imagem de MEV do filme PLGA – PPy *in situ*: (A) superfície do PLGA (15.000x); (B) nanofibras de PPy (10.000x).....55
- Figura 5.9. DTGA dos sistemas poliméricos. ....56
- Figura 5.10. Termograma dos sistemas poliméricos.....57
- Figura 5.11. Gráfico do comportamento de perda de massa.....59
- Figura 5.12. Filme de quitosana pura (QT EM 04) após 21 dias de degradação (2.000x). ....61
- Figura 5.13. Filme QT QT/ QT – PPy/ QT.....62
- Figura 5.14. Reação *in situ*. (A) Aspecto do filme durante a Reação. (B) aspecto final do filme.....63
- Figura 5.15. Imagens de MEV da superfície de filmes de quitosana (10.000x): (A) QT EM 02 antes da degradação; (B) QT EM 02 depois de 21 dias de degradação; (C) QT EM 02, 35 dias da degradação; (D) QT EM 04 antes da degradação; (E) QT EM 04 depois de 21 dias da degradação e (F) QT EM 04 35 dias de degradação. ....64
- Figura 5.16. Imagens de MEV do Filme QT EM 02 – PPy (10.000x): (A) QT EM 02 - PPy antes da degradação; (B) QT EM 02 - PPy 35 dias de degradação.65
- Figura 5.17. imagens de MEV do Filme QT EM 04 – PPy, (10.000x): (A) QT EM 04 - PPy antes da degradação; (B) QT EM 04 - PPy 21 dias de degradação; (C) QT EM 04 - PPy 35 dias de degradação.....66
- Figura 5.18. Imagens de MEV de Filmes de QT antes e após a degradação (10.000x): (A) QT EM 06 antes da degradação; (B) QT EM 06 35 dias de degradação; (C) QT EM 06 - PPy antes da degradação; (D) QT EM 06 - PPy 35 dias de degradação. ....66
- Figura 5.19. Filme QT BM 02 (10.000x). (A) QT BM 02 antes da degradação; (B) QT BM 02 depois de 35 dias de degradação;.....67
- Figura 5.20. Imagens de MEV do filme de PLGA (10.000x): (A) PLGA antes da degradação; (B) PLGA após 35 dias de degradação. (C) PLGA – PPy antes da degradação; (D) PLGA – PPy após 28 dias de degradação. ..68
- Figura 5.21. Espectro de IV dos filmes PLGA, PLGA após 35 dias de degradação e e PLGA- PPy após 35 dias da degradação. ....69

- Figura 5.22. Formato de uma amostra de QT EM 02 – PPy após a degradação. ...71
- Figura 5.23. Imagem de MEV de uma amostra de QT EM 02 – PPy após a degradação. ....71
- Figura 5.24. Imagens de AFM do filme de PLGA- PPy antes da degradação: (A) imagem em 2D; (B) imagens em 3D.....72
- Figura 5.25. Imagens de AFM do PLGA- PPy após 35 dias da degradação: (A) imagem em 2D; (B) Imagem em 3D.....73
- Figura 5.26. Imagem gerada por MicroCT de Raio X da Amostra de PLGA-PPy degradada ao longo de 35 dias.....73
- Figura 5.27. Imagem da porosidade do PLGA-PPy degradado durante 35 gerada pelo MicroCT de Raio x.....74

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 Reagentes utilizados .....	35
Tabela 5.2. Espessuras dos sistemas poliméricos .....	70

## LISTA DE SÍMBOLOS

ADBS	Ácido dodecilbenzenosulfônico
AFM	Microscopia de Força Atômica
APTS	Ácido p-toluenosulfônico monohidratado
ATR	Refletância Total Atenuada
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EIE	Espectroscopia de Impedância Elétrica
FDA	Food and Drug Administration
FK506	Tacrolimus
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GD	Grau de Desacetilação
HCl	Ácido clorídrico
ITT FUSE	Instituto Tecnológico em Ensaios e Segurança Funcional
KBr	Brometo de potássio
LabCEMM	Laboratório Central de Microscopia e Microanálise
LAMAT	Laboratório Multiusuário de Análise Térmica
LOR	Laboratório de Organometálicos
MDE	Medidor Digital de Espessura
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura

Micro CT	Microtomografia Computadorizada de Raios X
NaOH	Hidróxido de sódio
PBS	Solução tampão fosfato salino
PC	Polímero Condutor
PGA	Poli (ácido glicólico)
pH	Potencial de hidrogênio
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PPy	Polipirrol
QT	Quitosana
S/cm	Siemens/cm (condutividade)
TGA	Análise termogravimétrica

## RESUMO

DIAS PILAR, Fabiana. **Preparação de filmes de quitosana e PLGA com polipirrol para aplicação na regeneração nervosa.** Porto Alegre. 2014. Dissertação. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL.

A finalidade desta pesquisa foi preparar filmes biocompatíveis e reabsorvíveis de compósitos poliméricos de quitosana (QT) e poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) com nanofibras de polipirrol (PPy) para aplicação na regeneração de nervos periféricos. Os filmes de QT e PLGA foram preparados pelo método de evaporação do solvente e a polimerização do PPy foi realizada via polimerização química oxidativa usando APTS como agente dopante. Com o intuito de verificar o tempo de degradação dos filmes, foram realizados ensaios de degradação *in vitro*. As nanofibras de PPy e os filmes produzidos foram caracterizados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (ATR/FT-IR), Análise termogravimétrica (TGA), Microscopia de Força Atômica (AFM), Microtomografia Computadorizada de Raios X (Micro CT), Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE) e Eletrometro. As nanofibras de PPy sintetizadas apresentaram uma condutividade  $8 \times 10^{-4}$  S/cm e o filme de PLGA-PPy apresentou uma condutividade de  $1 \times 10^{-7}$  S/cm. A adição das nanofibras de PPy acelerou a degradação dos filmes compósitos em relação a matriz e modificou significativamente a morfologia dos filmes de PLGA e QT formando arcabouços que podem vir a favorecer a regeneração nervosa.

Palavras-Chaves: quitosana; nanofibras de polipirrol; nervos periféricos; PLGA.

## ABSTRACT

DIAS PILAR, Fabiana. **Preparation of PLGA and chitosan films with polypyrrole for application in nerve regeneration.** Porto Alegre. 2014. Master Thesis. Graduation Program in Materials Engineering and Technology, PONTIFICAL CATHOLIC UNIVERSITY OF RIO GRANDE DO SUL.

The purpose of this research was to prepare biocompatible and absorbable polymeric composites films of chitosan and PLGA with PPy nanofibers for application in peripheral nerve regeneration. The QT and PLGA films were prepared by solvent evaporation technique and PPy was synthesized by chemical oxidative polymerization using PTSA as dopant agent. In order to check the degradation time of the films, were performed a in vitro degradation tests. The nanofibers and PPy films produced were characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM), Infrared Spectroscopy Fourier Transform (ATR / FT-IR), Thermal Gravimetric Analysis (TGA), Atomic Force Microscopy (AFM), X-ray Computed Microtomography ( $\mu$ CT), Electrical Impedance Spectroscopy (EIS) and Electrometer. The PPy nanofibers synthesized showed a conductivity of  $8 \times 10^{-4}$  S/cm and the PLGA - PPy film produced showed a conductivity of  $1 \times 10^{-7}$  S/cm. The addition of PPy nanofibers accelerated the degradation of the composite films when compared to the array and significantly changed the morphology of the films of PLGA and QT, forming frameworks that may promote nerve regeneration.

Key-words: chitosan ; polypyrrole nanofibers ; peripheral nerves e PLGA.



## 1. INTRODUÇÃO

A recuperação funcional de nervos periféricos lesionados é uma das tarefas mais difíceis na neurocirurgia. Os nervos periféricos são extensões do Sistema Nervoso Central e os mesmos são responsáveis pelas conexões com as terminações nervosas das extremidades, em suas funções sensitiva e motora [1, 2, 3]. São suscetíveis a traumas como: contusão; compressão; esmagamento; estiramento; avulsão e laceração [2]. A interrupção da continuidade da estrutura do nervo, por algum tipo de trauma, resulta na parada de transmissão dos impulsos nervosos e na desorganização de suas atividades funcionais com consequente perda parcial ou total das funções motoras, sensoriais e funções autonômas do segmento do corpo humano [1].

O método mais utilizado atualmente na regeneração nervosa é o enxerto de nervo autólogo (do próprio organismo) o qual ainda apresenta desvantagens como um rendimento insuficiente de transplantes, morbidade no local doador e um diâmetro inadequado de nervos doadores [4]. Uma alternativa ao enxerto autógeno do nervo é o desenvolvimento de tubos artificiais que servem como um guia para o crescimento do nervo.

Nos últimos anos um número crescente de artigos de pesquisa relata a utilização de tubos artificiais para reparar defeitos nos nervos periféricos. O desenvolvimento de um tubo artificial como guia para a regeneração de nervos é uma alternativa aos enxertos autógenos. Este método é atualmente foco de interesse para a reparação de nervos periféricos.

Um material em formato de tubo é importante porque impede a formação de tecido fibroso no corte do nervo e funciona como um guia para que o nervo cresça e a regeneração ocorra ordenadamente. Quando este dispositivo é fabricado de um material biorreabsorvível, após o nervo ser reparado, o tubo que é absorvível degrada-se e os produtos degradados são eliminados pelo corpo por rotas metabólicas. A vantagem neste método é evitar um segundo procedimento cirúrgico para remover o tubo implantado [5].

Pesquisas na área de entrega controlada de fármacos têm apresentado grandes benefícios para os pacientes, tais como a melhoria do efeito terapêutico, toxicidade reduzida e efeitos colaterais reduzidos. Um exemplo é a grande quantidade de materiais poliméricos em nano escala que estão sendo testados na pesquisa de sistema de liberação controlada de fármacos [5, 6].

Nesta área, surgem os polímeros condutores (PCs) que chamam a atenção para potencial utilização no campo biomédico, pois são capazes de auxiliarem o deslocamento de sinais elétricos para os locais de destino (orgão-alvo) e podem, simultaneamente, fornecer suporte físico para o crescimento celular [7, 8]. A unidade funcional do nervo periférico é o neurônio, neste caso os polímeros condutores podem acelerar a regeneração nervosa conduzindo sinais elétricos ao longo da região a ser reparada, auxiliando o crescimento da fibra nervosa de uma extremidade a outra [8].

O polímero condutor polipirrol (PPy) vem sendo estudado no campo da medicina, em particular na área da engenharia de tecidos aplicada à regeneração de células neurais devido a sua biocompatibilidade e por ser um material de fácil síntese [9, 10]. A obtenção de PPy na morfologia fibrilar é importante porque os tecidos humanos são organizados em forma de fibras. Para a aplicação do PPy na regeneração nervosa é necessário uma matriz polimérica biocompatível [8]. Assim, materiais poliméricos como o PLGA – poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) - e a

Quitosana (QT) na forma de filmes compósitos com o PPy são fortes candidatos para a aplicação em regeneração nervosa.

Inúmeras pesquisas em busca de métodos avançados em regeneração nervosa vêm sendo realizadas com materiais poliméricos, principalmente com o biopolímero PLGA. O PLGA é um polímero sintético biocompatível produzido por policondensação ou por polimerização de abertura de anel, processos que tornam o PLGA uma matéria prima muito cara. Em alternativa ao PLGA, há a quitosana que é um material biocompatível, renovável, pois é proveniente de resíduos de crustáceos, portanto mais barato e de fácil acesso que o PLGA. Assim, torna-se justificável testar a quitosana como um material que seja aplicado na regeneração nervosa [11, 12].

A quitosana é um biomaterial potencial para a aplicação na regeneração nervosa, pode ser facilmente confeccionada em forma de tubos, devido às suas propriedades de formação de filme. Tubos de quitosana expandidos em soluções aquosas apresentam grande elasticidade e proporcionam um bom suporte mecânico para a regeneração do nervo. Além disso, os produtos da degradação da quitosana são atóxicos [13].

O presente trabalho tem como objetivo preparar sistemas poliméricos baseados em polímeros biodegradáveis (PLGA e Quitosana) e condutores (PPy) capazes de atuarem como condutos artificiais para regeneração nervosa.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo desta pesquisa é preparar compósitos poliméricos de quitosana (QT) e poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) - (PLGA) com nanofibras de polipirrol (PPy) e avaliar o processo de degradação desses sistemas poliméricos.

### **2.1. Objetivos Específicos**

Sintetizar nanofibras de PPy via polimerização química oxidativa;

Preparar filmes de QT e PLGA com e sem a adição de nanofibras de PPy;

Caracterizar a morfologia, a estrutura e as propriedades térmicas dos filmes;

Realizar o estudo de degradação *in vitro* dos filmes e compósitos preparados.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Nervos Periféricos

O Nervo periférico consiste num feixe de fibras nervosas de diferentes tamanhos. A Figura 3.1. ilustra um desenho esquemático da anatomia interna de um nervo periférico, formado pelo conjunto de fibras nervosas envoltas por tecido conjuntivo.



Figura 3.1. Anatomia interna de um nervo periférico (adaptado de 2).

Um trauma pode provocar lesões nas fibras nervosas. Cada fibra é completamente envolvida por um tecido conjuntivo elástico e resistente que protege as fibras nervosas de traumas mecânicos. Após o nervo sofrer um trauma, ocorre o processo degenerativo em alguns milímetros próximo ao local da lesão.

A Figura 3.2. mostra um nervo lesionado. Durante a regeneração, às células de Schwann em desenvolvimento formam as bandas de Büngner que são condutos longitudinais internos das célula de Schwann que estão em crescimento. As células de Schwann são células que envolvem os axônios dos neurônios dentro dos nervos periféricos. Se o local não sofrer uma intervenção cirúrgica, as células do tecido endotelial, ou seja, células externas ao nervo irão fagocitar as células nervosas, dificultando a regeneração.

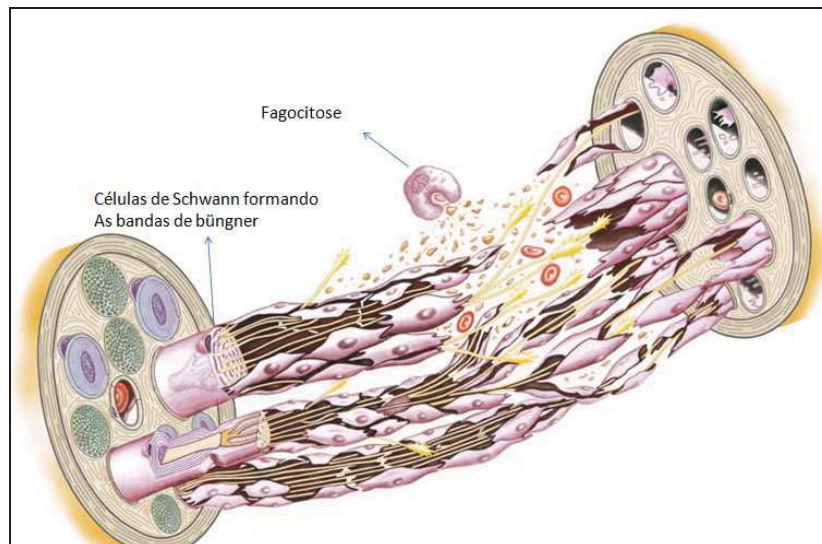


Figura 3.2. Processo de regeneração nervosa (adaptado de 2).

Sem um invólucro, ocorrerá o crescimento desordenado do nervo, formando neuromas, que são regiões com alta densidade de ramificações nervosas que causarão dor ao paciente.

Um enxerto tubular juntamente com uma estrutura fibrilar é importante devido às semelhanças aos tecidos biológicos naturais, e essa semelhança pode vir a favorecer o tratamento e a aceitação do material pelo organismo [14, 15].

Experimentos em animais demonstram que ocorre um crescimento axonal de 2,0 a 4,5 mm/dia. Em humanos, a taxa de crescimento axonal não é linear, estima-se que a taxa de crescimento seja de aproximadamente 1 a 2 mm/dia [16].

### 3.2. Quitosana

A quitosana é um polímero fascinante para inúmeras aplicações devido as suas propriedades que são de extrema importância no desenvolvimento de biomateriais: polímero catiônico, atóxico, biocompatível, biodegradável e renovável [17]. A importância química e bioquímica está fortemente relacionada com os grupos amina distribuídos regularmente através da sua cadeia molecular, os quais permitem personalizar a sua funcionalidade [18]. Assim, a quitosana têm sido o foco de um grande número de estudos que relataram suas potenciais aplicações nas áreas médicas, regeneração de nervos, ossos, cartilagens, curativos epidérmicos, terapias gênicas, entrega de fármacos, tratamento de águas, produção de cosméticos, aditivos alimentícios, membranas semipermeáveis e desenvolvimento de biomateriais [17, 18, 19, 20, 21].

A quitosana é um polímero natural obtido pela desacetilação da quitina em meio alcalino. A quitina é o principal constituinte do exoesqueleto de crustáceos e insetos, material bastante abundante na natureza. As unidades monoméricas que as compõem são representadas na Figura 3.3.

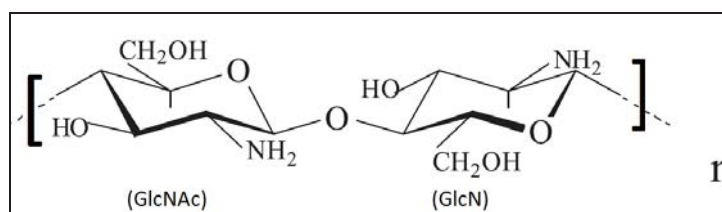


Figura 3.3. Representações da estrutura primárias da quitosana, onde n é o grau de polimerização (adaptado de 22).

A quitosana é um polissacarídeo composto das unidades monoméricas 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcNAc) e 2-amino-2-desoxi-D-glicopiranosose (GlcN) [18, 20, 22].

O tratamento da quitina com uma solução aquosa 40-45% (m/v) de hidróxido de sódio (NaOH) a uma temperatura de 90-120°C durante 4-5h resulta na desacetilação da quitina. As condições utilizadas para a desacetilação determinam o peso molecular do polímero e o grau de desacetilação (GD) da quitosana, que representa a porcentagem de grupos NH<sub>2</sub> livres. Quando GD da quitina alcança aproximadamente 50%, o polímero torna-se solúvel em soluções aquosas de ácidos fracos e passa a ser intitulado de quitosana. Todavia, a solubilidade da quitosana também depende de outros parâmetros como peso molecular e concentração do ácido utilizado [23]. A massa molecular da quitosana varia de 100.000g/mol a 1.000.000 g/mol. As classificações quanto à massa são: Baixa Massa Molecular (100.000g/mol); Média Massa Molecular (500.000 g/mol) e Elevado Peso Molecular (1.000.000 g/mol) [24].

A grande vantagem da quitosana está relacionada à presença dos grupos amino, pois estes permitem que este biopolímero facilmente se dissolva em soluções de ácidos fracos diluídos, devido à protonação, sendo o ácido acético o solvente mais empregado [19]. Quanto maior a quantidade destes grupos, maior a repulsão eletrostática entre as cadeias e também maior a solvatação em água [18, 19, 25]. Estes grupos, em alta quantidade distribuídos na matriz polimérica facilitam inúmeras modificações químicas, como exemplo: imobilização de agentes quelantes, quaternização, carboxilação, acilação, sulfonação, amidação, formação de complexo polieletrólítico, entre outros. A quitosana também apresenta uma alta hidrofiliabilidade, devida ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica [18, 19, 21, 25]. A Figura 3.4. mostra o mecanismo da degradação sofrida pela quitosana durante a hidrólise.



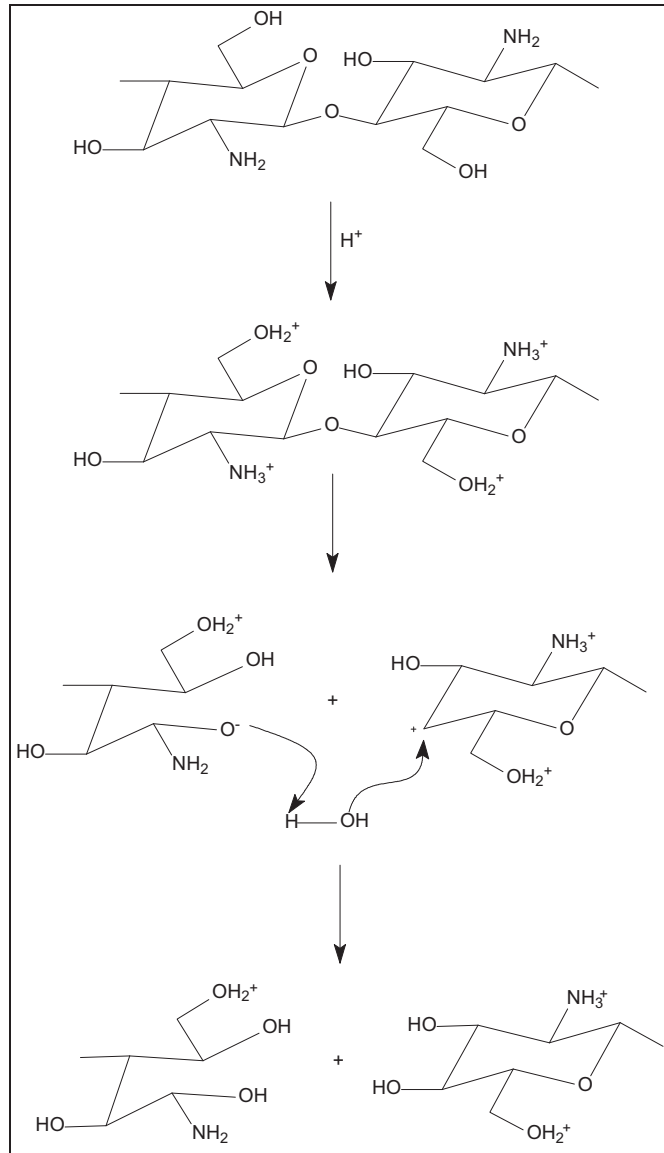


Figura 3.4. Mecanismo da degradação da quitosana (adaptado de 26).

Durante a degradação, ocorre a quebra das ligações entre os anéis glicosídicos, resultando na separação dos monômeros.

### 3.2.1. Quitosana na Engenharia de tecidos

Membranas finas e flexíveis de quitosana estão sendo testadas em tratamentos de queimaduras e mostram-se eficientes quando comparadas à gaze no tratamento de feridas. Curativos de quitosana contendo fármacos já foram

testados em seres humanos, e apresentaram bons resultados no controle de infecções e reduziram o tempo de cicatrização de feridas. A quitosana possui uma estrutura que favorece o crescimento celular, a organização dos tecidos e o fornecimento de proteínas para a cicatrização. A quitosana atua como barreira contra agentes infecciosos, minimiza a deformação cutânea, além de estimular a coagulação sanguínea natural. Esse biopolímero absorve os fluidos provenientes da ferida e bloqueia as terminações nervosas, reduzindo a dor [27].

A quitosana também é utilizada combinada com outros polímeros biocompatíveis como PLGA. O PLGA é um polímero sintético conhecido por ter excelente biocompatibilidade e elasticidade [28]. Pesquisas relatam a preparação de membranas mistas de QT/PLGA, às quais são criadas por meio de eletrofiação onde nanofibras são geradas através da aplicação de um campo elétrico em uma solução polimérica, para a potencial utilização na liberação controlada de fármacos. Essas fibras também são utilizadas na construção de vasos sanguíneos artificiais [28, 29, 30]. As nanofibras formadas por meio de eletrofiação formam uma superfície que apresenta uma elevada área superficial, de alta porosidade, e estrutura reticular tridimensional, a qual é semelhante ao tecido natural da matriz extracelular, podendo aumentar a adesão, e conseqüentemente a proliferação celular [30, 31]. Nos últimos anos, os sistemas de liberação controlada de fármacos apresentaram grandes benefícios para os pacientes, como: melhoria do efeito terapêutico, toxicidade reduzida, diminuição da dose do fármaco e redução dos efeitos colaterais [29]. A quitosana também vem ganhando destaque na área vascular devido à sua semelhança estrutural com os glicosaminoglicanos, que são os principais componentes da matriz extracelular do tecido vascular [32, 33].

Dentro da área da engenharia de tecidos, estudos indicam que as propriedades biológicas úteis da quitosana como aumento da cicatrização de feridas e o efeito antibacteriano são favoráveis para a confecção de tubos guias para o crescimento de nervos. Estudos indicam que tubos de quitosana implantado em ratos não produziram inflamação nos animais e promoveram a regeneração do tecido ao longo da parede do tubo, do início ao fim [34].

Estudos em ratos indicam que a incorporação do fármaco FK506 (tacrolimus), durante a fabricação dos tubos de quitosana semipermeáveis, resulta em um efeito eficaz e favorável à resposta inflamatória mínima. Além de favorecer uma reinervação mais rápida gerando fibras mielínicas que apresentaram um perfil morfométrico mais maduro em oito semanas [35]. O Fármaco FK506 pertence a um grupo de antibióticos com potente atividade imunossupressora aprovada pelo FDA. É amplamente utilizado para a prevenção da rejeição do enxerto após o transplante de órgãos, e representou um importante avanço no controle de receptores de órgãos [35,36].

Na área de alimentos a quitosana também é um polímero muito utilizado devido a sua propriedade bactericida natural. O crescimento microbiano na superfície dos alimentos é a causa principal da deterioração dos mesmos. Tem ocorrido uma evolução notável nos últimos anos nas embalagens de filmes poliméricos incorporados com agentes antimicrobianos para a melhoria da conservação dos alimentos embalados [37]. Uma das razões para a eficácia antimicrobiana da quitosana é o seu grupo amino carregado positivamente que interage com células microbianas que possuem grupos carregados negativamente em suas membranas, conduzindo à fuga proteica e outros constituintes intracelulares dos microrganismos. Filmes à base de quitosana são excelentes barreiras de oxigênio, no entanto, devido à sua natureza hidrofílica, eles possuem uma pobre propriedade de barreira à umidade [18, 37].

O emprego de quitina e quitosana, assim como a pesquisa por novas aplicações têm aumentado exponencialmente em diversas áreas, como na agricultura e indústria de alimentos, mas especialmente, na indústria farmacêutica, no desenvolvimento de cosméticos e biomateriais, tais como géis, filmes e membranas poliméricas [21].

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

O PLGA é um copolímero sintético composto das unidades monoméricas de Poli (ácido glicólico) - (PGA) e poli (ácido láctico) - (PLA). É um polímero biodegradável, biocompatível e bioabsorvível. Devido a essas características, estes polímeros estão muito presentes nas pesquisas de liberação controlada de fármacos, como agentes transportadores de proteínas e até mesmo no transporte de moléculas de DNA [38]. Seus componentes PGA e PLA são os materiais preferidos na fabricação de substratos para o transplante de células na engenharia de tecidos [39].

A Figura 3.5. ilustra o copolímero PLGA constituído pelas suas unidades monoméricas de poli (ácido glicólico) e poli (ácido láctico). O ácido láctico apresenta maior hidrofobicidade que o ácido glicólico. Dessa forma os copolímeros de PLGA ricos em ácido láctico são menos hidrofílicos, absorvem menos água, e, conseqüentemente, degradam-se mais lentamente [40].

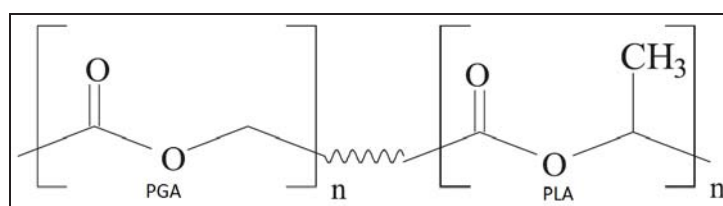


Figura 3.5. Estrutura química do PLGA (adaptado de 38).

Pesquisadores têm explorado a utilidade dos biopolímeros como o PLA e o PGA desde os anos 60, obtendo bons resultados ao utiliza-los como materiais de sutura tornando-os candidatos atraentes para as aplicações biomédicas, como na reconstrução de ligamentos, substituição traqueal, curativos cirúrgicos, enxertos vasculares, reparações nervosas, odontológicas e de fraturas [40]. Membranas porosas de polímeros absorvíveis são confeccionadas com o objetivo de servirem

como um substrato para que células isoladas possam fixar-se e crescer até formar o tecido. Este tipo de matriz polimérica pode agir tanto como apoio físico, quanto como um substrato aderente para as células isoladas durante cultura *in vitro* ou subsequente implante para promover a regeneração natural de tecidos, especialmente ossos e cartilagens [41].

A degradação do PLGA ocorre por meio da hidrólise. A vantagem deste biopolímero está no controle da variação das proporções dos seus monômeros, pois proporções diferentes irão resultar em tempos de degradação diferentes, assim pode se escolher a proporção adequada para cada tipo de aplicação específica [40, 41, 42]. Durante a hidrólise do PLGA, ocorre a quebra da molécula em suas unidades monoméricas: ácido láctico e ácido glicólico. Estes são eliminados do corpo por vias metabólicas. O mecanismo da degradação hidrolítica do PLGA pode ser observado na figura 3.6.

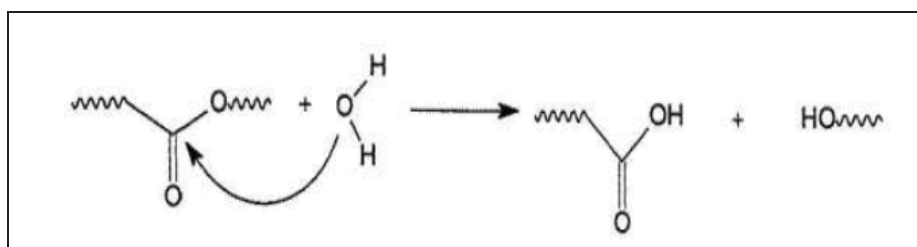


Figura 3.6. Hidrólise da ligação Ester do PLGA (adaptado de 43).

A cadeia do PLGA, durante a degradação hidrolítica, sofre a quebra das ligações ésteres hidrolisáveis, resultando nos monômeros ácido láctico e ácido glicólico, que são eliminados do corpo por vias metabólicas [43].

### 3.3.1. O PLGA aplicado à regeneração nervosa

Estudos recentes relatam a utilização do PLGA em forma de tubo, cujo qual serve como guia na regeneração nervosa. Os tubos de PLGA podem ser

desenvolvidos por meio de filmes enrolados e soldados com clorofórmio. Outra forma é a produção de tubos por eletrofiação. O efeito da solda com clorofórmio forma um tubo de espessura irregular, gerando um ponto de fragilidade e redução na quantidade de poros. Essa irregularidade no tubo pode comprometer a integridade estrutural do substrato antes do desejado, além de reduzir a infiltração de células e fluidos necessários nesta região [44, 45].

Os implantes absorvíveis, como os de PLGA, são importantes porque permitem que as células cresçam e se organizem enquanto o polímero se degrada. Posteriormente os produtos da degradação são eliminados do organismo pelas vias metabólicas, enquanto ocorre um crescimento natural do tecido, não sendo necessária uma nova intervenção cirúrgica para sua remoção do implante [40, 41, 46].

### **3.3.2. Blendas e revestimentos de PLGA e QT**

Os sistemas de entrega controlada de fármacos em micropartículas, atualmente, são dominados pelo uso do PLGA. No entanto, o PLGA apresenta uma ausência de grupos funcionais em sua superfície, impedindo a modificação da superfície para fins biomédicos. Para resolver este problema, pesquisadores usam blendas de PLGA/QT para proporcionar a possibilidade de conjugação com ligantes bioativos, por exemplo: açúcares, anticorpos ou peptídeos, para a superfície através de ligações covalentes [47].

O PLGA e a quitosana estão sendo testados no desenvolvimento de uma metodologia para a entrega controlada de fármacos onde a quitosana reveste nanoesferas de PLGA contendo nanopartículas de dexametasona de modo a formar uma casca para que o fármaco não seja liberado de imediato [48].

Substratos de múltiplas camadas compostas por policaprolactona (PCL) - gel/poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) - (PLGA)-gel/PLGA-QT estão sendo

fabricados usando um sistema de eletrofiação de injeção dupla para aplicação em vasos sanguíneos artificiais mostrando bons resultados [8].

### **3.4. Polímeros condutores nanoestruturados**

Para auxiliar a difusão do fármaco, através da matriz polimérica, polímeros condutores nanoestruturados estão sendo estudados com o objetivo de transportar diferentes fármacos ou moléculas ativas para liberá-los nos locais de interesse. A liberação do fármaco ocorre em resposta a pequenos estímulos ambientais, como exemplo: temperatura, força iônica, pH, luz, influência do campo eletromagnético. Essa tecnologia oferece promessas de melhorias em várias áreas como em engenharia de tecidos, diagnóstico e sistemas específicos de liberação controlada de fármacos [49].

Devido ao seu tamanho reduzido, nas últimas décadas, os nanomateriais têm sido de grande interesse em aplicações para áreas biológicas. Os materiais em nano escala apresentam propriedades diferenciadas como: elevada área superficial, maior reatividade química, e grande capacidade de penetração celular em comparação com os seus homólogos em dimensões normais [50, 51].

Os polímeros estruturados em forma de fibras estão se tornando cada vez mais atraentes, pois em geral a forma de fibra é uma estrutura que apresenta semelhança em relação os tecidos biológicos fibrosos naturais. Essa semelhança pode vir a favorecer o tratamento e a aceitação do material pelo organismo [14, 52]. Assim sendo, as nanofibras são as estruturas mais desejáveis para as aplicações biomédicas, principalmente para a engenharia de tecidos [14, 53].

A característica do tecido humano responder a estímulos elétricos faz dos polímeros condutores um material interessante para as mais variadas aplicações

nas áreas biomédicas [7, 54]. Neste trabalho, escolhemos o emprego do polipirrol em forma de nanofibras por ser considerado um polímero condutor biocompatível e de baixa toxicidade.

### 3.4.1. Polipirrol

O PPy é atualmente um dos polímeros condutores conhecidos mais investigados pois, destaca-se por apresentar uma elevada condutividade elétrica, baixa toxicidade ambiental, elevada flexibilidade, boas propriedades mecânicas e facilidade de síntese [55, 56, 57, 58].

Os métodos de polimerização do PPy mais usados são a síntese eletroquímica ou química, sendo que a oxidação do monômero pirrol (Py) pode ocorrer em vários solventes orgânicos e também em meio aquoso [55, 57, 58]. A polimerização química oxidativa do pirrol por oxidantes químicos em solventes aquosos ou não aquosos é bastante usada quando se deseja uma maior rendimento da reação [58, 59].

A condutividade no polipirrol ocorre devido à sua estrutura apresentar ligações simples e duplas alternadas entre os átomos de carbono ao longo da cadeia polimérica, como mostra a Figura. 3.7. Sendo Assim, acaba originando um caminho para o fluxo de elétrons o que resulta na ocorrência de condução elétrica [60].

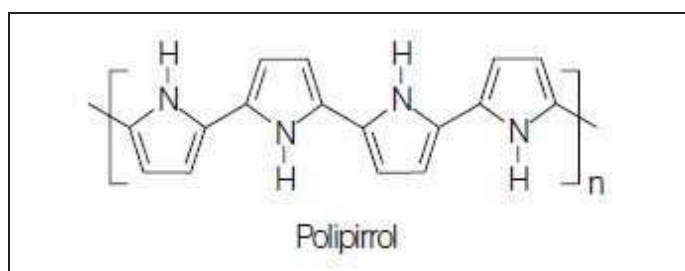


Figura 3.7. Estrutura química do polipirrol [61].



O PPy juntamente com a quitosana está sendo estudado para aplicação na formação de hidrogéis. Os resultados indicam que hidrogéis de PPy/QT são compostos sensíveis ao pH, mostram boa absorção de água em solução aquosa e solução salina destilada. A formação de hidrogéis pode abrir uma nova oportunidade para a fabricação de compósitos associando a biomacromoléculas e polímeros condutores, resultando em um papel mais importante na bioquímica e eletroquímica [20].

Pesquisas com compósitos de PLGA/PPy preparadas por eletrofiliação para uma promissora aplicação na confecção de estruturas de nanofibras, as quais são capazes de suportar adesão e orientar extensão de neurônios na regeneração do nervo, estão sendo realizadas. Relatos afirmam que este método permite formar estruturas de nanofibras condutoras adequadas para o uso como substrato de tecidos nervosos [62].

Ensaio em ratos demonstraram que a regeneração do nervo ciático de cobaias utilizando tubos de silicone revestidos com PPy apresentaram uma melhora mais significativa em relação aos que usaram tubo de silicone sem o PPy [63]. Os resultados da pesquisa mostraram uma boa biocompatibilidade do PPy com o tecido nervoso periférico das cobaias, o que indica que o PPy pode ser um bom material para ser aplicado na regeneração de nervos periféricos danificados [49]. O PPy não causou efeitos adversos sobre culturas celulares e animais testados. Os resultados não apontaram nenhuma evidência de toxicidade aguda e subaguda. As células de Schwann apresentaram uma melhor taxa de sobrevivência e proliferação quando em contato com o PPy [63].

O projeto de novos sistemas poliméricos biodegradáveis para a preparação de tubos artificiais, capazes de atuarem como guia para a regeneração nervosa exige que importantes características sejam consideradas: uma delas é que devem permanecer no organismo tempo suficiente para que o nervo lesado seja

reconstruído, além de estimular a fibra nervosa a crescer de uma extremidade a outra a fim de acelerar a regeneração; outra característica importante é que durante o processo de degradação não deve ocorrer interação e compressão do nervo lesionado. Quando se tem a liberação de fatores de crescimento durante o processo de regeneração é necessário ter um controle sobre a dosagem e o tempo de liberação do fármaco.

A avaliação da relação estrutura/morfologia com o tempo de degradação, permite que seja determinado qual sistema polimérico é mais eficiente para a preparação de tubos artificiais. Este ensaio permite estimar o tempo de liberação do fármaco e avaliar a dosagem que no futuro serão testados na regeneração de nervos periféricos *in vivo*.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo serão descritos os materiais utilizados na preparação das nanofibras de PPy e na confecção dos filmes de PLGA e QT, juntamente com os procedimentos, equipamentos e análises que foram realizadas durante o trabalho.

### 4.1. Materiais

Na tabela 4.1. são apresentados os reagentes utilizados na confecção das nanofibras de PPy e das membranas de PLGA e Quitosana.

Tabela 4.1. Reagentes utilizados.

Reagentes	Marca	Pureza
Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) – (PLGA Comercial)	PURAC (85:15 Láctico:glicólico)	99,4%
Quitosana de Baixa Massa Molecular	Fluka -BioChemika	85%
Quitosana de Alta Massa Molecular	Fluka BioChemika	93%
Pirrol (Py)	Sigma- Aldrich	98%
Ácido p-toluenosulfônico (APTS)	Sigma- Aldrich	98,5%
Clorofórmio (CHCl <sub>3</sub> )	SYNTH	99,8%
Diclorometano (CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> )	Sigma- Aldrich	99,5%
Etanol (CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH)	Sigma- Aldrich	99,5%
Cloreto Férrico (FeCl <sub>3</sub> )	Sigma- Aldrich	97%
Ácido acético (CH <sub>3</sub> COOH)	Neon	99,93%

O PLGA foi armazenado em *freezer* dentro de tubos Schlenks sob atmosfera de argônio. O clorofórmio e o diclorometano foram destilados por 8 horas na presença de pentóxido de fósforo e foram armazenados em atmosfera de argônio antes do uso. Os filmes foram preparadas em placas de Petri de 9 cm de diâmetro.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Síntese do polipirrol

O reagente pirrol (monômero) foi previamente destilado para a eliminação dos monômeros oxidados e remoção das impurezas [64]. A polimerização das nanofibras de ppy ocorreu pelo método da polimerização química oxidativa em meio aquoso e em temperatura de 0°C [57]. O monômero pirrol (0,5 mL;  $7,2 \times 10^{-3}$  mol) foi adicionado em 20 mL de água deionizada juntamente com 5,48g do agente dopante APTS (ácido p-toluenosulfônico monohidratado;  $28,8 \times 10^{-3}$  mols) em banho de gelo. O agente dopante APTS foi utilizado com o objetivo de aumentar a condutividade da nanofibra de PPy preparada. A solução foi mantida em agitação e temperatura de 0 °C durante 1 hora. Uma segunda solução (solução B), contendo 2g do agente oxidante cloreto férrico ( $\text{FeCl}_3$ ;  $12,24 \times 10^{-3}$  mols) foi solubilizado em 5 mL de água deionizada e adicionada gota a gota a primeira solução (após transcorrida uma hora de agitação). A reação é mantida em banho de gelo durante as primeiras 4h e permanece em repouso durante 20 horas.

A razão molar entre o [oxidante]:[monômero] foi [1,7]:[1]. Transcorridas às 24h o PPy formado, na forma de um precipitado preto, foi filtrado e lavado com água destilada e etanol em um sistema de filtração á vácuo. Após, o PPy é seco em estufa a 80°C durante 4 horas.

O organograma da Figura 4.1. esquematiza as etapas da síntese do PPy.

### Síntese das nanofibras

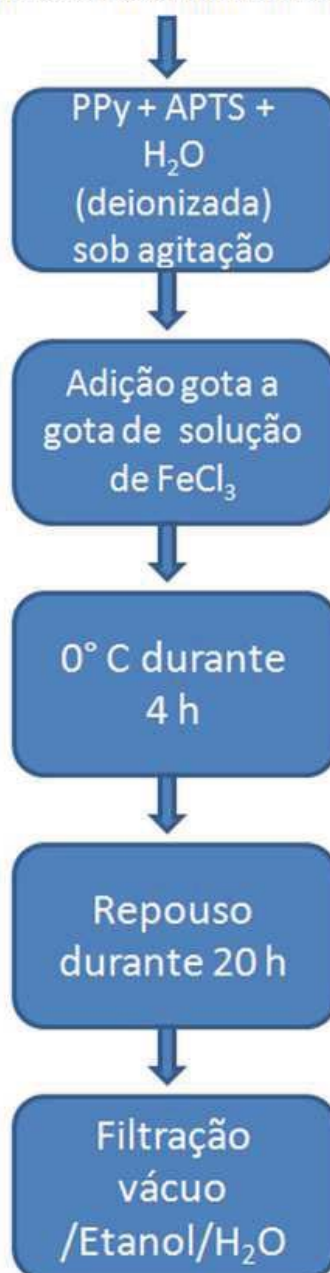


Figura 4.1. Organograma da síntese do polipirrol.

#### 4.2.2 Preparação de filmes de quitosana em camadas com PLGA.

Diferentes sistemas poliméricos baseados em polímeros biodegradáveis (quitosana e PLGA) e condutores (PPy) foram preparadas. A seguir são descritos os procedimentos experimentais na preparação de cada um dos sistemas poliméricos avaliados. Após a preparação, todos os filmes são retirados da placa de Petri,

armazenados em Schlenks, mantidos em atmosfera de argônio e posteriormente guardados no *freezer*.

Filme 1 (QT EM 02): 0,2g de quitosana de Elevada Massa Molecular (EM) foram adicionada em 20 mL de uma solução (1%,v/v) de ácido acético [19]. Para que ocorresse a total dissolução da quitosana em ácido acético, foi necessária a utilização de 5 horas em banho de ultrassom de 40 kHz (Unique, modelo USC-1600) à temperatura ambiente, e mais 12 horas de agitação com agitador magnético. Antes de ser vertida em placas de Petri, a solução foi filtrada para a retirada de material não solúvel e algum resquício de impurezas [19]. Após, o filme de quitosana foi seco em estufa durante 24 horas, na temperatura de 50°C. Depois de seco, o filme foi lavado com uma solução (1%, m/v) de hidróxido de sódio para neutralizar o ácido remanescente na superfície [11]. Em seguida, a superfície do filme foi lavada com água destilada e seca novamente em estufa durante 24 horas.

Filme 2 (QT BM 02): um filme de 0,2g de quitosana de Baixa Massa Molecular (BM) foi preparado com base na mesma metodologia descrita na preparação do filme 1.

Filme 3 (QT EM 04): uma solução de quitosana foi preparada com base na mesma metodologia descrita na preparação do filme 1, porém 0,4g de quitosana foram dissolvidos em 20 mL de uma solução (1%, v/v) de ácido acético, resultando numa concentração de 2% (m/v).

Filme 4 (QT EM 06): Uma solução de quitosana foi preparada com base na mesma metodologia descrita na preparação do filme 1, porém 0,6g de quitosana foram dissolvidos em 20 mL de uma solução (1%, v/v) de ácido acético, resultando numa concentração de 3% (m/v).

Filme 5 (PLGA): Usando a técnica da evaporação do solvente, 0,2 gramas de PLGA foram adicionados em 20 mL clorofórmio previamente seco. O PLGA foi solubilizado em banho de ultrassom durante 8 horas e mais agitação por 12 horas.

Após, foi vertido em uma placa de Petri, onde ocorreu a evaporação do solvente. A placa contendo o filme ficou sob atmosfera ambiente durante 24 horas.

Filme 6 (PLGA-PPy): 0,2 gramas de PLGA foram adicionados em 20 mL clorofórmio previamente seco. Primeiramente o PLGA foi solubilizado em banho de ultrassom durante 4h, após, adicionou-se à solução 0,02g PPy previamente sintetizado, conforme descrito no item 4.2.1. A solução ficou em banho de ultrassom por mais 2 horas, e depois sob agitação por mais 12 horas. Após, a solução foi vertida em uma placa de Petri, onde ocorreu a evaporação do solvente. A placa contendo o filme ficou sob atmosfera ambiente durante 24 horas.

Filme 7 (QT EM 02 - PPy): 0,2g de quitosana (EM) foram adicionadas em 20 mL de uma solução (1%,v/v) de ácido acético durante 4 horas em banho de ultrassom. Após, 0,02g de PPy, previamente sintetizado pelo método químico, foi adicionado à solução, à qual permaneceu mais 2h em banho de ultrassom. Posteriormente a solução ficou sob 12h de agitação magnética. A solução foi vertida em placas de Petri e após, o compósito foi seco em estufa durante 24 horas na temperatura de 50°C. Depois de seco, o filme foi lavado com uma solução (1%, m/v) de hidróxido de sódio para neutralizar o ácido remanescente na superfície [11]. Em seguida, a superfície do filme foi lavada com água destilada e seca novamente em estufa durante 24 horas.

Filme 8 (QT EM 04 - PPy): 0,4g de quitosana (EM) foi adicionado em 20 mL de uma solução (1%,v/v) de ácido acético durante 4 horas em banho de ultrassom. Após o processo de dissolução da quitosana em ácido acético, o PPy sintetizado foi adicionado à solução que permaneceu mais 2h em banho de ultrassom. Posteriormente a solução permaneceu sob agitação magnética durante 12h. A quantidade de PPy adicionado foi de 10% (m/m) em relação à massa de quitosana, ou seja 0,04g.

Filme 09 (QT EM 06 - PPy): Uma solução foi preparada com base na metodologia da preparação do filme 8, porém com uma massa de 0,6g de quitosana

dissolvidas em 20 mL de ácido acético (1%, v/v). A quantidade de PPy adicionado foi de 10% (m/m) em relação à massa de quitosana.

Filme 10 (QT/PLGA): Um filme de quitosana foi preparado usando a metodologia descrita no preparo do filme 1. Após a secagem em estufa, verteu-se sobre o filme de quitosana uma solução de PLGA, preparada conforme descrição no preparo do filme 5. Após, o filme foi retirado da placa e armazenado em Schlenk sob atmosfera de argônio no *freezer*.

Filme 11 (QT/PLGA- PPy): Foi preparado um filme de QT usando a mesma metodologia do filme 1. Após a secagem em estufa, foi vertido sobre ele uma solução de PLGA- PPy, idêntica a preparada conforma a descrição do preparo do filme 6.

Filme 12 (QT EM - PPy *in situ*): foi preparado um filme de quitosana com a mesma metodologia usada na preparação do filme 1. Posteriormente realizou-se uma polimerização *in situ* do pirrol, conforme a descrição no item 4.2.1. Neste caso, para manter o banho de gelo, a placa de Petri foi colocada dentro de um copo de béquer para que não ocorresse a entrada de água na reação. Após o tempo de reação do PPy, o filme foi lavado com água deionizada para retirada dos resíduos da síntese e por 24h permaneceu em estufa a temperatura de 50 °C. A Figura 4.2. mostra a placa de Petri dentro do copo de béquer.



Figura 4.2. Reação *in situ* do PPy.



Filme 13 (QT/QT-PPy/QT): Foi preparado um filme de quitosana com a mesma metodologia de preparo do filme 1. Após a secagem em estufa, verteu-se sobre o filme de quitosana uma solução de QT-PPy, preparada com a metodologia utilizada no preparo do filme 7. Após a secagem ocorreu mais uma vez a adição de uma solução de quitosana preparada conforme descrição do filme 1. O sistema foi seco em estufa a 50°C, durante 24h.

A confecção dos filmes foi realizada no Laboratório de Organometálicos e Resinas - LOR/FAQUI/PUCRS.

O organograma da Figura 4.3. esquematiza os diferentes filmes preparados neste trabalho.

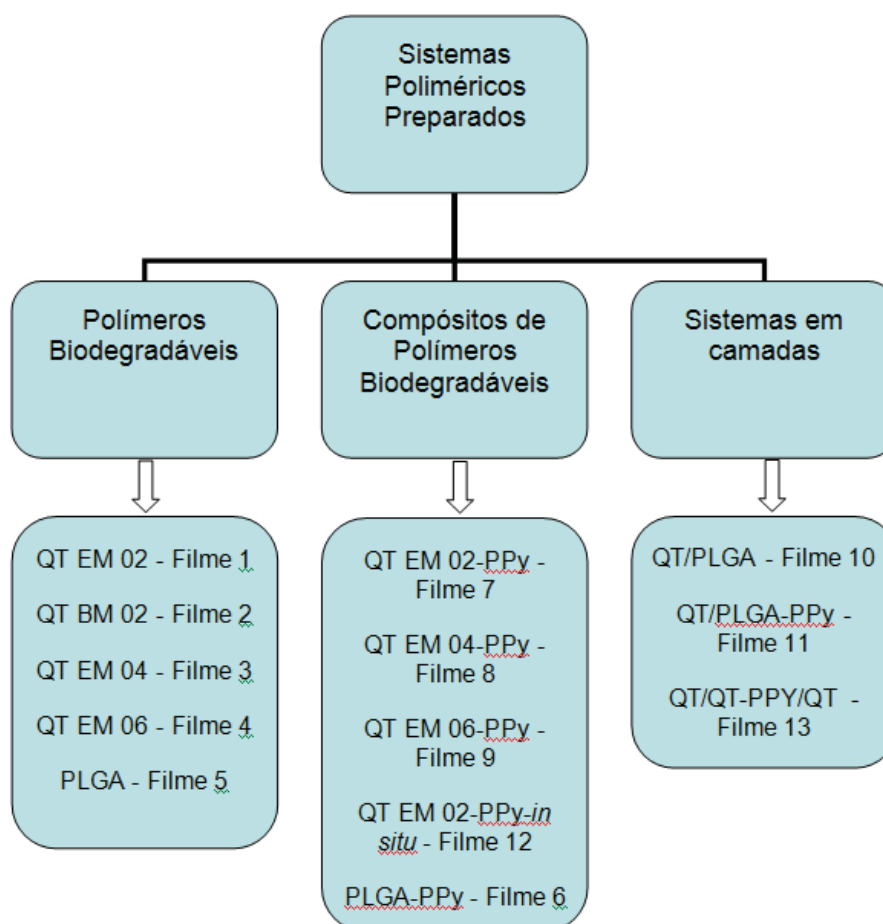


Figura 4.3. Organograma dos sistemas poliméricos preparados.

### 4.2.3. Ensaio de degradação hidrolítica

O ensaio de degradação *in vitro* dos sistemas poliméricos foi realizado com base na norma ASTM F1635 – 11 (2011) – Anexo B [65]. Este ensaio destina-se a avaliar a perda de massa, as alterações sofridas no material, alterações nas propriedades estruturais de materiais poliméricos utilizados em implantes cirúrgicos que sofrem hidrólise. Na Figura 4.4. estão as etapas da preparação dos filmes para o ensaio de degradação hidrolítica.

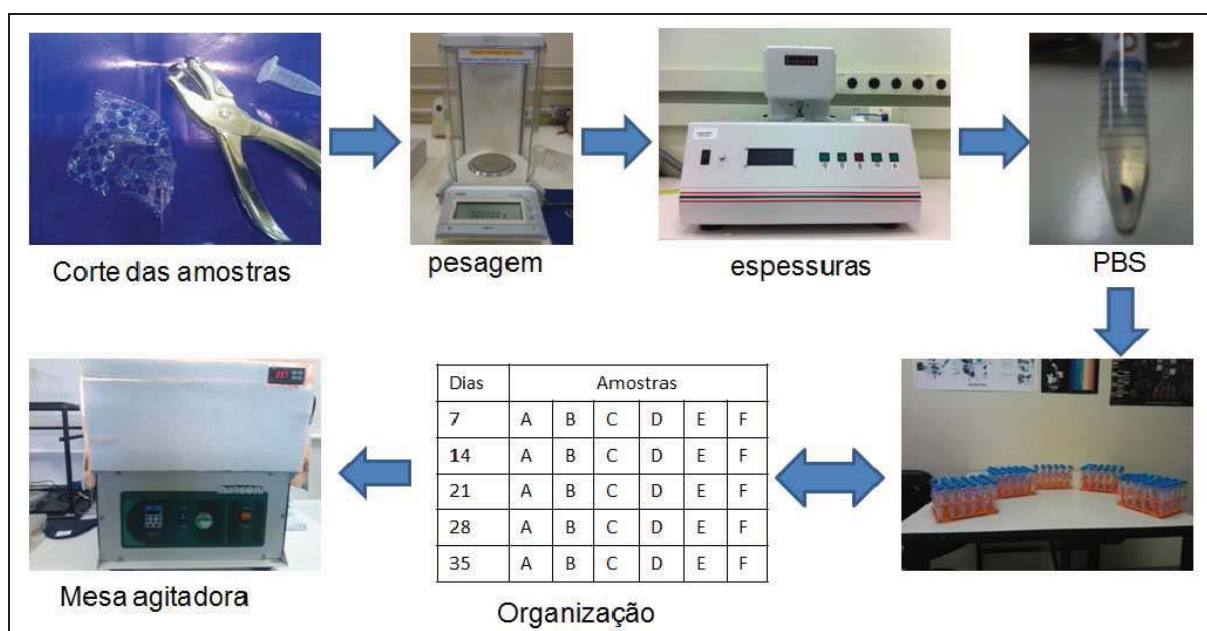


Figura 4.4. Etapas da preparação da amostra para a degradação.

Os filmes foram cortados em círculos de 0,5 cm de diâmetro e pesados. Após, a espessura foi aferida e as amostras foram colocados em tubos Falcon contendo 5 mL de solução tampão fosfato salino (PBS). Os tubos foram colocados em uma mesa agitadora com agitação de 60 rpm e termostato mantendo a temperatura à 37 °C [66]. De cada filme foram retiradas 6 amostras circulares de mesmo diâmetro. Após cada semana (7, 14, 21, 28 e 35 dias) as amostras foram retiradas da incubadora e lavadas com água destilada para retirada dos resíduos de PBS. Em seguida, foi realizada a pesagem da massa úmida (pesagem da amostra úmida que é realizada logo após a retirada da amostra da solução). Depois de secas sob vácuo, as amostras foram pesadas novamente até as medidas obterem uma massa constante.

O equipamento utilizado para realizar a degradação foi uma mesa agitadora, modelo MA-140/CF - Marconi, com controle da temperatura e níveis de agitação.

O aferimento da espessura de cada filme foi realizado antes e depois da degradação em um medidor digital de espessura (MDE), marca Hanatek, modelo n° 8020. A espessura de cada amostra foi aferida dez vezes, com o objetivo de reduzir a incerteza estatística.

Para as medidas de massa utilizou-se uma balança analítica de 5 casas decimais da marca Metter Toledo (modelo AG 245).

O pHmetro utilizado neste trabalho foi o de marca Digimed (modelo DM-20).

### **4.3. Técnicas de Caracterização**

As nanofibras de PPy e os sistemas poliméricos preparados foram caracterizadas por meio das técnicas de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (ATR/FT-IR), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise Termogravimétrica (TGA), Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE), Microscopia de Força Atômica (AFM), Microtomografia Computadorizada de Raios X (Micro CT) e Eletrômetro. Essas análises foram realizadas com o intuito de verificar a morfologia, propriedades térmicas, elétricas e estrutural dos polímero e sistemas poliméricos obtidos.

#### **4.3.1. Espectroscopia no infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).**

As estruturas moleculares dos materiais confeccionados foram determinadas por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) com o objetivo de verificar a obtenção do material desejado por meio da identificação das ligações químicas dos grupos funcionais presentes nos polímeros sintetizados. Os espectros de absorção no infravermelho (IV) foram obtidos no Espectrômetro da Perkin-Elmer (modelo Spectrum One FTIR Spectrometer) na região de 400 a 4000

$\text{cm}^{-1}$ , com resolução de  $4 \text{ cm}^{-1}$ . As amostras das nanofibras de PPy foram preparadas em pastilhas de KBr sob pressão de 10 toneladas, em uma prensa Perkin-Elmer Instruments. As pastilhas foram preparadas com 200mg de KBr previamente seco em estufa. Também foi necessário um acessório de refletância total atenuada (Universal ATR - Sampling Accessory), para a análise dos sistemas poliméricos confeccionados.

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

A análise da morfologia das amostras é necessária para identificar a formação de estrutura porosa ou lisa na superfície dos filmes de PLGA e quitosana e posteriormente para avaliação dos efeitos da degradação das estruturas confeccionadas. Essa caracterização também é importante para a verificação da formação de nanofibras de PPy.

As análises foram realizadas no Instituto Tecnológico em Ensaios e Segurança Funcional – ITT-FUSE da Unisinos, utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura da ZEISS (modelo EVO LS 15). Também foram realizadas análises no Laboratório Central de Microscopia e Microanálise do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da PUCRS em um microscópio Philips XL30. As amostras foram fixadas no suporte com uma fita dupla face condutora de carbono, e posteriormente metalizadas com ouro em um equipamento BALTEC SCD 005. As imagens foram registradas no modo de espalhamento elétrico 15 kV. A camada de ouro depositada foi de 20 nm. Os aumentos em geral variaram de 200x até 30.000x.

#### **4.3.3. Análises Termogravimétricas (TGA)**

As análises termogravimétricas (TGA) foram realizada para verificar a estabilidade térmica das amostras de PPy e dos filmes preparados. As análises de TGA foram feitas no Laboratório Multiusuário de Análise Térmica - LAMAT na

UFRGS, utilizando o aparelho SDT Q600 fabricado pela TA Instruments. As amostras de PPy foram aquecidas de 20 a 600 °C com fluxo de Nitrogênio (100 mL/min) a uma taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup>. Foi utilizado gás nitrogênio ultra-puro com vazão de 100 mL/min. As amostras foram pesadas com massas entre 20 mg e 26 mg e colocadas em panelinhas herméticas.

#### **4.3.4. Espectroscopia de Impedância Elétrica (EIE)**

A espectroscopia de impedância é uma técnica utilizada para caracterizar o comportamento elétrico de materiais. Nas amostras de PPy foram realizadas medidas de espectroscopia elétrica para verificar se o polímero formado era condutor. Essa técnica consiste em aplicar um sinal elétrico no material sob estudo e medir as partes reais e imaginárias de sua impedância em função da frequência do sinal aplicado, obtendo, dessa forma, o seu espectro de impedância. A partir dele, é possível inferir algumas das características elétricas do material, como a condutividade.

Amostras das nanofibras do PPy foram prensadas em forma de disco (2 x 12 mm) em um pastilhador e foram posteriormente utilizadas para realização das medidas de espectroscopia elétrica. Utilizou-se um porta amostras com eletrodos circulares de prata para introduzir a onda senoidal proveniente de um gerador de funções (Agilent), modelo 33210A e um osciloscópio (Minipa) modelo MO-2300. Este último foi usado para analisar os parâmetros da onda e medir a defasagem entre a corrente e a tensão [67]. Foi aplicada uma tensão senoidal de 5V pico-a-pico, de frequência variando entre 10Hz e 100kHz, em escala logarítmica, com 18 valores por década. O ruído experimental foi minimizado usando-se gaiola de Faraday aterrada, filtro de linha e estabilizador de tensão. A incerteza estatística foi reduzida tomando um mínimo de três medidas para cada amostra.

#### **4.3.5. Eletrômetro**

A resistividade dos filmes de PLGA e PLGA-PPy foi determinada com a utilização de um eletrômetro Keithley, modelo 6517A. As medidas foram realizadas com a aplicação de duas tensões: primeiramente, 400V e, após, 10V, fornecidos pelo próprio eletrômetro. A polaridade da tensão foi invertida a cada 0,5 segundos para evitar o acúmulo de carga na superfície da amostra, o que causaria um efeito capacitivo na amostra, com conseqüente aumento da resistividade medida. Para cada tensão aplicada, a medida foi repetida cinco vezes. Ao final, foi tomada a média dos valores encontrados.

#### **4.3.6. Microcopia de Força Atômica (AFM)**

As análises topográficas foram realizadas em um microscópio de Força Atômica (marca Bruker), modelo Dimension icon. Foi utilizada uma sonda de silício (scansyst.AIR) com força de 0.4 N/m e taxa de escaneamento de 70kHz. As imagens foram obtidas com o microscópio de força atômica operando no modo de contato *Peak Force Tapping*.

#### **4.3.7. Microtomografia Computadorizada (Micro CT) de Raios X**

A Microtomografia Computadorizada é uma técnica que permite obter informações sobre a forma tridimensional (3D) e a estrutura interna do material. Isso permite verificar a ocorrência de porosidade no material examinado. Esta análise foi realizada a partir de centenas de projeções do corpo de prova, por meio do rotacionamento do mesmo em relação a direção da radiação. Cada projeção foi adquirida com o objeto rotacionado em um determinado ângulo em relação à posição original, assim, foi obtido uma projeção para cada ângulo. As imagens microtomográficas foram obtidas por meio de um microtomógrafo (marca Bruker e modelo SkyScan 1173) com uma tensão de operação de 50kV e uma corrente elétrica de 0,3mA, gerando imagens de 6  $\mu\text{m}$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1. Preparação e Caracterização das nanofibras de PPy

Nanofibras de PPy foram sintetizadas por meio da polimerização química oxidativa conforme descrito no item 4.2.1 deste trabalho. Em um trabalho anterior do grupo de pesquisa, diferentes agentes dopantes como: ácido p-toluenosulfônico monohidratado (APTS), ácido dodecilbenzenosulfônico (ADBS), p-toluenosulfonato de sódio (PTS) e Ácido Clorídrico (HCl) e diferentes condições experimentais foram avaliadas. A partir dos resultados obtidos neste trabalho optou-se por preparar as nanofibras de PPy usando como agente dopante o APTS, pois resultou em morfologia de nanofibras e o polímero apresentou melhor estabilidade térmica [68]. A obtenção da morfologia de nanotubos ou nanofibras de PPy é um processo dependente da concentração do dopante e da relação molar entre o pirrol e o dopante [46, 56]. Inicialmente, a morfologia das amostras de polipirrol sintetizadas com a proporção molar [dop]:[Py] = 4, foi verificada por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV). A figura 5.1. mostra a morfologia fibrilar do polipirrol dopado com APTS sintetizado neste trabalho com diâmetros entre 61.76 nm a 262 nm.

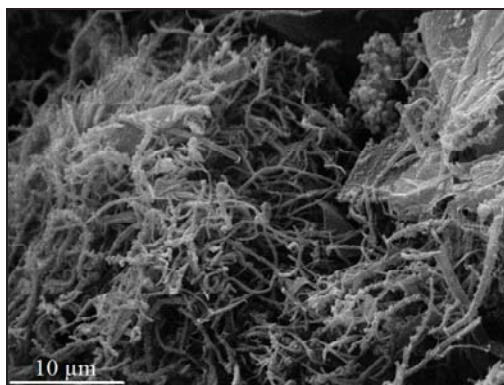


Figura 5.1: Imagem de MEV das nanofibras de PPy (5.000X).

A estrutura molecular do PPy foi avaliada por espectroscopia no infravermelho, no intervalo de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , Figura 5.2..

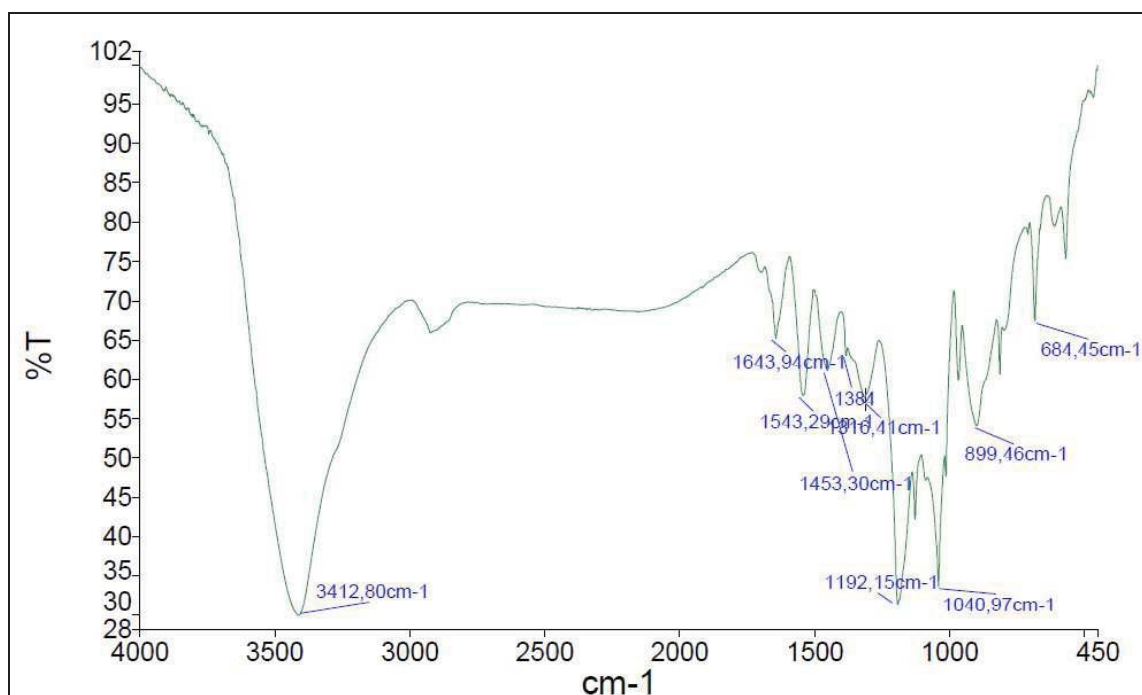


Figura 5.2. Espectro de FTIR das fibras de PPy.

Em 3400-3500  $\text{cm}^{-1}$  observa-se uma banda larga associada à ligação do grupo N-H [57, 69, 70]. O espectro apresenta uma banda de estiramento em aproximadamente 1644  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente à ligação C=C [69, 70, 71]. A banda de estiramento em 1543  $\text{cm}^{-1}$  também corresponde à ligação C=C no anel do pirrol [43, 71, 72, 73]. Em 1453  $\text{cm}^{-1}$  encontra-se a banda de estiramento relacionada à ligação N-C no anel do polipirrol [57, 71, 72, 74]. A banda larga em 1300  $\text{cm}^{-1}$  a 1400  $\text{cm}^{-1}$  é atribuída às ligações C-H e C-N dentro do plano de deformação do anel [57, 73, 75]. As bandas próximas a 1192  $\text{cm}^{-1}$  e 899  $\text{cm}^{-1}$  estão relacionadas com o estado dopado do PPy [73,76, 77].



As propriedades térmicas do polipirrol foram avaliadas por TGA. O termograma apresentado na Figura 5.3. mostra o perfil de degradação do PPy com aumento de temperatura da amostra.

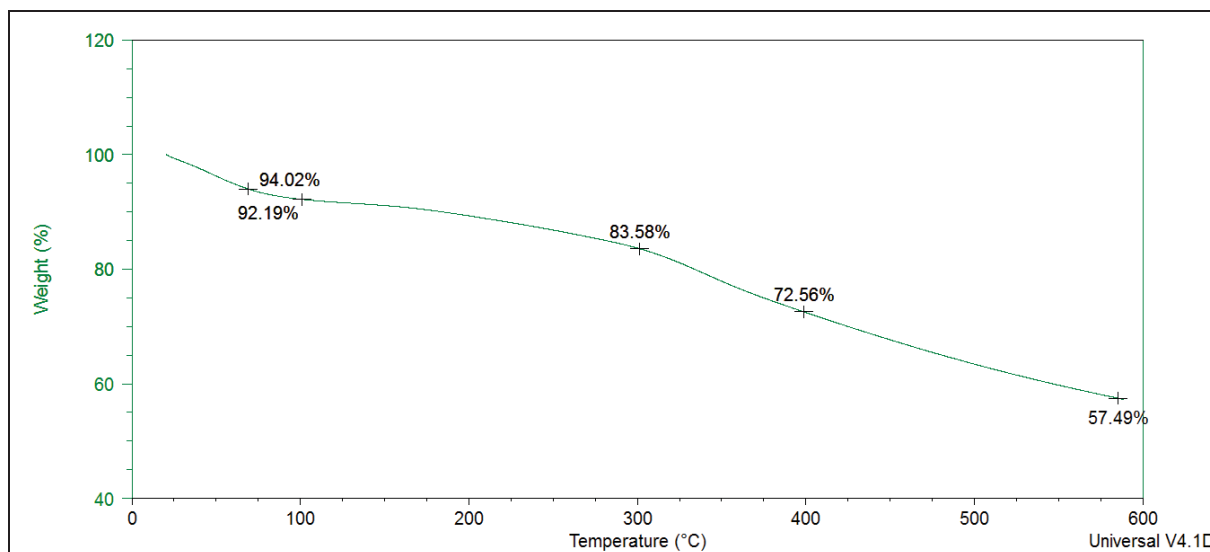


Figura 5.3. Termograma do PPy.

Inicialmente, o polímero perde 6 % de massa até alcançar a temperatura de 100 °C, referente à volatilização de moléculas de água, oligômeros e monômeros que não reagiram [78]. Até os 300 °C o polipirrol perde mais 9 % em massa referente à degradação dos íons dopantes que interagiram com o PPy e a possível produção e liberação de gases voláteis. Entre as temperaturas de 300 °C - 400 °C, o polipirrol perde mais 11 % referente ao início do processo de degradação do dopante e da quebra das cadeias poliméricas do polipirrol, até chegar a um resíduo final de 57 % de massa restante de polipirrol que não se degradou [69, 78].

A condutividade elétrica das nanofibras de PPy foi avaliada usando a técnica espectroscopia de impedância elétrica. A classificação de condutividade elétrica encontra-se em uma ampla faixa, passando de isolantes para semicondutores e até

condutores de valores elevados. Na literatura estudos indicam um desempenho na faixa de semicondutores ( $10^{-7} - 10^2$  S/cm) para os PPy dopados com diferentes dopantes [73]. Autores relatam que a condutividade dos polímeros quando sintetizados pelo método químico apresentam sempre valores mais baixos do que seus homólogos via síntese eletroquímica [79].

O PPy dopado com APTS, e sintetizado com o método descrito no item 4.2.1 deste trabalho, apresentou uma condutividade de  $8 \times 10^{-4}$  S/cm. Os valores encontrados neste estudo estão de acordo com a faixa de semicondutores referenciada em outros trabalhos [56, 63]. Em estudo sobre a polimerização do pirrol com diferentes dopantes, foram obtidos valores de condutividade para o PPy que variam de  $25 \times 10^{-4}$  a  $4 \times 10^{-2}$  S/cm [57].

A obtenção de elevados valores para a condutividade elétrica para o polipirrol quando à síntese é realizada por meio do método químico é difícil, pois além da influência da estrutura do dopante nas propriedades, o produto também é sensível às condições de síntese [57, 69] Portanto, as condições estabelecidas neste estudo para a síntese de PPy foram favoráveis para obtenção de PPy com condutividade elétrica na faixa de semicondutores.

## **5.2. Preparação dos filmes de quitosana, PLGA e compósitos**

Foram preparados diferentes sistemas poliméricos baseados em polímeros biocompatíveis (QT e PLGA) e condutores (PPy) com potencial aplicação na preparação de condutos artificiais para a regeneração nervosa. O aspecto dos filmes pode ser observado na Figura 5.4. Os filmes de quitosana preparados são transparentes e levemente amarelados, já os filmes de PLGA apresentaram-se transparentes e incolores. A adição das nanofibras de PPy aos filmes alterou a coloração dos mesmos para preto.



Figura 5.4. Aspecto dos filmes confeccionados.

Na página 92 deste trabalho, encontra-se um quadro com a descrição resumida da confecção dos sistemas poliméricos preparados que auxilia a relacionar a simbologia utilizada durante a leitura do trabalho.

Diferentes quantidades de polímeros biocompatíveis (0,2; 0,4; 0,6g) num mesmo volume de solvente foram utilizados a fim de preparar filmes com diferentes espessuras. A espessura do filme pode auxiliar no controle da liberação do fármaco e portanto ajustar, por exemplo, a liberação de um fármaco conforme a necessidade da regeneração do nervo.

A morfologia da superfície dos filmes preparados foi avaliada por meio de MEV. Resultados semelhantes foram obtidos para os diferentes filmes de QT e QT – PPy preparados. A partir da Figura 5.5. é possível observar a modificação na superfície dos filmes produzidos. Os filmes de QT apresentaram uma morfologia lisa, sem presença de poros ou rugosidades em sua superfície. No entanto, quando confeccionado na presença de PPy os filmes passaram a apresentar uma morfologia com relevos, formando arcabouço que podem vir a favorecer o crescimento celular. A Figura 5.5. ilustra as diferentes formas superficiais dos filmes.

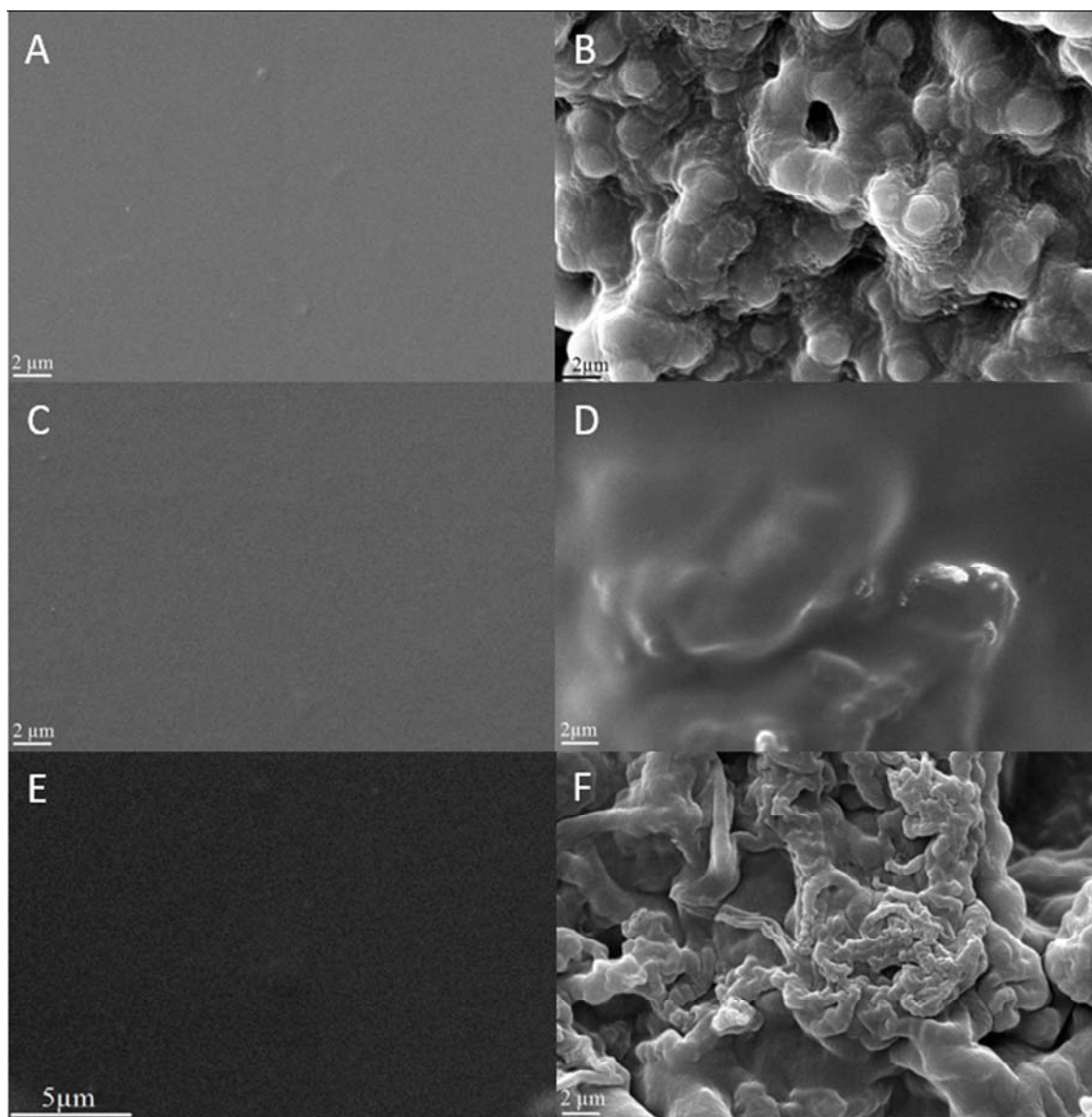


Figura 5.5. Microscopia dos filmes de quitosana (10.000x): (A) Filme QT EM 02; (B) Filme QT EM 02 – PPy; (C) QT EM 04; (D) QT EM 04 – PPy; (E) QT EM 06; (F) QT EM 06-PPy.

O Filme QT EM 04 PPy, Figura 5.5. (D), apresentou um pouco menos de relevo em relação aos demais filmes de QT - PPy. Essas diferenças morfológicas entre os filmes compósitos podem estar relacionadas à dificuldade da dispersão das nanofibras nas soluções de diferentes concentrações de quitosana que são altamente viscosas.

A preparação de filme de PLGA na presença PPy também modificou significativamente a morfologia do material. A partir da Figura 5.6. é possível observar que o PLGA cobriu as fibras de PPy, formando uma superfície rugosa e irregular.

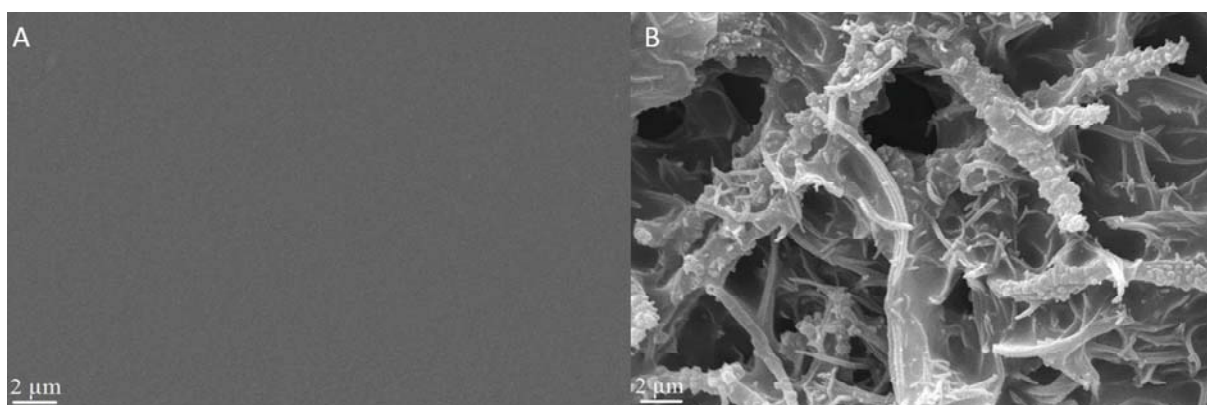


Figura 5.6. imagem de MEV dos filmes de PLGA e PLGA – PPy (10.000x): (A) PLGA; (B) PLGA – PPy.

A utilização de materiais poliméricos que servem como guia para crescimento nervoso necessita de uma superfície irregular que favoreça o desenvolvimento celular, sendo assim, a simples adição de nanofibras de PPy modifica a superfície dos filmes. O diferencial deste método é que o PPy na morfologia de fibras é adicionado na matriz polimérica, enquanto na literatura, o que se encontra são condutos artificiais de PLGA produzidos por eletrofiliação, onde o PPy na morfologia aglomerada é incorporado à fibra [8].

A fim de preparar um sistema polimérico com uma maior concentração de fibras na superfície, foi realizada uma polimerização *in situ* do pirrol em um filme de quitosana, previamente preparado e seco. A morfologia da superfície do filme QT EM – PPy *in situ* foi avaliada por MEV, figura 5.7. Podemos observar nas imagens que não ocorreu a formação de nanofibras de PPy *in situ*.

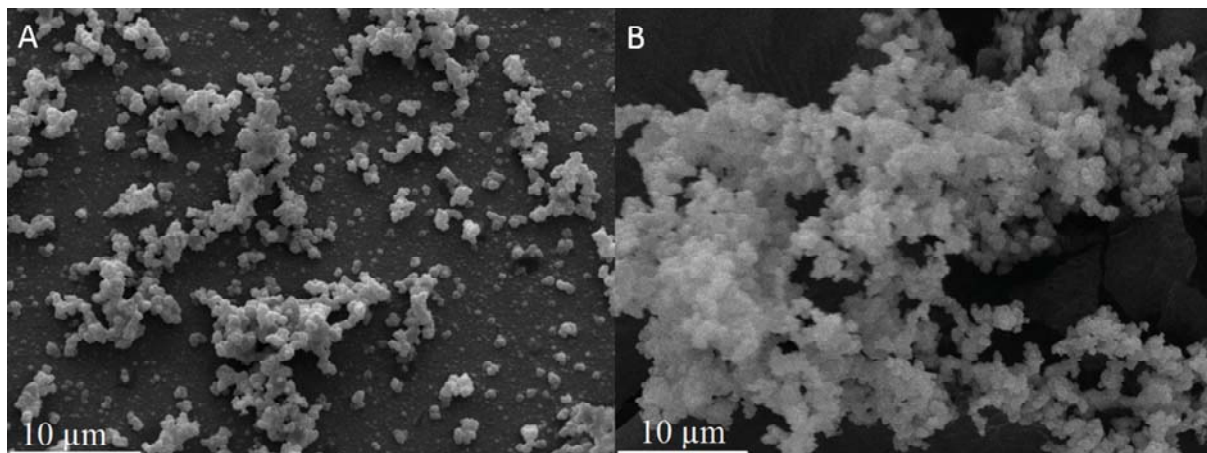


Figura 5.7. Imagem de MEV do filme QT EM – PPy *in situ* (5.000x): (A) Filme QT EM – PPy *in situ*; (B) Aglomerado de PPy recuperado na lavagem.

A partir das imagens de MEV da Figura 5.7. (A) podemos observar que a polimerização *in situ* na superfície do filme não resultou em nanofibras, mas sim em PPy aglomerado com a morfologia particulada aderida à superfície.

Foi realizada uma etapa de lavagem para remover o excesso de polipirrol que ficou aderido à superfície do filme de QT. As imagens de MEV do PPy recuperado a partir da solução de lavagem também mostraram morfologia particulada, Figura 5.7 (B).

Em um trabalho anterior do grupo, a polimerização *in situ* do pirrol foi realizada na superfície do PLGA, e foi observado que na superfície do filme ficou PPy aderido na morfologia particulada, Figura 5.8. (A). No entanto, na água de lavagem foi recuperado PPy na morfologia fibrilar, Figura 5.8. (B) [68].



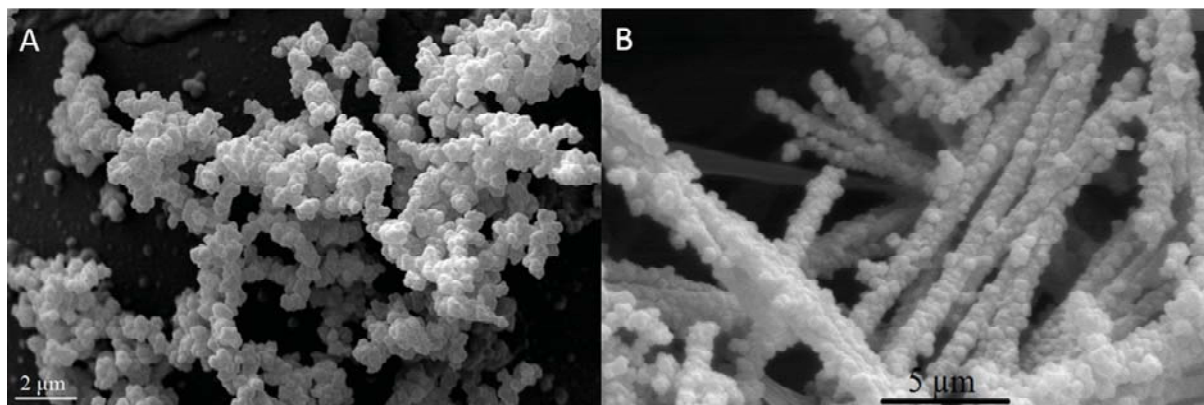


Figura 5.8. Imagem de MEV do filme PLGA – PPy *in situ*: (A) superfície do PLGA (15000x); (B) nanofibras de PPy (10.000x) [68].

Assim, neste trabalho foi verificado que essa abordagem para a produção de compósito polimérico *in situ*, para se obter uma maior concentração de polímero condutor na superfície não parece ser satisfatória.

Além dos filmes de quitosana, PLGA e dos compósitos com nanofibras de polipirrol, foram preparados três sistemas poliméricos estruturados em camadas:

1º) à uma camada de quitosana foi adicionado mais uma camada de nanofibras de PPy dispersas em PLGA (QT/PLGA-PPy);

2º) à uma camada de quitosana adicionou-se mais uma camada de PLGA (QT/PLGA);

3º) à uma camada de quitosana foi adicionado uma camada de PPy disperso em quitosana e sob essa segunda camada, foi adicionada mais uma camada de quitosana (QT/QT-PPy/QT).

O objetivo da preparação destes sistemas em camadas foi avaliar a influência de diferentes arquiteturas no controle do processo de degradação.

A morfologia desses sistemas em camadas também foi observados por MEV, entretanto a superfície de cada uma delas não apresentou diferença em relação aos filmes de camada única.

As propriedades elétricas dos compósitos de PLGA preparados foram avaliadas por meio de um eletrômetro. Para essa análise, foram preparados filmes com 10 cm de diâmetro utilizando uma massa de 2g de PLGA e 0,2g de PPy, respeitando a proporção de 10% da massa da matriz, que foi a proporção utilizada para a preparação de todos os compósitos poliméricos neste trabalho. O filme de PLGA apresentou uma condutividade de  $1 \times 10^{-14}$  S/cm, usando ambas as tensões (400V e 10V), apresentando-se bem isolante. Já o filme de PLGA-PPy mostrou-se mais condutor, pois usando a tensão de 400V, ele apresentou uma condutividade de aproximadamente  $1,6 \times 10^{-9}$  S/cm. Quando aplicado uma tensão de 10 V, sua condutividade aumentou para cerca de  $1 \times 10^{-7}$  S/cm.

As propriedades térmicas dos sistemas poliméricos preparados foram avaliadas por TGA. A Figura 5.9 apresenta o perfil de degradação com o aumento de temperatura dos sistemas QT BM 02; QT EM 02; QT EM 02 – PPy; PLGA e PLGA – PPy.

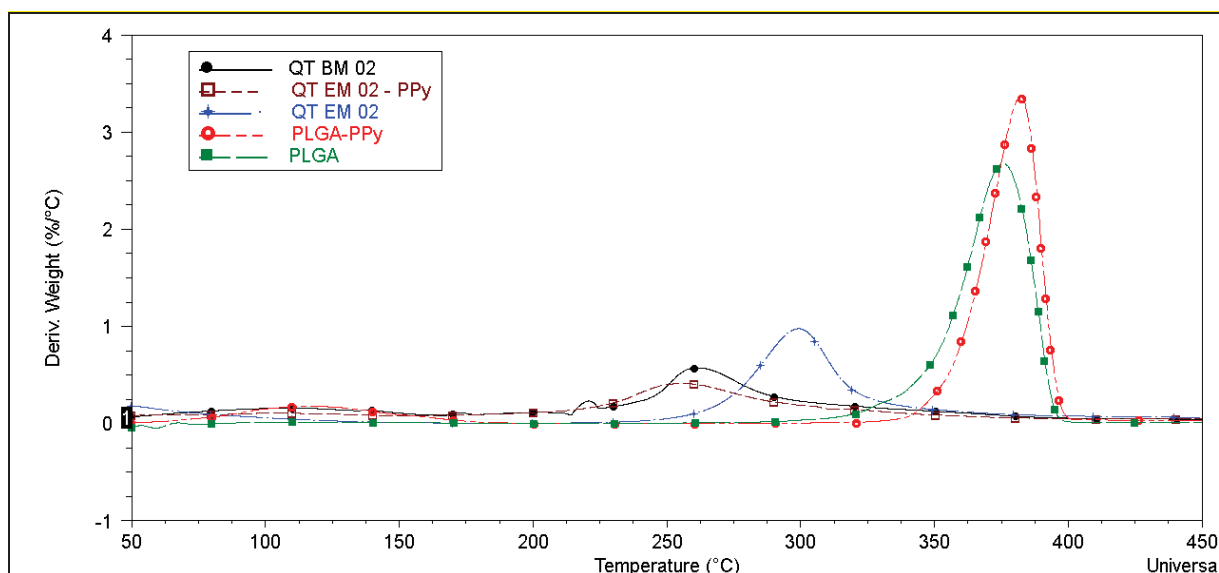


Figura 5.9. DTGA dos sistemas poliméricos.

O Filme PLGA-PPy apresentou a maior resistência térmica quando comparado com os demais filmes. O Filme QT EM 02 apresentou maior resistência



térmica que o filme QT BM 02 e o compósito QT EM 02- PPy. Como esperado, o filme de baixa massa molecular sofre degradação em uma temperatura menor que o de elevada massa molecular. O filme compósito QT EM 02 – PPy degradou sob influência de menor temperatura. Ao contrário do que foi observado para o PLGA a adição das nanofibras de PPy diminuiu a estabilidade térmica da quitosana, esse fenômeno pode ocorrer devido a interação da quitosana com as nanofibras. Materiais estruturados em forma de nanofibras apresentam uma maior superfície de contato e com isso suas propriedades físico-químicas podem gerar respostas diferentes quando disperso em matrizes diferentes.

A Figura 5.10 apresenta o termograma dos sistemas preparados PLGA; PLGA-PPy; QT BM 02; QT EM 02; QT EM 02 – PPy; QT EM 04; QT EM 04 – PPy; QT EM 06; QT EM 06 – PPy;

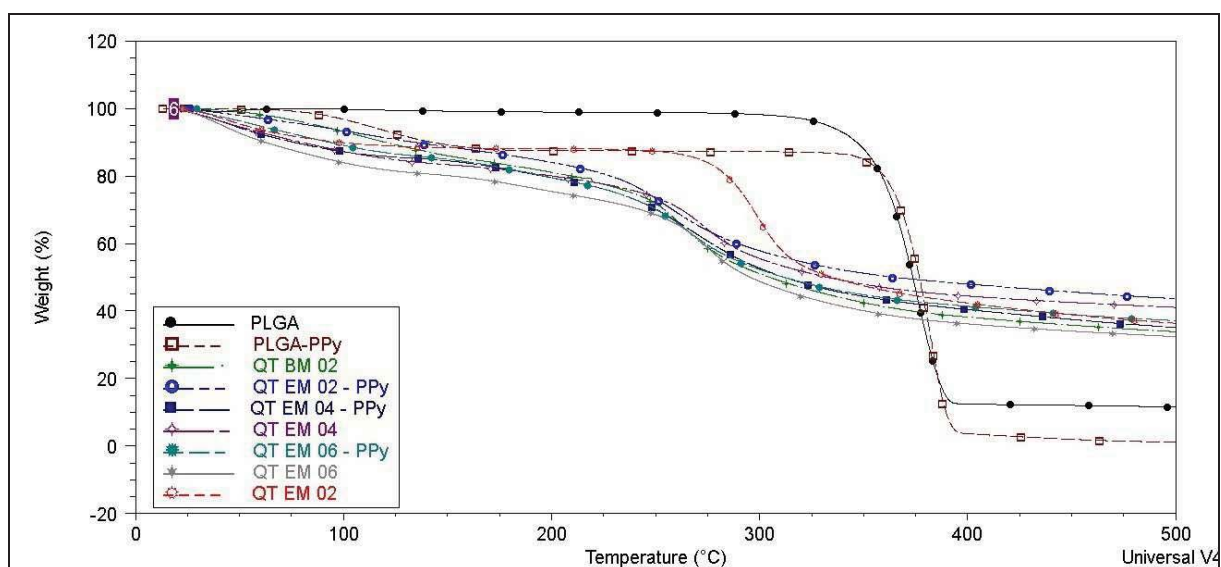


Figura 5.10. Termograma dos sistemas poliméricos.

As curvas termogravimétricas da quitosana e dos compósitos de QT mostram uma perda de massa em duas etapas [80]. A primeira perda de massa, que ocorreu até os 100°C, para os filmes de quitosana são referentes à perda de umidade da amostra e resíduos de ácido acético utilizado na produção do filme, portanto,

variações nessa etapa estão relacionadas com a capacidade de retenção de água no material. A segunda perda de massa inicia em torno de 200°C terminando em até 350°C esta etapa está relacionada ao processo de decomposição, que ocorre através das quebras das ligações glicosídicas seguida da decomposição das unidades monoméricas do polímero [80, 81].

O filme PLGA-PPy inicialmente perde até 100°C pouca massa, referente ao residual de clorofórmio utilizado na confecção do filme e a umidade presente na amostra. As amostras de PLGA apresentam uma boa estabilidade térmica até 300 °C e uma perda de massa acentuada de 300 a 400°C. Esta perda está relacionada à quebra das cadeias do polímero, chegando a um residual de 0,03% do PLGA puro e 10% de residual para o PLGA – PPy. O resíduo de 10% pode ser referente à carga de PPy adicionada que não degrada até 600°C.

As amostras de quitosana retêm mais umidade que as de PLGA, por isso a primeira perda de massa é maior. O resíduo final maior das amostras PLGA- PPy, QT EM 02 – PPy e QT EM 06 – PPy em relação as suas matrizes puras devem estar relacionadas ao fato do PPy não se degradar totalmente até 600 °C.

### **5.3. Ensaio de Degradação**

Foram realizados ensaios de degradação com os sistemas poliméricos QT EM 02, QT BM 02, QT EM 04, QT EM 06, PLGA, PLGA – PPy, QT EM 02 – PPy, QT EM 04 – PPy, QT EM 06 – PPy, QT/PLGA, QT/PLGA – PPy. A finalidade desses ensaios foi acompanhar o processo de degradação dos diferentes filmes preparados quando submersos numa solução de PBS. Este tipo de solução simula o pH e as trocas fluídicas do corpo humano. Após cada período de degradação (7, 14, 21, 28 e 35 dias), o processo de degradação foi avaliado por meio da perda de massa dos

filmes preparados. Desta forma, 6 réplicas de cada amostra foram secas e pesadas até a obtenção da massa constante. A porcentagem da perda de massa foi calculada utilizando a equação (5.1) [66].

$$\text{Perda de massa} = \left( \frac{P_0 - P_T}{P_0} \right) \times 100 \quad (5.1)$$

Onde  $P_0$  = peso da massa antes do teste de degradação e  $P_T$  = peso da massa seca após cada tempo de degradação.

A Figura 5.11. exibe o gráfico de perda de massa obtidos para os filmes QT EM 02, QT BM 02, QT EM 04, QT EM 06, PLGA, PLGA – PPy, QT EM 02 – PPy, QT EM 04 – PPy e QT EM 06 – PPy durante o período de degradação.

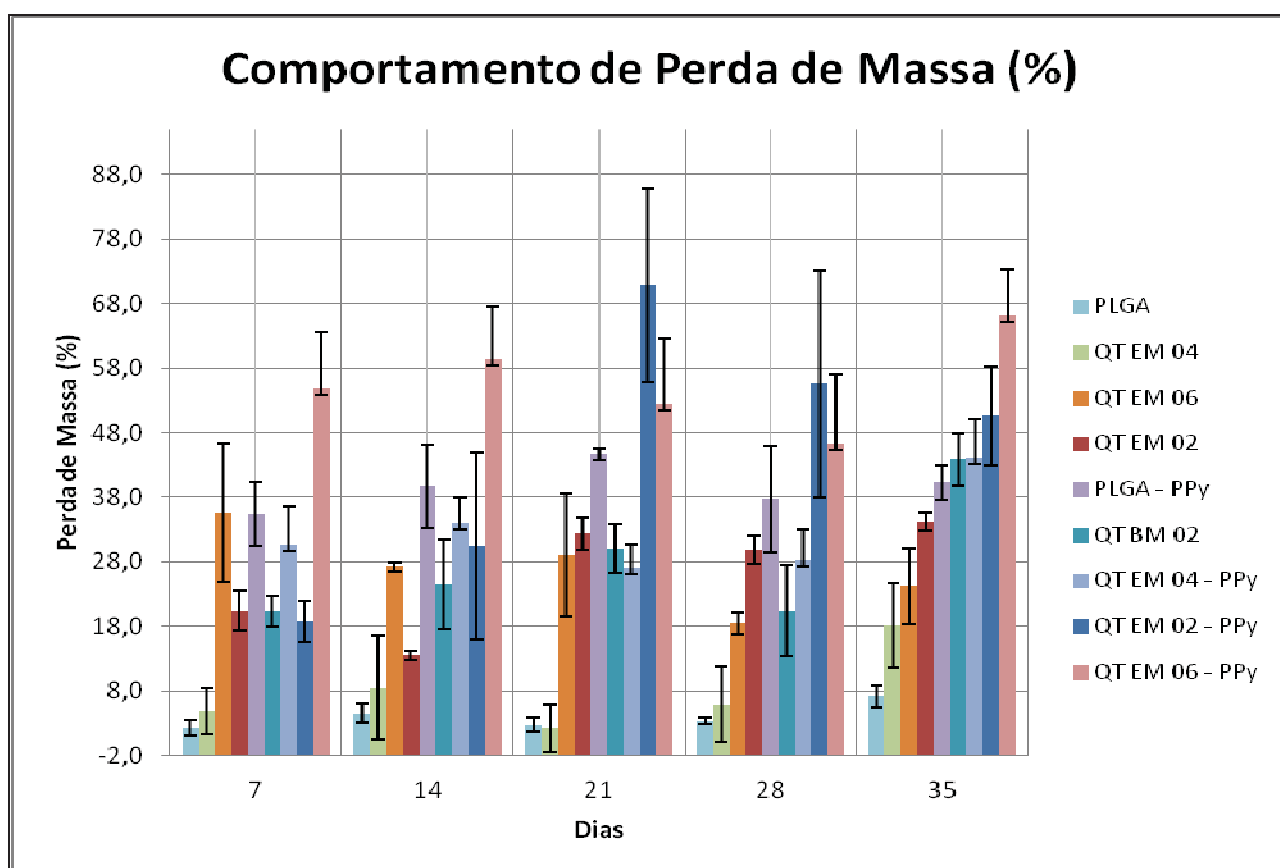


Figura 5.11. Gráfico do comportamento de perda de massa.

Apesar da dificuldade de executar o processo de medidas que se refletiu no desvio padrão, a partir do gráfico podemos observar que os filmes de quitosana de alto e baixo peso molecular degradaram-se mais rapidamente que os filmes de PLGA. Entre os filmes de PLGA, foi possível observar que o filme de PLGA-PPy apresentou uma perda de 40% de massa, enquanto o PLGA puro apresentou somente 7% de perda de massa. Os filmes compósitos apresentaram uma degradação maior que o filme do biopolímero puro, denotando que a adição do polipirrol favorece a degradação da matriz polimérica. A adição de uma carga em uma matriz pode reduzir a cristalinidade do material, a redução da cristalinidade favorece a degradação do mesmo, pois grau de organização das cadeias e a massa molecular do material influenciam diretamente no perfil de degradação do material [81]. Esse resultado também pode ser relacionado à morfologia mais rugosa das superfícies dos filmes, devido à presença das nanofibras que podem favorecer o processo de degradação.

As amostras dos filmes contendo as nanofibras de PPy que ficaram durante 35 dias em solução, apresentaram uma média 28% maior de perda de massa em relação aos filmes puros.

A quitosana de baixo peso molecular pura (QT BM 02) perde em média 9,7% a menos de peso, em 35 dias, quando comparada aos filmes compósitos de quitosana e PPy. No entanto, quando comparada aos filmes de quitosana de alto peso molecular sem a adição de PPy, a quitosana de baixo peso molecular degradou-se mais rapidamente. As cadeias poliméricas menores degradam mais rapidamente e, portanto o processo de degradação é mais rápido, neste caso.

Os filmes puros de quitosana de elevado peso molecular perdem 18% mais peso que o PLGA puro, aos 35 dias. Isso ocorre porque a quitosana absorve uma quantidade maior de água que o PLGA, acelerando assim a degradação por hidrólise.

Quando avaliamos a perda de massa do PLGA e a QT EM 04, observamos que ocorreu uma diminuição na perda de massa em relação aos 7 e aos 14 dias. Este fato pode estar relacionado ao processo de lavagem para a remoção dos sais

da solução de PBS da superfície do filme não ter sido adequada. Na massa total final da amostra pode estar somada ao peso adicional de cristais de sais da solução de PBS que ficaram aderidos à superfície das membranas mesmo após a lavagem. Na Figura 5.12. observa-se que cristais de sais de fosfato salino da solução tampão ficaram em grande quantidade aderidos a superfície da amostra de quitosana de 21 dias de degradação.

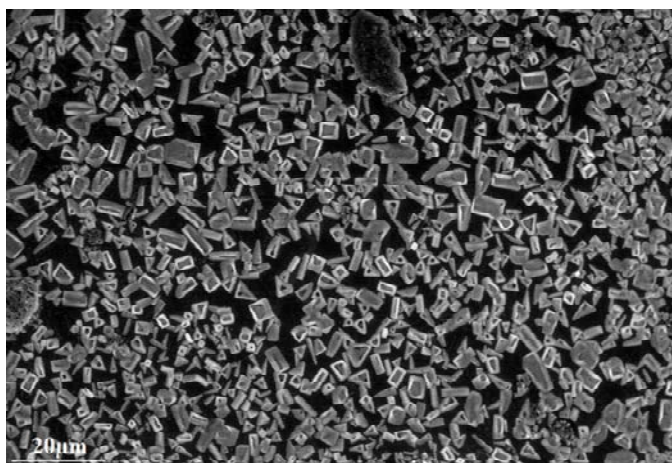


Figura 5.12. Filme de quitosana pura (QT EM 04) após 21 dias de degradação (2.000x).

Apesar dos demais filmes degradados não apresentarem um comportamento linear os valores então dentro do desvio padrão. Os erros associados a este ensaio podem estar relacionados às baixas massas das amostras utilizadas que variaram de 1mg a 4mg. Além disso, também devemos considerar a dificuldade de dispersar as nanofibras de polipirrol nas soluções mais concentradas de quitosana, resultando em filmes com diferentes distribuições.

Os filmes em camadas QT/PLGA PPy e QT / PLGA foram retirados do gráfico, pois durante a degradação algumas amostras descolaram, dificultando a análise da degradação. Além disso, a quitosana sofre uma hidratação muito maior que o PLGA em meio aquoso, como consequência a quitosana dilata e deforma o sistema polimérico. Devido ao fato dos dois polímeros não possuírem o mesmo

coeficiente de absorção de água, este sistema polimérico torna-se inviável. O coeficiente de absorção foi calculado pela equação (5.2) [66].

$$\text{Absorção de água} = \left( \frac{M_{tU} - M_{tS}}{M_{tS}} \right) \times 100$$

(5.2)

Onde  $M_{tU}$  = Massa úmida e  $M_{tS}$  = Massa seca.

Resultando em uma media de absorção de água de 206% para os filmes de quitosana e 23% para os filmes de PLGA.

A pesagem da massa úmida foi realizada retirando o excesso de água sobre a amostra colocando a sobre um papel filtro. A amostra é pesada contendo a umidade absorvida durante a submersão na solução tampão.

O Filme QT/ QT – PPy/ QT não participou do processo de degradação, pois ao adicionar cada camada, a camada de baixo do filme foi solubilizada pelo ácido acético, tornando o filme enrugado, como pode-se observar na Figura 5.13. Além de rugoso o filme apresentou rigidez e aderência muito grande à placa de Petri, quebrando ao ser destacado da placa. Devido a essas características apresentadas, o filme não é adequado ao que o trabalho propõe.



Figura 5.13. Filme QT QT/ QT – PPy/ QT.

O Filme QT EM – PPy *in situ* também não participou do processo de degradação pois ao ser seco, após a lavagem para a retirada dos resíduos da reação *in situ* ele se degradou. Na figura 5.14. pode ser observado o aspecto final do filme. Devido a essas características apresentadas, o filme não é adequado ao que propõe o trabalho.

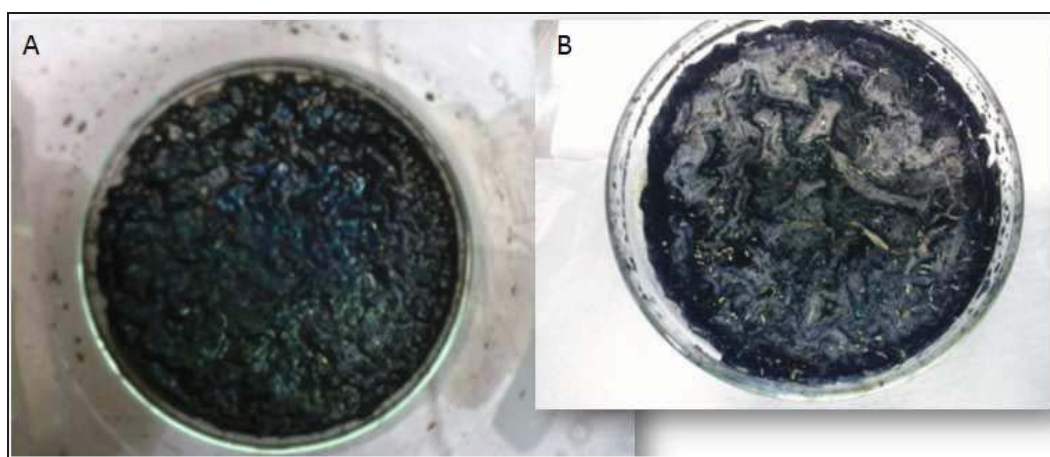


Figura 5.14. Reação *in situ*. (A) Aspecto do filme durante a Reação. (B) aspecto final do filme.

Alterações no pH da solução de PBS (pH ~7,4) foram monitoradas em função do tempo de degradação. O uso da solução tamponada permite uma simulação de degradação mais próxima do *in vivo*, e a solução pode neutralizar os radicais ácidos liberados pela hidrólise impedindo uma aceleração geral na degradação. No entanto, com o aumento na taxa de degradação esse controle fica cada vez mais difícil, e a tendência é o decaimento do pH [82, 83, 84, 85].

Neste trabalho, não ocorreu mudanças significativas nos valores de pH das soluções de PBS após os períodos de degradação. A solução contendo somente a solução tampão fosfato exposta às mesmas condições de temperatura e agitação (branco) manteve um comportamento de pH na faixa de 7,35-7,58, enquanto que as soluções dos demais filmes ficou na faixa de 7,35- 7,57. Desta forma, o



comportamento da solução PBS na presença dos filmes foi similar à solução branco, logo a degradação dos filmes até o período avaliado não acarretou em mudanças ao pH do meio.

O processo de degradação das amostras foi também acompanhado por meio de MEV. Na Figura 5.15. observa-se a degradação dos filmes QT EM 02 e QT EM 04 em 21 e 35 dias. Antes da degradação, os filmes apresentaram uma superfície lisa e homogênea, sem relevos aparente em um aumento de 10.000 vezes. No 21º dia a superfície começou a apresentar relevos, como pode ser observado na Figura 5.15. (B) e (E). Ao final dos 35 dias de degradação, a superfície apresentou relevos protuberantes e estruturas semelhantes a bolhas bem diferentes a imagem inicial e a imagem da degradação de 21 dias.

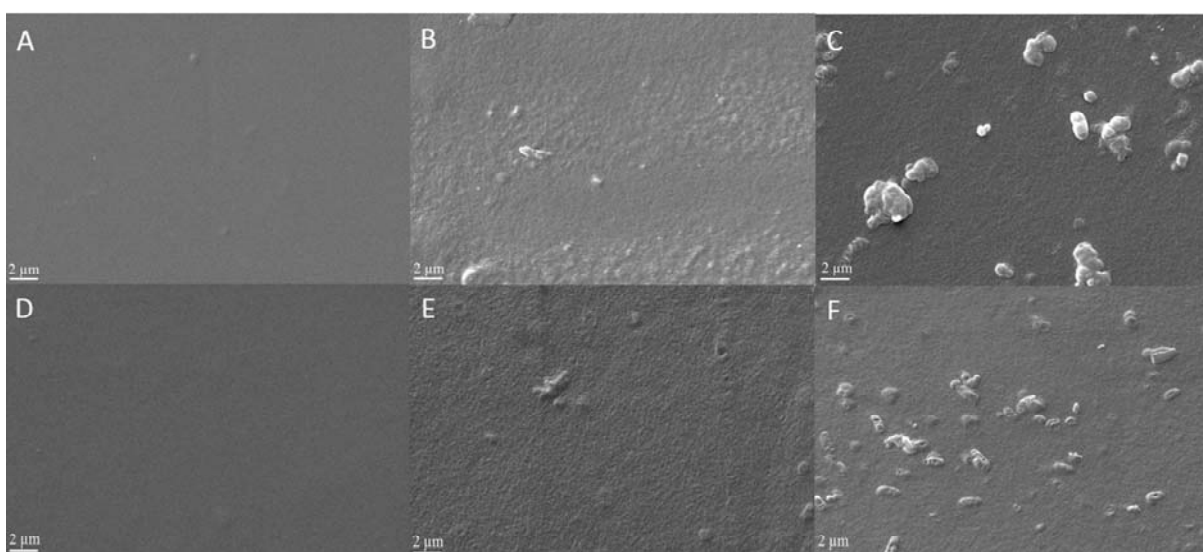


Figura 5.15. Imagens de MEV da superfície de filmes de quitosana (10.000x): (A) QT EM 02 antes da degradação; (B) QT EM 02 depois de 21 dias de degradação; (C) QT EM 02, 35 dias da degradação; (D) QT EM 04 antes da degradação; (E) QT EM 04 depois de 21 dias da degradação e (F) QT EM 04 35 dias de degradação.



Os filmes compósitos de quitosana também apresentaram alterações na superfície ao longo da degradação, como pode ser observado nas Figuras 5.16. e 5.17.

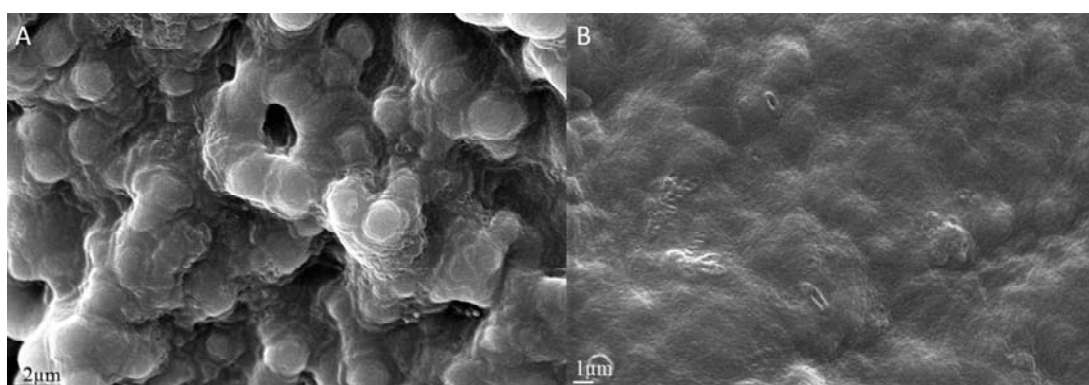


Figura 5.16. Imagens de MEV do Filme QT EM 02 – PPy (10.000x): (A) QT EM 02 - PPy antes da degradação; (B) QT EM 02 - PPy 35 dias de degradação.

Em geral, a amostra apresentou menos arcaçouços em relação à amostra não degradada, no entanto apresentou uma superfície com relevos. Isso pode ser devido ao fato de que durante a degradação da amostra, ela passa a degradar a superfície diminuindo a rugosidade. Deve-se levar em conta também, que as amostras de quitosana com polipirrol apresentaram maior perda de massa em relação aos outros filmes.

Na Figura 5.17 pode ser observado a degradação gradual do filme QT EM 04 - PPy aos 21 e 35 dias. Antes da degradação a amostra apresentou arcaçouços, porém o recobrimento da quitosana é mais liso. Esse recobrimento ficou mais rugoso ao longo da degradação e após 35 dias, essa superfície apresenta uma superfície mais rugosa.

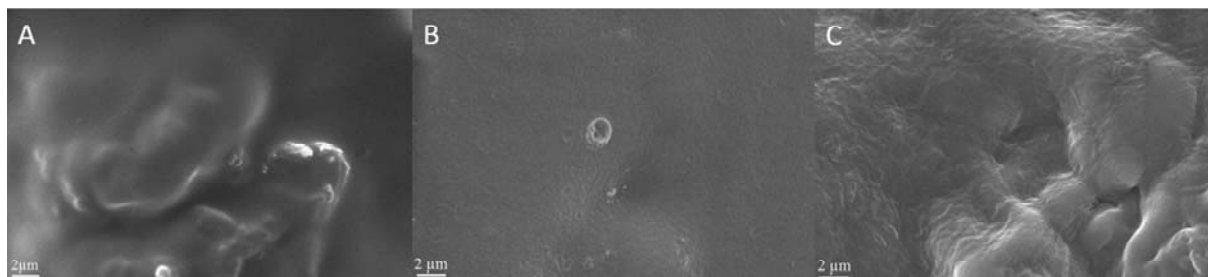


Figura 5.17. Imagens de MEV do Filme QT EM 04 – PPy, (10.000x): (A) QT EM 04 - PPy antes da degradação; (B) QT EM 04 - PPy 21 dias de degradação; (C) QT EM 04 - PPy 35 dias de degradação.

Na Figura 5.18. (B) pode ser observada a superfície do filme QT EM 06 e o filme de QT EM 06 – PPy após 35 dias de degradação. O comportamento, nesse caso, foi o mesmo apresentado nos casos anteriores.

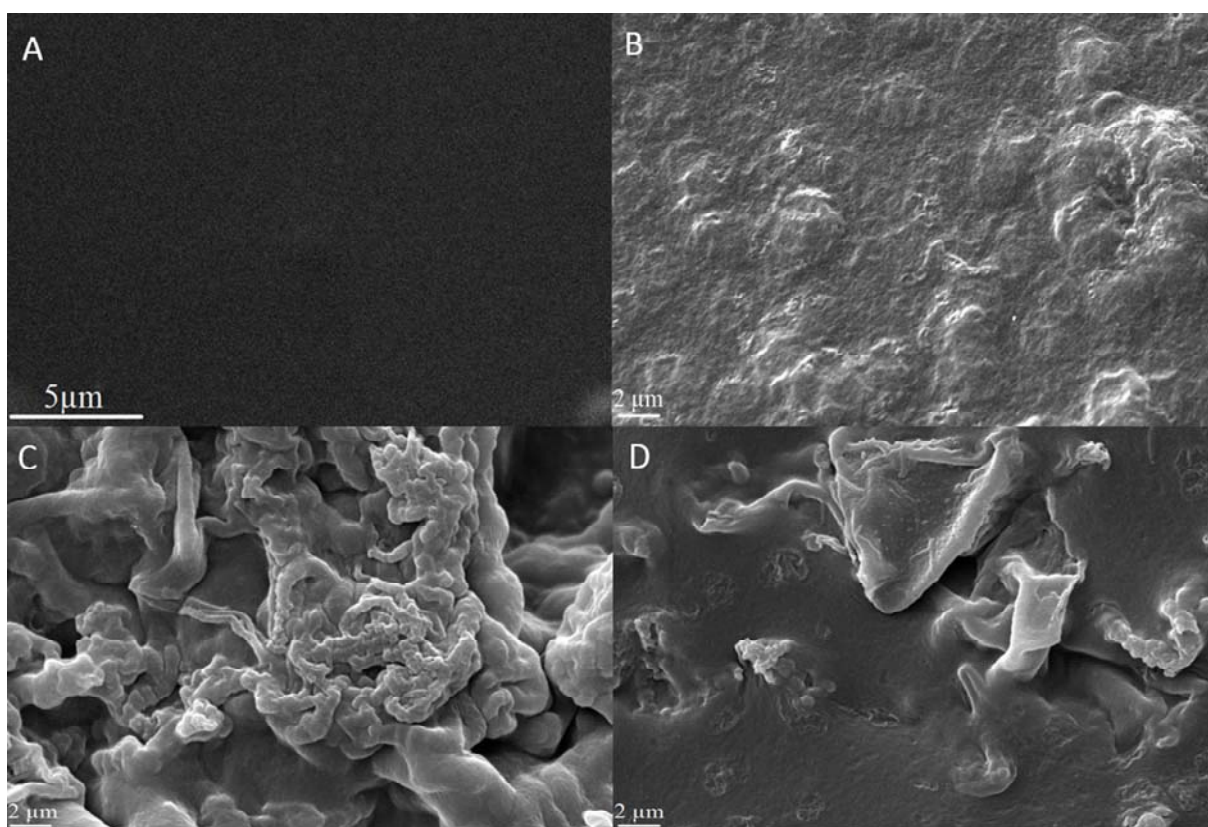


Figura 5.18. Imagens de MEV de Filmes de QT antes e após a degradação (10.000x): (A) QT EM 06 antes da degradação; (B) QT EM 06 35 dias de degradação; (C) QT EM 06 - PPy antes da degradação; (D) QT EM 06 - PPy 35 dias de degradação.

A degradação do filme QT BM 02 em 35 dias pode ser observada na Figura 5.19. (B). Observa-se que ocorreu um aumento do relevo da superfície e o surgimento de estruturas semelhantes a bolhas.

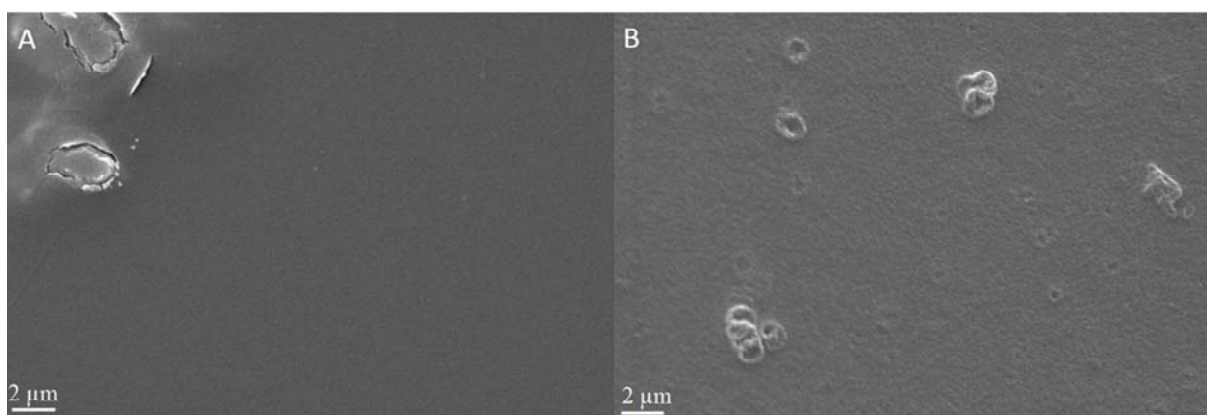


Figura 5.19. Filme QT BM 02 (10.000x): (A) QT BM 02 antes da degradação; (B) QT BM 02 depois de 35 dias de degradação.

Na hidratação da quitosana, são hidratados, primeiramente, grupos hidrofílicos. Após um longo período de hidratação, a estrutura polimérica incorpora uma maior quantidade de água que acaba preenche os espaços existentes entre as cadeias. Após a retirada das amostras na solução de PBS, elas são submetidas à secagem sob vácuo, o que pode resultar nessa morfologia de bolhas na superfície do filme.

O filme de PLGA também passou a apresentar relevos em sua superfície após 35 dias da degradação. As alterações nas superfícies podem ser observadas na Figura 5.20.

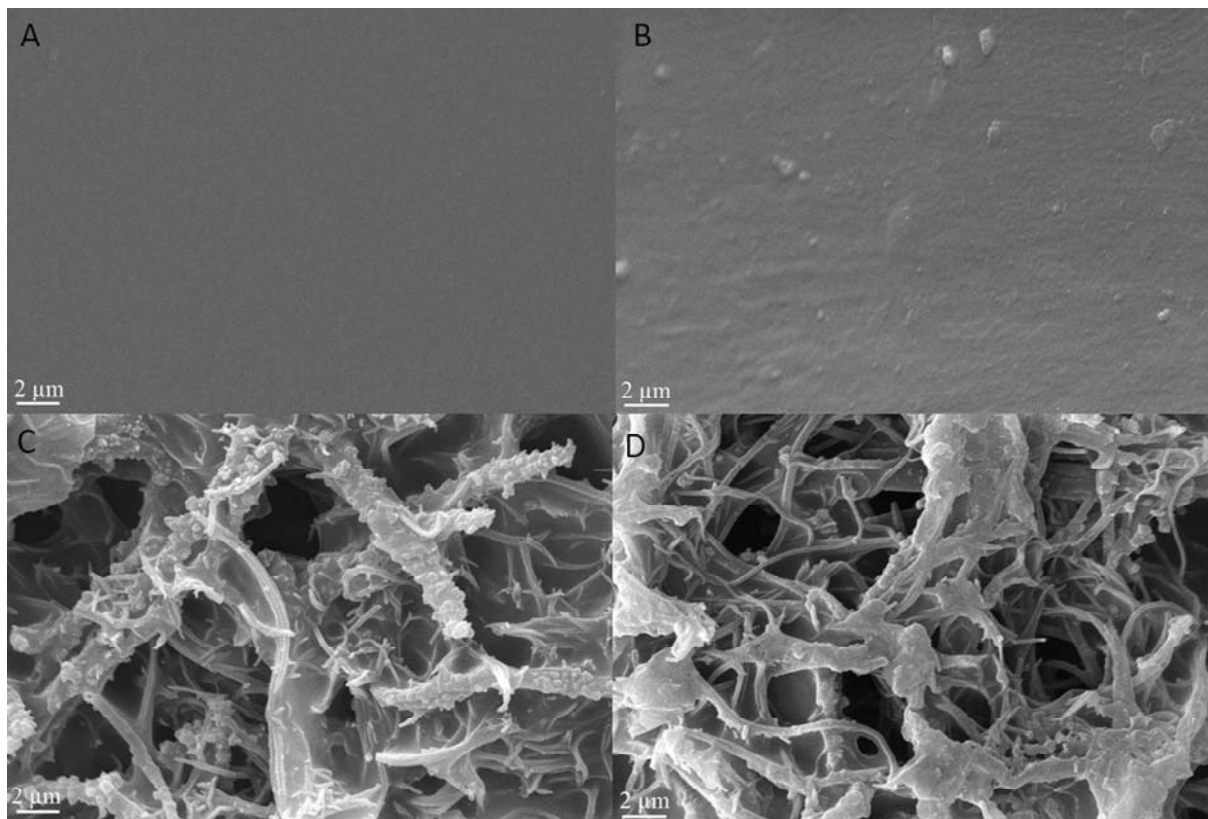


Figura 5.20. Imagens de MEV do filme de PLGA (10.000x): (A) PLGA antes da degradação; (B) PLGA após 35 dias de degradação. (C) PLGA – PPy antes da degradação; (D) PLGA – PPy após 28 dias de degradação.

Na Figura 5.20. (D) pode-se observar que após 35 dias a amostra apresentou uma leve diminuição na camada de PLGA que recobre o PPy na superfície mais externa.

Os filmes de PLGA e PLGA-PPy degradados foram analisados pela técnica de ATR/FT-IR. Na figura 5.21. estão destacadas as principais bandas que caracterizam o PLGA. Por meio do espectro de IV foi possível observar que a degradação ocorreu, pois a diminuição de intensidade das bandas fica evidente de acordo com o material degradado. Foi observado que o processo de perda de massa do PLGA- PPy (Espectro a), foi mais acentuado do que no PLGA puro, após 35 dias de degradação (Espectro b).

Entre 2996-2850  $\text{cm}^{-1}$  observou-se as bandas características de estiramentos simétricos e assimétricos de grupos  $\text{CH}_2$  e  $\text{CH}_3$  [42]. Em 1750 $\text{cm}^{-1}$ , visualizou-se uma banda intensa e aguda, causada pelo alongamento da ligação  $\text{C}=\text{O}$  dos ésteres, característica principal dos compostos de PLGA. No espectro estão presentes as bandas de deformação assimétrica de  $\text{CH}_3$  em 1382  $\text{cm}^{-1}$  e de  $\text{CH}_2$  em 1452  $\text{cm}^{-1}$  [42, 86].

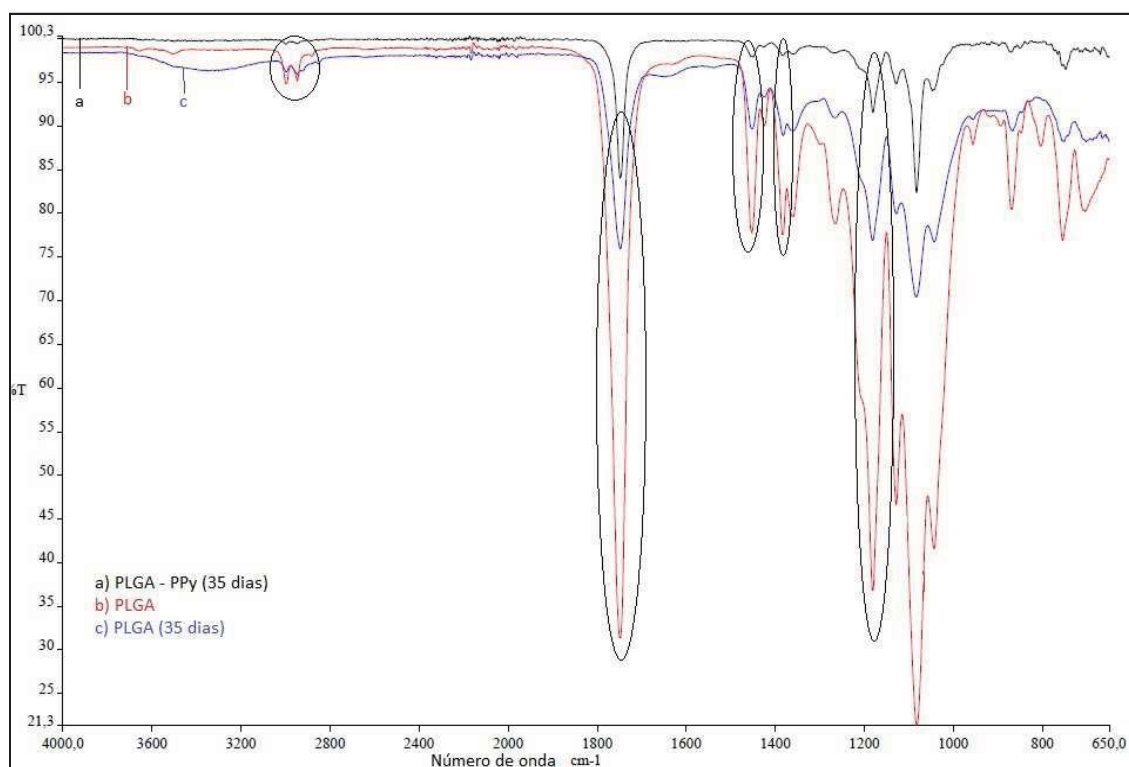


Figura 5.21. Espectro de IV dos filmes PLGA, PLGA após 35 dias de degradação e e PLGA- PPy após 35 dias da degradação.

As espessuras dos sistemas poliméricos preparados foram aferidas antes e após a degradação. A determinação da espessura do filme preparado, a partir de cada percentagem de massa usada, é um meio de padronizar o processo da confecção do filme. O processo é de difícil reprodutibilidade devido à elevada viscosidade das soluções que dificulta a confecção de filmes com espessuras homogêneas, considerando toda a área do filme. A partir da Tabela 5.2., mesmo



considerando o desvio padrão de algumas amostras, é possível observar um aumento da espessura dos filmes com o aumento da concentração de quitosana e PLGA e ainda com a adição das nanofibras de PPy. A Tabela 5.2. apresenta uma média dos valores das espessuras dos filmes preparados.

Tabela 5.2. Espessura dos sistemas poliméricos preparados.

Filme	Espessuras (micrometro)	
	Espe <span>ss</span> ura ( $\mu\text{m}$ )	Espe <span>ss</span> ura ( $\mu\text{m}$ )
	Antes da Degradação	Depois da Degradação
<b>QT EM 02</b>	42 $\pm$ 3	463 $\pm$ 49
<b>QT EM 04</b>	61 $\pm$ 9	1020 $\pm$ 44
<b>QT EM 06</b>	89 $\pm$ 9	1224 $\pm$ 84
<b>QT EM 02 - PPy</b>	55 $\pm$ 6	597 $\pm$ 95
<b>QT EM 04 - PPy</b>	94 $\pm$ 5	328 $\pm$ 69
<b>QT EM 06 - PPy</b>	124 $\pm$ 8	158 $\pm$ 95
<b>QT/PLGA -PPy</b>	118 $\pm$ 9	666 $\pm$ 73
<b>QT/PLGA</b>	119 $\pm$ 9	423 $\pm$ 76
<b>QT BM 02</b>	70 $\pm$ 11	227 $\pm$ 15
<b>PLGA</b>	57 $\pm$ 10	69 $\pm$ 11
<b>PLGA/PPy</b>	265 $\pm$ 14	1254 $\pm$ 97

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho, não foi possível verificar uma relação entre a espessura do filme e o tempo de degradação.

Após a degradação, os filmes apresentam valores mais elevados de espessura, pois as amostras degradadas deformam-se apresentando formas enrugadas, inchadas, abauladas ou formas tubulares, dificultando o procedimento do aferimento correto das espessuras (Figura 5.22 e Figura 5.23.).

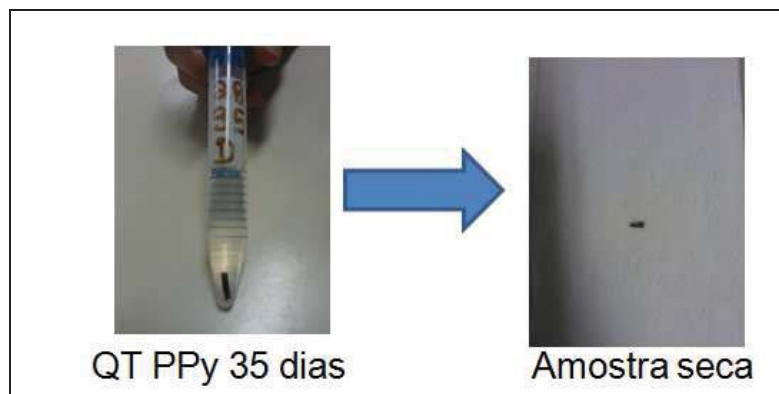


Figura 5.22. Formato de uma amostra de QT EM 02 – PPy após a degradação.

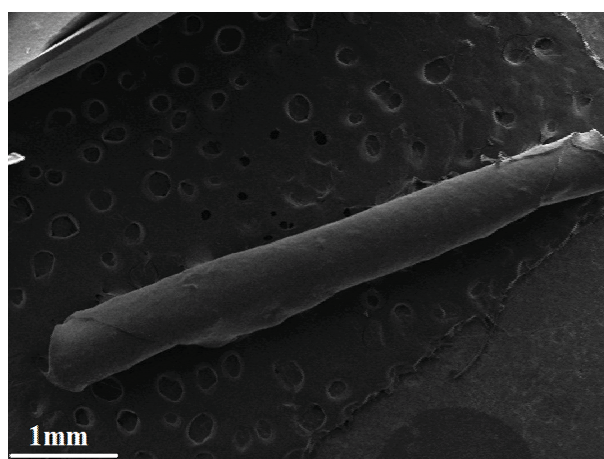


Figura 5.23. Imagem de MEV de uma amostra de QT EM 02 – PPy após a degradação.

O aumento da espessura dos filmes pode estar relacionado também ao processo de intumescimento das amostras em meio aquoso, pois ao absorver água o filme dilata e as moléculas de água incorporadas ao sistema continuam retidas na rede polimérica do filme até que sejam secas sob vácuo. Esse procedimento pode originar porosidades no material. As amostras de PLGA puro são as que menos deformam, pois absorvem menos água durante a degradação.

Com o intuito de investigar a ocorrência do aumento da espessura dos filmes de PLGA – PPy foi realizada uma análise topográfica por meio de Microscopia de Força Atômica, no modo *Peak Force Tapping*. Foram analisadas amostras dos filmes de PLGA – PPy antes da degradação e após 35 dias de degradação. A topografia dos filmes foi observada em uma área de 20x20  $\mu\text{m}^2$ . As imagens produzidas estão apresentadas na Figura 5.24 e Figura 5.25. A topografia do PLGA – PPy, Figura 5.24. (A) apresenta a imagem em 2D e (B) apresenta a imagem em 3D. Na figura 5.24. (A) foi possível observar uma superfície irregular com a presença de relevos. Na figura 5.24. (B) foi possível observar um relevo com altura máxima de 3,5 nm.

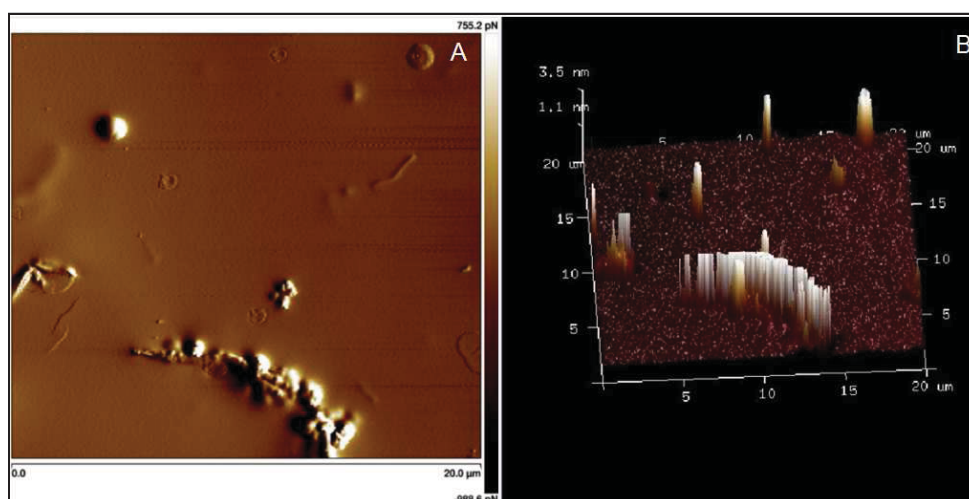


Figura 5.24. Imagens de AFM do filme de PLGA- PPy antes da degradação: (A) imagem em 2D; (B) imagens em 3D.

A figura 5.25. mostra a topografia do PLGA – PPy após 35 dias de degradação. Na figura 5.25. (A) foi possível observar uma superfície com bolhas, muito diferente da amostra observada antes da degradação. Na figura 5.25. (B) foi possível observar um relevo de altura máximo de 8,3 nm, confirmando que o processo de degradação ocasiona o aumento da espessura do filme devido a irregularidades formadas na superfície.



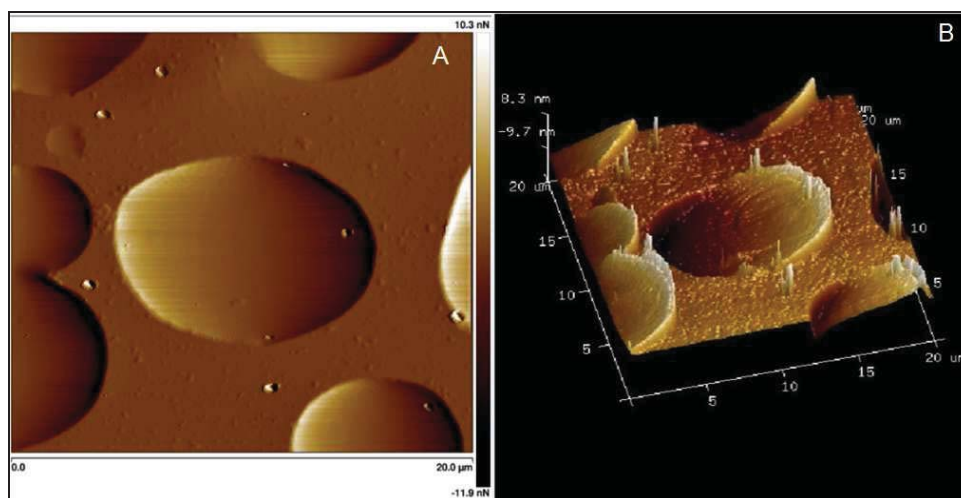


Figura 5.25. Imagens de AFM do PLGA- PPy após 35 dias da degradação: (A) imagem em 2D; (B) Imagem em 3D.

Com o objetivo de investigar a formação de porosidades no filme PLGA-PPy durante o processo de degradação, foi realizada posteriormente uma análise por meio da técnica de Microtomografia Computadorizada em uma amostra de PLGA - PPy após 35 dias de degradação. Na figura 5.26. podemos observar a imagem do polímero gerada pelo microtomógrafo. Nesta amostra, o polímero apresentou 32% de massa e 68% de porosidade.

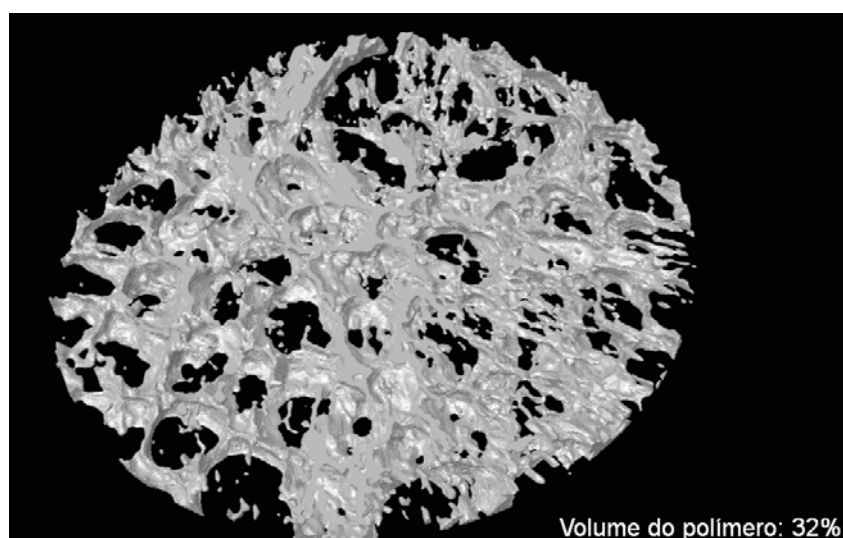


Figura 5.26. Imagem gerada por MicroCT de Raio X da Amostra de PLGA-PPy degradada ao longo de 35 dias.

Na figura 5.27. podemos observar a imagem da porosidade presente no polímero gerada pelo microtomógrafo.

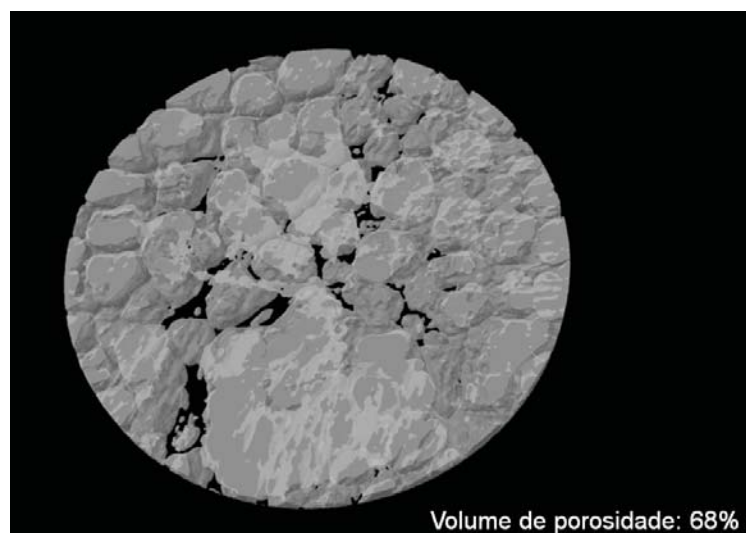


Figura 5.27. Imagem da porosidade do PLGA-PPy degradado durante 35 gerada pelo MicroCT de Raio x.

As análises de espessura juntamente com as caracterizações do material realizadas por AFM e Microtomografia Computadorizada sugerem que do processo de degradação até a secagem da amostra ocorre o aumento da espessura e porosidade.

## 6. CONCLUSÕES

Foram sintetizadas nanofibras de PPy via polimerização química oxidativa. A polimerização química oxidativa do pirrol utilizando o APTS como agente dopante resultou em nanofibras de PPy com condutividade elétrica de  $8 \times 10^{-4}$  S/cm. A adição de 10% de nanofibras de polipirrol à matriz isolante de PLGA ( $1,6 \times 10^{-9}$  S/cm) resultou em um compósito com uma condutividade elétrica de semicondutor ( $1 \times 10^{-7}$  S/cm).

A dispersão das nanofibras de PPy em PLGA ou QT modificou significativamente a superfície dos filmes produzidos, formando arcabouços que podem vir a favorecer a regeneração nervosa. Isto porque formam uma estrutura artificial que mimetiza a estrutura morfológica e a função do tecido biológico, favorecendo o crescimento celular.

A polimerização do pirrol na superfície dos filmes de quitosana (polimerização *in situ*) resultou em PPy com morfologia particulada e a reação danificou o filme, indicando que este não é o método adequado para a obtenção de um filme com maior concentração de nanofibras na superfície.

O estudo da degradação *in vitro* dos compósitos preparados demonstrou que a adição das nanofibras de PPy favoreceu a degradação da matriz polimérica, sem acarretar em alterações de pH para o meio da degradação.

Considerando os compósitos analisados neste estudo, os filmes PLGA-PPy e QT EM 04 – PPy apresentaram os resultados apropriados para o desenvolvimento de um conduto que venha a servir como guia para o crescimento de tecido nervoso. Esses filmes apresentaram uma morfologia adequada para o desenvolvimento celular e a perda mássica dos mesmos foi menor quando comparado aos outros compósitos avaliados neste estudo.

## 7. PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Na continuidade deste trabalho sugere-se:

Preparação de blendas de Quitosana e PLGA a fim de aumentar o tempo de degradação do material para 12 meses.

Avaliar a influência da adição de quantidades diferentes de PPy no processo e degradação dos compósitos.

Analisar a degradação do material em formato de tubo.

Ampliar o período de degradação *in vitro* dos sistemas poliméricos.

Avaliar a adesão celular às membranas.

Avaliar a regeneração nervosa *in vivo*.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[1] RODRÍGUEZ, F. J.; Valero-Cabre, A.; Navarro, X. Regeneration and functional recovery following peripheral nerve injury. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 1, n. 2, p. 177- 185, 2004.

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

[3] JUNG, Y.; Ng, J. H.; Keating, C. P.; Senthil-Kumar, P.; Zhao, J.; Randolph, M. A.; Winograd, J. M.; Evans, C. L. Comprehensive Evaluation of Peripheral Nerve Regeneration in the Acute Healing Phase Using Tissue Clearing and Optical Microscopy in a Rodent Model. **PLOS ONE**, v. 9, p. 1-12, 2014.

[4] CAO, W.; Cheng, M; AO, Q; Gong, Y; Zhao, N; Zhang, Xiufang. Physical, mechanical and degradation properties, and Schwann cell affinity of cross-linked chitosan films. **J. Biomater. Sci. Polymer Edn**, v. 16, p. 791–807, 2005.

[5] ICHIHARA, S; Inada, Y; Nakamura, T. Artificial nerve tubes and their application for repair of peripheral nerve injury: an update of current concepts. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 39S4, p. S29–S39, 2008.

[6] MENG, Z. X.; Zheng, W.; LI, L.; Zheng, Y.F. Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold. **Materials Chemistry and Physics**, v. 125, p. 606–611, 2011.

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

[8] LEE, J.Y.; Bashur, C.A.; Milroy, C.A.; Forciniti, L.; Goldstein, A.S.; Schmidt, C.E. Nerve growth factor-immobilized electrically conducting fibrous scaffolds for potential use in neural engineering applications. **IEEE transactions on nanobioscience**, v. 11, p. 15-21, 2012.

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

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

[11] ASSIS, O. B. G.; Da Silva, V. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em diversas Concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, p.223-228, 2003.

[12] KULISH, E. I; Fatkullina, R. R.; Volodina, V. P.; Kolesov, S. V.; Monakov , Y. B. Enzymatic Degradation of Modified Chitosan Films. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 80, p. 1178-1180, 2007.

[13] ITOH, S.; Suzuki, M.; Yamaguchi, I.; Takakuda, K.; Kobayashi, H.; Shinomiya, K.; Tanaka, J. Development of a Nerve Scaffold Using a Tendon Chitosan Tube. **Artif Organs**, v. 27, p.1079–1088, 2003.

[14] LEUNG, V.; Ko, F. Biomedical applications of nanofibers. **Polymers for Advanced Technologies**, v. 22, p. 350-365, 2011.

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

[16] Lundborg G. Nerve regeneration and repair. **Acta Orthop Scand**, v. 58, p. 45-69, 1987.

[17] RIVEROA, S.; GARCÍA, M.A.; PINOTTI, A. Crosslinking capacity of tannic acid in plasticized chitosan films. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p. 270–276, 2010.

[18] LARANJEIRA, M. C. M.; Fávere. V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova.**, v. 32, No. 3, 672-678, 2009.

[19] THAKHIEW, W.; Devahastin, S; Soponronnarit, S. Effects of drying methods and plasticizer concentration on some physical and mechanical properties of edible chitosan films. **Journal of Food Engineering**, v. 99, p. 216–224, 2010.



[20] HUANGA, H.; Wua, J.; Lina, X.; Li,L; Shangb, S.; Yuenb, M. C.; Yana, G. Self-assembly of polypyrrole/chitosan composite hydrogels. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 72– 76, 2013.

[21] SILVA, H. S. R. C.; Dos Santos; K. S. C. R; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Quim. Nova.**, v. 29, No. 4, p. 776-785, 2006.

[22] BATTISTI, M. V.; Filho, S. P. C. Obtenção e caracterização de  $\alpha$ -quitina e quitosanas de cascas de *Macrobrachium rosenbergii*. **Quim. Nova.**, v. 31, p. 2014-2019, 2008.

[23] DASH, M.; Chiellin, F; Ottenbrite, R. M.; Chiellini, E. Chitosan - A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 36 p. 981–1014, 2011.

[24] MUZZARELLI, R.A.A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, V. 76, p. 167–182, 2009.

[25] DOS SANTOS, J. E.; Soares, J.P.; Dockal, E. R.; Campana Filho S. P.; Cavalheiro. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 13, nº 4, p. 242-249, 2003.

[26] NÓBREGA, A. K. C. Formulação de pastas cimentícias com adição de suspensões de quitosana para simentação de poços de petróleo. Natal. 2009. 135

p. Tese (Doutorado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Centro de Ciências Exatas e da Terra. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Brasil.

[27] PAUL, W.; Sharma, C. P. Chitosan and Alginate Wound Dressings: A Short Review. **Trends Biomater. Artif. Organs**, v. 18, p. 18-23, 2004.

[28] WANG, X.; Makitie, A. A.; Paloheimo, K.; Tuomi, J.; Paloheimo, M. A Tubular PLGA-Sandwiched Cell/Hydrogel Fabrication Technique Based on a Step-by-Step Mold/Extraction Process. **Advances in Polymer Technology**, v. 30, No. 3, p. 163–173, 2011.

[29] MENGA, Z.X.; Zhenga, W.; Li, L.; Zheng, Y.F. Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold. **Materials Chemistry and Physics**, v. 125, p. 606–611, 2011.

[30] NGUYEN, T.; Lee, B. The effect of cross-linking on the microstructure, mechanical properties and biocompatibility of electrospun polycaprolactone–gelatin/PLGA–gelatin/PLGA–chitosan hybrid composite. **Sci. Technol. Adv. Mater.**, v. 13, p.11, 2012.

[31] RAVIS, J. Sill, Horst A. von Recum. Electrospinning: Applications in drug delivery and tissue engineering. **Biomaterials**, v. 29, p. 1989-2006, 2008.

[32] DENG C.; Li, F.; Griffith, M.; Ruel, M.; Suuronen, E. J. Application of Chitosan-Based Biomaterials for Blood Vessel Regeneration. **Macromol. Symp.**, v. 297, p.138–146, 2010.

[33] KIM, M. J.; Kim,J.H.; Yi,G.; Lim,S.; Hong,Y.S.; Chung,D. J. In vitro and in vivo Application of PLGA Nanofiber for Artificial Blood Vessel. **Macromolecular Research**, v. 16, No. 4, p. 345-352, 2008.

[34] ITOH, S.; Suzuki, M.; Yamaguchi, I.; Takakuda, K.; Kobayashi, H.; Shinomiya, K.; Tanaka, J. Development of a Nerve Scaffold Using a Tendon Chitosan Tube. **Artif Organs**, v. 27, p.1079–1088, 2003.

[35] LI, X.; Wang, W.; Wei, G.; Wang, G.; Zhang,W.; Ma, X. Immunophilin FK506 loaded in chitosan guide promotes peripheral nerve regeneration] [Clinical and mechanistic differences between FK506 (tacrolimus) and cyclosporin A. **Biotechnol Lett.**, v. 32, p.1333–1337, 2010.

[36] VASCONCELOS, R. S.; Zanis Neto,J.; Parolin, M.; Coelho, J.; Müller, P. G. O. Anemia hemolítica microangiopática induzida por tacrolimus e ciclosporina. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30(6) p. 505-506, 2008.

[37] OJAGH, S. M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S. H.; Hosseini, S. M. H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chemistry**., v. 122, p.161–166, 2010.

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

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

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

[41] REZENDE, C. A.; LUCHESI, C.; BARBO, M.D. L. P.; DUEK, E. A. R. Membranas de Poli (Ácido Lático-Co-Ácido Glicólico) como Curativos para Pele: Degradação In Vitro e In Vivo. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n° 3, p. 232-238, 2005.

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

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

[44] BOCCACCINI, A. R.; et al. Bioresorbable and bioactive polymer/bioglass composites with tailored pore structure for tissue engineering applications. **Composites Science and Technology**, v. 63, p.2417-2429, 2003.

[45] BOCCACCINI, A.R.; Blaker, J.J.; Maquet, V.; Jérôme, R. Preparation and characterisation of poly (lactide-co-glycolide) (PLGA) and PLGA/Bioglass® composite tubular foam scaffolds for tissue engineering. **Mat. science and engineering C. biomimetic and supramoleculiar svstems**, v. 25, p. 23-31, 2005.

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

[47] FISCHER, S.; Foerg, C.; Merkle, H. P.; Gander, B. Chitosan Coated Plga-Microspheres - A Modular System for Targeted Drug Delivery. **European Cells and Materials**, v. 7, p. 11-12, 2004.

[48] CHRONOPOULOUA, L.; Massimib, M.; Giardib, M. F.; Camettic, C.; Devirgiliis, L. C.; Dentinia, M.; Paloccia, C. Chitosan-coated PLGA nanoparticles: A sustained drug release strategy for cell Cultures. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 103, p. 310– 317, 2013.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[60] PEIGHAMBARDOUST, S. J.; Pourabbas, B. Synthesis and Characterization of Conductive Polypyrrole/Montmorillonite Nanocomposites via One-pot Emulsion Polymerization. **Macromol. Symp.**, v. 247, p. 99–109, 2007.

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

[62] LEE, J. Y.; Bashur, C. A.; Goldstein, A. S.; Schmidt; C. E. Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. **Biomaterials**, v. 30, p 4325–4335, 2009.

[63] WANG, X.; Gu, X.; Yuan, C.; Chen, S.; Zhang, P.; Zhang, T.; Yao, J.; Chen, F.; Chen, G. Evaluation of biocompatibility of polypyrrole in vitro and in vivo. **Journal of Biomedical Materials Research A**, v. 68, p. 411-422, 2004.

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

[65] ASTM-American Society for Testing and Materials International. Standard test method for in vitro degradation testing of hydrolytically degradable polymer resins and fabricated forms for surgical implants. ASTM F 1635-11. West Conshohocken, United States, p. 19428-2959, 2011.

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

[67] CHINAGLIA, D.L. et al., Espectroscopia de impedância no laboratório de ensino. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, São Paulo, v. 30, n. 4, p. 4504-1-4504-9, 2008.

[68] VALENTE, C. A. Síntese de nanofibras de polipirrol para potencial aplicação em conduto biodegradável para regeneração nervosa. Porto Alegre. 2014. 140p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais) Faculdade de Engenharia. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande Do Sul, Brasil.

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

[70] GUPTA, N.D.; Banerjee, D.; Das, N.S.; Chattopadhyay, K.K. Kinetics of micelle formation and their effect on the optical and structural properties of polypyrrole



nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 385, p. 55-62, 2011

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

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

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

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

[75] LIU, J., Wan, M. Studies on Formation Mechanism of Polypyrrole Microtubule Synthesized by Template-Free Method. **Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry**, v. 39, p. 997-1004, 2001.

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

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

[78] BASAVARAJA, C.; Kim, N.R.; Jo, E.A.; Pierson, R.; Huh, D.S.; Venkataraman, A. Transport Properties of Polypyrrole Films Doped with Sulphonic Acids. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v. 30, n.11, p.2701-2706, 2009.

[79] BALINT, R.; Cassidy, N.J; Cartmell, S.H. Conductive polymers: Towards a smart biomaterial for tissue engineering. **Acta Biomaterialia**, v. 10, p. 2341-2353, 2014.

[80] MUKOMA, P.; Jooste, B.; Vosloo, H. Synthesis and characterization of crosslinked chitosan membranes for application as alternative proton exchange membrane material in fuel cells. **Journal of power sources**, v. 136, p. 16-23, 2004.

[81] PENICHE, C. Self-curing membranes of chitosan /PAA IPNs obtained by radical polymerization: preparation, characterization and interpolymer complexation. **Biomaterials**, v. 20, p. 1869-1878, 1999.

[82] KURITA, K.; KAJI, Y.; MORI, T. e NISHIYAMA, Y. Enzymatic degradation of chitin: susceptibility and the influence of deacetylation. **Carbohydrate Polymers**, v. 42, p.19-21, 2000.

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

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

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

[86] CHEN, C. C. et al. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. **Biomat.**, v. 24, p. 1167-1173, 2003.

## 9. ANEXO A

Relação de filmes produzidos.

N°	Filme	Descrição
1	QT EM 02	<b>0,2g</b> de quitosana de <b>Elevada Massa</b> molecular solubilizada em ácido acético. Seco em estufa em temperatura de 50°C.
2	QT BM 02	<b>0,2g</b> de quitosana de <b>Baixa Massa</b> .
3	QT EM 04	<b>0,4g</b> de quitosana de <b>Elevada Massa</b> molecular.
4	QT EM 06	<b>0,6g</b> de quitosana de <b>Elevada Massa</b> molecular.
5	PLGA	<b>0,2 g</b> de PLGA solubilizados em clorofórmio. Técnica da evaporação do solvente em atmosfera ambiente.
6	PLGA-PPy	<b>0,2 g</b> de PLGA e <b>0,02g</b> de PPy são solubilizados em clorofórmio. Técnica da evaporação do solvente em atmosfera ambiente.
7	QT EM 02 - PPy	<b>0,2g</b> de QT e <b>0,02g</b> de PPy foram solubilizados em ácido acético.
8	QT EM 04 - PPy	<b>0,4g</b> de quitosana e <b>0,04g</b> de PPy foram solubilizados em ácido acético.
9	QT EM 06 - PPy	<b>0,6g</b> de quitosana e <b>0,06g</b> de PPy foram solubilizados em ácido acético.
10	QT/PLGA	Foi preparado um filme usando a metodologia descrita no preparo do filme 1. Após a secagem em estufa é vertido sobre o filme de quitosana uma solução de PLGA preparada conforme descrição no preparo do filme 5.
11	QT/PLGA - PPy	Um filme de quitosana é preparado usando a mesma metodologia do filme 1. Após a secagem em estufa é vertido sobre ele uma solução idêntica preparada conforma a descrição do preparo do filme 6.
12	QT EM - PPy <i>in situ</i>	Em um filme de quitosana com a mesma metodologia usada na preparação do filme 1, realizou-se a polimerização <i>in situ</i> do pirrol.
13	QT/QT-PPy/QT	Foi preparado um filme de quitosana com a mesma metodologia de preparo do filme 1. Após a secagem em estufa, verteu-se sobre o filme de quitosana uma solução preparada com a metodologia utilizada no preparo do filme 8. Após a secagem ocorreu mais uma vez a adição de uma solução de quitosana preparada conforme descrição do filme 1

## 10. ANEXO B



Designation: F1635 – 11

### **Standard Test Method for *in vitro* Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants<sup>1</sup>**

This standard is issued under the fixed designation F1635; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscript epsilon ( $\epsilon$ ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.



Designation: F1635 – 11

## Standard Test Method for *in vitro* Degradation Testing of Hydrolytically Degradable Polymer Resins and Fabricated Forms for Surgical Implants<sup>1</sup>

This standard is issued under the fixed designation F1635; the number immediately following the designation indicates the year of original adoption or, in the case of revision, the year of last revision. A number in parentheses indicates the year of last reapproval. A superscripted epsilon ( $\epsilon$ ) indicates an editorial change since the last revision or reapproval.

### 1. Scope

1.1 This test method covers *in vitro* degradation of hydrolytically degradable polymers (HDP) intended for use in surgical implants.

1.2 The requirements of this test method apply to HDPs in various forms:

1.2.1 Virgin polymer resins, or

1.2.2 Any form fabricated from virgin polymer such as a semi-finished component of a finished product, a finished product, which may include packaged and sterilized implants, or a specially fabricated test specimen.

1.3 This test method provides guidance for mechanical loading or fluid flow, or both, when relevant to the device being evaluated. The specifics of loading type, magnitude, and frequency for a given application are beyond the scope of this test method.

1.4 The values stated in SI units are to be regarded as standard. No other units of measurement are included in this standard.

1.5 *This standard does not purport to address all of the safety concerns, if any, associated with its use. It is the responsibility of the user of this standard to establish appropriate safety and health practices and determine the applicability of regulatory limitations prior to use.*

### 2. Referenced Documents

2.1 *ASTM Standards:*<sup>2</sup>

D638 Test Method for Tensile Properties of Plastics

D671 Test Method for Flexural Fatigue of Plastics by

Constant-Amplitude-of-Force (Withdrawn 2002)<sup>3</sup>

D695 Test Method for Compressive Properties of Rigid Plastics

D747 Test Method for Apparent Bending Modulus of Plastics by Means of a Cantilever Beam

D790 Test Methods for Flexural Properties of Unreinforced and Reinforced Plastics and Electrical Insulating Materials

D882 Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting

D1708 Test Method for Tensile Properties of Plastics by Use of Microtensile Specimens

D1822 Test Method for Tensile-Impact Energy to Break Plastics and Electrical Insulating Materials

D2857 Practice for Dilute Solution Viscosity of Polymers

F748 Practice for Selecting Generic Biological Test Methods for Materials and Devices

2.2 *Other Referenced Standard:*

ISO 31–8 Physical Chemistry and Molecular Physics – Part 8: Quantities and Units

ISO 10993–1 Biological Evaluation of Medical Devices—Part 1 Evaluation and Testing<sup>4</sup>

ISO 10993–9 Biological Evaluation of Medical Devices—Part 9 Framework for Identification and Quantification of Potential Degradation Products<sup>4</sup>

NIST Special Publication SP811 Guide for the Use of the International System of Units (SI)<sup>5</sup>

### 3. Terminology

3.1 *Definitions:*

3.1.1 *absorbable, adj—in the body*—an initially distinct foreign material or substance that either directly or through intended degradation can pass through or be assimilated by cells and/or tissue.

<sup>1</sup> This test method is under the jurisdiction of ASTM Committee F04 on Medical and Surgical Materials and Devices and is the direct responsibility of Subcommittee F04.15 on Material Test Methods.

Current edition approved March 1, 2011. Published March 2011. Originally approved in 1995. Last previous edition approved in 2004 as F1635 – 04a. DOI: 10.1520/F1635-11.

<sup>2</sup> For referenced ASTM standards, visit the ASTM website, [www.astm.org](http://www.astm.org), or contact ASTM Customer Service at [service@astm.org](mailto:service@astm.org). For *Annual Book of ASTM Standards* volume information, refer to the standard's Document Summary page on the ASTM website.

<sup>3</sup> The last approved version of this historical standard is referenced on [www.astm.org](http://www.astm.org).

<sup>4</sup> Available from American National Standards Institute (ANSI), 25 W. 43rd St., 4th Floor, New York, NY 10036, <http://www.ansi.org>.

<sup>5</sup> Available from National Institute of Standards and Technology (NIST), 100 Bureau Dr., Stop 1070, Gaithersburg, MD 20899-1070, at <http://physics.nist.gov/cuu/Units/bibliography.html>.



 F1635 – 11

Note 1—See Appendix X2 for a discussion regarding the usage of absorbable and other related terms.

3.1.2 *hydrolytically degradable polymer (HDP)*—any polymeric material in which the primary mechanism of chemical degradation in the body is by hydrolysis (water reacting with the polymer resulting in cleavage of the chain).

3.1.3 *resin*—any polymer that is a basic material for plastics.<sup>6</sup>

#### 4. Summary of Test Method

4.1 Samples of polymer resins, semi-finished components, finished surgical implants, or specially designed test specimens fabricated from those resins are placed in buffered saline solution at physiologic temperatures. Samples are periodically removed and tested for various material or mechanical properties at specified intervals. The required test intervals vary greatly depending on the specific polymeric composition. For example, poly(*L*-lactide) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) degrade very slowly and can require two or more years for complete degradation. Polymers based substantially on glycolide can completely degrade in two to three months depending on the exact composition and on the size of the specimen. Degradation time is also strongly affected by specimen size, polymer molar mass, and crystallinity.

Note 2—The term molecular weight (abbreviated MW) is obsolete and should be replaced by the SI (Système Internationale) equivalent of either relative molecular mass ( $M_r$ ), which reflects the dimensionless ratio of the mass of a single molecule to an atomic mass unit [see ISO 31–8], or molar mass ( $M$ ), which refers to the mass of a mole of a substance and is typically expressed as grams/mole. For polymers and other macromolecules, use of the symbols  $M_w$ ,  $M_n$ , and  $M_z$  continue, referring to mass-average molar mass, number-average molar mass, and  $z$ -average molar mass, respectively. For more information regarding proper utilization of SI units, see NIST Special Publication SP811.

#### 5. Significance and Use

5.1 This test method is intended to help assess the degradation rates (that is, the mass loss rate) and changes in material or structural properties, or both, of HDP materials used in surgical implants. Polymers that are known to degrade primarily by hydrolysis include but are not limited to homopolymers and copolymers of *L*-lactide, *D*-lactide, *D,L*-lactide glycolide, caprolactone, and *p*-dioxanone.<sup>7</sup>

5.2 This test method may not be appropriate for all types of implant applications or for all known absorbable polymers. The user is cautioned to consider the appropriateness of the test method in view of the materials being tested and their potential application (see X1.1.1).

5.3 Since it is well known that mechanical loading can increase the degradation rate of absorbable polymers, the presence and extent of such loading needs to be considered when comparing *in vitro* behavior with that expected or observed *in vivo*.

5.3.1 *Mechanically Unloaded Hydrolytic Evaluation*—Conditioning of a hydrolysable device under mechanically

unchallenged hydrolytic conditions at 37°C in buffered saline is a common means to obtain a first approximation of the degradation profile of an absorbable material or device. It does not necessarily represent actual *in vivo* service conditions, which can include mechanical loading in a variety of forms (for example, static tensile, cyclic tensile, shear, bending, and so forth). If the performance of a device under its indicated use includes loading, hydrolytic aging alone is NOT sufficient to fully characterize the device.

5.3.2 *Mechanically Loaded Hydrolytic Evaluation*—The objective of loading is to approximate (at 37°C in buffered saline) the actual expected device service conditions so as to better understand potential physicochemical changes that may occur. Such testing can be considered as necessary if loading can be reasonably expected under *in vivo* service conditions. When feasible, test specimens should be loaded in a manner that simulates *in vivo* conditions, both in magnitude and type of loading. Clinically relevant cyclic load tests may include testing to failure or for a specified number of cycles followed by testing to evaluate physicochemical properties.

5.3.2.1 *Static Loading*—It is notable that for some polymeric materials it has been shown that a constant load results in the same failure mechanism (for example, creep) and is the worst case when compared to a cyclic load (where the maximum amplitude of the cyclic load is equal to the constant load). Thus, in specific cases it may be acceptable to simplify the test by using a constant load even when the anticipated *in vivo* loading is cyclic. It is incumbent upon the user of this test method to demonstrate through experiment or specific reference that this simplification is applicable to the polymer under investigation and does not alter the failure mode of the test specimen. If such evidence is not available, it is necessary to recognize that static loading and cyclic loading are measuring different material properties and are not comparable. Using one to replace the other could lead to misinterpretation of the results.

Note 3—Caution must be taken to ensure that fixturing does not introduce artifactual performance or degradation issues, or both. An example is the use of rigid foam block, which restricts swelling & expansion and can elevate pull out strength test results from sample compression within the block. Additionally, restricted perfusion due to the closed cell nature of the foam can result in concentration of acidic byproducts that result in accelerated degradation when compared to a normally perfused and buffered *in vivo* condition.

Note 4—When performing degradation testing under load, it may be necessary to consider and monitor polymer creep during testing, which may be significant.

5.4 Absorbable devices subjected to flow conditions (for example, vascular stents, particularly those with a drug eluting component) may degrade more rapidly than the same device maintained under static degradation test conditions. When it is feasible to estimate the flow conditions that an implant will be subjected to *in vivo* and replicate them *in vitro* the degradation study should be conducted under flow conditions. However, details regarding appropriate flow modeling are beyond the scope of this test method.

5.5 Sterilization of HDP materials should be expected to cause changes in molar mass or structure, or both, of the polymers. This can affect the initial mechanical and physical

<sup>6</sup> *Polymer Technology Dictionary*, Tony Wbclan ed., Chapman & Hall, 1994.

<sup>7</sup> *Handbook of Biodegradable Polymers*, A.J. Domb ed., Harwood Academic Publishers, 1997.



 F1635 – 11

properties of a material or device, as well as its subsequent rate of degradation. Therefore, if a test is intended to be representative of actual performance *in vivo*, specimens shall be packaged and sterilized in a manner consistent with that of the final device. Non-sterilized specimens may be included for comparative purposes.

## 6. Materials and Apparatus

**6.1 Physiologic Soaking Solution**—A phosphate-buffered saline (PBS) solution shall be used. The pH of the solution shall be maintained at  $7.4 \pm 0.2$  (see X1.3) unless it is determined through documented literature or self-advised study that the pH should be different due to the physiological conditions of the intended application (this may require use of an alternate buffer system). Limited excursions outside of the specified pH range are tolerable provided the time weighted average pH after buffer replenishment is maintained within this range (see X1.3.1). The ionic concentration should be in the physiological range for the intended application (for example, a solution that contains 0.1 M phosphate buffer and 0.1 M NaCl would be appropriate for most tissue or blood contact devices). The solution-to-HDP mass ratio shall be as high as practical. Although there is some experience with ratios as low as 20:1, the experimenter is cautioned that at lower ratios (that is, less buffering capacity) the solution pH may change more quickly. In accordance with 9.1.3 and X1.4, aging/testing is to be terminated if the solution temperature or pH are allowed to drift outside of the specified ranges. Higher solution/specimen ratios (for example, 100:1) will be more likely to facilitate maintenance of stable aging conditions.

6.1.1 Over the course of the study, the pH should be monitored frequently and the solution shall be changed periodically in order to maintain the pH within the acceptable limits. Refer to X1.5 for additional information.

6.1.2 Other physiologic solutions, such as bovine serum, may be substituted provided the solution is properly buffered. An anti-microbial additive should be used to inhibit the growth of microorganisms in the solution during the test period but the investigator must demonstrate through literature reference or experimentation that the chosen antimicrobial does not affect the degradation rate. Section X1.6 provides additional information. The appropriate MSDS should always be consulted concerning toxicity, safe use, and disposal of such additives.

**6.2 Sample Container**—A self-contained, inert container (bottle, jar, vial, and so forth) capable of holding the test sample and the required volume of physiologic soaking solution (see X1.7). Multiple samples may be stored in the same container provided that suitable sample separation is maintained to allow fluid access to each sample surface and to preclude sample-to-sample contact. Each container must be sealable against solution loss by evaporation.

**6.3 Constant Temperature Bath or Oven**—An aqueous bath or heated air oven capable of maintaining the samples and containers at physiologic temperatures,  $37 \pm 2^\circ\text{C}$ , for the specified testing periods.

**6.4 pH Meter**—A pH metering device sensitive in the physiological range (pH 6 to pH 8) with a precision of 0.02 or better.

**6.5 Balance**—A calibrated weighing device capable of measuring the weight of a sample to a precision of 0.1 % of its initial weight. A balance having precision to 0.05 % or 0.01 % will facilitate establishment of an appropriate specimen drying period.

**6.6 Other**—Additional equipment as deemed appropriate by the specific test method.

## 7. Sampling

**7.1 Weight Loss**—A minimum of three samples shall be tested per time period.

**7.2 Molar Mass**—A minimum of three samples shall be tested per time period.

**7.3 Mechanical Testing**—A minimum of six samples shall be tested per time period.

**NOTE 5**—Statistical significance may require more than the minimum number of samples to be tested.

**7.4 Solution Temperature and pH**—Soaking solutions shall be tested on a periodic basis throughout the test duration. The required test period is dependent on the degradation rate of the test polymer, the solution/specimen mass ratio, and the solution's buffering capacity; once per week is generally practical and suggested. In cases where no prior knowledge of the degradation rate is available, it is suggested that the pH be tested at least daily until a baseline is established. This increased sampling frequency may need to be repeated during periods of elevated mass loss (that is, pH change).

## 8. Sample and Test Specimen

8.1 All test samples shall be representative of the material under evaluation.

8.1.1 For most HDP resins, inter-lot variations in the molar mass and residual monomer content can be significant. Since these factors can strongly affect degradation rates, molar mass (or inherent viscosity) and residual monomer content of the source resin and fabricated test parts need to be understood.

8.1.2 Where evaluation aims allow, it is recommended that samples comparing variations in design be produced from the same material lot (or batch) and under the same fabrication conditions.

8.1.3 When testing for inter-lot variability in degradation rate (for example, for process validation purposes), a minimum of three resin lots should be used.

8.2 If a test is intended to be representative of actual performance *in vivo*, specimens shall be packaged and sterilized in a manner consistent with that of the final device. Unsterilized control specimens may be included for comparative purposes showing the effects of sterilization.

## 9. Procedure

### 9.1 Test A, Weight Loss:

9.1.1 Test samples, in either resin or fabricated form, shall be weighed to a precision of 0.1 % of the total sample weight prior to placement in the physiological solution. Samples shall be dried to a constant weight before initial weighing (see **Note**



 F1635 – 11

6 and X1.8). Drying conditions, including final relative humidity (if applicable), shall be reported and may include the use of a desiccator, partial vacuum, or elevated temperatures (see Note 7).

9.1.2 Test samples shall be fully immersed in the physiological solution for a specified period of time as discussed in 4.1 (for example, 1 week, 2 weeks, and so forth).

9.1.3 Upon completion of the specified time period, each sample shall be removed, gently rinsed with sufficient distilled water to remove saline, placed in a tared container, and dried to a constant weight (see Note 6 and X1.8). The weight shall be recorded to a precision of 0.1 % of the original total sample weight.

Note 6—Drying to a constant weight may be quantified as less than 0.1 % weight change over a period of 48 h, or less than 0.05 % change in 24 h if the balance used is capable of such precision. Section X1.8 provides additional information.

Note 7—Elevated temperatures may be used to assist drying of the sample provided that the temperature used does not induce material or chemical changes in the sample. Vacuum drying with a dry gas purge can alternately be used without concern for material degradation. The drying conditions used for the samples prior to aging and for the samples retrieved at each test interval shall be identical. The actual drying conditions used are to be reported.

9.1.4 After weighing, the samples shall not be returned to the physiological solution and shall be retired from the study.

## 9.2 Test B, Molar Mass:

9.2.1 Prior to placement of samples in the physiological solution, determine the molar mass of representative samples using either inherent viscosity (logarithmic viscosity number) testing following the recommendations of Test Method D2857 or size exclusion chromatography. Testing shall be done in a solvent appropriate for the test polymer and at a temperature sufficient to allow solubility and temperature control. For example, the molar mass of poly(*l*-lactide) should be determined in chloroform at 30°C. The sample dilution ratio (mg/cm<sup>3</sup>) and test temperature shall be reported. Alternative means of molar mass determination may be used when feasible.

9.2.2 Test samples shall be fully immersed in the physiological solution for the specified period of time (for example, 1 week, 3 weeks, 52 weeks, and so forth).

9.2.3 Samples shall be removed at each specified time period throughout the duration of the test, dried as in 9.1.1, and tested for inherent viscosity as above. For polymers that undergo very rapid degradation, the molar mass may change significantly during the drying procedure, causing an overestimate of the degradation rate. Therefore the user should exercise caution in interpretation of this data. This caution does not generally apply to mass loss measurements, since continued degradation after the samples are placed in tared containers will not affect the sample mass unless the degradation products are volatile. For rapidly degrading HDP materials, alternative procedures such as vacuum drying should be considered.

## 9.3 Test C, Mechanical Testing:

9.3.1 Determine the appropriate mechanical properties of representative samples of resin or fabricated forms using tensile, compressive, torque, bending or other appropriate mechanical tests prior to placement of the samples in the

physiological solution (time zero). Relevant ASTM test methods may include one or more of the following:

Test Method D638

Test Method D671

Test Method D695

Test Method D747

Test Method D790

Test Method D882

Test Method D1708

Test Method D1822

9.3.2 Fully immerse test samples in the physiological solution at 37°C for the specified period of time (for example, 1 week, 2 weeks, and so forth).

9.3.3 Remove samples at each specified time period throughout the duration of the study and test using the originally selected mechanical test methods and conditions. Unless otherwise deemed relevant, samples should be tested in a non-dried or wet condition. Section X1.9 provides additional information. Testing conditions, wet versus dry, testing temperature, and so forth, should be reported.

9.3.4 Unless specifically germane to the testing scheme, samples shall be retired after the completion of each test.

## 9.4 Other Testing:

9.4.1 The characterization of other material properties and use of other test methods (for example, thermal properties measured using Differential Scanning Calorimetry) may also be performed at each test interval. Conditioning and testing parameters, as well as test results, should all be recorded and reported.

9.4.2 The degradation products of the HDP under investigation may be analyzed. ISO 10993-9 provides guidelines for identification and quantification of degradation products.

9.4.3 Biological response to HDP materials or their degradation products may be investigated. Practice F748 and ISO 10993-1 provide guidelines for the selection of *in vitro* and *in vivo* biocompatibility tests for medical devices and materials.

## 10. Test Termination

10.1 Testing of samples shall be terminated when one or more of the following has occurred:

10.1.1 A predetermined end point has been reached, that is, elapsed time (for example, 2 years), percent weight loss, minimum molar mass, percent strength loss, and so forth.

10.1.2 Sample integrity has been compromised by the progression of degradation or by mechanical damage to the point that meaningful and reliable data may no longer be obtained.

10.1.3 The soaking solution temperature or pH has drifted outside of the ranges specified in Section 6. Any sample properties obtained since the last in-range temperature and pH measurements shall be considered invalid and so noted in the study report (see X1.4).

## 11. Report

11.1 Report the following information:

11.1.1 Test material description, batch or lot number and dimensions (as appropriate).

11.1.2 Solution composition and preparation procedures.



 F1635 – 11

11.1.3 Measurements of solution temperature and pH with time, if applicable.

11.1.4 Sample weights expressed as an average percentage loss, initial and subsequent by time period.

11.1.5 Molar mass, initial and subsequent by time period.

11.1.6 Mechanical properties (tensile strength, compressive strength, stiffness, elongation at break, and so forth) appropriate for tests performed, at time zero and at each time period.

11.1.7 Other material properties measured.

11.1.8 Reason(s) for test termination.

## 12. Precision

12.1 Intralaboratory and interlaboratory reproducibility has not been systematically determined.

## 13. Keywords

13.1 absorbable; bioabsorbable; degradation; *in vitro*; hydrolytically degradable polymer; hydrolysis; PLA, poly(*l*-lactic acid); poly(*d*-lactide); poly(*d,l*-lactide); PGA, poly(glycolide); poly(*ε*-caprolactone); poly(*p*-dioxanone); surgical implant

## APPENDICES

### (Nonmandatory Information)

#### XI. RATIONALE

XI.1 With the development of absorbable polymers for use in implantable devices, there is a need to define standard testing methods that aid in characterizing material and mechanical properties with time in a simulated physiological environment. This test method is intended only as a framework for assessing degradation of implant materials and devices.

XI.1.1 This test method is written for use in characterizing hydrolytically degradable polymer resins and devices. Given the wide variety of absorbable polymer compositions currently available or under investigation, it is incumbent upon the researcher to show through reference or experimentation that other degradation mechanisms are not dominant for the material and the intended use. For example, certain bio-polymers (for example, collagen based materials such as gelatin) are known to degrade *in vivo* primarily by enzymatic attack and the use of this method would give a serious underestimation of the degradation rate. It has also been hypothesized that enzymatic degradation may play a role in the degradation of some synthetic polymers. *in vitro* studies have shown that in sufficient concentration certain enzymes (for example, esterases) may increase degradation rates of specific polymers with susceptible bonds. However, when comparisons have been made between *in vitro* and *in vivo* degradation rates of equivalent samples of hydrolytically degradable polymers under unloaded conditions, the results have consistently shown that *in vivo* acceleration of degradation is either not present or is within the error of measurement.<sup>7</sup>

XI.2 It is recognized that the use of test coupons or specimens in forms other than final implant configurations may be helpful in assessing relevant polymer properties. For example, rectangular or round rods may be necessary to measure flexural properties, while a screw geometry may be required to evaluate the performance of a specific implantable device. However, specimen size, surface area, and process considerations must be addressed in order to relate *in vitro* degradation of test specimens to *in vivo* behavior of implant devices.

XI.3 The pH level specified for the buffered saline solution (that is,  $7.4 \pm 0.2$ ) was selected on the basis of information

received from two consultants to the Task Group that this range of pH values was representative of that found in human blood and extra-cellular fluid. For devices intended for use in applications where the fluid environment has a different pH (for example, urethral stents exposed to urine), a different pH specification may be more appropriate. It is then incumbent upon the researcher to properly document the choice of environmental conditions. The range of  $\pm 0.2$  should be maintained regardless of the chosen target value of pH.

XI.3.1 For this application, the time weighted average (TWA) pH is computed using the following equation:

$$\text{TWA pH} = \frac{(\text{pH}_1 t_1) + (\text{pH}_2 t_2) + (\text{pH}_3 t_3) + \dots + (\text{pH}_n t_n)}{(t_1 + t_2 + t_3 + \dots + t_n)} \quad (\text{X1.1})$$

where:

pH = measured pH at the respective sampling point,

$t_j$  = elapsed time from buffer replenishment, and

$t_n$  = elapsed time from the prior sampling point.

XI.3.2 It is also recommended that the starting pH of the solution be made as close to the upper end of the chosen range as possible since all known HDP systems generate degradation products that are acidic.


XI.3.3 Information regarding the actual impact both alkaline (pH = 10.09) and acidic (pH = 5.25) pH has on the mechanical properties of absorbable sutures (as observed at pH = 7.44) can be found in Chu.<sup>8</sup>

XI.4 Termination of testing, following a significant change in solution temperature or pH, is indicated in 10.1.3 in order to avoid the generation of invalid results once meaningful loss of control over soaking conditions has occurred.

XI.5 A wide variety of PBS compositions is available and in common use. The components are targeted to achieve final solutions that exert near-physiological osmotic pressures of

<sup>8</sup>Chu, C. C., "The Effect of pH on the *in vitro* Degradation of Poly(glycolide lactide) Copolymer Absorbable Sutures," *Journal of Biomedical Materials Research*, 16, 1982, pp. 117-124.



 F1635 – 11

approximately 280 to 300 mOsm. Common buffer concentrations range from approximately 0.01 to 0.1 M with the higher concentrations providing greater buffering capacity. Additional information about the composition and preparation of pH proportioned monobasic-dibasic phosphate buffer solutions may be found in a handbook available from Calbiochem Inc., a division of EMD Biosciences.<sup>9</sup>

X1.6 Addition of sodium azide at a concentration of 0.1 % is common. Other antimicrobials that are commonly used include penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL), and amphotericin (0.25 to 2.5 µg/mL). Regardless of the antibiotic or antimicrobial agent(s) that is used, it is incumbent upon the investigator to determine that their use does not affect the degradation rate of the HDP under investigation. These materials may be hazardous and all persons using them should review the MSDS before handling and use all recommended safety precautions.

X1.7 The inert containers used to hold the samples and solution are usually glass or plastic. However, for some (short duration) tests, stainless steel containers may be appropriate.

X1.8 Revision or further specification of requirements for drying to a constant weight are intended to be developed from

<sup>9</sup> Available from EMD Biosciences, Inc., 10394 Pacific Center Ct., San Diego, CA 92121. <http://www.emdbiosciences.com>

round robin testing to follow issuance of this test method. The requirements stated in Note 6 are based on experience with extruded 3.2-mm diameter rods of *l*-PLA dried under nominal full vacuum at room temperature. Constant weight was achieved after 3 to 4 days.

X1.9 Task Group members have observed the use of wet versus dry test conditions to result in significant differences in some mechanical property measurements. It is recommended that testing be performed on specimens that are immersed in water at 37°C at the time of testing. Report whichever conditions are actually used.

X1.10 This test method does not suggest the use of agitation during soaking for the following reasons. First, in the majority of applications for absorbable polymers, implantation occurs in tissues that will not expose the implants to measurable fluid flow. Even in cases where turnover of fluids occurs, such as in the abdominal cavity, the device will become encapsulated in fibrous tissue within two weeks of implantation. The presence of the fibrous capsule will shield the material from fluid flow and limit transport mechanisms to diffusion. Furthermore, studies comparing static *in vitro* degradation rates to *in vivo* degradation rates for several HDP materials have shown that the *in vitro* results are predictive of the *in vivo* degradation rates.<sup>7</sup>

## X2. TERMINOLOGY

X2.1 Synthetic implants fabricated from hydrolysable alpha-hydroxy polyesters have been described as "absorbable" since the first polyglycolide based sutures were commercialized in the United States in the 1970s. At that time, both poly(glycolide) (DEXON - Davis & Geck) and poly(glycolide-co-lactide) copolymer (VICRYL - Ethicon) based sutures were classified as "Absorbable Surgical Suture" by the United States Pharmacopeia (USP) and the United States Food & Drug Administration (US-FDA), a designation that remains to this day. In contrast with "Nonabsorbable Surgical Suture," synthetic glycolide-lactide and collagen based sutures undergo hydrolytic and/or enzymatic driven chain scission, generating byproducts that are then absorbed by the body. Since designation, other terms such as "degradable" and "resorbable" have been used interchangeably to describe absorbable implants, with the prefix "bio-" often applied to all these terms.

X2.2 Based on historical usage and regulatory precedent, this document preferentially utilizes the term absorb/

absorbable/absorption to describe implantable synthetic hydrolysable polymers & devices. The prefix "bio" is avoided since it is redundant in the context of implant applications. "Resorb" and its derivatives are avoided since they are accepted medical terms routinely utilized to describe natural resorption processes present in dynamic tissue, such as osteoclastic driven bone remodeling. "Degrade" and its various derivatives are avoided when referring to either an implantable device or raw material since common utilization is routinely applied broadly to include composting and other natural processes (including ultra-violet radiation) that cause materials to either intentionally or unintentionally break down into chemical and/or particulate matter. However, use of the term "degrade" and its derivatives is considered acceptable when referring to chain scission within the implantable device or polymer (e.g. "The absorbable implant degrades through hydrolysis." or "During extrusion, absorbable polyglycolide is prone to thermal degradation.").



## F1635 – 11

*ASTM International takes no position respecting the validity of any patent rights asserted in connection with any item mentioned in this standard. Users of this standard are expressly advised that determination of the validity of any such patent rights, and the risk of infringement of such rights, are entirely their own responsibility.*

*This standard is subject to revision at any time by the responsible technical committee and must be reviewed every five years and if not revised, either reapproved or withdrawn. Your comments are invited either for revision of this standard or for additional standards and should be addressed to ASTM International Headquarters. Your comments will receive careful consideration at a meeting of the responsible technical committee, which you may attend. If you feel that your comments have not received a fair hearing you should make your views known to the ASTM Committee on Standards, at the address shown below.*

*This standard is copyrighted by ASTM International, 100 Barr Harbor Drive, PO Box C700, West Conshohocken, PA 19428-2969, United States. Individual reprints (single or multiple copies) of this standard may be obtained by contacting ASTM at the above address or at 610-832-9585 (phone), 610-832-9555 (fax), or [service@astm.org](mailto:service@astm.org) (e-mail); or through the ASTM website ([www.astm.org](http://www.astm.org)). Permission rights to photocopy the standard may also be secured from the ASTM website ([www.astm.org](http://www.astm.org) COPYRIGHT).*