



João Manuel Lopes

Licenciado em Ciências de Engenharia Biomédica

Síntese e Incorporação de um Polímero Condutor em Matrizes Eletrofiadas para Suporte à Regeneração Neuronal

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientador: Célia Maria Reis Henriques, Professora Auxiliar, FCT-UNL

Co-orientador: Marta Cristina Parracho Cañado Corvo, Investigadora Auxiliar, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Professora Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: João Paulo Miranda Ribeiro Borges

Vogal: Professora Doutora Célia Maria Reis Henriques



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Dezembro, 2019

Síntese e Incorporação de um Polímero Condutor em Matrizes Eletrofiadas para Suporte à Regeneração Neuronal

Copyright © João Manuel Lopes, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

“Não importa o quão devagar se vai, desde que não se pare”

Confúcio (551 a.C.- 479 a.C.)

Agradecimentos

A vida é feita de etapas, umas que terminam, outras que começam. Terminei agora mais uma. Na conclusão de qualquer etapa, há sempre um caminho que foi percorrido. Nesse caminho percorrido há sempre pessoas que foram determinantes. Nada se consegue sozinho. Desta forma, há alguns agradecimentos que tenho que fazer.

Primeiramente quero agradecer à professora Célia Henriques pela oportunidade que me deu para realizar este trabalho. Sem a sua ajuda nada teria sido possível.

Agradeço também à investigadora Marta Corvo, que me auxiliou sempre que foi necessário, tendo disponibilizado material indispensável à execução deste trabalho.

Agradeço à investigadora Ana Pinto, do grupo de investigação no qual estava inserido o meu trabalho, pela dedicação, paciência, inteira disponibilidade, transmissão de conhecimentos e humildade com que sempre me ajudou. Para ti, Ana, o meu muito obrigado.

Agradeço também à investigadora Ana Baptista do Departamento de Ciências dos Materiais por ter disponibilizado a utilização do espectrofotómetro *Jasco V-770*. Destaco também a sua simpatia e a inteira disponibilidade.

Agradeço à professora Rita Branquinho pela ajuda, utilização do equipamento de DLS *W130i* e simpatia.

Agradeço aos meus colegas de laboratório, Sara Inocêncio, Alice Belo, Zé Vilhena e Rafael Me-deiros pelos bons momentos que passámos no laboratório e pelas conversas que tivemos sobre tudo e sobre nada.

Agradeço ao meu tio, Vergílio, que foi uma peça essencial no meu percurso de vida.

Terminei com os agradecimentos às pessoas mais importantes da minha vida, e que sem eles nada teria sido possível, aos meus pais, Ramiro e Dores. Para vocês o meu muito obrigado.

A produção de matrizes fibrosas para a aplicação de estimulação eléctrica a células neuronais pode contribuir para a sua regeneração. A incorporação de poli (3,4 – etilenodioxitiofeno) (PEDOT), na matriz poderá conferir-lhe a necessária condutividade. A dificuldade em dissolver este polímero condutor requer que a matriz seja produzida a partir de dispersões de partículas finas.

Neste trabalho, o PEDOT foi obtido por polimerização química dos monómeros (EDOT), usando cloreto de ferro como agente oxidante. Foram seguidas duas vias: numa o EDOT foi disperso em ácido acético e o oxidante adicionado dissolvido em etanol, na outra utilizou-se um líquido iónico, bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazólio[BMIM][Tf₂N], para dissolver EDOT e o oxidante. Para eliminar potenciais resíduos citotóxicos, os pós foram sujeitos a um processo de lavagens controlado por espectroscopia de UV-vis e testes colorimétricos. Para a sua análise recorreu-se a medidas de condutividade, espectroscopias de UV-vis e de infravermelho por transformada de Fourier, dispersão dinâmica de luz e testes *in vitro* de citotoxicidade. Os pós com dimensões na ordem dos 300 nm, revelaram possuir estados condutores (estados de polarão) e ausência de citotoxicidade.

Cada um dos pós obtidos foi disperso numa solução de gelatina de peixe, numa razão PEDOT/gelatina de 20%, que foi eletrofiada para produzir matrizes fibrosas. Também foi produzida uma matriz de gelatina. As matrizes foram reticuladas e caracterizadas por FTIR, microscopia eletrónica de varrimento e sujeitas a um teste *in vitro*. As células epiteliais da linha *Vero* semeadas sobre as matrizes aderiram e proliferaram como indicaram os resultados dos testes colorimétricos e imagens de fluorescência dos núcleos.

Palavras-chave: Síntese Química de PEDOT; Líquido Iónico; Gelatina; Eletrofição; Reticulação; Cultura Celular

Abstract

The production of scaffolds for the application of electrical stimulation to neuronal cells may contribute to their regeneration. The incorporation of poly (3,4 - ethylenedioxythiophene) (PEDOT) in the scaffold may give it the necessary conductivity. The difficulty in dissolving this conductive polymer requires that the scaffold should be produced from fine particle dispersions.

In this work, PEDOT was obtained by chemical polymerization of monomers (EDOT), using iron chloride as oxidizing agent. Two ways were followed: EDOT was dispersed in acetic acid and the oxidant added dissolved in ethanol; in the other an ionic liquid, 1-butyl-3-methylimidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide [BMIM] [Tf₂N], was used to dissolve both, EDOT and the oxidant. To eliminate potential cytotoxic residues, the powders were submitted to a wash process controlled by UV-vis spectroscopy and colorimetric testing. For the analysis of powders, conductivity, UV-vis and Fourier transform infrared spectroscopy, dynamic light scattering and in vitro cytotoxicity tests were used. The powders with dimensions in the order of 300 nm revealed to have conductive states (polaron states) and absence of cytotoxicity.

Each of the obtained powders was dispersed in a fish gelatin solution, at PEDOT/gelatin ratio of 20%. This solution was used to produce scaffolds by electrospinning. A gelatin scaffold was also produced. The scaffolds were crosslinked and characterized by FTIR, scanning electron microscopy and were used to make an in vitro test. Vero epithelial cells adhered and proliferated as indicated by the results of colorimetric assays and fluorescence imaging of the nuclei.

Keywords: PEDOT Chemical Synthesis; Ionic liquid; Gelatine; Electrospinning; Crosslinking; Cell culture

Índice

LISTA DE FIGURAS.....	XVII
LISTA DE TABELAS.....	XX
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURA.....	XXII
APRESENTAÇÃO E ENQUADRAMENTO DO TRABALHO.....	3
1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1 POLÍMEROS CONDUTORES COMO PARTE INTEGRANTE DE <i>SCAFFOLDS</i>	5
1.2 ELETROFIAÇÃO	12
1.3 RETICULAÇÃO DA GELATINA.....	16
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
2.1 SÍNTESE QUÍMICA DO PEDOT.....	19
2.1.1 <i>PEDOT:AA</i>	20
2.1.2 <i>PEDOT:[BMIM][Tf₂N]</i>	20
2.2.2 <i>Análise do líquido da lavagem</i>	24
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO PEDOT	25
2.2.1 <i>Caracterização química</i>	25
2.2.2 <i>Medição da Condutividade</i>	26
2.2.3 <i>Avaliação do diâmetro dos pós por DLS</i>	29
2.3 PREPARAÇÃO DAS MATRIZES DE FIBRAS	30
2.3.1 <i>Soluções poliméricas produzidas</i>	31
2.3.2 <i>Eletrofiação das Soluções Produzidas</i>	32
2.3.3 <i>Reticulação da Gelatina</i>	33
2.4 CARACTERIZAÇÃO DAS MATRIZES	34
2.4.1 <i>Análise morfológica</i>	34
2.4.2 <i>Análise química</i>	34
2.5 TESTES <i>IN VITRO</i>	35
2.5.1 <i>Testes de Citotoxicidade</i>	35
2.5.2 <i>Teste de Adesão e Proliferação</i>	35
2.5.3 <i>Avaliação da viabilidade celular usando resazurina</i>	36
3. APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DE RESULTADOS.....	37
3.1 POLIMERIZAÇÃO QUÍMICA DO PEDOT	37
3.2 LAVAGEM DO POLÍMERO.....	38
3.3 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DO PEDOT SINTETIZADO.....	43

3.3.1 FTIR.....	43
3.3.2 UV-vis-NIR.....	49
3.4 CONDUTIVIDADE DO PEDOT SINTETIZADO	52
3.5 DLS	54
3.6 ELETROFIAÇÃO DE SOLUÇÕES DE GELATINA COM PEDOT.....	57
3.7 SEM DAS DEPOSIÇÕES DE FIBRAS ELETROFIADAS	59
3.8 EDS DAS MATRIZES DE GELATINA/PEDOT	61
3.9 ANÁLISE DE FTIR DAS MATRIZES DE GELATINA/PEDOT	64
3.10 TESTES <i>IN VITRO</i>	68
3.10.1 <i>Testes de Citotoxicidade</i>	68
3.10.1 <i>Testes de Adesão/Proliferação</i>	69
4 CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS.....	74
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	78
APÊNDICE	84

Lista de Figuras

FIG. 1 ESTRUTURA DE UM MONÓMERO DE EDOT.	7
FIG. 2 REAÇÃO DE SÍNTESE DE PEDOT NO SEU ESTADO CONDUTOR UTILIZANDO O $FeCl_3$	8
FIG. 3 ESTRUTURA QUÍMICA DE $[BMIM][Tf_2N]$	10
FIG. 4 DISTRIBUIÇÃO DA CARGA EM GELATINAS DO TIPO A (EM CIMA) E DO TIPO B (EM BAIXO) EM SOLUÇÕES AQUOSAS	12
FIG. 5 ESQUEMA DE MONTAGEM DE ELETROFIAÇÃO.	13
FIG. 6 MECANISMO DE RETICULAÇÃO DA GELATINA POR EXPOSIÇÃO A VAPOR	17
FIG. 7 ESQUEMA GERAL DOS MATERIAIS E DAS VÁRIAS ETAPAS EFETUADAS AO LONGO DO TRABALHO.	18
FIG. 8 CÊNTRIFUGAS UTILIZADAS NO PROCESSO DE RECUPERAÇÃO DOS PÓS DE PEDOT.	22
FIG. 9 SONICADOR <i>UP50H ULTRASONICPROCESSOR(A)</i> E BANHO ULTRASSONS <i>DIGITAL HEATED ULTRASONIC CLEANER</i>	25
FIG. 10 PRENSA <i>SPECAC MANUAL HYDRAULICPRESS (FTIR + XRF PELLETPRESS)</i>	27
FIG. 11 ESQUEMA DE UMA PASTILHA DE ALTURA L , RAIOS R E ÁREA DA SECÇÃO RETA.....	27
FIG. 12 MATERIAL UTILIZADO NA MEDIÇÃO DA RESISTÊNCIA ELÉCTRICA DAS PASTILHAS: PAPEL DE ALUMÍNIO	28
FIG. 13 EQUIPAMENTO DE DLS <i>W130I</i> USADO PARA AVALIAR O TAMANHO DAS PARTÍCULAS DOS PÓS DE PEDOT.....	30
FIG. 14 MONTAGEM EXPERIMENTAL DO SISTEMA DE ELETROFIAÇÃO UTILIZADO.	30
FIG. 15 MICROSCÓPIO ÓTICO <i>VisiCam 3.0</i> UTILIZADO PARA ANALISAR AS FIBRAS.....	33
FIG. 16 RESULTADOS DO TESTE DE NITRATO DE PRATA PARA DETECÇÃO DA PRESENÇA DE IÕES DE Cl^- NUMA SOLUÇÃO	38
FIG. 17 RESULTADOS DO TESTE DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO PARA A DETECÇÃO DA PRESENÇA DE IÕES	39
FIG. 18 TESTE DE HIDRÓXIDO DE SÓDIO REALIZADO AOS SOBRENADANTES DA LAVAGEM DO PEDOT: $[BMIM][Tf_2N]$	40
FIG. 19 ESPETRO UV-VIS DO SOBRENADANTE DA 6ª LAVAGEM DO PEDOT:AA (SÍNTESE 1).....	41
FIG. 20 ESPETROS UV-VIS DOS SOBRENADANTES DA 1ª, 2ª E 3ª LAVAGEM DO PEDOT: $[BMIM][Tf_2N]$ (SÍNTESE 1).	41
FIG. 21 ESPETROS DE FTIR DO EDOT, PEDOT:AA (SÍNTESE 3) E PEDOT: $[BMIM][Tf_2N]$ (SÍNTESE 3).....	43
FIG. 22 ESPETRO DE FTIR DO EDOT UTILIZADO NESTE TRABALHO.	44
FIG. 23 ESPETROS DE FTIR DO PÓ DE PEDOT:AA OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO QUÍMICA EM MEIO ÀCIDO UTILIZANDO	46
FIG. 24 ESPETRO DE FTIR DO PEDOT: $[BMIM][Tf_2N]$ USADO NESTE TRABALHO.	47
FIG. 25 ESPETROS DE FTIR DE PÓ DE PEDOT: $[BMIM][Tf_2N]$ OBTIDO POR POLIMERIZAÇÃO QUÍMICA NUMA SOLUÇ.....	48
FIG. 26 ESPETROS DE ABSORVÂNCIA UV-VIS-NIR DE DISPERSÕES DOS PÓS DE PEDOT:AA.....	49
FIG. 27 ESPETROS DE ABSORVÂNCIA UV-VIS-NIR DE DISPERSÕES DOS PÓS DE PEDOT: $[BMIM][Tf_2N]$	50
FIG. 28 ESPETROS DE ABSORVÂNCIA UV-VIS-NIR DA SÍNTESE 3 DO PEDOT:AA E DO PEDOT: $[BMIM][Tf_2N]$	51
FIG. 29 PASTILHAS DE PEDOT:AA (SÍNTESE 3) (A), PASTILHA DE PEDOT:AA (SÍNTESE 2) (B) E PASTILHA	52
FIG. 30 DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHOS DAS PARTÍCULAS, OBTIDA POR DLS, PARA AS DISPERSÕES	55
FIG. 31 MATRIZ DE GELATINA COM PEDOT:AA (SÍNTESE 3) (A) E COM PEDOT: $[BMIM][Tf_2N]$ (SÍNTESE 3) (B).....	59
FIG. 32 ESPETROS DE EDS DAS MATRIZES DE: GELATINA/PEDOT:AA (EM CIMA).....	62
FIG. 33 ESPETROS DE FTIR DAS MATRIZES DE GELATINA DE PEIXE RETICULADA E NÃO RETICULADA.	64
FIG. 34 ESPETROS DE FTIR DAS MATRIZES DE GELATINA/PEDOT:AA RETICULADA E NÃO RETICULADA.....	65
FIG. 35 ESPETROS DE FTIR DAS MATRIZES DE GELATINA DE PEIXE RETICULADA E NÃO RETICULADA	67
FIG. 36 VIABILIDADE CELULAR DE CÉLULAS <i>VERO</i> INCUBADAS EM EXTRACTOS DE PÓS DE PEDOT DURANTE 48 HORAS..	68

FIG. 37 RESULTADO DO TESTE COLORIMÉTRICO DE CITOTOXICIDADE APÓS 3H DE INCUBAÇÃO DAS CÉLULAS.....	69
FIG. 38 REPRESENTAÇÃO DA VIABILIDADE CELULARDE CÉLULAS <i>VERO</i> SEMEADAS NAS MATRIZES DE GELATINA DE PEIXE	70
FIG. 39 REPRESENTAÇÃO DO RESULTADO DO TESTE DE RESAZURINA AO FIM DE 3 DIAS.	70
FIG. 40 À ESQUERDA DA IMAGEM ENCONTRA-SE UM FRACO COM MEIO E À DIREITA DOIS <i>EPPENDORFS</i>	71
FIG. 41 IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS <i>VERO</i> COM AMPLIAÇÃO 400X.....	72
FIG. 42 IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS <i>VERO</i> COM AMPLIAÇÃO 400X.....	72
FIG. 43 IMAGEM DE FLUORESCÊNCIA DE CÉLULAS <i>VERO</i> COM AMPLIAÇÃO 400X.....	72

Lista de Tabelas

TABELA 1 CARACTERÍSTICAS E ALGUMAS APLICAÇÕES DOS POLÍMEROS CONDUTORES COMUMMENTE USADOS	6
TABELA 2 PROPRIEDADES FÍSICAS DE EDOT.....	8
TABELA 3 PROPRIEDADES FÍSICAS DE [BMIM][Tf ₂ N]	10
TABELA 4 SÍNTESES QUÍMICAS DE PEDOT UTILIZANDO O ÁCIDO ACÉTICO E AS RESPECTIVAS QUANTIDADES.....	20
TABELA 5 SÍNTESES QUÍMICAS DE PEDOT UTILIZANDO O [BMIM][Tf ₂ N] E AS RESPECTIVAS QUANTIDADES.....	21
TABELA 6 TABELA COM AS CONDIÇÕES EM QUE FORAM EFETUADOS OS 8 CICLOS DE LAVAGENS	23
TABELA 7 TABELA DAS LAVAGENS DA SOLUÇÃO DE PEDOT: [BMIM][Tf ₂ N] (SÍNTESE 1)	23
TABELA 8 CONCENTRAÇÕES DE PEDOT, APARELHOS E TEMPO UTILIZADOS NA APLICAÇÃO DE ULTRASSONS.....	26
TABELA 9 CONCENTRAÇÕES DE PÓS DE PEDOT EM ÁGUA, USADAS PARA OBTER AS SUSPENSÕES.....	29
TABELA 10 SOLVENTES E GELATINA USADOS NA PREPARAÇÃO DAS SOLUÇÕES A ELETROFIAR.....	31
TABELA 11 SOLUÇÕES POLIMÉRICAS PRODUZIDAS.....	31
TABELA 12 PICOS CARACTERÍSTICOS DO PEDOT E DE ALGUNS REAGENTES ENVOLVIDOS NA SUA SÍNTESE QUÍMICA.....	42
TABELA 13 BANDAS DE ABSORÇÃO CARACTERÍSTICAS DO EDOT NO INFRAVERMELHO.....	45
TABELA 14 TABELA COM AS RESISTÊNCIAS OBTIDAS A PARTIR DO MULTÍMETRO	53
TABELA 15 DIÂMETROS MÉDIOS DAS POPULAÇÕES DE PARTÍCULAS PRESENTES NAS DISPERSÕES DE PEDOT:AA	56
TABELA 16 IMAGENS DE MO 400X DE FIBRAS OBTIDAS A PARTIR DE UMA SOLUÇÃO DE GELATINA DE PEIXE	58
TABELA 17 IMAGENS SEM DAS MATRIZES DE FIBRA ELETROFIADAS COM OS PARÂMETROS DE PRODUÇÃO.....	60
TABELA 18 DIÂMETROS MÉDIOS (D) DAS FIBRAS PRODUZIDAS E RESPECTIVOS DESVIOS PADRÃO ($\bar{\sigma}$).....	61
TABELA 19 BANDAS DE ABSORÇÃO NO INFRAVERMELHO CARACTERÍSTICAS DA GELATINA E DA GELATINA	66

Lista de Siglas e Abreviatura

- AA Ácido Acético
- ATR-FTIR *Attenuated total reflection- Fourier transform infrared spectroscopy*
- [BMIM][Tf₂N] bis(trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazólio
- DHT Tratamento Desidrotérmico
- DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole
- DLS *dynamic light scattering*
- EDOT 3,4 – etilenodioxitiofeno
- MO Microscopia ótica
- PCL Poli(caprolactona)
- PEDOT Poli (3,4 – etilenodioxitiofeno)
- PEDOT:AA PEDOT obtido por polimerização química em que se utilizou o ácido acético (AA) para dispersar o EDOT
- PEDOT:[BMIM][TF₂N]- obtido por polimerização química em que se utilizou o [BMIM][TF₂N] para dispersar o EDOT
- GP gelatina de peixe
- GTA Glutaraldeído
- SEM Microscopia Eletrônica de Varrimento (do inglês *Scanning Electron Microscopy*)
- SNP Sistema Nervoso Periférico
- SCP Sistema Nervoso Central

Apresentação e Enquadramento do Trabalho

A Engenharia de Células e Tecidos é um campo multidisciplinar, que englobando conhecimentos de biologia, física e química, tem como objetivo desenvolver tecidos artificiais como substitutos de tecidos ou órgãos que tenham sido danificados. Esta é uma área do conhecimento bastante embrionária havendo por isso muito que explorar.

O sistema nervoso é um dos sistemas mais fascinantes, misteriosos e complexos do organismo, sendo por isso alvo de muitos estudos. Todas as funções do organismo dependem da sua ação [1]. Os acidentes de viação, as quedas e as lesões decorrentes de atividade desportiva são algumas das situações que podem levar à rutura parcial ou completa de fibras nervosas. A regeneração de axónios do sistema nervoso central (SNC) praticamente não existe. No sistema nervoso periférico (SNP) a regeneração é possível, mas os corpos celulares dos neurónios não podem ter sido afetados aquando da lesão e as células de *Schwann* têm de estar ativas de forma a criarem uma estrutura de suporte que permita a regeneração [2,3]. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo produzir estruturas de suporte à regeneração neuronal utilizando para o efeito materiais bicompatíveis e biodegradáveis. Os neurónios possuem excitabilidade elétrica, ou seja, a capacidade de responderem a estímulos [3]. Assim, a produção de matrizes fibrosas através das quais seja possível aplicar estimulação elétrica a neurónios pode contribuir para a sua regeneração.

Neste trabalho produziu-se o polímero condutor poli (3,4-etilenodioxitiofeno), PEDOT, para incorporar em matrizes de suporte celular conferindo-lhes condutividade. O PEDOT foi obtido por polimerização química de monómeros de 3,4-etilenodioxitiofeno, EDOT, usando cloreto de ferro como agente oxidante. Dada a dificuldade em dissolver o PEDOT ou obter dispersões de partículas finas, foram seguidas duas abordagens distintas durante o processo de polimerização. Numa dessas abordagens, utilizou-se um líquido iónico para dissolver o EDOT, a bis (trifluorometilsulfonil)imida de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][Tf₂N], tendo em conta que os líquidos iónicos têm a capacidade de dissolverem uma ampla gama de compostos orgânicos e inorgânicos. A síntese química de um polímero condutor da família do PEDOT (um politiofeno) utilizando um líquido iónico foi realizada anteriormente [4] com sucesso. No entanto, não foram ainda exploradas as potencialidades da síntese de polímeros condutores recorrendo a líquidos iónicos para a produção de *scaffolds* de suporte à regeneração neuronal.

Sem dúvida que a pertinência do trabalho realizado é evidente, não só pela área do conhecimento que encerra, mas também pela aplicabilidade que pode ter na resolução de múltiplos problemas.

1. Introdução

1.1 Polímeros condutores como parte integrante de *scaffolds*

Os neurónios dos mamíferos em geral apresentam uma limitada capacidade de regeneração. Quando ocorre a danificação de um axónio do SNP, este pode sofrer um processo de reparação se os corpos celulares dos neurónios não tiverem sido afetados e se as células de *Schwann*, que produzem mielina, estiverem ativas. No SNC, a reparação de neurónios danificados é praticamente inexistente, mesmo quando os corpos celulares dos neurónios se mantêm intactos. [2,3]

Acidentes de viação, quedas, lesões decorrentes de atividade desportiva, etc., podem levar a que as fibras nervosas formadas pelos prolongamentos dos neurónios (axónios e dendrites) sejam parcial ou completamente cortadas, esmagadas ou esticadas [2,5]. Ao contrário do que acontece com o SNC, o SNP permite a regeneração de axónios que tenham sido danificados.

Quando a sutura do nervo não é possível, é necessário recorrer a enxertos autólogos de nervos. Esta é a técnica mais utilizada na reparação de nervos periféricos. No entanto esta técnica acarreta limitações como a disponibilidade de tecido e a incompatibilidade de tamanhos [3]. Dadas as limitações da técnica tradicional de reparação de nervos periféricos, a Engenharia de Células e Tecidos tem vindo a apresentar novas soluções, como a produção de *scaffolds* artificiais, biodegradáveis e biocompatíveis que sirvam de suporte à regeneração de axónios, substituindo os enxertos.

A utilização de polímeros condutores como parte integrante de *scaffolds* poderá conferir-lhes a condutividade necessária para a aplicação de estimulação elétrica de neurónios contribuindo para a sua regeneração. Os polímeros condutores são uma classe particular de polímeros. A tabela 1 apresenta alguns polímeros condutores, bem como as suas principais características. As vantagens que os polímeros condutores oferecem, tornam-nos interessantes em aplicações, como por exemplo no desenvolvimento de biossensores e na administração de fármacos (tabela 1) [6]. Os polímeros condutores podem ainda ser bastante úteis em Engenharia de Células e Tecidos, pois ao serem incorporados em matrizes de suporte celular, permitem conferir-lhes a condutividade necessária à aplicação de estimulação elétrica às células [4].

Tabela 1 Características e algumas aplicações dos polímeros condutores comumente usados (Adaptado [7])

Polímeros Condutores	Condutividade (mS/cm)	Vantagens	Desvantagens	Aplicações
Polipirrol (PPy)	10^3 a 5×10^4	Elevada condutividade [8] Elevada estabilidade eletroquímica [9] Biocompatível [10,11] Elevada resistência mecânica [8]	Insolúvel em água [9,12]	Biossensores, administração de fármacos, próteses neurais, engenharia de tecidos
Polianilina (PANI)	10^2 - 10^8	Elevada condutividade [13] Elevada estabilidade eletroquímica [9,12]	Falta de plasticidade [14] Baixa taxa de adesão e proliferação celular [15] Insolúvel em água [16]	Biossensores, administração de fármacos, indústria alimentar, engenharia de tecidos
Politiofeno (PT)	10^{-1} - 10^{-4}	Boas propriedades ópticas [17] Biocompatível [18]	Baixa condutividade Baixa estabilidade eletroquímica Baixa solubilidade	Biossensores, indústria alimentar, engenharia de tecidos

Poli (3,4 etilenodioxitiofeno) (PEDOT)	(3 a 5) x10 ⁵	Elevada estabilidade eletroquímica [19] Elevada condutividade [20] Biocompatível [21]	Resistência mecânica relativamente baixa	Administração de fármacos, próteses neurais
---	--------------------------	---	--	---

O poli (3,4 – etilenodioxitiofeno) (PEDOT) foi o polímero condutor utilizado neste trabalho. O PEDOT é um derivado do politiofeno, constituído por monómeros de 3,4- etilenodioxitiofeno (EDOT) (figura 1).

O EDOT tem a capacidade de ser protonado na posição α do anel de tiofeno por ácidos fortes [22]. Das reações de oxidação dos monómeros de EDOT resultam tipicamente materiais oligoméricos condutores por dopagem [22]. De facto, parte do oxidante usado na reação reverte para a oxidação de alguns dos anéis da cadeia de PEDOT contribuindo para a criação de estados condutores, um processo designado de dopagem. A condutividade do polímero neutro pode ser aumentada por dopagem, tanto por oxidação (dopagem-p, que deixa o polímero positivo) como por redução (dopagem-n que deixa o polímero negativo) que cria novos estados eletrónicos [6]. Na tabela 2 apresentam-se algumas propriedades físicas do monómero EDOT [22].



Fig. 1 Estrutura de um monómero de EDOT.

Tabela 2 Propriedades físicas de EDOT [22].

Viscosidade (20°C)	11 mPa.s
Densidade (20°C)	1,34 g/cm ³
Ponto de fusão	10,5° C
Ponto de ebulição (1013 mbar)	225° C
Pressão de vapor (20°C)	0,05 mbar
Pressão de vapor (90°C)	10 mbar
Solubilidade em água (20°C)	2,1 g/L
Ponto de inflamação	104° C
Ponto de autoignição	360° C

Existem dois métodos principais para sintetizar polímeros condutores: o método químico e o método eletroquímico. A polimerização química, donde resultam pós ou dispersões coloidais, permite criar todos os tipos de polímeros condutores, incluindo alguns polímeros condutores que não podem ser sintetizados com o método eletroquímico [6]. A condutividade de um polímero condutor é bastante sensível à escolha e pureza do solvente, do oxidante, da concentração relativa dos reagentes (monómero, oxidante e dopante), do tempo de reação, da temperatura e da utilização de agitação [6].

Na polimerização química oxidativa de PEDOT, o oxidante introduz no polímero conjugado cargas positivas que o tornam condutor. A reação de síntese de PEDOT no seu estado condutor (ilustrada na Fig.2) utilizando FeCl_3 como oxidante/dopante compreende dois passos principais: a polimerização oxidativa do monómero onde se forma o polímero neutro, e a dopagem oxidativa do polímero neutro formando o polímero condutor [6,22]. Apenas na presença da molécula dopante com carga negativa é que o polímero condutor é estabilizado.

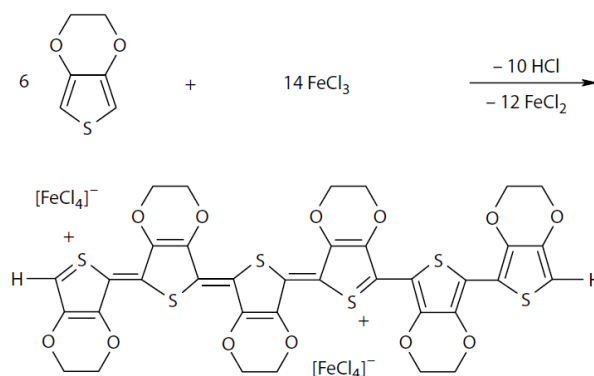


Fig. 2 Reação de síntese de PEDOT no seu estado condutor utilizando o FeCl_3 como oxidante/dopante [8].

O dopante oxidativo, ao introduzir transportadores de carga no polímero condutor, vai fazer com que electrões sejam removidos à cadeia polimérica, realocalizando-os como polarões [6]. Um polarão resulta da interação do electrão com a rede do cristal que polariza e distorce. Quando um potencial eléctrico é aplicado, o polarão tem a capacidade de se deslocar no polímero, permitindo a passagem de corrente [6]. O processo de dopagem ocorre em geral durante a síntese do polímero condutor e pode ser realizado quimicamente, electroquimicamente ou por *fotodoping* [6]. O uso de diferentes dopantes e a sua quantidade condiciona as propriedades do material [6].

O PEDOT tem sido um dos polímeros condutores mais estudados devido à sua elevada estabilidade, ao baixo potencial de redução e à transparência ótica no seu estado condutor [6,23]. O PEDOT é azul-escuro no estado reduzido e azul-claro no estado oxidado, ou seja, a sua cor muda com o estado de dopagem, sendo por isso interessante em aplicações óticas [24,19]. Estudos térmicos revelaram que o PEDOT se degrada continuamente acima dos 150°C e que se decompõe completamente a temperaturas superiores a 390°C [19]. As propriedades condutoras permanecem quase inalteradas em condições ambientais após o envelhecimento [19]. A elevada estabilidade do PEDOT deve-se à geometria do anel e ao efeito doador de electrões dos átomos de oxigénio nas posições 3 e 4, o que permite estabilizar a carga positiva no polímero [19]. O PEDOT pode apresentar uma elevada condutividade eléctrica (até 550 S/cm) quando dopado [19]. Devido às suas propriedades semicondutoras, o PEDOT tem múltiplas aplicações, como em células solares, sensores, sondas neurais e dispositivos electrónicos [23]. O PEDOT também já foi testado em enxertos de nervo. O trabalho consistiu em realizar a polimerização química *in situ* de PEDOT em estruturas de tecido muscular acelular. Os resultados mostraram que a polimerização *in situ* ocorreu em todo o tecido, convertendo-o num substrato acelular não antigénico com potencial para futuras experiências *in vivo* relacionadas com a reparação de nervos e a produção de próteses bioartificiais [25].

A resposta biológica à presença de PEDOT é algo extremamente importante para este trabalho, pois pretende-se que a matriz produzida com PEDOT seja biocompatível. A biocompatibilidade de PEDOT foi demonstrada com a investigação de *Valle et al.* sobre a interação de filmes de PEDOT com células epiteliais [18]. A produção de filmes de PEDOT também foi levada a cabo por *Luo et al.* Este investigou a sua biocompatibilidade semeando fibroblastos da linha-NIH3T3 em filmes de PEDOT que foram implantados *in vivo* subcutaneamente [26]. Os resultados mostraram que os filmes de PEDOT apresentam citotoxicidade muito baixa e desencadeiam reduzida resposta. *Bolin et al.* produziu nanofibras de poli-(etilenotereftalato de etileno) (PET) e nanofibras de PET revestidas com PEDOT, dopadas com tosilato [27]. O método utilizado foi a polimerização em fase de vapor. Os resultados mostraram uma boa adesão e prolife-

ração de células neuronais nas nanofibras de PET revestidas com PEDOT. Num estudo realizado por *Feng et al.*, foram produzidas nanofibras de PEDOT por eletrofiação [28]. Na polimerização foi usado o FeCl_3 como oxidante. As nanofibras de PEDOT produzidas mostraram boas propriedades mecânicas. Evidenciaram uma condutividade elétrica de $7.8 \pm 0,4 \text{ S. cm}^{-1}$.

A dificuldade em dissolver o PEDOT requer que os *scaffolds* sejam produzidos a partir de dispersões de partículas finas. Uma das abordagens seguidas no presente trabalho foi utilizar um líquido iônico no processo de polimerização. Os líquidos iônicos (LI) são sais, constituídos por cátions orgânicos e ânions orgânicos ou inorgânicos, que possuem um ponto de fusão inferior a 100°C . Têm uma pressão de vapor muito baixa, são praticamente não inflamáveis e podem ser recicláveis [4]. Têm a capacidade de dissolver uma ampla gama de compostos orgânicos e inorgânicos e apresentam excelente estabilidade oxidativa e redutiva. A sua grande janela eletroquímica permite conciliar uma infinidade de monómeros e a oxidantes químicos em concentrações significativas para a síntese de polímeros condutores [4].

A bis (trifluorometilsulfonyl) imida de 1-butil-3-metilimidazólio [BMIM][Tf₂N] foi escolhido para efetuar a polimerização química de PEDOT. Na figura 3 encontra-se representada a estrutura química de [BMIM][Tf₂N]. Na tabela 3 são apresentadas algumas das suas propriedades físicas.

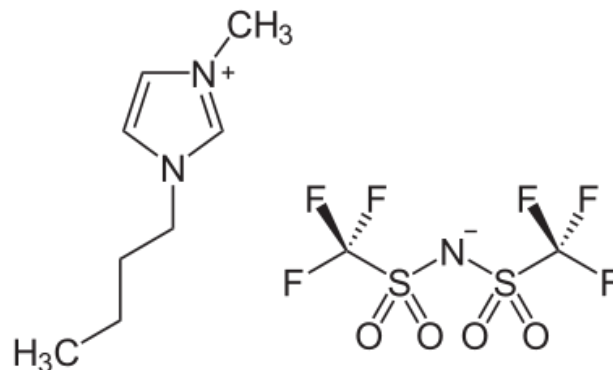


Fig. 3 Estrutura química de [BMIM][Tf₂N].

Tabela 3 Propriedades físicas de [BMIM][Tf₂N] (Adaptada de *Iolitec-IonicLiquidTechnologies*)

Fórmula	$\text{C}_{10}\text{H}_{15}\text{F}_6\text{N}_3\text{O}_4\text{S}_2$
Peso molecular	419,37 g/mol
Ponto de fusão	- 4°C
Densidade	1,44 g/cm ³ a 20°C
Viscosidade	48,8 cP
Tensão Superficial	32,8 mN/m

A utilização de LI na produção de polímeros condutores é relativamente recente, apesar disso já alguns estudos foram feitos para ver de que forma a sua utilização pode melhorar a condutividade e a solubilidade dos polímeros condutores. Para testar de que forma o líquido iônico pode melhorar a solubilidade de PEDOT, foi realizado um estudo que demonstrou a capacidade dos LI em dissolver uma vasta gama de elementos orgânicos e inorgânicos combinada com a sua ampla janela eletroquímica que permite conciliar um grande número de monómeros e oxidantes em concentrações significativas. A polimerização foi testada dissolvendo dois oxidantes diferentes: FeCl_3 (Cloreto de Ferro) e AuCl_3 (Cloreto de ouro), sendo que o AuCl_3 foi mais eficaz na produção de nanopartículas condutoras na presença de LI [4].

A produção de *scaffolds* envolve a utilização de materiais biocompatíveis e biodegradáveis que desencadeiem respostas celulares que contribuam para a regeneração de tecido. Os chamados biopolímeros são polímeros que possuem estas características. Para melhorar a resposta celular de *scaffold* cujas propriedades condutoras sejam baseadas num polímero condutor, utilizam-se misturas do polímero condutor com um biopolímero. O biopolímero utilizado neste trabalho foi a gelatina de peixe. A gelatina é um biopolímero derivado do colagénio, amplamente utilizado devido às suas propriedades biológicas e ao baixo custo [29]. Apesar de ser solúvel em meios aquosos, pode ser reticulada. Modificações químicas e mistura com outros materiais permitem alterar as suas propriedades mecânicas e bioquímicas [30,31]. A gelatina pode conter até 19 aminoácidos ligados de forma parcialmente ordenada [31]. A representação $(\text{Glicina-X-Prolina})_n$ é responsável pela estrutura helicoidal tripla da gelatina, em que X representa principalmente os aminoácidos lisina, arginina, metionina ou valina [31].

O colagénio é uma proteína extremamente importante na constituição da matriz extracelular do tecido conjuntivo, apresentando uma elevada quantidade de glicina, prolina e hidroxiprolina [29,32]. Pode ser desnaturado e convertido em gelatina na presença de soluções ácidas [29].

As características da gelatina dependem do pH, da temperatura e do tempo de extração usados no processamento do colagénio [30]. O peso molecular e o ponto isoelétrico (PI) são parâmetros que podem ser alterados dependendo destas condições [30,29]. A gelatina pode ser obtida sob condições de pré-tratamento ácidas ou alcalinas dando origem a dois tipos de gelatina: gelatina tipo A (PI a pH 8-9) e gelatina tipo B (PI a pH 4-5) [30]. A gelatina é carregada negativamente em pH elevado e carregada positivamente em pH baixo (Fig.4) [31].

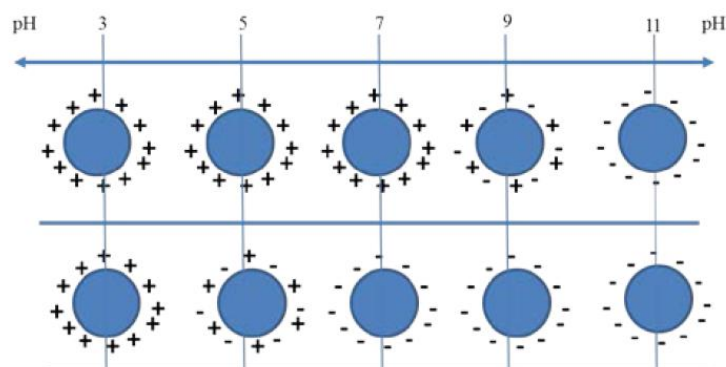


Fig. 4 Distribuição da carga em gelatinas do tipo A (em cima) e do tipo B (em baixo) em soluções aquosas com diferente pH [16].

Quanto à sua proveniência, existem vários tipos de gelatina como por exemplo a gelatina de porco, de vaca e de peixe. A maior parte da gelatina comercial é derivada de mamíferos, mas, devido a razões socioculturais e religiosas, tem havido um grande esforço por privilegiar outras fontes, como o peixe [29,32]. A produção de gelatina de peixe evidencia um elevado potencial, visto que permite a obtenção de grandes quantidades de colagénio [29,32]. No entanto, uma das grandes desvantagens da utilização desta gelatina quando comparada com a gelatina de mamíferos tem que ver com as suas propriedades reológicas [29]. As gelatinas de peixe apresentam viscosidades mais baixas do que as gelatinas de mamíferos, o que limita a sua gama de aplicações [29,31].

A obtenção das matrizes fibrosas obtidas neste trabalho baseou-se na eletrofiação de soluções com gelatina. Na secção seguinte serão abordados alguns fundamentos desta técnica.

1.2 Eletrofiação

A eletrofiação (*electrospinning*) é uma técnica que permite produzir fibras com diâmetros na ordem dos nanómetros ou micrómetros, genericamente designadas por nanofibras e que apresentam uma elevada razão área superficial/volume [33]. A eletrofiação pode ser usada para produzir deposições de nanofibras de diferentes materiais, sob a forma de uma malha com elevada porosidade e poros de pequenas dimensões [33]. Estas encontram aplicações em diversas áreas tais como na engenharia biomédica, na energia e na nano engenharia [34]. Na engenharia de tecidos podem ser utilizadas como cobertura de feridas, como vectores de libertação controlada de drogas e em sensores [33, 35].

Durante o processo de eletrofiação várias são as forças que competem entre si: a força eletrostática que atua no jato carregado devido ao campo elétrico existente entre a agulha e o coletor, a repulsão eletrostática entre os elementos carregados adjacentes no interior do jato e que é responsável pelo alongamento, as forças viscoelásticas e a tensão superficial que atua em sentido contrário ao estiramento [34,36]. Quando a força eletrostática repulsiva supera a tensão superficial da solução, um jato de solução irrompe na ponta da agulha a partir do chamado cone de Taylor [34]. A preservação do cone de Taylor exige um equilíbrio entre a tensão aplicada, a distância da ponta da agulha ao coletor e o caudal.

Na técnica de eletrofiação, a solução polimérica que emerge de uma seringa de metal é carregada pela fonte de alta tensão ligada à agulha. Quando a tensão aplicada entre a agulha e o coletor é suficientemente alta para que se forme o jato, o campo elétrico guia a fibra até ao coletor [35,36]. O alongamento juntamente com a evaporação do solvente permite a produção de fibras nanométricas ou micrométricas que são depositadas no coletor ao potencial da terra [35]. As características das fibras que são produzidas durante o processo de fiação dependem do polímero e do solvente usado, das condições experimentais, tais como o caudal da solução polimérica, a distância entre o coletor e agulha e a tensão aplicada entre a agulha e o coletor [33].

Na figura 5 apresenta-se um esquema de uma montagem de eletrofiação. Os elementos principais de montagem são: a bomba injetora, a seringa, a agulha, a fonte de alta tensão e o coletor.

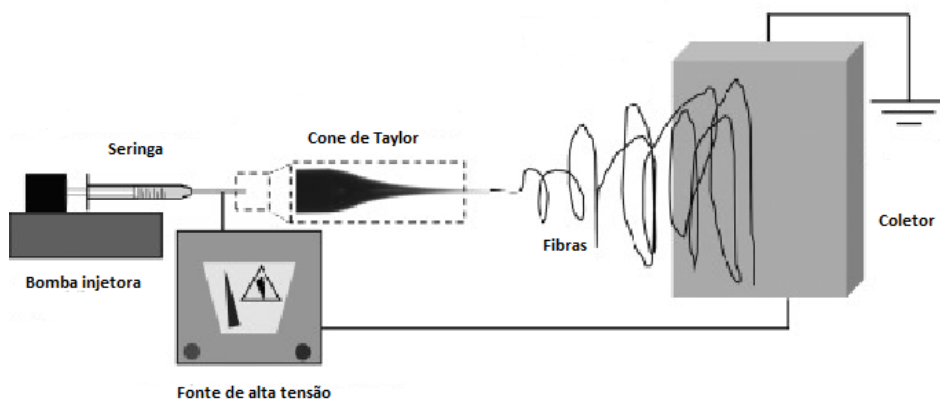


Fig. 5 Esquema de montagem de eletrofiação (Adaptado[75]).

Parâmetros das Soluções Poliméricas

Os parâmetros da solução, como a viscosidade, a condutividade eléctrica e a tensão superficial são parâmetros extremamente importantes no processo de fiação, tendo influência direta na morfologia e na geometria das nanofibras. Estes parâmetros estão directamente relacionados com as propriedades físico-químicas dos polímeros e dos solventes e com as interações polímero-solvente [36].

A viscosidade de uma solução polimérica aumenta com o aumento da concentração do polímero e com o aumento da sua massa molecular [37]. No processo de eletrofiação, mantendo-se os parâmetros de produção fixos e aumentando a viscosidade da solução polimérica verifica-se uma tendência para o aumento do diâmetro das fibras [38]. Para valores de viscosidades baixas, as forças de tensão superficial são responsáveis pela formação de gotas. À medida que a viscosidade aumenta, gotas esféricas menores dão lugar a gotas mais longas, até ser atingido um valor mínimo que suporte um estiramento contínuo, dando origem a um filamento uniforme [37]. Uma viscosidade bastante elevada pode não só dificultar a saída de solução da agulha como a trajetória do jato até ao coletor.

A tensão superficial está directamente relacionada com a formação do cone de Taylor. A formação deste cone dá-se quando a tensão aplicada é suficientemente alta para que as forças electrostáticas superem a tensão superficial da gota [38]. Quando se atinge esse valor de tensão crítica, o processo de fiação inicia-se.

A tensão superficial tende a reduzir a superfície de contacto do líquido com o ar circundante [37]. Uma tensão superficial elevada leva a um aumento do diâmetro das fibras, podendo também originar a formação de irregularidades com a forma de contas ao longo da fibra [37].

Tanto a condutividade como a constante dieléctrica do solvente influenciam o comportamento da solução sujeita ao processo de eletrofiação. Quanto maior for a condutividade da solução polimérica, maior será o estiramento e menor será o diâmetro das fibras e o número de aglomerados esféricos [38, 37]. Já o efeito da constante dieléctrica é muito semelhante ao efeito da condutividade, visto que uma maior constante dieléctrica leva à produção de fibras com menor diâmetro e menor número de contas [37].

Parâmetros de Produção

Os principais parâmetros de produção são: a tensão aplicada, a distância entre a agulha e o coletor, o caudal da solução e o diâmetro interno da agulha.

A eletrofiação baseia-se na aplicação de uma diferença de potencial entre um capilar metálico ligado ao reservatório que contém a solução polimérica e um coletor (em geral colocado ao potencial da terra). É a corrente com origem nesta diferença de potencial que carrega e causa o estiramento do jato e a formação de uma fibra. Para um determinado sistema polímero-solvente há um valor mínimo de diferença de potencial que causa em geral um aumento do estiramento do jato, o que contribui para a obtenção de fibras com diâmetros menores [37]. No entanto, a diminuição do tempo de voo da fibra em direção ao coletor pode produzir o efeito inverso [33].

A distância entre a agulha e o coletor é outro dos parâmetros de produção a ter em conta. Existe um valor mínimo de distância entre a agulha e o coletor para que possa haver a evaporação total de solvente [38, 37]. A distância necessária para que ocorra a evaporação completa de solvente está dependente do ponto de ebulição do solvente. A evaporação incompleta de solvente pode causar a fusão entre fibras e a formação de aglomerados [37]. Esta distância juntamente com o valor da tensão aplicada determina a intensidade e configuração do campo elétrico.

O caudal da solução determina a quantidade de polímero disponível durante a formação da fibra. Um aumento do diâmetro da agulha pode levar a um aumento do diâmetro da fibra devido ao aumento da quantidade de solução disponível.

Parâmetros Ambientais

A temperatura e a humidade relativa são parâmetros ambientais que influenciam o desenrolar do processo de eletrofiação e a morfologia das fibras obtidas. Desta forma, é importante que sejam controladas.

A humidade atmosférica influencia a taxa de evaporação de solvente com forte composição em água. Num ambiente mais húmido a evaporação do solvente é mais lenta, o que tem consequências ao nível da morfologia das fibras produzidas [39].

O aumento da temperatura leva a uma evaporação mais rápida do solvente. Por este motivo, podem ser usados solventes com uma taxa de evaporação mais baixa para reduzir o diâmetro das fibras que ficam assim sujeitas a um estiramento durante um maior tempo de voo [40].

1.3 Reticulação da gelatina

A gelatina é um polímero solúvel em água. Em particular, a gelatina de peixe dissolve-se em água fria. Assim, para conferir estabilidade em meios aquosos às matrizes de gelatina produzidas, é necessário submetê-las a um processo de reticulação. A reticulação tem também influência nas propriedades mecânicas da matriz [41].

A reticulação ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por ligações covalentes. A este processo também é dado o nome de *crosslinking* ou ligação cruzada.

Existem vários processos de reticulação, os quais serão apresentados a seguir.

Os métodos físicos de reticulação incluem principalmente o tratamento desidrotérmico (DHT), a irradiação UV e gama e o tratamento com plasma [41,42]. A reticulação física evita a adição de compostos na rede polimérica e a utilização de solventes, o que poderia resultar em efeitos citotóxicos. Quando o material a reticular compreende outro constituinte para além da gelatina pode não ser possível aplicar temperaturas da ordem das necessárias para o processo de DHT. Em geral, a desvantagem da utilização dos métodos físicos de reticulação é o baixo grau de reticulação obtido, o que pode levar no caso da gelatina à obtenção de hidrogéis mecanicamente frágeis [41,43].

A reticulação química envolve a formação de ligações covalentes entre as cadeias poliméricas da gelatina, obtendo-se dessa forma hidrogéis de gelatina mais estáveis [43]. A reticulação química usa agentes químicos como glutaraldeído (GTA), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), compostos poliepóxidos, entre outros. [44,43]. E existem agentes de reticulação químicos naturais como a genipina (GP), o ácido nordihidroguaiarético (NDGA), o ácido tânico e a procianidina (PC) [42].

Na reticulação química da gelatina existem dois tipos de ligações cruzadas: as ligações intra-helicoidais e inter-helicoidais. É a distância entre as cadeias de polímero que determina se as ligações cruzadas que se formam são intra-helicoidais ou inter-helicoidais. As ligações cruzadas intra-helicoidais incluem as ligações formadas entre duas cadeias polipeptídicas numa mesma hélice [44]. Estas ligações influenciam a temperatura de desnaturação [44]. As ligações cruzadas inter-helicoidais são formadas entre cadeias polipeptídicas de duas hélices adjacentes, o que aumenta o peso molecular da gelatina, afetando também a flexibilidade [44].

Entre os métodos químicos de reticulação enumerados anteriormente, o vapor de glutaraldeído (GTA) é muito usado, sendo eficaz na estabilização de matrizes nanofibrosas de gelatina [43].

Neste trabalho, a gelatina das matrizes eletrofiadas foram reticuladas por exposição a vapor de GTA. O GTA ($C_5H_8O_2$) é um líquido viscoso à temperatura ambiente sendo solúvel em água. A reticulação da gelatina ocorre devido à reação química entre os grupos amina (NH_2) dos resíduos da lisina e hidroxilisina do colagénio e os grupos aldeído do GTA, dando origem a ligações cruzadas intra e intermoleculares [44,42]. Esta reação tem como consequência a formação de bases de *Schiff* [42]. Uma base de *Schiff* é um grupo funcional que contém uma ligação dupla carbono-nitrogénio, com o átomo de nitrogénio ligado a um grupo arilo ou alquilo ($R_1R_2C=N-R_3$).

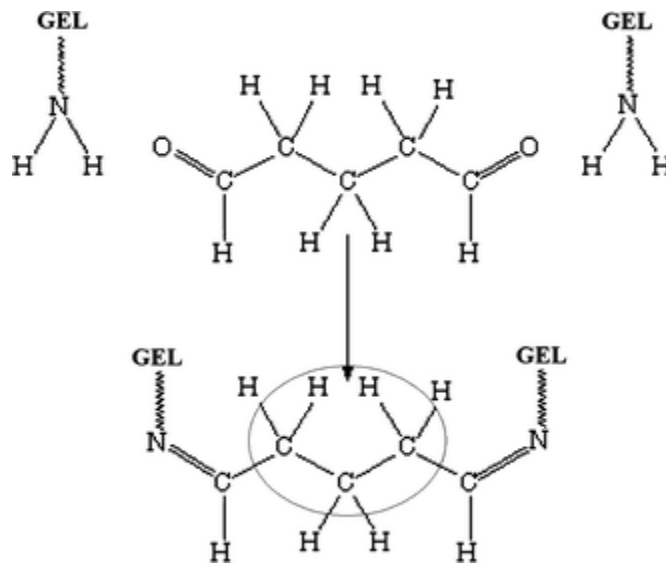


Fig. 6 Mecanismo de reticulação da gelatina por exposição a vapor de glutaraldeído [76]).

A utilização de GTA como agente reticulante pode introduzir citotoxicidade nas fibras produzidas devido à presença de grupos aldeído livres [43]. Existem várias estratégias que permitem reduzir este risco, tais como a redução da concentração do agente de reticulação ou a introdução de pós-tratamentos [43]. Exemplos de pós-tratamentos são: o enxaguamento, a exposição a soluções com moléculas que reajam com grupos aldeído não reagidos e a colocação em vácuo para a eliminação de moléculas não reagidas.

Esquema geral dos materiais produzidos

De seguida apresenta-se um esquema geral (figura 7) dos materiais e das etapas realizadas ao longo deste trabalho.

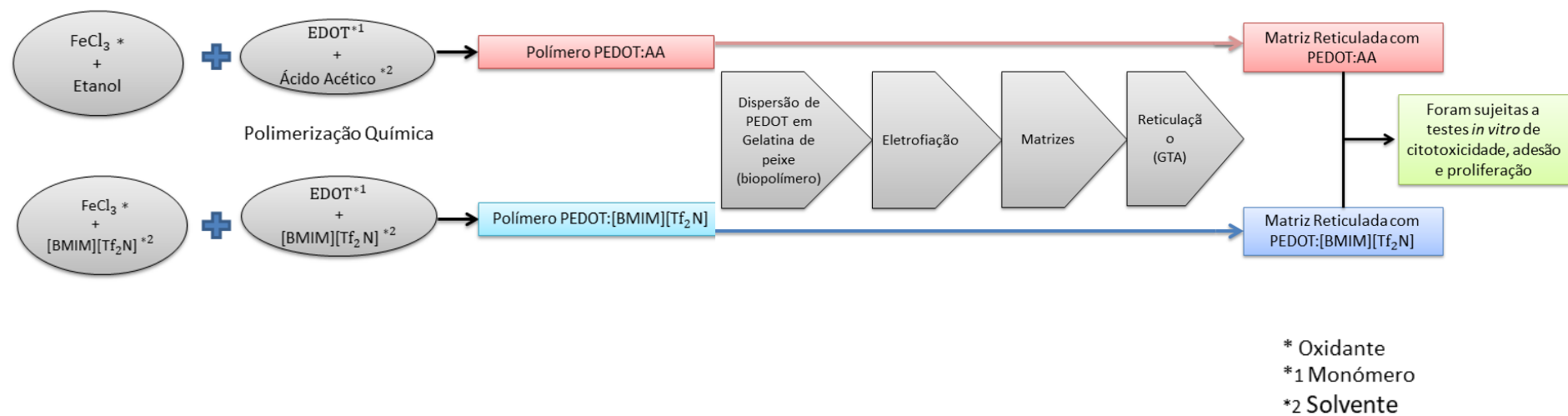


Fig. 7 Esquema geral dos materiais e das várias etapas efetuadas ao longo do trabalho.

2 Materiais e Métodos

Neste capítulo apresentam-se os materiais utilizados na síntese química de PEDOT e na produção das fibras de gelatina e PEDOT. Apresentam-se também os métodos usados na síntese e na caracterização dos pós de PEDOT e na produção e caracterização das fibras.

2.1 Síntese química do PEDOT

Para a síntese química do PEDOT foram usados os seguintes reagentes:

- 3,4- etilenodioxitiofeno (EDOT), 97% (*Alfa Aesar*);
- Ácido Acético (CH_3COOH), $\geq 99,7\%$ (*Fisher Chemical*);
- Etanol, absoluto, $\geq 99,8\%$ (*Fisher Chemical*);
- Cloreto de ferro (III) anidro (FeCl_3), 98% (*Alfa Aesar*);
- 1-butil-3-metilimidazólio bis (trifluorometilsulfonil) imida([BMIM][Tf₂N]), 99% (*Io-li-tec*).

Na síntese química do PEDOT foram seguidas duas abordagens. Numa utilizou-se o ácido acético como solvente do EDOT e na outra um líquido iónico. Os polímeros obtidos foram designados por PEDOT:AA e PEDOT:[BMIM][Tf₂N], respectivamente. Em ambos os casos, a proporção molar oxidante/monómero utilizada foi 6:14 (EDOT: FeCl_3) [22].

2.1.1 PEDOT:AA

O EDOT foi adicionado ao ácido acético numa concentração de 4,2% (m/m). A solução do oxidante foi preparada dissolvendo-se FeCl_3 a 50% (m/m) em etanol e a sua densidade foi determinada experimentalmente, obtendo-se um valor de 1,268 g/ml. Esta solução foi depois adicionada gota a gota à solução de EDOT até atingir a proporção molar de EDOT: FeCl_3 (1:2,33) na mistura final. A mistura foi mantida em agitação durante a síntese. Na tabela 4 encontram-se especificadas as quantidades de reagentes usadas em cada uma das três sínteses bem como o tempo de reação.

Tabela 4 Sínteses químicas de PEDOT utilizando o ácido acético e as respectivas quantidades.

	EDOT / μl	CH_3COOH /ml	FeCl_3 a 50% (m/m) em etanol / ml	Tempo de reacção / h
PEDOT:AA (Síntese 1)	300	9,14	1,679	24
PEDOT:AA (Síntese 2)	300	9,14	1,679	48
PEDOT:AA (Síntese 3)	601	18,28	3,358	24

2.1.2 PEDOT:[BMIM][Tf_2N]

Adaptando o procedimento seguido por Dulgerbaki *et al* [45], o monómero foi adicionado ao líquido iónico ([BMIM][Tf_2N]) nas quantidades indicadas na tabela 5 e a mistura sujeita a agitação magnética durante 20 min. A solução do oxidante foi preparada dissolvendo-se FeCl_3 a 13% (m/m) em [BMIM][Tf_2N] com a ajuda de um sonicador. O FeCl_3 dissolvido em [BMIM][Tf_2N], foi então adicionado gota a gota à solução de EDOT e a solução foi mantida sob agitação magnética. Como se pode constatar pela tabela 5, na última das três sínteses a razão volúmica [BMIM][Tf_2N]:EDOT foi alterada de 1:16,6 para 1:10.

Tabela 5 Sínteses químicas de PEDOT utilizando o [BMIM][Tf₂N] e as respectivas quantidades.

	EDOT / μl	Solvente [BMIM][Tf ₂ N] / μl	Massa de FeCl ₃ (mg) / volume de [BMIM][Tf ₂ N] / (ml)	Tempo de reacção / h
PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (Síntese 1)	50	830	176 / 0,830	24
PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (Síntese 2)	50	830	176 / 0,830	23
PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (Síntese 3)	250	2500	880 / 4,150	24

A solubilidade de EDOT em [BMIM][Tf₂N] foi previamente avaliada por observação no microscópio ótico de uma lâmina de vidro onde se colocou 50 μl de [BMIM][Tf₂N] aos quais se adicionou 0,5 μl de EDOT. Pôde-se observar-se que enquanto decorria a adição de EDOT, este se dispersava pelo líquido iónico observando-se no final uma só fase homogénea. Já num procedimento semelhante onde se substituiu o líquido iónico por água, verificou-se a presença de duas fases com uma interface bem definida entre a água e o EDOT.

2.2 Lavagem do PEDOT sintetizado

2.2.1 Metodologia

Uma vez decorrido o tempo de polimerização, o PEDOT encontra-se sob a forma de pós numa mistura. Assim, procedeu-se a um processo de lavagem com recuperação dos pós por centrifugação. As lavagens devem eliminar restos de reagentes e outros produtos da síntese tais como espécies de ferro. Na figura 8 encontram-se as duas centrífugas utilizadas no processo de recuperação dos pós. Inicialmente foi utilizada uma centrífuga com uma aceleração máxima de 2600 g (a), mas ao longo do processo de lavagens, esta aceleração não foi suficiente para sedimentar as partículas, tendo sido necessário utilizar uma centrífuga com maior aceleração, 12000g (b).

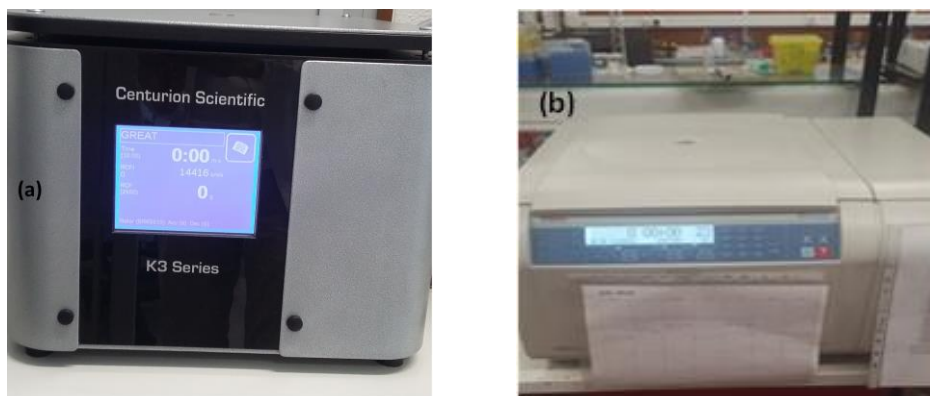


Fig. 8 Centrífugas utilizadas no processo de recuperação dos pós de PEDOT. Centrífuga *CenturionScientific K3 Series* (a) e *ThermoMultifuge X1R* (b) permitem acelerações máximas de 2600 12000 g, respetivamente.

Para as lavagens utilizou-se água ultrapura ou metanol ou etanol. Cada lavagem incluiu vários ciclos de: exposição dos pós ao solvente, centrifugação e separação do sobrenadante de um *pellet* de pós de polímero. Os sobrenadantes foram guardados para posterior análise.

No início de cada novo ciclo, ao *pellet* resultante do ciclo anterior era adicionado uma nova quantidade de solvente. O *pellet* era então descompactado com a ajuda de uma espátula e de um *Vortex* para aumentar a exposição do material ao solvente e assim a eficiência da lavagem. O número de ciclos de lavagem foi determinado pela análise dos sobrenadantes.

Ao PEDOT:AA resultante da síntese 1- PEDOT:AA (síntese 1) - foram efetuados oito ciclos de lavagem. Na tabela 6 encontra-se a indicação do solvente usado em cada ciclo, os tempos de centrifugação e as respectivas acelerações.

Tabela 6 Tabela com as condições em que foram efetuados os 8 ciclos de lavagens do PEDOT:AA (síntese 1): solventes usados, tempo de centrifugação e respetiva aceleração.

Ciclo	Solvente utilizado	Tempo de centrifugação / min	Aceleração / g
1	Água ultra pura	10	2600
2	Água ultra pura	5	2600
3	Água ultra pura	5	2600
4	Água ultra pura	10	2600
5	Água ultra pura	10	2600
6	Água ultra pura	20	2600
7	Água ultra pura	20	2600
8	Etanol	20	2600

A 8ª lavagem foi realizada com etanol porque este é menos denso (789 Kg/ m^3) do que a água, o que facilita a sedimentação das partículas de pó mais pequenas. Nas sínteses 2 e 3 de PEDOT:AA seguiu-se um procedimento idêntico ao seguido para a síntese 1. As tabelas com a indicação do solvente usado em cada ciclo, os tempos de centrifugação e as respetivas acelerações para as sínteses 2 e 3 de PEDOT:AA são apresentadas no Apêndice B.

O PEDOT:[BMIM][TF₂N] resultante da síntese 1- PEDOT:[BMIM][TF₂N] (síntese 1) – foi sujeito a cinco ciclos de lavagem mediados por centrifugações efetuadas com diferentes intervalos de tempo e com diferentes acelerações. Na tabela 7 encontram-se as condições em que foram realizados os cinco ciclos de lavagem.

Tabela 7 Tabela das lavagens da solução de PEDOT: [BMIM][Tf₂N] (síntese 1), dos solventes usados, dos tempos de centrifugação e das acelerações centrífugas.

Ciclo	Solvente utilizado	Tempo de centrifugação/ min	Aceleração / g
1ª	metanol	10	2600
2ª	metanol	5	2600
3ª	metanol	15	2600
4ª	metanol	40	12000
5ª	metanol	40	12000

Nas sínteses 2 e 3 de PEDOT:[BMIM][Tf₂N] seguiu-se um procedimento idêntico ao seguido para a síntese 1. As tabelas com a indicação do solvente usado em cada ciclo, os tempos de centrifugação e as respectivas acelerações para as sínteses 2 e 3 de PEDOT: [BMIM][Tf₂N] são apresentadas no Apêndice B.

2.2.2 Análise do líquido da lavagem

Para monitorizar a composição do líquido de lavagem, procedeu-se à obtenção de espectros de UV-vis de alguns dos sobrenadantes recolhidos.

Com o objetivo de detetar a presença de iões de ferro ou cloro, alguns dos sobrenadantes foram avaliados segundo dois testes colorimétricos: o teste de hidróxido de sódio e o teste de nitrato de prata.

O teste do hidróxido de sódio permite averiguar se existem iões Fe²⁺ e Fe³⁺ nos sobrenadantes. Consoante a presença de um ou de outro ião formam-se precipitados de cor diferente – cor verde para o ião Fe²⁺ e cor castanha para o ião Fe³⁺ [46, 47]. Para a realização do teste foram adicionadas mais de 10 gotas de uma solução aquosa 0,5 M de NaOH a 300 µl do sobrenadante em análise.

O teste de nitrato de prata permite averiguar a existência de iões Cl⁻ livres [48]. Estes podem surgir tanto a partir do FeCl₃ como do FeCl₂, que se forma durante a reação de polimerização do PEDOT [49]. Na presença de iões Cl⁻, o nitrato de prata reage formando-se um precipitado branco [48]. Para a realização do teste, prepararam-se 50 ml de uma solução aquosa de AgNO₃ de 0,17 g por 10 ml de água desionizada [49]. O teste consistiu em adicionar 4 gotas de solução de AgNO₃ a 300 µl dos sobrenadantes analisados.

Na análise e discussão dos resultados serão apresentados os resultados dos testes colorimétricos, que apesar das suas limitações, deram uma informação qualitativa da presença de ferro nas águas das lavagens.

2.2 Caracterização do PEDOT

2.2.1 Caracterização química

Espetroscopia de UV-vis

Foram feitas várias dispersões de pós de PEDOT em metanol para posterior análise através da espectroscopia de ultravioleta visível (UV-vis). Para promover a desagregação dos pós e assim melhorar a dispersão usaram-se ultrassons. Para a preparação das dispersões de PEDOT:AA (síntese 1) e PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 1 e 2) foi utilizado um banho de ultrassons, mas para as dispersões PEDOT:AA (síntese 2 e 3) e PEDOT:[BMIM]:[Tf₂N] (síntese 3) foi utilizado um sonicador (1 ciclo, amplitude 60%). Para a obtenção dos espectros de UV-vis, foi utilizado um espectrofotômetro, *Scanspec UV*. Na figura 9 estão representados o sonicador e o banho de ultrassons utilizado. Na tabela 8 encontram-se as concentrações de PEDOT, os aparelhos utilizados para a aplicação de ultrassons e o tempo de duração deste procedimento.

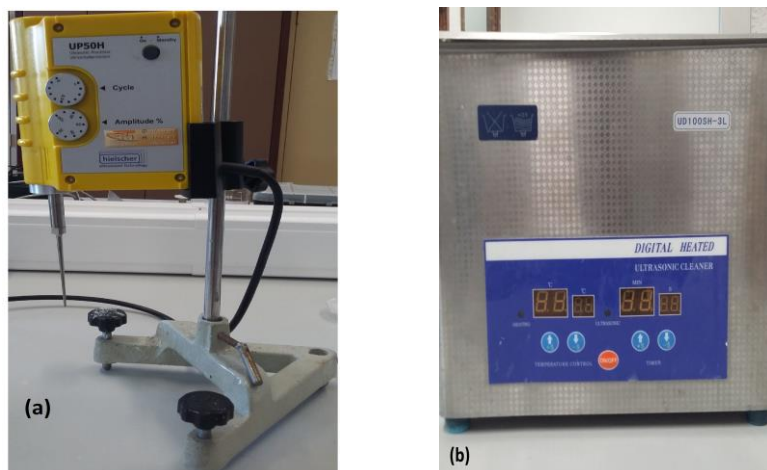


Fig. 9 Sonicador *UP50H ultra sonic processor* (a) e banho ultrassons *Digital Heated Ultrasonic Cleaner UD100SH-3L* (b) utilizados.

Tabela 8 Concentrações de PEDOT, aparelhos e tempo utilizados na aplicação de ultrassons na presença das dispersões dos pós de PEDOT em metanol para posterior análise de UV-vis.

PEDOT	Concentração de PEDOT em metanol /mg ml ⁻¹	Sonicador Tempo / min	Banho de Ultrassons Tempo / min
PEDOT:AA (síntese 1)	1	-	60
PEDOT:AA (síntese 2)	1	15	-
PEDOT:AA (síntese 3)	0,1	5	-
PEDOT:[BMIM][Tf ₂ N] (síntese 1)	1	-	60
PEDOT:[BMIM][Tf ₂ N] (síntese 2)	1	-	60
PEDOT:[BMIM][Tf ₂ N] (síntese 3)	0,1	5	-

A análise de UV-vis destas dispersões permite identificar bandas características do estado não condutor (neutro) e dos estados condutores (devido à dopagem) de polarão e bipolarão do PEDOT.

ATR-FTIR

Os vários pós de PEDOT sintetizados foram analisados através da técnica ATR-FTIR, de forma a obter-se uma informação mais detalhada da sua estrutura. É de referir que para esta análise e testes subsequentes, os pós das sínteses 1 e 2 do PEDOT:[BMIM]:[Tf₂N] foram misturados, já que se podem considerar réplicas um do outro.

2.2.2 Medição da Condutividade

Para medir a condutividade foram preparadas pastilhas de forma cilíndrica de PEDOT:AA e de PEDOT: [BMIM][Tf₂N]. Esta preparação consistiu na compactação dos respectivos pós dentro de um molde de aço, utilizando a prensa manual que é mostrada na figura 10. Cada pastilha foi obtida a partir de cerca de 100 mg de pó. A pressão aplicada foi de aproximadamente $1,21 \times 10^8$ N/m², o que equivale a 1210 bar.



Fig. 10 Prensa *Specac Manual HydraulicPress (FTIR + XRF pelletpress)* utilizada para produzir as pastilhas de PEDOT.

A altura (l) e o diâmetro ($2r$) das pastilhas (figura 11) foram medidos com um micrómetro. Para estabelecer o contacto elétrico dos topos da pastilha com as pontas de prova de um multímetro, usado para medir a resistência R (ver figura 12), os topos das pastilhas foram pintados com cola de prata. Neste procedimento, tentou evitar-se que a cola escorresse para o interior e para as bordas da pastilha, voltando para baixo o topo que estava a ser pintado. Depois da cola secar, colocou-se a pastilha sobre uma folha de alumínio sobre a qual se encostou uma das pontas de prova do multímetro enquanto que a outra ponta foi posta em contacto com a face livre da pastilha.

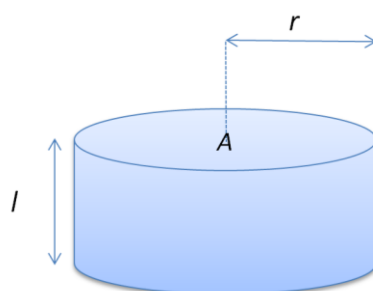


Fig. 11 Esquema de uma pastilha de altura l , raio r e área da secção reta A ($A = \pi \times r^2$).



Fig. 12 Material utilizado na medição da resistência eléctrica das pastilhas: papel de alumínio, multímetro *Agilent U1241A* e duas pontas de prova.

Segundo a lei de Ohm, a corrente num fio condutor é proporcional à queda de potencial nesse fio:

$$I = \frac{V}{R}$$

A resistência R é proporcional ao comprimento do fio l e inversamente proporcional à área da secção reta A :

$$R = \rho \frac{l}{A}$$

A resistividade eléctrica ρ mede a oposição de um material à passagem de corrente eléctrica. A condutividade eléctrica σ avalia o comportamento eléctrico de um dado material, sendo o inverso da resistividade:

$$\sigma = \frac{1}{\rho}$$

Esta última expressão foi a utilizada para calcular a condutividade da pastilha.

2.2.3 Avaliação do diâmetro dos pós por DLS

A dispersão dinâmica de luz (DLS) é uma técnica não destrutiva que permite medir a distribuição do tamanho de partículas pequenas em suspensão num líquido. É um método rápido e preciso se a gama de tamanhos for pequena, mas que se torna inconveniente quando existe uma grande diferença no tamanho das partículas. A técnica permite avaliar a forma das partículas [50].

O DLS baseia-se em dois fenómenos: o efeito de *Tyndall* (dispersão de luz por pequenas partículas em suspensão num líquido) e o movimento browniano (movimento aleatório de pequenas partículas num fluido que resulta de choques entre as moléculas do meio e as partículas) [51]. No DLS, o espalhamento de um feixe luminoso monocromático é função do tamanho e da forma das partículas [52]. A identificação de eventos singulares de dispersão (medição de fótons dispersos por interação com uma só partícula) requer que a concentração da suspensão seja muito pequena.

Neste trabalho, para avaliar a dimensão dos pós de PEDOT, procedeu-se à sua dispersão em água, utilizando o sonicador (figura 9). O processo foi efetuado num só ciclo a 90% de amplitude. Na tabela 9 apresentam-se as concentrações usadas para produzir as suspensões dos vários pós analisados e os tempos a que foram sujeitas a sonicação. Algumas suspensões tiveram que ser sujeitas a um maior tempo de sonicação do que outras para que se pudesse obter uma suspensão homogénea.

Tabela 9 Concentrações de pós de PEDOT em água, usadas para obter as suspensões para análise em DLS e tempos de sonicação a que as preparações foram sujeitas.

PEDOT	Concentração / mg ml ⁻¹	Tempo de sonicação/min
PEDOT:AA (síntese 1)	0,1	1
PEDOT:AA (síntese 2)	0,1	1
PEDOT:AA (síntese 3)	0,1	20
PEDOT:[BMIM][Tf ₂ N] (síntese 1-2)	0,125	15
PEDOT:[BMIM][Tf ₂ N] (síntese 3)	0,125	20

Na figura 13 encontra-se o equipamento de DLS utilizado. O *software* utilizado para recolher os dados foi o *AvidNano*.



Fig. 13 Equipamento de DLS *W130i* usado para avaliar o tamanho das partículas dos pós de PEDOT.

2.3 Preparação das Matrizes de Fibras

Na figura 14 está representada a montagem utilizada para a produção das matrizes de fibras de gelatina de peixe e de gelatina de peixe e PEDOT (PEDOT:AA e PEDOT:[BMIM][Tf₂N]) por eletrofição. O sistema compreende uma bomba infusora onde se coloca a seringa com a solução (figura 14 (a)), uma agulha metálica e um coletor (neste trabalho usou-se um cilindro rotativo) ligado à terra (figura 12 (b)) e uma fonte de tensão que estabelece a diferença de potencial entre a agulha e o coletor (figura 12 (c)).

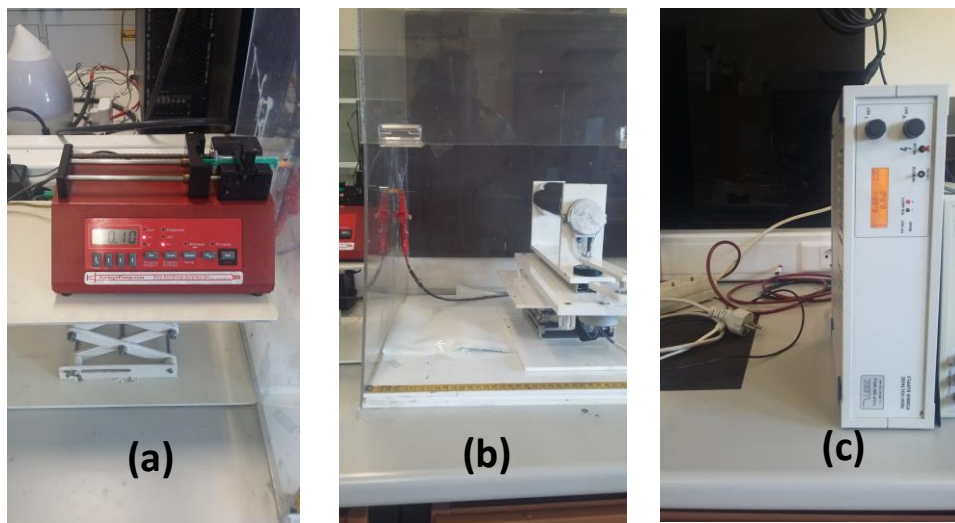


Fig. 14 Montagem experimental do sistema de eletrofição utilizado. Bomba infusora (a), agulha e coletor (b) e fonte de tensão (c).

2.3.1 Soluções poliméricas produzidas

Na tabela 10 apresenta-se os solventes e a gelatina que, juntamente com os pós de PEDOT:AA e PEDOT:[BMIM][Tf₂N] sintetizados neste trabalho, foram usados na produção das soluções poliméricas a eletrofiar.

Tabela 10 Solventes e gelatina usados na preparação das soluções a eletrofiar.

Material	Fórmula química	Massa molecular / g mol ⁻¹	Fornecedor
Ácido acético	CH ₃ COOH	60,05	Fisher Chemical
Etanol	C ₂ H ₅ OH	40,07	Fisher Chemical
Gelatina de peixe	-	60000	Sigma-Aldrich®

Na tabela 11 apresenta-se a composição polimérica das várias soluções produzidas usando uma solução aquosa de ácido acético a 90% (m/m) como solvente.

Tabela 11 Soluções poliméricas produzidas.

PEDOT % (m/m)	Gelatina de peixe % (m/m)
PEDOT:AA (síntese 2) 5%	25%
PEDOT:AA (síntese 3) 5%	25%
PEDOT:[BMIM][TF ₂ N] (síntese3) 5%	25%

Na preparação das soluções, o pó de PEDOT foi disperso na solução de ácido acético a 90% com a ajuda de um sonicador (figura 9 (a)) durante 15 min (1 *cycle*, amplitude 60%). A amplitude 60% diz respeito à potência que foi utilizada durante o processo, tendo em conta que a potência máxima do aparelho é de 50 W. Em seguida adicionou-se a gelatina de peixe à solução que foi colocada sob agitação durante 24h para a dissolução da gelatina.

2.3.2 Eletrofiação das Soluções Produzidas

Os parâmetros do processo de fiação da solução de gelatina de peixe a 25% em AA a 90% foram determinados anteriormente em trabalhos levados a cabo no laboratório: agulha de calibre 23, 20 cm de distância entre a agulha e o colector, caudal de infusão da solução de 0,2 ml e 15 V aplicados à agulha [53]. No entanto, a introdução de PEDOT na solução de gelatina exigiu que se testassem condições de fiação desta nova solução. Os testes foram realizados com a solução produzida usando o pó PEDOT:AA (síntese 2). Os parâmetros obtidos foram depois usados na fiação das soluções produzidas usando os pós PEDOT:AA (síntese 3) e PEDOT:[BMIM][BMIM][Tf₂N] (síntese 3).

Os parâmetros de produção testados foram o caudal, a tensão aplicada e o diâmetro interno da agulha. Consideraram-se os caudais de 0,1 ml/h e 0,3 ml/h, tensões de 10 KV, 15 KV, 20 KV e agulhas de calibre 21 e 23, cujos diâmetros internos são respectivamente 0,49 mm e 0,32 mm. A distância entre a ponta da agulha e o colector foi sempre a mesma, 20 cm. À medida que os vários parâmetros de produção iam sendo testados, também iam sendo recolhidas fibras em lâminas de vidro que foram analisadas ao microscópio ótico *VisiCam 3.0* (figura 15).

Com base nos resultados, definiram-se os parâmetros de produção das fibras a partir das soluções de PEDOT e gelatina: agulha de calibre 23, 20 cm de distância entre a agulha e o coletor, caudal de infusão da solução de 0,1 ml/h e 15 KV aplicados à agulha.

Para as várias soluções fiadas foram feitas deposições de fibras numa folha de alumínio colocada em volta do coletor cilíndrico que foi mantido a rodar num regime de baixa rotação. Estas deposições foram usadas nos testes de reticulação. Para a cultura celular, as fibras foram recolhidas em lamelas circulares com diâmetro de 12 mm que se fixaram à folha de alumínio com a ajuda de pequenas gotas de água. As deposições de fibras foram colocadas numa estufa a 80°C durante 48h para promover a evaporação dos resíduos de ácido acético que é tóxico para as células. Após este procedimento, algumas das fibras depositadas sobre as lamelas fixas ao alumínio soltaram-se. Preparou-se então uma solução de PCL a 10% (m/m) que foi usada para fixar as fibras sobre as lamelas à borda destas. As deposições foram sujeitas ao processo de reticulação da gelatina.



Fig. 15 Microscópio óptico *VisiCam 3.0* utilizado para analisar as fibras.

2.3.3 Reticulação da Gelatina

As matrizes produzidas (a partir das soluções indicadas na tabela 11) foram sujeitas a um processo de reticulação da gelatina com GTA. Para tal, as matrizes foram colocadas numa caixa hermética, fechada, com dois recipientes abertos com 25 ml de solução aquosa de GTA a 50%. A caixa foi colocada numa estufa, a 37°C, durante 4h.

2.4 Caracterização das Matrizes

Para caracterizar as matrizes de fibras eletrofiadas a partir das soluções de gelatina e PEDOT (tabela 11) procedeu-se à sua análise morfológica e química.

2.4.1 Análise morfológica

Para a análise morfológica recorreu-se à microscopia ótica e à microscopia eletrónica de varrimento (SEM). A técnica de SEM foi levada a cabo utilizando o equipamento *TM 3030Plus*. A partir das imagens de SEM e utilizando o *software ImageJ* foram calculados os diâmetros das fibras.

2.4.2 Análise química

O equipamento de SEM utilizado para a observação da morfologia das matrizes permitiu ainda fazer a caracterização elementar das amostras pela técnica de espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS). Nesta técnica, a constituição elementar da amostra é revelada pela presença no espectro de emissão de raios X dos picos característicos da estrutura atómica dos elementos que estão presentes.

As matrizes de fibras foram ainda analisadas pela técnica de espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) antes e depois de terem sido sujeitas aos processos de reticulação. A técnica de FTIR permite obter o espectro (de absorção ou emissão) de uma dada amostra na região do infravermelho onde surgem bandas características de vibrações específicas das ligações químicas presentes. Neste trabalho foi usada a variante ATR (reflexão total atenuada), que permite que a amostra seja analisada diretamente sem qualquer preparação prévia.

2.5 Testes *in vitro*

Foram realizados testes *in vitro* para detetar eventuais efeitos citotóxicos dos pós de PEDOT e para fazer uma avaliação preliminar da adesão e proliferação de células semeadas sobre as matrizes. Em ambas as avaliações foi usada a linha de células *Vero*. Os procedimentos foram efetuados numa câmara de fluxo laminar (*EscoLabculture®Class II*).

2.5.1 Testes de Citotoxicidade

Os testes de citotoxicidade foram realizados aos pós de PEDOT:AA (síntese 1) e de PEDOT:[BMIM]:[Tf₂N] (síntese 1-2). Os testes foram realizados pelo método do extrato e de acordo com a norma ISSO 10993-5, como a seguir se descreve. Para cada pó, colocaram-se 50 mg num *ependorfe* de seguida foi adicionado 1 ml de uma solução aquosa de etanol a 70% para proceder à esterilização.

Após a adição da solução de etanol, o *ependorf* foi agitado para promover o contacto com as partículas. Apesar das lavagens a que os pós foram sujeitos, durante a esterilização verificou-se que a solução apresentava uma cor que indicava a presença de FeCl₃ não reagido e por isso substituiu-se a solução de etanol por várias vezes aumentando assim o número de ciclos de lavagem durante a esterilização. O *ependorf* foi depois deixado aberto durante dois dias na câmara de fluxo laminar para que a evaporação do solvente ocorresse.

Adicionou-se de seguida 1 ml de meio de cultura (DMEM) ao pó e colocou-se o *ependorf* numa estufa a 37°C. Após as 48 h, os extratos foram colocados nos poços de uma caixa de 96 poços, numa sementeira de células efetuada anteriormente. A placa foi posta a incubar durante 48 h a 37°C. Procedeu-se de seguida à avaliação de possíveis efeitos citotóxicos utilizando rezazurina como indicador colorimétrico de viabilidade celular (ver secção 2.6.3). Para tal o meio de cada poço foi substituído pela solução de rezazurina usada no teste.

2.5.2 Teste de Adesão e Proliferação

Antes de se proceder aos testes de adesão e proliferação de células *Vero* semeadas sobre as matrizes, estas foram sujeitas a um tratamento com glicina que visa eliminar resíduos tóxicos resultantes da exposição das matrizes ao vapor de GTA usado para a reticulação da gelatina. Não foi efetuado nenhum procedimento adicional de esterilização das matrizes já que a exposição ao GTA assegura a necessária esterilização. Assim, as lamelas circulares com as matrizes reticuladas foram colocadas em caixas de *petri* e completamente cobertas com uma solução de glicina de 20 mg/ml filtrada, durante mais de 24 horas.

Para a realização dos testes de adesão e proliferação foi utilizada uma placa de 24 poços, cada um com a área de cerca de 2 cm². Os materiais a testar foram fixos em suportes de *teflon* que deixam exposta uma área de cerca de 0,5 cm² (disponível para a cultura). Cada suporte de *teflon* foi colocado num poço da caixa de poços. As células foram semeadas com uma densidade de 2 × 10⁴ células/cm². Foram usadas 6 réplicas de cada uma dos 3 tipos de matrizes (gelatina de peixe, gelatina de peixe com PEDOT:AA da síntese 3 e gelatina de peixe com PEDOT:[BMIM]:[Tf₂N] da síntese 3) e réplicas do controlo de células. Os restantes 2 poços da placa foram usados para o controlo de meio necessário para o teste de viabilidade.

A partir de avaliações de viabilidade efetuadas ao fim de 24 e 72 horas de incubação das células, foram realizados testes de avaliação da viabilidade utilizando resazurina visando determinar as taxas de adesão e de proliferação, respetivamente. Para tal, usou-se o procedimento descrito na secção seguinte. Após o período de incubação retirou-se 140 µl do meio dos poços para uma placa de 96 poços que foi lida no leitor de placas.

2.5.3 Avaliação da viabilidade celular usando resazurina

O teste de resazurina é um teste colorimétrico em que a resazurina, um composto cor-de-rosa, é reduzida a resorufina pelas células metabolicamente ativas. A redução de resazurina em resorufina provoca uma mudança de cor do meio que pode ser analisada através da leitura das absorvâncias. O máximo de absorvância da resazurina ocorre a 601 nm e o da resorufina a 571 nm. Para avaliar a viabilidade celular, foram efetuadas leituras nos comprimentos de onda característicos da resazurina e da resorufina recorrendo a um leitor de placas (*Biotek ELX 8000UV*).

Antes da realização do teste de viabilidade é preparado meio com resazurina: 50 % de meio de cultura e 50 % de uma solução de resazurina a 0,04 mg/ml em PBS. Os meios dos poços a testar são então aspirados e de seguida é colocado meio com resazurina. Devem ser ainda estabelecidos controlos de meio, colocando a solução de resazurina em poços limpos da placa. A placa é incubada durante um período de tempo (entre 2h a 3h). Ao fim desse tempo foram efetuadas as leituras de absorvância a 601 nm (D0601) e a 571 nm (D0571).

Para se obter uma informação quantitativa da conversão de resazurina em resorufina é necessário efetuar a subtração (D0571- D0601). Esta subtração deve ser aplicada a todos os poços, mesmo para os que não contém células, como os do controlo de meio (DOCM570-DOCM601). A medida da resazurina convertida em resorufina é dada por (D0571- D0601) - (DO571- D0601). A viabilidade celular numa determinada condição em relação à de um controlo de células é avaliada pela razão entre a resazurina convertida nessa condição e a convertida no controlo.

3. Apresentação e Discussão de Resultados

3.1 Polimerização química do PEDOT

O trabalho realizado teve como objectivo eletrofiar matrizes de fibras poliméricas à base de gelatina e que incluía PEDOT, por forma a que a sua condutividade seja adequada à aplicação de estimulação eléctrica a células neuronais. Para que tal suceda, é necessário que os pós de PEDOT incorporem as soluções a fiar sob a forma de dispersões de partículas finas. Tendo em conta este objectivo, testaram-se as duas vias apresentadas na secção 2.1. para produzir os pós: numa o EDOT foi disperso em ácido acético e o oxidante dissolvido em etanol e na outra utilizou-se o [BMIM][Tf₂N] para dissolver o EDOT e o oxidante. Em ambos os casos, a polimerização química de EDOT foi efetuada utilizando o rácio molar de EDOT para FeCl₃ expresso pela equação representada na figura 2 da secção 1.1. que, na condição de todos os reagentes serem consumidos, levaria à formação do PEDOT no seu estado condutor.

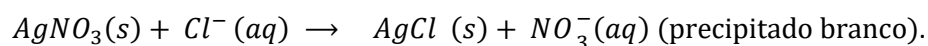
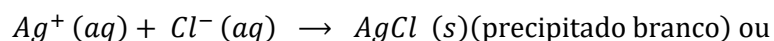
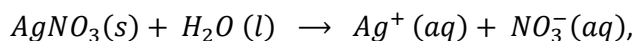
Após a primeira polimerização de PEDOT efetuada em meio ácido, o polímero PEDOT:AA (síntese 1) foi alvo de um processo de lavagem com água com o objetivo de eliminar reagentes não reagidos e subprodutos da reacção. No entanto, e apesar do carácter ácido do meio da reacção, a utilização da água pode conduzir à formação de precipitados de hidróxidos de ferro que fiquem misturados com os pós produzidos. Por este motivo as lavagens subsequentes foram realizadas com etanol e metanol. Estes álcoois também têm a vantagem de dissolver EDOT não reagido o que proporciona a sua remoção.

Na secção seguinte serão apresentados os resultados da monitorização da eficiência do processo de lavagem do polímero realizada através da análise dos sobrenadantes das lavagens com recurso a testes colorimétricos e a espectroscopia de UV-vis.

3.2 Lavagem do polímero

A lavagem dos pós resultantes do processo de polimerização química foi efetuada como descrito na secção 2.2. Os testes de hidróxido de sódio e de nitrato de prata foram realizados por forma a avaliar a eficiência das lavagens na remoção de contaminantes provenientes do cloreto de ferro.

O teste de nitrato de prata foi realizado adicionando 4 gotas de solução de $AgNO_3$ de concentração 0,017 g/ml a 300 μ l das soluções a testar. De seguida apresentam-se algumas reações químicas que podem ocorrer durante o teste de nitrato de prata:



Foram avaliadas três soluções: a solução de $FeCl_3$ em etanol e as águas da 1ª lavagem e da 6ª lavagem do PEDOT:AA (síntese 1). Na figura 16 estão representados os resultados.

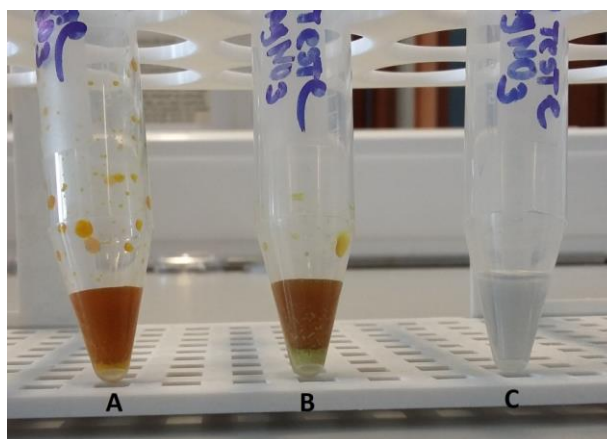
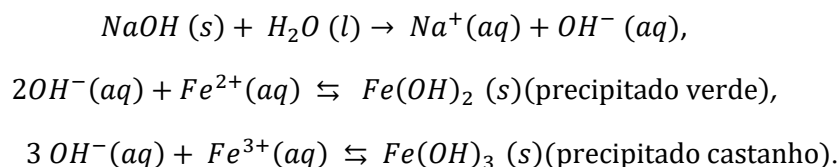


Fig. 16 Resultados do teste de nitrato de prata para detecção da presença de iões de Cl numa solução de $FeCl_3$ em etanol (A) e nas águas da lavagem do PEDOT:AA (síntese 1): 1ª lavagem (B) e 6ª lavagem (C).

Tanto no tubo A como no tubo B o teste de nitrato de prata deu positivo, pois em ambos os casos é visível a presença de um precipitado esbranquiçado nos tubos. Acima deste precipitado a cor castanha indica a presença cloreto de ferro III. Já no tubo C, observou-se a formação de um precipitado branco, mas em menor quantidade do que do tubo B e a solução acima do precipitado apresentou uma cor quase transparente, o que mostra que a presença de iões Cl^- e de ferro é reduzida.

O teste de hidróxido de sódio foi realizado adicionando mais de 10 gotas de solução de NaOH de concentração 0,5 M a 300 μl das soluções a testar. De seguida apresentam-se as equações químicas de algumas possíveis reações que podem ocorrer durante o teste:



Foram avaliadas exatamente as mesmas soluções usadas no teste do nitrato de prata: a solução de FeCl_3 em etanol e as águas da 1ª lavagem e da 6ª lavagem do PEDOT:AA (síntese 1). Na figura 17 estão representados os resultados.

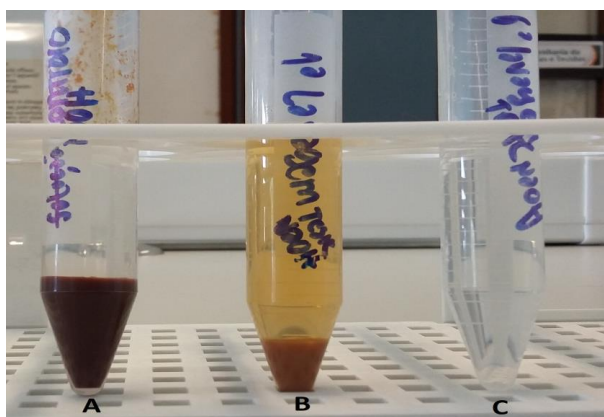


Fig. 17 Resultados do teste de hidróxido de sódio para a detecção da presença de iões de Fe numa solução de FeCl_3 em etanol (A) e nas águas da lavagem do PEDOT:AA (síntese 1): 1ª lavagem (B) e 6ª lavagem (C).

O precipitado do tubo A apresenta uma cor castanho-escuro, o do tubo B uma cor castanho-clara e o do tubo C não apresenta precipitado nem nenhuma alteração de cor (figura 17). O íon Fe^{3+} está presente tanto no tubo A (como seria de esperar) como no tubo B, pois os precipitados obtidos apresentaram cor castanha (menos intensa no tubo B). No tubo C, para além de não se ter formado nenhum precipitado visível também não houve nenhuma alteração de cor, o que permite concluir que a presença de íões Fe^{2+} e Fe^{3+} a existir, estará abaixo do limite de detecção deste teste.

O teste de hidróxido de sódio também foi efetuado para as soluções sobrenadantes das centrifugações correspondentes às três primeiras lavagens de PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 1) (figura 18).

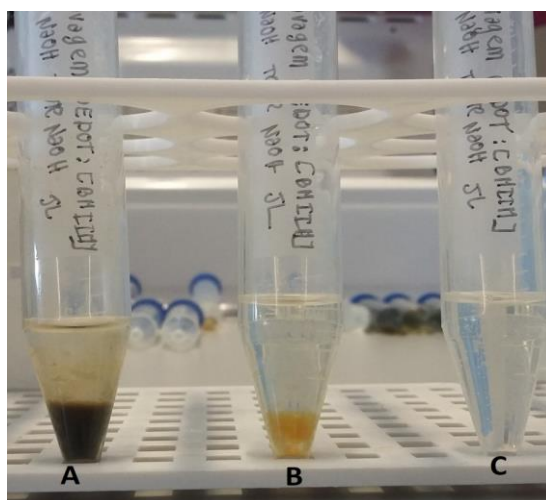


Fig. 18 Teste de hidróxido de sódio realizado aos sobrenadantes da lavagem do PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 1) correspondentes à 1ª lavagem (A), 2ª lavagem (B) e 3ª lavagem (C).

O precipitado do tubo A apresentou uma cor verde (embora tal não seja perceptível na foto), o do tubo B uma cor castanha-esverdeada e a do tubo C não apresentou nenhum precipitado nem alteração da cor do sobrenadante. Tendo em conta as cores dos precipitados, pode concluir-se que existem íões Fe^{2+} na água da 1ª lavagem e na da 2ª podem existir tanto íões Fe^{2+} como Fe^{3+} . No tubo C, não existe evidência da presença destes íões, pelo que, a existirem, estarão presentes numa concentração abaixo do limite de detecção do teste.

De forma a conferir os resultados do teste de hidróxido de sódio foram obtidos espectros UV-vis dos sobrenadantes da 6ª lavagem do PEDOT:AA (síntese 1) e das três primeiras lavagens do PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 1). Os resultados são apresentados na figura 19 e 20, respectivamente.

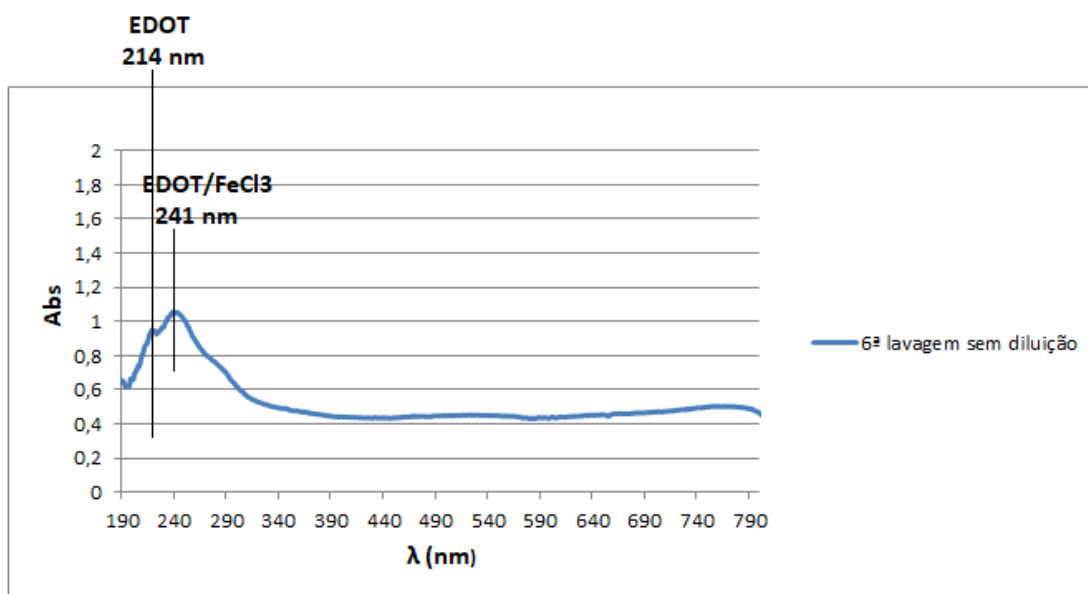


Fig. 19 Espectro UV-vis do sobrenadante da 6ª lavagem do PEDOT:AA (síntese 1).

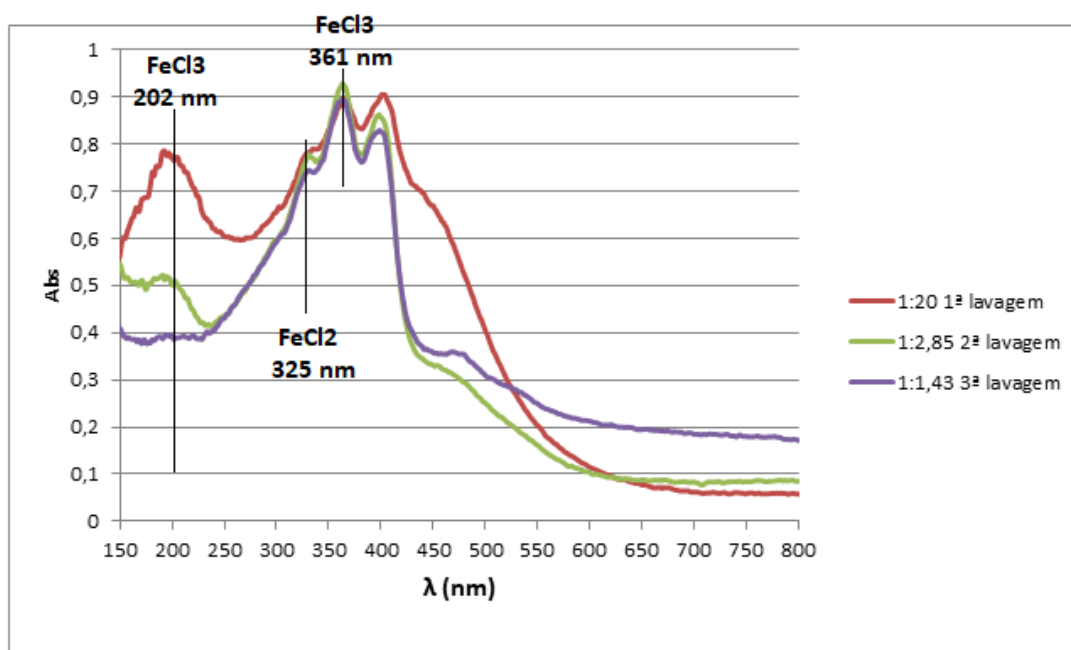


Fig. 20 Espectros UV-vis dos sobrenadantes da 1ª, 2ª e 3ª lavagem do PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 1).

Através do espectro UV-vis da figura 19 é possível observar que na 6ª lavagem ainda existe um pico característico de FeCl_3 a 241 nm [54,55]. Este resultado prova que o teste de hidróxido de sódio tem limitações, uma vez que segundo ele, a água da 6ª lavagem não apresenta ferro.

Devido à baixa intensidade da lâmpada do espectrofotómetro abaixo dos 200 nm, não é possível retirar conclusões dos espectros UV-vis da figura 20 abaixo desse comprimento de onda. Nos espectros da 1ª e 2ª lavagens surge um pico por volta dos 200nm que pode ser atribuído à presença de FeCl_3 e que se reduz significativamente após a 3ª lavagem [54,55]. O pico a 325 nm pode ser atribuído à presença de FeCl_2 [56] e o que surge a 361 nm à presença de FeCl_3 [54,55]. Esta presença de iões Fe^{3+} e Fe^{2+} não foi contudo detetada no teste de NaOH (não ocorreu mudança de cor). Esta situação pode dever-se à falta de sensibilidade do teste para a quantidade de iões presentes na solução.

Para proceder à identificação dos picos dos espectros de UV-vis, construiu-se a tabela 12 onde estão representadas algumas absorções no UV-vis características de possíveis componentes presentes nos sobrenadantes das lavagens, obtidos a partir da literatura.

Tabela 12 Picos característicos do PEDOT e de alguns reagentes envolvidos na sua síntese química.

Componentes	Picos característicos	Referências
PEDOT:[BMIM]:[Tf₂N]	197nm e 265nm	Identificados neste trabalho*
PEDOT	507nm-541nm	[57]
FeCl₄⁻	270nm e 370nm	[58]
EDOT	215nm e 243nm	[59]
FeCl₃	200nm;240nm;275nm;300nm;315nm;370nm	[54,55]
FeCl₂	262,2nm 330nm	[56]

*Encontra-se no apêndice A o espectro de UV-vis do PEDOT:[BMIM]:[Tf₂N].

Para as restantes sínteses de PEDOT:AA e de PEDOT:[BMIM][Tf₂N] obtiveram-se espectros UV-vis das últimas lavagens com o objectivo de detetar picos característicos de ferro. Os testes de hidróxido de sódio e de nitrato de prata não foram realizados devido às suas limitações.

3.3 Caracterização química do PEDOT sintetizado

3.3.1 FTIR

A técnica de FTIR foi utilizada para confirmar a polimerização dos monómeros de EDOT em PEDOT e averiguar a estrutura química do PEDOT sintetizado nas duas condições consideradas (PEDOT:AA e PEDOT:[BMIM][Tf₂N]). No gráfico da figura 21 apresentam-se os espectros de FTIR que se obtiveram para o EDOT, PEDOT:AA (síntese 3) e PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 3).

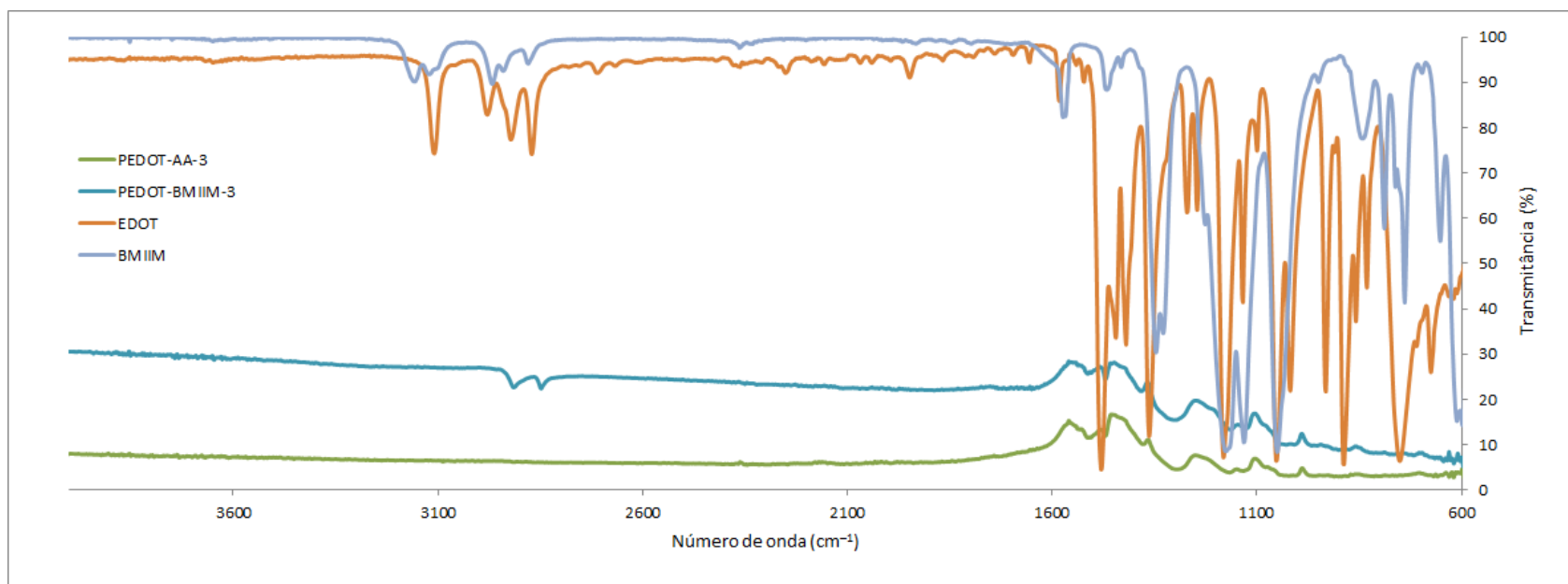


Fig. 21 Espectros de FTIR do EDOT, PEDOT:AA (síntese 3) e PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 3).

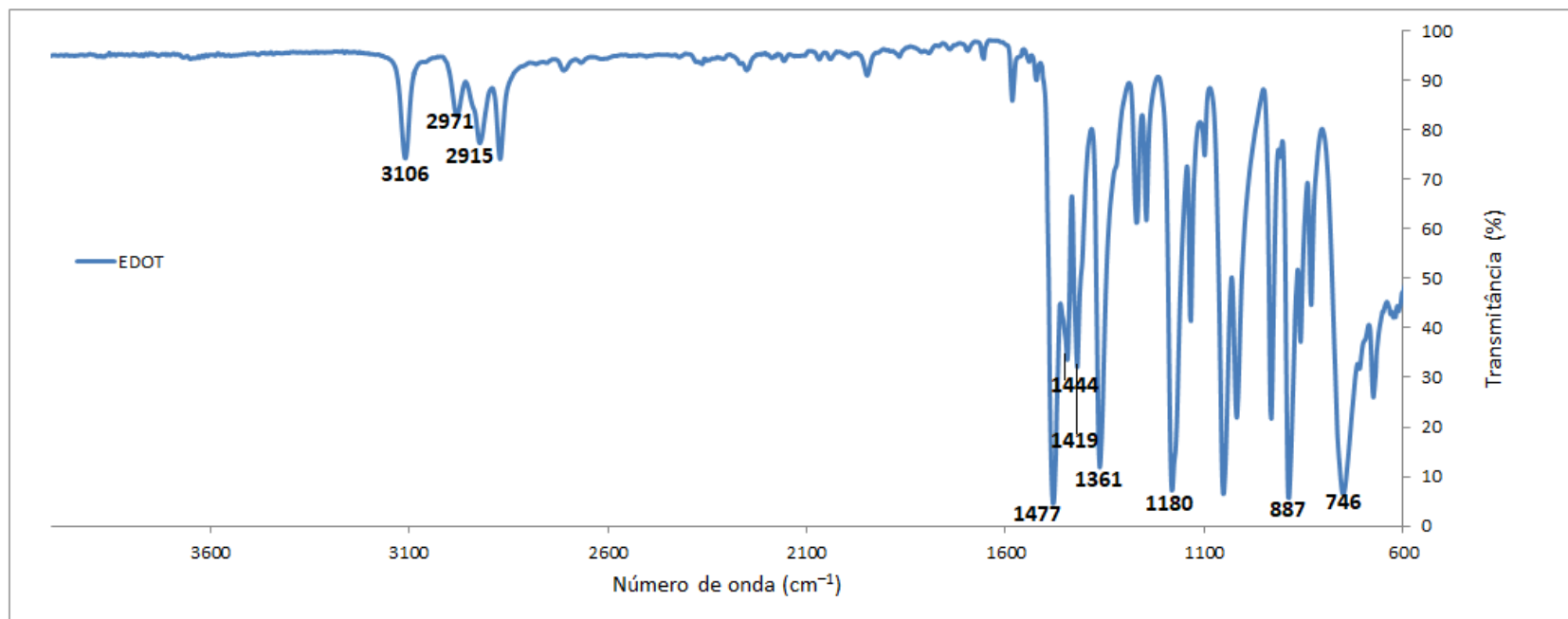


Fig. 22 Espectro de FTIR do EDOT utilizado neste trabalho.

Na tabela 13 estão indicadas as localizações das bandas características do EDOT referidas na literatura e a sua associação às que surgem no espectro da figura 22.

Tabela 13 Bandas de absorção características do EDOT no infravermelho.

Número de onda / cm^{-1} Literatura	Referência	Número de onda / cm^{-1} Obtido	Descrição
3112	[22]	3106	Estiramento da vibração C-O
2982	[22]	2971	Estiramento da vibração C-O
2925	[22]	2915	Estiramento da vibração C-O
1487/1481	[59]	1477	Estiramento da vibração C-C e C=C
1446	[22]	1444	Estiramento da vibração C-C e C=C
1422	[22]	1419	Estiramento da vibração C-C e C=C
1367/1365	[59]	1361	Estiramento da vibração C-C e C=C
1186/1185	[60, 59]	1180	Vibração de deformação no plano e fora do plano de =C-H
892/890	[60, 59]	887	Vibração de deformação no plano e fora do plano de =C-H
764/754	[60, 59]	746	Vibração de deformação no plano e fora do plano de =C-H

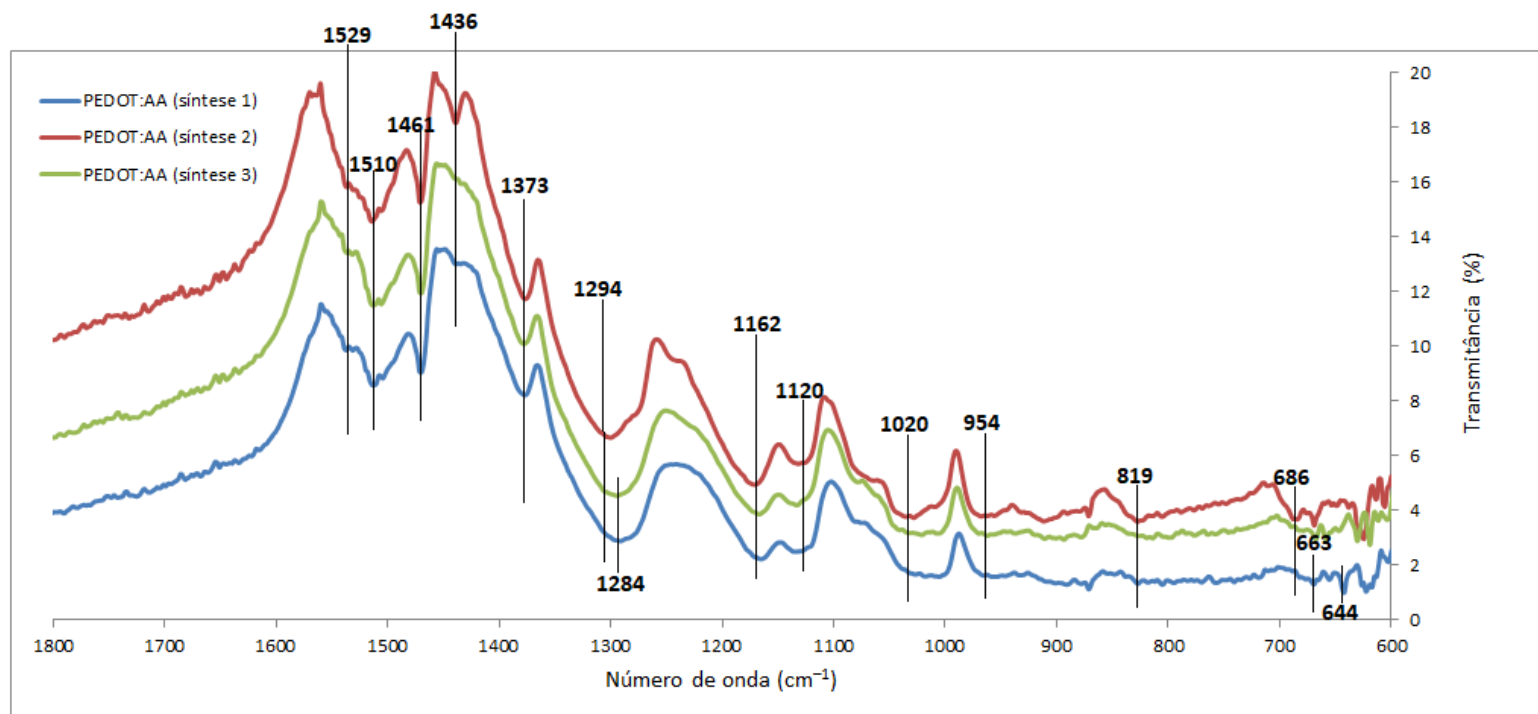


Fig. 23 Espectros de FTIR do pó de PEDOT:AA obtido por polimerização química em meio ácido utilizando FeCl_3 como oxidante.

Na figura 23 estão representados os espectros de FTIR do pó de PEDOT:AA correspondentes às três sínteses realizadas. É visível que não existem diferenças substanciais entres estes espectros, o que seria de esperar relativamente às sínteses 1 e 3 que são réplicas uma da outra. Já em relação à síntese 2, a única diferença, em relação às restantes, foi o tempo de reação sob agitação magnética (que se aumentou de 24h para 48h) o que parece não ter tido um impacto significativo na estrutura do polímero. É de notar que se assume que o tempo de reação termina quando a solução de PEDOT é retirada do agitador magnético e é adicionado metanol/etanol para iniciar o processo de lavagem.

Assim, podemos identificar as bandas características do PEDOT:AA (síntese 1, 2 e 3) que surgem aproximadamente entre 600 cm^{-1} e 1600 cm^{-1} e cuja posição se encontra marcada na figura 23. A vibração a 1510 cm^{-1} pode ser atribuída ao alongamento da ligação C=C no anel de tiofeno [22, 61]. As vibrações a 1373 cm^{-1} e 1294 cm^{-1} podem dever-se ao alongamento da ligações C-C [57, 61, 62]. As vibrações 954 , 819 e 686 cm^{-1} podem ser atribuídas ao alongamento da ligação C-S no anel de tiofeno [57, 61, 63, 62]. As bandas 1162 cm^{-1} e 1120 cm^{-1} podem dever-se à vibração de flexão da ligação C-O-C no grupo etilenodioxí. Todas as bandas anteriormente mencionadas são características do PEDOT, o que mostra que o processo de polimerização química do PEDOT:AA (síntese 1,2 e 3) foi bem-sucedida.

De seguida, na figura 24 apresenta-se o espectro de FTIR do líquido iónico [BMIM][Tf₂N] utilizado nas sínteses do PEDOT.

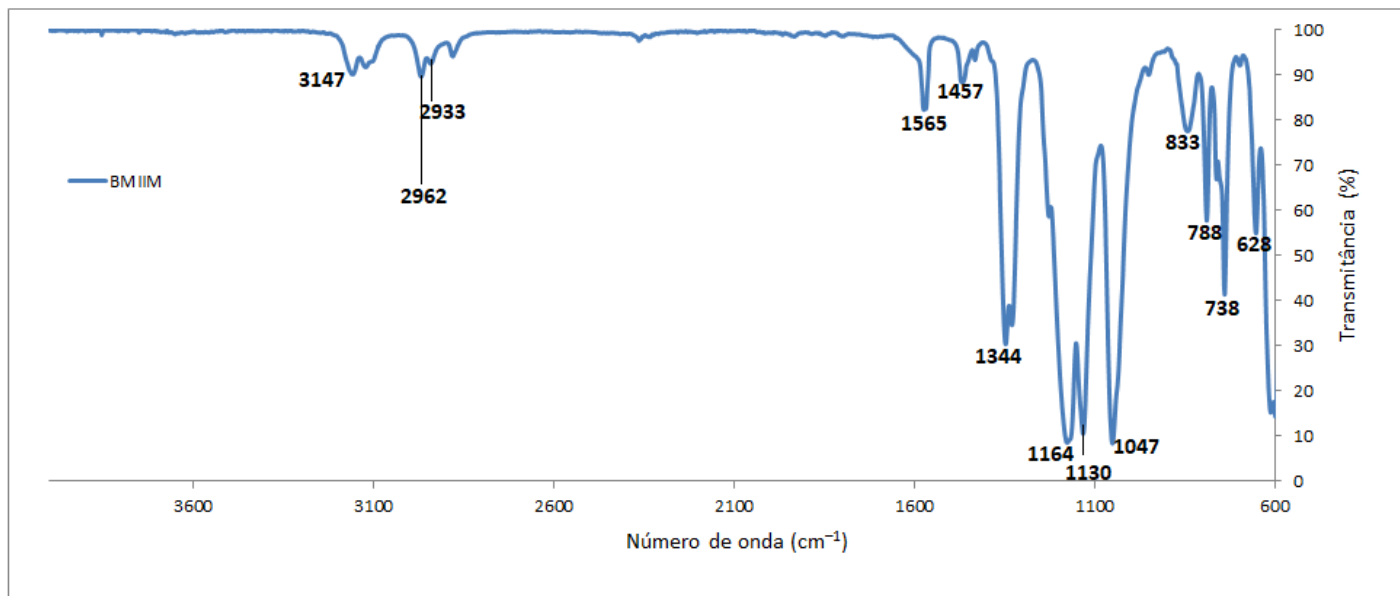


Fig. 24 Espectro de FTIR do [BMIM][Tf₂N] usado neste trabalho.

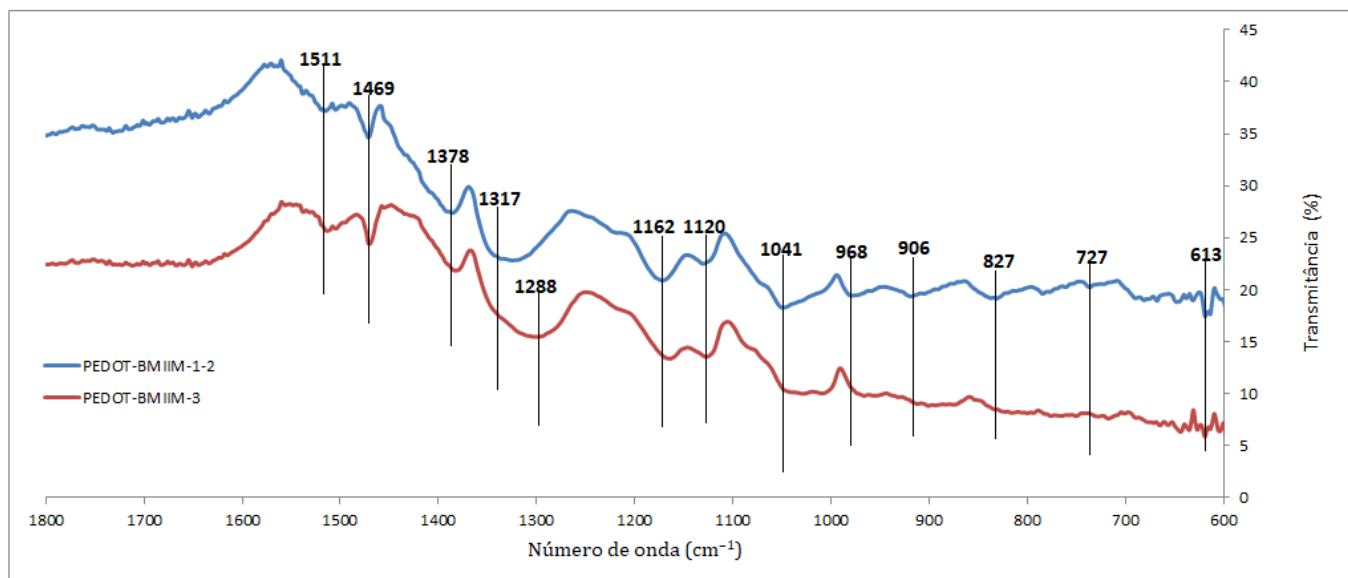


Fig. 25 Espectros de FTIR de pó de PEDOT:[BMIM][Tf₂N] obtido por polimerização química numa solução de [BMIM][Tf₂N] utilizando FeCl₃ como oxidante.

Na figura 25 estão representados os espectros de FTIR dos pós de [BMIM][Tf₂N] (síntese 1-2), resultado da mistura de pós das sínteses 1 e 2, e de [BMIM][Tf₂N] (síntese 3). Estes espectros são muito semelhantes, pois as sínteses também o foram (ver secção 2.1). As bandas características do PEDOT surgem na gama de números de onda entre 600 cm⁻¹ e 1600 cm⁻¹. A vibração a 1511 cm⁻¹ pode ser atribuída ao alongamento da ligação C=C no anel de tiofeno [22, 61]. As vibrações a 1378 e 1317 cm⁻¹ podem dever-se ao alongamento das ligações C-C [57, 61, 62]. As vibrações a 968 e a 827 cm⁻¹ podem ser atribuídas ao alongamento da ligação C-S-C no anel de tiofeno [57, 61, 63, 62]. A banda a 1041 cm⁻¹ pode dever-se à vibração de flexão da ligação C-O-C no grupo etilenodioxo [57]. A presença destas bandas mostra que o processo de polimerização do PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 1-2 e 3) foi bem-sucedido.

3.3.2 UV-vis-NIR

Dispersões de pós de PEDOT:AA e PEDOT:[BMIM][Tf₂N] preparadas como descrito na secção 2.2.1., foram analisadas por espectroscopia de UV-vis-NIR na gama 200-1300 nm. A partir destes espectros é possível identificar a presença de estados neutros e de estados condutores que dependem do estado de dopagem devido ao íão Cl⁻. O PEDOT apresenta três estados de dopagem: o neutro, o polarão e o bipolarão. Este último é o mais condutor. De seguida encontram-se os espectros de absorvância UV-vis-NIR de dispersões dos pós de PEDOT:AA obtidos nas sínteses 1, 2 e 3 (figura 26) e de dispersões dos pós de PEDOT:[BMIM][Tf₂N] das sínteses 1, 2 e 3 (figura 27).

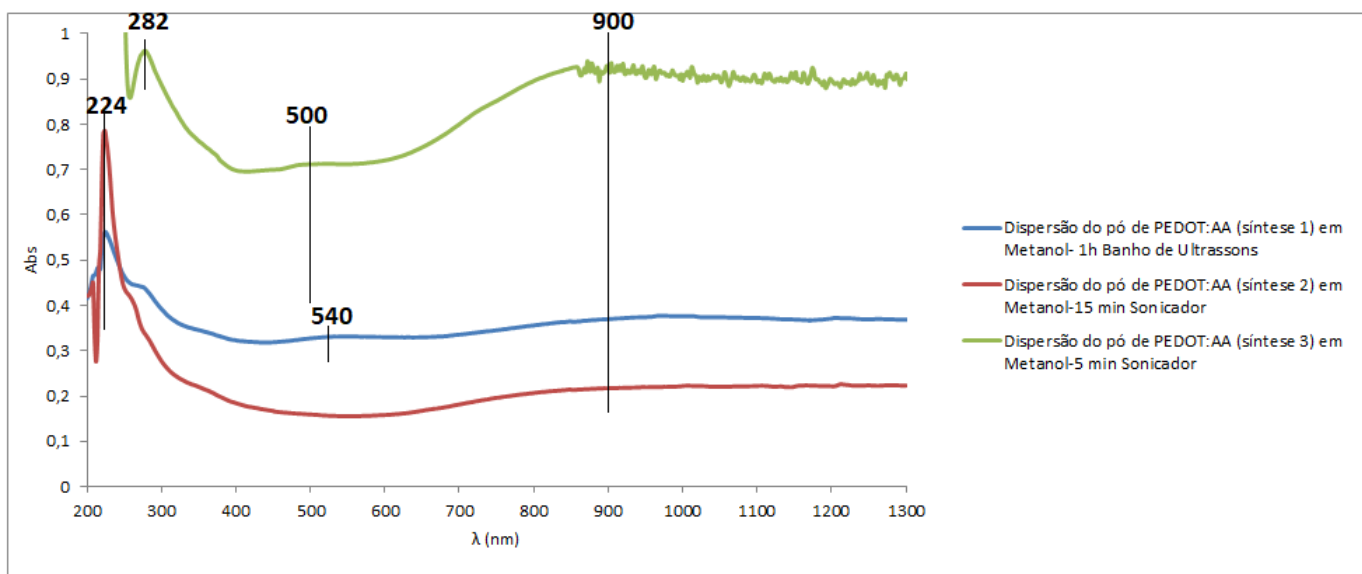


Fig. 26 Espectros de absorvância UV-vis-NIR de dispersões dos pós de PEDOT:AA.

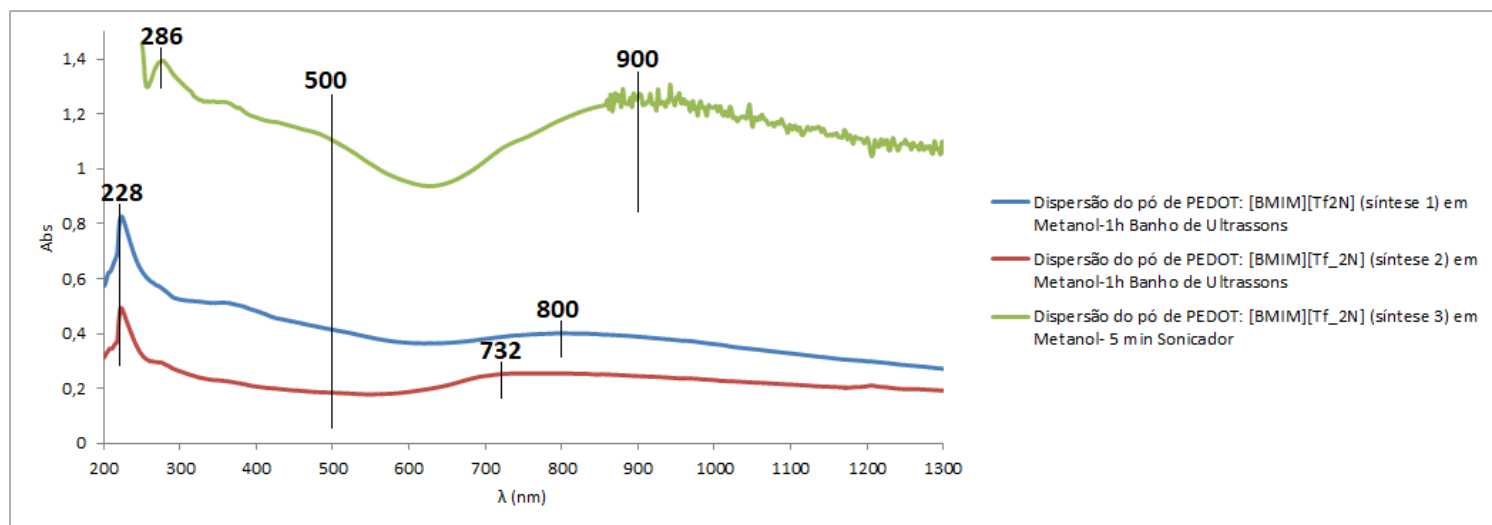


Fig. 27 Espectros de absorvância UV-vis-NIR de dispersões dos pós de PEDOT:[BMIM][Tf₂N].

Nos espectros correspondentes aos pós de PEDOT:AA (figura 26) é possível identificar uma banda centrada nos 900 nm, sendo esta mais saliente na síntese 3. Esta banda é característica do estado de polarão (PEDOT⁺) [64,65]. As bandas centradas a 500 e 540 nm, correspondem aos pós da síntese 3 e da síntese 1, respectivamente, podem ser atribuídas às transições π - π^* ao longo da cadeia polimérica [57]. Já as bandas abaixo dos 300 nm são características das transições electrónicas π - π^* no anel de tiofeno [59] (também surgem no espectro de UV-vis do EDOT).

No espectro de absorvância UV-vis-NIR PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 3) (figura 27), também está presente a banda centrada a 900 nm, característica do estado dopado de polarão. Relativamente a aos espectros das sínteses 1 e 2, esta banda centrada surge a 800 nm e 732 nm, respectivamente. Tal como para o PEDOT:AA, também surge uma banda em torno dos 500 nm, que pode ser atribuído às transições π - π^* ao longo da cadeia polimérica, e que é ,

mais saliente no caso do [BMIM][Tf₂N] (síntese 3) do que nos casos das sínteses 1 e 2. Já as bandas abaixo dos 300 nm devem-se às transições eletrônicas π - π^* no anel de tiofeno. [65,57, 59]

É de notar que nos espectros respeitantes ao PEDOT:AA (síntese 1) e PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 1) a banda entre os 500 nm e os 600 nm não é perceptível, o que se pode dever à diferença no modo de preparação das dispersões em metanol, pois para estes pós utilizou-se um banho de ultrassons durante 1h em vez de alguns minutos de sonicação.

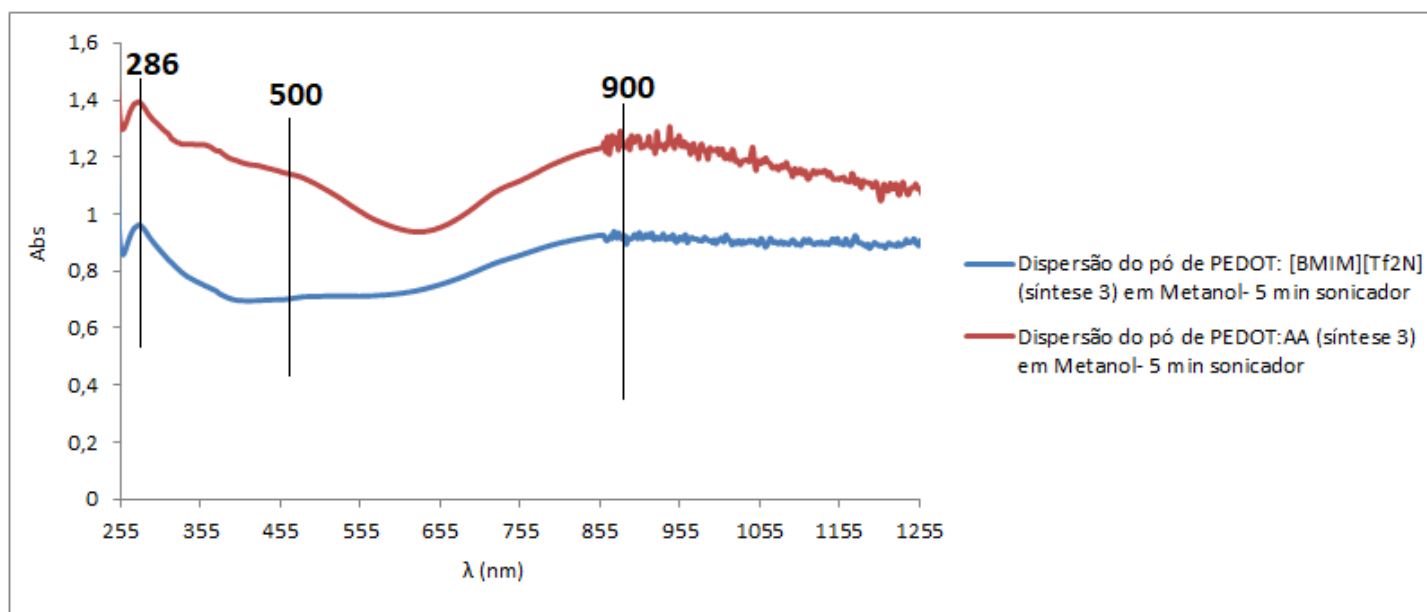


Fig. 28 Espectros de absorvância UV-vis-NIR da síntese 3 do PEDOT:AA e do PEDOT:[BMIM][Tf₂N].

Um dos objectivos deste trabalho foi investigar em que medida as propriedades do PEDOT são influenciadas por se proceder à polimerização do EDOT numa solução do líquido iónico [BMIM][Tf₂N]. Na figura 28 estão representados os espectros de absorvância UV-vis-NIR dos pós de PEDOT:AA (síntese 3) e PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 3) que foram obtidos usando dispersões semelhantes (tendo sido utilizado para o efeito o sonicador durante 5 minutos). Nesta figura podemos constatar que a razão entre a intensidade da banda associada ao estado polarão (a 900 nm) e a intensidade da banda associada ao estado neutro (500 nm) é maior para o PEDOT:AA do que para o PEDOT:[BMIM][Tf₂N], o que está de acordo com os valores indicativos da condutividade que são apresentados na secção seguinte (tabela 14).

3.4 Condutividade do PEDOT sintetizado

Tendo em conta as quantidades de pó de PEDOT obtidas nas várias sínteses, foram prensadas três pastilhas de PEDOT:AA (síntese 3) e apenas uma pastilha de PEDOT:AA (síntese 2) e de PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 3) (figura 29). Assim os resultados destas medições são apenas indicativos da condutividade dos materiais sendo necessário proceder à sua validação com mais medições. Os valores das resistências e das condutividades das pastilhas são apresentados na tabela 14.

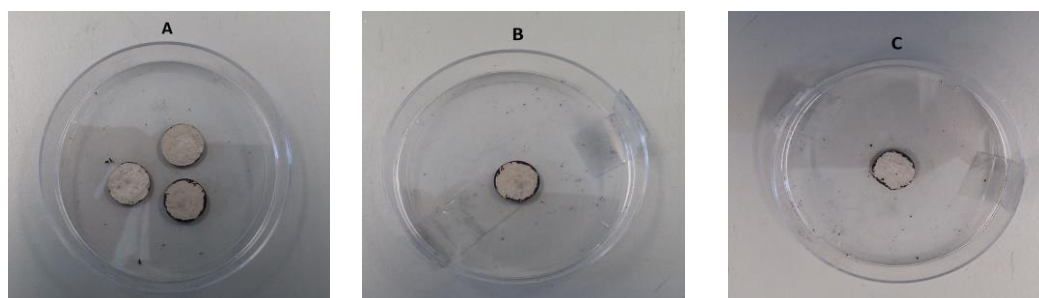


Fig. 29 Pastilhas de PEDOT:AA (síntese 3) (A), pastilha de PEDOT:AA (síntese 2) (B) e pastilha de PEDOT:[BMIM][TF2N] (C).

Tabela 14 Tabela com as resistências obtidas a partir do multímetro e as respectivas condutividades calculadas.

Material	Resistência / Ω	Condutividade / Scm^{-1}
PEDOT:AA (síntese 3)	67 ± 6	$(2,2 \pm 0,3) \times 10^{-3}$
PEDOT:AA (síntese 2)	36	$4,3 \times 10^{-3}$
PEDOT:[BMIM][Tf2N] (síntese 3)	154	$1,0 \times 10^{-3}$

Apenas foi possível calcular a incerteza associada à resistência e à condutividade para as pastilhas de PEDOT:AA (síntese 3), visto terem sido obtidas três pastilhas. Após o cálculo da média da resistência procedeu-se ao cálculo da incerteza associada a essa média. A incerteza da resistência foi calculada a partir do desvio padrão. O mesmo procedimento foi utilizado para calcular a incerteza associada à condutividade.

As pastilhas de PEDOT:AA (síntese 3) apresentam uma condutividade de $(2,2 \pm 0,3) \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$ e as de PEDOT:[BMIM][Tf2N] (síntese 3) de $1,0 \times 10^{-3} \text{ S cm}^{-1}$. Ambas as condutividades são da mesma ordem de grandeza, havendo uma ligeira tendência para a condutividade das pastilhas de PEDOT:AA ser maior. A condutividade do PEDOT está relacionada com a quantidade de dopante ao longo da cadeia e, embora em ambas as abordagens se tenha utilizado a proporção estequiométrica monómero:oxidante que permite obter o PEDOT no estado condutor, não é possível controlar a quantidade de FeCl_3 que realmente é incorporada.

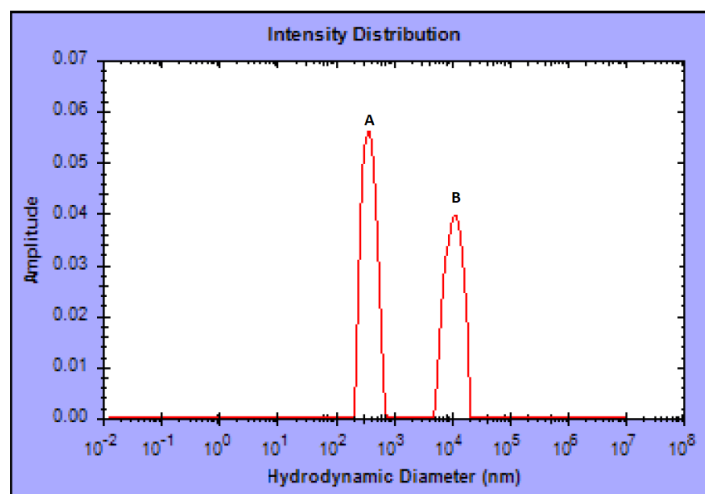
De acordo com a literatura, a condutividade de PEDOT dopado é cerca de 300 S/cm [64,61]. O valor de condutividade obtido por Kelkar *et al.* para PEDOT dopado com FeCl_3 foi de $4,55 \times 10^{-1} \text{ S/cm}$ [66]. Estes autores procederam à síntese química do PEDOT (usando FeCl_3 como oxidante) que foi depois sujeito a um processo desdopagem e a uma dopagem subsequente. O valor de condutividade obtido para o PEDOT desdopado foi de $3,41 \times 10^{-3}$. No entanto as condutividades foram medidas usando o método das quatro pontas. Assim os valores da condutividade obtidos por Kelkar *et al.* e os obtidos neste trabalho podem não ser comparáveis. Na literatura surgem valores de condutividade do PEDOT muito díspares.

É de salientar que, para a medição da condutividade das pastilhas foi necessário cobrir as faces planas das mesmas com cola de prata, podendo acontecer que, a cola se infiltre no material. Nesta situação, os valores de condutividade seriam obtidos por excesso, dada a elevada condutividade da prata.

3.5 DLS

Após os pós de PEDOT terem sido dispersos em água para a análise de DLS, estas suspensões foram deixadas a repousar durante dois dias, com o objetivo de verificar se ocorreria deposição de partículas no fundo dos frascos nos quais as dispersões tinham sido preparadas. Constatou-se que houve em todas uma ligeira deposição. Esta deposição pode corresponder a agregados de partículas ou partículas de maior dimensão que assim não foram medidas. Isto quer dizer que, se ao final de dois dias não tivesse ocorrido deposição, ter-se-iam efetuado as medições do tamanho das partículas com um maior rigor. Quando numa suspensão as partículas demoram muito tempo a depositarem-se, pode-se inferir que se está na presença de partículas pequenas, mas também leves e provavelmente na ausência de aglomerados de partículas. Estas condições são fulcrais para a qualidade da medida através da técnica de DLS.

De seguida apresentam-se os gráficos da distribuição de intensidade obtidos a partir do *software* do equipamento *AvidNano W130i*(figura 30). A partir deles foi possível extrair alguma informação acerca das populações de diâmetros existentes nas dispersões de PEDOT:AA e de PEDOT: [BMIM][Tf₂N] analisadas.



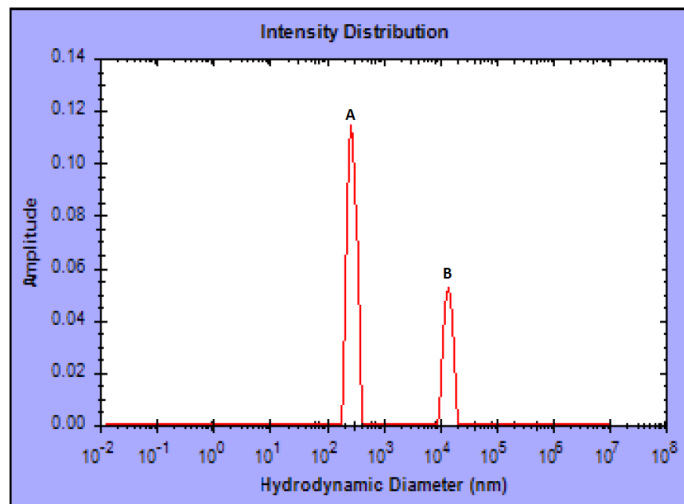
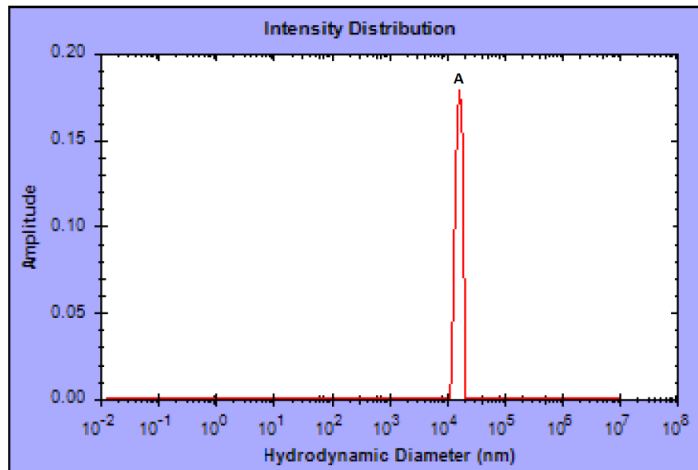
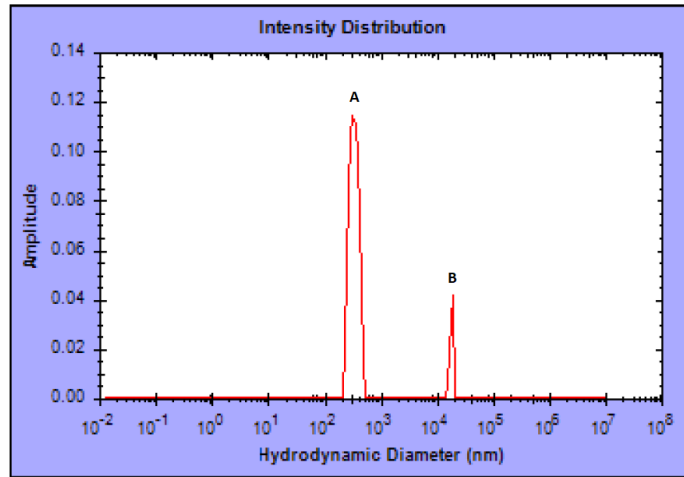


Fig. 30 Distribuição de tamanhos das partículas, obtida por DLS, para as dispersões de PEDOT:AA (síntese 2), PEDOT:AA (síntese 3), PEDOT:[BMIM][TF2N] (síntese 1-2) e PEDOT:[BMIM][TF2N] (síntese 3) em água.

Na tabela 15 apresentam-se os valores do diâmetro médio de uma dada população de partículas correspondentes aos gráficos anteriores. De notar, que para a maior parte dos gráficos identificam-se dois picos que estão indicados por A e B. Na tabela também são apresentados os desvios padrão associados ao diâmetro médio de cada população e a percentagem de polidispersão.

Tabela 15 Diâmetros médios das populações de partículas presentes nas dispersões de PEDOT:AA e PEDOT:[BMIM][Tf₂N] e os respetivos desvios padrão e polidispersão.

Dispersões	Pico A		Pico B	
	Diâmetro Médio /nm	Polidispersão / %	Diâmetro Médio /nm	Polidispersão / %
PEDOT:AA (síntese 2)	409 ± 120	30	11 825 ± 3991	34
PEDOT:AA (síntese 3)	290 ± 147	51	15 519 ± 7371	48
PEDOT: [BMIM][Tf₂N], (síntese 1-2)	14 737 ± 6 127	42	-	-
PEDOT: [BMIM][Tf₂N], (síntese 3)	294 ± 55	19	14 577 ± 2876	20

Na dispersão de PEDOT:AA (síntese 2) o pico A diz respeito a uma população de partículas com um diâmetro médio de (409 ± 120) nm. Já relativamente ao pico B, não se pode afirmar que exista uma população de partículas com um diâmetro médio de (11 825 ± 3991) nm, pois esta gama de diâmetro está fora da gama de medição do equipamento de DLS, que é de 1 a 1000 nm, e por isso corresponde a um artefacto da medição. O mesmo acontece com o pico B do PEDOT:AA (síntese 3) e do PEDOT: [BMIM][Tf₂N], (síntese 3) e também com o pico A do PEDOT: [BMIM][Tf₂N], (síntese 1-2).

Na dispersão do PEDOT:AA (síntese 3) e do PEDOT:[BMIM][Tf₂N], (síntese 3), estão presentes populações de partículas com diâmetros médios de (290 ± 147) nm e (294 ± 55) nm, respetivamente. Estes valores são semelhantes e estão próximos dos da literatura para partículas de PEDOT [67,68,69]. Tendo em conta que os valores dos diâmetros das fibras produzidas de gelatina com PEDOT são da ordem do 1200 nm (tabela 18), seria de esperar que as partículas de PEDOT se encontrassem confinadas ao interior das fibras. No entanto, nalgumas fibras é possível observar nas imagens de SEM (tabela 17) que há partículas ou agregados de partículas maiores do que o diâmetro de algumas fibras.

Dada a proximidade do diâmetro das partículas de PEDOT:AA (síntese 3) e de PEDOT: [BMIM][Tf₂N] (síntese 3), aparentemente a utilização do líquido iónico não influenciou o ta-

manho das partículas mais pequenas de PEDOT presentes nas dispersões. Quanto ao índice de polidispersão, ele é maior para o PEDOT:AA (síntese 3) (51%) do que para o PEDOT:[BMIM][Tf₂N](síntese 3) (19%), podendo dizer-se que, na gama de medida do aparelho, a dispersão de PEDOT:[BMIM][Tf₂N](síntese 3) tem partículas de tamanho mais uniforme. No entanto, as partículas maiores que poderão ter-se formado não foram medidas, como acima referido. Assim, serão necessárias outras medições (realizadas recorrendo a microscopia eletrónica de transmissão TEM) para podermos analisar as populações globalmente.

A influência da concentração de oxidante no tamanho das partículas de PEDOT foi avaliada em [67], tendo-se concluído que quanto maior for a concentração de oxidante maiores são as partículas formadas. Entre outros este também poderá ser um fator a ter em conta em trabalhos futuros.



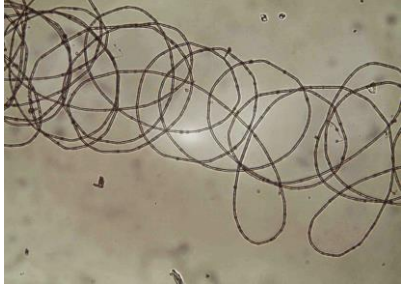

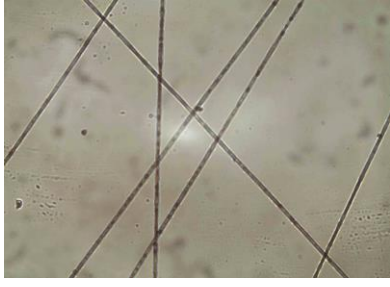

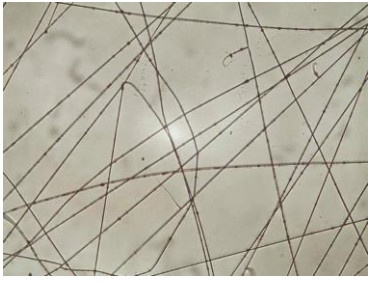
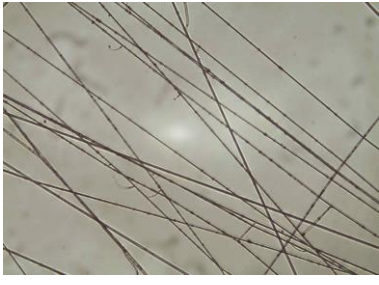
3.6 Eletrofiação de soluções de gelatina com PEDOT

Antes da produção das fibras de gelatina com PEDOT foi preparada uma solução de gelatina de peixe a 25% (m/m) em ácido acético a 90% (m/m) e procedeu-se à sua eletrofiação com o objetivo de exercitar a técnica de eletrofiação. Só depois se procedeu à fiação das soluções poliméricas descritas na secção 2.3.2.

Procedeu-se depois à fiação da solução polimérica com gelatina a 25% e PEDOT:AA (síntese 2) a 5%, começando com o conjunto de parâmetros: agulha de calibre 23, distância agulha-coletor de 20 cm, 10 KV para a tensão aplicada à agulha e 0,1 ml/h para o caudal. A fiação desta solução polimérica teve como objetivo definir as condições de fiação para a obtenção das matrizes de gelatina com PEDOT:AA (síntese 3) e PEDOT:[BMIM][Tf₂N](síntese 3) para serem depois utilizadas na cultura celular.

Na tabela 16 são apresentadas as imagens de MO que foram obtidas para vários valores de tensão aplicada à agulha e de caudal.

Tabela 16 Imagens de MO 400X de fibras obtidas a partir de uma solução de gelatina de peixe a 25% (w/w) com 5% (w/w) de PEDOT:AA (síntese 2) para vários valores da tensão aplicada e de caudal. Em todos os casos foi usada uma agulha de calibre 23 e uma distância agulha-coletor de 20 cm. A eletrofição foi realizada a uma temperatura ambiente de 20,1°C e com uma humidade relativa de 40,7 % rh.

Caudal Tensão	0,1 ml/h	0,3 ml/h
10 kV		
15 kV		
20 kV		
25 kV		

Nas imagens apresentadas na tabela anterior é visível que, em todas as condições se obtêm fibras com pequenos grânulos de PEDOT. Para a condição 0,1 ml/h e 10 KV, observou-se a acumulação de solução à saída da agulha. Nas fibras obtidas com um caudal de 0,1 ml/h e a tensão de 20 KV e 25 KV ocorriam descontinuidades na deposição (quebra da fibra), o que se deve à elevada diferença de potencial que estava a ser aplicada. Nas fibras obtidas com os parâmetros de 0,3 ml/h e 10 KV, verifica-se a acumulação de solução à saída da agulha. Já com o aumento da tensão verificaram-se dois efeitos: primeiro as fibras tinham alguma dificuldade em se fixar ao colector, formando tufos no ar e depois o jato partia dando origem a projeções de gotas e a um processo instável. Em suma, os parâmetros do processo escolhidos para a produção das fibras foram: uma agulha de calibre 23, um caudal de 0,1 ml/h, 15 KV para a tensão aplicada à agulha e uma distância de 20 cm entre a agulha e o coletor. Ainda assim, estas condições levaram à perda de alguma solução que se foi acumulando na ponta da agulha e que acabou por cair para baixo desta. No entanto, ocorre um estiramento contínuo da fibra quer a partir da ponta da agulha quer da gota acumulada. As fibras obtidas com estes parâmetros apresentam distribuição mais uniforme dos grânulos de PEDOT.

Na figura 31A pode observar-se um pedaço de matriz de gelatina com PEDOT:AA (síntese 3) obtido após a eletrofição e na figura 31B uma matriz de gelatina com DOT:[BMIM][Tf₂N](síntese 3). É de notar a cor cinzenta mais ténue na situação B. Isto deveu-se à deposição de pós no fundo do frasco onde a solução foi produzida e conseqüentemente à redução da sua concentração na mesma.

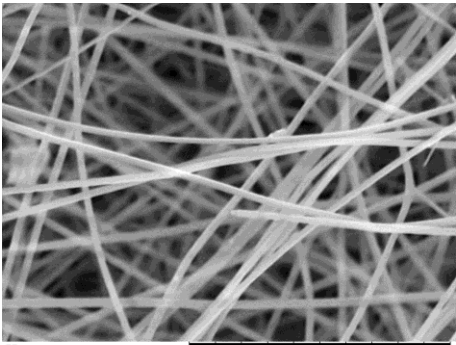
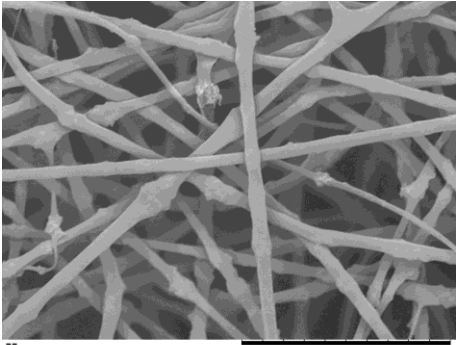
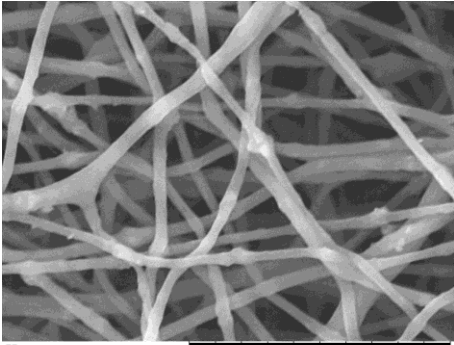
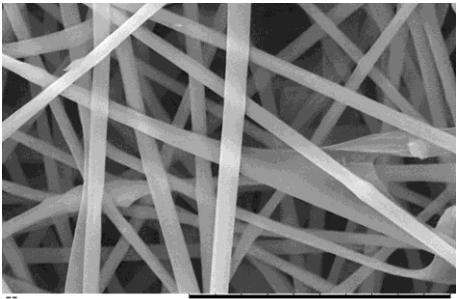
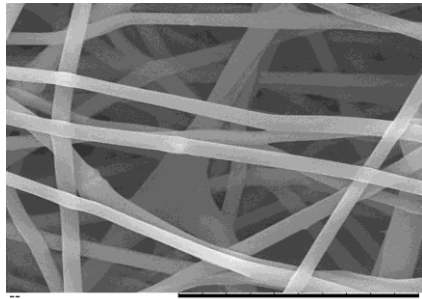


Fig. 31 Matriz de gelatina com PEDOT:AA (síntese 3) (A) e com PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (síntese 3) (B). Ambas as matrizes encontram-se não reticuladas.

3.7 SEM das deposições de fibras eletrofiadas

Para se obter uma informação mais detalhada da morfologia das fibras e dos seus diâmetros (antes e após a sua reticulação), obtiveram-se imagens de SEM, as quais se encontram representadas na tabela 17.

Tabela 17 Imagens SEM das matrizes de fibras eletrofiadas com os parâmetros de produção seleccionados (agulha de calibre 23, caudal de 0,1 ml/h, 15 KV, 20 cm antes e depois de serem reticuladas. Abaixo das imagens indicam-se condições ambientais verificadas durante a eletrofiação.

	Matrizes não reticuladas	Matrizes reticuladas
Gelatina	 <p>IMG0233 2019/09/19 15:31 NMUD10.7 x5.0k 20 µm</p> <p>20,0°C; 41,9% rh</p>	
Gelatina/PEDOT:AA 25/5	 <p>IMG9777 2019/07/26 12:16 NM D10.1 x4.0k 20 µm</p> <p>20,1°C; 40,7% rh; síntese 2</p>	 <p>IMG0222 2019/09/19 14:52 NMUD11.1 x5.0k 20 µm</p> <p>26,4°C; 41,8% rh; síntese 3</p>
Gelatina/PEDOT:[BMIM][TF ₂ N] 25/5	 <p>IMG0225 2019/09/19 15:12 NMUD11.1 x5.0k 20 µm</p> <p>27,4°C; 42,8% rh; síntese 3</p>	 <p>IMG0224 2019/09/19 15:10 NMUD11.0 x5.0k 20 µm</p> <p>27,4°C; 42,8% rh; síntese 3</p>

Nas imagens de SEM das matrizes de gelatina/PEDOT:AA é possível visualizar grânulos de PEDOT distribuídos pelas fibras. Já nas matrizes de gelatina/PEDOT:[BMIM][Tf₂N] identificam-se poucos grânulos de PEDOT. Esta situação ocorreu devido à sedimentação dos grânulos de PEDOT:[BMIM][Tf₂N] já referida anteriormente mesmo após 15 min de sonicação. Assim, a proporção gelatina/PEDOT:[BMIM][Tf₂N] é efetivamente menor sendo também menor quantidade de grânulos observados.

A partir das imagens de SEM, apresentadas na tabela 17, mediram-se os diâmetros das fibras. Na tabela 18 encontram-se os seus valores médios e os respectivos desvios padrão da média.

Tabela 18 Diâmetros médios (\bar{d}) das fibras produzidas e respectivos desvios padrão (σ).

Fibras	Reticuladas $(\bar{d} \pm \sigma)/ \text{nm}$	Não Reticuladas $(\bar{d} \pm \sigma)/ \text{nm}$
Gelatina	-	568±135
Gelatina/PEDOT:AA	1114± 360	1225±239
Gelatina/PEDOT:[BMIM][Tf ₂ N]	1353±221	1104±181

Verifica-se que o diâmetro médio das fibras de gelatina/PEDOT é da ordem dos 1200 nm, independentemente de incorporarem o PEDOT:AA ou o PEDOT:[BMIM][Tf₂N] e de terem sido ou não reticuladas. Podemos assim concluir que a exposição a vapor de glutaraldeído não alterou significativamente a morfologia das fibras.

3.8 EDS das matrizes de gelatina/PEDOT

Com o objetivo de analisar a composição elementar, submeteram-se as matrizes de gelatina:PEDOT, após reticulação, à técnica de EDS.

Na figura 32 estão representadas as zonas analisadas das matrizes, os mapas de distribuição elementar correspondentes ao S e o rácio em número dos elementos C, O e S.

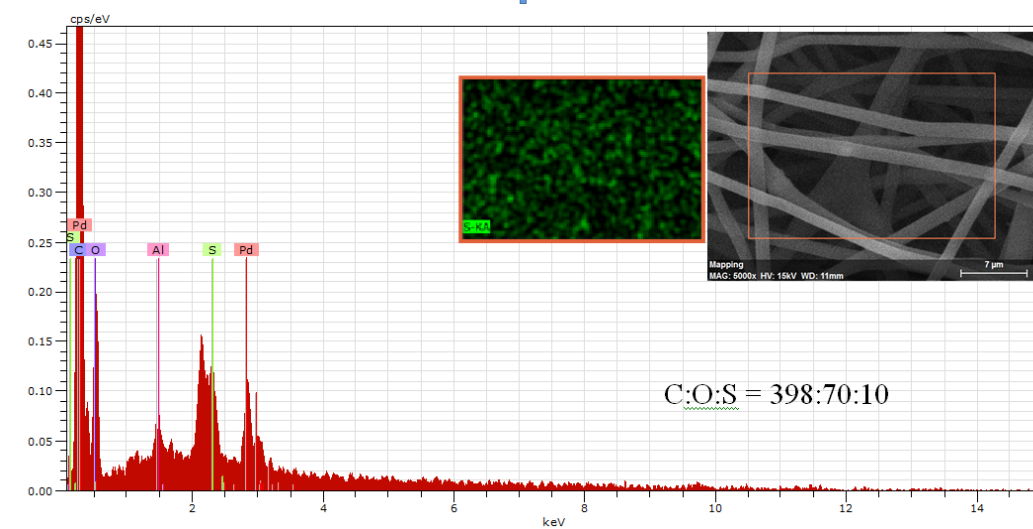
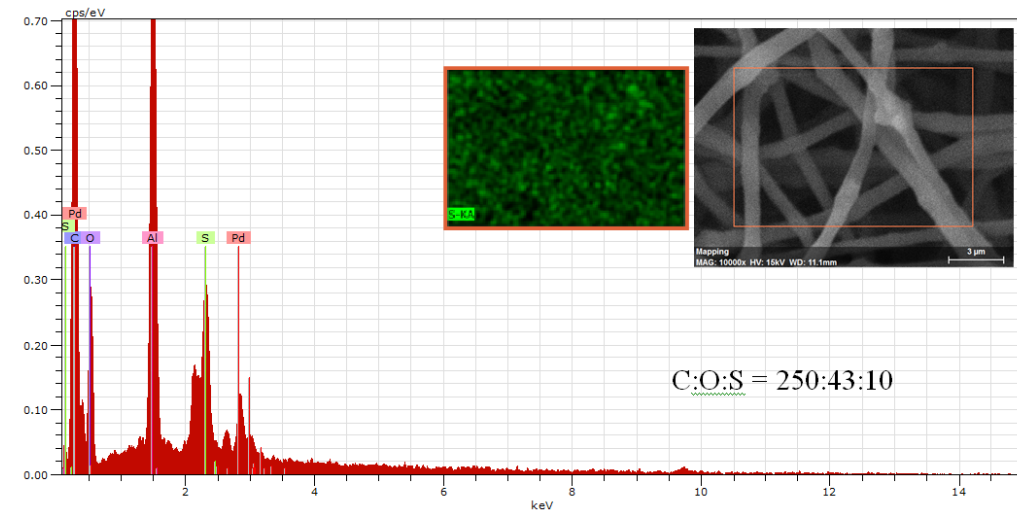


Fig. 32 Espectros de EDS das matriz de: gelatina/PEDOT:AA (em cima) e gelatina/PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (em baixo) reticuladas. No canto superior direito dos gráficos mostra-se a zona da matriz analisada e o correspondente mapa de distribuição do S. Em cada espectro está indicada a proporção de átomos de C:O:S correspondente.

Tanto o PEDOT como a gelatina possuem os elementos C, O e S (o S encontra-se nos aminoácidos cisteína e metionina). Como o mapa de EDS para a gelatina não foi obtido, não se pode inferir que fração destes elementos corresponde ao PEDOT. No entanto, é possível constatar que existe menos S no rácio C:O:S da matriz de gelatina/PEDOT:[BMIM][TF₂N] (398:70:10) do que no da matriz de gelatina/PEDOT:AA, o que é compatível com a presença de menos grânulos de PEDOT nas primeiras.

3.9 Análise de FTIR das matrizes de gelatina/PEDOT

Na figura 33 estão representados os espectros de FTIR de matrizes de gelatina de peixe, uma reticulada com vapor de GTA e outra não reticulada. Na tabela 19 apresentam-se as bandas características da gelatina, reportadas na literatura, e as que podem ser identificadas a partir dos espectros obtidos.

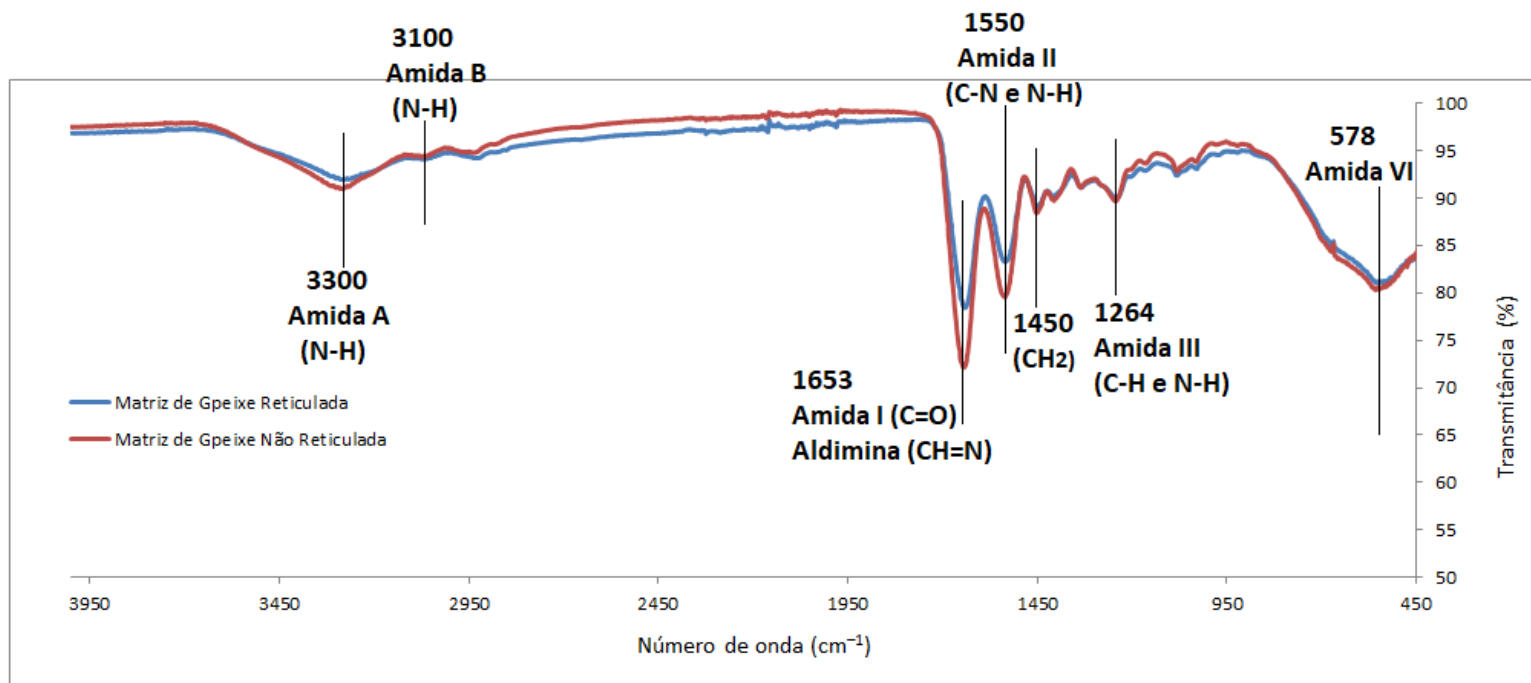


Fig. 33 Espectros de FTIR das matrizes de gelatina de peixe reticulada e não reticulada.

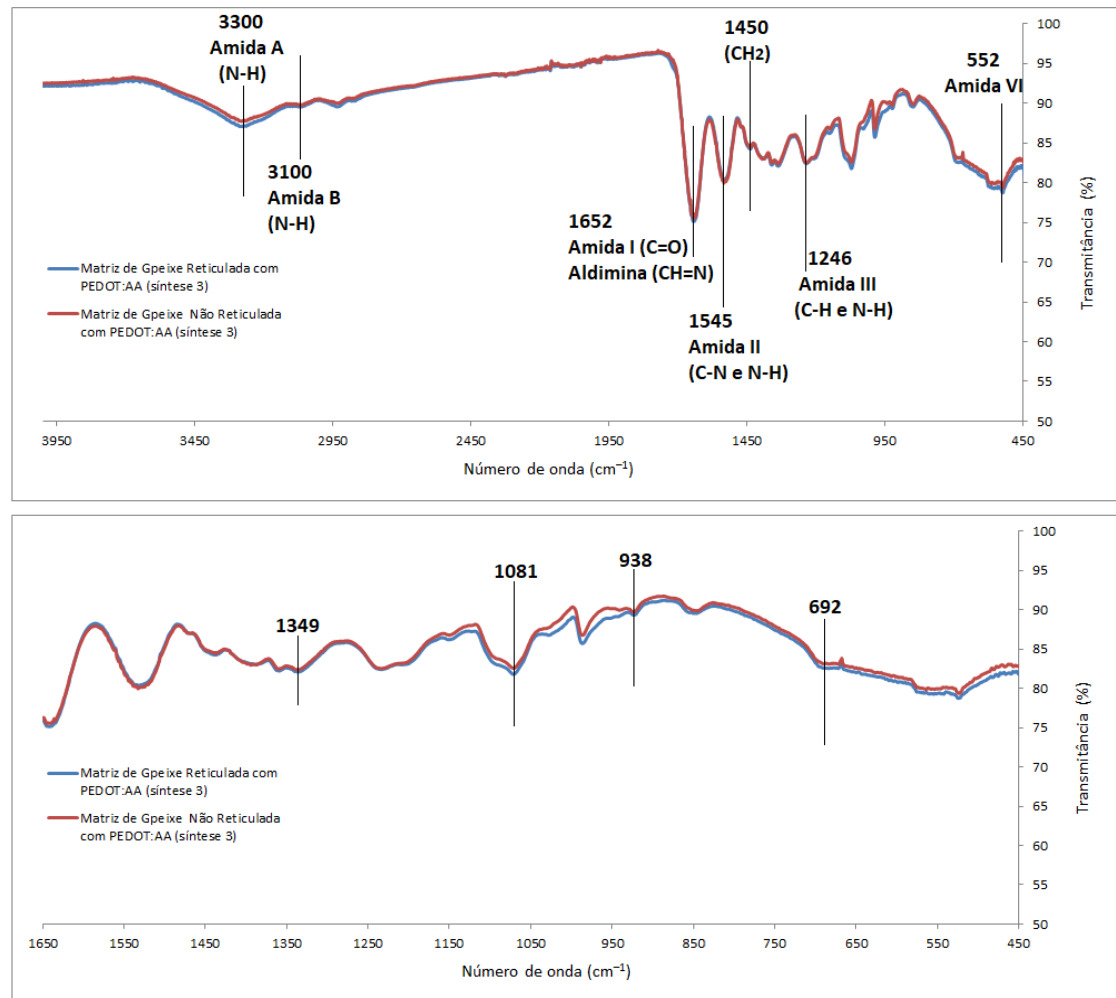


Fig. 34 Espectros de FTIR das matrizes de gelatina/PEDOT:AA reticulada e não reticulada.

Tabela 19 Bandas de absorção no infravermelho características da gelatina e da gelatina reticulada com GTA..

Designação	Número de onda / cm^{-1} Literatura	Referência	Número de onda / cm^{-1} Obtido	Descrição
Amida A	3300	[70,71,72]	3300	Estiramento da vibração N-H
Amida B	3100	[72]	3100	Estiramento da vibração N-H
Amida I	1600-1690	[70,72]	1653	Estiramento C=O
Amida II	1480-1575	[70,71,72]	1550	Estiramento C-H Deformação angular N-H
Amida III	1229-1301	[70,72]	1264	Estiramento C-H Deformação angular N-H
Amida VI	537-606	[72]	578	Deformação angular C=O
	1450	[73]	1450	Deformação assimétrica CH_2
-	1640-1690	[70]	1640-1690	Estiramento da ligação CH=N (aldimina)

No gráfico superior da figura 34, os espectros das matrizes de gelatina/PEDOT:AA não reticulada e reticulada, evidenciam as bandas características de gelatina. As bandas a 3300 e 3100 cm^{-1} podem ser atribuídas ao estiramento da vibração N-H. As bandas a 1545 e 1246 cm^{-1} podem dever-se ao estiramento C-N e à deformação angular N-H. A vibração a 1652 cm^{-1} pode estar associada ao estiramento C=O. A banda a 552 cm^{-1} diz respeito à amida VI.[71, 70, 72] O GTA tem dois grupos aldeído (-CHO) que podem reagir com dois grupos amina dos resíduos de lisina das proteínas resultantes da formação de duas ligações aldimina (CH=N) que ficam assim a ligar duas cadeias poliméricas [70]. Após a reticulação, a matriz de gelatina evidenciou uma mudança de cor de branco para amarelo que confirma a formação destas ligações responsáveis pela reticulação [70]. A formação de ligações aldimina pode causar um aumento da intensidade relativa da banda a 1540 cm^{-1} e da banda a 1650 cm^{-1} (que se sobrepõe com a banda amida I). Um aumento da intensidade relativa da banda a 1450 cm^{-1} também pode dever-se à reticulação. Estes aumentos não são muito perceptíveis nos espectros obtidos, embora os referentes às matrizes de gelatina mostrem essa tendência. No gráfico inferior da figura 34, são apresentados novamente os dois espectros de FTIR das matrizes de gelatina/PEDOT:AA reticulada e não reticulada, mas numa faixa mais estreita, 450-1650 cm^{-1} . Nesta faixa são visíveis bandas características do PEDOT a 1349, 1081, 938 e 692 cm^{-1} [57, 74, 60, 61]. Algumas destas bandas sobrepõem-se às bandas da gelatina.

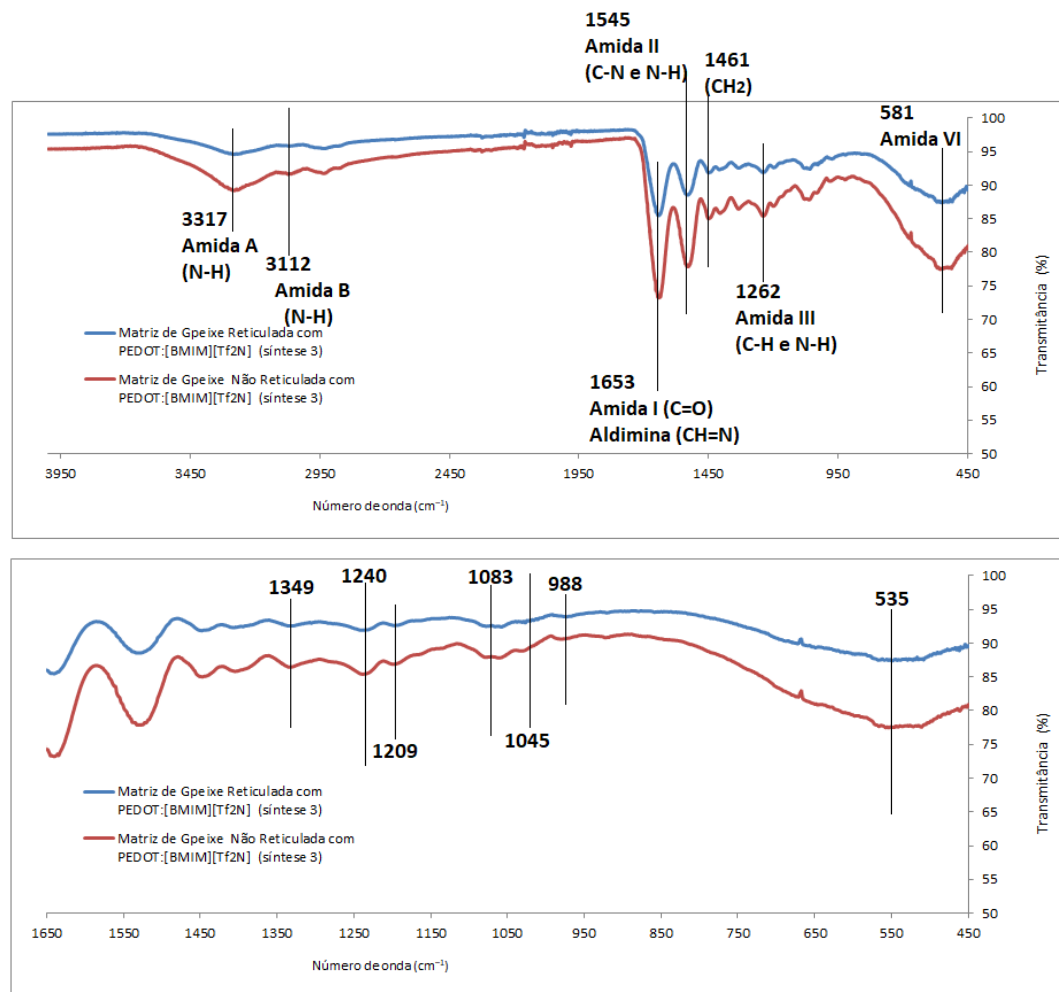


Fig. 35 Espectros de FTIR das matrizes de gelatina de peixe reticulada e não reticulada com PEDOT:[BMIM][Tf₂N]. (síntese 3).

Relativamente aos espectros de FTIR das matrizes de gelatina/PEDOT:[BMIM][Tf₂N] não reticulada e reticulada, foram encontradas as mesmas bandas características da gelatina mencionadas anteriormente para as de gelatina/PEDOT:AA, como se mostra na figura 43. Na gama 450-1650 cm⁻¹ são visíveis algumas bandas características do PEDOT, tais como: 535, 988, 1045, 1083, 1209 e 1349 cm⁻¹ [57,74, 61]. Algumas destas bandas sobpõem-se às bandas características da gelatina. Também surgem duas bandas características do [BMIM][Tf₂N]: 1349 e 1240 cm⁻¹.

3.10 Testes *in vitro*

Nesta secção serão apresentados os resultados dos testes *in vitro* de citotoxicidade e de adesão/proliferação. Por forma a confirmar a presença de células nas matrizes de gelatina/PEDOT, foram obtidas imagens de fluorescência das células *Vero* semeadas nas matrizes.

3.10.1 Testes de Citotoxicidade

Na figura 36 apresentam-se os resultados dos testes *in vitro* de citotoxicidade efetuados aos pós de PEDOT:AA e PEDOT: [BMIM][Tf₂N].

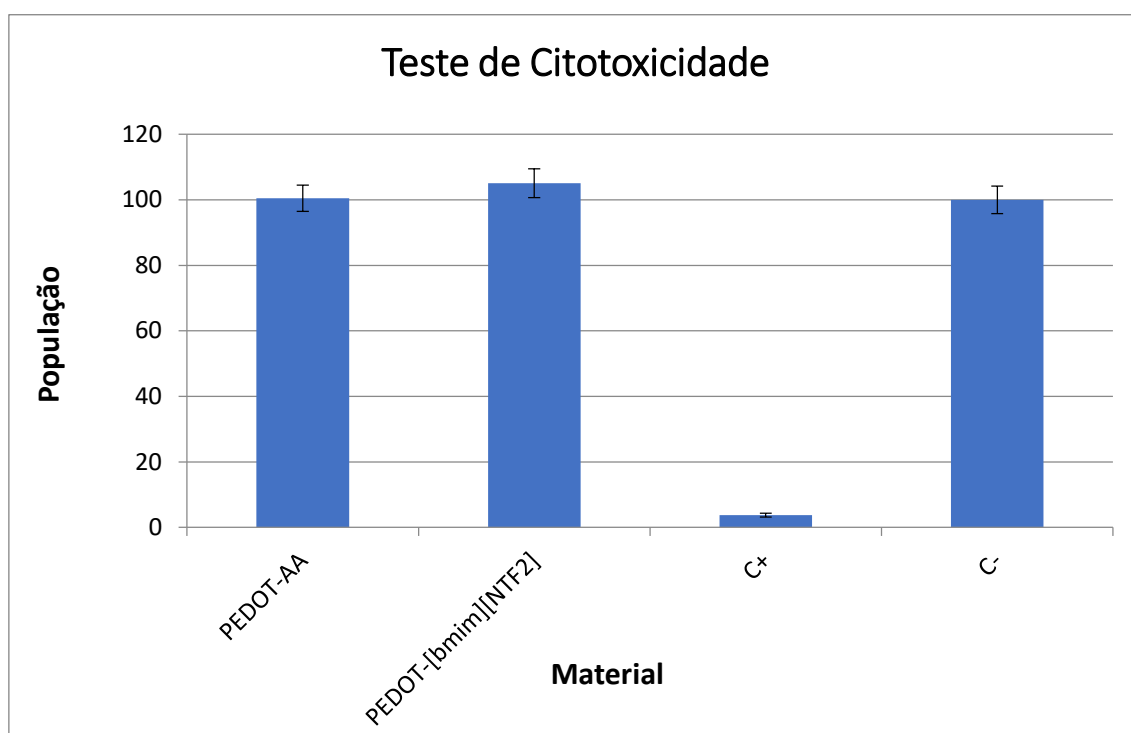


Fig. 36 Viabilidade celular de células *Vero* incubadas em extractos de pós de PEDOT durante 48 horas. C+ representa o controlo positivo de citotoxicidade e C- o controlo negativo de citotoxicidade. No topo das colunas são apresentadas as barras de incerteza.

A viabilidade celular foi avaliada recorrendo ao método colorimétrico da resazurina. Quando a resazurina é reduzida a resorufina pelas células metabolicamente ativas, ocorre uma mudança de cor do meio (figura 37). Essa mudança pode ser quantificada através da medição da variação da absorvância. Como a variação da absorvância é proporcional ao número de células viáveis, foi possível calcular as viabilidades relativas ao C- (células viáveis) das células em contacto com os extratos dos pós. Estas viabilidades são de (100 ± 4) % para o PEDOT:AA e (105 ± 4) % para o PEDOT:[BMIM][Tf₂N]. Estes números mostram inequivocamente que os pós de PEDOT:AA e de PEDOT:[BMIM][Tf₂N] não são tóxicos para as células *Vero* visto que a sua viabilidade relativa em contacto com os extratos é cima dos 90 % . No gráfico da figura 36 também é apresentada a viabilidade relativa do controlo positivo (C+): $(3,8 \pm 0,6)$ % . Esta viabilidade relativa muito baixa para as células em meio com 20% dedimetilsulfóxido (DMSO), que é tóxico para as células, mostra a fiabilidade do teste.

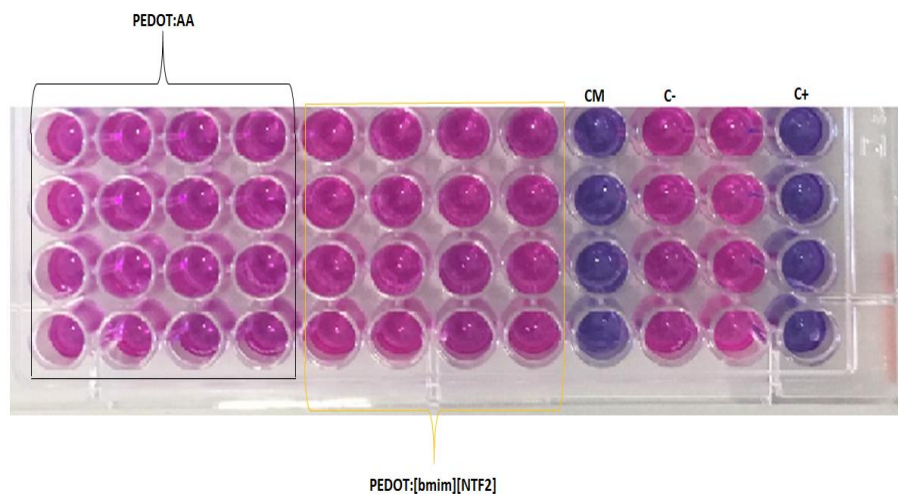


Fig. 37 Resultado do teste colorimétrico de citotoxicidade após 3h de incubação das células em meio com uma solução de resazurina. A coluna CM diz respeito ao controlo de meio, a C- ao controlo negativo e a C+ ao controlo positivo. As colunas rodeadas por PEDOT:AA e PEDOT:[BMIM][Tf₂N] dizem respeito às condições de teste, em que a primeira coluna corresponde ao resultado do teste aos extractos e as 3 seguintes às suas diluições.

3.10.1 Testes de Adesão/Proliferação

Na figura 38 apresentam-se os resultados dos testes *in vitro* de adesão (teste de viabilidade realizado 24 horas após a cultura) e de proliferação (ao fim de 3 dias) realizados às matrizes.

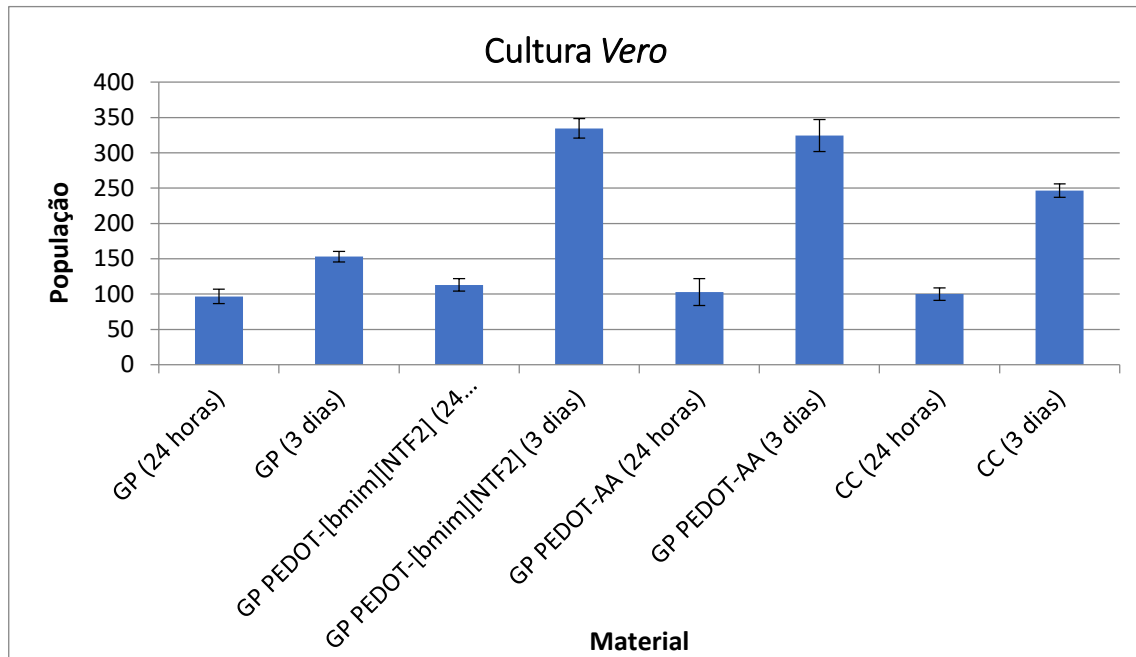


Fig. 38 Representação da viabilidade celular de células *Vero* semeadas nas matrizes de gelatina de peixe (GP), de gelatina de peixe com PEDOT:[BMIM][Tf₂N] (GP PEDOT:[BMIM][Tf₂N]) e de gelatina de peixe com PEDOT:AA (GP PEDOT:AA) ao fim de 24 horas e de 3 dias. (CC) representa o controle de células (células semeadas apenas na placa sem qualquer matriz).

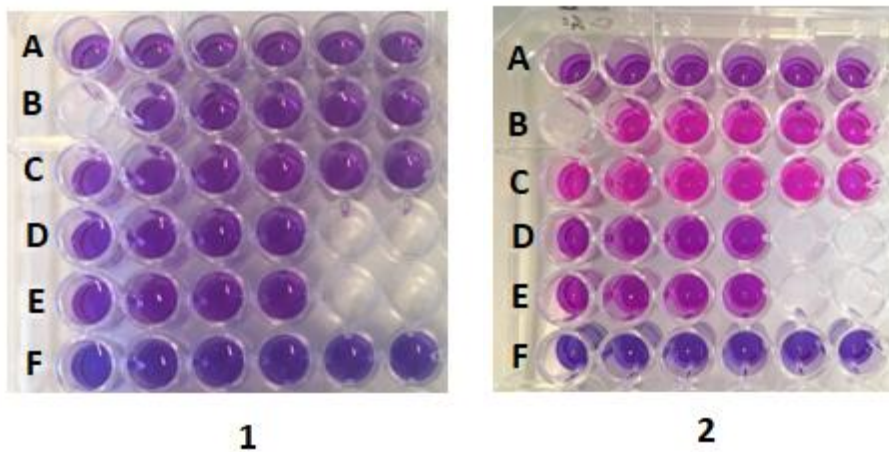


Fig. 39 Representação do resultado do teste de resazurina ao fim de 3 dias. Na caixa 1 estão representados os poços antes de serem submetidos ao teste de resazurina. Na caixa 2 representa a caixa 1 após o teste de resazurina.

Na figura 38 a primeira linha (A) diz respeito às células semeadas nas matrizes de gelatina de peixe, as duas seguintes (B e C) às células semeadas nas matrizes de gelatina/PEDOT (B para PEDOT:[BMIM][Tf₂N] e C para PEDOT:AA), as linhas D e E são dos CC e a última (F) é a do CM. A partir da placa 2, é possível inferir aparentemente que as células *Vero* gostam bastante das matrizes com PEDOT, pois as linhas B e C apresentam uma coloração bastante rosada. Quando comparamos estas linhas com as linhas sem PEDOT e as do CC, é visível que estas também apresentam uma cor rosada, embora com menor intensidade. Conclui-se a partir deste teste que as células gostaram tanto das matrizes de PEDOT como das sem PEDOT e do CC, o que não era espectável. Desta forma os dados do teste correspondente à placa da direita não são confiáveis.



Fig. 40 À esquerda da imagem encontra-se um frasco com meio e à direita dois *ependorfs* onde se encontram os pós de PEDOT. O líquido que se encontra por cima dos pós também é meio.

Tendo em conta os resultados do teste de resazurina apresentados na figura 39 e tendo em consideração a mudança de cor dos extratos que sobraram, representados na figura 40, percebe-se que o PEDOT interfere tanto com a cor do indicador de pH do meio de cultura como com a cor da resazurina. Conclui-se que o teste colorimétrico de resazurina efetuado quer para o primeiro dia, quer para o terceiro não é válido. Por este motivo, procedeu-se à marcação fluorescente com 6-diamino-2-fenil indol (DAPI) das células. As imagens resultantes (figuras 41, 42 e 43) mostram efetivamente que as células aderiram e mantiveram-se viáveis ao fim dos três dias.

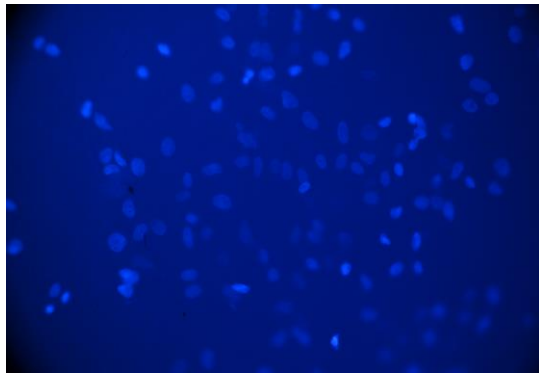


Fig. 41 Imagem de fluorescência de células *Vero* com ampliação 400X que se encontram aderidas à matriz de gelatina de peixe.

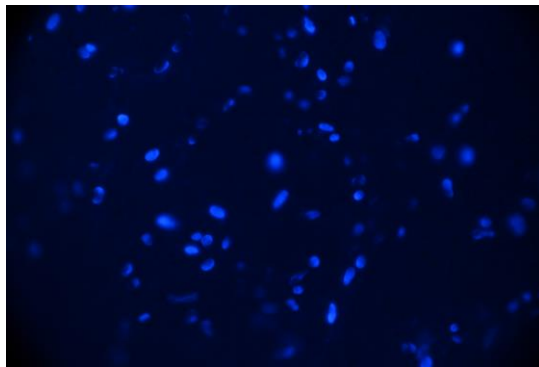


Fig. 42 Imagem de fluorescência de células *Vero* com ampliação 400X que se encontram aderidas à matriz de gelatina de peixe com PEDOT:AA.

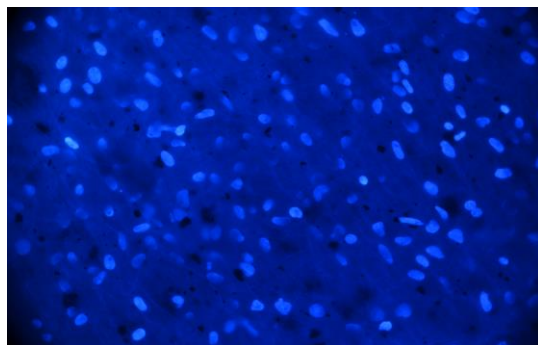


Fig. 43 Imagem de fluorescência de células *Vero* com ampliação 400X que se encontram aderidas à matriz de gelatina de peixe com PEDOT:[BMIM][Tf₂N].

4 Conclusões E Perspetivas Futuras

O trabalho realizado teve como objetivo principal produzir matrizes de suporte à regeneração neuronal, incorporando nelas um polímero condutor, o PEDOT, de forma a poderem estimular electricamente células neuronais. Uma das grandes dificuldades inerentes à utilização de PEDOT, é a sua fraca solubilidade, o que põe em causa a obtenção de matrizes com a capacidade de estimularem eletricamente as células neurais por elas suportadas. A produção de matrizes para a aplicação de estimulação elétrica está dependente da obtenção de dispersões de partículas finas a partir das quais são produzidas. De forma a ultrapassar esta dificuldade, foram seguidas duas vias distintas: numa o EDOT foi disperso em ácido acético, adicionando-se depois o oxidante dissolvido em etanol e na outra utilizou-se o [BMIM][Tf₂N] para dissolver o EDOT, adicionando de seguida o oxidante, também ele dissolvido em etanol. Os líquidos iónicos têm a capacidade de dissolverem uma ampla gama de compostos orgânicos e inorgânicos, daí a introdução do [BMIM][Tf₂N] no processo de polimerização de uma das vias seguidas.

Após a polimerização química de PEDOT e a obtenção dos pós que daí resultaram, estes foram sujeitos a um processo de lavagens com o objectivo de eliminar o FeCl₃ não reagido que poderia mais tarde pôr em causa a viabilidade celular das matrizes produzidas. O método de lavagem utilizado foi o de centrifugação, que se mostrou não ser o mais eficiente, pois foi necessário um número bastante elevado de lavagens, a velocidades também elas elevadas. Por exemplo, o pó de PEDOT:AA (síntese 3) foi sujeito a 23 lavagens, não tendo sido possível remover por completo o FeCl₃. As últimas águas das lavagens foram monitorizadas por espectroscopia de UV-vis. Os espectros obtidos apresentaram picos característicos de FeCl₃.

As últimas águas das lavagens de PEDOT:AA (síntese 1) e de PEDOT:[BMIM][Tf₂N](síntese 1) foram submetidas a testes colorimétricos (teste de hidróxido de sódio e de nitrato de prata). Estes testes foram realizados com o intuito de averiguar a presença de ferro. Tanto nas águas das lavagens de PEDOT:AA (síntese1), como nas de PEDOT:[BMIM][Tf₂N], os testes provaram a existência de ferro em algumas delas. Não foram realizados testes colorimétricos para as outras sínteses, porque ao serem efetuados em conjugação com a técnica de espectroscopia de UV-vis, revelaram limitações na detecção de ferro em algumas águas das lavagens. Os testes colorimétricos de hidróxido de sódio e de nitrato de prata são métodos visuais, de rápida execução, mas com limitações na detecção de pequenas quantidades.

Depois do processo de lavagens, os pós foram secos e analisados através da técnica de FTIR. Todos os espectros de FTIR dos pós evidenciaram bandas características de PEDOT. Os espectros de FTIR obtidos a partir dos pós de PEDOT:[BMIM][TF2N] apresentaram também bandas características de [BMIM][TF2N].

Dispersões obtidas a partir de pós de PEDOT também foram analisadas por espectroscopia de UV-vis. Os resultados mostraram que tanto o PEDOT:AA como o PEDOT:[BMIM][TF2N] estavam no estado polarão, um dos estados condutores do PEDOT dopado. O estado polarão, embora seja um estado condutor, não é o mais condutor. Quando se compara o pico característico do estado neutro com o do estado polarão para o mesmo espectro, verifica-se que o pico associado ao estado polarão de PEDOT:AA é mais pronunciado face ao pico do seu estado neutro. Para o PEDOT:[BMIM][Tf₂N] esta diferença é menor. Poder-se-á dizer que o PEDOT:AA poderá ser ligeiramente mais condutor do que o PEDOT:[BMIM][Tf₂N].

As medições de condutividade envolveram a produção de pastilhas, pintadas com cola de prata. Essas medições foram levadas a cabo com a utilização de um multímetro, de uma folha de alumínio e duas pontas de prova. Embora os valores de condutividade medidos estejam na mesma ordem de grandeza, as pastilhas de PEDOT:AA mostram ser ligeiramente mais condutores, o que vai de encontro aos resultados obtidos através dos espectros de UV-vis.

As matrizes produzidas por eletrofição também foram analisadas utilizando a técnica de FTIR antes e depois do processo de reticulação da gelatina. Os espectros apresentaram bandas características de gelatina. O processo de reticulação realizado às matrizes também ficou patente nos espectros obtidos.

Os diâmetros das fibras também foram medidos através da obtenção de imagens SEM e do *software ImageJ*. Tanto as fibras com PEDOT:AA, como as com PEDOT:[BMIM][TF2N], apresentaram um diâmetro na ordem dos 1000 µm, o que confere maior veracidade aos valores obtidos para o tamanho das partículas de PEDOT. As partículas apresentaram um tamanho próximo dos 300 nm, valor obtido a partir da técnica de DLS. O tamanho das partículas de PEDOT é bastante inferior ao diâmetro das fibras que as suportam, o que era espectável.

Os pós foram sujeitos a testes *in vitro* de citotoxicidade. Todos eles revelaram não ser citotóxicos. As matrizes produzidas foram sujeitas a testes *in vitro* de adesão e proliferação. As células epiteliais da linha *Vero*, para além de terem aderido às matrizes, também proliferaram. Foram obtidas imagens de fluorescência dos núcleos que comprovaram a adesão efectiva das células às matrizes.

Futuramente poder-se-iam otimizar alguns processos, como a polimerização química de PEDOT, de forma a aumentar o seu rendimento e os parâmetros de eletrofição, que embora tenham sido otimizados, revelaram não ser os ideais.

O método de medição da condutividade, utilizado neste trabalho, quando utilizado nas condições ideais, revela ser um bom método, mas quando assim não é, pode ser enganador. A utilização deste método implica que as pastilhas sejam pintadas com cola de prata, que é altamente condutora. O problema na utilização deste método prende-se com facto de que quando as superfícies são irregulares e apresentam fissuras, a cola de prata pode penetrar e alterar os valores de condutividade medidos. A condutividade das pastilhas também poderia ser medida utilizando um potencióstato, um método alternativo ao método utilizado. Seria interessante no futuro medir a condutividade das pastilhas utilizando este método e comparando os resultados obtidos com os do método utilizado.

Neste trabalho as matrizes foram testadas com células epiteliais da linha *Vero*. Dados os resultados obtidos nos testes *in vitro* de citotoxicidade, de adesão, de proliferação e as imagens de fluorescência dos núcleos, seria interessante desta vez semear células de uma linha neural (SH-SY5Y) nas matrizes produzidas, células estas que estão mais próximas das células neurais que são danificadas durante acidentes de viação, lesões adquiridas da prática desportiva ou em quedas.

5 Referências Bibliográficas

1. Ramé, A., Théron, S. *Anatomia e Fisiologia*. CLIMEPSI EDOTORES. (2012).
2. Wang, X., So, K. F. & Xu, X. M. *Advances and Challenges for Neural Regeneration Research. Neural Regeneration* (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-12-801732-6.00001-X
3. Tortora, G.J, Derrickson, B.H. *Princípios de Anatomia e Fisiologia*. GUABARA KOOGAN LIDA. (2010).
4. Pringle, J. M. *et al.* Conducting polymer nanoparticles synthesized in an ionic liquid by chemical polymerisation. *Synth. Met.* 156, 979–983 (2006).
5. del Valle, J. & Navarro, X. *Interfaces with the peripheral nerve for the control of neuroprostheses. International Review of Neurobiology* 109, (Elsevier Inc., 2013).
6. R, B., N.J., C. & S.H., C. Conductive polymers: toward a smart biomaterial for tissue engineering. *Acta Biomater.* 10, 2341–2353 (2014).
7. Min, J. H., Patel, M. & Koh, W. G. Incorporation of conductive materials into hydrogels for tissue engineering applications. *Polymers (Basel)*. 10, 1–36 (2018).
8. Yang, J., Choe, G., Yang, S., Jo, H. & Lee, J. Y. Polypyrrole-incorporated conductive hyaluronic acid hydrogels. *Biomater. Res.* 20, 1–7 (2016).
9. Liming, D. *Intelligent Macromolecules for Smart Devices From Materials Synthesis to Device Applications:Chapter 2 Conducting Polymers*. Springer (2004).
10. Stewart, E. M., Liu, X., Clark, G. M., Kapsa, R. M. I. & Wallace, G. G. Inhibition of smooth muscle cell adhesion and proliferation on heparin-doped polypyrrole. *Acta Biomater.* 8,

- 194–200 (2012).
11. Huang, Z. B., Yin, G. F., Liao, X. M. & Gu, J. W. Conducting polypyrrole in tissue engineering applications. *Front. Mater. Sci.* 8, 39–45 (2014).
 12. Dai, L. Conjugated and fullerene-containing polymers for electronic and photonic applications: Advanced syntheses and microlithographic fabrications. *J. Macromol. Sci. - Polym. Rev.* 39, 273–387 (1999).
 13. Kaur, G., Adhikari, R., Cass, P., Bown, M. & Gunatillake, P. Electrically conductive polymers and composites for biomedical applications. *RSC Adv.* 5, 37553–37567 (2015).
 14. Gholami, H., Shakeri, A. & Saadattalab, V. Investigation of physical and mechanical properties of polyaniline/MMT nanocomposites. *Curr. Chem. Lett.* 6, 151–158 (2017).
 15. Borriello, A., Guarino, V., Schiavo, L., Alvarez-Perez, M. A. & Ambrosio, L. Optimizing PANi doped electroactive substrates as patches for the regeneration of cardiac muscle. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 22, 1053–1062 (2011).
 16. Hussin, H., Gan, S. N., Mohamad, S. & Phang, S. W. Synthesis of water-soluble polyaniline by using different types of cellulose derivatives. *Polym. Polym. Compos.* 25, 515–520 (2017).
 17. Das, S., Chatterjee, D. P., Ghosh, R. & Nandi, A. K. Water soluble polythiophenes: Preparation and applications. *RSC Adv.* 5, 20160–20177 (2015).
 18. del Valle, L. J. *et al.* Cellular adhesion and proliferation on poly(3,4-ethylenedioxythiophene): Benefits in the electroactivity of the conducting polymer. *Eur. Polym. J.* 43, 2342–2349 (2007).
 19. Wang, Y. Research progress on a novel conductive polymer-poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT). *J. Phys. Conf. Ser.* 152, (2009).
 20. He, J., Su, J., Wang, J. & Zhang, L. Synthesis of water-free PEDOT with polyvinylpyrrolidone stabilizer in organic dispersant system. *Org. Electron.* 53, 117–126 (2017).
 21. Kim, D. H., Richardson-Burns, S. M., Hendricks, J. L., Sequera, C. & Martin, D. C. Effect of immobilized nerve growth factor on conductive polymers: Electrical properties and cellular response. *Adv. Funct. Mater.* 17, 79–86 (2007).
 22. Elschner, A., Kirchmeyer, S., Lövenich, W., Merker, U. & Reuter, K. *PEDOT Principles and Applications of an Intrinsically Conductive Polymer.* (2011).
 23. Sulaiman, Y. & Katakly, R. Effect of Monomer Modifications on the Physical Properties of Electropolymerised PEDOT Films. *J. Electrochem. Soc.* 159, F1–F9 (2011).
 24. Zainal, M. F. & Mohd, Y. Characterization of PEDOT Films for Electrochromic Applications. *Polym. - Plast. Technol. Eng.* 54, 276–281 (2015).
 25. Peramo, A. *et al.* In situ polymerization of a conductive polymer in acellular muscle tissue constructs. *Tissue Eng. - Part A.* 14, 423–432 (2008).
 26. Luo, S. C. *et al.* Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) nanobiointerfaces: Thin, ultrasmooth, and functionalized PEDOT films with in vitro and in vivo biocompatibility. *Langmuir* 24, 8071–8077 (2008).
 27. Bolin, M. *et al.* Linköping University Post Print Nano-fiber scaffold electrodes based on

- PEDOT for cell stimulation Nano-fiber scaffold electrodes based on PEDOT for cell stimulation. *Sensors and Actuators B-Chemical* 2, 451–456 (2009).
28. Feng, Z. Q. *et al.* A facile approach for the fabrication of core-shell PEDOT nanofiber mats with superior mechanical properties and biocompatibility. *J. Mater. Chem. B* 1, 1818–1825 (2013).
 29. Alfaro, A. da T., Balbinot, E., Weber, C. I., Tonial, I. B. & Machado-Lunkes, A. Fish Gelatin: Characteristics, Functional Properties, Applications and Future Potentials. *Food Eng. Rev.* 7, 33–44 (2014).
 30. Rose, J. B. *et al.* Gelatin-based materials in ocular tissue engineering. *Materials (Basel)*. 7, 3106–3135 (2014).
 31. Hoque, M., Nuge, T., Yeow, T., Nordin, N. & Prasad, R. Gelatin Based Scaffolds for Tissue Engineering-a Review. *Polym. Res. J.* 9, 15 (2015).
 32. Manikandan, A., Thirupathi Kumara Raja, S., Thiruseelvi, T. & Gnanamani, A. Engineered fish scale gelatin: An alternative and suitable biomaterial for tissue engineering. *J. Bioact. Compat. Polym.* 33, 332–346 (2018).
 33. Henriques, C., Vidinha, R., Botequim, D., Borges, J. P. & Silva, J. A. M. C. A systematic study of solution and processing parameters on nanofiber morphology using a new electrospinning apparatus. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 9, 3535–3545 (2009).
 34. Es-saheb, M., Elzatahry, A. A., Sherif, E. S. M., Alkaraki, A. S. & Kenawy, E. R. A novel electrospinning application for polyvinyl chloride nanofiber coating deposition as a corrosion inhibitor for aluminum, steel, and brass in chloride solutions. *Int. J. Electrochem. Sci.* 7, 5962–5976 (2012).
 35. Sultan Lipol, L. & Rahman, M. M. Electrospinning and Electrospun Nanofibers. *World J. Nano Sci. Eng.* 06, 45–50 (2016).
 36. Venturelli, R. B. & Gripa, S. ELETROFIAÇÃO: UMA ALTERNATIVA PARA A PRODUÇÃO DE NÃOTECIDOS. *Rev. da UNIFEBE* 264, 249–264 (2017).
 37. Veleirinho, M. B. da R. Desenvolvimento de membranas nanofibradas por electrospinning- potencial aplicação na clarificação de sumos. (2007).
 38. Costa, R. G. F. *et al.* Eletrofiação de polímeros em solução. Parte I: Fundamentação teórica. *Polímeros* 22, 170–177 (2012).
 39. Souza, S. Desenvolvimento e Caracterização de Nanofibras Obtidas pela Técnica de Eletrofiação Coaxial Visando a Liberação de Bevacizumabe para o Tratamento de Degeneração Macular Relacionada a Idade. (2016).
 40. Oliveira, L. AUTOMATIZAÇÃO E CONTROLO DE UM SISTEMA DE ELECTROSPINNING. (2011).
 41. Chiono, V. *et al.* Genipin-crosslinked chitosan/gelatin blends for biomedical applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19, 889–898 (2008).
 42. Ma, B., Wang, X., Wu, C. & Chang, J. Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds. *Regen. Biomater.* 1, 81–89 (2014).
 43. Campiglio, C. E., Contessi Negrini, N., Farè, S. & Draghi, L. Cross-Linking Strategies for Electrospun Gelatin Scaffolds. *Materials (Basel)*. 12, 2476 (2019).

44. Yang, Z., Peng, H., Wang, W. & Liu, T. Crystallization behavior of poly(ϵ -caprolactone)/layered double hydroxide nanocomposites. *J. Appl. Polym. Sci.* 116, 2658–2667 (2010).
45. Dulgerbaki, C., Maslakci, N. N. & Komur, A. I. Chemical synthesis and characterization of composite materials in the presence of ionic liquids. *Compos. Interfaces* 6440, 300 (2016).
46. Testing for ions gases. Acedido a 19 de agosto de 2019 em: <https://www.bbc.co.uk/bitesize/guides/z8fgmnb/revision/3>.
47. Tests for ions. Acedido a 19 de agosto de 2019 em: <https://www.bbc.co.uk/bitesize/guides/z9nr6yc/revision/4>.
48. Farias, M. H. & Costa, G. cloretos : análise crítica Nitrato de prata como método colorimétrico para detecção da penetração de cloretos : análise crítica. *Conf. Pap.* 186 (2018). doi:10.4322/2526-7248.017
49. Williamson, C. L., Maly, K. E. & Macneil, S. L. Synthesis of Imidazolium Room-Temperature Ionic Liquids: A Follow- Up to the Procedure of Dzyuba, Kollar, and Sabnis. *Chemical Education* 799–801 (2013). doi:10.1021/ed300369m
50. Murphy, R. M. Static and dynamic light scattering of biological macromolecules: What can we learn? *Curr. Opin. Biotechnol.* 8, 25–30 (1997).
51. Hassan, P. A., Rana, S. & Verma, G. Making sense of Brownian motion: Colloid characterization by dynamic light scattering. *Langmuir* 31, 3–12 (2015).
52. Stetefeld, J., McKenna, S. A. & Patel, T. R. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophys. Rev.* 8, 409–427 (2016).
53. Nogueira, A. Avaliação do desenvolvimento de neurónios em materiais nanoestruturados destinados a uma conduta neural. (2016).
54. Kawai, T., Nishihara, H. & Aramaki, K. Inhibition Effects of Amines and Thiols on Iron Corrosion in Anhydrous Methanol Solution Containing FeCl₃. *J. Electrochem. Soc.* 143, 3867 (1996).
55. Mankbadi, M. R., Barakat, M. A., Ramadan, M. H., Woodcock, H. L. & Kuhn, J. N. Iron chelation by polyamidoamine dendrimers: A second-order kinetic model for metal - Amine complexation. *J. Phys. Chem. B* 115, 13534–13540 (2011).
56. Tarkuc, S. *et al.* Synthesis, characterization and electrochromic properties of a conducting copolymer of pyrrole functionalized polystyrene with pyrrole. *Polymer (Guildf)*. 47, 2001–2009 (2006).
57. Zhao, Q., Jamal, R., Zhang, L., Wang, M. & Abdiryim, T. The structure and properties of PEDOT synthesized by template-free solution method. *Nanoscale Res. Lett.* 1–9 (2014).
58. Liu, W., Scientific, T. C., Etschmann, B. & Spiccia, L. UV – Vis spectrophotometric and XAFS studies of ferric chloride complexes in UV – Vis spectrophotometric and XAFS studies of ferric chloride complexes in hyper-saline LiCl solutions at 25 – 90 ° C. *Chem. Geol.* (2006). doi:10.1016/j.chemgeo.2006.02.005
59. Bahry, T. *et al.* An alternative radiolytic route for synthesizing conducting polymers in an organic solvent. *New J. Chem.* 42, 8704–8716 (2018).
60. Ghosh, S. & Glass, C. PEDOT nanostructures synthesized in hexagonal mesophases. *New*

J. Chem. (2014). doi:10.1039/c3nj01349a

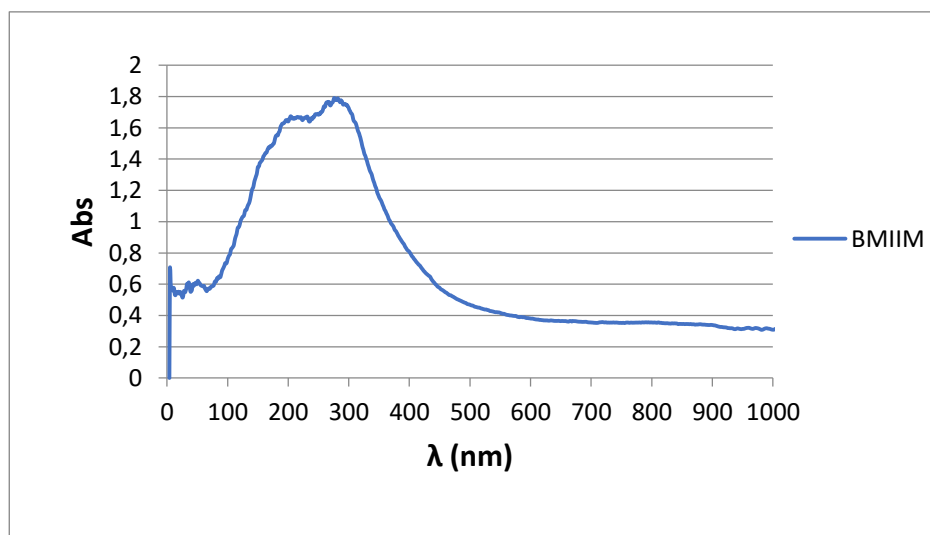
61. Bai, X. *et al.* Controlled fabrication of highly conductive three-dimensional flowerlike poly (3,4-ethylenedioxythiophene) nanostructures. *J. Mater. Chem.* 21, 7123–7129 (2011).
62. Reza Nabid, M., Tabatabaei Rezaei, S. J. & Zahra Hosseini, S. A novel template-free route to synthesis of poly(3,4- ethylenedioxythiophene) with fiber and sphere-like morphologies. *Mater. Lett.* 84, 128–131 (2012).
63. Megherbi, A., Meghabar, R. & Belbachir, M. Preparation and Characterization of Clay (Maghnite-H)/Poly(3,4-Ethylenedioxythiophene) Composites. *J. Surf. Eng. Mater. Adv. Technol.* 03, 21–27 (2013).
64. Cho, M. S., Kim, S. Y., Nam, J. D. & Lee, Y. Preparation of PEDOT/Cu composite film by in situ redox reaction between EDOT and copper(II) chloride. *Synth. Met.* 158, 865–869 (2008).
65. Park, B. W. *et al.* Neutral, polaron, and bipolaron states in pedot prepared by photoelectrochemical polymerization and the effect on charge generation mechanism in the solid-state dye-sensitized solar cell. *J. Phys. Chem. C* 117, 22484–22491 (2013).
66. Kelkar, D. & Chourasia, A. Structural , Thermal and Electrical Properties. *Chem. Chem. Technol. Chem.* 10, 587–595 (2016).
67. Kim, J. S., Jang, W. & Wang, D. H. The investigation of the seebeck effect of the poly(3,4-ethylenedioxythiophene)-tosylate with the various concentrations of an oxidant. *Polymers (Basel)*. 11, (2018).
68. Mantione, D., del Agua, I., Sanchez-Sanchez, A. & Mecerreyes, D. Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) (PEDOT) derivatives: Innovative conductive polymers for bioelectronics. *Polymers (Basel)*. 9, (2017).
69. Mantione, D. *et al.* Poly(3,4-ethylenedioxythiophene):GlycosAminoGlycan Aqueous Dispersions: Toward Electrically Conductive Bioactive Materials for Neural Interfaces. *Macromol. Biosci.* 1227–1238 (2016). doi:10.1002/mabi.201600059
70. Nguyen, T.-H. & Lee, B.-T. Fabrication and characterization of cross-linked gelatin electro-spun nano-fibers. *J. Biomed. Sci. Eng.* 03, 1117–1124 (2010).
71. Gomes, S. R., Rodrigues, G., Martins, G. G., Henriques, C. M. R. & Silva, J. C. In vitro evaluation of crosslinked electrospun fish gelatin scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* 33, 1219–1227 (2013).
72. Kong, J. & Yu, S. Fourier transform infrared spectroscopic analysis of protein secondary structures. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. 39, 549–559 (2007).
73. Gomes, S., Rodrigues, G., Martins, G., Henriques, C. & Silva, J. C. Evaluation of nanofibrous scaffolds obtained from blends of chitosan, gelatin and polycaprolactone for skin tissue engineering. *Int. J. Biol. Macromol.* 102, 1174–1185 (2017).
74. Bhatnagar, M. P., Kelkar, S. & Mahanwar, P. Synthesis & Characterization of PEDOT / Poly (lactic acid) Nanofibers by Electrospinning. *Polym. Int.* 1–21 (2016). doi:10.1002/pi.5267
75. Repanas, A., Andripoulou, S., Glasmacher, B.: The significance of electrospinning as a method to create fibrous scaffolds for biomedical engineering and drug delivery appli-

cations. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 31, 137-146 (2016).

76. Azami, M., Moztarzadeh, F. & Tahriri, M. Preparation, characterization and mechanical properties of controlled porous gelatin/hydroxyapatite nanocomposite through layer solvent casting combined with freeze-drying and lamination techniques. *J. Porous Mater.* 17, 313–320 (2010).

Apêndice

Apêndice A – Espectro UV-vis do [BMIM][Tf2N]



Apêndice B – Tabelas das lavagens da solução de PEDOT

PEDOT:AA (síntese 2)

Ciclo	Solvente utilizado	Tempo de centrifugação / min	Aceleração / g
1	Etanol	40	12000
2	Etanol	40	12000
3	Etanol	40	12000
4	Etanol	40	12000
5	Etanol	40	12000
6	Etanol	40	12000
7	Etanol	40	12000
8	Etanol	40	12000
9	Etanol	40	12000
10	Etanol	40	12000

PEDOT:AA (síntese 3)

Ciclo	Solvente utilizado	Tempo de centrifugação / min	Aceleração / g
1	etanol	10	2600
2	etanol	10	2600
3	etanol	10	2600
4	etanol	10	2600
5	etanol	20	2600
6	etanol	10	12000
7	etanol	30	12000
8	etanol	20	12000
9	etanol	10	12000
10	etanol	10	12000
11	etanol	10	12000
12	metanol	10	12000
13	metanol	20	12000
14	metanol	10	12000
15	metanol	10	12000
16	metanol	10	12000
17	metanol	10	12000
18	metanol	10	12000
19	metanol	10	12000
20	metanol	10	12000
21	metanol	10	12000
22	metanol	20	12000
23	metanol	20	12000

PEDOT: [BMIM][Tf₂N] (síntese 2)

Ciclo	Solvente utilizado	Tempo de centrifugação / min	Aceleração / g
1	metanol	15	12000
2	metanol	15	12000
3	metanol	15	12000

PEDOT: [BMIM][Tf₂N] (síntese 3)

Ciclo	Solvente utilizado	Tempo de centrifugação / min	Aceleração / g
1	metanol	10	2600
2	metanol	10	2600
3	metanol	10	2600
4	metanol	10	2600
5	metanol	20	2600
6	metanol	10	12000
7	metanol	30	12000
8	metanol	10	12000
9	metanol	70	12000
10	metanol	40	12000
11	metanol	60	12000
12	metanol	60	12000