

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

**Obtenção e Caracterização de Membranas de
PLDLA em Aplicação como prótese para
Regeneração Nervosa Periférica**

Autor: Grazielle dos Santos Baraúna
Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

Obtenção e Caracterização de Membranas de PLDLA em Aplicação como prótese para Regeneração Nervosa Periférica

Autor: Grazielle dos Santos Baraúna
Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

Curso: Engenharia Mecânica
Área de Concentração: Departamento de Materiais (DEMA)

Dissertação de mestrado acadêmico apresentado à comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Campinas, 2007
S.P. – Brasil

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

B231o Baraúna, Grazielle dos Santos
Obtenção e caracterização de membranas de PLDLA em aplicação como prótese para regeneração nervosa periférica / Grazielle dos Santos Baraúna. --Campinas, SP: [s.n.], 2007.

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica.

1. Biomateriais. 2. Membranas (Biologia). 3. Polímeros na medicina. 4. Biodegradação. 5. Materiais biomédicos. 6. Engenharia Biomédica. I. Duek, Eliana Aparecida de Rezende. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Título em Inglês: Obtention and characterization of PLDLA membranes for application as peripheral nervous regeneration prosthesis

Palavras-chave em Inglês: Biomaterials, Membranes, Poly(L-co-D,L lactic acid), Degradation, Tubular prosthesis, Nervous regeneration

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Célia Marina de Alvarenga Freire, Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior

Data da defesa: 05/07/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADEMICO

Obtenção e Caracterização de Membranas de PLDLA em Aplicação como prótese para Regeneração Nervosa Periférica

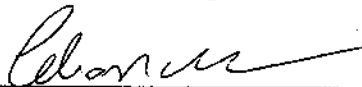
Autor: Grazielle dos Santos Baraúna

Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

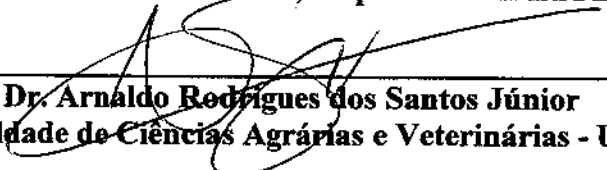
A Banca Examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta Dissertação:



**Prof.^a. Dr.^a. Eliana Aparecida de Rezende Duek, Presidente
Universidade Estadual de Campinas – DEMA/FEM**



**Prof. Dr.^a Célia Marina de A. Freire
Universidade Estadual de Campinas – DEMA/FEM**



**Prof. Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Júnior
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Unesp**

Campinas, 5 de julho de 2007.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a DEUS...

Aos meus pais pelo incentivo em todos os momentos da minha vida.

Ao Enea, Andréa e Júnior, pela atenção e colaboração.

A minha orientadora, pela orientação, apoio, confiança e exemplo de profissionalismo.

Aos professores, funcionários da Faculdade de Engenharia Mecânica, Departamento de Materiais / UNICAMP, entre eles, em especial à Claudinete.

Gostaria de agradecer a minha grandiosa amiga Márcia “gaúcha” por ajudar a concluir minha dissertação.

Aos meus amigos de laboratório Lucas, Kátia, Marcelo e Carolina Lucchesi pela preciosa colaboração.

Ao professor do Instituto de Biologia-UNICAMP, Alexandre de Oliveira e seu aluno de doutorado Amauri Pierucci.

...muito obrigada, Grazielle!

*Deus não escolhe os preparados,
ele prepara os escolhidos!*
(autor desconhecido)

PUBLICAÇÕES

Periódicos

BARAÚNA, Grazielle S.; PIERUCCI, Amauri; DE OLIVEIRA, Alexandre; DUARTE, Márcia A.T.; DUEK, Eliana Ap. Rezende, Estudo da degradação "in vivo" de poli(L-co-D,L-ácido láctico) aplicado como prótese para regeneração nervosa periférica, **Revista Matéria**, v.12, n.2, pp.298-306, 2007.

Resumo

Baraúna, Grazielle dos Santos, *Obtenção e Caracterização de Membranas de PLDLA em Aplicação como prótese para Regeneração Nervosa Periférica*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 52 p. Dissertação de Mestrado

Nas últimas décadas, polímeros biorreabsorvíveis têm sido utilizados em experimentos biomédicos a fim de buscar materiais com propriedades físicas e mecânicas cada vez mais adequados para a sua aplicação no corpo humano. Com intuito de obter um material polimérico adequado para aplicação como prótese tubular para regeneração do nervo ciático, estudou-se a obtenção e caracterização de tubos biorreabsorvíveis de poli(L-co-D,L-ácido láctico), PLDLA, preparados a partir de membranas obtidas por evaporação de solvente. As membranas foram submetidas à degradação *in vitro* e os tubos foram implantados através da técnica de tubulização do nervo ciático em ratos Spreague Dawley. Os processos de degradação *in vitro* e *in vivo* foram acompanhados por calorimetria diferencial de varredura (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TGA), cromatografia de permeação a gel (GPC), ensaio mecânico e microscopia óptica (MO).

Dados de DSC mostraram que o PLDLA é amorfo apresentando uma Tg de 60°C. A temperatura de início de degradação foi de 340°C, como pode ser verificado por TGA. Tanto as análises de DSC quanto às análises de TGA, mostraram que o processo de degradação *in vitro* foi mais rápido que a degradação *in vivo*, considerando o período de tempo estudado. Os dados obtidos por GPC confirmaram esses resultados e mostraram que as amostras começam a degradar a partir da segunda semana, apresentando nítida degradação após 16 semanas.

As micrografias a partir de MEV mostraram que antes da degradação, as membranas de PLDLA eram densas, sem presença de poros. Apesar de se verificar indícios de degradação a partir de 2 semanas, somente a partir da 16 semanas verificou-se um nítido aumento da quantidade de poros e trincas na superfície da fratura, enquanto para os tubos, as micrografias mostraram que o processo de degradação foi mais acelerado no início, comparado com as membranas.

O ensaio mecânico de tração mostrou que as membranas apresentaram resistência máxima de 47,5 (\pm 4) MPa e módulo de Young's de 2315,71 (\pm 196,88) MPa. Através da MO, verificou-se a regeneração do nervo periférico com 4 semanas de implante. O estudo *in vivo* mostrou que a técnica de tubulização é eficaz, indicando que o polímero estudado apresenta grande potencial para ser utilizado como guia para regeneração nervosa periférica.

Palavras Chave

- biomateriais, membranas, poli(L-co-D,L-ácido láctico) (PLDLA), degradação, prótese tubular, regeneração nervosa

Abstract

Baraúna, Grazielle dos Santos, *Obtention and Characterization of PLDLA Membranes for Application as Peripheral Nervous Regeneration Prosthesis*, Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 52 p. Dissertação de Mestrado

In the last decades, bioreabsorbable polymers have been used in biomedical experiments in order to look for materials with physical and mechanical properties appropriate for application in the human body. Aiming to obtaining a polymeric material appropriate for application as tubular prosthesis for regeneration of the peripheral sciatic nerve, it was studied the obtention and characterization of bioreabsorbable tubes of poly(L-co-D,L-lactic acid), PLDLA, prepared from membranes obtained by casting. Membranes were submitted to in vitro degradation and the tubes were implanted by the technique of tubulization in the sciatic nerve in mice Spreague Dawley. In vitro and in vivo degradation process were accompanied by DSC, SEM, TGA, GPC, mechanical properties and OM.

DSC data showed that PLDLA is amorphous and presents a Tg of 60°C. The temperature in the beginning of degradation was 340°C, as it can be verified by TGA. DSC and TGA analyses showed that the in vitro degradation process was faster than the in vivo degradation, considering the period of time studied. The data obtained by GPC confirmed those results and showed that the samples begin to degrade starting from the 2nd week and presenting clear degradation after 16th week.

SEM showed that before the degradation, the PLDLA membranes were dense, without presence of pores. In spite of verifying degradation indications starting from 2nd week, only in 16th week a clear increase of the amount of pores and trines in the surface of the fracture was verified. On the other hand, the MEV of tubes showed that the degradation process was more accelerated in the beginning, compared to the membranes.

The mechanical properties showed that the membranes presented maximum strenght of 47,5 (\pm 4) MPa and 2315,71 (\pm 196,88) MPa young's modulus.

By optical microscopy, a regeneration of the peripheric nervous after 4th week of implantation was verified. In vivo study showed that the tubulization technique is effective, indicating that the PLDLA presents great potential to be used as guide for peripheral nervous regeneration.

Key Words

- Biomaterials, membranes, poly(L-co-D,L lactic acid), degradation, tubular prosthesis, nervous regeneration

Índice

Lista de Figura.....	xi
Lista de Tabelas.....	xii
Nomenclatura	xiii
Introdução.....	1
Revisão da Literatura	3
2.1. Biomateriais	3
2.2. Poliésteres alifáticos	4
2.3. Poli(α -hidróxi ácidos).....	4
2.4. Biodegradação do poli (α -hidroxi ácidos)	7
2.5. Nervo Periférico.....	10
Materiais e Métodos	13
3.1. Preparação das membranas	13
3.2. Estudo in vitro	15
3.2.1. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	15
3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	15
3.2.4. Cromatografia de permeação em gel (GPC)	16
3.3. Estudo in vivo	16
3.3.1 Animais e grupos experimentais	16
3.3.2. Implantes	16
3.3.2.1. Procedimento cirúrgico para a tubulização	17
3.3.3. Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para microscopia óptica.....	18
3.3.4. Processamento dos explantes	18
3.3.5. Microscópio Óptico (MO).....	19

Resultados e Discussão.....	20
4.1. Estudo da degradação <i>in vitro</i> e estudo <i>in vivo</i>	20
4.1.1. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	20
4.1.2. Cromatografia de permeação em gel (GPC)	24
4.1.3. Análise termogravimétrica (TGA)	26
4.1.4. Ensaio mecânico de tração <i>in vitro</i>	28
4.1.5. Análise macroscópica das amostras degradadas <i>in vitro</i>	30
4.1.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	31
4.1.7. Estudo Macroscópico <i>in vivo</i>	36
4.1.8. Microscopia óptica (MO)	36
Conclusão	39
Referências Bibliográficas	40
Anexos	50

Lista de Figura

Figura 1. Estrutura dos poli(α -hidróxi ácidos)	5
Figura 2. Polimerização por abertura de anel do diéster cíclico para obtenção do poli(α -hidróxi ácido).....	5
Figura 3. Estereoisômeros do ácido láctico e do lático	6
Figura 4. Hidrólise do poli(L-ácido láctico) através da cisão das ligações ésteres.....	7
Figura 5. Sistema de evaporação de solvente para secagem das membranas.....	14
Figura 6. Fluxograma do procedimento experimental	14
Figura 7. Foto do tubo implantado.....	17
Figura 8. (A) nervo ciático, antes do implante; (B) tubulização do nervo ciático com a prótese tubular de PLDLA.....	17
Figura 9. Curvas de DSC para as membranas de PLDLA em função do tempo de degradação <i>in vitro</i>	21
Figura 10. Curvas de DSC para as membranas de PLDLA em função do tempo de degradação <i>in vivo</i>	23
Figura 11. Curvas de TGA para as membranas de PLDLA em função do tempo de degradação <i>in vitro</i>	26
Figura 12. Curvas de TGA para as membranas de PLDLA em função do tempo de degradação <i>in vivo</i>	27
Figura 13. Gráficos de (a) resistência à tração, (b) Módulo de elasticidade e (c) Alongamento na ruptura em função do tempo de degradação <i>in vitro</i>	29
Figura 14. Macroscopia em diferentes tempos de degradação <i>in vitro</i>	30
Figura 15. Micrografias eletrônicas de varredura de membranas de PLDLA em função do tempo de degradação <i>in vitro</i> .)	32
Figura 16. Micrografias eletrônicas de varredura de tubos PLDLA em função do tempo de degradação <i>in vivo</i>	35
Figura 17. Nervo ciático retirado da prótese tubular após o período de sobrevivência do animal.....	36
Figura 18. Vista dos nervos ciáticos regenerados após tubulização.	37

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valores de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m), temperatura de cristalização (T_c), entalpia de fusão (ΔH_m) e entalpia de cristalização (ΔH_c) para as membranas de PLDLA após degradação <i>in vitro</i>	21
Tabela 2. Valores de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m), temperatura de cristalização (T_c), entalpia de fusão (ΔH_m) e entalpia de cristalização (ΔH_c) para os tubos de PLDLA após degradação <i>in vivo</i>	23
Tabela 3. Dados de GPC para diferentes tempos de degradação <i>in vitro</i>	25
Tabela 4. Dados de GPC para os tubos de PLDLA degradadas <i>in vivo</i>	25
Tabela 5. Dados determinados por TGA para as membranas de PLDLA obtidas por evaporação de solvente e degradadas <i>in vitro</i>	27
Tabela 6. Dados determinados por TGA para os tubos de PLDLA degradadas <i>in vivo</i> . T_i (temperatura de início de degradação) e T_d (temperatura na qual a perda de massa é máxima).....	28

NOMENCLATURA

Abreviações

T_g – Temperatura de transição vítrea
T_c – Temperatura de cristalização
T_m – Temperatura de fusão
T_i – Temperatura de início de degradação
T_d – Temperatura máxima de perda de massa
M_w – Massa molar média ponderada
M_n – Massa molar média numérica
 ΔH_M – Entalpia de fusão experimental
 ΔH_C – Entalpia de cristalização experimental
DSC – Calorimetria diferencial de varredura
GPC – Cromatografia de permeação em gel
TGA – Análise termogravimétrica
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MO – Microscopia óptica
MPa – Megapascal
N – Newton
NaCl – Cloreto de sódio
pH – ponte de hidrogênio
PLA – poli(ácido láctico)
PLLA – Poli(L-ácido láctico)
PLDLA – Poli(L-co-D,L-ácido láctico)
PDLA – poli(D-ácido láctico)
PGA – poli (ácido glicólico)
PCL – policaprolactona
SNP – Sistema nervoso periférico
KV – Quilovolts
THF - Tetrahidrofurano

Siglas

ASTM – American Society of Testing Materials

Capítulo 1

Introdução

Nas últimas décadas, polímeros biorreabsorvíveis têm sido estudados *in vivo* buscando-se materiais com propriedades físicas e mecânicas cada vez mais adequadas para aplicações no corpo humano, tais como, suturas cirúrgicas, sistema para liberação controlada de drogas, peles artificiais, veias e artérias artificiais, dispositivos ortopédicos e guias para regeneração nervosa, sem provocar reações adversas.

Os poli(α -hidróxi ácidos) são considerados uma das famílias de polímeros mais promissoras na área dos polímeros biorreabsorvíveis. Além da sua biocompatibilidade, apresenta a vantagem de se degradar em contato com fluidos corpóreos, através da hidrólise de suas ligações ésteres, sendo os produtos gerados, completamente absorvidos pelo organismo.

Um dos polímeros biorreabsorvíveis mais estudado objetivando diversas aplicações biomédicas é o PLLA, devido às suas excelentes propriedades mecânicas, porém, o longo período requerido para sua degradação total, associado à alta cristalinidade de seus fragmentos pode causar reações inflamatórias intensas, o que restringe suas aplicações. Na tentativa de minimizar o efeito das reações causadas pelo PLLA, uma combinação do monômero L-láctico e D,L-láctico resultando no copolímero poli(L-co-D,L-ácido láctico) (PLDLA), tem sido estudado, pois o

mesmo apresenta como principais características ser rapidamente degradado, não gerar fragmentos cristalinos e excelentes propriedades mecânicas de resistência à tração.

Devido à essas características, o PLDLA possui alto potencial para ser utilizado como guia para regeneração nervosa, no sentido de reparar o nervo lesionado que pode ser resultante de esmagamento, transecção parcial ou completa do nervo. Estes materiais servem de molde para que o nervo se regenere e adquira o formato desejado, ao mesmo tempo em que o polímero vai sendo degradado. Para isto, existe um tempo adequado em que o polímero deva iniciar o seu processo de degradação.

Os objetivos desta pesquisa foram estudar a obtenção, caracterização, propriedades térmicas, mecânicas e morfológicas de membranas de poli (L-co-D,L- ácido láctico) (PLDLA) obtidas através do método de evaporação de solvente, assim como a avaliação da degradação *in vitro* e *in vivo* de próteses tubulares deste polímero para regeneração nervosa periférica.

Capítulo 2

Revisão da Literatura

A busca incansável do homem por padrões superiores de qualidade de vida e longevidade tem gerado cada vez mais a necessidade de alternativas para substituição e reparos de partes do corpo humano, vitimados por traumas ou patogenias. Nesse sentido, os biomateriais têm sido de grande interesse, aliado aos conhecimentos de equipes multidisciplinares, buscando materiais com propriedades adequadas para aplicação como órgãos artificiais, liberação controlada de drogas, dispositivos cardiovasculares, miniaturização de próteses, enxertos ósseos, dispositivos ortopédicos e guias para regeneração nervosa.

2.1. Biomateriais

Os biomateriais fazem parte de uma área de pesquisa relativamente nova que surgiu com o avanço científico e tecnológico de novos materiais e da adaptação dos já existentes para uso médico/odontológico. A definição adotada na Concensus Conference of the European Society for Biomaterials, mais simplificada, é a de que biomaterial é todo material não vivo usado em dispositivo médico (ou biomédico), objetivando interação com o sistema biológico [Willians, 1987]. Para que um biomaterial possa ser implantado no

corpo humano, ele deve satisfazer uma série de exigências: ser biocompatível, biofuncional, atóxico, fácil de esterilizar e apresentar propriedades mecânicas adequadas. Dependendo do propósito da aplicação, o implante não deve ser excessivamente complexo do ponto vista cirúrgico e protético. Além de propiciar fácil implantação, e quando necessário, fácil remoção, e economicamente viável [Vert *et al.*, 1992].

Dentre os biomateriais, a família dos poliésteres alifáticos tem se destacado devido suas boas propriedades de biodegradação e biorreabsorção.

2.2. Poliésteres alifáticos

Os poliésteres alifáticos são considerados uma das famílias de polímeros mais atrativas e promissoras devido principalmente à sua biorreabsorção, características desses polímeros, pois sofrem degradação, principalmente por hidrólise, através da cisão das ligações ésteres, formando produtos atóxicos, biocompatíveis, e que depois são reabsorvidos *in vivo* pelo organismo e eliminados por caminhos naturais após a sua metabolização. A biorreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material estranho inicial e da degradação em produtos sem efeitos residuais [Vert *et al.*, 1992].

O interesse em utilizar os polímeros biorreabsorvíveis é principalmente pelo fato de serem degradados por hidrólise evitando que o paciente se submeta a uma segunda cirurgia para retirada do dispositivo, reduzindo custo e traumas. Seus atributos fazem dele um forte candidato na indústria biomédica e farmacêutica, como material de implante reabsorvível e um veículo para sistemas de liberação de fármacos.

Os poliésteres alifáticos podem oferecer grande variedade de propriedades, apresentando-se como plásticos rígidos altamente cristalinos e também como polímeros dúcteis [Chandra & Rustgi, 1998].

2.3. Poli(α -hidróxi ácidos)

Os poli(α -hidróxi ácidos) constituem uma classe de poliésteres representados pela fórmula geral $-(-O-CHR-CO-)_n$ [Vert *et al.*, 1992]. Os poli(α -hidróxi ácidos), especialmente o PLA (**Figura 1**, R = CH₃) e o PGA (**Figura 1**, R = H) e seus polímeros de

baixa massa molecular (menor que 10.000 Da), podem ser sintetizados através da reação de poliesterificação direta do ácido láctico e glicólico, respectivamente [Wise *et al.*, 1979].

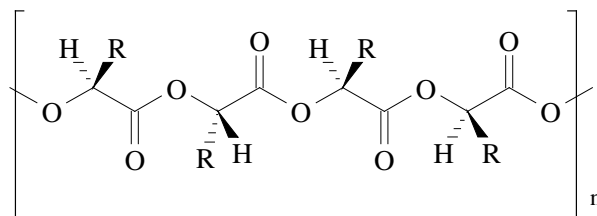


Figura 1. Estrutura dos poli(α -hidróxi ácidos). PLA quando R = CH₃ e PGA quando R = H [Pezzin, 2001].

Devido às suas baixas propriedades mecânicas, estes polímeros não possuem uma aplicação prática. Entretanto, eles podem ser usados como material de partida para a síntese de dímeros cíclicos (lactídeos e/ou glicolídeos), através da polimerização por abertura de anel do correspondente mono ou diéster cíclico [Eppley, 2003].



Figura 2. Polimerização por abertura de anel do diéster cíclico para obtenção do poli(α -hidróxi ácido) [An *et al.*, 2000].

O PLA é um polímero semi-cristalino, com temperatura de transição vítrea de 57 °C e ponto de fusão de 174 - 184 °C (**Figura 2**, R = CH₃), o grupo metil do PLA faz com que ele seja hidrofóbico e mais resistente a hidrólise [Bergsma *et al.*, 1995; Bessho *et al.*, 1997; Rokkanen *et al.*, 1996].

Os dois monômeros que são geralmente usados como partida na síntese do poli (ácido láctico), ácido láctico e dímero cíclico do ácido láctico, apresentam quiralidade, sendo que o ácido láctico apresenta duas formas estereoisoméricas, o L- e o D- ácido láctico. Já o láctico, o diéster cíclico do ácido láctico, apresenta quatro isômeros diferentes: L- láctico, D- láctico, a mistura racêmica D, L-láctico e o meso- láctico, que é opticamente inativo e

contém uma unidade L e uma unidade D no anel. Na literatura pouquíssimo é descrito sobre o meso- láctico, já que sua obtenção é muito difícil [Vert *et al.*,1995].

Segundo o Chemical Abstract a nomenclatura do láctico é: 3,6 dimethyl-1,4-dioxane,2-5,dione. Os prefixos para L, D ou meso-láctico são respectivamente: (3S-cis) ou (S-S); (3R-cis) ou (R, R) e trans. É válido ressaltar que o poli (L-ácido láctico) e o poli (L- láctico) apresentam a mesma fórmula estrutural e estes dois nomes distintos se referem exclusivamente ao monômero de partida usado na síntese, e podem ser abreviado pela sigla PLLA (**Figura 3**) [Motta, 2002].

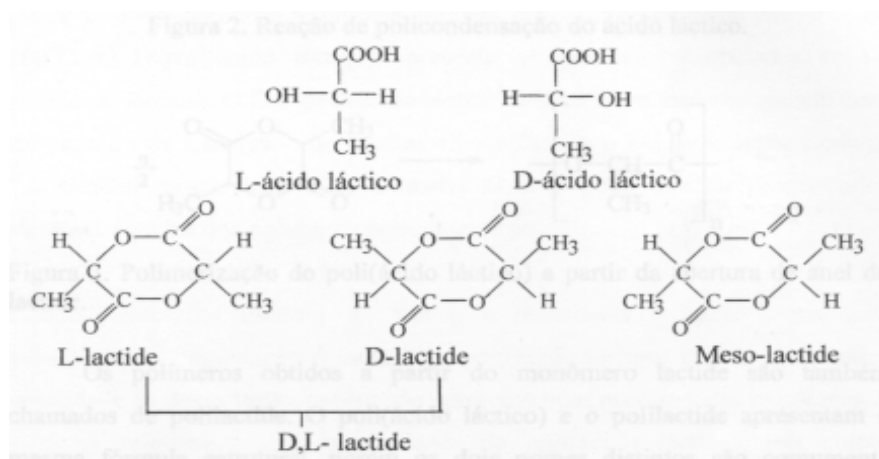


Figura 3. Estereoisômeros do ácido láctico e do láctico [Motta, 2002].

O PLA possui três estereoisômeros: poli(L-ácido láctico) (PLLA), poli(D – ácido láctico) (PDLA) e o poli(D, L- ácido láctico) (PDLLA). O PLA levógiro e dextrógiro são imagens especulares um do outro, ambos opticamente puros e semi-cristalinos [Tsuji *et al.*, 1991], enquanto o estereocopolímero PDLLA é racêmico e amorfo [Tsuji *et al.*, 1999]. O PLLA, tem se destacado, pela sua excelente biocompatibilidade e boas propriedades mecânicas, tendo sido testados em vários estudos clínicos [Bergsma *et al.*,1995; Bessho *et al.*, 1997; Rokkanen *et al.*, 1996]. Todavia, o longo período requerido para a sua degradação total, associado à alta cristalinidade de seus fragmentos pode causar grandes reações inflamatórias no corpo de longa duração, o que restringe seu uso em algumas aplicações clínicas. Buscando diminuir essa cristalinidade do PLLA, pode ser usado como material uma combinação dos monômeros L- láctico e D, L- láctico, sendo que esse último

tem como característica ser rapidamente degradado e não gerar fragmentos cristalinos, durante esse processo. O copolímero poli(L- ácido láctico-co-D, L ácido láctico), na relação 70:30 já é muito utilizado comercialmente, como o MacroPore Biosurgery da empresa Macropore [Macropore, 2006]

O PLDLA tem sido extensivamente investigado para uso em biomateriais, devido sua estabilidade mecânica [Scmidmaier *et al.*, 2001]. O PLDLA de baixo peso molecular também tem sido utilizado como sistema de liberação controlada de drogas, associado com antibióticos, ou fatores de crescimento [Gollwitzer *et al.*, 2003].

2.4. Biodegradação do poli (α -hidroxi ácidos)

Os poli(α -hidroxi ácidos) sofrem degradação principalmente por hidrólise, através da cisão das ligações ésteres, formando grupos terminais carboxila e hidroxila [Sung *et al.*, 2004]. A reação é representada na **Figura 4**.

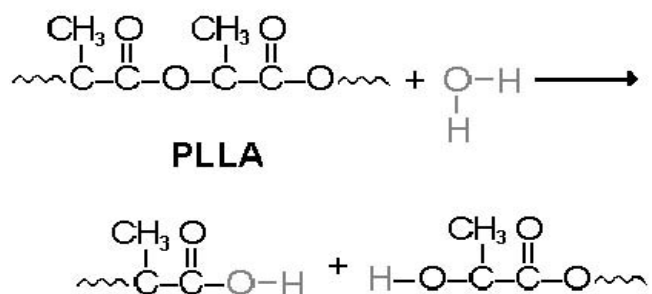


Figura 4. Hidrólise do poli(L-ácido láctico) através da cisão das ligações ésteres [Pezzin, 2001].

O ácido láctico, gerado pela degradação do poli(L-ácido láctico), é incorporado ao ciclo do ácido carboxílico e eliminado como dióxido de carbono e água [Hollinger & Battistone, 1986; Böstman, 1991; Peltoniemi, 2002].

O tempo de reabsorção do PLLA pelo organismo pode levar mais de 36 meses, essa capacidade de controlar o tempo de degradação no organismo é, sem dúvida, notável, o que justifica a grande quantidade de pesquisas que vem sendo realizadas com esse material [Bergsma *et al.*, 1995].

Esta variação de tempo de degradação é um dos fatores que direcionam a aplicação do material, sendo o homopolímero PLLA mais indicado para fixação de fraturas. [Barber, 1998, Pietrzak *et al.*, 1996].

Estudos mostram que o copolímero poli(L-ácido láctico-co-D,L ácido láctico) PLDLA de proporção 70:30, sendo a mistura 70% do poli(L- ácido láctico) e 30% do poli(D,L ácido láctico), apresenta como características principais: ser capaz de reter aproximadamente 100% de sua resistência inicial por 3 meses, mais de 90% num período de 6 meses e 30% num período de 12 meses; pode ser moldado por aquecimento muitas vezes sem perder suas propriedades mecânicas; pode ser reabsorvido completamente no intervalo de 18- 36 meses [Claes *et al.*, 1996].

Já é sabido que uma vez implantados no corpo, dispositivos biodegradáveis devem manter suas propriedades mecânicas pelo tempo necessário, e só então, serem degradados, reabsorvidos e eliminados sem deixar traços. Tanto a degradação *in vivo* como a *in vitro* desses materiais ocorre num ambiente aquoso através da quebra das ligações ésteres presentes na cadeia do polímero [Jalil, 1990]. O processo de degradação dos polímeros biorreabsorvíveis foi proposto por Raghuvanshi em 1993, e se baseia em três fases:

1. Processo de cisão das cadeias ao acaso: neste processo existe uma redução significativa da massa molar do polímero, mas sem ser verificado uma perda de massa significativa. Não existe ainda a formação de monômeros solúveis;
2. Na fase intermediária ocorre uma diminuição da massa molar acompanhada por uma rápida perda de massa e a formação de produtos oligoméricos solúveis.
3. Nesta fase os fragmentos oligoméricos são transformados nos seus respectivos monômeros. Ocorre aqui a completa solubilização do polímero.

O fato de ocorrer inicialmente uma perda da massa molar do polímero, seguido posteriormente pela perda de sua massa do polímero é um indicativo de que o tipo de degradação é *in bulk*. Este tipo de formação de poros ocorre quando a taxa em que a água penetra o dispositivo excede aquela em que o polímero é convertido em materiais solúveis em água. Este mecanismo de degradação em estágios permitiu que pesquisadores relatassem que a taxa de degradação na superfície é menor do que a degradação no interior destes dispositivos [Therin *et al.*, 1992; Ekholm, 2006].

Inicialmente, a degradação ocorre mais rapidamente na superfície dos implantes, devido a maior disponibilidade da água neste local. Os produtos de degradação da superfície são rapidamente dissolvidos no fluido e removidos do seio do polímero. No entanto, a remoção dos produtos da degradação no interior do dispositivo é lenta resultando assim, o acúmulo de produtos, os quais catalisam a degradação, promovendo uma hidrólise mais acelerada das ligações ésteres no interior dos dispositivos [Middleton, 2000].

Um dos fatores que influenciam a taxa de degradação do PLLA é o pH, o qual influencia na resistência mecânica desses materiais, sendo que o polímero mantém altos níveis de resistência em pH neutro, enquanto em pHs ácidos ou básicos a degradação se mostra muito mais intensa [Chu, 1982].

Outro fator que influencia a taxa de degradação do polímero, é o local onde o dispositivo é implantado. Dispositivos maiores implantados em áreas com poucas vascularizações podem degradar e diminuir a capacidade do corpo transportar para fora os subprodutos degradados [Athanasiou, 1998]. Por exemplo, se ao redor do tecido não for possível eliminar a grande quantidade de produtos ácidos originários de uma degradação muito rápida dos polímeros, pode ser verificado o aparecimento de uma inflamação ou algum outro tipo de resposta tóxica no local do implante [Suganuma *et al.*, 1993]. Todavia, essas complicações verificadas em alguns implantes desses polímeros em questão, aparecem, por exemplo, no caso dos implantes biorreabsorvíveis ortopédicos numa taxa menor do que 10 %, o que nos permite dizer que os resultados em humanos são na grande maioria favoráveis [Athanasiou, 1998].

Portanto, a taxa de degradação do polímero e a capacidade do local do implante em eliminar os produtos ácidos originários da degradação são de suma importância para se minimizar algum tipo de reação inflamatória [Suganuma *et al.*, 1993]. De maneira resumida pode-se dizer as taxas de biodegradação dos copolímeros de PLLA são dependentes de vários fatores como: relação molar dos meros provenientes do láctico na cadeia do polímero; massa molar; grau de cristalinidade e local do implante [Andrew *et al.*, 2001, Diener, 2003].

A hidrólise de polímeros amorfos como o PLDLA é mais rápida do que em polímeros semi-cristalino. Diferentes poliésteres alifáticos podem, desta forma, exibir cinéticas degradacionais bem distintas em soluções aquosas [Rezwan *et al.*, 2006].

2.5. Nervo Periférico

O nervo periférico é formado pelas projeções, denominadas axônios, dos neurônios motores presentes na coluna anterior da medula espinhal e neurônios sensitivos presentes no gânglio sensitivo (espinhal). Este apresenta em sua composição as células perineurais, fibroblastos, e especialmente as células de Schwann (CS) as quais envolvem os axônios formando a bainha de mielina [Garbay *et al.*, 2000]. A bainha de mielina é formada pela diferenciação da membrana plasmática das CS, a qual apresenta grande concentração de lipídios como o colesterol. Contudo, também apresenta algumas proteínas, entre estas, a proteína básica mielínica (MBP), entre outras [Garbay *et al.*, 2000]. Devido a sua constituição, esta atua como um isolante elétrico permitindo a rápida propagação do impulso nervoso ao órgão alvo.

Anatomicamente o nervo periférico está envolvido por três camadas de tecido conjuntivo. A camada mais externa é chamada de epineuro, formada por tecido conjuntivo denso na periferia, possui fibras de colágeno tipo I e vasos sanguíneos em sua constituição. Já a camada média é denominada de perineuro, encontrando as células pavimentosas (isto é, fibroblastos e células perineurais) e colágeno I e III, os quais envolvem os axônios originando os fascículos. A camada mais interna de tecido conjuntivo é denominada endoneuro. Contém axônios mielínicos envolvidos pela bainha de mielina, amielínicos, envolvidos pelas projeções citoplasmáticas das CS [Guth, 1956].

2.5.1. Lesões Nervosas

Nos Estados Unidos, aproximadamente 200.000 pacientes são tratados cada ano com lesões no nervo periférico, o qual exige intervenção cirúrgica. Essas lesões são resultados de traumas, doenças ou procedimento cirúrgico que exijam transecção do nervo periférico para ter acesso ao local da cirurgia [Yannas, 2004]. Casos de traumas acidentais são rotineiros nas salas de emergência dos hospitais. Um exemplo de trauma cirúrgico é o procedimento utilizado em cirurgias oncológicas, para remover tumores da base cranial, no qual o nervo facial é removido para providenciar acesso a esta região [Janecka, 1990].

Várias lesões podem acometer o SNP, sendo a mais severa, a transecção completa do nervo periférico (axotomia). Neste caso, há perda da continuidade do nervo e sua retração,

de forma que este passa a apresentar um coto proximal e um coto distal [Sunderland, 1990; Lundborg, 1993; Terenghi, 1999].

Após a transeção, no corpo celular do neurônio há um aumento do retículo endoplasmático rugoso, responsável pela síntese de proteínas relacionadas ao reparo do axônio [Terenghi, 1999; Zochodne, 2000].

Já no coto distal desenvolve-se um processo degenerativo denominado degeneração Walleriana, ocorrendo a fragmentação da bainha de mielina e dos axônios transeccionados [Lunn *et al.*, 1990], recrutamento dos macrófagos em direção ao local da lesão, bem como a proliferação e multiplicação das CS. Ambos atuam na fagocitose dos fragmentos de mielina e de axônios em degeneração [Beuche & Fried, 1984; Sunderland, 1990; Bruck *et al.*, 1995; Ide, 1996; Bruck, 1997; Cheng & Zochodne, 2002; Stoll *et al.*, 2002].

2.5.1.1. Técnicas de Reparo Nervoso

Apesar da capacidade regenerativa do SNP [Barnes, 1985; Ide, 1996; Oliveira *et al.*, 2004], há casos onde a extensão da lesão impossibilita a reconexão entre os cotos. Nesse intuito, vários materiais como os ossos, fâscias, tendões, músculos, vasos sanguíneos têm sido utilizados no reparo do nervo periférico [Fields *et al.*, 1989; Evans *et al.*, 1999; Yannas, 2004]. Contudo, o autoenxerto de nervo cutâneo (e.g. nervo cutâneo sural ou safeno) resulta numa melhor recuperação motora e sensitiva. Porém, há a perda da sensibilidade da área do nervo retirado para o transplante [Evans *et al.*, 2002].

Há ainda outras técnicas de reparo, como a sutura das bainhas conjuntivas (neurorrafia), implantes de autoenxertos de músculo estriado esquelético e a tubulização [Fields *et al.*, 1989; Lundborg, 1993; Lundborg *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Pierucci *et al.*, 2004].

A tubulização é uma técnica realizada quando a distância que separa os dois cotos não excede alguns milímetros. O processo da tubulização consta de uma prótese tubular onde o coto distal e proximal são introduzidos e fixados através de pontos cirúrgicos em suas extremidades, deixando-se um espaço de poucos milímetros entre os mesmos [Fields *et al.*, 1989, Lundborg *et al.*, 2004; Oliveira *et al.*, 2004; Pierucci *et al.*, 2004]. Os objetivos desta técnica são criar um ambiente favorável à regeneração, orientar o crescimento das

fibras em direção ao coto distal, proteger as fibras nervosas do tecido cicatricial e evitar a formação de neuromas. Além disso, possibilita o emprego de moléculas da matriz extracelular (MEC) (colágeno, fibronectina, laminina), células fundamentais para o processo regenerativo (células de Schwann), e fatores de neurotróficos como o fator neurotrófico derivado da glia (GDNF), fator de crescimento do nervo (NGF), entre outros, para o preenchimento do tubo a fim de aumentar a eficiência do processo regenerativo [Fields *et al.*, 1989; Lundborg, 1993; Tong *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 2001; Rodríguez *et al.*, 2000; Bloch *et al.*, 2001; Da Silva *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2004; Pierucci *et al.* 2004].

Estudos recentes mostraram excelentes resultados no processo regenerativo quando utilizados biomaterias na técnica da tubulização, após cumprirem sua função, o tubo degrada gradualmente sem induzir uma reação adversa no tecido [Madison *et al.*, 1985; Aldini *et al.*, 1996; Kiyotani *et al.*, 1996; Evans *et al.*, 1999; Evans *et al.*, 2002]. Tubos porosos biorreabsorvíveis construídos a partir de PLLA, propiciaram uma melhora na resposta funcional, refletindo em um número significativo de axônios regenerados [Evans *et al.*, 1999]. Ainda, na tentativa de melhorar o processo regenerativo, os mesmos foram preenchidos com células de Schwann [Evans *et al.*, 2002]. Outro biopolímero, o poli (caprolactona) (PCL) destacou-se por ser biocompatível e surge como uma alternativa ao autoenxerto [Aldini *et al.*, 1996]. O PLGA e o PCL foram utilizados como guia para regeneração nervosa [Wen, 2006].

Os resultados obtidos com esta técnica são superiores aos dos auto-enxertos. [Brunelli, 1994; Mackinnon, 1990; Hentz, 1991; Muller, 1993].

Os tubos sintéticos de material reabsorvível mostraram melhores resultados quando comparados aos não absorvíveis [Madison *et al.*, 1985]. De acordo com alguns autores eles enfatizam a necessidade de remoção do material não reabsorvível após a regeneração do nervo. Da perspectiva clínica isto é um fator negativo, tendo uma razão suficiente para seu descarte. Os materiais reabsorvíveis por sua vez não necessitam de uma segunda intervenção cirúrgica, além de provocarem pouca reação fibrótica e sua reabsorção não impede o crescimento do nervo em diâmetro [Madison *et al.*, 1985], em contraste com que ocorre com os de materiais não reabsorvíveis. Porém é importante ter um material onde a taxa de reabsorção não seja muito rápida, sendo adequada para que a regeneração e reorganização do nervo sejam efetivas [Aldini, 1996].

Capítulo 3

Materiais e Métodos

3.1. Preparação das membranas

Foram preparadas membranas de poli (L-ácido lático-co-D,L-ácido lático), PLDLA, (70:30, Mw 282 700 g.mol⁻¹) (Sintetizado no Labiomat/ PUC-Sorocaba) nas dimensões 50x30x5mm utilizando a técnica de evaporação de solvente. Soluções poliméricas contendo copolímero na concentração 2,5% m/v, foram dissolvidas em diclorometano (Merck KgaA, Darmstadt, Alemanha). Após completa dissolução do copolímero, sob agitação por 2 horas, a solução foi vertida cuidadosamente, evitando a formação de bolhas, em um molde de vidro nas dimensões 50x30x5mm.

O molde contendo a solução foi colocado em uma cuba de vidro (**Figura 5**) saturada com o vapor do solvente durante 24 horas, onde o fluxo de ar seco promovia o arraste do solvente e a consequente formação das membranas. Após a evaporação do solvente, as membranas foram secas à vácuo por 8 horas e mantidas nesta condição até a caracterização em um dessecador à vácuo.

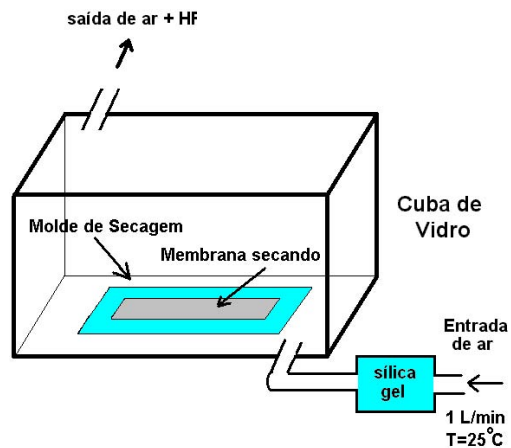


Figura 5. Sistema de evaporação de solvente para secagem das membranas [Luciano, 1997].

Após a obtenção, as membranas foram caracterizadas por DSC, TGA, MEV, GPC e ensaio mecânico de tração antes e após o estudo *in vitro* e *in vivo*, conforme esquema a seguir:

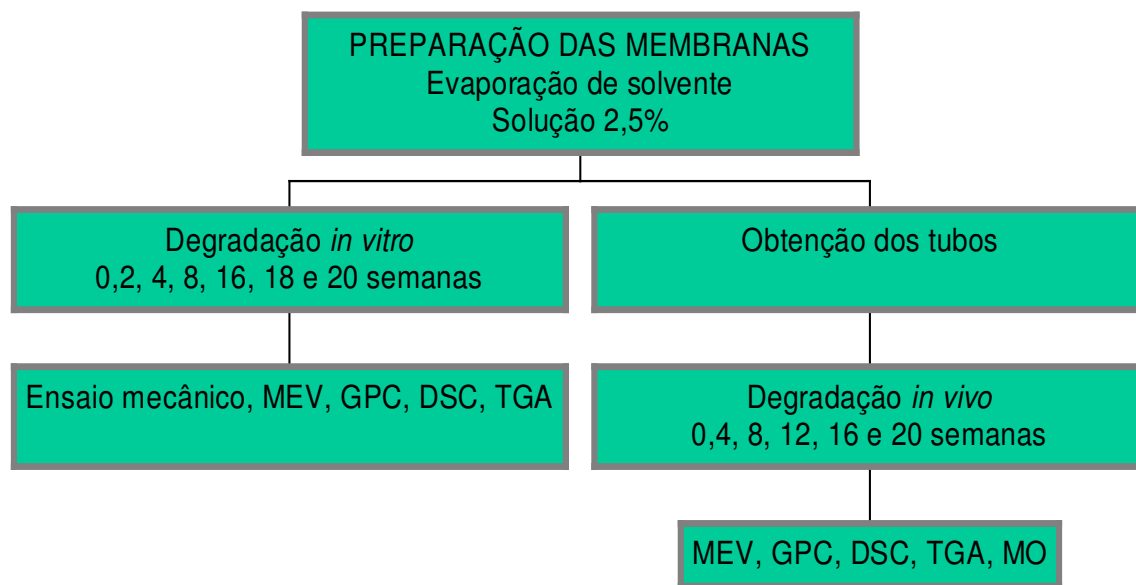


Figura 6. Fluxograma do procedimento experimental

3.2. Estudo *in vitro*

Realizou-se o estudo *in vitro* para avaliar o comportamento do material mediante o processo de degradação hidrolítica. As membranas de PLDLA foram imersas em tubos de ensaios com tampa rosqueada, previamente esterilizadas com álcool 70% contendo solução tampão fosfato pH 7 a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ sendo retiradas após 0, 2, 4, 8, 16, 18 e 20 semanas. Após os tempos determinados, as membranas foram lavadas com água destilada, secas em estufa à vácuo a 60°C durante 8 horas. As membranas antes e após a degradação foram submetidas às técnicas de caracterização por DSC, TGA, MEV, GPC e ensaio de tração.

3.2.1. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

As medidas de DSC foram realizadas em um equipamento modelo 2920 Modulated DSC (Ta Instruments). As amostras, pesando em torno de 10 mg, foram aquecidas entre 25 a 210°C a $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ seguida de isoterma por 5 minutos; após isto, as amostras foram resfriadas à 0°C a $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$, isoterma de 5 minutos em 0°C , e reaquecidas até 210°C .

3.2.2. Análise termogravimétrica (TGA)

As amostras das membranas, pesando cerca de 20 mg foram aquecidas de 25 a 450°C a $10^\circ\text{C}.\text{min}^{-1}$ sob atmosfera de argônio, utilizando-se o equipamento STA 409C (Netzsch).

3.2.3. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os fragmentos da superfície superior das membranas e a superfície de fratura das mesmas (obtidas em nitrogênio líquido), foram fixados em um suporte metálico e recobertos com uma fina camada de ouro, utilizando-se um metalizador de amostras Sputter Coater BAL-TEC SCD 050 e analisados em um microscópio eletrônico de varredura JEOL JXA 860A, sob tensão de 10 a 20 kV.

3.2.4. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A massa molar média numérica (Mn), massa molar média ponderada (Mw) e o índice de polidispersão (IP) foram obtidos em um cromatógrafo líquido CLWA-1, utilizando-se colunas ultrastyrigel e detector de índice de refração Waters 410. Foram utilizados padrões de poliestireno para a calibração e THF (tetrahidrofurano) como fase móvel.

3.2.5. Ensaio mecânico de tração

As membranas de PLDLA com cerca de 40 mm de comprimento, 2,0 mm de largura e 0,20 mm de espessura foram submetidas a ensaios de tração em um sistema automático de testes de materiais da marca Tinius Olsen, modelo H5KS, célula de carga de 200N e velocidade de 10 mm.min⁻¹ utilizando norma ASTM D882-02. Cada amostra foi submetida a 7 ensaios nas mesmas condições de umidade (50%) e temperatura (22°C).

3.3. Estudo *in vivo*

3.3.1 Animais e grupos experimentais

O estudo envolveu 30 ratos da linhagem Spreague Dawley, fêmeas adultas com aproximadamente 8 semanas de idade e 0,25Kg de peso.

Os ratos foram mantidos no biotério do departamento de Anatomia do Instituto de Biologia da Unicamp segundo normas padrões de manutenção e cuidado com animais de laboratório durante todo o período pré e pós-operatório. O regime de luz foi de 12 horas e a temperatura foi controlada em 25 ± 2°C.

3.3.2. Implantes

Para os implantes, membranas de PLDLA foram submetidas à técnica de tubulização obtendo-se tubos com diâmetro de 1,6mm e 10mm de comprimento, **Figura 7**. Os tubos foram esterilizados por imersão em álcool 70% por 24 horas e lavados em solução tampão fosfato pH 7,4 a 37°C, por 2 horas antes da cirurgia.

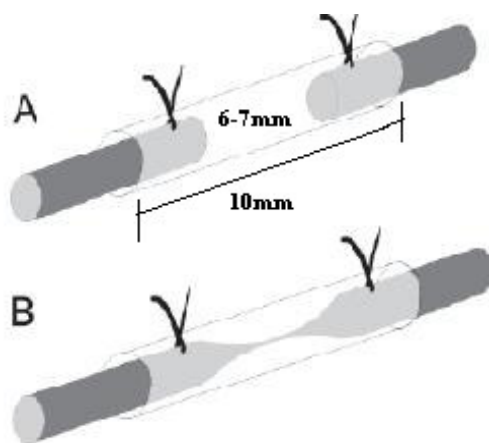


Figura 7. Foto do tubo implantado [Oliveira,2004].

3.3.2.1. Procedimento cirúrgico para a tubulização

Após anestesia (0,2mL de ketamina e 0,2mL xylazina, 0.2mL/100g peso corpóreo, ip), os animais foram submetidos à tricotomia da coxa esquerda. Em seguida, foram colocados em decúbito ventral sob microscópio cirúrgico. A pele foi incisada afastando-se a musculatura, procedeu-se a exposição do nervo ciático. O nervo foi transecionado e, após a retração dos cotos, estes foram introduzidos e fixados, com um ponto cirúrgico (fio mononylon 10-0, ethicon), no interior de um tubo de PLDLA (Clay Adams, comprimento=10mm, diâmetro interno=1,6mm e diâmetro externo=3,2mm), deixando-se um espaço de 6-7mm entre eles.

A **Figura 8** mostra o nervo antes do implante (A), prótese tubular de PLDLA (B).

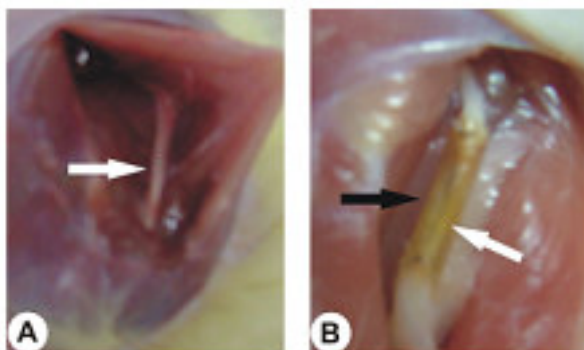


Figura 8. (A) nervo ciático, antes do implante; (B) tubulização do nervo ciático com a prótese tubular de PLDLA. Observe o nervo regenerado (seta branca) no interior da prótese (seta preta).

Encerrados os procedimentos de tubulização, o plano muscular foi suturado com um fio de seda 7-0 e a pele fechada com 2 ou 3 grampos cirúrgicos. Os animais foram mantidos em biotério do Departamento de Anatomia -IB-Unicamp, por um período de 4, 8, 12, 16 e 20 semanas, recebendo ração e água *ad libitum*.

3.3.3. Sacrifício dos animais e processamento dos espécimes para microscopia óptica

Após anestesia com Hidrato de Cloral 10% (0,1mL/20g, i.p) os animais foram submetidos a toracotomia e a seguir perfundidos transcárdiacamente com auxílio de uma bomba perfusora do tipo peristáltica. Inicialmente, visando a lavagem dos vasos e órgãos, os animais foram perfundidos com 150mL de uma solução salina tamponada e heparinizada NaCl 0,9% em tampão fosfato de sódio, pH 7,38). A fixação foi realizada pela subsequente perfusão de 300mL de uma solução contendo glutaraldeído (2%) e paraformaldeído (1%) em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,38.

3.3.4. Processamento dos explantes

Após a fixação, o conjunto contendo o nervo regenerado no interior do tubo de PLDLA foi dissecado e imerso na mesma solução fixadora por 12 horas, a uma temperatura de 4°C. Passado esse período, os elementos do referido conjunto foram lavados em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,38 e dissecados sob lupa, sendo os cotos proximal e distal separados. Os fragmentos foram colocados individualmente em frascos contendo tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,38. Estes foram então pós-fixados por um período de 2 horas em solução de tetróxido de ósmio a 1%, diluído em tampão fosfato de sódio 0,01M, pH 7,38. Seguindo-se à pós-fixação, os fragmentos foram lavados em água destilada e desidratados em série crescente de acetona e incluídos em resina (Epon 812, EMS). Os blocos foram desbastados e secções semi-finas (0,5µm) obtidas e coradas com azul de toluidina 0,25% para a observação ao microscópio de luz.

Após retirada do material biológico nos tempos determinados (4, 8, 12, 16 e 20 semanas) os tubos foram caracterizados através de MEV, DSC, GPC e TGA, cujas descrições das técnicas foram apresentadas no item estudo *in vitro nos tópicos 3.2.1 a 3.2.4. e por microscopia óptica*.

3.3.5. Microscópio Óptico (MO)

As amostras preparadas foram observados através de um microscópio óptico, marca Nikon, Eclipse TS100, aumento 10X e 100X.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1. Estudo da degradação *in vitro* e estudo *in vivo*

A degradação *in vitro* mostra-se como uma alternativa eficiente quando comparado aos estudos *in vivo*, sendo fundamentais e necessários. Os custos são menores, o processo pode ser acelerado e as condições dos ensaios, como temperatura, pH, produtos e subprodutos de degradação podem ser quantificados e monitorados [Barbanti, 2004].

Nesse tópico serão apresentados e discutidos os resultados obtidos a partir da degradação *in vitro* do PLDLA na forma de membranas e do estudo *in vivo* do PLDLA após implante na forma de tubos, analisados por DSC, TGA, GPC, ensaio mecânico de tração, MEV e MO.

4.1.1. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A **Figura 9** apresenta as curvas de DSC (segundo aquecimento) obtidos a partir das análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC), antes e após a degradação *in vitro* das membranas de PLDLA nos tempos 0, 2, 4, 8, 16, 18 e 20 semanas.

Através das informações da análise por DSC é possível observar apenas a presença da Tg nos termogramas, o que caracteriza o PLDLA como um polímero amorfo.

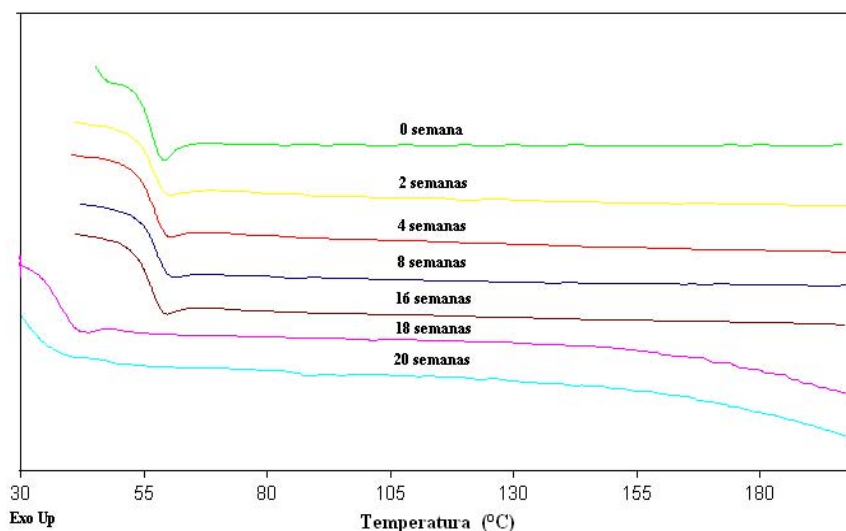


Figura 9. Curvas de DSC para as membranas de PLDLA em função do tempo de degradação *in vitro*.

A **Tabela 1** mostra os dados obtidos a partir das análises de calorimetria diferencial de varredura, antes e após a degradação das membranas de PLDLA *in vitro* nos tempos 0, 2, 4, 8, 16, 18, 20 semanas.

Tabela 1. Valores de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de cristalização (T_c), entalpia de fusão (ΔH_m) e entalpia de cristalização (ΔH_c) para as membranas de PLDLA após degradação *in vitro*.

Tempo de Degradação (semanas)	T_g (°C)
0	59
2	57
4	57
8	57
16	57
18	38
20	35

O PLDLA manteve-se constante até a 16^o semana, onde apresentou uma T_g em 59°C. Porém, na 18^o e 20^o semanas a queda da T_g foi acentuada, passando para 30°C. Essa diminuição na T_g pode ser explicada pela quebra das cadeias poliméricas. Como a T_g está

relacionada à temperatura a partir da qual as cadeias poliméricas adquirem mobilidade, à medida que a degradação ocorre e conseqüentemente obtêm-se cadeias menores, a temperatura necessária para promover esse movimento é menor, o que justifica a diminuição na Tg.

Os termogramas obtidos a partir da degradação *in vivo*, após implante dos tubos, avaliados até o tempo de degradação 8 semanas, apresentaram apenas a temperatura de transição vítrea (Tg), o que está de acordo com as características amorfas do copolímero. O valor da Tg antes da degradação foi de 59 °C, diminuindo para 40°C após 8 semanas. Após 12 semanas de degradação, a Tg foi de 56 °C e o termograma apresentou um pico bem definido de fusão (175°C), e um pico de cristalização (103 °C), cujos valores das entalpias de fusão e cristalização são, respectivamente, $\Delta H_m = 50\text{J/g}$ e $\Delta H_c = 26\text{J/g}$. Esses dados indicam que apesar do material ser amorfo, antes da degradação, à medida que o processo de degradação ocorre, o material torna-se cristalino, dificultando a mobilidade das cadeias das regiões amorfas, causando um aumento no valor de Tg (56 °C), **Figura 10**.

Esse comportamento já foi verificado para outros polímeros biorreabsorvíveis. Duek e cols. em estudos da degradação *in vitro* de pinos de PLLA, afirmaram que para polímeros parcialmente cristalinos, a degradação ocorre preferencialmente nas regiões amorfas e verifica-se um aumento do grau de cristalinidade do material devido à formação de novos cristais, através do rearranjo das cadeias de menor massa molar, originadas no processo de degradação [Duek *et al.*, 1999]. Segundo os autores, o aumento da cristalinidade do PLLA com o tempo de degradação foi atribuído a cisões hidrolíticas dos segmentos das cadeias e conseqüente diminuição da massa molar. Tais cisões resultam em um menor enovelamento dos segmentos de cadeia localizados nas regiões amorfas [Tsuji, 1999; Tsuji, 1997]. Neste estudo acredita-se que o aparecimento da ΔH_c e ΔH_m deve-se ao rearranjo de cadeias menores geradas pelo próprio processo de degradação, onde há uma diminuição da massa molar e formação de novos cristais. No caso do copolímero amorfo, à medida que ocorre a fragmentação das cadeias, elas se rearranjam e formam novos cristais.

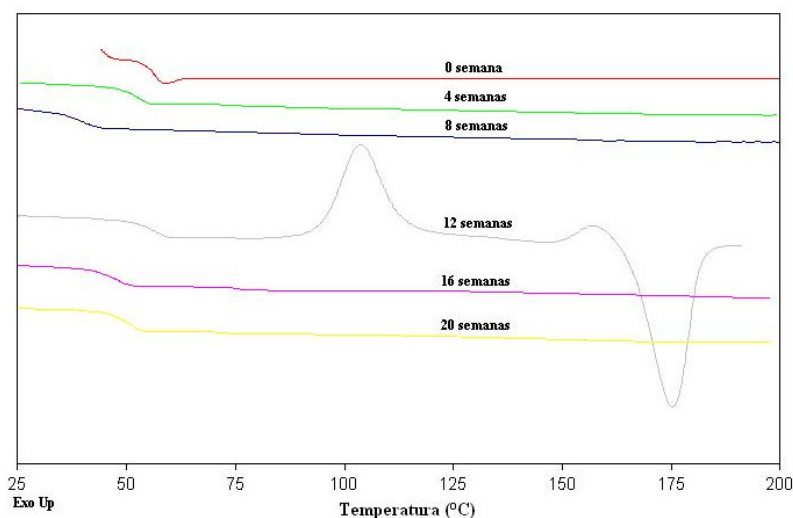


Figura 10. Curvas de DSC para as membranas de PLDLA em função do tempo de degradação *in vivo*.

A **Tabela 2** mostra os dados obtidos a partir das análises de calorimetria diferencial de varredura, antes e após a degradação dos tubos de PLDLA *in vivo* nos tempos 0, 4, 8, 12, 16, e 20 semanas.

Tabela 2. Valores de temperatura de transição vítrea (T_g), temperatura de fusão (T_m), temperatura de cristalização (T_c), entalpia de fusão (ΔH_m) e entalpia de cristalização (ΔH_c) para os tubos de PLDLA após degradação *in vivo*.

Tempo de Degradação (semanas)	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	T_c (°C)	ΔH_c (J/g)
0	59	-	-	-	-
4	52	-	-	-	-
8	40	-	-	-	-
12	56	175	50	103	26
16	47	-	-	-	-
20	51	-	-	-	-

Comparando-se os resultados obtidos a partir do DSC para os estudos *in vitro* e *in vivo*, e considerando o período entre 0 e 20 semanas, verifica-se que o decréscimo nos valores de T_g foi muito mais acentuado no estudo *in vitro*. No entanto, para as amostras submetidas ao estudo *in vitro*, os valores de T_g permaneceram praticamente constantes até

16 semanas enquanto os valores de Tg obtidos a partir do estudo *in vivo*, oscilaram nesse período e apresentaram mínima variação.

Era de se esperar que as amostras *in vivo* degradassem mais rapidamente que as *in vitro*, em função dos fatores fisiológicos aos quais foram submetidas no organismo do animal. Entretanto, verifica-se que as amostras *in vivo* sofreram uma brusca variação nos valores de Tg até 8 semanas, enquanto os valores de Tg para as amostras *in vivo*, permaneceram inalterados até 16 semanas, o que vem de encontro com os efeitos fisiológicos comentados acima. Como a degradação *in vivo* ocorreu numa velocidade alta, e conseqüentemente houve formação de cadeias menores, teve como resultado a cristalização das mesmas, confirmado pelo aparecimento dos picos de fusão e cristalização após 12 semanas, o que provoca uma degradação mais lenta a partir desse tempo de degradação.

Por outro lado, as amostras *in vitro*, submetidas a um processo de degradação estático, depende da difusão das moléculas de água, o que é mais lento e por isso apresenta um período inicial de estabilidade. No entanto, a partir do momento que ocorre a difusão e conseqüentemente a degradação, o processo se desencadeia. Durante o processo, provavelmente ocorreu à formação de novos cristais, mas não pode ser verificado exatamente nesses tempos analisados.

4.1.2. Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A determinação da distribuição de massas molares de um polímero é a melhor maneira de prever suas propriedades físicas, como rigidez, flexibilidade, entre outros durante o processo de degradação [Canevarollo, 2002].

A **Tabela 3** mostra os valores de massa molar média ponderada (M_w) e Massa molar Média numérica (M_n), em função do tempo de hidrólise para as membranas de PLDLA. Verifica-se uma diminuição nos valores de M_w , a qual é notada a partir da 2 semanas. Essa diminuição teve uma queda acentuada a partir da 16^o semana ($M_w= 98.156$) o qual se estende até a 20^o semana ($M_w=8.378$). Estes resultados são peculiares da degradação do material onde há clivagem hidrolítica, caracterizada pela diminuição da M_w . Os valores estão de acordo com os resultados obtidos pelo DSC, onde houve uma diminuição acentuada da Tg nos tempos de 18 e 20 semanas.

Tabela 3. Dados de GPC para as membranas em função do tempo de degradação *in vitro*.

Tempo de Degradação (semanas)	Mw (g.mol ⁻¹)	Mn (g.mol ⁻¹)	I.P.
0	282 700	131 354	2.1
2	199 011	120 246	1.7
4	184 256	132 762	1.4
8	178 909	108 940	1.6
16	98 156	58 265	1.7
18	10 873	3 790	2.9
20	8 378	3 760	2.2

A análise de GPC das amostras degradadas *in vivo* possibilitou verificar a variação das massas molares devido à quebra das cadeias poliméricas, em função do tempo de degradação, para os tubos de PLDLA após implante, **Tabela 4**. Verifica-se uma queda na massa molar das amostras à medida que a degradação ocorre.

Tabela 4. Dados de GPC para os tubos de PLDLA em função do tempo de degradação *in vivo*

Tempo de Degradação (semanas)	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	I.P. (Mw/Mn)
0	282 700	131 354	2.1
4	174 051	97 452	1.8
8	170 865	97 385	1.8
16	136 584	93 129	1.4
20	128 356	68 890	1.7

Mw = Massa molar Média ponderada, Mn = Massa molar Média numérica

Como verificado na **Tabela 4** a queda nos valores de massa molar foi mais acentuada a partir da 8^o semana, diferentemente da brusca diminuição da massa molar verificada no caso da degradação *in vitro*, no início do processo. Esses dados confirmam os dados de DSC para o processo de degradação do PLDLA, tanto no estudo *in vivo*, quanto no *in vitro*.

A degradação dos poliésteres tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, foi investigada por muitos autores Kopecek & Ulbrich, (1983), Holland & Yasin, (1986), Lewis (1990). Diferentes fatores afetam a cinética de degradação, tais como: composição química e estrutura configuracional, processamento, massa molar (Mw), polidispersividade (Mw/Mn), condições ambientais, tensão e deformação, cristalinidade, morfologia, orientações das

cadeias [Rezwan *et al.*, 2006]. Polímeros com massa molar mais baixa degradam mais rápido que os de massa molar mais alta [Lindhardt, 1988] e os polímeros ramificados degradam muito mais rápido do que os lineares.

A estereoquímica influencia nas propriedades finais do polímero. Em geral, o grau inicial de cristalinidade dos poliésteres influencia a taxa de degradação; como os segmentos cristalinos são quimicamente mais estáveis que os segmentos amorfos, isto reduz a permeação de água para o interior da matriz, diminuindo a taxa de degradação [Rezwan *et al.*, 2006]. Por estas razões o PLDLA tem surgido como alternativa para diminuir essa cristalinidade do PLLA, podendo ser usado como material uma combinação dos monômeros L- lático e D, L-lático, gerando um copolímero que tem como característica ser rapidamente degradado e não gerar fragmentos cristalinos, durante esse processo, evitando inflamações agudas [Baraúna *et al.*, 2007].

4.1.3. Análise termogravimétrica (TGA)

As membranas de PLDLA submetidas ao estudo *in vitro* foram analisadas por TGA para avaliar a temperatura de início de perda de massa (T_i) e Temperatura onde a derivada da curva é máxima (T_d) em relação ao tempo de degradação, **Tabela 5**. As curvas de TGA (**Figura 11**) para todas as amostras apresentam um único estágio de perda de massa, independente do tempo de degradação e do sistema de degradação, *in vivo* ou *in vitro*, com valores de T_i em 340 °C e T_d em 364 °C.

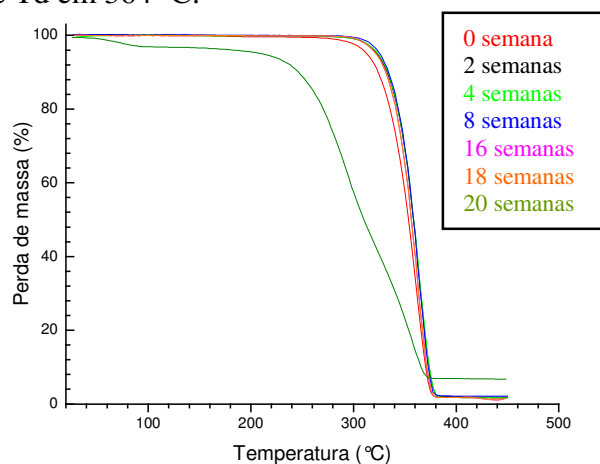


Figura 11. Curvas de TGA para as membranas de PLDLA em função do tempo de degradação *in vitro*.

Na **Tabela 5**, é possível constatar uma diminuição da T_i , de acordo com o tempo de degradação, sendo que os valores de T_i são menores para os tempos de 18 e 20^o semanas. Este comportamento é característico de material degradado.

Tabela 5. Dados obtidos por TGA para as membranas de PLDLA em função do tempo de degradação *in vitro*.

Tempo de Degradação (semanas)	T_i (°C)	T_d (°C)
0	340	364
2	339	364
4	339	364
8	339	363
16	338	361
18	277	309
20	250	289

T_i = temperatura onde se inicia o estágio de perda de massa “onset”, T_d = temperatura onde a derivada da curva é máxima.

Os tubos de PLDLA degradados *in vivo* (**Figura 12**) também foram analisados por TGA para avaliar a temperatura de início da degradação em função do tempo de implante.

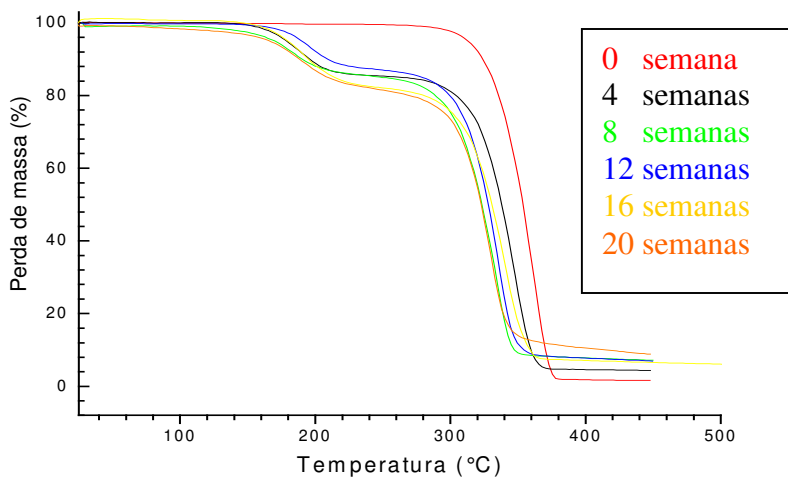


Figura 12. Curvas de TGA para as membranas de PLDLA em função do tempo de degradação *in vivo*.

Comparando-se os valores de T_i (temperatura de início de degradação) e T_d (temperatura na qual a perda de massa é máxima), verifica-se um decréscimo nas temperaturas de perda de massa em função do tempo de degradação até 8 semanas. Após esse período, a diminuição nos valores de T_i e T_d é menos acentuada. Conforme discutido nas análises de DSC, essa diferença no comportamento do processo de degradação nas amostras submetidas aos estudos *in vitro* e *in vivo* podem estar relacionadas às diferentes condições do meio, sendo o processo de degradação *in vivo* um mecanismo complexo de eventos celulares e bioquímicos [Chu, 1999; Sung, 2004].

Tabela 6. Dados obtidos por TGA para os tubos de PLDLA em função do tempo de degradação *in vivo*. T_i (temperatura de início de degradação) e T_d (temperatura na qual a perda de massa é máxima).

Tempo de Degradação (semanas)	T_i (°C)	T_d (°C)
0	340	364
4	314	349
8	310	330
12	305	336
16	304	341
20	300	334

4.1.4. Ensaio mecânico de tração *in vitro*

A partir das curvas de tensão x deformação obtidas através dos ensaios de tração para as membranas de PLDLA após 0, 2, 4, 8, 16 semanas de degradação, foram calculados os valores de resistência à tração, módulo de elasticidade e alongamento na ruptura, **Figura 13** (a, b, c), respectivamente.

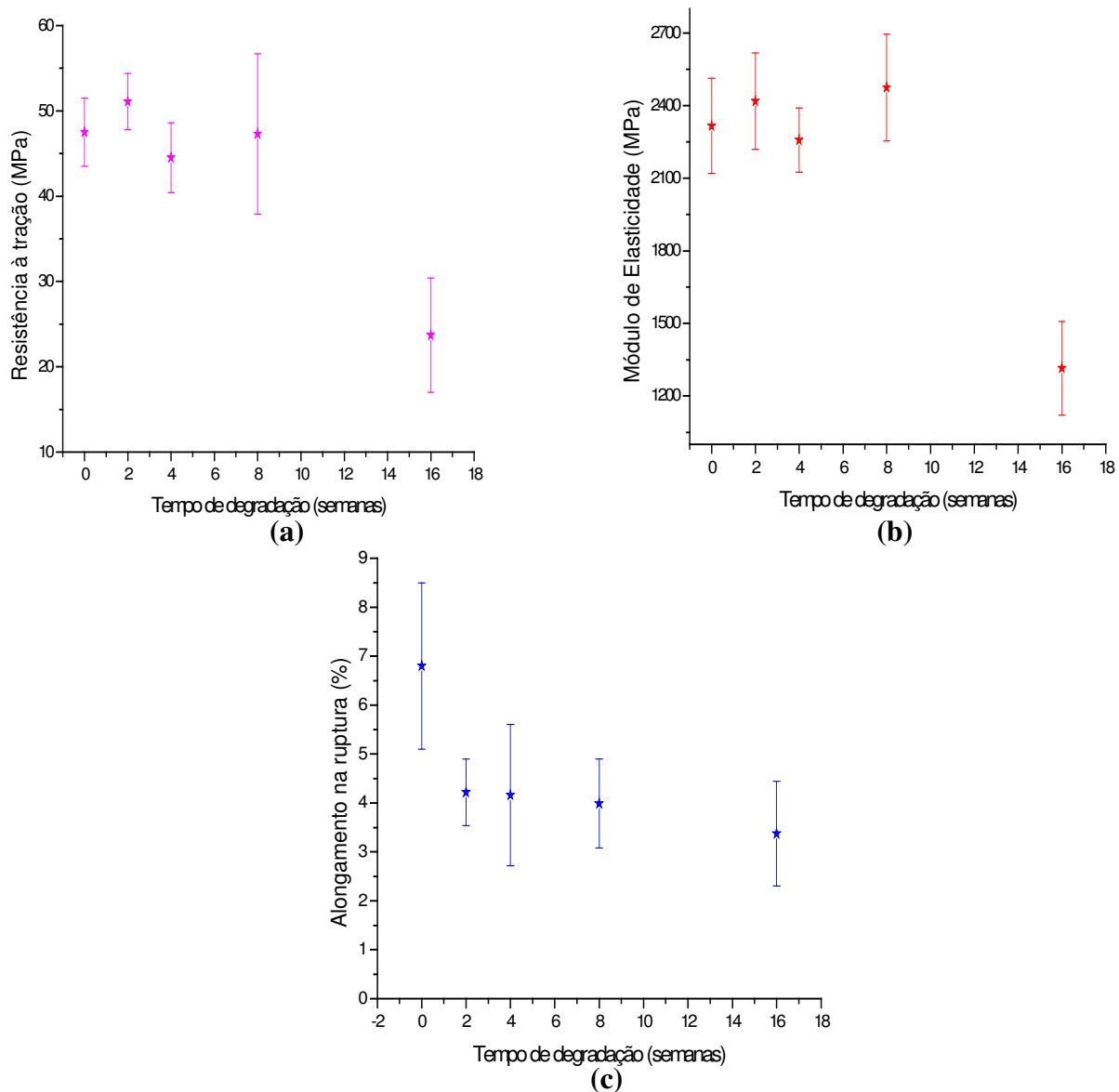


Figura 13. Gráficos de (a) resistência à tração, (b) Módulo de elasticidade e (c) Alongamento na ruptura, obtidos a partir do ensaio de tração para as membranas de PLDLA em função do tempo de degradação *in vitro*.

Verifica-se que o PLDLA mantém suas propriedades mecânicas, com pequenas alterações até 8 semanas de degradação, já 16^o semana, houve uma diminuição destas propriedades (**Figura 13 (a), (b) e (c)**), devido à degradação acentuada do polímero.

O resultado da resistência à tração e do módulo de elasticidade das membranas de PLDLA no tempo 0 semanas (**Figura 13(a) e (b)**), está de acordo aos encontrados na literatura que foram respectivamente de 35 MPa e 1900 – 2400 MPa [Middleton *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001].

Na tentativa de melhorar as propriedades mecânicas e aumentar a velocidade de degradação do PLLA, Chen e col., (2001) estudaram blendas de PLLA/PDLLA nas composições 100/0, 80/20, 60/40, 50/50, 40/60, 20/80, 0/100 e observaram que a composição 40/60 apresentou melhores propriedades mecânicas onde o módulo de elasticidade foi de $20,5 \pm 3,9$ MPA. O módulo de elasticidade, é uma propriedade do material. Assim sendo, os valores obtidos para o módulo de elasticidade são os mais indicados para comparações com dados de propriedades mecânicas obtidas na literatura.

Vale ressaltar que para os biomateriais, nem sempre um alto valor de módulo de elasticidade é tão importante, se ao degradar, o polímero perde rapidamente suas propriedades mecânicas. É necessário ter em mente que as propriedades requeridas para um material irão depender da aplicação à qual ele se destina. No caso de regeneração nervosa periférica, foi comprovada a regeneração em 30 dias após o implante, sendo este tempo suficiente para manter as propriedades mecânicas, isso foi observado neste estudo com as membranas de PLDLA onde mantiveram suas propriedades até 8 semanas, sendo assim o tempo suficiente para que haja a regeneração nervosa periférica.

4.1.5. Análise macroscópica das amostras degradadas *in vitro*

Foi possível observar através da análise macroscópica que a partir de 16 semanas de degradação ocorreu uma diminuição no tamanho da amostra, e as membranas após 16 e 20 semanas estavam totalmente degradadas, apresentando uma coloração branca que pode ser observada através da **Figura 14**. Nijenjuis e colaboradores[1991] atribuíram este fato à recristalização dos polímeros.

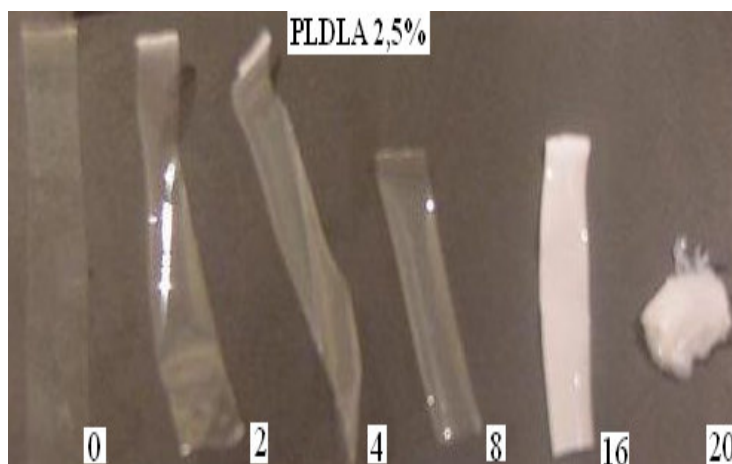
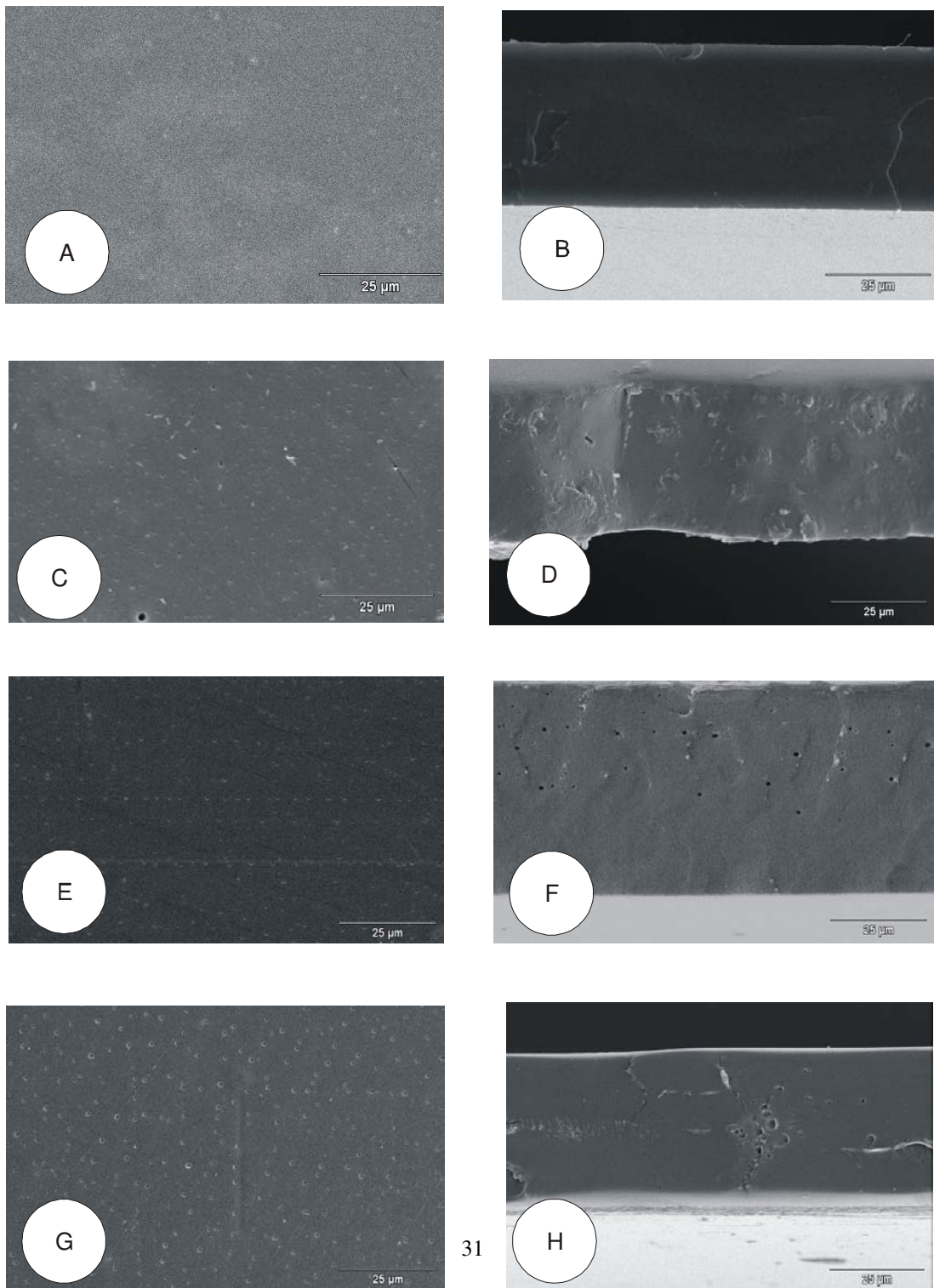


Figura 14. Macroscopia em diferentes tempos de degradação *in vitro*.

4.1.6. Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As membranas e os tubos de PLDLA foram analisadas por MEV antes e após o processo de degradação, *in vitro* e *in vivo*, e são mostradas nas **Figuras 15 e 16**, respectivamente.



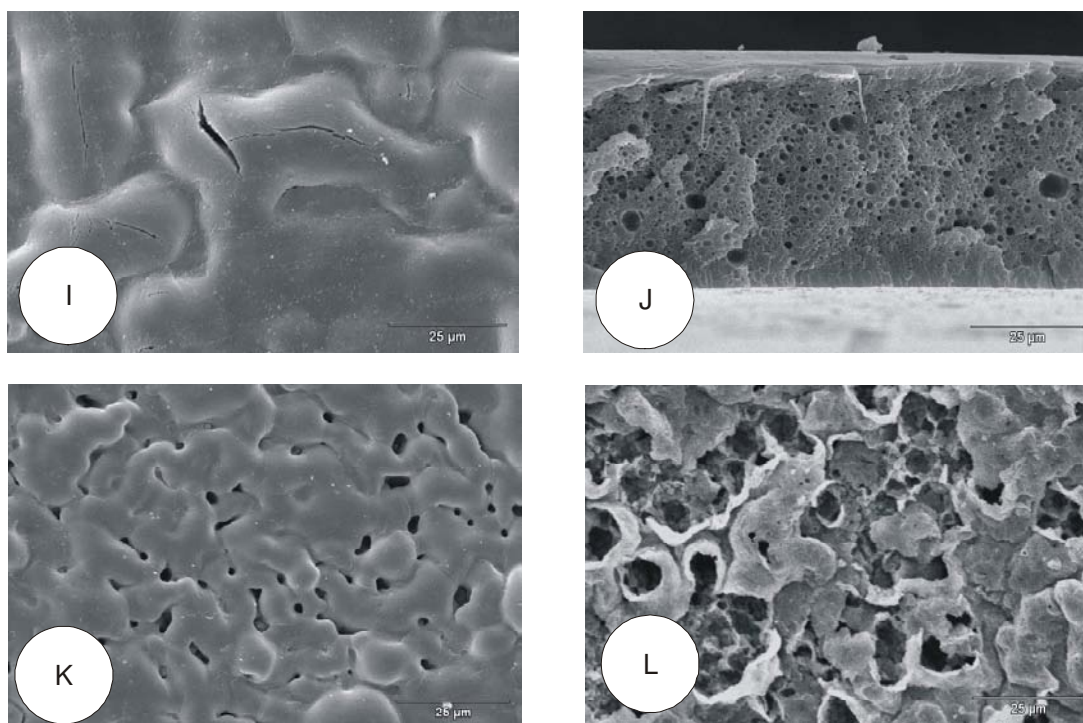


Figura 15. Micrografias eletrônicas de varredura de membranas de PLDLA em função do tempo de degradação *in vitro*. Foram analisadas superfícies (coluna da esquerda) e a superfície da fratura (coluna da direita) nos períodos de 0 (a; b), 2 (c; d), 4 (e; f), 8 (g; h), 16 (i; j), e apenas superfície 18, 20 semanas (k; l) .

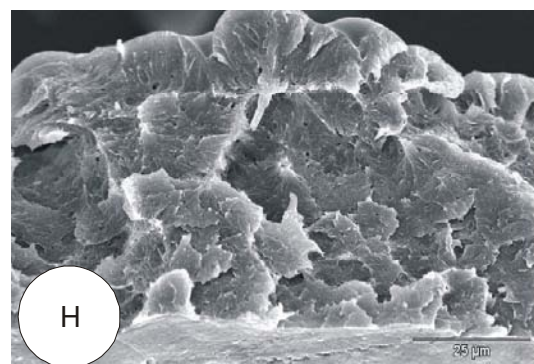
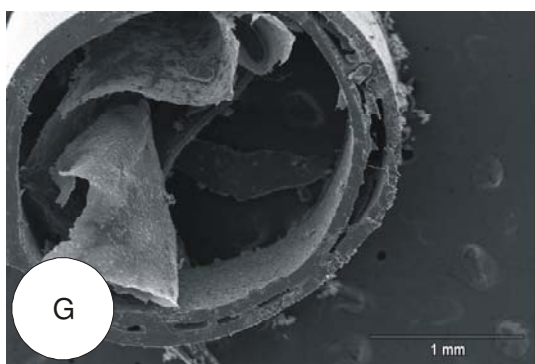
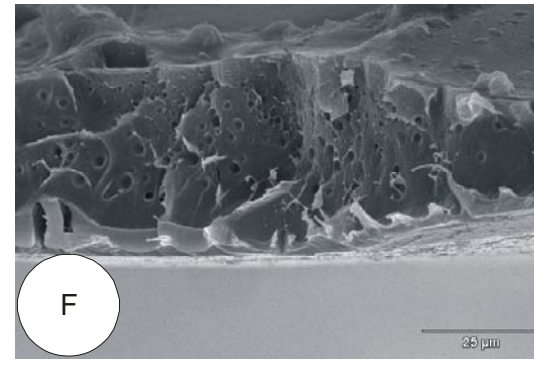
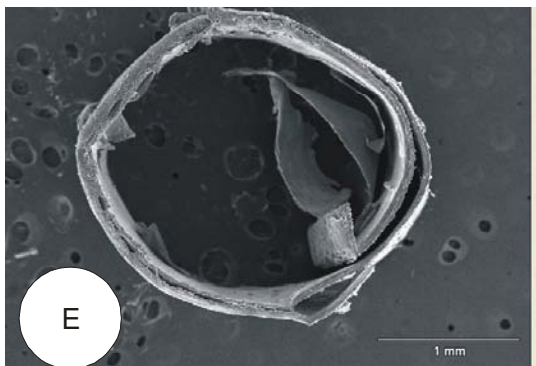
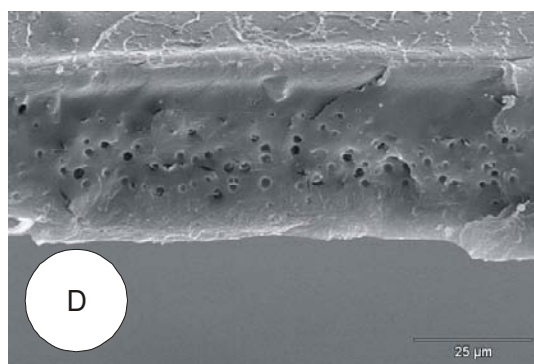
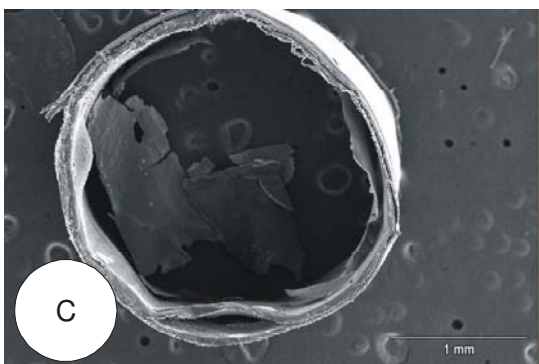
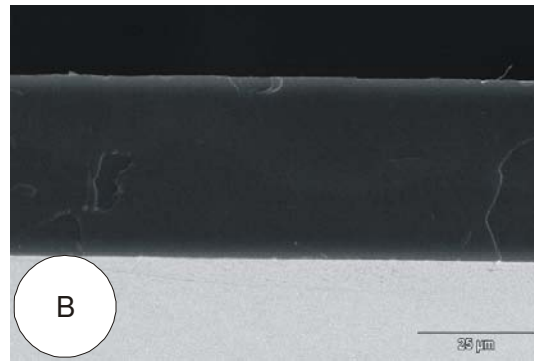
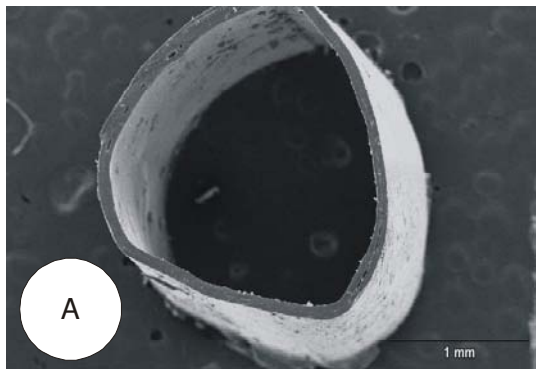
Analisando as micrografias obtidas por MEV é possível observar a degradação da membrana com o tempo de degradação *in vitro*, **Figura 15**. Verifica-se que a morfologia do PLDLA, antes da degradação, é densa e lisa tanto na superfície superior quanto na superfície de fratura, com total ausência de poros, totalmente compacta **Figura 15 (A, B)**. Com apenas 2 semanas de degradação é verificado a presença de alguns poros dispersos na superfície da membrana, **Figura 15 (C)**. A superfície de fratura também apresentou alguns poros, porém em menor quantidade **Figura 15 (D)**. Esse aspecto se manteve até 8 semanas de degradação. A partir da 16^ª semana de degradação, verifica-se nítido aumento da quantidade de poros na superfície da fratura **Figura 15 (J)** e trincas e rachaduras na superfície **Figura 15 (I)**. Após 18 semanas de degradação o material apresentou-se completamente degradado, **Figura 15 (K)**, impossibilitando a fratura do material. Após 20

semanas **Figura 15 (L)**, verifica-se que o processo de degradação é mais intenso comparado com o tempo de 18 semanas.

Um estudo mais detalhado sobre a degradação do PLLA, descrito por VERT et al., (1991), mostrou que o polímero se degrada de forma heterogênea, sendo mais rápido nos domínios amorfos do que nos cristalinos e mais rápido no interior do que na superfície, devido a uma auto-catálise ácida. O entendimento da degradação preferencial no interior é baseado no estudo *in vitro*, mimetizando o meio fisiológico. O polímero é imerso em um meio aquoso, onde ocorre a absorção de água e inicia-se a clivagem hidrolítica das ligações ésteres, ocasionando uma diminuição da massa molar. No início, a degradação é mais rápida na superfície do que no centro, devido ao gradiente de absorção de água. Os produtos da degradação são formados tanto na superfície quanto no centro, mas aqueles localizados perto da superfície dissolvem-se mais facilmente no meio, pois os localizados no interior devem difundir-se através da massa. Logo, a concentração de grupamentos carboxílicos ácidos aumenta muito mais no interior do que na superfície, catalisando a degradação [Middleton et al., 2000].

A **Figura 16** mostra as micrografias do PLDLA obtidas a partir dos tubos submetidos aos implantes, em função do tempo de degradação. Antes da degradação, as amostras apresentaram uma morfologia densa, ausência de poros e uma superfície de fratura lisa, como no caso do estudo *in vitro* **Figura 15 (B)**. Verifica-se nitidamente a integridade do tubo, **Figura 16(A)**. Após 4 semanas de implante observa-se o início do processo de degradação, com presença de um esfoliamento em camadas, **Figura 16 (C)**, e grande quantidade de poros na superfície de fratura **Figura 16 (D)**, evidenciando a degradação do material o que se acentua após 8 e 12 semanas **Figura 16(E, F, G, H)**. Embora após 16 semanas de degradação **Figura 16 (J)**, aparentemente, não apresenta uma nítida degradação, é necessário salientar que a micrografia refere-se à região da superfície da fratura da parede do tubo. Por outro lado, se avaliarmos as **Figuras 16(C,E,G,I,K)**, verifica-se que os tubos se fragmentaram e esfoliaram.

O aumento da porosidade está diretamente relacionado ao tempo de degradação dos implantes. Essa técnica permitiu um melhor acompanhamento do processo de degradação das membranas, que é caracterizado pelo aparecimento de fraturas e poros no polímero.



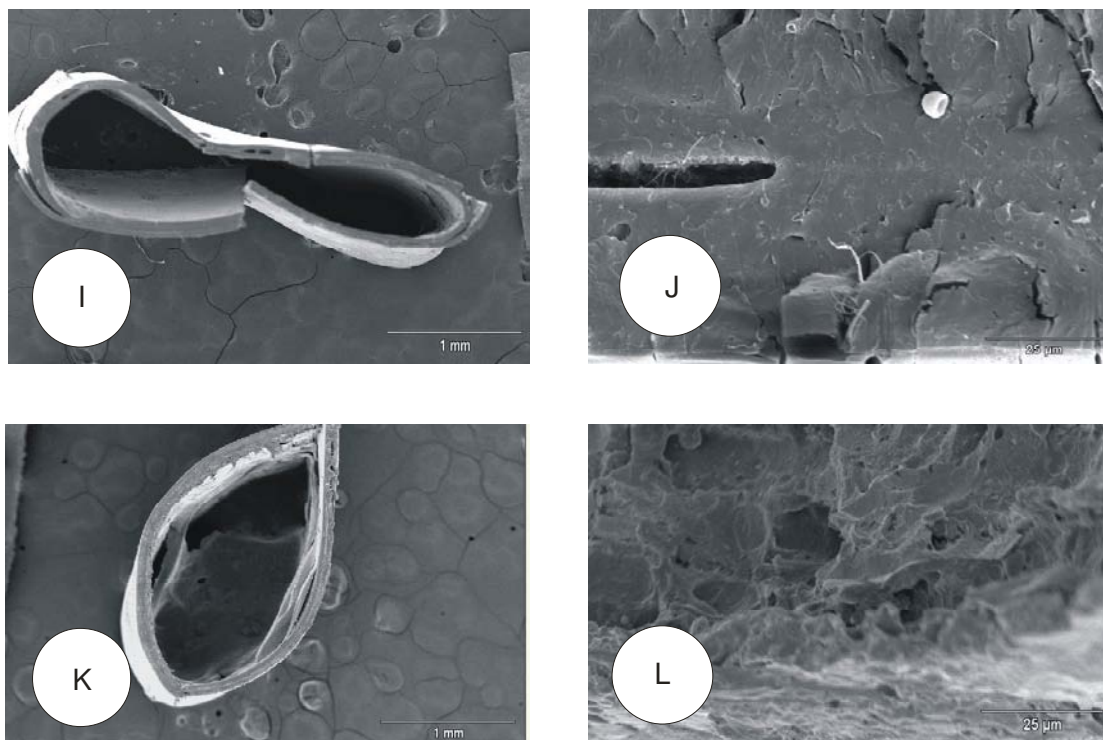


Figura 16. Micrografias eletrônicas de varredura de tubos PLDLA em função do tempo de degradação *in vivo*. Foram analisadas cortes transversais (coluna da esquerda) e superfície da fratura (coluna da direita) nos períodos de 0 (a; b), 4 (c; d), 8 (e; f), 12 (g; h), 16 (i; j), e 20 semanas (k; l).

A degradação *in vivo* ocorre devido a uma sucessão de eventos, expostos aos fluidos aquosos do corpo inicialmente o material sofre uma hidratação. Com a presença das moléculas de água, o processo de degradação dá-se através da hidrólise das ligações ésteres, originando os oligômeros (ou monômeros) solúveis e não tóxicos. A degradação prossegue por um processo biologicamente ativo (por enzimas) ou por clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de massa, diminuição da massa molar ponderal média e pela perda das suas propriedades mecânicas, como a resistência à tração [Barbanti, 2004].

Os resultados obtidos pó MEV estão de acordo com os dados de DSC, GPC e TGA, sendo que as amostras *in vivo*, inicialmente degradam mais rapidamente que as amostras *in vitro*.

4.1.7. Estudo Macroscópico *in vivo*

Macroscopicamente, pode-se afirmar que os tubos de PLDLA, após o período de 8 e 12 semanas, não apresentaram resposta inflamatória local, mostrando assim uma ótima biocompatibilidade do copolímero, já que a biocompatibilidade dos tubos é fortemente influenciada pelo comportamento de degradação do polímero [Lam *et al*, 1994].

Durante a retirada e preparação do material dos explantes para as análises histológicas pode-se notar que as membranas estavam aderidas ao tecido adjacente. No entanto, com maior tempo de implante, a aderência do polímero ao tecido tornou-se maior. Outro aspecto positivo encontrado foi o não colapamento e nem descolamento das camadas constituintes, além de, apresentar uma superfície interna uniforme, durante os períodos de 4 a 20 semanas de tubulização.

Foi observado macroscopicamente, o nervo regenerado após a sua transecção (seta) e seus cotos proximal e distal (**Figura 17**).

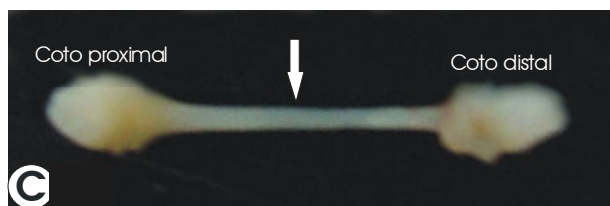


Figura 17. Nervo ciático retirado da prótese tubular após o período de sobrevivência do animal.

4.1.8. Microscopia óptica (MO)

Através das fotomicrografias obtidas por MO, foi possível observar a regeneração do nervo após o período de 4, 8, 12, 16 e 20 semanas, indicados pela presença de epineuro, perineuro vascularizado, células perineurais em torno de axônios mielínicos e amielínicos, de acordo com **Figura 18**.

A presença de vasos sanguíneos, observada nessas amostras sugere um primeiro passo para a neovascularização, possibilitando a regeneração do tecido lesado e a perfeita integração do polímero ao sítio de implantação **Figura 18(A1,B1,B2,C1,C2)**. Com 4

semanas já era possível observar a presença de axônios mielínicos regenerados (**Figura 18 (A2,B2,C2,D2,E2)**) delimitados por células perineurais (**Figura 18(A2,C2)**).

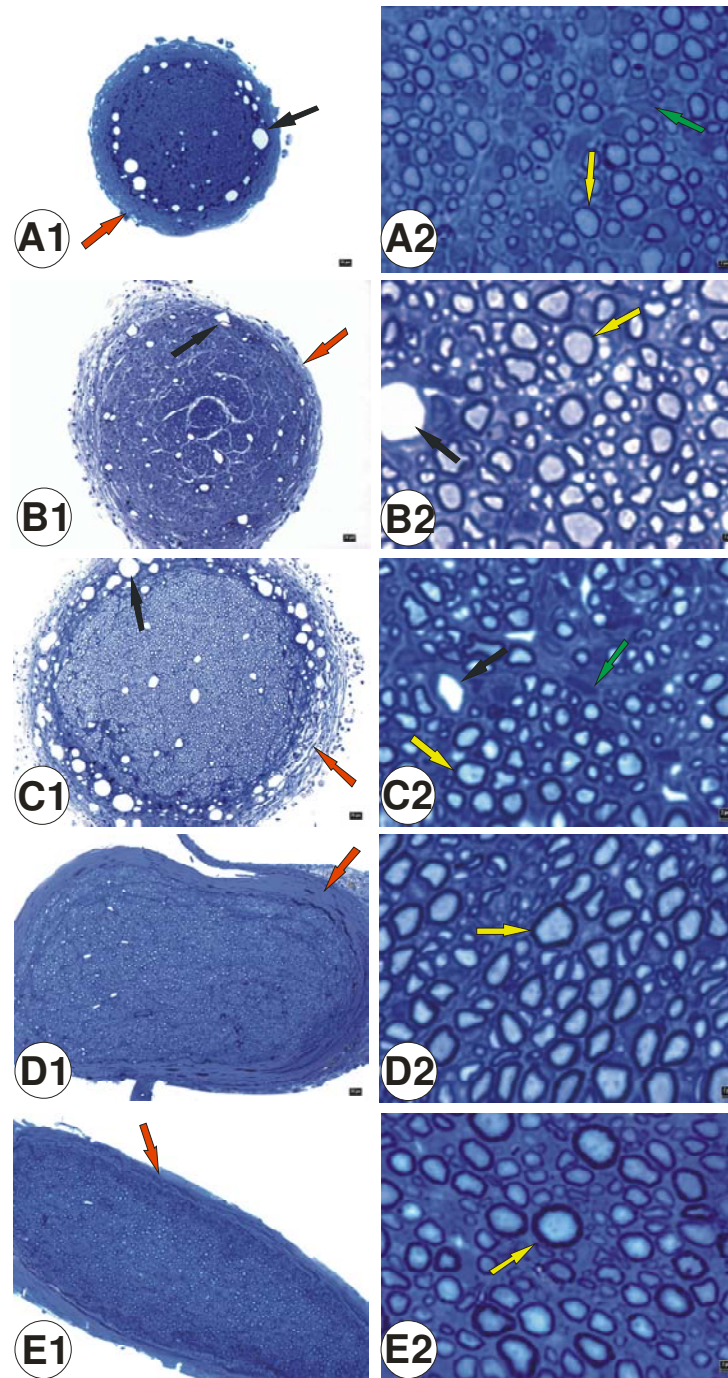


Figura 18. Vista dos nervos ciáticos regenerados após tubulização. (A1) no interior do tubo de PLDLA , 4 semanas após o implante. (B1) após o período de 8 semanas. (C1) após 12 semanas; (D1 e E1) após o período de 16 e 20 semanas de tubulização respectivamente; escala= 20 μ m. A espessura do epineuro do nervo regenerado (seta vermelha) Em maior aumento os respectivos nervos regenerados no interior da prótese tubular (A2, B2, C2, D2 e E2). Vasos sanguíneos epineurais e endoneurais (setas pretas), o número de axônios mielínicos regenerados (seta amarela) delimitados por células perineurais (seta verde); escala= 2 μ m.

Observou-se uma maior área do nervo regenerado em relação ao tempo de sobrevivência do animal **Figura 18 (C1, D1 e E1)**. Foi notada também uma crescente vascularização da região do implante para períodos de implante maiores que 12 semanas (**Figura 18 (B1,B2,C1,C2)**). Axônios mielínicos regenerados (**Figura 18(A2,B2,C2,D2,E2)**) delimitados por células perineurais (**Figura 18 (A2,C2)**), mostra a presença de epineuro **Figura 18(A1,B1,C1,D1,E1)**.

Embora o implante de polímeros, por si só, desenvolva uma resposta inflamatória local [Lam, 1995], não foram detectadas alterações que indicassem reação inflamatória secundária. Além disso, as membranas propiciaram proteção contra agentes estranhos e traumatismos.

De acordo com Evans *et al.*, (1999), foi possível observar o aumento da quantidade de axônios na 16ª semana de implante de PLLA poroso, porém tem uma limitação devido ao alto tempo de degradação do material.

O processo de cicatrização foi rápido e nenhuma alteração foi observada em relação ao comportamento dos animais. Não foi observado macroscopicamente nenhum processo inflamatório severo, como edema, hiperemia, necrose.

Kakinoki *et al.*, (1997) cita a importância da utilização de materiais biodegradáveis em relação aos tubos de silicone, onde os mesmos precisam de uma segunda intervenção cirúrgica, pois a permanência do tubo de silicone no organismo pode afetar os movimentos das articulações e induzir a inflamação do líquido sinovial.

Capítulo 5

Conclusão

O estudo *in vitro* mostrou que o processo de degradação do PLDLA ocorre a partir da 8ª semana, com variações nas propriedades térmicas, mecânicas e morfológicas.

O estudo *in vivo* mostrou que não houve o desenvolvimento de resposta inflamatória exacerbada, indicando a biocompatibilidade do PLDLA e o tubo de PLDLA evita a compressão sobre nervo, isolando o local da lesão, orientando a reorganização das fibras e possibilitando assim a regeneração do nervo ciático.

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

Aldini, N.N., Perego, G., Cella, G.D., Maltarello, M.C., Fini, M., Rocca, M. and Giardino, R. Effectiveness of a bioabsorbable conduit in the repair of peripheral nerves. *Biomaterials*, v.17, pp.959-962, 1996.

An, Y.H., Woolf, S.K. & Friedman, R.J. *Biomaterials*, v.21, pp.2635-2652, 2000.

Andrew, S.D., Phill, G.C., Marra, K.G. The influence of polymer blend compositions on the degradation of polymer/hydroxyapatite biomaterials. *J. Mater Sci: Mater Med*, v.12, pp.673-7, 2001.

Athanasiou, K.A., Agrawal, C.E., Barber, F. A., Burkhart, S.S. Orthopaedic applications for PLA-PGA biodegradable polymer. *Arthrosc: J Arthrosc Relat Surg.*, v.14,(7), pp.726-37,1998.

Baraúna, G.S., Duarte, M.A.T., Duek, E.A.R., Pierucci, A., Oliveira, A. Estudo da degradação *in vivo* de poli(L-ácido láctico-co-D,L-ácido láctico). *Revista Matéria*, v.12,pp.298-306, 2007.

Barbanti, S.H., Zavaglia, C.A.C., Duek, A.R. Polímeros biorreabsorvíveis na engenharia de tecidos. *Polimeros*, v.15,pp., 2004.

Barber, F.A. *Resorbable fixation devices: a product guide Orthopedic*. Special Edition, 4.ed., pp.1111-17,1998

Barnes, D.M. What makes nerves regenerate? Many experimental strategies revolve around a central issue: What conditions promote regeneration and functional recovery in mammalian nerves? *Science*, v.230, pp.1024-1025, 1985.

Bergsma, J.E., Bruijn, W.C., Rozema, F.R., Bos, R.R., Boering, G. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials*, v. 16, pp. 25-31, 1995.

Bessho, K., Iizuka, T., Murakami, K. A bioabsorbable poly-L-lactide miniplate and screw system for osteosynthesis in oral and maxillofacial surgery. *Journal Oral Maxillofac Surg*, v. 55, pp. 941, 1997.

Beuche, W., Fried, R.L. The role of non-resident cells in Wallerian degeneration. *J. Neurocytol.*, v.13, pp.767-796,1984.

Bloch, J., Fine, E.G., Bouche, N., Zurn, A.D., Aebischer, P. Nerve growth factor and neurotrophin-3 releasing guidance channels promote regeneration of the transected rat dorsal root. *Experimental Neurology*, v.172, pp.425-432, 2001.

Böstman, O.M. Current concepts review absorbable implants for the fixation fractures. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.73, pp.148-153, 1991.

Bruck, W. The role of macrophages in Wallerian degeneration. *Brain Pathol.* v.7, pp. 741-752, 1997.

Bruck, W., Bruck, C., Marushak, B., and Fried, R.L. Mechanisms of macrophage recruitment in Wallerian degeneration. *Acta Neuropathol.*, v. 89, pp. 363-367, 1995.

Brunelli, G.A., Vigasi, A., Brunelli, G.R. Different conduits in peripheral nerve surgery. *Microsurgery*, v.15, pp.176-8, 1994.

Canevarolo Jr., S.V. Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros.. *Artliber Editora*, São Paulo, 2002.

Chandra, R., Rustgi, R. Biodegradable polymers. *Prog. Polym. Sci.*, London, v.23, pp.1273-1335, 1998.

Chen, Z.Y., Chai, Y.F., Cao, L. *et al.* Glial cell line derived neurotrophic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rat. *Brain Research*, v.902, (2), pp.272-276, 2001.

Cheng, C., Zochodne, W. In vivo proliferation, migration and phenotypic changes of Schwann cells in the presence of myelinated fibers. *Neuroscience*, v.115, (1), pp.321-329, 2002.

Chu, C. C. Biodegradable Polymeric Biomaterials: an Update Overview, in: *The Biomedical Engineering Handbook*, cap. 41, Bronzino, J. D. (ed.), CRC Press, 1999.

Chu, C.C. A comparison of the effect of pH on the absorbable sutures. *Arch Surg.*,v. 195, p.55-59,1982.

Claes, L.E., Ignatius, A.A., Rehm, K.E. and Scholz, C. New bioresorbable pin for the reduction of small bony fragments: design, mechanical properties and in vitro degradation. *Biomaterials*,v.17, pp.1621, 1996.

Da-Silva, C.F., Da Gama, S.A.M., Júnior, R.M., Pereira, F.C. Influence of highly purified of hyaluronic acid on peripheral nerve regeneration in vivo. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, v.20, (2), pp.121-124, 2003.

Diener, T., Hensel, B. Biodegradable Drug Depots on Coronary Stents –Local Drug Delivery in Interventional Cardiology. *Progress Biomedical Research*, v. 8, (2), pp.82-91, 2003.

Duek, E. A. R., Zavaglia, C. A. C., Belangero, W. D., *In vitro* study of poly(lactic acid) pin degradation. *Polymer*, v. 40, pp. 6465-6473, 1999.

Ekholm, M., Helander, P., Hietanen, J., Lindqvist, C., Salo, A., Kellomaki, M., Suuronen, R. A histological and immunohistochemical study of tissue reactions to solid poly(ortho ester) in rabbits. *Int. J. Oral Maxillofac*, in press, 2006.

Eppley, B. L. Resorbable plate and screw fixation in pediatric craniofacial surgery, operative techniques in plastics and reconstructive surgery. *Plastic & Reconstructive Surgery*, v. 9, (1), pp.36-45, 2003.

Evans, G.R., Brandt, K., Katz, S., Chauvin, P., Otto, L., Bogle, M., Wang, B., Meszlenyi R.K., Lu, L., Mikos, A.G., Patrick, C.W. Jr. Bioactive poly(L-lactic acid) conduits seeded with Schwann cells for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, v. 23, pp.841-848, 2002.

Evans, G.R., Brandt, K., Widmer, M.S., Lu, L., Meszlenyi R.K., Gupta P.K., Mikos, A.G., Hodges, J., Willians, J., Gurlek, A., Nabawi, A., Lohma, R., Patrick C.W.Jr. In vivo evaluation of poly(L-lactic acid) porous conduits for peripheral nerve regeneration. *Biomaterials*, v.20, pp.1109-1115, 1999.

Fields, R.D., Le Beau, J.M., Longo, F.M. *et al.* Nerve regeneration through artificial tubular implants. *Progress in Neurology*, v.33, pp. 87-134, 1989.

Garbay, B., Heape, A.M., Sargueil, F., Cassgne, C. Myelin Systesis in the peripheral nervous system. *Progress in Neurobiology*, v.61, pp.267-304, 2000.

Gollwitzer, H., Ibrahim, K., Meyer, H., Mittelmeier, W., Bush, R., Stemberger, A. Antibacterial poly(D,L-lactic acid) coating of medical implants using a biodegradable drug delivery technology. *J Antimicrob Chemother*, v.51, pp.585-91, 2003.

Guth, L. Regeneration in the ammalian peripheral nervous system. *Peripheral Nervous system regeneration*, v.36, pp.441-478, 1956.

Hentz, V.R., Rosen, J.M., Xiao, S.J., McGill, K.C., Abraham, G. A comparison of suture and tubulization nerve repair technique in a primate. *J Hand Surg Am.*, v.16, pp. 251-61, 1991.

Holland, S.J. and Yasin, M. Polymers for biodegradable medical devices. 1. The potential of polyesters as controlled macromolecular release systems. *J. Controlled Rel.*, v.4, pp.155-180, 1986.

Hollinger, J.O. and Battistone, G.C. Biodegradable bone repair materials – synthetic polymers and ceramics. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.207, pp. 291-305, 1986.

Ide, C. Peripheral nerve regeneration. *Neuroscience Research*, v.25, (2), pp. 101-121, 1996.

Jalil, R., Nixon, J.R. Biodegradable poly(lactic acid) and poly(lactide-co-glycolide) microcapsules: problems associated with preparation techniques and release properties. *J. Microencapsulation*, v.7, pp.297-325, 1990.

Janecka, I.P., Sem, C.N., Sekhar, L.N., Arriaga, M. Facial translocation: a new approach to the cranial base. *Otolaryngol Head Neck Surg.*, v.103, pp.413-9, 1990.

Kakinoki, R., Nishijima, N., Ueba, Y., Oka, M., Yamamuro, T., Nakamura, T. Nerve regeneration over a 25 mm gap in rat sciatic nerves using tubes containing blood vessels: the possibility of clinical application. *International Orthopaedics.*, v.21, pp.332-336, 1997.

Kiyotani, T., Teramachi, M., Takimoto, Y., Nakamura, T., Shimizu, Y., Endo, K. Nerve regeneration across a 25-mm gap bridged by a polyglycolic acid-collagen tube: a histological and electrophysiological evaluation of regenerated nerves. *Brain Research*, v. 740, pp.66-74, 1996.

Kopecek, J. and Ulbrich, K. Biodegradation on biomedical polymers. *Prog.Polym. Sci.*, v.9, pp.1-58, 1983.

Lam, K.H., Nieuwenhuis, P., Molenaar, I., Esselbrugge, H., Feijen, J., Dijkstra, P.J. e Schakeraad, J.M. Biodegradation of porous versus non porous poly(L-lactic acid) films. *Journal of Biomedical Materials Research: Materials in medicine*, v.5, pp.181-189, 1994.

Lewis, D.H. Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymers in Biodegradable Polymers as drug Delivery systems (M. Chasin and R.Langer, eds.), Marcel Decker, New York, Chapter 1, 1990.

Lindhardt, R. Biodegradable Polymers for Controlled Release of Drugs, Springer-Verlag, New York, Chapter, 1988.

Luciano, R.M. Síntese, caracterização e degradação de membranas de poli(ácido-lático), um polímero biorreabsorvível, Dissertação de Mestrado, Faculdade Engenharia Mecânica, Unicamp, Campinas, São Paulo, 1997.

Lundborg, G. Peripheral nerve injuries: Pathophysiology and strategies for treatment. *Journal of Hand Therapy*, v.6, (3), pp. 179-188, 1993.

Lundborg, G., Rosen, L., Dahlin, L., Holmberg, J., Rosen, I. Tubular repair of the median or ulnar nerve in the human forearm: a 5-year follow-up. *J. Hand Surg.*, v.29, pp.100-107, 2004.

Lunn, E.R., Brown, M.C., Perry, V.H. The pattern of axonal degeneration in the peripheral nervous system varies with different types of lesion. *Neuroscience*, v.35, (1), pp.157-165, 1990.

Mackinnon, S.E. and Dellon, A. L. Clinical nerve reconstruction with a bioabsorbable polyglycolic acid tube. *Plast. Reconstr. Surg.*, v.85, pp. 419-424, 1990.

Macropore Resorbable Technology: An Overview, Scientific Data series in Resorbable Fixation. Disponível em :http://www.macropore.com/pdf/Resorb_Overview.pdf. acesso em: abril, 2006.

Madison, R., da Silva, C.F., Dikkes, P., Chiu T.H., Sidman R.L. Increased rate of peripheral nerve regeneration using bioreabsorbable nerves guides and a laminin-containing gel. *Exp. Neurol.*, v. 88, pp.767-772, 1985.

Middleton, J.C., Tipton, Arthur, J. Synthetic Biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, v. 21, pp. 2335-2346, 2000.

Motta, A.C. Síntese e caracterização do Poli(L-acido lactico)- PLLA e Poli(L-acido lactico-co- acido glicolico)- PLGA e estudo da degradação "in vitro". Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2002, Tese (Mestrado).

Muller, H., Dombert, T., Terzis, J., Arnold, H. Axonal growth on laminin containing substrats. *Microsurgery*,v.14, pp.33, 1993.

Nijenhuis, A.J., Grijpma, D.W. and Pennings, A.J. Highly crystalline as-polymerized poly(L-lactide). *Polymer Bulletin*, v.26, pp.71-77, 1991.

Oliveira, A. L., Pierucci, A., Pereira, K.B. Peripheral nerve regeneration through the nerve tubulization technique. *Braz. J. Morphol. Sci.*, v.21,(4), pp.225-231, 2004.

Peltoniemi, H., Asbammakhi, N., Kontio, R., Waris, T., Salo, A., Lindqvist, C., Gratz, K., Suuronen, R. The use of bioabsorbable osteofixation devices in craniomaxillofacial surgery. *Oral surgery,oral medicine, oral pathology*, v.94, (1), 2002.

Pezzin, A. P. T., Alberta van ekenstein, G.O.R., and Duek, E. A. R. Melt behavior, crystallinity and morphology of poly(p-dioxanone) (PPD). *Polymer*. Inglaterra: v.42, pp.8303 - 8306, 2001.

Pezzin, A. P. T. Obtenção e caracterização de blendas de poli(dioxanona)/poli(L-acido láctico) (PPD/PLLA) para aplicação como prótese de menisco biorreabsorvível. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2001. Tese (Doutorado) .

Pierucci, A., Faria, A.M., Pimentel, E.R., Santos Jr., A.R., Oliveira, A.L.R. Effects of aggrecan on Schwann cell migration in vitro and nerve regeneration *in vivo*. *Braz. J. Morphol. Sci.*, v.21, pp.65-71, 2004.

Pietrzak, W.S., Sarver, D., Verstynen, M. Bioabsorbable implants – practical considerations. *Biomaterials*, v.19, pp.109-119, 1996.

Raghuvanshi, R.S., Singh, M., Talwar, G.P. Biodegradable delivery system for single step immunization with tetanus toxoid. *Int J Pharm*, v. 93, pp.1-5, 1993.

Rezwan, K., Chen, Q.Z., Blaker, J.J., Boccaccin, A. R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*, v. 27, pp.3413–3431, 2006.

Rodriguez, F.J., Verdu, E., Ceballos, D., Navarro, X. Nerve guides seeded with autologous Schwann cells improve nerve regeneration. *Experimental neurology*, v.161, pp.571-584, 2000.

Rokkanen, P., Bostman, O., Vainionpaa, S., Makela, E. A., Hirvensalo, E., Partio, E.K., Vihtonen, K., Patiala, H., Tormala, P. Absorbable devices in the fixation of fractures. *Journal Trauma*, v. 40, pp. 123, 1996.

Schmidmaier, G., Wildemann, B., Stemberger, A., Hass, N.P., Raschke, M. Biodegradable poly(D,L-lactide) coating of implants for continuous release of growth factors. *J. Biomed Mater Res*, v.58, pp.449-55, 2001.

Standard Test Method for Tensile Properties of thin Plastic Sheeting, D882-02, US, 2002.

Stoll,G., Jander,S., Myers, R. Degeneration and regeneration of the peripheral nervous system: From Augustus Waller’s observations to neuroinflammation. *Journal of the Nervous System*, v.7, (1), pp.13, 2002.

Suganuma J., Alexander H. Biological response of intramedullary bone to poly (l-lactid acid). *J.Appl. Biomater*, v. 4, pp.13-27, 1993.

Sunderland, S.S. The Anatomy and Physiology of nerve injury. *Muscle & Nerve*, v.13, pp.771-784, 1990.

Sung, H-J., Meredith, C., Johnson, C., Galis, Z.S. The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis. *Biomaterials*, v.25, pp.5735-5742, 2004.

Terenghi, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. *J.Anat.*, v.194, pp.1-14, 1999.

Therin, M., Christel, P., Garreau, H., Vert, M. In vitro degradation of massive poly (alpha hydroxy acids): validation of in vitro findings. *Biomaterials*, v. 13, pp.594-600, 1992.

Tong, X., Hirai, K., Shimada, H., Mizutani, Y., Izumi, T., Toda, N., and Yu, P. Sciatic nerve regeneration navigated by laminin-fibronectin double coated biodegradable collagen grafts in rats. *Brain Res.*, v.663, pp.155-162, 1994.

Tsuji, H. and Ikada, Y. Stereocomplex formation between poly(lactic acid)s XI.Mechanical properties and morphology of solution-cast films. *Polymer*, v.40, pp.6699-6708, 1999.

Tsuji,H., Horii, F., Hyon, S.H. and Ikada, , Y. Stereocomplex formation between enantiomeric poly(lactic acid)s. 2. Stereocomplex formation in concentrated solutions. *Macromolecules*, v.24, (10), pp. 2719-2724, 1991.

Vert, M., Schawarch, G., Coudane, J. Present and future of PLA polymers. *J. Macromol. Sci., Pure Appl. Chem.*, A32, pp. 787, 1995.

Vert, M., Li, S.M., Spenlehauer, G. and Guerin, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *J. Mater. Sci. Mater. Med*, v.3, pp.432-446, 1992.

Yang, S., Leong, K.F., Du, Z., Chua, C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng.*,v.7, pp.679-89, 2001.

Yannas, I.V., Hill, B.J. Selection of biomaterials for peripheral nerve regeneration using data from the nerve chamber model. *Biomaterials*, v.25, pp.1593-1600, 2004.

Wen, X., Tresco, P.A. Fabrication and characterization of permeable degradable poly(DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) hollow fiber phase inversion membranes for use as nerve tract guidance channels. *Biomaterials*, *In press*, 2006.

Willians, D.F. (ed), Definitions in Biomaterials – Progress in Biomedical Engineering, *Elsevier*, v.4, Cap.1, 1987.

Wise, D.L., Fellmann, T.D., Danderson, J.E. and Wenworth, R.L. In: *Drug Carriers in Biology and Medicine*, G. Gregoriadis, Ed., Academic Press, London, pp.237, 1979.

Zochodne, D.W. The microenvironment of injured and regenerating peripheral nerves. *Muscle & Nerve*. Supplement 9, pp.S33-S38, 2000.

Anexos

ANEXO I – Tabela de DSC (1º aquecimento) para membranas em função ao tempo de degradação *in vitro*

Membrana PLDLA	Tg (°C)
0	59
2	61
4	60
8	62
16	58
18	49
20	-

ANEXO II – Tabela de DSC (1º aquecimento) para membranas em função ao tempo de degradação *in vivo*

Tubos de PLDLA (semanas)	Tg (°C)	Tm (°C)	ΔH_m (J/g)	Tc (°C)	ΔH_c (J/g)
0	59	-	-	-	-
4	55	-	-	-	-
8	57	-	-	-	-
12	68	173	50	103	26
16	57	-	-	-	-
20	57	-	-	-	-