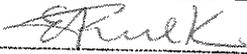


ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR Rubens Monteiro
Luciano E APROVADA PELA
COMISSÃO JULGADORA EM 29/08/97.


ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

Síntese, Caracterização e Degradação de Membranas de Poli(ácido-lático), um Polímero Bioabsorvível

Autor : **Rubens Monteiro Luciano**

Orientador: **Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek**

Co-orientador: **Prof. Dr. Carlos Kenichi Suzuki**

17/97

L963s

32473/BC

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Síntese, Caracterização e Degradação de Membranas de Poli(ácido-lático), um Polímero Bioabsorvível

Autor : **Rubens Monteiro Luciano**

Orientador: **Profa. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek**†

Co - Orientador: **Prof. Dr. Carlos Kenichi Suzuki**†

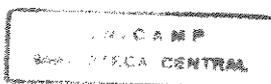
Curso: Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Dissertação de Mestrado apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Campinas, 1997

S.P. - Brasil



UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
T.	Unicamp
L963s	
V.	
E.	
T. Nº33 BC/	32473
PROC.	284/57
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	16/12/97
N.º CPD	

CM-00104049-7

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

L963s Luciano, Rubens Monteiro
Síntese, caracterização e degradação de membranas de poli(ácido-lático), um polímero bioabsorvível / Rubens Monteiro Luciano.--Campinas, SP: [s.n.], 1997.

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

1. Polímeros - Biodegradação.† 2. Implantes artificiais.†
3. Materiais biomédicos.† I. Duek, Eliana Ap. Rezende. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS**

Dissertação de Mestrado

**Síntese, Caracterização e Degradação
de Membranas de Poli(ácido-lático), um
Polímero Bioabsorvível**

Autor : **Rubens Monteiro Luciano**

Orientador: **Prof. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek**

Co-Orientador : **Prof. Dr. Carlos Kenichi Suzuki**



Prof. Dra. Eliana Aparecida de Rezende Duek, Presidente
Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia Mecânica



Prof. Dra. Célia Marina de Alvarenga Freire
Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Engenharia Mecânica



Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro
Universidade Estadual de Campinas - Instituto de Biologia

Campinas, 29 de agosto de 1996

Dedicatória:

Dedico este trabalho a perseverança de meus pais, Roberto e Iolanda, que sempre me apoiaram em todas as etapas difíceis;

Aos meus irmãos, Rafael e Luciana, sempre muito curiosos e prontos a ajudar;

E à Dra. Cintia, que sempre soube curar meus males .

Agradecimentos

Este trabalho não seria possível de ser realizado sem o apoio e colaboração de diversas pessoas, às quais presto meus sinceros agradecimentos:

À minha família, pelo incentivo em seguir a carreira acadêmica, mesmo sabendo que eu sempre precisaria de apoio financeiro;

À "Chefa", profa. Eliana Duek, que soube me guiar pelos meandros da linguagem científica com precisão e destreza;

Ao CNPq pelo apoio financeiro;

À profa. Cecília Zavaglia, sempre pronta a resolver aqueles "problemas insolúveis";

À profa. Maria do Carmo Alberto Rincon, minha ligação com o mundo das coisas vivas;

Às colegas Sônia e Ana Paula, sempre com conselhos úteis;

Ao colega Necésio Costa, sempre apto a discussões proveitosas;

Aos amigos do laboratório, Vanessa, José Augusto, Renato, Samuel, entre outros, sempre prontos a prestar ajuda e colaborar.

Aos amigos de sempre, Márcio, Régis, Maurício, Celso, Marcos, Carmo, Fernando, Alexandre, entre outros.

Aos funcionários do Depto; Rita, Claudia, Fábio, José Luiz, Emilcio, Daniel, Maria do Carmo, Sr. Laerte, que nas suas respectivas funções faziam tudo funcionar.

*" O essencial para a abelha como para o golfinho é existir.
Para o homem, é o saber e maravilhar-se ante este saber "*

Jacques Cousteau

Sumário

Capítulo 1 - Introdução

1.1 Considerações Gerais Sobre os Polímeros Bioabsorvíveis	1
1.2 Objetivos	2

Capítulo 2 - Revisão da Literatura

2.1 Biomateriais Poliméricos	3
2.2 Implantes Permanentes e Temporários	4
2.3 Os Polímeros Bioabsorvíveis	5
2.4 Aplicações dos Polímeros Bioabsorvíveis	10
2.4.1 Em Tecidos Ósseos	10
2.4.2 Em Tecidos Moles e Cartilagens	15

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1 Síntese das Membranas	21
3.2 Estudo <i>in vitro</i>	24
3.2.1 Preparação das Amostras	24
3.2.2 Ensaio de Tração	27
3.2.3 Análise via Microscopia Eletrônica de Varredura	29

3.2.4	Análise térmica via Calorimetria Diferencial de Varredura	30
3.2.5	Análise da variação da massa molar via Cromatografia por Permeação em Gel	30
3.3	Estudo <i>in vivo</i>	31
3.3.1	Obtenção dos Implantes	31
3.3.2	Animais	31
3.3.3	Procedimento Cirúrgico	32
3.3.4	Retirada das Amostras	33
3.3.5	Preparação das Amostras para Análise Histológica	33

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

4.1	Ensaio de Tração	34
4.2	Resultados do GPC	41
4.3	Resultados DSC	45
4.4	Caracterização Estrutural Através de Micrografias usando MEV	53
4.5	Resultados do ensaio <i>in vivo</i>	64
4.5.1	Análise macroscópica	64
4.5.2	Microscopia de Luz	65

Capítulo 5 - Conclusões

Capítulo 6 - Sugestões para próximos trabalhos

Referências Bibliográficas

Apendice 1 - Histórico da Pesquisa com Polímeros Absorvíveis

Lista de Figuras

Capítulo 2 - Revisão da Literatura

Figura 1 - Fórmula estrutural dos poli(α -hidróxi ácidos). PLA quando $R=CH_3$, e PGA quando $R=H$, p. 6

Figura 2 - Esquema simplificado da degradação metabólica de alguns polímeros biodegradáveis. [BÖSTMAN, 1991], p. 7

Capítulo 3- Materiais e Métodos

Figura 3- Molde para deposição da solução polímero-solvente para posterior secagem. Vista superior e vista em corte ampliada.p. 23

Figura 4 - Sistema de evaporação de solvente para secagem das membranas através de fluxo de ar seco.p. 24

Figura 5 - Formato e dimensões dos corpos de prova preparados segundo norma ASTM 1708/96 para os ensaios de tração. Quarenta corpos de prova foram preparados para cada um dos cinco tipos de membrana. p. 25

Figura 6: Esquema da divisão dos CP para os testes. p. 25

Figura 7 - Sistema para avaliação da degradação das membranas "in vitro". As amostras (corpos de prova) foram separadas em grupos de dez peças e unidas entre si através de um fio fino de nylon. A cada 10 dias um grupo era retirado e seguia para as análises.p.26

Figura 8 : Típico aspecto de uma curva obtida em um ensaio de tração e mostrando os pontos retirados para análise. E é o módulo de elasticidade.p. 29

Figura 9: Local onde os implantes foram inseridos e sua forma.p.32

Capítulo 4 - Resultados

Figura 10 Gráfico comparativo dos valores médios de tensão e respectivos desvios padrão obtidos para o limite de escoamento dos diferentes tipos de membranas e seus respectivos tempos de degradação in vitro. p. 35

Figura 11 - Gráfico comparativo dos valores médios de alongamento e respectivos desvios padrão obtidos para o limite de escoamento dos diferentes tipos de membranas para os tempos de degradação T=0, 10, 20 e 30 dias.p.36

Figura 12 A- Gráfico comparativo da evolução dos valores médios de módulo de elasticidade e respectivos desvios padrão obtidos para as membranas sem plastificante tipo 5% e tipo 10% em função do tempo de degradação. p.37

Figura 12B: Módulos de elasticidade e desvios padrão das membranas com plastificante, sem degradação. Observar que os valores são bem mais baixos do que os obtidos para as membranas sem plastificante. p.38

Figura 13 - Gráfico mostrando o decréscimo no valor de Mn em função do tempo de degradação *in vitro*. p.42

Figura 14 - Gráfico mostrando o decréscimo também de Mw com o avanço da degradação. p.42

Figura 15 - Gráfico mostrando a redução de Mw em função do tempo de degradação. p.43

Figura 16 - Polidispersividade (razão Mw/Mn) em função do tempo de degradação. p.43

Figura 17- Termogramas de membranas tipo 5% para os tempos de degradação T=0,10,20 e 30 dias. Observar que existe uma transição na curva entre 50 e 60 °C, indicando a Tg. Notar também o aumento da entalpia de fusão principalmente entre T=0 e T=10 dias e um pico endotérmico de fusão endotérmico entre 173 a 176 °C. p.46

Figura 18: Termogramas de membranas tipo 10% para os tempos de degradação T=0,10,20 e 30 dias. Novamente pode ser notado uma transição vítrea entre 49 e 55 °C, indicando a Tg e o aumento da entalpia de fusão entre T=0 e T=10 dias, além da Tm entre 172 e 176 °C . p. 46

Figura 19: Termogramas de membranas tipo 10%/10%P para os tempos de degradação T=0,10,20 e 30 dias. Notar o aumento na entalpia de fusão mais pronunciado do que nas membranas anteriores, sem plastificante. Uma transição vítrea, Tg, menos pronunciada, nítida apenas para T=10 dias a 52 °C , e Tm variando 157 a 173 °C.p.47

Figura 20: Termogramas de membranas tipo 10%P para os tempos de degradação T=0,10,20 e 30 dias. Notar o desaparecimento da transição vítrea. p.47.

Figura 21: Termogramas de membranas tipo 15%P para os tempos de degradação T=0,10,20 e 30 dias. Aqui também pode-se observar uma aumento na entalpia de fusão em função do tempo de degradação, mais pronunciada entre T=0 e T=10 dias. Tm na faixa de 156 a 168 °C. p.48

Figura 22: Variação dos valores de temperatura de transição vítrea para as membranas tipo 5% e 10% (as membranas com plastificante não apresentaram Tg acima de 0 °C). p.49

Figura 23: Variação da temperatura de fusão (Tm) em função do tempo de degradação para os cinco tipos de membranas. p. 49

Figura 24: Este gráfico compara o aumento do grau de cristalinidade para os cinco tipos de membrana em função do tempo de degradação *in vitro*. Observe que para os três tipos de membranas com adição de plastificante, o aumento é bem mais pronunciado. p.50

Figura 25: Micrografia eletrônica da superfície de fratura de uma membranas tipo 5% sem degradação, mostrando que a membrana é densa em seu interior.p.54

Figura 26: Micrografia eletrônica da superfície de fratura de uma membranas tipo 5% com trinta dias de degradação, mostrando formações arredondadas na superfície indicando esferulitos semi-formados e pequenos pontos brancos resultantes da erosão causada pela degradação.p.54

Figura 27: Micrografia eletrônica da superfície de fratura de uma membranas tipo 10% sem degradação, mostrando também que existem esferulitos semi-formados na superfície porém o interior da membrana mostra-se denso como a membrana 5%.p.55

Figura 28: Micrografia eletrônica da superfície de fratura de uma membranas tipo 10% com trinta dias de degradação, mostrando que o interior da membrana continua denso porém a região da fratura apresenta-se com microtrincas(tons brancos) causados pela degradação.p.55

Figura 29 :Micrografia eletrônica da superfície de uma membrana densa tipo 10% com trinta dias de degradação mostrando detalhes da forma dos semi-esferulitos. Notar os pontos de erosão devido a degradação nos quais a membrana começa a se romper.p.56

Figura 30 : Micrografia eletrônica da superfície de fratura de uma membrana tipo 10%/10%P, sem degradação, mostrando que a membrana na verdade é formada por um aglomerado de esferulitos e uma superfície mais densa. Notar os poros resultantes deste empilhamento de esferulitos.p.56

Figura 31 :Micrografia eletrônica da superfície inferior (lado 10%P) de uma membrana tipo 10%/10%P com dez dias de degradação mostrando a forma de aglomerado de esferulitos do qual é composta a membrana, formando uma rede porosa interconectada. p..57

Figura 32 -Micrografia eletrônica mostrando um detalhe da superfície de fratura de uma membrana 10%/10%P com 10 dias de degradação mostrando que os esferulitos que formam a membrana tem uma superfície rugosa e homogênea.p.57

Figura 33: Micrografia eletrônica da superfície de fratura de uma membrana tipo 10%/10%P após vinte dias de degradação *in vitro*. Notar que a parte superior encontra-se já bem erodida pela degradação.p.58

Figura 34: Micrografia eletrônica da superfície inferior (lado 10%P) de uma membrana tipo 10%/10%P após trinta dias de degradação *in vitro*. Nesse estágio de degradação os esferulitos já estão se separando, e a membrana está totalmente fragilizada. Notar que a membrana está se rompendo pela na região de contato entre os esferulitos, e não através do rompimento dos mesmos.

Figura 35: Micrografia eletrônica da superfície de uma membrana tipo 15%P, sem degradação, mostrando o aglomerado de esferulitos, presentes em todas as membranas com plastificante.p.59

Figura 36: Micrografia eletrônica da superfície de fratura de uma membrana tipo 15%P, sem degradação. As membranas com plastificante apresentaram sempre um mesmo tipo de estrutura, um aglomerado de esferulitos rugosos.p.59

Figura 37: Micrografia eletrônica de uma membrana tipo 15%P, sem degradação mostrando detalhes da superfície dos esferulitos, muito semelhante aos das outras membranas com plastificante.p.60

Figura 38: Micrografia eletrônica mostrando um detalhe da superfície de um esferulito de uma membrana tipo 15%P sem degradação. Observe a superfície porosa e rugosa, presente em todas as membranas em que foi adicionado plastificante. p.60

Figura 39: Micrografia eletrônica mostrando a superfície de uma membrana tipo 15%P com vinte dias de degradação. Notar que os esferulitos começam a trincar do centro para fora devido à degradação, até que se dividem totalmente (centro do foto). Este mesmo fenômeno foi observado por Carter, 1984.p.61

Figura 40: Micrografia eletrônica mostrando o aspecto geral do processo de degradação ocorrendo em toda a extensão de uma membrana tipo 15%P com trinta dias de degradação. Notar que a quase totalidade dos esferulitos apresentam trincas em seu centro.p.61

Figura 41: Micrografia eletrônica mostrando o aspecto das trincas no centro dos esferulitos de uma membrana tipo 15%P, com trinta dias de degradação.p.62

Figura 42 : Micrografia eletrônica de uma membrana tipo 10%P, com 30 dias de degradação. A morfologia é muito semelhante a da membrana 15%P, porém aparentemente os esferulitos apresentam um diâmetro médio menor.p.62

Figura 43 : Foto micrografia mostrando o corte histológico da região do implante de uma membrana do tipo 5%. Observar a cápsula fibrosa (setas), local onde a membrana estava inserida (*), leve reação inflamatória (RI) . p.65

Figura 44 : Foto micrografia mostrnado um detalhe da figura anterior, no local do implante. Notar a cápsula fibrosa (setas) com discreta reação inflamatória (RI). P.66

Figura 45 : Foto micrografia de um corte histológico da região do implante de uma membrana do tipo 10%. Observar a cápsula fibrosa (setas) envolvendo a membrana (*) deslocada de posição mas agora com as bordas visíveis.devidoà adesão de algumas células. P.66

Figura 46 - Foto Micrografia do corte histológico do local do implante da membrana tipo 10%/10%P. Observar a fragmentação da membrana (*) que se encontra em íntimo contato com o tecido hospedeiro. p.67

Figura 47 - Foto micrografia mostrando detalhe da figura anterior, revelando células gigantes de corpo estranho (seta) em contato direto com a membrana.p.67

Figura 48 - Foto micrografia do corte histológico do local de implante da membrana tipo 10%P, revelando-a totalmente fragmentada (setas) e invadida pelo tecido hospedeiro.p.68

Figura 49 - Foto micrografia mostrando detalhe da figura anterior. Notar célula gigante de corpo estranho(seta) e capilares (cabeça de seta). p.68

Figura 50 - Foto micrografia mostrando célula gigante de corpo estranho (seta) totalmente inserida entre esferulitos de uma membrana tipo 15%P.p.69

Tabela:

Tabela 1: Dados de propriedades mecânicas e grau de cristalinidade para membranas de PLLA puro, após tratamento térmico (Tsuyi, 1994):

Nomenclatura

Letras latinas

E - módulo de elasticidade	(MPa)
H_c - entalpia de cristalização	(J)
H_f - entalpia de fusão	(J)

$H_{f100\%}$ - entalpia de fusão do polímero 100% cristalino	(J)
p - probabilidade de igualdade entre médias	(x100 = porcentagem)
T - tempo	(dias)
T_g - temperatura de transição vítrea	(°C)
T_m - temperatura de fusão	(°C)
M_n - massa molar média numérica	
M_w - massa molar média em peso	
M_z - massa molar média viscosimétrica(GPC)	
M_v - massa molar média(viscosímetro)	

Letras gregas

ϵ - alongamento	(x 100 = %)
χ - grau de cristalinidade	(%)
σ - tensão	(MPa)
Δ - diferença	
ϵ_e - alongamento na σ_e	(x 100 = %)
σ_e - tensão no limite da zona elástica	(MPa)

Abreviaturas

ASTM	American Society for Testing Materials
CP	corpo de prova
DMA	Dynamic Mechanical Analiser
DSC	Calorimetria Diferencial de Varredura
GPC	Cromatografia por Permeação em Gel
GTR	Regeneração Guiada de Tecido
HE	Hematoxilina/Eosina
LVDT	Sensor de deslocamento por variação indutiva
MeCl	cloreto de metileno
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTS	Materials Test System
PDLLA	poli(D/L ácido láctico)
PEG	polietileno glicol
PGA	poli(ácido glicólico)
PLA	poli(ácido láctico)
PLA96	poli(96%L/ 4%D ácido láctico)
PLGA	poli(ácido láctico/glicólico)
PLLA	poli(L-ácido láctico)
PTFE	poli(tetrafluoretileno)
PVA	poli(álcool vinílico)

Resumo

LUCIANO, Rubens Monteiro, *Síntese, Caracterização e Degradação de Membranas de Poli(Ácido Lático), um Polímero Bioabsorvível, Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 1997. 105 p. Dissertação de Mestrado.*

Polímeros com função estrutural temporária para auxiliar na recuperação de tecidos vivos lesados vem se tornando uma área de pesquisa muito promissora. Um destes polímeros é o poli(ácido-lático) que pode ser utilizado sob a forma de membranas que funcionam como suporte para fixação e crescimento celular (derme artificial, lesões internas, transplante de células) ou como separação entre tecidos moles e tecidos ósseos em recuperação (regeneração guiada de tecido). Neste trabalho, cinco tipos diferentes de membranas, três com e duas sem plastificante foram sintetizadas. O objetivo foi correlacionar os parâmetros de síntese e composição das membranas com a biocompatibilidade, morfologia, propriedades físico-químicas e propriedades mecânicas iniciais e após períodos de degradação de até 30 dias através de ensaios *in vivo* e *in vitro*. Para os ensaios *in vivo*, discos foram implantados em 15 ratos e trinta dias depois retirados e realizada a análise histológica. Nos ensaios *in vitro*, as membranas foram imersas em solução tampão fosfato e o processo de degradação foi acompanhado de dez em dez dias até trinta dias. Pelos resultados obtidos podemos concluir que é possível controlar a velocidade de degradação através da adição de plastificante, sem que isso comprometa a biocompatibilidade do material. A adição do plastificante também modifica a membrana morfológicamente, tornado-a porosa. A porosidade contribui muito para a fixação e crescimento celular, porém torna a membrana bem mais frágil mecanicamente quando comparada com uma membrana sem poros. Com estes resultados podemos dividir as membranas em dois grupos com distintas aplicações: membranas densas, bioabsorvíveis, que não favorecem a invasão celular porém são biocompatíveis, indicadas para regeneração guiada de tecido e membranas porosas, também bioabsorvíveis, facilmente invadidas por células, indicadas para recuperação e recomposição de tecidos moles.

Palavras chave - poli(ácido - lático), membranas, bioabsorção, biomateriais, PLLA

Abstract

LUCIANO, Rubens Monteiro, *Synthesis, Characterisation and Degradation of Poly(lactic acid) Membranes, a Bioabsorbable Polymer*, Campinas: Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 1997. 105 p. Dissertação de Mestrado.

Poly(lactic acid) (PLA) can play a central role in corporeal devices. PLA membrane possess adequate biocompatibility, hydrolysis degradation and absorption which make them suitable for use as biomaterial. They can be used as cell ingrowth matrix or insulating layer between soft and hard tissue. It contributes to the tissue regeneration during convalescence. In this piece of work five types of PLA membrane were synthesised, some with plasticizer and others without it. Biocompatibility, morphology, physico-chemical and mechanical properties were evaluated using different synthesis parameters and chemical compositions. *In Vivo* and *in Vitro* tests were carried out to degrade the membranes. PLA discs were implanted in fifteen rats, after thirty days they were extracted out and histologically analysed. For the *In Vitro* tests, PLA membranes were immersed in a phosphate buffer solution and the degradation process was followed up during thirty days. The results showed that membranes with plasticizer present a good tissue adhesion and porous structure. The yield strength and Young's modulus for the membranes with plasticizer are smaller than the one without plasticizer. The results obtained permit to conclude that the degradation velocity of membranes can be controlled by the addition of plasticizer, and it does not affect the biocompatibility of them. The addition of plasticizer can influence the morphology by making the membrane more porous. The porosity can contribute for cell fixation and cell ingrowth, however the membranes with plasticizer are more fragile than the one without it. Concern to their application, PLA membranes can be classified into two groups:

- Dense bioabsorbable membranes, which does not contribute to the cell invasion that can be used as guide for tissue regeneration;
- Flexible and porous membranes that can be used as soft tissue recomposition and regeneration.

Keywords - poli(lactic acid), membranes, bioabsorbable, PLLA , biomaterial

Capítulo 1

Introdução

1.1 Considerações Gerais Sobre os Polímeros Bioabsorvíveis

A busca do homem por dispositivos que auxiliam na recuperação de ferimentos ou acelerem o processo de cicatrização é bem antiga. Há cerca de 4000 anos atrás, os egípcios já usavam o linho, um material polimérico natural, para suturas de ferimentos. Desde 600 A.C. os indianos usavam outras formas de polímeros naturais tais como o algodão, a crina de cavalo e o couro. Suturas realizadas com seda são utilizadas desde 200 D.C. [SHALABY et al., 1984].

No entanto, a principal dificuldade encontrada por estes antigos pesquisadores da área de biomateriais era conciliar as propriedades físico-químicas e mecânicas requeridas para a funcionalidade do implante com um nível aceitável de reação inflamatória, geralmente causada devido a moléculas solúveis ou íons liberados pelos materiais utilizados como implantes.

Até 1960, polímeros susceptíveis à degradação por hidrólise eram considerados uma descoberta desastrosa. Entretanto, com o avanço das pesquisas, esses materiais passaram a ter aplicação na área médica, principalmente devido às suas características de bioabsorção. Em 1966, Schulgens patenteou nos Estados Unidos o processo de síntese do poli(ácido-lático), também chamado de PLA, que, juntamente com o poli(ácido glicólico) - PGA, são polímeros sintetizados a partir de monômeros que fazem parte do metabolismo natural do organismo e sofrem degradação por hidrólise, ou seja, após um período em contato com um meio aquoso sofrem cisões em suas ligações ésteres formando CO_2 e H_2O .

Essas características os enquadra em uma nova classe de materiais para implantes: os implantes absorvíveis, que após implantados e cumprida sua função de auxílio estrutural são absorvidos pelo organismo hospedeiro.

Vários pesquisadores das áreas médica, biológica, química e engenharia tem estudado juntos os processos de reação biológica, perda de propriedades mecânicas e alterações das propriedades físico-químicas do PLA quando implantado.

Algumas das aplicações nas quais o PLA já vem sendo utilizado são como dispositivos para recuperação de fraturas, fios para sutura interna, liberação controlada de drogas, regeneração guiada de tecido e suporte para cultura de células.

1.2 Objetivos

Os objetivos deste trabalho são sintetizar e caracterizar membranas absorvíveis de poli(ácido lático) que podem ser utilizadas, por exemplo, como suporte para cultura de células, regeneração de epiderme e regeneração guiada de tecido.

Para isso, o trabalho foi desenvolvido em quatro etapas:

1. Síntese das membranas;
2. Caracterização através de:
 - micrografias eletrônicas através de M.E.V. (Microscopia eletrônica de varredura);
 - termogramas através de DSC (Calorimetria diferencial de varredura);
 - curvas de variação de massa molar através de GPC (Cromatografia por permeação em gel);
 - ensaios de tração (curvas tensão X deformação);
3. Estudo *in vivo* através de implantes;
4. Estudo *in vitro* através de degradação em tampão fosfato pH 7,4.

CAPÍTULO 2

Revisão da Literatura

2.1 Biomateriais Poliméricos

A pesquisa de materiais naturais ou sintéticos tem despertado grande interesse nos últimos anos visando aplicações nas áreas médica e odontológica. No que se refere aos polímeros verifica-se um vasto campo de aplicações. Os chamados polímeros de engenharia são aplicados na ortopedia (próteses internas e externas, órteses, dispositivos de fixação para consolidação óssea), em cardiologia (elementos de bombas de circulação extracorpórea, ventrículos artificiais, revestimentos de marca-passo implantáveis), na urologia (membranas de filtração de máquinas de hemodiálise), cirurgia vascular (próteses diversas) e liberação controlada de drogas. [PARK, 1979 ; HENCH, 1982]

O uso cada vez mais constante de materiais artificiais para restaurar partes do corpo humano tem exigido o desenvolvimento de tecnologias diferenciadas para fabricação de produtos que atendam às solicitações de materiais implantáveis. Até pouco tempo, o que vinha ocorrendo era a adaptação de materiais já consagrados em diversas aplicações para uso em organismos vivos. Essas adaptações não se dão sem problemas, e sua consolidação exige pesquisa e desenvolvimento intrinsecamente ligado à aplicação. Atualmente muitos pesquisadores tem buscado desenvolver materiais específicos para aplicações nas diversas áreas da medicina.[HENCH & ETHRIDGE, 1982; LANGER et al., 1990].

O uso de polímeros em organismos é acompanhado por algum tipo de interação polímero-célula. Basicamente os primeiros usos de polímeros *in vivo* foram em aplicações onde o polímero deveria permanecer inerte e os estudos eram focados no entendimento de como prevenir ou minimizar as interações indesejáveis. Embora esse aspecto continue sendo importante para uma variedade de aplicações, hoje a pesquisa de novos polímeros que interagem com células (provocando resposta fisiológica, como crescimento ou diferenciação) é um outro caminho em destaque.

MALMONGE, 1997, realizou estudos com hidrogéis sintéticos para obtenção de um biomaterial com características adequadas ao uso no reparo de defeitos da cartilagem articular. Para mimetizar a matriz extracelular da cartilagem hialina foram incorporados grupos negativos fixos a estrutura macromolecular do hidrogel. O hidrogel obtido não induziu reação inflamatória que inviabilizasse sua utilização, minimizou a ocorrência de reação sinovial e acelerou a reparação de defeitos provocados na cartilagem.

2.2 Implantes Permanentes e Temporários

Entre os diversos tipos de implantes e suas respectivas aplicações existem dois principais grupos: os implantes permanentes e os temporários.

Como permanentes podemos citar as próteses articulares, como juntas de joelho, ombro, cotovelo, punho, quadril, etc., exigindo materiais biocompatíveis resistentes à degradação e que devem sanar o defeito por tempo indeterminado. Esses implantes só são removidos se houver falha ou desgaste do material do implante ou se o paciente for jovem, em fase de crescimento, e necessitar de um implante de dimensões maiores. A complexidade dos movimentos e as elevadas cargas às quais as articulações são submetidas exigem materiais resistentes bem como um projeto apropriado das próteses.

Os implantes temporários têm como objetivo reparar um defeito até que o processo natural de recuperação do tecido lesado tenha se completado. Como exemplo podemos citar a redução de fraturas através de pinos e parafusos (que devem ser removidos após a recuperação do osso), suturas em geral, proteção para úlceras e queimaduras, sistemas de liberação controlada de drogas. São esses tipos de implantes a principal área de utilização dos polímeros absorvíveis.

2.3 Os Polímeros Bioabsorvíveis

De um modo geral, os processos de degradação de polímeros podem ser explicados por quatro mecanismos que podem ocorrer isoladamente ou em conjunto: solubilização, ionização, degradação catalisada por enzimas e degradação hidrolítica. [GILDING et al., 1981; HUANG et al., 1989]. Em sua grande maioria, os implantes temporários são obtidos com polímeros que sofrem degradação hidrolítica.

Moléculas biológicas naturais, como proteínas e celulose, são geralmente degradadas em sistemas biológicos por hidrólise seguida por oxidação. Não é surpresa que os polímeros sintéticos bioabsorvíveis contenham ligações hidrolizáveis ao longo de sua cadeia, como por exemplo, em grupos amida e éster, susceptíveis a biodegradação por microorganismos e enzimas hidrolíticas.

Os polímeros sintéticos degradáveis por enzimas devem possuir cadeias flexíveis o suficiente para facilitar o ataque dos sítios ativos pela enzima. Isso explica o fato de poliésteres alifáticos serem facilmente degradáveis por sistemas biológicos enquanto sistemas aromáticos rígidos como poli(etileno tereftalato) serem normalmente considerados bioinertes. [HUANG et al., 1989]

Os polímeros mais estudados são os poli(α -hidróxi ácidos): poli(L- ácido láctico) - PLA, o poli(ácido glicólico) - PGA, os copolímeros de PLA/PGA, a poli(para-dioxanona), a policaprolactona e o polihidróxi-butirato/valerato.

Estruturalmente, esses polímeros são poliésteres que sofrem degradação devido às cisões hidrolíticas nas ligações ésteres. Esses polímeros podem ser sintetizados via polimerização por

abertura do anel de diésteres cíclicos na presença de catalisadores [DITTRICH & SCHULZ, 1971]. A fórmula estrutural dos poli(α -hidróxi ácidos) é mostrada a seguir:

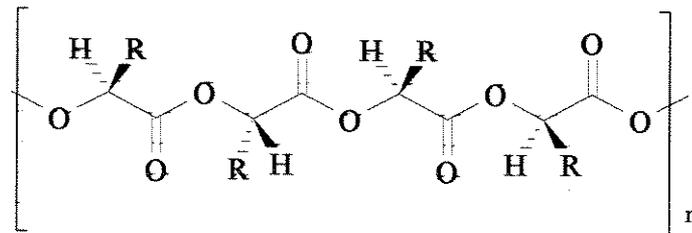


Figura 1 - Fórmula estrutural dos poli(α -hidróxi ácidos). PLA quando $R=CH_3$, e PGA quando $R=H$.

No caso do poli(ácido láctico) a quiralidade do carbono α permite sintetizar dois compostos enantiômeros, o poli(D - ácido láctico) - PDLA e o poli(L - ácido láctico) (PLLA).

Segundo DITTRICH & SCHULZ, 1971, esses materiais têm diferentes propriedades, como, por exemplo, suas velocidades de degradação, pois o grupo metila é responsável por dois efeitos na cinética de biodegradação: o aumento da hidroflicidade, e o impedimento estérico na reação de hidrólise. A cinética de hidrólise do PDLA tem sido verificada ser mais rápida do que em seu análogo, o PLLA [GILDING et al., 1981].

O processo de degradação, que tem sido investigado por vários autores, indica não ser homogêneo, e inicia-se nas regiões amorfas do material, devido a maior susceptibilidade de ataque dos fluidos orgânicos [LI² et al., 1990; PISTNER² et al., 1993; ALI et al., 1993].

Bergsma et al., 1995; avaliaram o efeito da cristalinidade entre membranas de poli(100% L -ácido láctico) e poli(96%L,4%D - ácido láctico) (PLA96). Pelas conclusões dos autores, a diferença, devido a inclusão de unidades de (D-ácido láctico) na estrutura polimérica, influencia na redução de possíveis reações inflamatórias aos tecidos com que o material interage.

VERT et al., 1984; afirmaram que o grau de cristalinidade determina a taxa de absorção de água do polímero, o que conseqüentemente irá influenciar na velocidade de degradação do material.

Um estudo realizado por BÖSTMAN, 1991, indicou uma excelente biocompatibilidade desses materiais, pois os produtos da biodegradação metabólica do poli(ácido lático), CO₂ e H₂O, são reabsorvidos pelo organismo. Neste caso, a degradação metabólica do PLA segue o processo de oxidação do ácido lático, que por sua vez é convertido em ácido pirúvico. Na presença da acetil coenzima A ocorrerá liberação de CO₂ e conseqüentemente a decomposição em citrato. Este citrato será então incorporado no ciclo dos ácidos tricarbóxicos, que por final eliminará novamente CO₂ e H₂O, conforme está representado na figura 2.

Degradação metabólica do PGA, PLA e poli(dioxanona)

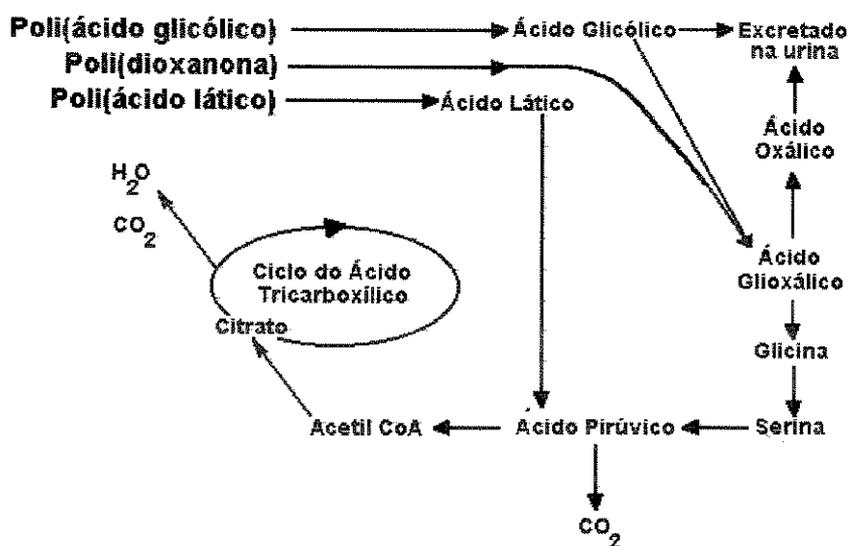


Figura 2 - Esquema simplificado da degradação metabólica de alguns polímeros biodegradáveis. [BÖSTMAN, 1991]

Existem várias técnicas para se acompanhar e quantificar a degradação e propriedades de polímeros absorvíveis. Vários autores realizaram trabalhos tratando da degradação dos

polímeros absorvíveis puros, reforçados e compósitos. Do ponto de vista biológico, analisa-se a resposta do tecido ao implante através da verificação da biocompatibilidade, formação de fibroses, reação inflamatória, edemas, etc. O apêndice 1 mostra um painel cronológico dos principais trabalhos publicados e resultados sobre o estudo da biocompatibilidade dos polímeros absorvíveis.

Os pesquisadores obtêm dispositivos do polímero para implantes variando morfologia, cristalinidade, composição dentre outros e analisam a influência desses parâmetros no processo de degradação do material após implante ou *in vitro*. Assim, acompanham as variações de cristalinidade (por ensaios de calorimetria diferencial de varredura - DSC e Difração de Raio-X, microscopia de luz polarizada), do peso molecular (por cromatografia de permeação em gel - GPC e medida de viscosidade), da morfologia (microscopia eletrônica de varredura - MEV, microscopia de luz) e das propriedades mecânicas (através de ensaios de flexão, compressão e tração).

A reação aos implantes pode ser estudada *in vitro* ou *in vivo*. A maior desvantagem de se estudar os efeitos *in vitro* é o fato de analisarmos o processo isoladamente sem a interação com sistemas fisiológicos do tecido hospedeiro muito relevantes, como por exemplo os sistemas e nervoso e imunitário

A degradação do polímero é um fator importante, pois determina o tipo e a intensidade da resposta inflamatória, já que o surgimento de partículas poli, oligo e monoméricas liberadas durante a degradação do polímero *in vivo* está diretamente correlacionada com uma mudança no tipo e intensidade da resposta inflamatória. Isso pode ser causado por produtos tóxicos provenientes da degradação ou pela mudança na rugosidade superficial e forma do implante durante a liberação de fragmentos. Além disso, a própria fagocitose dos fragmentos atua como um importante fator na modificação da resposta inflamatória. A fagocitose modifica o processo funcional do macrófago, que é o pivô na resposta inflamatória a nível de tecido e na reação de corpo estranho. As células gigantes observadas nesta fase são formadas pela fusão de macrófagos. A fagocitose de fragmentos também causa a morte celular e a liberação do conteúdo destas células mortas podem causar uma reação inflamatória aguda. [HYON et al., 1985; LAM, et al., 1993].

BRADY et al., 1973, analisaram a rota e velocidade de eliminação de implantes de PLA através da inserção de um carbono radioativo em sua estrutura. Após implantar o polímero no abdômen de ratos, constataram que, 168 dias após o implante, 36,8 % do implante havia sido eliminado, sendo 4,6% pela urina, 2,8% pelas fezes e 29,4% via respiração sob a forma de CO₂.

ALI et al., 1993, utilizaram técnicas de GPC, DSC e MEV para estudar os mecanismos de degradação do polímero amorfo poli(DL- ácido lático). Concluíram que o radical hidroxila é um fator muito significativo na velocidade de degradação deste polímero.

LAM et al., 1994, sintetizaram filmes porosos e não porosos de PLLA e verificaram que um dos fatores que determinam a hidrólise desses materiais é o seu grau de cristalinidade. Através da técnica do DSC, constataram que todos os filmes quando submetidos a degradação em meio aquoso apresentam um aumento na cristalinidade.

Polímeros em geral, quando possuem fases cristalinas, apresentam dois tipos de formações: a lamelar, composta de placas sobrepostas e paralelas e a esferulítica, de aspecto globular. O PLLA apresenta sempre formações esferulíticas. CAM, et al., 1995, estudaram o efeito da massa molecular e da morfologia na degradação hidrolítica de membranas de PLLA confeccionadas através de dissolução em solvente. A degradação foi feita *in vitro* em meio alcalino para acelerar o processo de degradação. Os autores utilizaram microscopia de luz convencional, de luz polarizada e eletrônica de varredura para análise da superfície das membranas erodidas pela hidrólise. Espectrofotometria a 570 nm foi utilizada para analisar a redução na transparência das membranas e aumento na densidade de esferulitos e DSC para avaliar o grau de cristalinidade em função do tempo de degradação. Os resultados mostraram um aumento de cristalinidade juntamente com uma aceleração na formação de esferulitos com o processo de degradação.

PEREGO et al., 1996, realizaram testes de viscosidade para avaliar a massa molecular, DSC, polarimetria e testes de tração e de flexão para correlacionar as propriedades de várias

amostras de PLA com diferentes taticidades e massas moleculares com suas propriedades mecânicas. Concluíram que o PLLA apresenta melhores propriedades mecânicas do que o PDLLA . Os maiores valores de módulo de elasticidade foram obtidos para peso molecular 35.000 daltons para o PLLA amorfo e o PDLLA, enquanto que para PLLA cristalino esse valor foi de 55.000 daltons.

2.4 Aplicações dos Polímeros Bioabsorvíveis

2.4.1 Em Tecidos Ósseos

Em ortopedia, é comum o uso de metais sob a forma de parafusos, fios de aço e pinos para recuperação de defeitos em tecidos ósseos. Os parafusos são usados para fixar as placas evitando que o osso seja submetido a macro e micro movimentos. Existem diferentes tipos de parafusos dependendo da estrutura do osso. Fios são utilizados para fixar pequenas fragmentos em locais onde o parafuso não manteria os fragmentos juntos. Pinos intramedulares são outro tipo de dispositivo utilizado para restaurar fraturas de ossos longos. São inseridos no espaço intramedular de ossos para manter o alinhamento e evitar o deslocamento durante a recuperação. Oferecem mais resistência a flexão do que as placas externas, porém a resistência à tensão é inferior.[HENCH & ETRIDGE, 1982].

Os metais, apesar de possuírem várias propriedades a seu favor, não são os biomateriais ideais para esse tipo de aplicação. A rigidez metálica previne a formação de calos e priva o osso da solicitação mecânica devido a grande diferença no módulo de elasticidade se comparado com o osso. O tempo no qual a prótese metálica funciona como um desvio à tensão aplicada ao osso tem como consequência o desenvolvimento de uma estrutura óssea mecanicamente inferior devido à atrofia, pois o osso pára de ser submetido aos esforços. Outros problemas são refraturas após remoção, corrosão, liberação de partículas ou íons, inflamações, dentre outros. [TORMALA et al.,1991; GILDING,1981; GRULKE, 1989].

As características de bioabsorção, propriedades mecânicas e biocompatibilidade dos polímeros absorvíveis, principalmente do PLLA, têm colocado-os como fortes candidatos para substituição dos dispositivos metálicos, pois torna uma segunda cirurgia para remoção dos mesmos após a recuperação do osso, desnecessária. Isso diminui custos hospitalares, riscos de complicações cirúrgicas e o tempo de recuperação da paciente.

O desempenho de um dispositivo ortopédico depende de uma série de fatores. Primeiro o dispositivo deve ter um projeto próprio com propriedades mecânicas adequadas. Deve ser manufaturado sobre controle suficiente de forma a não incorporar defeitos no implante. A seleção do material é importante e deve garantir biocompatibilidade e resistência à corrosão durante o tempo necessário para recuperação do osso.

O uso de materiais absorvíveis é baseado no seguinte princípio: quando a resistência do local fraturado aumenta devido ao processo natural de recuperação a absorção começa a ocorrer. O implante suporta uma elevada fração da carga transmitida ao osso durante os primeiros estágios do processo de recuperação. A redução gradual da resistência do implante, devido a absorção, transfere uma percentagem crescente da carga ao osso em recuperação. Como resultado, o local da fratura recuperada deve desenvolver uma resistência comparável àquela do osso original. De modo ideal esses processos devem ocorrer de maneira simultânea.

LEENSLAG¹ et al., 1987, sintetizaram poli(L ácido láctico) com alta massa molecular (massa molar média = 1×10^5 daltons), à temperatura de 100-120°C, e estudaram suas propriedades mecânicas e morfológicas. Placas e parafusos deste material foram utilizados no tratamento de fraturas mandibular de cães e ovelhas. A cura do osso foi excelente e procedeu-se sem formação de calos ou sinal de inflamações. Além disso, acompanhou-se o processo de degradação durante a cura. As placas foram moldadas por compressão do material ($T=200^\circ\text{C}$ e $P=18 \times 10^3$ Kg). Após 11 semanas de implantação verificaram a degradação, a qual entre outros fatores foi atribuída à microporosidade do implante.

MANNIMEN et al., 1992, realizaram um estudo comparando propriedades mecânicas de parafusos de PLLA reforçado com fibras, implantando parafusos de metal e de PLLA para fixação de ossos em ovelhas. As dimensões para parafusos foram de 50 mm de comprimento, 3,2 mm na

parte central e 4,5 mm de diâmetro das linhas externas. Os parafusos de PLLA foram moldados por compressão nas mesmas dimensões. As radiografias entre 6 a 12 semanas mostraram a união do osso sem sinais de inflamações e com enfraquecimento do osso para o caso do parafuso metálico enquanto com parafusos de PLLA houve um aumento da resistência. Os estudos indicam que o uso de parafusos de PLLA, ao invés de metálico, na fixação de osso em ovelhas evita a proteção ao esforço e enfraquecimento do osso. Entretanto, parafusos de PLLA não são recomendados para uso sem suporte externo em regiões de alto esforço mecânico. Os autores comentam a dificuldade em se comparar os dispositivos devido a incompletas informações moleculares, estruturais e mecânicas.

BÖSTMAN¹ et al., 1992, verificaram a migração de partículas poliméricas durante a degradação de implantes de poli(ácido glicólico) em fêmur de coelho, utilizando parafusos e pinos. Os resultados mostraram que a partir de 6 semanas de implante ocorreu a união do osso e os orifícios intra articulares dos canais do implante foram preenchidos com um tecido fibro-conectivo e fragmentos do polímero migraram para o tecido hospedeiro a uma distância de aproximadamente 0,85 mm a partir do implante original. Pouco mais tarde esses autores [BÖSTMAN² et al., 1992] realizaram um estudo mais detalhado através de dados histológicos, histomorfométricos e verificaram os primeiros sinais de invasão do tecido no implante após 40 dias. Após 7 dias verificaram a formação de uma camada de fibroblastos circundando o implante. Analisaram a variação do volume do osso e contagem de células.

Além de pinos e parafusos, outra possibilidade é a utilização de hastes implantadas na parte intramedular do osso. KUMTA et al., 1992, estudaram a degradação de PGA e copolímeros PGA-PLA após implantação intramedular e subcutânea em coelhos. Após 2 semanas, o material perdeu 73% da resistência no implante intramedular e 64% no subcutâneo. Implantes de PGA foram comparados com hastes Kirschner para fixação de fraturas intra-articulares de mão. Em seis meses não foi verificada nenhuma diferença entre os 2 grupos, nem reação alérgica.

Além de testes em animais, trabalhos recentes mostram a viabilidade de aplicação para fixação de fraturas em seres humanos, com resultados satisfatórios. [NAKAMURA et al., 1993; PIHLAJAMÄKI et al., 1992]. Segundo BÖSTMAN, 1991, um estudo envolvendo 516 pacientes nos quais foram implantados com pinos de PGA ou PGA:PLA, em uma clínica de trauma em

Helsinki, Finlândia, revelou as seguintes falhas dos implantes poliméricos que necessitaram reoperação :

falha na fixação da fratura - 1,2 %;

infecção bacteriana - 1,7 %;

inflamação não infecciosa após cerca de 20 semanas de implante - 7,9 %.

Böstman conclui que esta taxa de cerca de 8% de complicação nos implantes deve ser sempre analisada comparando-a com a necessidade de se executar uma segunda operação no caso implantes metálicos.

Outro tipo de material utilizado para fixação de fraturas são os materiais reforçados. Consistem de materiais absorvíveis, por ex.: PGA/PLA reforçados com aproximadamente 60% de fibras do próprio polímero [TÖRMALA et al., 1987]. VAINIONPAA et al., 1987, estudaram o poli ácido glicólico (PGA) reforçado com fibras e verificaram alta tensão mecânica, como conseqüência da adesão entre as fibras e a matriz. Outra possibilidade consiste em materiais poliméricos reforçados com hidroxiapatita. [TÖRMALA et al., 1991].

Além dos dispositivos ortopédicos, os polímeros absorvíveis podem ser incluídos em outra linha de pesquisa relacionada: o estudo de proteínas morfogenéticas induzindo crescimento ósseo. Nesse caso, o PLLA pode ser útil como um composto com polietileno glicol (PEG) ou hidroxiapatita funcionando como um carregador para proteína. Proteínas morfogenéticas são capazes de induzir a diferenciação de células tipo mesênquima na cartilagem ou osso através do processo de ossificação endocondral. [MIYAMOTO et al.,1993].

Também sob a forma de membranas, os polímeros são usados em tecidos ósseos. Regeneração guiada de tecido (do inglês, Guided Tissue Regeneration - GTR) , é uma técnica usada para o tratamento de defeitos ósseos em regiões nas quais o osso está em íntimo contato com um tecido mole. Consiste em separar através de uma membrana absorvível ou não, os dois tipos de tecido, impedindo que haja invasão de regiões que devem ser preenchidas com tecido ósseo em recuperação pelo tecido mole.

ROBERT et al., 1993, avaliaram a biocompatibilidade e degradação de membranas de PLA com alta massa molecular e com adição de até 30% em peso de oligômeros de PLA obtidas com o intuito de servirem como implantes periodontais para GTR. Eles implantaram as membranas sob a derme no abdômen de ratos. Os resultados obtidos mostraram que essas membranas são muito bem toleradas pelo tecido, sem reação inflamatória. Quanto maior a concentração de polímero com baixa massa molecular, maior a taxa de degradação. A absorção dos implantes foi completa após 60 dias. As membranas foram progressivamente substituídas por tecido conectivo fibroso.

ZELLIN et al., 1995, testou 10 diferentes tipos de membranas absorvíveis e não absorvíveis, indicadas para GTR periodontal. Furos passantes de 5 mm de diâmetro nas mandíbulas de ratos adultos foram realizados e cobertos com as membranas. As análises foram efetuadas após 6 semanas do implante. O estudo mostrou que diferentes membranas variam fortemente em termos de eficácia em promover a reconstrução óssea, mesmo sendo quimicamente semelhantes. Além disso, membranas desenhadas especificamente para aplicações em periodontia podem não ser adequadas para recuperação de outras regiões ósseas.

PIATTELLI et al. , 1996, avaliou a possibilidade de regeneração óssea utilizando novas membranas absorvíveis e não absorvíveis comercialmente disponíveis (Guidor Matrix Barrier® e Gore-Tex®) indicadas a princípio para aplicações em periodontia. Os ensaios foram realizados através de implantes em tíbias de ratos. Concluíram que a degradação das membranas não interferiu na recuperação dos ossos, não havendo reação inflamatória nos dois tipos de membrana e que a membrana Guidor pode ser utilizada para regeneração GTR ósseo.

PINEDA et al., 1996, implantaram membranas de PLA com poros de vários tamanhos em 15 coelhos para cobrir um largo defeito ósseo de 10 mm criado propositadamente. Radiografias pós implante revelaram um hematoma na região do defeito que foi desaparecendo a medida que a formação de um novo tecido ósseo foi ocorrendo, independentemente do tipo de membrana utilizada. O autor concluiu que a função primária das membranas usadas para cobrir defeitos ósseos é a de preservar componentes osteogênicos presentes no espaço sob a membrana e garantir o crescimento das células na cavidade medular.

LAM et al., 1994, realizaram um estudo abrangente e detalhado *in vitro* e *in vivo* analisando a degradação de membranas porosas e não porosas de poli(L-ácido láctico) que poderiam ser utilizadas tanto em GTR quanto em suporte para cultura de células. Analisaram as mudanças na massa molecular, na polidispersividade, na temperatura de fusão, na energia de fusão, na resistência à tração, no módulo de elasticidade, na massa e na área superficial das membranas sob degradação. Estes autores constataram que as membranas porosas apresentam os maiores valores de massa molecular e temperatura de fusão e degradam mais rapidamente em relação às membranas não porosas. No entanto, as membranas não porosas apresentaram os maiores valores de calor de fusão, indicando a presença de moléculas pequenas formando domínios cristalinos mais facilmente.

SILVA et al. , 1985, utilizou tri-etil-citrato para preparar pequenos tubos flexíveis de PLLA absorvíveis para GTR de nervos rompidos em ratos adultos. Os resultados indicaram um significativo aumento de células em função do tempo quando comparado com o grupo de controle.

2.4.2 Em Tecidos Moles e Cartilagens

A literatura tem mostrado também uma nova aplicação para os polímeros absorvíveis sob a forma de membranas: reconstrução de tecidos através de cultura de células. O estudo desses materiais gerou uma nova linha de pesquisa, a Engenharia de Tecidos [TORMALA et al., 1993; FREED et al., 1993].

Numa discussão sobre as futuras direções em engenharia de tecidos, Davis et al., 1996; avaliaram a utilização de polímeros absorvíveis como suporte para cultura de células. Esse tipo de aplicação tem apresentado várias vantagens sobre o transplante de órgãos, pois há um controle preciso das características do material utilizado, além das propriedades mecânicas, químicas, e morfológicas das membranas poderem ser manipuladas visando a otimização do processo. Ao invés de utilizar-se um órgão todo, utiliza-se um pequeno número de células do tecido doador. Isso permite que na expansão *in vitro* haja a remoção de células indesejáveis,

diminuindo a rejeição entre as células cultivadas e as do receptor. Dessa forma, os custos de todo o processo são reduzidos de forma significativa.

Neste caso, membranas densas e membranas porosas de polímeros absorvíveis são confeccionadas com o intuito de servirem como um substrato para que células isoladas possam se fixar e crescer até formar o tecido. Em se tratando da regeneração de tecidos, seja através do recrutamento de células de tecido vizinho sadio ou através de transplante de células sadias, é necessário a existência de um substrato que sirva como suporte para o crescimento celular. O suporte pode ser absorvido, desaparecendo à medida que o tecido se regenera mas pode ser também de material bioinerte, com características semelhantes às da matriz extracelular. A técnica de engenharia de tecido para crescimento de cartilagem tem aplicações potenciais em ortopedia, plástica, reconstrução e cirurgia craniomaxilofacial.

Matrizes porosas propiciam espaço adequado para a semeadura e crescimento das células e produção de matriz extracelular. A distribuição da uniformidade e interconecção da estrutura porosa é importante, facilitando a formação dos tecidos na forma de uma rede organizada, tendo grande aplicação na reconstrução de tecidos ósseos e cartilagosos, [VAN SLIEDREGT et al., 1994].

Membranas porosas de polímeros absorvíveis podem ser obtidas através de diversas técnicas. Um procedimento comumente usado envolve a preparação da solução do polímero com adição de um sal com granulometria controlada. Após a evaporação do solvente, são obtidas membranas com partículas de sal distribuídas. Com a remoção do sal após sucessivas lavagens, obtém-se membranas com poros da ordem de 50 a 500 μm , dependendo da granulometria do sal utilizado [WALD et al., 1993].

MOONEY et al., 1996, utilizou um método interessante para obter membranas porosas: aplicou gás carbônico para produzir esponjas de poli (D,L ácido láctico-co-glicólico). Obteve uma estrutura com poros da ordem de 100 μm e com uma porosidade superior a 93%.

Outra maneira de preparar membranas porosas, originalmente utilizado para obtenção de membranas porosas para processos de ultra ou nano filtração é a "inversão de fases". Este

método consiste em dissolver o polímero, espalhar a solução sobre uma superfície plana e introduzir esta camada (sem que o solvente tenha evaporado) em um banho de não-solvente. O resultado é uma membrana com pequenos poros porém bem homogêneos e bem distribuídos. [KESTING, 1985]

FREED et al.,1993, estudaram o crescimento de condrócitos *in vitro*, cultivados sobre matriz de PGA fibroso durante 6 semanas. Os resultados mostraram a formação de densidade de células da mesma ordem de magnitude para a cartilagem articular (colágeno). Condrócitos também atacaram os poros do poli(ácido láctico) no mesmo período de tempo formando a metade das células comparando com a cartilagem normal. Demonstraram que condrócitos crescem sobre esses polímeros *in vivo* por seis meses, mantendo a forma do dispositivo original, resultando na formação de cartilagem.

PUELACHER et al.,1994, estudaram a cultura de condrócitos *in vivo* e *in vitro* para reconstrução da cartilagem na região nasal, com sucesso na formação da cartilagem hialina.

WALD et al.,1993; VAN SLIEDREGT et al.,1994; mostraram que matrizes porosas proporcionam espaço adequado para a sementeira, crescimento das células e produção de matriz extracelular. A distribuição da uniformidade e interconecção da estrutura porosa é importante, já que facilita a formação dos tecidos na forma de uma rede organizada, tendo grande aplicação na reconstrução de tecidos como cartilagem e osso.

Hoje, várias áreas envolvidas com pesquisas biomédicas empregam técnicas de cultura de células para estudar aspectos da biologia celular, diagnosticar doenças e avaliar a toxicidade, mutagenicidade e transformabilidade de vários meios, materiais e dispositivos sintéticos, propagar vírus para uso na confecção de vacinas, sintetizar produtos específicos como hormônios e anticorpos, dentre outros. Para estas aplicações, é importante o conhecimento das características de adesão e crescimento celular na superfície do polímero. [PARK ,1979, HENCH & ETHRIDGE ,1982]

Muitos estudos têm mostrado que a adesão e a expansão celular é favorecida em substratos hidrofílicos. VAN der VALK et al. ,1983, estudaram a interação de fibroblastos em

superfícies poliméricas, tentando fornecer uma relação entre energia superficial livre e o espalhamento dos mesmos.

Propriedades tais como tipo de grupamento químico, relação entre hidrofiliicidade, hidrofobicidade, anisotropia fisico-química e flexibilidade do substrato têm sido propostas como fatores que influenciam o comportamento de uma cultura de células. LYDON et al., 1985, apresentaram uma revisão sobre as relações entre as propriedades fisico-químicas de um substrato e o comportamento celular, para uma série de polímeros sintéticos.

MIKOS et al., 1994, estudaram o aumento da hidrofiliicidade de esponjas de poli(DL-lático-co-ácido glicólico) deixando o dispositivo em repouso em etanol, e em seguida substituindo o etanol pela água.

THOMSON et al., 1996, sintetizaram membranas delgadas, da ordem de $12 \pm 3 \mu\text{m}$, não porosas e flexíveis de PLLA e do copolímero poli(DL ácido lático-ácido glicólico) nas proporções 75:25 e 50:50 e realizaram cultura *in vitro* de células epiteliais pigmentares de retina retiradas de fetos humanos utilizando as membranas como suporte. Houve boa fixação celular e os autores concluem que estas membranas podem ser uma maneira de se transportar células alogênicas para terapia de um grande número de doenças oculares relacionadas com disfunção da retina.

LAM et al., 1995, avaliaram a influência da morfologia de superfície e hidrofiliicidade de membranas absorvíveis (PLLA, porosas e densas) e não absorvíveis (PTFE (Teflon) e PTFE expandido) em relação à resposta inflamatória após implantá-las sob a derme de ratos. Constataram, através de medidas do ângulo de contato que o PLLA é mais hidrofílico que o PTFE. Não houve invasão celular nas membranas de PTFE expandido enquanto que nas porosas de PLLA a invasão foi abundante. A partir de 6 semanas de implante, a reação inflamatória às membranas porosas de PLLA foi maior do que a exibida pelas outras membranas. Finalmente, concluíram que a porosidade aumenta a resposta inflamatória somente quando a hidrofiliicidade permite invasão celular.

BEUMER et al., 1994, testou uma membrana de dupla camada absorvível criada para regeneração de grandes defeitos que atingem a espessura total da derme. A camada inferior, porosa, foi desenhada para permitir a invasão de componentes da derme e a camada superior, densa, para servir como substrato para fixação de queratinócitos. Foram observadas em todas as amostras partículas das membranas fagocitadas por células. Nas análises realizadas 1 ano pós implante constatou-se que a redução de área superficial das membranas foi de menos de 20%.

COOMBES et al., 1992, obtiveram membranas microporosas de PLLA, do copolímero PLLA-PGA e da blenda de PLLA-PGA para aplicações como enxertos ósseos e liberação controlada de drogas, através da técnica *gel casting*. Os termogramas obtidos das blendas mostraram ser efetivamente a superposição dos termogramas dos componentes individuais. De acordo com os autores, as membranas obtidas dessa forma apresentam potencial para aplicações em enxertos ósseos.

WALD et. al., 1993, prepararam discos porosos (1,35 cm de diâmetro e 0,5 cm de espessura) para cultura de células (crescimento de hepatócitos). Os discos foram preparados por dissolução do poli(ácido láctico) em clorofórmio a temperatura ambiente, adicionando-se cloreto de sódio (tamanho de partículas de 106 a 150µm e 250 a 500µm). Após evaporação do solvente, lavaram as membranas em meio aquoso para eliminar o sal e obtiveram membranas com poros variando entre 126 a 166 µm.

MOONEY et al., 1995, sintetizaram membranas de PLLA/PVA (poli álcool vinílico) altamente porosas (90-95 % de poros) para cultura de hepatócitos. Após obtenção do dispositivo poroso através da evaporação do solvente de uma solução contendo PLLA e sal, o mesmo foi imerso em solução de PVA durante 16 horas, diminuindo a hidrofobicidade do dispositivo. Dessa forma houve uma diminuição do ângulo de contato com a água de 79° para 23°, não inibindo a adesão dos hepatócitos no polímero e facilitando a penetração do meio de cultura no dispositivo.

Em 1995, SCHUGENS et al., sintetizaram um implante biodegradável de poli(ácido láctico) com controle de porosidade de uma forma original, que consistiu na aglomeração de

esferas de PDLLA de tamanhos calibrados como constituintes da membrana. Outro recurso utilizado neste mesmo experimento foi a adição de um plastificante biocompatível e biodegradável, o tri-etil-citrato. O plastificante atua nas cadeias poliméricas, diminuindo a interação entre as cadeias, favorecendo a flexibilidade da membrana. Como consequência ocorre a diminuição no valor da temperatura de transição vítrea. [DUEK et al., 1996]

CAPÍTULO 3

Materiais e Métodos

3.1 Síntese das Membranas

A principal técnica utilizada para obtenção de membranas de PLA é conhecida em inglês como "*casting*". O polímero é dissolvido em um solvente (clorofórmio ou cloreto de metileno). Em seguida a solução formada é depositada sobre placas de vidro e exposta a atmosfera ambiente ou a uma atmosfera com um fluxo controlado de gás (N_2 ou Ar seco) para arraste e evaporação do solvente. Após a evaporação do solvente a membrana pode ser colocada sob vácuo para eliminação total do solvente. A proporção entre o polímero e o solvente pode variar desde 20% (g/mL), resultando em uma solução extremamente viscosa e difícil de manusear a frações da ordem de 2%, formando uma membrana extremamente fina.

Neste trabalho, o método utilizado para a síntese de membranas de PLA foi o de *casting*. Cinco tipos diferentes de membranas foram obtidas através da variação da concentração de polímero-solvente e da adição de tri-etil-citrato (Aldrich), um plastificante biocompatível. Para todas as membranas, o solvente utilizado foi o cloreto de metileno (MeCl) para análise marca Merck. O polímero utilizado foi o PLLA com massa molecular média de 300.000 Daltons (segundo o fabricante) fornecido pela Medsorb. Cerca de 120 mL de cada solução foi obtida para cada tipo de membrana e mantido em recipiente fechado.

A nomenclatura adotada para cada tipo de membrana bem como as concentrações utilizadas de polímero, solvente e plastificante estão citadas a seguir:

- **membrana tipo 5%**

5 g de PLLA + 100 mL de MeCl

- **membrana tipo 10%**

10 g de PLLA + 100 mL de MeCl

- **membrana tipo 10%P**

10 g de PLLA + 100 mL de MeCl + 10 mL de tri-etil citrato

- **membrana tipo 15%P**

15 g de PLLA + 100 mL de MeCl + 10 mL de tri-etil-citrato

- **membrana tipo 10%/10%P**

Membrana dupla camada. Obtida através da deposição da solução de membrana 10% sobre a membrana 10%P quase seca.

Para facilitar a dissolução do PLLA no solvente e homogeneização da solução, todos os recipientes contendo a mistura foram submetidos a agitação com agitador magnético, à temperatura ambiente. Após dissolução todas as soluções foram mantidas à temperatura ambiente em recipientes fechados até o momento da utilização.

As soluções foram depositadas cuidadosamente, para evitar a formação de bolhas, em um molde feito com uma placa de vidro liso de dimensões 10 x 15 cm. Foi feito um ressalto de 1 mm nas bordas da placa para evitar vazamento da solução e manter a espessura da solução depositada também em 1 mm.(figura 3).

Logo em seguida o molde foi colocado em uma cuba de vidro totalmente fechado mas com um fluxo de ar seco com uma vazão de 1 litro/min para secagem das membranas. Para garantir que o ar estivesse seco e limpo foi adicionado um filtro de lã de rocha e sílica-gel ao tubo antes da entrada do ar no recipiente de vidro.(figura 4)

As membranas permaneceram neste sistema à temperatura ambiente durante cerca de 15 horas, finda as quais, já bem resistentes para manuseio, foram retiradas do molde e armazenadas em dessecador a vácuo até o momento de serem cortadas. No total, 4 membranas tipo 5%, 4 tipo 15%P, 8 tipo 10% e 8 tipo 10%P, todas nas dimensões de 100 x 150 mm foram obtidas.

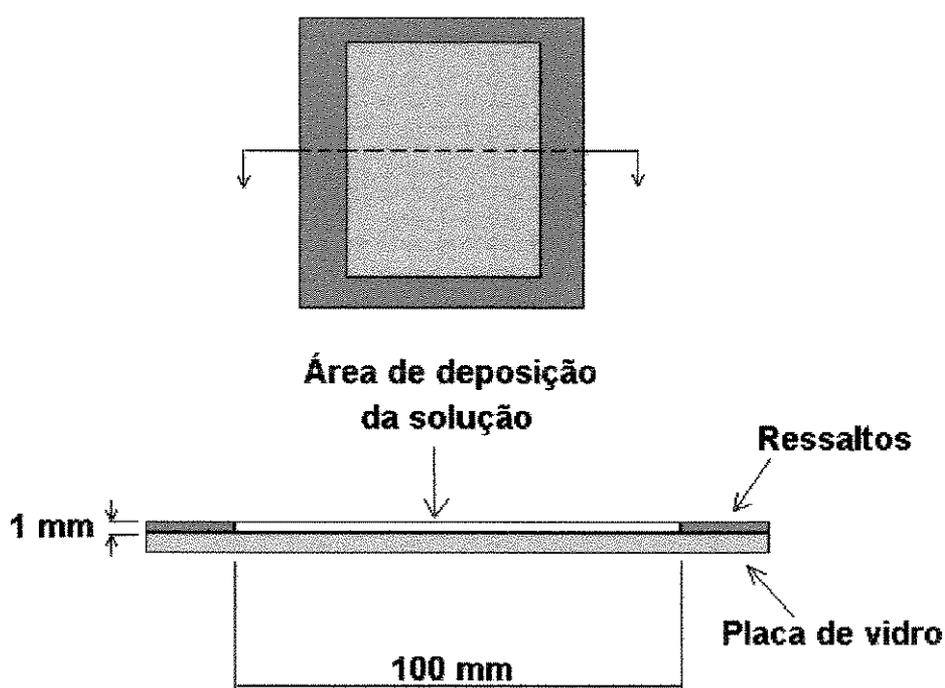


Figura 3- Molde para deposição da solução polímero-solvente para posterior secagem. Vista superior e vista em corte ampliada.

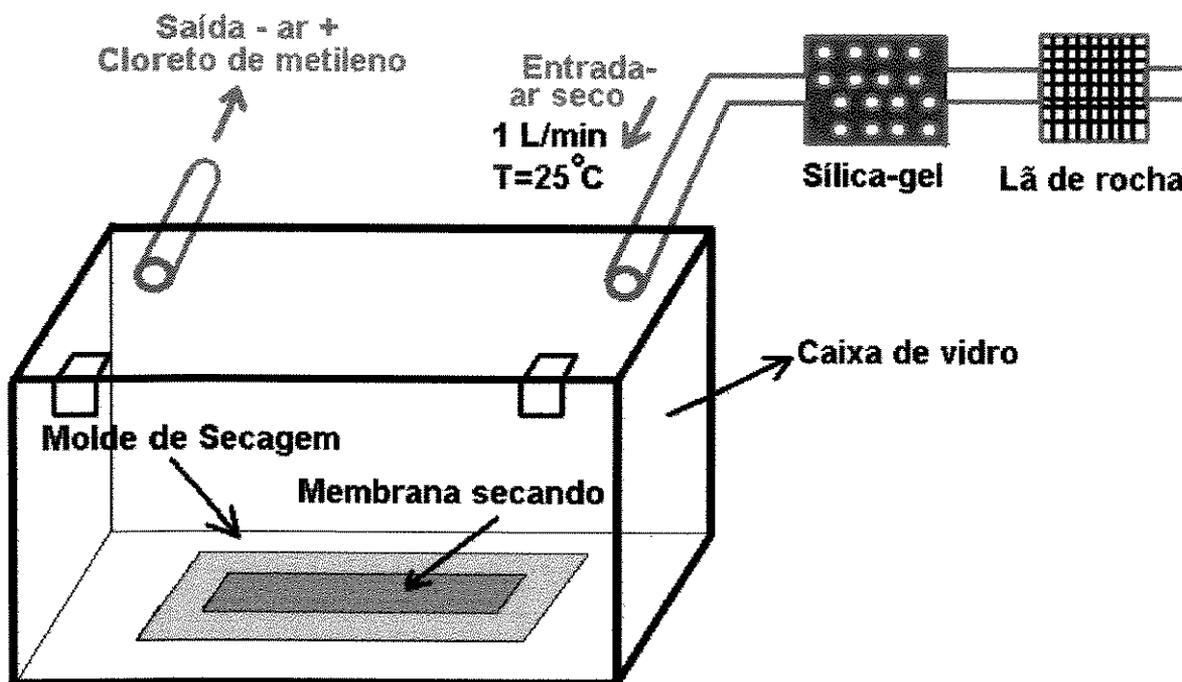


Figura 4 - Sistema de evaporação de solvente para secagem das membranas através de fluxo de ar seco.

3.2 Estudo físico- químico da degradação das membranas

3.2.1 Preparação das Amostras

Com o intuito de avaliar as alterações que ocorrem nas propriedades mecânicas e físico-químicas sob degradação, 40 corpos de prova (CP) foram confeccionados para cada um dos 5 diferentes tipos de membrana. Os CPs foram cortados através de ferramenta de corte (punção) confeccionado especificamente para corte de amostras nas dimensões da norma ASTM 1708/96 - *Standard test method for Properties of plastics By Use of Microtensile Specimens*, na forma e dimensões mostradas na figura 5.

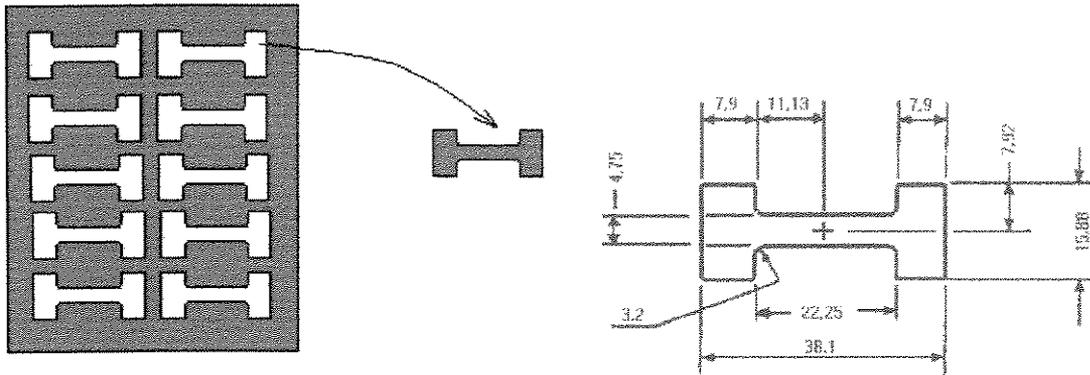


Figura 5 - Formato e dimensões dos corpos de prova preparados segundo norma ASTM 1708/96 para os ensaios de tração. Quarenta corpos de prova foram preparados para cada um dos cinco tipos de membrana.

Estes 40 corpos de prova foram divididos em 4 grupos de 10 conforme esquema abaixo.

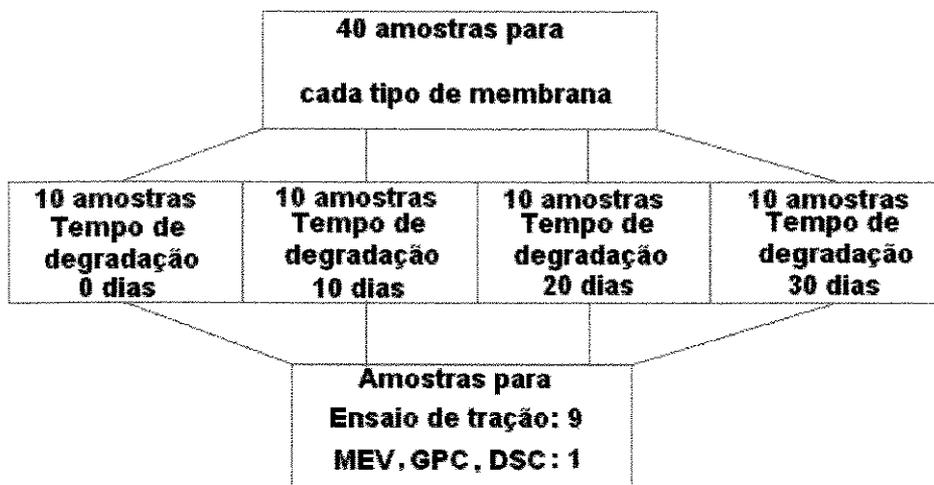


Figura 6: Esquema da divisão dos CP para os testes.

Dos 10 corpos de prova para cada período de tempo T de degradação, 9 foram destinados ao ensaio de tração (pela norma ASTM, são necessários no mínimo 5 CP) e 1 corpo de prova foi usado para as demais medidas DSC, GPC e MEV.

Todos os CP (com exceção do grupo T=0 dias) foram colocados em uma cuba com capacidade para 15 litros, imersos em uma solução de tampão fosfato com pH 7,4, concentração de 0,13 moles/L e temperatura 37 °C suspensos por um fino fio de nylon para que ambas as faces estivessem em contato livre com a solução. (figura 7)

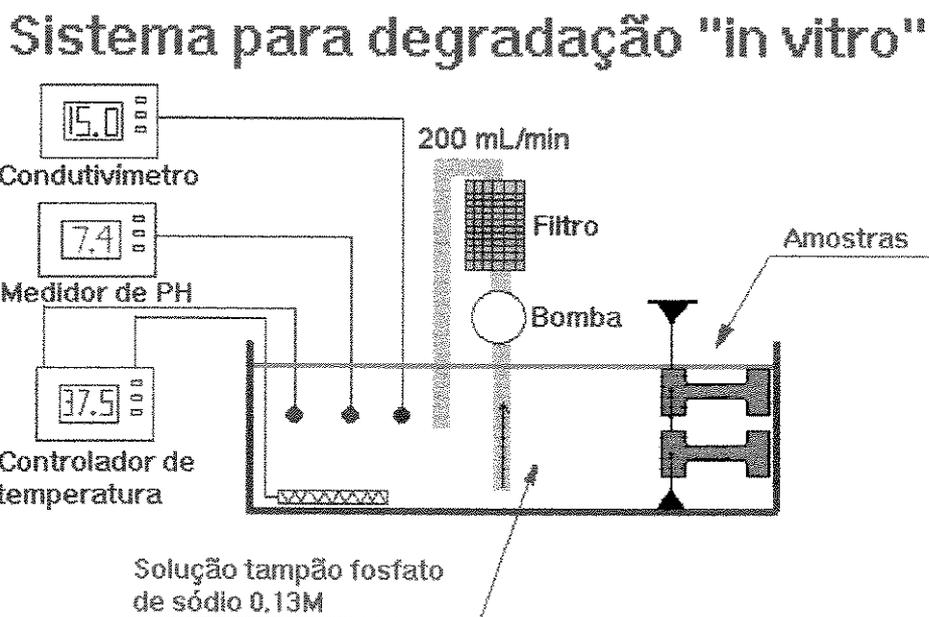


Figura 7 - Sistema para avaliação da degradação das membranas "in vitro". As amostras (corpos de prova) foram separadas em grupos de dez peças e unidas entre si através de um fio fino de nylon. A cada 10 dias um grupo era retirado e seguia para as análises.

Este banho foi mantido a temperatura constante através de um controlador/monitor digital de temperatura (ECS5w - Robert Shaw) acoplado a um elemento de aquecimento resistivo inserido em um tubo de ensaio. A precisão do sistema assegurava uma variação máxima de ± 0.5 °C durante todo o período do experimento.

Um mini-filtro mecânico do tipo utilizado em aquários (modelo Pinguim-mini, bomba submersa) e elemento filtrante lã de rocha com uma vazão de 200mL/min foi incorporado ao sistema para evitar a aglomeração de fungos e manter a solução homogênea. A vazão de 200 mL/min foi conseguida através da redução da área de entrada no bocal de sucção da bomba e teve como objetivo evitar que fosse gerada turbulência na solução onde se encontravam as amostras, o que poderia alterar a taxa de degradação.

Afim de monitorar as variações de condutividade da solução, um sistema de sensor permitia a verificação diária deste parâmetro. A medida da condutividade (Conductometer OK -114 - Radelkis, digital) permitia avaliar com precisão a perda de água da solução por evaporação e a sua necessidade de reposição com água destilada, afim de evitar que a concentração dos sais do tampão fosfato fosse alterada.

O pH foi também monitorado diariamente, através de um medidor de pH digital (Analyser pH 300). O valor manteve-se constante durante todo o período do experimento (30 dias), com oscilações máximas de ± 0.2 em relação a medida especificada.

A cada 10 dias, 10 corpos de prova de cada tipo de membrana eram retirados da solução. Imediatamente, os corpos eram lavados com água destilada e submetidos a vácuo para secagem e armazenamento. Os CP permaneceram sob vácuo até o momento das análises.

3.2.2 Ensaio de Tração

Os ensaios de tração foram efetuados utilizando-se um equipamento padrão para ensaios de tração (MTS 810 - Materials Test System), seguindo-se a norma ASTM 1708/96 para a realização dos ensaios. O teste utilizado foi o de velocidade constante de separação entre as garras, sendo uma delas fixa. A velocidade de espaçamento entre as garras utilizada foi de 2.2 mm/min.

As garras utilizadas foram do tipo mordedura simples, de aço 1020, com fixação e aperto via parafusos e com ranhuras leves na parte interna para evitar escorregamento dos CPs.

Antes do início dos testes o equipamento permaneceu ligado durante pelo menos 1 hora para estabilização térmica. A célula de carga utilizada foi de 100Kgf, eletronicamente configurada para fundo de escala de 10Kgf, com uma precisão de $\pm 0,5\%$ do fundo de escala. Esta foi a célula de carga de menor valor disponível para uso na ocasião dos ensaios.

O sistema de medição de deslocamento utilizado foi um LVDT padrão, com precisão de $\pm 0.5\%$ do fundo de escala, ajustado para 10 mm.

As grandezas medidas no ensaio (força aplicada e deslocamento) convertidas para sinais elétricos foram aplicados a um registrador XY acoplado ao sistema, obtendo-se as curvas força *versus* deformação.

Os CPs que apresentaram ruptura próxima às garras ou algum tipo de falha não compatível com o ensaio foram descartados. A norma recomenda pelo menos 5 medidas para cada tipo de material, porém, em alguns casos, isto não foi possível devido a fragilidade do material e dificuldade em fixar os CPs nas garras para o ensaio.

A medida da espessura das amostras foi realizada através de um micrômetro com precisão de 0,0025mm após os CPs terem sido fixados nas garras da MTS. Essa medida foi realizada em três pontos distintos e aleatórios da zona de tração do CP e o menor resultado obtido foi utilizado para o cálculo da área da secção transversal do CP. O cálculo da área da secção transversal consistiu na multiplicação deste valor por 4,75 mm, largura desta parte do CP. Os pontos de tensão e deformação no final da zona de proporcionalidade (zona elástica) foram os dados escolhidos para a comparação das curvas. A média do valor obtidos para estes pontos para cada conjunto de membranas foi calculada com o respectivo desvio padrão. Para o cálculo do módulo de elasticidade, usou-se a tangente da reta conforme mostra a figura 8.



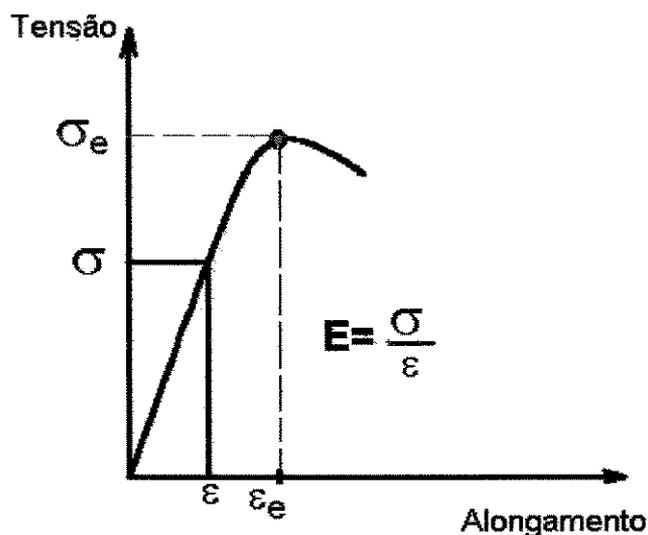


Figura 8 : Típico aspecto de uma curva obtida em um ensaio de tração e mostrando os pontos retirados para análise. E é o módulo de elasticidade.

Logo nos primeiros 10 dias de degradação, todos os tipos de membrana que continham plastificante em sua composição, ou seja, tipos 10%P, 15%P e 10%/10%P, ficaram muito frágeis e não foi possível manipulá-las para se efetuar os ensaios de tração nos tempos $T=10,20$ e 30 dias. A análise prosseguiu com as membras 5% e 10% até o trigésimo dia.

3.2.3 Análise via Microscopia Eletrônica de Varredura(MEV)

As análises morfológicas das membranas de PLLA durante o estudo da degradação *in vitro* foram realizadas através de MEV (Jeol 300). As amostras foram preparadas da seguinte forma:

- Obtenção das Micrografias eletrônicas da superfície das membranas:

Após lavagem com água destilada as membranas permaneceram sob vácuo por 24 horas. Em seguida foram fixadas ao suporte através de cola condutora (cola prata) e metalizadas com ouro, pois o polímero não é bom condutor.

- Micrografia das superfícies de fraturas das membranas:

Após lavadas com água as membranas foram submetidas a vácuo por 24 horas. Retiradas do vácuo foram imersas em N₂ líquido fraturadas com o auxílio de pinças. Em seguida, as membranas ficaram mais 24 horas sobre vácuo e só então foram fixadas e metalizadas seguindo o mesmo procedimento descrito no item anterior.

3.2.4 Análise térmica via Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Para a análise via DSC (DU PONT), amostras de aproximadamente 10 mg foram retiradas de todas as membranas para todos os tempos de degradação. Nos tempos pré-determinados, 10,20 e 30 dias, as membranas foram retiradas, lavadas em água destilada, secas a vácuo e submetidas a análise.

As propriedades térmicas foram obtidas na faixa de temperatura de 0 a 250 °C com uma velocidade de aquecimento de 10 °C/min.

3.2.5 Análise da variação da massa molar via Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

As massas molares médias (M_n, M_w e M_z) das membranas após estudo *in vitro*, em função do tempo de degradação foram determinadas por Cromatografia de Permeação em Gel. Foi utilizado um Cromatógrafo (Waters) contendo 3 colunas Ultrastyrigel 500, 1000 e 10000 Å, associado a um detector de índice de refração.

As amostras (8 mg) foram dissolvidas em 10 ml de clorofórmio (MERCK P.A.). O volume de injeção utilizado foi de 200 µL. Clorofórmio foi usado como eluente numa vazão de 1 mL/min. As massas molares M_w, M_n e razão de polidispersividade foram calculadas usando padrão de poliestireno dissolvido em tetrafluoretileno (MERCK P.A.).

3.3 Estudo *in vivo*

3.3.1 Obtenção dos Implantes

As mesmas membranas obtidas segundo o procedimento citado no item 3.1 foram cortadas em formato de disco com 5 mm de diâmetro. Um total de 30 discos foram confeccionados, sendo 6 de cada tipo de membrana. Os discos foram lavados em água destilada e deionizada por 30 min e em etanol a 70% por mais 2 horas. A seguir as membranas foram secas à temperatura ambiente e armazenadas em dessecador a vácuo contendo sílica-gel.

Momentos antes da cirurgia para implante, as amostras foram retiradas do dessecador e submergidas em um recipiente com soro fisiológico o qual foi submetido a baixo vácuo (limiar do início da ebulição da solução) por alguns minutos apenas para permitir a saída de bolhas de ar dos poros das membranas e preenchê-los com a solução de soro fisiológico. Este procedimento evita que alguns pontos na membrana, por estarem abrigando uma bolha de ar, não possam ser invadidos por células e se tornem um foco de possível infecção (LAM et al, 1993).

3.3.2 Animais

Neste trabalho foram utilizados 15 ratos machos, com 4 meses de idade provenientes do Centro de Bioterismo do Instituto de Biologia da Unicamp. Os ratos foram separados em 5 lotes de três indivíduos cada (1 lote para cada tipo de membrana a ser implantada). Os ratos foram mantidos no biotério do Departamento de Histologia e Embriologia 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.

3.3.3 Procedimento Cirúrgico

Para a cirurgia os ratos foram anestesiados em atmosfera saturada com éter etílico e logo após foram posicionados em decúbito ventral. As membranas foram inseridas dorsolateralmente (uma em cada lado) conforme procedimento descrito a seguir:

Duas incisões de cerca de 1 cm de comprimento (figura 9) foram efetuadas na região dorsal do animal, já sem pelos, e com auxílio de uma tesoura de ponta romba, abriu-se um espaço no subcutâneo onde uma amostra foi inserida em cada incisão.

Esse mesmo tipo de procedimento foi realizado para todos os lotes de animais e para todos os tipos de membranas. Em seguida as incisões foram suturadas com fio de nylon 5-0 e os ratos foram acondicionados em gaiolas.

Os animais foram monitorados diariamente para verificar as condições de saúde e alteração no comportamento, permanecendo em suas gaiolas até o trigésimo dia a contar da data do implante recebendo ração comercial e água "ad libitum".

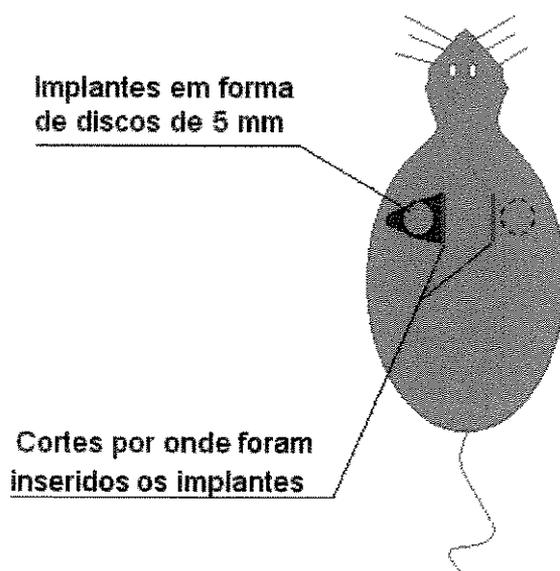


Figura 9: Local onde os implantes foram inseridos e sua forma.

3.3.4 Retirada das Amostras

Para a retirada das amostras, novamente realizou-se a tricotomia no dorso do animal já sacrificado em atmosfera saturada de éter etílico por tempo prolongado e, orientando-se pela cicatriz da cirurgia de implante, um segmento de tecido em forma retangular abrangendo a toda região do implante foi retirado.

A região onde se encontrava os restos da membrana e o tecido ao redor foram cuidadosamente analisados macroscopicamente afim de se encontrar qualquer evidência de necroses ou de alguma reação inflamatória local intensa.

3.3.5 Preparação das Amostras para Análise Histológica

A amostra implantada juntamente com o tecido que a envolvia foram imediatamente fixados em solução de Bouin por 24 horas, à temperatura ambiente.

O material fixado foi lavado com água, a seguir desidratado em um gradiente de álcool etílico (70,80,95 e 100%) e posteriormente embebido em parafina (Histosec- Merck). Cortes transversais de 6 a 8 μm de espessura foram obtidos em um micrótomo marca Leica e corados pelo método de HE (Hematoxilina/Eosina).

Os preparados histológicos obtidos foram analisados e fotografados em fotomicroscópio (Zeiss) com diferentes aumentos e os negativos foram posteriormente ampliados cerca de 4 vezes.

Capítulo 4

Resultados e Discussão

4.1 Ensaio de tração

Para que se possa trabalhar com uma membrana bioabsorvível necessitamos ter especificadas suas características mecânicas principalmente quanto aos esforços máximos aos quais ela poderá ser submetida durante o manuseio, durante processos de lavagem e esterilização, no momento da fixação ao tecido hospedeiro e no manejo para cultura de células *in vitro* quando for este o caso.

O conhecimento dos valores de tensão máximos que a membrana pode suportar sem danificar sua estrutura e comprometer seu desempenho como suporte para células é de suma importância para uma metodologia de obtenção segura e seriada de membranas, bem como é uma forma de avaliar a qualidade do material final obtido.

Numa etapa posterior, com a membrana já fixada ao tecido hospedeiro ou com a cultura de células *in vitro* já em andamento, começa a ocorrer a degradação do polímero, o que altera totalmente suas propriedades mecânicas. O acompanhamento das alterações destas propriedades em função do tempo no qual a membrana está submetida ao meio de degradação é outro dado essencial para a aplicação de membranas bioabsorvíveis.

Uma vez de posse destes dados é possível escolher entre um ou outro tipo de membrana conforme a aplicação desejada, além de podermos, através da alteração na composição da

membrana, sintetizarmos uma com velocidade de alteração nas propriedades mecânicas compatível com a velocidade de crescimento da matriz celular que irá substituí-la em sua função de suporte.

Os resultados obtidos para as membranas em teste mostraram que logo nos primeiros 10 dias de degradação, todos os tipos de membrana que continham plastificante em sua composição, ou seja, tipos 10%P, 15%P e 10%/10%P, ficaram muito frágeis tornando impossível manipulá-las para se efetuar os ensaios de tração nos tempos T=10,20 e 30 dias. A análise prosseguiu com as membranas 5% e 10% até o trigésimo dia. Os resultados obtidos para tensão máxima no limite do escoamento estão mostrados na figura a seguir:

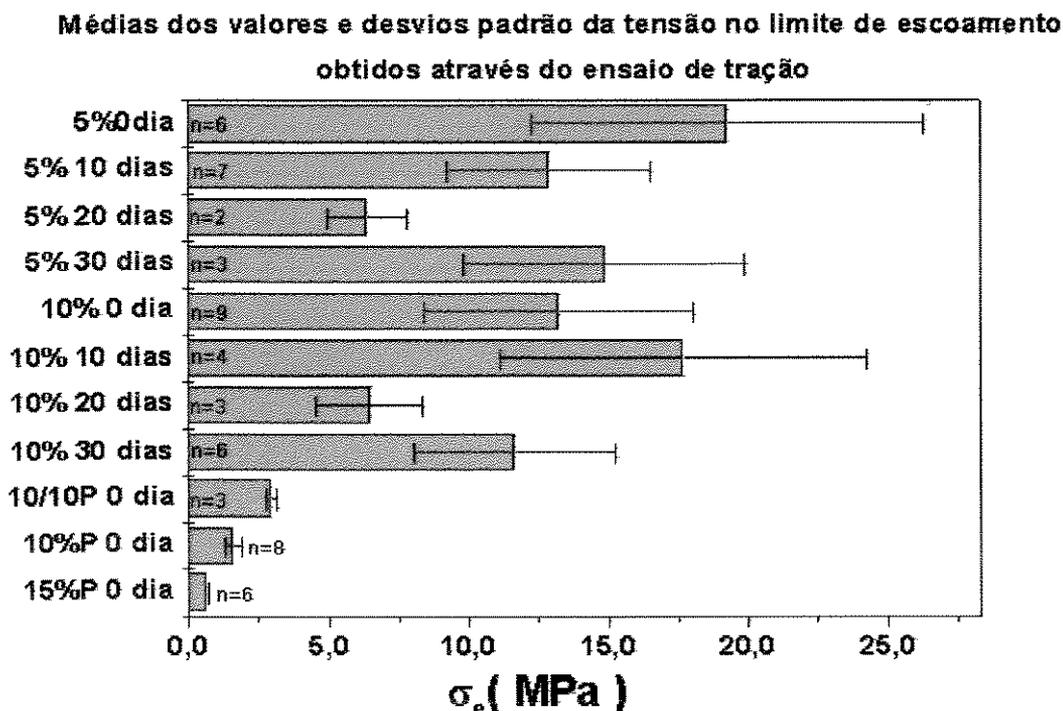


Figura 10 - Gráfico comparativo dos valores médios de tensão (σ_e) obtidos no limite de escoamento dos diferentes tipos de membranas nos tempos de degradação T=0,10,20,30; n é o número de ensaios. Somente as membranas 5% e 10% puderam ser ensaiadas até o trigésimo dia.

Nota-se que mesmo para o tempo T=0 de degradação, os valores de tensão das membranas com plastificante são bem inferiores aos das outras membranas. Isto porque o

plastificante permite um aumentando na mobilidade das cadeias poliméricas. Aplicando a análise estatística (t-Student bicaudal, através do programa Microcal Origin 4.0, assumindo um nível de significância de 5%) para comparar a significância das médias obtidas, constatamos que as médias das membranas com plastificante são significativamente diferentes entre si ($p < 0.05$), enquanto que os valores obtidos para as membranas tipo 5% e tipo 10% para os diferentes tempos de degradação não apresentaram diferença significativa ($p > 0.05$).

No entanto, se analisarmos apenas os valores de tensão, podemos estar escondendo outra propriedade mecânica importante das membranas, o alongamento, conforme mostra a figura abaixo:

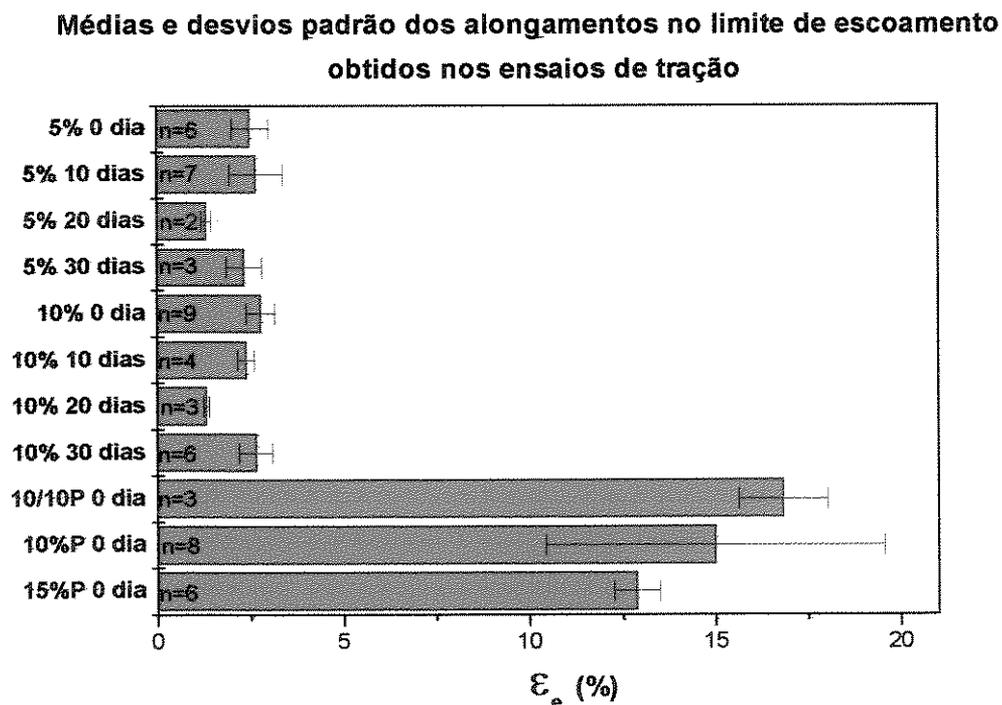


Figura 11 - Gráfico comparativo dos valores médios de alongamento (ϵ_e) obtidos no limite de escoamento dos diferentes tipos de membranas para os tempos de degradação $T=0, 10, 20$ e 30 dias.

Este gráfico mostra claramente a ação do plastificante, que, se de um lado diminui drasticamente a tensão, aumenta também drasticamente o alongamento. Isto é uma

característica muito importante na aplicação de membranas que devam ser flexíveis o bastante para acompanhar a movimentação e flexibilidade natural dos tecidos moles. Mais uma vez, a análise estatística mostrou que as médias obtidas para as membranas 5% e 10% não são significativamente diferentes ($p > 0.05$) quando comparadas entre si para todos os 4 tempos de degradação. Já quando comparamos as membranas com plastificante com as membranas sem plastificante, a diferença é estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Muitos polímeros não seguem a lei de Hooke de proporcionalidade na zona elástica, apresentando uma componente adicional viscoelástica que dissipa energia. Para estes materiais, a inclinação da tangente à curva tensão x deformação para baixos valores de tensão é usualmente tomada como o módulo de elasticidade (E). Os resultados obtidos utilizando esta metodologia de cálculo estão nas figuras 12 A) e 12 B).

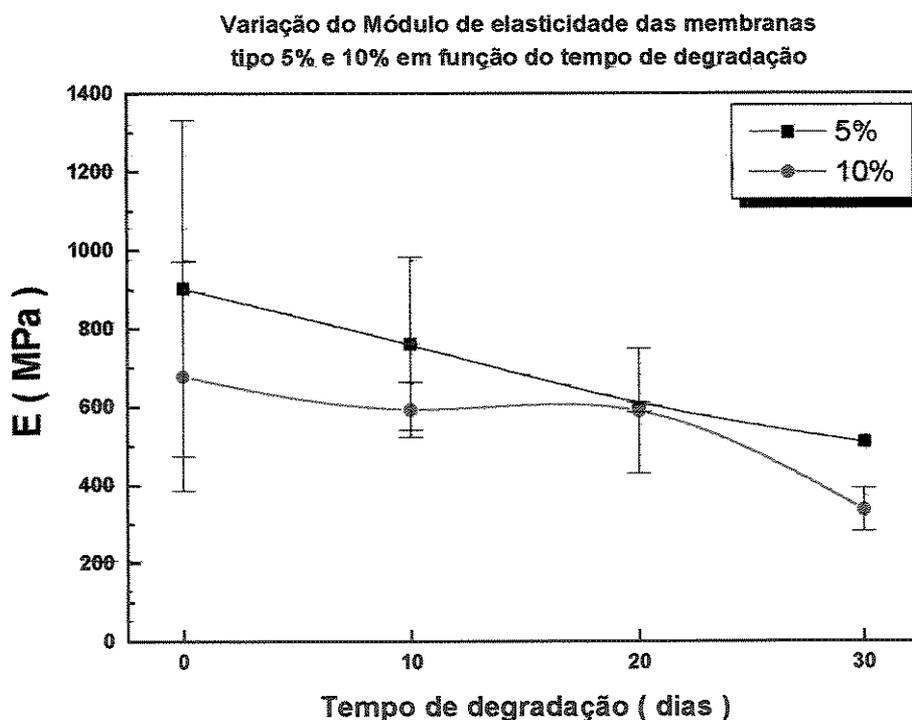


Figura 12 A

Comparação entre os módulos de elasticidade das membranas com plastificante. Tempo de degradação=0

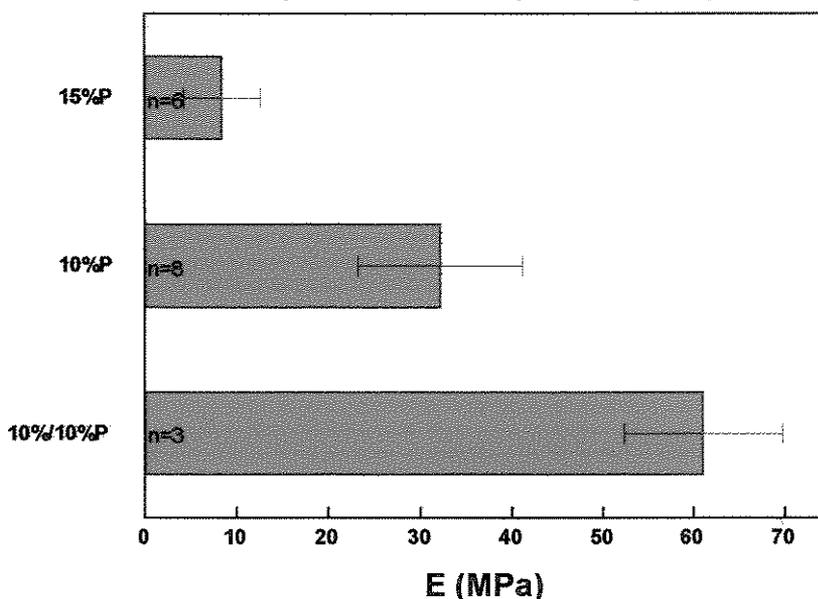


Figura 12 B

Figura 12 - A) Gráfico comparativo da evolução dos valores médios de módulo de elasticidade e respectivos desvios padrão obtidos para as membranas sem plastificante tipo 5% e tipo 10% em função do tempo de degradação. **B)** Módulos de elasticidade e desvios padrão das membranas com plastificante, sem degradação. Observar que os valores são bem mais baixos do que os obtidos para as membranas sem plastificante no tempo T=0 dia..

Podemos verificar através da figura 12 A uma redução no valor do módulo de elasticidade em função do tempo de degradação. No entanto a análise estatística mostrou que apenas para a membrana 10% 30 dias ocorre um redução significativa ($p < 0.05$) em relação aos outros tempos de degradação, T=0,10,20. Nos outros casos a variação encontrada não foi estatisticamente significativa ($p > 0.05$). Quando comparamos as duas membranas para um mesmo tempo de degradação, também não encontramos diferença significativa entre os valores dos módulos, a não ser para o tempo T=10 dias.

A figura 12 B mostra valores do módulo de elasticidade para as membranas com plastificante para $T = 0$ dias de degradação. A análise estatística dos dados mostraram que as médias obtidas são significativamente diferentes entre as membranas. Não é surpresa que o maior módulo entre as membranas seja o da 10%/10%P, pois esse era o objetivo quando acoplamos uma membrana mais resistente (10%) a uma mais frágil (10%P).

No entanto, o valor obtido para o módulo desta membrana, cerca de 60 MPa, foi muito mais próximo do valor de uma membrana 10%P, 30 MPa, do que do valor de módulo de uma membrana 10%, 700 MPa. A explicação para este fato pode ser visualizada através das micrografias eletrônicas via MEV, onde nota-se que a membrana 10% (figura 29) no processo de deposição acabou se difundindo pela membrana 10%P, havendo então distribuição do plastificante por toda a membrana. Além disso, outros dois fatores devem ser considerados: a quantidade de solução polímero-solvente tipo 10% colocada sobre a membrana já seca 10%P não foi controlada, apenas o nível total do molde foi observado e a espessura final da membrana não ficou muito maior do que a de uma 10%P, o que indica que a quantidade de solução 10% colocada foi bem pequena. O resultado obtido foi, na verdade, uma membrana monocamada com menos concentração de plastificante.

A explicação para a diferença nos valores de módulo(E) entre as membranas 15%P e 10%P, uma das hipóteses supostas é que a maior concentração de polímero na solução polímero-solvente tenha favorecido a formação de esferulitos maiores, o que tem como consequência propriedades mecânicas inferiores na maioria dos polímeros. No entanto, não foi feita uma análise detalhada do tamanho médio dos esferulitos destas membranas para que se pudesse ser feita uma comparação.

A caracterização mecânica das membranas de PLLA sintetizadas por dissolução em solvente permitiu quantificar os valores máximos que cada tipo de membrana pode suportar, uma vez que os valores de tensão e alongamento utilizados para a análise são os admissíveis, ou suportáveis, e não os de ruptura, exceção para os casos em que a membrana sofria uma fratura frágil, ainda dentro da zona elástica. De qualquer forma, um valor especificado como sendo, por exemplo, 70% a 90% desta força pode ser utilizado para se especificar uma

aplicação para um ou outro tipo de membrana, levando em consideração também o alongamento e a flexibilidade desejada.

Pode-se constatar também que as membranas com adição de 10% (v/v) de plastificante apresentam um comportamento mecânico extremamente elástico porém com pouca resistência mecânica, o que limita sua aplicação a casos em que os esforços são bem pequenos ou em pequenas áreas. Neste sentido, um estudo da variação na quantidade de plastificante adicionado em função da variação das propriedades mecânicas, pode permitir obter membranas com as características de tensão e alongamento desejadas.

Tsuji et al., 1994, obtiveram membranas de PLLA puro e analisaram variações nas propriedades mecânicas em função do tratamento térmico em várias temperaturas. Relacionaram essas propriedades com o grau de cristalinidade.

Tabela 1: Dados de propriedades mecânicas e grau de cristalinidade para membranas de PLLA puro, após tratamento térmico (Tsuji & Ikeda, 1995):

Cristalinidade (%)	Tensão (Mpa)	Módulo (Mpa)	Alongamento (%)
46	50	1810	85
49	57	1990	39
51	57	1850	17
52	57	2000	10
57	59	2110	6

De acordo com Tsuji & Ikeda, podemos verificar que os valores de tensão, módulo de elasticidade e alongamento estão intimamente vinculados aos valores de cristalinidade. O aumento da cristalinidade aumenta também a tensão e módulo mas diminui o alongamento.

Cordewener et al., 1995, investigaram as propriedades físicas, mecânicas e histológicas de filmes obtidos a partir de 96% de PLLA e 4% de PDLA formando poli(96L/ 4D ácido láctico). Os dados mostraram que as propriedades mecânicas decrescem linearmente durante as 7 primeiras semanas, sendo que após 3 semanas observaram uma queda de 50% no valor inicial, de 51,3 para 27.5 MPa. O módulo de elasticidade decresceu gradativamente e a variação foi de 3.4 para 1.8 GPa após 7 semanas.

Quando comparamos os valores de tensão obtidos através de ensaios de tração para o PLLA com os valores obtidos na literatura um aspecto que deve ser considerado é que poucos são os autores que realizam uma análise estatística dos resultados para avaliar se os resultados são significativos do ponto de vista estatístico. Outro fator importante é o critério utilizado pelo autor quanto aos pontos considerados na curva tensão x deformação para cálculo da tensão, alongamento e módulo de elasticidade. Alguns utilizam a tensão de ruptura, outros a tensão no limite de escoamento, outros nem mencionam qual foi a tensão utilizada. Quanto ao módulo de elasticidade, sua determinação para certos tipos de polímeros é um problema pois muitas vezes não há um comportamento linear inicial na curva, dificultando o traçado da tangente que indentifica o módulo. Por isso, tem sido contestada a utilização do valor de módulo de elasticidade para a comparação de propriedades de polímeros, sendo mais recomendado o valor de módulo de elasticidade dinâmico, obtido através da técnica de DMA (Dynamic Mechanical Analysis), que no entanto, ainda não estava disponível para realização de ensaios na época do experimento.

Não foi encontrado na literatura nenhum dado a respeito de caracterização mecânica de membranas de PLLA obtidas com adição de plastificante.

4.2 Resultados do GPC

As medidas da variação da massa molar são uma indicação da ocorrência do processo de degradação em polímeros. Quando o processo de degradação é acompanhado em função do tempo pode-se obter informações a respeito de quão mais lento ou mais rápido é o processo.

Foram realizadas medidas da variação da massa molar para as membranas de PLLA nos tempos T=0,20 e 30 dias. Dados da massa molar média em número (M_n), em peso (M_w), viscosimetria (M_z) e polidispersividade podem ser visualizados na figura a seguir:

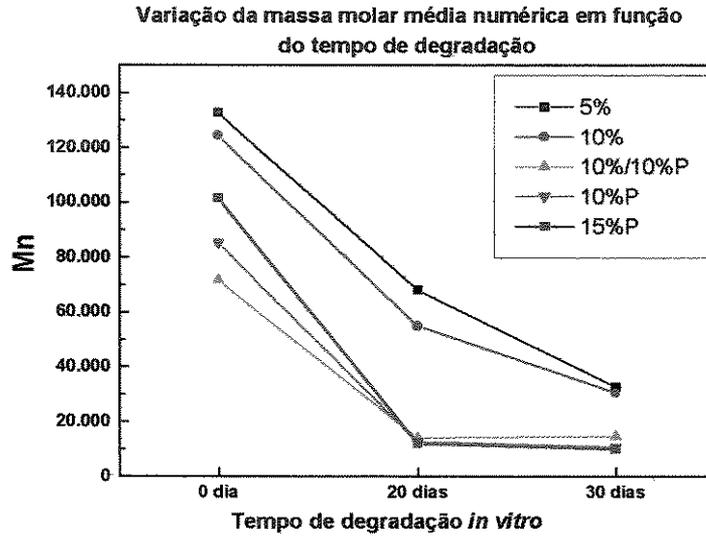


Figura 13 - Gráfico mostrando a variação no valor de Mn de todas as membranas em função do tempo de degradação *in vitro*.

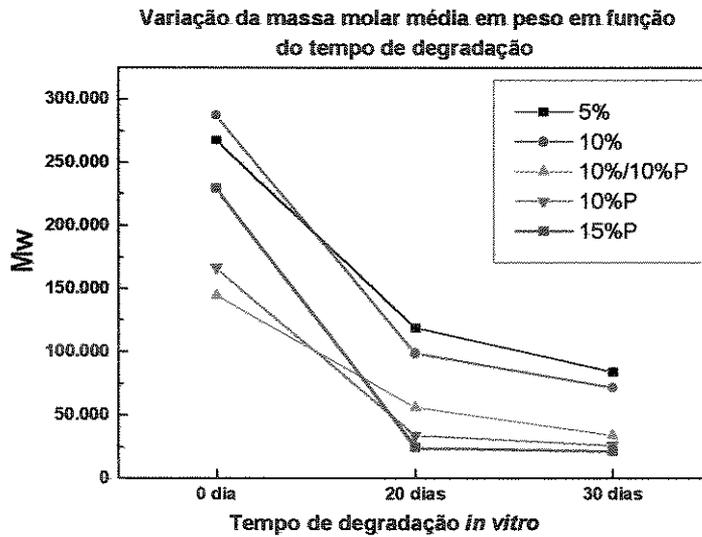


Figura 14 - Gráfico mostrando a variação de Mw em função do tempo de degradação para todas as membranas.

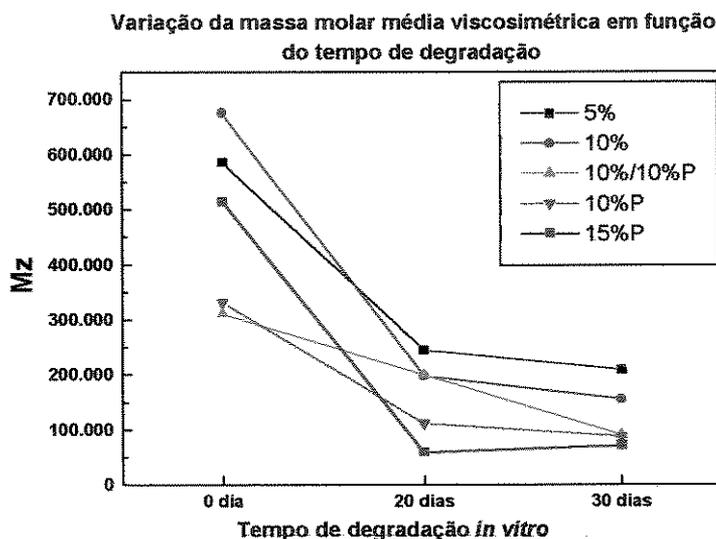


Figura 15 - Gráfico mostrando a redução de Mz em função do tempo de degradação para todas as membranas

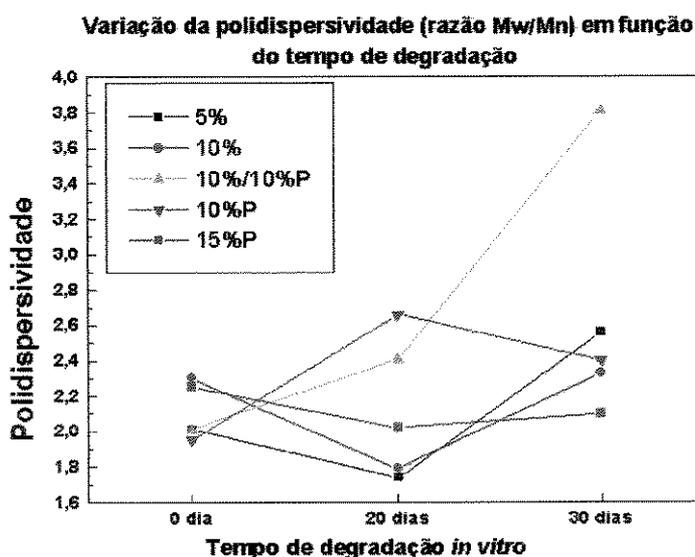


Figura 16 - Polidispersividade (razão Mw/Mn) em função do tempo de degradação, para todas as membranas.

Podemos verificar uma diminuição dos valores de Mn, Mw e Mz em função do tempo de degradação para todas as membranas, com um decréscimo mais acentuado entre os tempos T=0 e T=20 dias em relação à T=20 e T=30 dias. Além disso, verifica-se uma perda muito

maior de massa molar para as membranas contendo plastificante, como ocorreu com as propriedades mecânicas.

Os cromatogramas para as membranas tipo 5% e 10% apresentam uma distribuição larga e monomodal (uma curva única) até 30 dias. As membranas contendo plastificante, mostram uma distribuição bimodal na região de baixa massa molar, após 20 dias. Os resultados do GPC mostrando a diminuição da massa molar aliado ao fato das membranas com plastificante estarem submetidas a uma temperatura acima da transição vítrea (T_g), ajudam a explicar o aumento de cristalinidade encontrado nas análises de DSC.

Valores de polidispersividade, figura 16, apresentam consideráveis flutuações mas esse comportamento é confirmado pela literatura [PISTNER et al., 1993 ; LAM et al., 1994], deve-se considerar que estamos relacionando M_n e M_w , os quais são dependentes do processo de degradação, ou seja, quando o cromatograma mostra um comportamento monomodal, a possibilidade de erro na escolha dos pontos para integralização da curva é menor.

Entretanto, na medida em que o processo de degradação se propaga, verifica-se um comportamento bimodal e no final de longos tempos de degradação verifica-se que a curva volta a ser monomodal.

Li³ et al., 1990; confirmaram esse comportamento quando estudaram amostras semi cristalinas de PLLA e afirmaram que o comportamento bimodal está relacionado a oligômeros formados a partir da clivagem dos arranjos cristalinos, muitas vezes formados por tamanhos de cadeias diferentes. Com a degradação, verifica-se uma tendência a permanecer uma quantidade maior de comprimentos de cadeias semelhantes e no final obtém-se uma curva monomodal.

Dados de GPC mostraram uma diferença significativa no processo de degradação comparando-se as membranas com e sem plastificante, complementando os resultados obtidos por DSC e propriedades mecânicas.

4.3 Resultados do DSC

A técnica de calorimetria diferencial de varredura, também chamada de calorimetria exploratória de varredura, é muito útil para se determinar variações da cristalinidade durante o processo de degradação. Estes dados são obtidos comparando-se a entalpia de fusão de uma dada amostra do polímero com a entalpia de fusão teórica, supondo o polímero 100% cristalino, valor obtido na literatura [FISCHER et al., 1973].

Assim, podemos obter informações sobre a temperatura de transição vítrea (Tg), relacionada com as regiões amorfas do polímero, um pico endotérmico de fusão (Tm) e um exotérmico de cristalização (Tc) relacionados com as regiões cristalinas do material.

Para o cálculo do grau de cristalinidade, utiliza-se a equação abaixo: [CAM et al., 1995]

$$\% \chi = \frac{\Delta H_f - \Delta H_c}{\Delta H_{f100\%}} \times 100$$

onde;

χ é o grau de cristalinidade (%);

ΔH_f = entalpia de fusão experimental (J/g);

ΔH_c = entalpia de cristalização experimental (J/g);

$\Delta H_{f100\%}$ = entalpia de fusão teórica para o polímero 100% cristalino.

As figuras a seguir, mostram os termogramas para os cinco tipos de membrana de PLLA sintetizados :

4.3 Resultados do DSC

A técnica de calorimetria diferencial de varredura, também chamada de calorimetria exploratória de varredura, é muito útil para se determinar variações da cristalinidade durante o processo de degradação. Estes dados são obtidos comparando-se a entalpia de fusão de uma dada amostra do polímero com a entalpia de fusão teórica, supondo o polímero 100% cristalino, valor obtido na literatura [FISCHER et al., 1973].

Assim, podemos obter informações sobre a temperatura de transição vítrea (Tg), relacionada com as regiões amorfas do polímero, um pico endotérmico de fusão (Tm) e um exotérmico de cristalização (Tc) relacionados com as regiões cristalinas do material.

Para o cálculo do grau de cristalinidade, utiliza-se a equação abaixo: [CAM et al., 1995]

$$\% \chi = \frac{\Delta H_f - \Delta H_c}{\Delta H_{f100\%}} \times 100$$

onde;

χ é o grau de cristalinidade (%);

ΔH_f = entalpia de fusão experimental (J/g);

ΔH_c = entalpia de cristalização experimental (J/g);

$\Delta H_{f100\%}$ = entalpia de fusão teórica para o polímero 100% cristalino.

As figuras a seguir, mostram os termogramas para os cinco tipos de membrana de PLLA sintetizados :

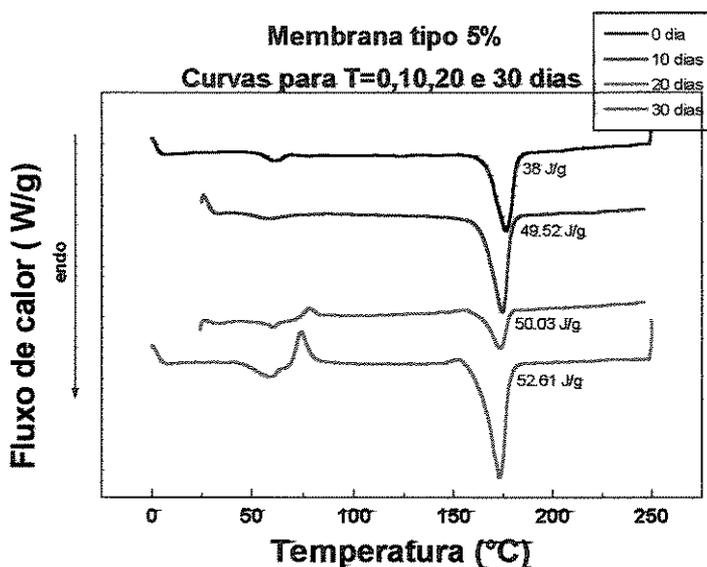


Figura 17: Termogramas de membranas tipo 5% para os tempos de degradação T=0,10,20 e 30 dias. Observar que existe uma transição na curva entre 50 e 60 °C, indicando a Tg. Notar também o aumento da entalpia de fusão (J/g) principalmente entre T=0 e T=10 dias e um pico de fusão endotérmico entre 173 a 176 °C.

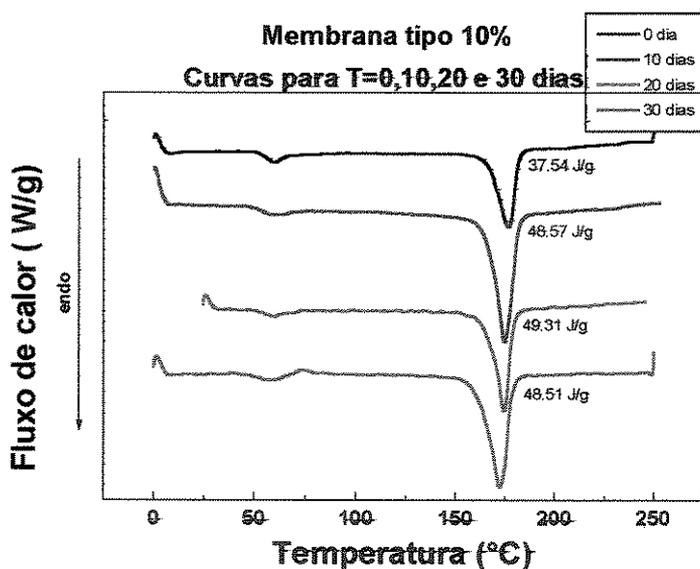


Figura 18: Termogramas de membranas tipo 10% para os tempos de degradação T=0,10,20 e 30 dias. Novamente pode ser notado uma transição vítrea entre 49 e 55 °C, indicando a Tg e o aumento da entalpia de fusão entre T=0 e T=10 dias, além da Tm entre 172 e 176 °C .

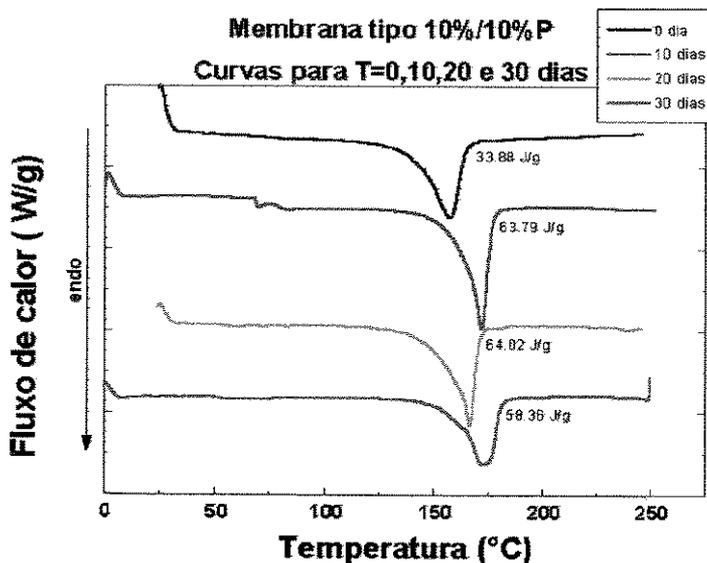


Figura 19: Termogramas de membranas tipo 10%/10%P para os tempos de degradação T=0,10,20 e 30 dias. Notar o aumento na entalpia de fusão mais pronunciado do que nas membranas anteriores, sem plastificante. Uma transição vítrea, T_g, menos pronunciada, nítida apenas para T=10 dias a 52 °C, e T_m variando 157 a 173 °C.

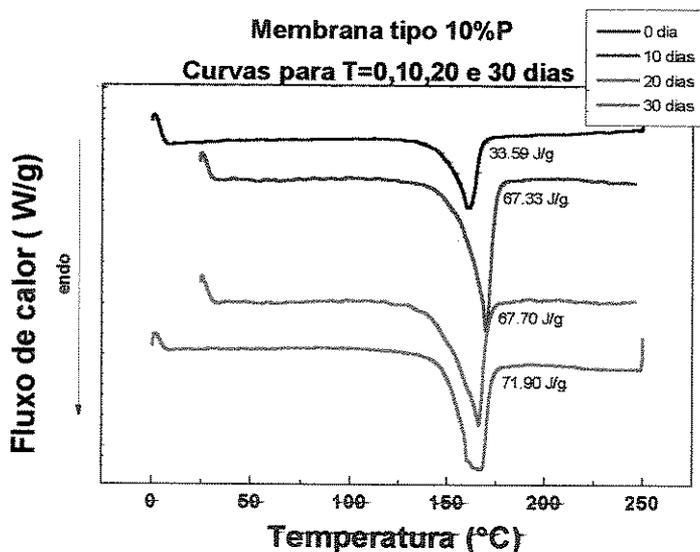


Figura 20: Termogramas de membranas tipo 10%P para os tempos de degradação T=0,10,20 e 30 dias. Notar o desaparecimento da transição vítrea e aumento da entalpia de fusão (J/g) e T_m entre 160 - 169 °C.

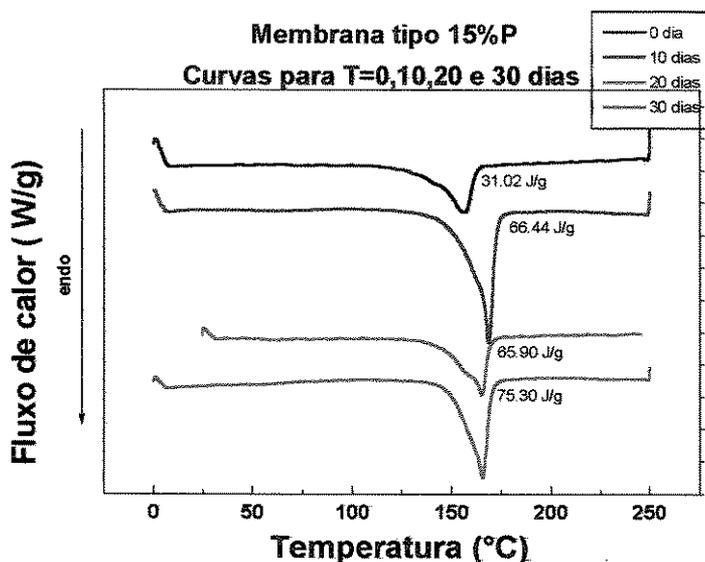


Figura 21: Termogramas de membranas tipo 15%P para os tempos de degradação T=0,10,20 e 30 dias. Aqui também pode-se observar uma aumento na entalpia de fusão em função do tempo de degradação, mais pronunciada entre T=0 e T=10 dias. Tm na faixa de 156 a 168 °C.

Basicamente, as amostras apresentam um pico de fusão endotérmico (Tm) na faixa de 165 a 176 °C e uma transição vítrea (Tg) na faixa de 50 a 57 °C, conforme mostram as figuras 17 a 21. Para todas as membranas verifica-se um aumento do grau de cristalinidade em função do tempo de degradação e para as membranas com plastificante, uma Tg abaixo de 0 °C.

O gráfico da figura 22 mostra a variação da Tg das membranas 5% e 10% em função do tempo de degradação. Embora a Tg tenha variado muito pouco ao redor de 53 °C, existe uma tendência a diminuir com o decorrer do processo de degradação. Isso pode ser explicado devido à degradação das partes amorfas que acaba permitindo uma maior mobilidade das cadeias.

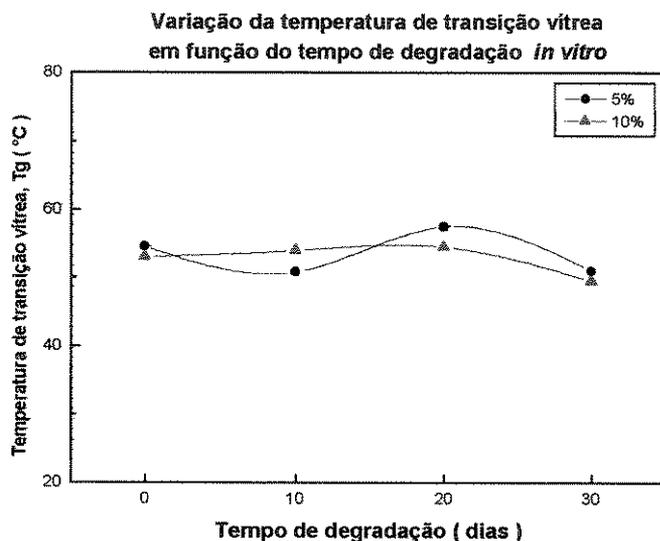


Figura 22: Variação dos valores de temperatura de transição vítrea para as membranas tipo 5% e 10% (as membranas com plastificante não apresentaram Tg acima de 0 °C).

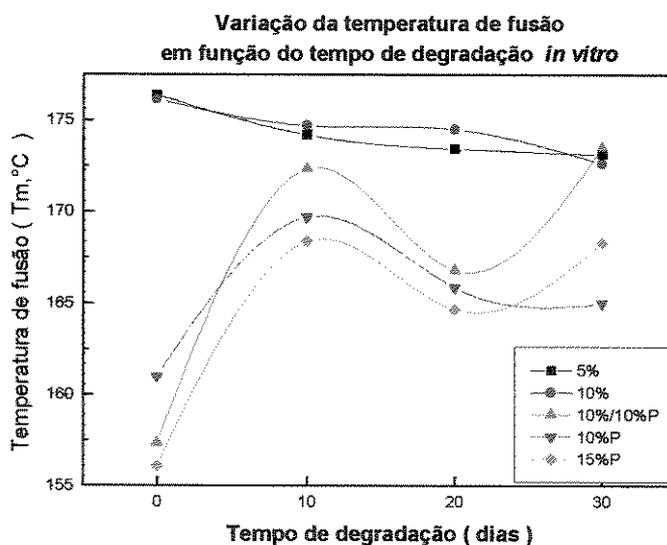


Figura 23: Variação da temperatura de fusão (T_m) em função do tempo de degradação para os cinco tipos de membranas.

Pela figura 23 podemos observar que a T_m das membranas sem plastificante sofre pouca variação mas decresce linearmente até o trigésimo dia de degradação *in vitro*, já nas membranas com plastificante os valores de T_m não apresentam uma estabilidade nem indicam uma tendência no comportamento. Além disso verifica-se nesses casos um alargamento do pico de fusão (figuras 19 a 21), podendo ser explicado pelo aumento no grau de cristalinidade

devido a formação de novos cristais. Essa diferença é mais evidente se observarmos a figura 24:

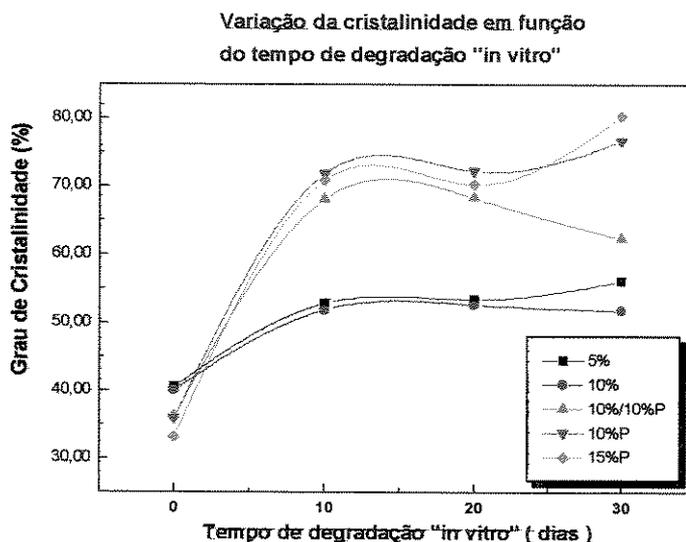


Figura 24: Este gráfico compara o aumento do grau de cristalinidade para os cinco tipos de membrana em função do tempo de degradação *in vitro*. Observe que para os três tipos de membranas com adição de plastificante, o aumento é bem mais pronunciado.

Valores do grau de cristalinidade a partir da entalpia de fusão indicam um aumento do grau de cristalinidade para todos os tipos de membranas e esse aumento é mais acentuado para as membranas contendo plastificante e nos 10 primeiros dias de imersão em tampão fosfato.

Existe uma controvérsia na literatura para explicar o aumento do grau de cristalinidade com o aumento do tempo de degradação. A maioria dos autores afirmam que ocorre um rearranjo das cadeias menores geradas pelo próprio processo de degradação e como consequência formação de novos cristais, enquanto outros acreditam que a medida que a parte amorfa do polímero degrada, permanece uma maior porcentagem de fase cristalina.

O processo de degradação de poliésteres, como é o caso do poli(ácido -lático), é devido à hidrólise das ligações ésteres, à qual ocorre nas regiões amorfas do polímero. Isto pode explicar o aumento da cristalinidade também observado por esses autores. [LI¹ et al., 1990]; [LEENSLAG² et al., 1987].

O processo de degradação é mais complexo do que relacionar partes amorfas e cristalinas. Grizzi et al. em 1995, usando diferentes placas de PDLA amorfo observaram que o processo de degradação é heterogêneo e que é mais rápido no centro do que na superfície, quando em contato com o meio aquoso.

Assim, o autor resume esse processo nos seguintes passos: inicialmente a amostra é homogênea, em contato com o meio aquoso inicia-se a hidrólise e conseqüentemente clivagem das ligações ésteres, confirmado pela diminuição da massa molar. No início do processo é provável que a degradação ocorra na superfície devido ao gradiente de absorção de água, mas pode se dissolver mais facilmente no meio comparado com os localizados no centro. A concentração de grupos finais carbonila aumenta no centro e passa a catalisar o processo.

Esse comportamento auto catalítico mostra-se ser geral para o processo de degradação nos poliésteres alifáticos. Entretanto, esse processo é dependente da estrutura química e configuracional das cadeias poliméricas, além da morfologia dos dispositivos. [LI¹ et al., 1990]

Lam et al., 1994, confirmaram essa hipótese ao mostrarem que membranas não porosas de PLLA degradam mais rapidamente do que membranas porosas, pois no caso das membranas não porosas o efeito auto catalítico é favorecido enquanto que para as porosas ocorre a facilidade na dissolução dos produtos.

Nas membranas em estudo, temos que considerar que o plastificante age dando maior mobilidade às cadeias poliméricas e diminui a Tg. A ação do plastificante diminuindo a interação entre as cadeias pode explicar a diminuição no grau de cristalinidade inicial das membranas 10%P, 15%P, e 10%/10%P, quando comparados com as membranas 5% e 10%, de acordo com a figura 24. Por outro lado verifica-se um aumento pronunciado no grau de cristalinidade das membranas com plastificante após 10 dias em tampão fosfato em relação aos valores obtidos para as membranas 5% e 10%.

Conforme mostrado nas figuras 19 e 21 o plastificante diminui a Tg para temperaturas abaixo de 0 °C. Assim, quando submetidas ao banho em tampão fosfato a 37 °C as membranas encontram-se acima da Tg e as cadeias apresentam mobilidade, facilitando o rearranjo entre

elas, durante o processo de degradação. A mobilidade das cadeias favorece a formação de cristais e conseqüentemente aumenta o grau de cristalinidade. Esse fenômeno é favorecido também pela formação de cadeias menores devido ao processo de degradação.

No caso das membranas de PLLA em estudo, conforme poderá ser visualizado através das micrografias através de MEV, distingue-se duas morfologias: as membranas 10% e 5% mostram uma morfologia densa e as membranas contendo plastificante uma morfologia porosa e globular.

Comparando-se os nossos resultados com os obtidos por Lam et. Al., 1994, era de se esperar que as membranas com plastificante apresentassem um maior aumento no grau de cristalinidade em função do tempo de degradação, resultado oposto ao encontrado. Esses resultados nos levam a concluir que o plastificante exerce um efeito mais acentuado no processo de degradação do que o efeito devido à diferença morfológica entre as membranas, ou seja o efeito da mobilidade das cadeias prevalece sobre a morfologia.

O aumento da cristalinidade é verificado mesmo para as membranas amorfas. Estudos realizados com copolímeros PLA37.5/PGA25, completamente amorfos mostraram através de análise de DSC que o copolímero apresenta uma Tg na faixa de 50-55 °C. Após 12 semanas em tampão fosfato, além da Tg, apresentam um pico de fusão na faixa de 95-100 °C, indicando a formação de regiões cristalinas confirmadas por análises de Raio-X. Tg também pode diminuir devido ao efeito plastificante da água. No caso do copolímero, é influenciada pela composição; quanto maior a porcentagem de ácido glicólico em relação ao ácido láctico mais rápido é o processo de degradação. [LI² et al. , 1990].

Porém devemos lembrar que no caso das membranas porosas obtidas através da adição de plastificante, a ação do mesmo diminuindo a Tg e dando maior mobilidade à cadeia é muito mais marcante do que esse processo, e sua degradação acaba sendo muito mais rápida, como observamos nos resultados dos ensaios de tração e GPC. Essa estrutura porosa e a estrutura densa das outras membranas podem ser visualizadas através das micrografias realizadas através de MEV.

4.4 Caracterização Estrutural das Membranas usando MEV

A morfologia das membranas, principalmente no que diz respeito ao tamanho e distribuição dos poros, exerce fundamental importância na adesão celular. Uma membrana porosa, no entanto, tende a ser mais frágil quanto a esforços mecânicos conforme foi demonstrado no item 4.1. Porém, deve-se levar em consideração que um teste *in vitro* não avalia de maneira completa a perda de propriedades mecânicas de uma membrana, pois não leva em conta a invasão celular e produção de matriz extracelular sobre a membrana que pode acabar reforçando-a.

As micrografias eletrônicas obtidas das membranas permitem claramente identificar diferenças fundamentais entre o aspecto morfológico das membranas e as mudanças causadas pela degradação. Enquanto as membranas sem plastificante apresentaram uma estrutura basicamente densa e lisa, com raras formações esferulíticas, as membranas nas quais foi adicionado plastificante, apresentaram um estrutura completamente porosa, formada por esferulitos da ordem de 60 a 100 μm de diâmetro com uma superfície totalmente rugosa. Figura 25.

A medida que o tempo de degradação avança, começam a surgir pontos de erosão na superfície das membranas sem plastificante que se espalham por toda a membrana de forma uniforme. Figura 26.

Já nas membranas com plastificante, o processo de degradação pode ser notado pelo surgimento de trincas que se iniciam no centro dos esferulitos e se propagam no sentido radial. Com o decorrer do processo, o esferulito se rompe ou acaba se soltando da membrana. As maiores mudanças do ponto de vista morfológico podem ser observadas a partir do décimo dia de degradação *in vitro*. Figura 34.

A sequências de micrografias a seguir mostram o aspecto dos cinco tipos de membranas durante os trinta dias de degradação em que durou o teste *in vitro*.

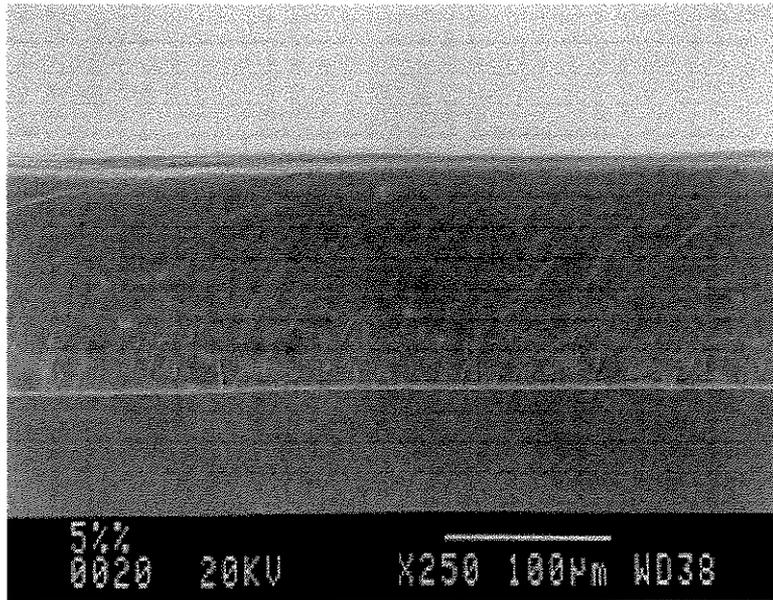


Figura 25: Micrografia da superfície de fratura de uma membranas tipo 5% sem degradação, mostrando que a membrana é densa em seu interior.

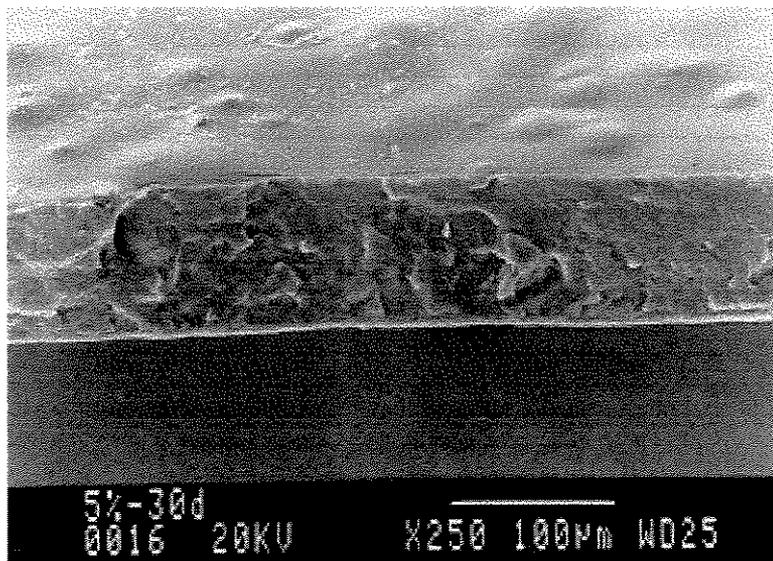


Figura 26: Micrografia da superfície de fratura de uma membranas tipo 5% com trinta dias de degradação, mostrando formações arredondadas na superfície indicando esferulitos semi-formados e pequenos pontos brancos resultantes da erosão causada pela degradação.

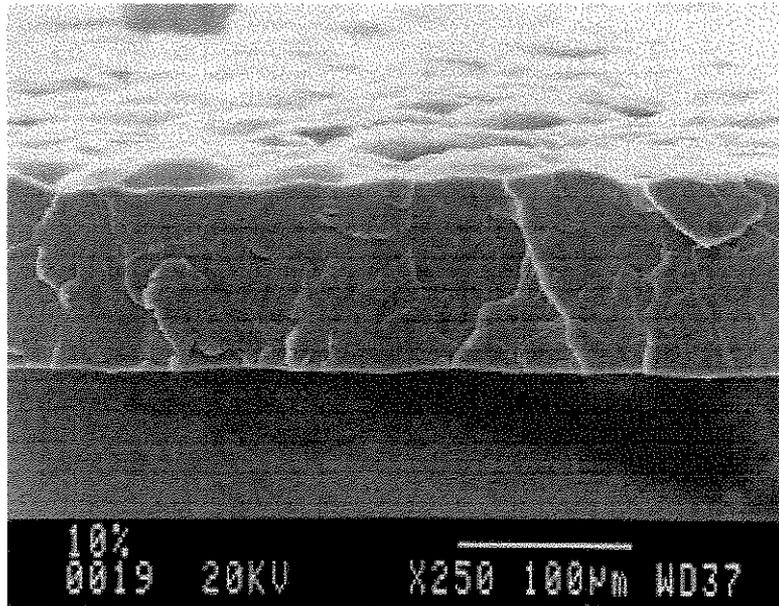


Figura 27: Micrografia da superfície de fratura de uma membrana tipo 10% sem degradação, mostrando também que existem esferulitos semi-formados na superfície porém o interior da membrana mostra-se denso como a membrana 5%.

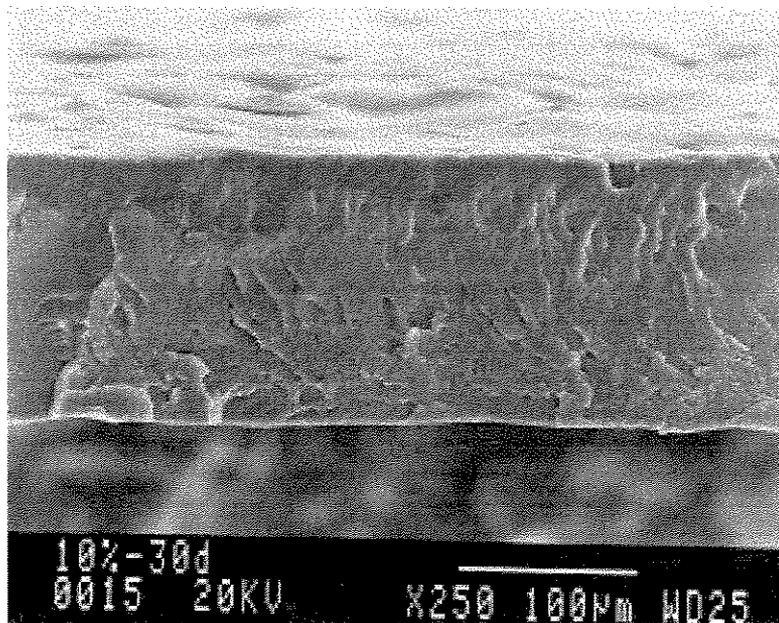


Figura 28: Micrografia da superfície de fratura de uma membranas tipo 10% com trinta dias de degradação, mostrando que o interior da membrana continua denso porém a região da fratura apresenta-se com microtrincas(tons brancos) causados pela degradação.

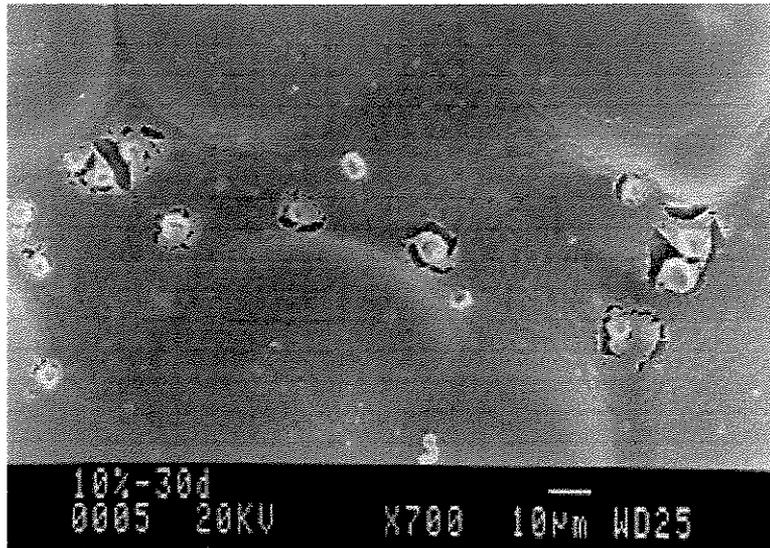


Figura 29 : Micrografia da superfície de uma membrana densa tipo 10% com trinta dias de degradação mostrando detalhes da forma dos semi-esferulitos. Notar os pontos de erosão devido a degradação nos quais a membrana começa a se romper.

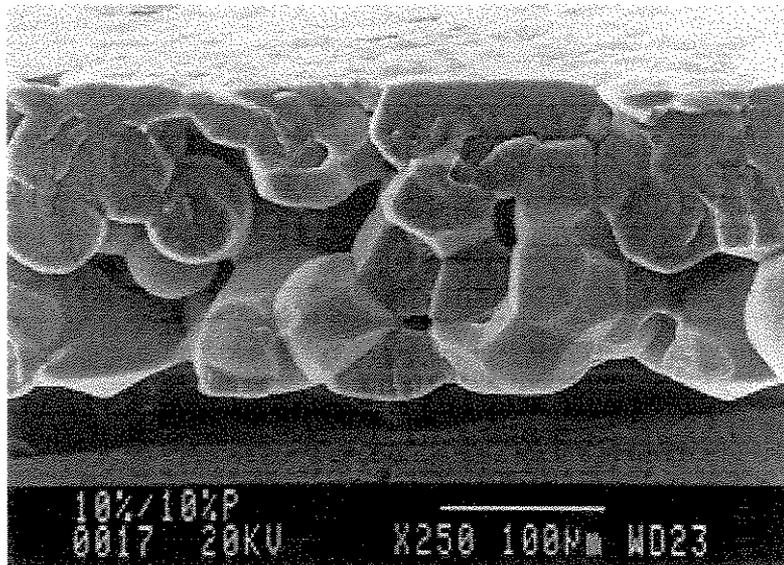


Figura 30 : Micrografia da superfície de fratura de uma membrana tipo 10%/10%P, sem degradação, mostrando que a membrana na verdade é formada por um aglomerado de esferulitos e uma superfície mais densa. Notar os poros resultantes deste empilhamento de esferulitos

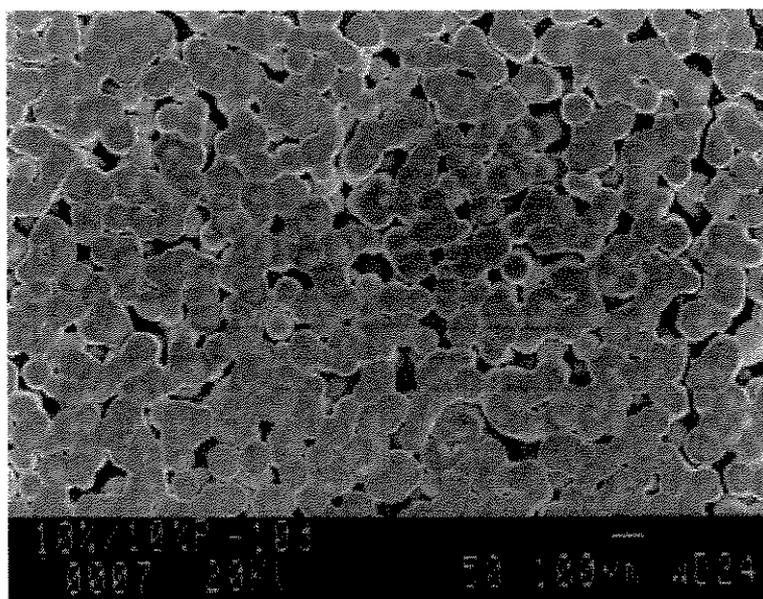


Figura 31 :Micrografia da superfície inferior (lado 10%P) de uma membrana tipo 10%/10%P com dez dias de degradação mostrando a forma de aglomerado de esferulitos do qual é composta a membrana, formando uma rede porosa interconectada.

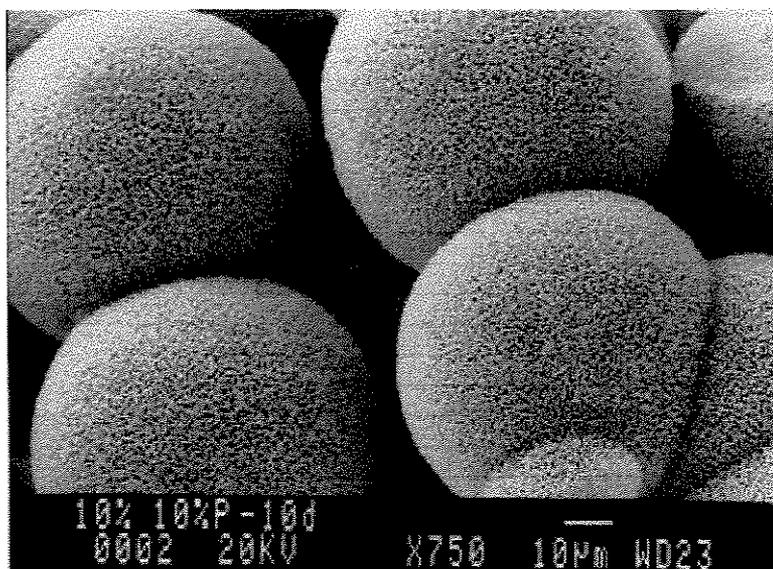


Figura 32 -Micrografia mostrando um detalhe da superfície de fratura de uma membrana 10%/10%P com 10 dias de degradação mostrando que os esferulitos que formam a membrana tem uma superfície rugosa.

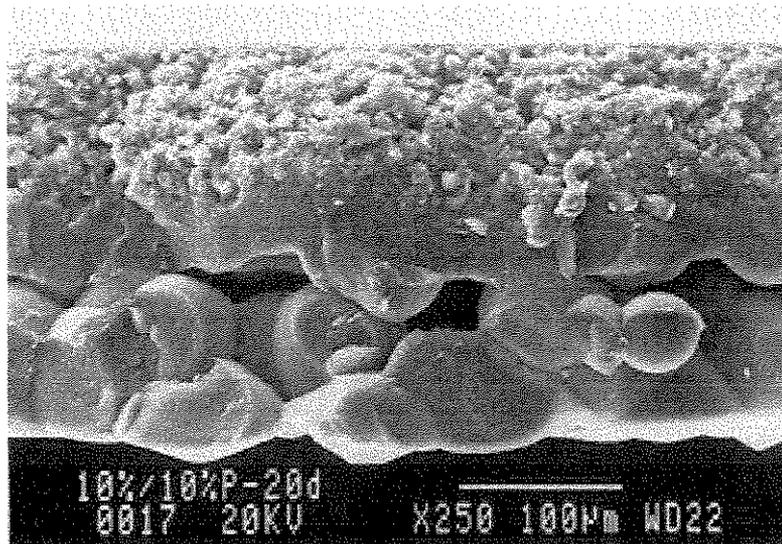


Figura 33: Micrografia da superfície de fratura de uma membrana tipo 10%/10%P após vinte dias de degradação *in vitro*. Notar que a parte superior encontra-se já bem erodida pela degradação.

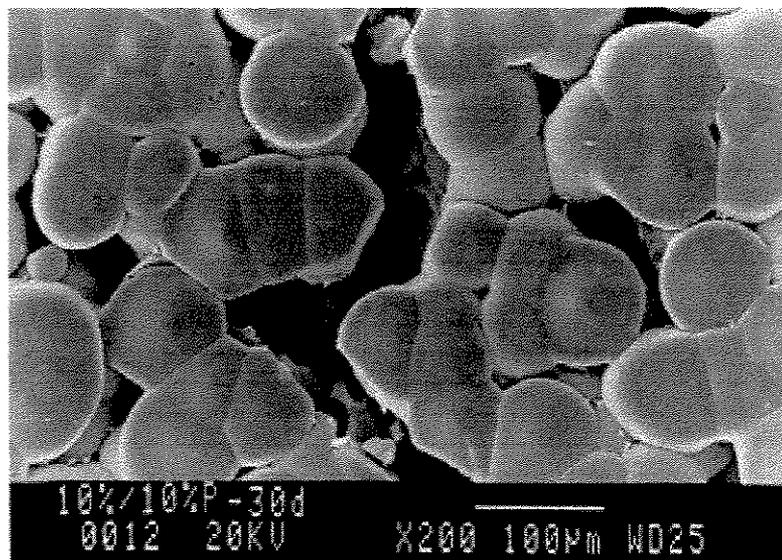


Figura 34: Micrografia da superfície inferior (lado 10%P) de uma membrana tipo 10%/10%P após trinta dias de degradação *in vitro*. Nesse estágio de degradação os esferulitos já estão se separando, e a membrana está totalmente fragilizada. Notar que a membrana está se rompendo pela na região de contato entre os esferulitos, e não através do rompimento dos mesmos.

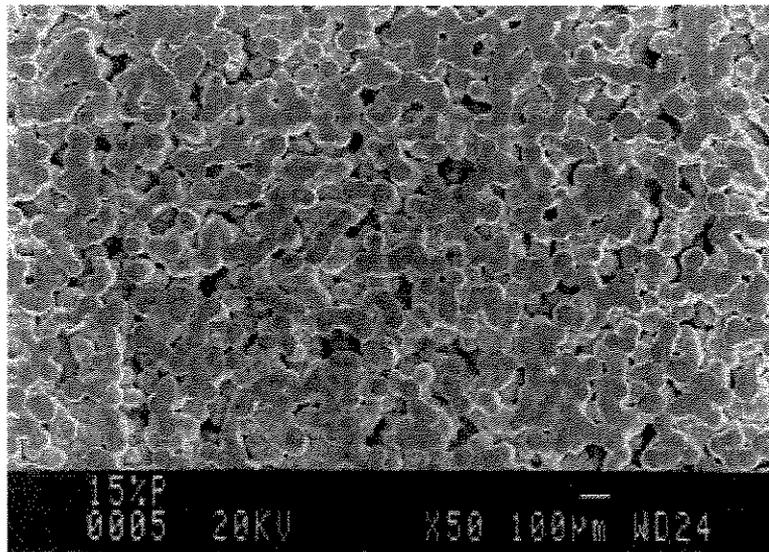


Figura 35: Micrografia da superfície de uma membrana tipo 15%P, sem degradação, mostrando o aglomerado de esferulitos, presentes em todas as membranas com plastificante.

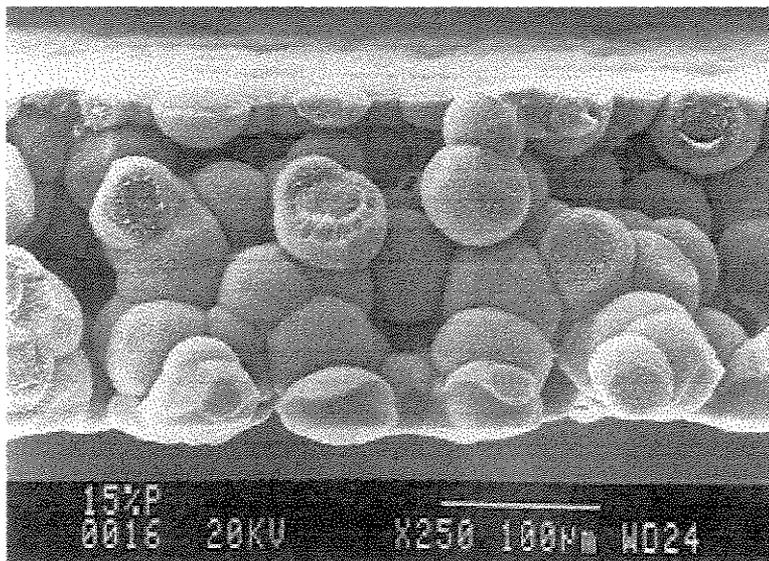


Figura 36: Micrografia da superfície de fratura de uma membrana tipo 15%P, sem degradação. As membranas com plastificante apresentaram sempre um mesmo tipo de estrutura, um aglomerado de esferulitos rugosos.

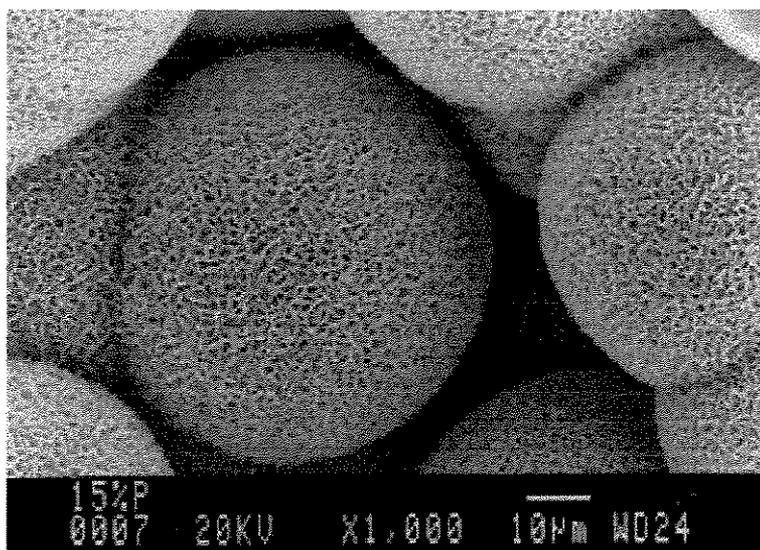


Figura 37: Micrografia de uma membrana tipo 15%P, sem degradação mostrando detalhes da superfície dos esferulitos, muito semelhante aos das outras membranas com plastificante.

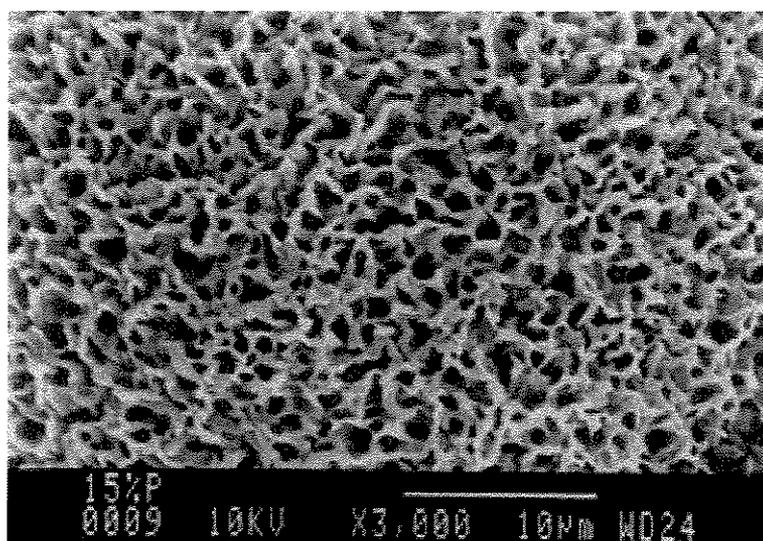


Figura 38: Micrografia mostrando um detalhe da superfície de um esferulito de uma membrana tipo 15%P sem degradação. Observe a superfície porosa e rugosa, presente em todas as membranas em que foi adicionado plastificante.

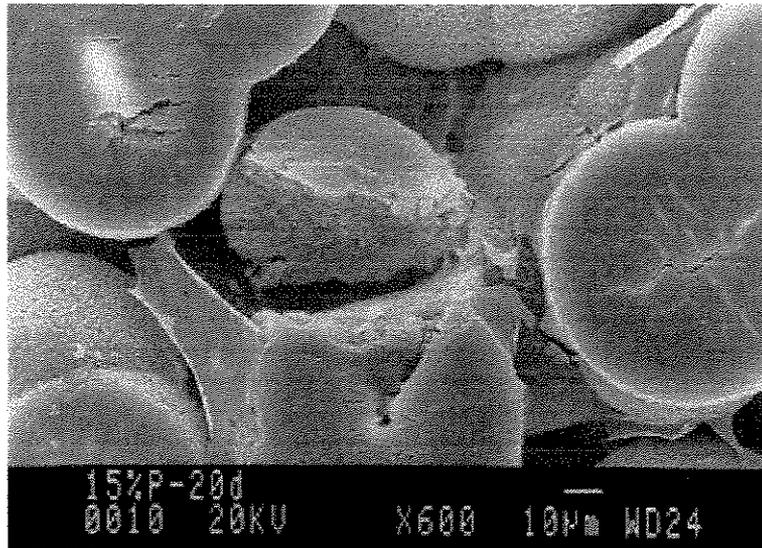


Figura 39: Micrografia mostrando a superfície de uma membrana tipo 15%P com vinte dias de degradação. Notar que os esferulitos começam a trincar do centro para fora devido à degradação, até que se dividem totalmente (centro do foto). Este mesmo fenômeno foi observado por Carter, 1984.

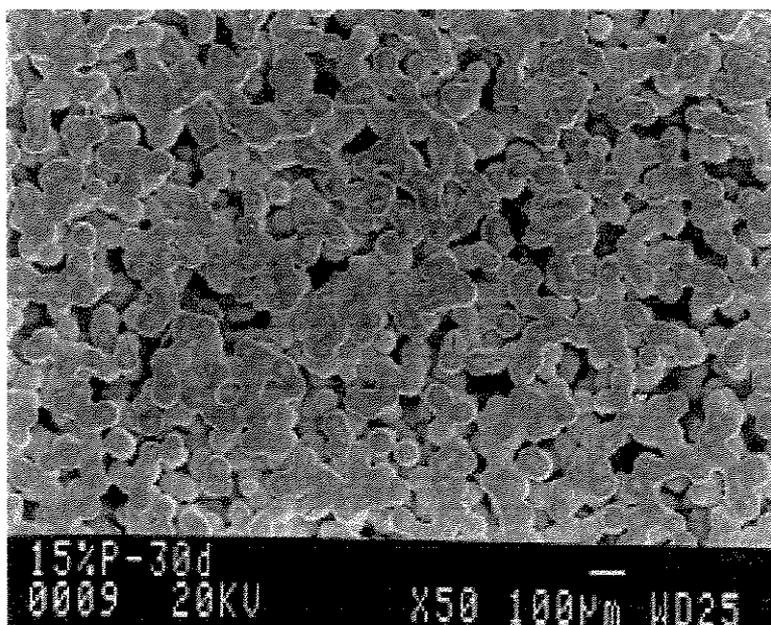


Figura 40: Micrografia mostrando o aspecto geral do processo de degradação ocorrendo em toda a extensão de uma membrana tipo 15%P com trinta dias de degradação. Notar que a quase totalidade dos esferulitos apresentam trincas em seu centro.

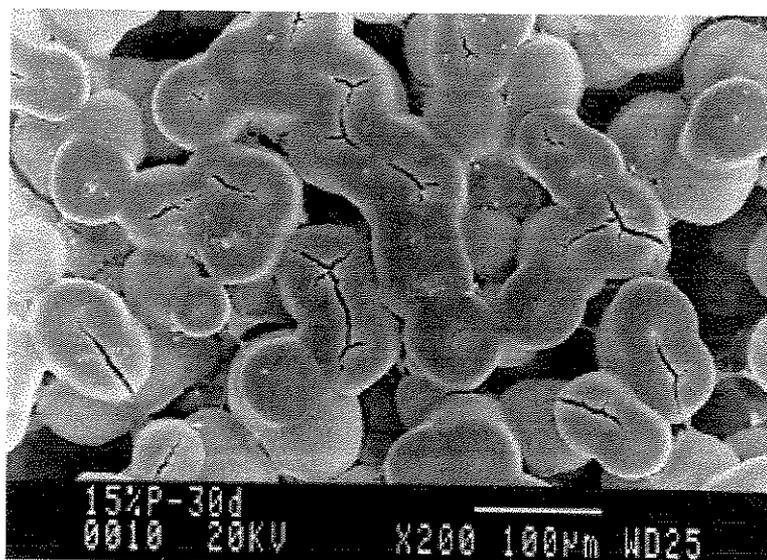


Figura 41: Micrografia mostrando o aspecto das trincas no centro dos esferulitos de uma membrana tipo 15%P, com trinta dias de degradação.

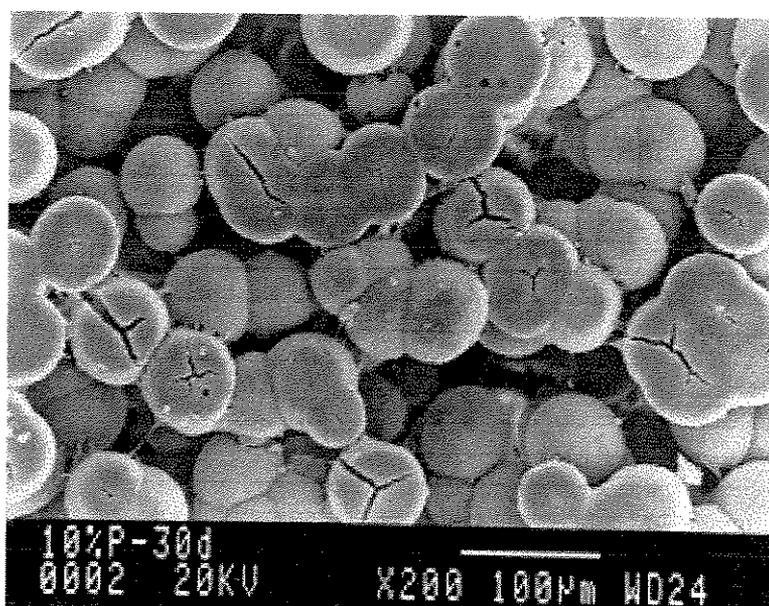


Figura 42 : Micrografia de uma membrana tipo 10%P, com 30 dias de degradação. A morfologia é muito semelhante a da membrana 15%P, porém aparentemente os esferulitos apresentam um diâmetro médio menor.

Claramente, quando a porosidade de um material aumenta, a resistência e a complacência mudam. Geralmente a resistência diminui com o aumento da porosidade, devido não somente a diminuição da quantidade de material, mas também devido a fatores relacionados a concentração de tensões. A taxa de perda das propriedades mecânicas da membrana é um fator determinante no sucesso do implante. Essa taxa deve ser compatível com a invasão celular e produção de matriz extracelular que irá substituir a membrana.

4.5 Resultados do ensaio *in vivo*

4.5.1 Análise macroscópica

A análise *in vivo* é necessária para avaliar a resposta do tecido ao implante. A morfologia, porosidade, composição e tensão superficial influenciam na resposta tecidual. Nesse sentido, os diferentes tipos de membranas sintetizados foram implantados em ratos para avaliar o nível de resposta inflamatória aos implantes. De posse destes resultados pode-se verificar até que ponto as alterações na metodologia utilizada para a confecção das membranas e sua composição têm influência na resposta biológica.

Nas amostras sem plastificante (tipos 5% e 10%), não foi constatada boa adesão do tecido hospedeiro às membranas durante os trinta dias de implante. Isto dificultou até mesmo a obtenção dos cortes histológicos no micrótomo pois o fragmento de membrana cortado não permanecia no local em que estava implantado após o corte no micrótomo.

As membranas com plastificante (tipos 10%P, 10%/10%P e 15%P) foram de tal forma incorporadas ao tecido hospedeiro que foi muitas vezes difícil localizá-las macroscopicamente nas amostras de tecido implantado.

Em nenhum dos casos foi notado regiões que pudessem indicar necroses ou qualquer reação inflamatória grave através de análise macroscópica das regiões implantadas durante a retirada das amostras. Não houve sinais de alteração no comportamento em nenhum dos ratos

e não foi observada nenhuma diferença significativa entre os ratos de um mesmo grupo quanto a resposta aos implantes ou cicatrização dos cortes cirúrgicos.

4.5.2 Microscopia de luz

A análise ao microscópio de luz do fragmento de tecido onde foi realizado o implante da membrana tipo 5% mostrou que em nenhum dos cortes foi possível manter o fragmento da membrana devido a pouca adesão do tecido a mesma, ficando apenas o registro de sua presença através da marca deixada e da reação inflamatória indicada pela presença maciça de células ao redor da membrana. Uma fibrose encapsulando a membrana, numa típica reação de corpo estranho, foi observada (figuras 43 e 44).

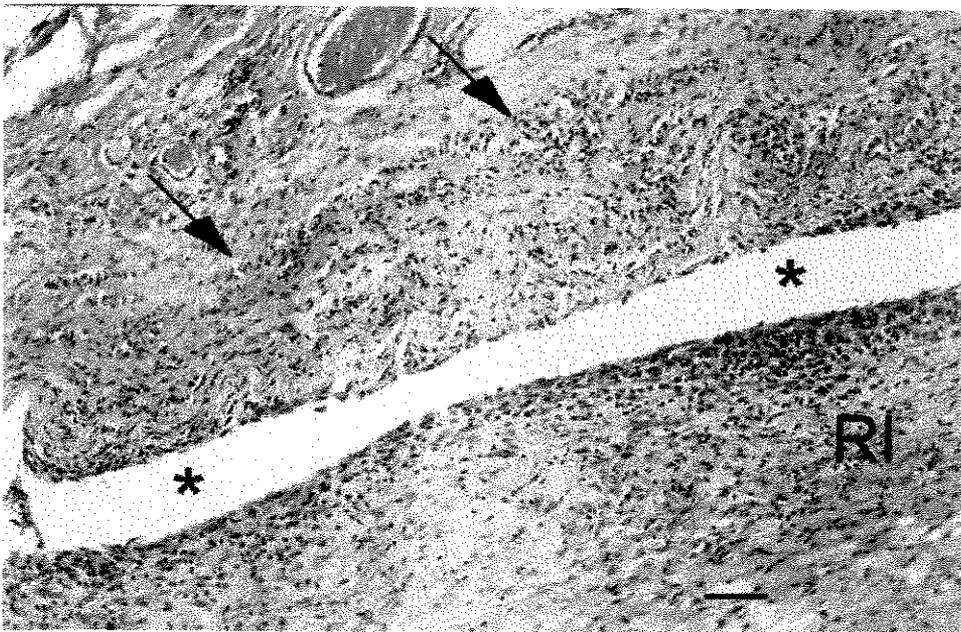


Figura 43 - Micrografia mostrando o corte histológico da região do implante de uma membrana do tipo 5%. Observar a cápsula fibrosa (setas), local onde a membrana estava inserida (*), leve reação inflamatória (RI) Barra = 104µm. Tempo de implante = 30 dias.

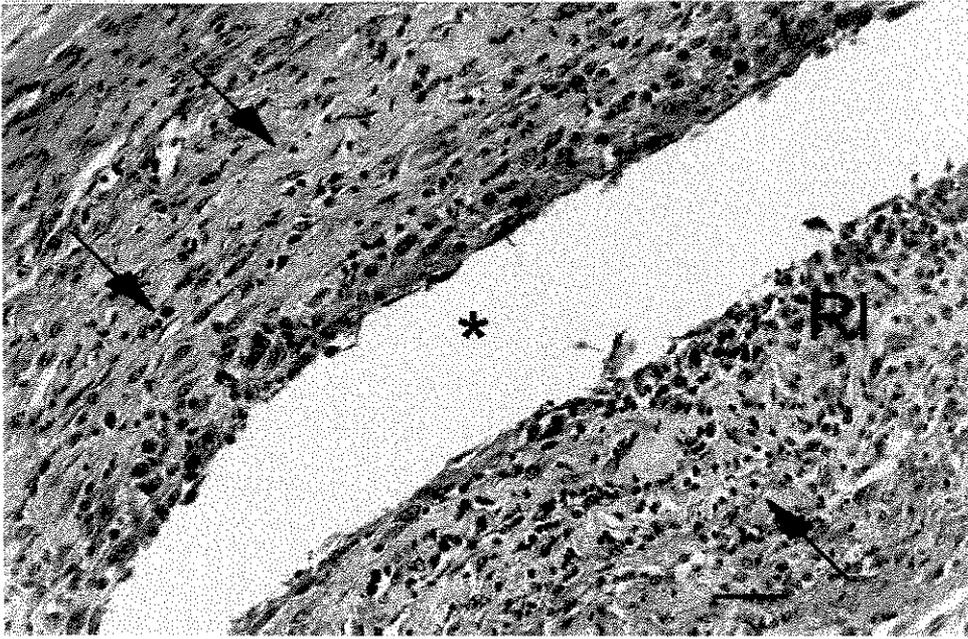


Figura 44- Micrografia mostrnado um detalhe da figura anterior, no local do implante. Notar a cápsula fibrosa (setas) com discreta reação inflamatória (RI). Barra = 40 μ m. Tempo de implante = 30 dias.

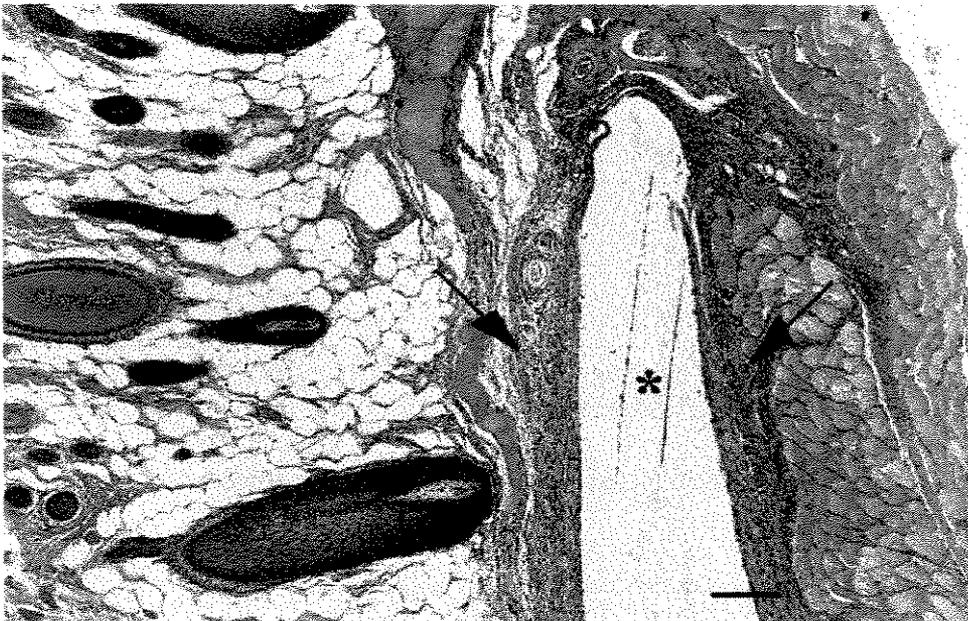


Figura 45- Micrografia de um corte histológico da região do implante de uma membrana do tipo 10%. Observar a cápsula fibrosa (setas) envolvendo a membrana (*) deslocada de posição mas com as bordas visíveis devido à adesão de algumas células. Barra = 208 μ m. Tempo de implante = 30 dias.



Figura 46 - Micrografia do corte histológico do local do implante da membrana tipo 10%/10%P. Observar a fragmentação da membrana (*) que se encontra em íntimo contato com o tecido hospedeiro. Barra = 406 μ m. Tempo de implante = 30 dias.

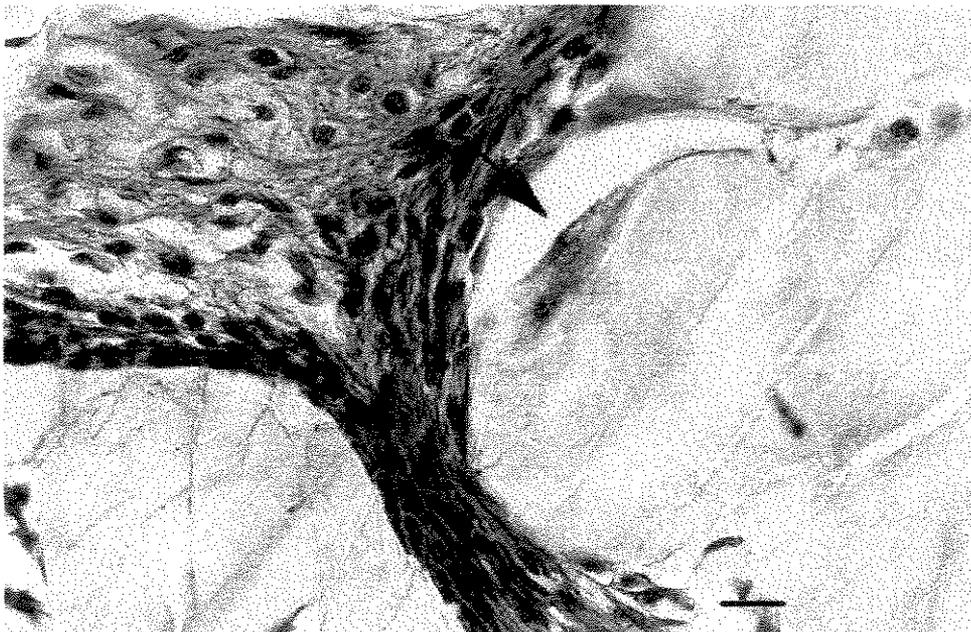


Figura 47 - Micrografia mostrando detalhe da figura anterior, revelando células gigantes de corpo estranho (seta) em contato direto com a membrana. Barra = 26 μ m. Tempo de implante = 30 dias.

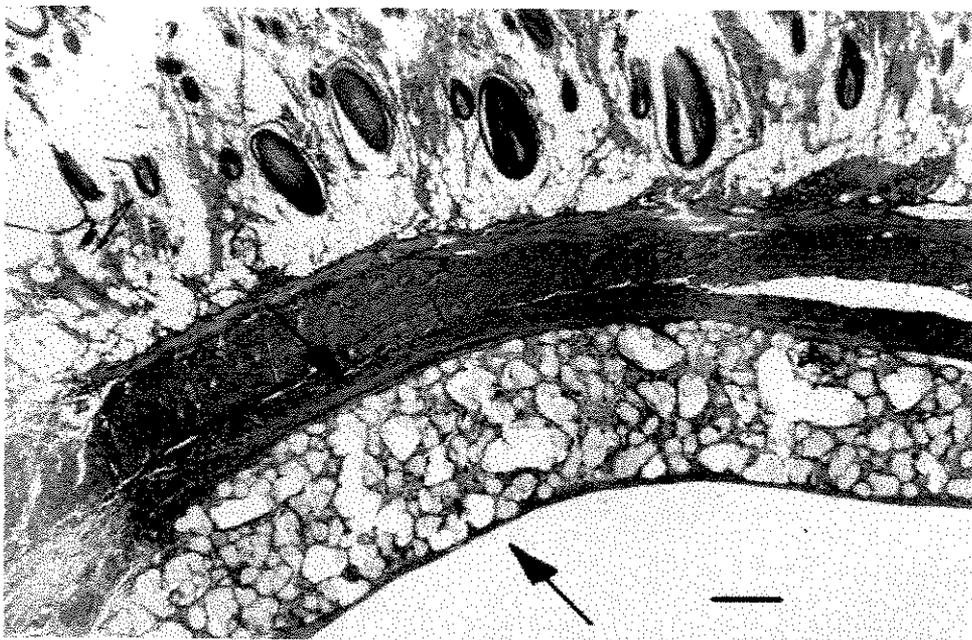


Figura 48 - Micrografia de corte histológico do local do implante da membrana tipo 10%P, mostrando-a totalmente fragmentada (entre as setas) e invadida pelo tecido hospedeiro. Barra = 406 μm . Tempo de implante = 30 dias.

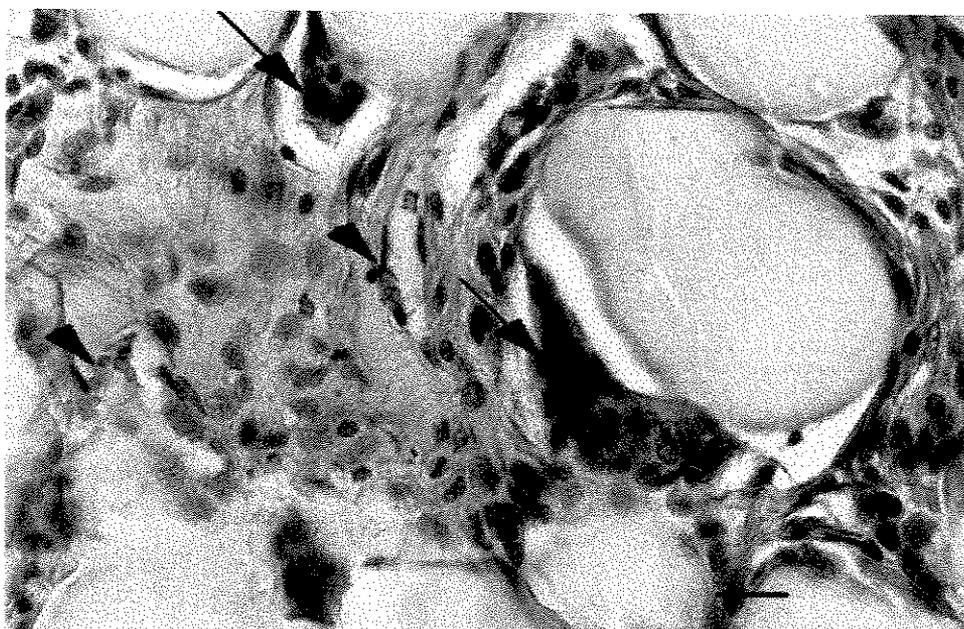


Figura 49 - Micrografia mostrando detalhe da figura anterior. Notar célula gigante de corpo estranho (seta) e capilares (cabeça de seta). Barra = 26 μm . Tempo de implante = 30 dias.

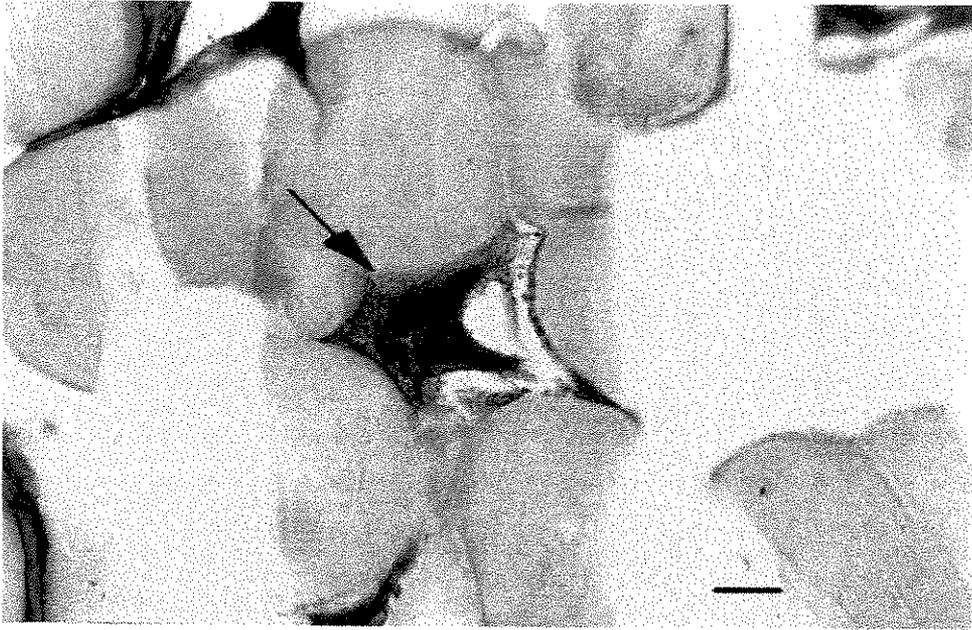


Figura 50 - Micrografia mostrando célula gigante de corpo estranho (seta) totalmente inserida entre esferulitos de uma membrana tipo 15%P. Barra = 26 μ m. Tempo de implante = 30 dias.

A análise dos implantes da membrana tipo 10% revelou que este implante foi muito semelhante ao da membrana tipo 5%, excluindo-se o fato de que nele é possível visualizar-se fragmentos da membrana nos cortes(Figura 45).

Foram observadas também algumas células aderidas à superfície da membrana, indicadas pela linha reta de pontos pretos que acompanha o corte, já que a membrana é completamente transparente. Observou-se também uma reação inflamatória moderada no local do implante. Nenhum fragmento da membrana pode ser visto nos tecidos ao redor do implante, indicando que a degradação ainda não havia atingido a membrana a ponto da mesma começar a se fragmentar.

A observação dos implantes de membrana tipo 10%/10%P (figuras 46 e 47) mostraram claramente que a ação do plastificante altera totalmente a reação do tecido ao implante. Na figura 46 observa-se um aspecto geral da membrana e do tecido ao redor, mostrando que a membrana foi totalmente invadida por células em toda a sua espessura e já se encontra bem degradada. Podemos notar que a membrana está totalmente fraturada e aderida ao tecido

hospedeiro, com sobreposição de fragmentos da membrana. A explicação encontrada é que esta sobreposição ocorreu devido a movimentação do animal, já que não se trata de separação das camadas das membranas, já que cada fragmento tem a espessura total inicial da membrana.

Os implantes das membranas tipo 10%P mostram nas figuras 48 e 49 uma total invasão da membrana pelo tecido, sem sinais de inflamação. A presença de neovascularização na espessura da membrana bem como algumas células gigantes de corpo estranho podem ser observados na figura 49. A membrana já não possui mais uma estrutura única, mas sim um aglomerado de corpos globulares unidos por prolongamentos do tecido hospedeiro.

As fotos da membrana que contém a maior concentração de polímero, a membrana tipo 15%P mostram resultados muito semelhantes aos da membrana 10%P, sem sinais de inflamação e um elevado grau de degradação. A figura 50 mostra em detalhe os esferulitos formados e uma célula gigante aderida entre eles. A invasão pelo tecido conjuntivo mostra-se completa e uniforme. Assim como na membrana anterior, a membrana já não tem mais função estrutural, e sim só existe como membrana por estar unida pelo tecido.

Os resultados obtidos permitem dividir as membranas em dois tipos distintos:

- Membranas densas (5% e 10%) que provocam leve reação inflamatória após 30 dias de implante, nas quais não há adesão de tecido nem sinais de degradação. Do ponto de vista biológico, a reação ao implante ocorreu sem inflamações severas nem edemas, ao menos até o período de trinta dias. Pelos resultados observados, estas membranas podem ser indicadas para GTR ou qualquer outra técnica de recuperação que necessite isolamento entre tecidos através de uma membrana biocompatível com longo tempo de degradação.

- Membranas porosas (10%P, 10%/10%P e 15%P); que provocam uma reação inflamatória muito discreta, nas quais ocorre uma fácil e significativa invasão celular que acelera o processo de degradação da membrana que torna-a fixada ao tecido hospedeiro. As indicações para estas membranas seriam os casos em que necessita-se um suporte para crescimento celular, como no caso de reconstrução de tecidos.

Capítulo 5

Conclusões

A análise dos resultados mostram que a adição do plastificante melhora muito a interação tecido-membrana, porém a membrana perde rapidamente suas propriedades mecânicas conforme foi demonstrado no capítulo 4. Outro fator importante observado é que o plastificante que foi utilizado por Silva et al. em 1985 e Schugens et al. em 1995 para tubos de regeneração guiada de células neurais, e utilizado neste trabalho para dar flexibilidade e porosidade às membranas, não exerceu nenhuma ação inibidora de crescimento celular, durante os trinta dias durante os quais os implantes permaneceram implantados.

Conciliar as propriedades mecânicas com a reação ao implante pode tornar esta membrana muito útil para aplicações como cultura e implante de tecidos ou recuperação de lesões como as causadas por queimaduras. A sequência de eventos histológicos associados com o crescimento de tecido indica claramente a necessidade de uma estrutura suficientemente porosa para se obter a regeneração tecidual e fixação biológica.

Todas as análises indicaram que as membranas com plastificante degradam muito mais rapidamente do que as sem plastificante. Isto limita a sua aplicação a técnicas de recuperação de lesões ou cultura celular onde ocorra uma rápida migração e invasão de células, para que a matriz extracelular passe a repor a estrutura degradada da membrana e o tecido se forme.

Os ensaios mecânicos mostraram que a quantidade de plastificante utilizada (10% v/v) reduziu significativamente o módulo de elasticidade das membranas, que não ultrapassou o valor de 60 MPa e, 10 dias após, já não era nem possível testá-las devido a fragilidade. Por outro

lado, as membranas sem plastificante apresentaram um módulo de elasticidade da ordem de 900 MPa, e mantiveram as propriedades mecânicas por muito mais tempo.

Dados de DSC mostraram que o plastificante reduz a Tg, o que acelera o processo de degradação devido a maior mobilidade das cadeias, já que a membrana quando implantada estará a uma temperatura superior a Tg, ou seja, 37 °C, temperatura do corpo. Verificou-se um aumento do grau de cristalinidade em função do tempo de degradação e esse aumento foi mais acentuado para as membranas com plastificante. O aumento no grau de cristalinidade é favorecido pelas cisões das cadeias conforme mostrado pelos dados de GPC, as quais passam a se rearranjar mais facilmente.

As micrografias obtidas através de MEV mostraram uma diferença marcante na morfologia das membranas. Enquanto as membranas sem plastificante mostraram ser completamente densas, as membranas com plastificante mostraram uma estrutura composta de um aglomerado de esferulitos de aproximadamente 100 µm de diâmetro que formando uma rede de poros interconectados. Este tipo de morfologia tem sido citado na literatura [COOMBES² et al., 1992] como sendo ideal para crescimento e invasão celular. Esses mesmos esferulitos mostram trincas que se propagam no sentido radial já a partir do décimo dia de degradação *in vitro*, indicando que o processo de degradação ocorre também no interior do esferulitos.

Os resultados obtidos permitem dividir as membranas em dois tipos distintos:

- Membranas densas (5% e 10%) que pelas características são mais indicadas para aplicações do tipo GTR ou qualquer outra técnica de recuperação que necessite isolamento entre tecidos através de uma membrana biocompatível com longo tempo de degradação.
- Membranas porosas (10%P, 10%/10%P e 15%P); indicadas para os casos em que necessita-se um suporte para crescimento celular, como no caso de reconstrução de tecidos.

Capítulo 6

Sugestões para Próximos trabalhos

As diferenças encontradas entre um tipo e outro de membrana sem plastificante são relativamente sutis, mas indicam que podemos trabalhar com a concentração do polímero não só para diminuir a velocidade da degradação ou aumentar os valores das propriedades mecânicas mas sim trabalharmos com uma quantidade mínima de polímero para diminuirmos o custo da membrana.

Outra sugestão é realizar ensaios no sentido de traçar a curva módulo de elasticidade em função da porcentagem de plastificante adicionado e do tempo de degradação para equacionarmos a taxa de perda das propriedades mecânicas.

Implantes *in vivo* com longo prazo de duração e ensaios de degradação acelerada através da imersão em solução com pH básico ou ácido também são sugestões para trabalhos futuros que forneceriam muitos dados importantes.

Já na área médica e biológica, inúmeros são os testes que podem ser feitos para se avaliar a aplicabilidade destas novas membranas. Testes com tecidos ósseos, derme, órgãos internos, úlceras do sistema digestivo e queimaduras são apenas algumas possibilidades.

ALI, S.A.M.; DOHERTY, P.J. e WILLIAMS, D.F., Mechanisms of polymer degradation in implantable devices, 2. Poly(DL-lactic acid), *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, p. 1409-1418, 1993.

ATHANASIOU, K.A.; NIEDERAUER, G.G. e AGRAWAL, C.M., Sterilization, toxicity, biocompatibility and clinical applications of polylactic acid/ polyglycolic acid copolymers, *Biomaterials*, v.17, p. 93-102, 1996.

BERGSMA, J.E.; ROZEMA, F.R.; BOS, R.R.M.; van ROZENDAAL, A.W.M.; de JONG, W.H.; TEPPEMA, J.S. and JOZIASSE, A.A.P.; Biocompatibility and degradation mechanisms of predegraded and non-predegraded poly(lactide) implants: an animal study, *Journal of Materials Science: materials in medicine*, v.6, p. 715-724, 1995.

BERGSMA¹, J.E.; ROZEMA, F.R.; BOS, R.R.M.; BOERING, G.; BRUIJN, W.C. e PENNING, A.J., In vivo degradation and biocompatibility study of in vitro pre-degraded as-polymerized polylactide particles, *Biomaterials*, v.16, p.267-274, 1995.

BERGSMA², J.E.; ROZEMA, F.R.; BOS, R.R.M.; BOERING, G.; BRUIJN, W.C. e PENNING, A.J., Biocompatibility study of as-polymerized poly(L-lactide) in rats using cage implant system, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.29, p. 173-179, 1995.

BEUMER, G.J.; van BLITTERSWIJK, C.A. and PONEC, M.; Degradative behavior of polymeric matrices in (sub) dermal and muscle tissue of the rat: a quantitative study, *Biomaterials*, v.15, n.7, p.551-559, 1994.

BÖSTMAN, O.M.; Current concepts review, absorbable implants for the fixation of fractures, *The Journal of Bone and Joint Surgery*, v.73-A, n.1, p.148-153, 1991

BOSTMAN¹, O.M.; PÄIVÄRINTA, V.; PARTIO, E.; MANNINEN, M.J.; VASENIUS, J.; MAJOLA, A. E ROKKANEN, P., The tissue-implant interface during degradation of absorbable

polyglycolide fracture fixation in the rabbit femur, *Clin. Orthop. and Related Research*, v.285, p.263-272,1992.

BÖSTMAN², O.M.; PÄIVÄRINTA, V.; MANNINEN, M.J. E ROKKANEN, P., Polymeric debris from absorbable polyglycolide screws and pins, *Acta Orthop. Scand.*; v.63, n.5, p.555-559,1992.

BRADY, J.M.; CUTRIGHT, D.E. ; MILLER, R.A.; BATTISTONE, G.C. E HUNSUCK, E.E., Resorption rate, route of elimination, and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.7, p.155, 1973.

CAM, DARINN; HYON, S.H.; IKADA, Y.; Degradation of high molecular weight poly(l-lactide) in alkaline medium, *Biomaterials*, v.16, n.11, p.833-843, 1995

COOMBES, A.G.A. E HECKMAN, J.D., Gel casting of resorbable polymers. 1 Processing and applications , *Biomaterials*, v.13, n.4, p.217-224,1992.

COOMBES², A.G.A. E HECKMAN, J.D., Gel casting of resorbable polymers. 2 In-vitro degradation of bone graft substitutes , *Biomaterials*, v.13, n.5 p.297-307,1992.

CORDEWERNER, F.W.; ROZEMA, F. R.; BOS, R. R. M., BOERING G.; Material properties and tissue reaction during degradation of poly (96L/4D-Lactide) - a study in vitro and in rats, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.6, p. 211-217, 1995

DAVIS. M., D.; VACANTI, J. P.; Toward development of an implantable tissue engineered liver, *Biomaterials*, v.17, p. 365-372, 1996.

DITTRICH, W. e SCHULZ, R.C., *Angew. Makromol. Chem.*, v.15, p.109,1971.

DUEK, E.A. R.; MALMONGE, S.M.; ZAVAGLIA, C.A.C.; Tecnologia dos Materiais Poliméricos, EMA-1; agosto de 1996. Apostila.

- FISHER, E.W.; STERZEL H.J.; WEGNER, G.; Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. *Kolloid-Z Z Polymere*, v.251, p.980-990, 1973.
- FREED, L.E.; MARQUIS, J.C.; NOHRIA, A.; EMMANUAL, J.; MIKOS, A.G. E LANGER, R., Neocartilage formation in vitro and in vivo using cells cultures on synthetic biodegradable polymers, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, p.11-23,1993.
- GILDING, D.K. e REED, A.M., *Polymer*, v.20,p.1459, 1979.
- GILDING, D.K., *Biocompatibility of Clinical Implant Materials*, 1981, David F. Williams, v.2, p. 211.
- GRULKE, E.A., Sutures, *Encyclopedia of Polymer Science and Enginering*, A. Wiley-Interscience Publication, John wiley & Sons, New York, , v.16, p. 473, 1989.
- HEGYELI, A.F., Use of organ cultures to evaluate biodegradation of polymer implant materials, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.7,p.205,1973.
- KUMTA, S.M; SPINNER, R. E LEUNG, P.C., Absorbable intramedullary implants for hand fractures, Animal experiments and clinical trial, *The J. of Bone and Joint Surg.*, v.743, n.4,p. 563,1992.
- LAITINEN, O. ;ALITALO, I.; TOIVONEN, T.; VASENIUS, J.; TORMALA, P. E VAINIONPAA, S., Tissue response to a braided poly-L-lactide implant in an experimental reconstruction of anterior cruciate ligament, *J. of Mater. Sci.: Mater. in Med.*, v.4, p. 547-554,1993.
- LAM, K.H.; NIEUWENHUIS, P.; MOLENAAR, I.; ESSELBRUGGE, H.; FEJEN, J.; DIJKSTRA, P. J. E SCHAKERAAD, J.M., Biodegradation of porous versus non porous poly(L-lactic acid) films, *J. of Mater. Sci.: Mater. in Med.*, v.5, p.181-189,1994.

- LAM, K.H.; SCHAKENRAAD, J. M.; ESSELBRUGGE, H.; FEIJEN, J.; NIEUWENHUIS, P.;
The effect of phagocytosis of poly(L-lactic acid) fragments on cellular morphology and
viability, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.27, p.1569-1577,1993.
- LAM, K.H.; SCHAKENRAAD, J. M.; GROEN, H.; ESSELBRUGGE, H.; DIJKSTRA, P.J.;
FEIJEN, J. AND NIEUWENHUIS, P.; The influence of surface morphology and wettability on
inflammatory response against poly(L-lactic acid): A semi-quantitative study with monoclonal
antibodies, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.29, p.929-942,1995.
- LANGER, R.; CIMA, L.G.; TAMADA, J.A. e WINTERMANTEL, E., Future directions in
biomaterials, *Biomaterials*, v.11, p. 738-745,1990.
- LEENSLAG¹, J.W.; PENNING, A.J.; BOS, R.R.M.; ROZEMA, F.R.; E BOERING, G.; Resorbable
materials of poly(L-lactide). VI. Plates and Screws for internal fracture fixation, *Biomaterials*, v.8, p.
70-73,1987.
- LEENSLAG², J.W.; PENNING, A.J.; BOS, R.R.M.; ROZEMA, F.R. e BOERING G.; Resorbable
materials of poly(L-lactide) VIII. in vivo e in vitro degradation, *Biomaterials*, v.8, p. 311-314,1987.
- LEESTRA, T.S., MALTHA, J.C.; E KUIJPERS-JAGTMAN, A. M., Biodegradation of non-
porous films after submucoperiosteal implantation on the palate of Beagle dogs, *J. of Mater.
Sci.: Mater. in Med.*, v.6, p. 445-450,1995.
- LI¹, S.M.; GARREAU, H. e VERT, M., Structure-property relationships in the case of the
degradation of massive aliphatic poly(α -hydroxy acids) in aqueous media, Part 1: poly(DL-
lactic acid), *J. of Mater. Sci. : Mater. in Med.*, v.1, p. 123-130,1990.
- LI², S.M.; GARREAU, H. e VERT, M., Structure-property relationships in the case of the
degradation of massive aliphatic poly(α -hydroxy acids) in aqueous media, Part 2: degradation of

- lactide-glicolide copolymers: PL_{37.5}G_{62.5} and PL₇₅G₂₅, *J. of Mater. Sci. : Mater. in Med.*, v.1, p. 131-139,1990.
- LI³, S.M.; GARREAU, H. e VERT, M., Structure-property relationships in the case of the degradation of massive aliphatic poly(α -hydroxy acids) in aqueous media, Part 3: influence of the morphology of poly(L-lactic acid), *J. of Mater. Sci. : Mater. in Med.*, v.1, p. 198-206,1990.
- LOTY, S.; FOREST, N.; BOULEKBACHE, H. E SAUTIER, J.M., Cytochalasin D induces changes in cell shape and promotes in vitro chondrogenesis: A morphological study, *Biol. Cell.*, v.83, p. 149,1995.
- LYDON, M.J.; MINETT, T.W. AND TIGHE, B.J., Cellular Interactions with synthetic Polymer Surfaces in Cultura, *Biomaterials*, v.6, n.6, p.396-402,1985.
- MAJOLA, A.; VAINIONPAA, S.; ROKKANEN, P.; MIKKOLA. H.-M. E TORMALA, P., Absorbable self-reinforced polylactide (SR-PLA) composite rods for fracture fixation: strength and strength retention in the bone and subcutaneous tissue of rabbits, *J. of Mater. Sci.: Mater. in Med.*, v.3, p.43-47,1992.
- MANNINEN, M.J.; PÄIVÄRINTA, U.; TAURIO, U. E TÖRMÄLÄ, P., Polylactide screws in the fixation of olecranon osteotomies, *Acta Orthop. Scand.*, v.63, n.4, p. 437,1992.
- MIKOS, A. G.; SARAkinos, G.; LEITE, S.M.; VACANTI, J.P. E LANGER, R., Laminated three-dimensional biodegradable foams for use in tissue engineering, *Biomaterials*, v.14, n.5, p. 323-330,1993.
- MIKOS, A.G., LYMAN, D., FREED, L.E. E LANGER, R., Wetting of poly(L-lactic) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams for tissue culture, *Biomaterials*, v.15, p. 55-58,1994.

- MILLER, R.R. E Mc DEVITT, C.A., A quantitative Microwell assay for chondrocyte cell adhesion, *Analyt. Biochem.*, v.192., p. 380,1991
- MIYAMOTO, S.; TAKAOKA, K.; OKADA, T.; YOSHIKAWA, H.; HASHIMOTO, J.; SUZUKI, S. E ONO, K., Polylactic acid-polyethylene glycol block copolymer, *Clin. Orthop. and Related Research*, v.294,p.333,1993.
- MOONEY, D.J.; PARK, S.; KAUFMANN, P.M.; SANO, K.; MACNAMARA, K.; VACANTI, J.P. E LANGER, R., Biodegradable Sponges for Hepatocyte Transplantation, *J. of Biom. Mater. Res.*, v.29,p. 959, 1995.
- MOONEY, D.J.; Baldwin, D.F., Suh, P.S., Vacanti, J. P. , Langer R.; Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L - lactide - co- glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials*, v.17, p. 1417 -1422, 1996.
- MOSMANN, T. , Rapid colorimetric assay cellular grow and suvival : Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Meth.*, v.65, p.55.,1983
- NAKAMURA, S.; NINOMIJA, S.; TAKATORI, Y.; MORIMOTO, S.; KUSABA,I. E KUROKAWA, T., Polylactide screws in acetabulat osteotomy, *Acta Orthop. Scand.*, v.64,n.3,p.301,1993.
- PEREGO, G.; CELLA, G.D.; BASTIOLI, C.; Effect of Molecular Weight and Crystallinity on Poly(lactic acid) Mechanical Properties, *Journal of Applied Polymer Science*, vol 59, 37-43 (1996)
- PIATTELLI, A.; SCARANO,A.; RUSSO, P. and MATARASSO, A.; Evaluation of guided bone regeneration in rabbit tibia using bioresobable and non-resorbable membranes, *Biomaterials*, v.17, n.8, p. 791-796, 1996.

PIHLAJAMÄKI, H.; BÖSTMAN, O.; HIRVENSALO, E.; TÖRMÄLÄ, P. E ROKKANEN, P.,
Absorbable pins of self-reinforced poly-L- lactic acid for fixation of fractures and osteotomies, *The
J. of Bone and Joint Surg.*, v.748, n.6, p.853, 1992

PINEDA, L.M.; BÜSING, M.; MEINIG, R.P.; GOGOLEWSKI, S.; Bone regeneration with
resorbable polymeric membrane. III. Effect of poly(L-lactide) membrane pore size on the bone
healing process in large defects. *Journal of Biomedical Materials Research*, v.31, p. 385-394,
1996.

PISTNER, H.; STALLFORTH, H.; GUTWALD, R.; MUHLING, J.; REUTHER, J. e MICHEL,
C., Poly(L-lactide): a long-term degradation study in vivo, Part II: physico-mechanical
behaviour of implants, *Biomaterials*, v.15, n.6, p. 439, 1994

PISTNER¹, H.; GUTWALD, R.; ORDUNG, R. e REUTHER, J., Poly(L-lactide): a long-term
degradation study in vivo. I. Biological results, *Biomaterials*, v.14, p. 671, 1993

PISTNER², H.; BENDIX, D.R.; MUHLING, J. e REUTHER, J.F., Poly(L-lactide): a long term
degradation study in vivo, Part III: analytical characterization, *Biomaterials*, v.14, n.
4, p.291, 1993

PUELACHER, W.C.; MOONEY, D.; LANGER, R.; UPTON, J.; VACANTI, J.P. E VACANTI,
C.A., Design of nasoseptal cartilage replacements synthesized from biodegradable polymers
and chondrocytes, *Biomaterials*, v.15, n.10, p. 774, 1994

ROBERT, P.; MAUDUIT, J.; FRANK, R.M. E VERT, M., Biocompatibility and resorbability of a
polylactic acid membrane for periodontal guided tissue regeneration, *Biomaterials*, v.14,
n.5, p. 353, 1993

SCHUGENS, CH.; GRANDFILS, C.; JEROME, TEYSSIE, PH.; DELREE, P.; MARTIN, D.;
MALGRANGE, B.; MOONEN, G.; Preparation of a macroporous biodegradable

polylactide implant for neuronal transplantation, *Journal of Biomedical Materials Research*, v.29,p.1349-1362,1995

SILVA, C.F; MADISON, R.; DIKES, P.; CHIU, T.; SIDMAN, R.L.; An In Vivo Model to Quantify Motor and Sensory Peripheral Nerve Regeneration Using Bioresorbable Nerve Guide Tubes, *Brain Research*, n. 342, p. 307-315, 1985

THERIN, M.; CRISTEL, P. ; LI, S.; GARREAU, H. e VERT, M., In vivo degradation of massive poly(α - hidroxy acids): validation of in vitro findings, *Biomaterials*, v.13, p.594, 1992.

THOMSON, R. C.; GIORDANO, G.G.; COLLIER, J.,H.; ISHAUH, S.,L.; MIKOS, A.,G.,LAHIRI-MUNIR,D.; GARCIA, C.,A., Manufacture and characterization of poly(α -hydroxy ester) thin films as temporary substrates for retinal pigment epithelium cells. *Biomaterials*, v.17, n.3 , p321-327,1996.

TORMALA, P.; VAINIONPAA, S.; KILPIKARI, J. E ROKKANEN, P., The effects of fibre reinforcement and gold plating on the flexural and tensile strength of PGA/PLA copolymer materials in vitro. *Biomaterials*, v.8, p. 42 , 1987.

TORMALA, P.; VASENIUS, J.; VAINIONPAA, S.; LAIHO, J.; POHJOMEN, T. E ROKKANEN, P., Ultra-high-strength absorbable self-reinforced polyglycolide (SR-PGA) composite rods for internal fixation of bone fractures: in vitro and in vivo study, *J. Biomed. Mater. Res.* v.25, p 1, 1991

TORMALA, P. ;ALITALO, I.; TOIVONEN, T.; VASENIUS, J.; LAITINEN, O.e Vainionpaa, S., Tissue response to a braided poly-L-lactide implant in an experimental reconstruction of anterior cruciate ligament, *J. of Mater. Sci.: Mater. in Med.*, v.4, p. 547, 1993.

TSUJI, H.; IKADA, Y.; Properties and morphologies of poly(L-lactide): 1. Annealing condition effects on properties and morphologies of poly(L-lactide); *Polymer*, V.6, n.14, p.2709-2716, 1995.

VAINIONPAA, S.; KILPIKARI, J.; LAIHO, J.; HELEVIRTA, P.; ROKKANEN, P. E TORMALA, P., Strength and strength retention in vitro, of absorbable, self-reinforced polyglycolide (PGA) rods for fracture fixation, *Biomaterials*, v.8, p. 46, 1987.

VAN DER VALK, P.; VAN PELT, A.W.J.; BUSSCHER, H.J. DE JONG, H.P.; WILDEVUUR, CH.R.H.; ARENDS, J., Interaction of fibroblasts and polymer surfaces: relationship between surface free energy and fibroblast spreading, *J. of Biom. Mater. Res.*v.17, p. 807, 1983.

VAN SLIEDREGT, A.; VAN LOON, J.A.; VAN DER BRINK, DE GROOT, K. E VAN BLITTERSWIJK, C. A., Evaluation of polylactide monomers in an in vitro biocompatibility assay, *Biomaterials*, v.15, n.4, p.251, 1994.

WALD, H.L.; SARAkinos, G.; LYMAN, M.D.; MIKOS, A.G.; VACANTI, J.P. E LANGER, R., Cell seeding in porous transplantation devices, *Biomaterials*, v.14, n.4, p.270, 1993.

ZELLIN, G., GRITLI-LINDE, A.; LINDE, A.; Healing of mandibular defects with different biodegradable membranes: an experiment study in rats. *Biomaterials*, v.16, n.8, p.601-609, 1995.

NORMA ASTM

D 1708 - 96

Standard test Method for Tensile Properties of Plastics By use of Microtensile Specimens

Livros

- BRISTON, J. H.; *Plastic Films*. 3 ed., London: Longman Scientific & Technical, 1989, Cap. 9 : Mechanical Properties, p. 93-112.
- CARTER, B. K.; WILKES, G. L.; Some Morphological investigations on an absorbable copolyester biomaterial based on glycolic lactic acid. *Polymers as Biomaterials*, Plenum Press, 1984; Section A: Materials and Properties, p. 67-92.
- HENCH L.L. E ETHRIDGE, E.C. , *Biomaterials: An Interfacial Approach*, Ed. Academic Press, New York, 1982.
- HUANG, S.J., Biodegradable polymers, *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, A. Wiley - Interscience Publication, John wiley & Sons, New York, 1989, v.2, p. 220,.
- HYON, S. H.; JAMSHIDI, K.; IKADA, Y.; "Melt Spinning of Poly-L-Lactide and Hydrolysis of the Fiber in Vitro" ; *Polymers as Biomaterials*, Plenum Press, Section A: Materials and Properties, p. 51-65, 1985.
- KESTING, R. E.; "*Synthetic Polymeric Membranes: A Structural Perspective*"; John Wiley and Sons, second edition, Inc. New York, 1985
- PARK, J.B. "*Biomaterials: An Introduction*", Ed. Plenum Press, New York, 1979.
- SHALABY, W. S.; HOFFMAN, A. S.; RATNER, B. D., AND HORBETT, T. A.; "*Polymers as Biomaterials*" , Plenum Press, 1984.
- VERT, M. ; CHABOT F. ; CHIRSTEL, P. E LERAY, J. ; *Macromolecular biomaterials*, CRC Press, Boca- Raton, FL, 1984 , p. 120

WILLIAMS, D.F. (ed), *Definitions in Biomaterials, Proceedings of a consensus conference of the european society for biomaterials*, Chester, England, march 3-5, 1986, Elsevier, 1987.

1983	Salthouse	Suturas em músculo de rato	PGA PLA (VICRYL)	Reação inflamatória leve
1986	Higashi <i>et al.</i>	Reparo de ossos em ratos	PLA /HA(PLA/hidroxiapatita)	PLA/hidroxiapatita favorece o crescimento de tecido ósseo
1986	Visscher <i>et al.</i>	Músculo de ratos	PLA PGA	Pequena reação após 480 dias
1987	Leenslag <i>et al.</i>	Fixação de fraturas cães e ovelhas	PLLA	Bem tolerado, aumento da atividade celular
1988	Schakenraad <i>et al.</i>	Liberação controlada de drogas em tecidos moles de ratos	PLLA	Reação de corpo estranho bem tolerada
1988	Schmitz and Hollinger	Reparo de ossos em coelhos	PLA PGA	Sem reação adversa do tecido hospedeiro
1989	Schakenraad <i>et al.</i>	Implantes subcutâneos em ratos	PDLLA	Reação de corpo estranho leve
1990	Schakenraad <i>et al.</i>	Liberação controlada de drogas em tecidos moles de ratos	PLLA	PLLA é biocompatível
1991	Cooper <i>et al.</i>	Derme de ratos	PGA PLA	Sem inflamação
1991	Devereux <i>et al.</i>	Parede abdominal de ratos	PGA	Sem atividade intrínseca bactericida ou bacterioestática relacionada
1991	Galgut <i>et al.</i>	Tecidos moles de ratos	PLA	Bem tolerado, biocompatibilidade suficiente
1991	Klompmaker <i>et al.</i>	Reparo de menisco em cães	PLLA	Inflamação crônica
1991	Majola <i>et al.</i>	Fixação de ossos em ratos	PLLA PDLLA	Sem inflamação ou reação de corpo estranho
1991	von Schroeder <i>et al.</i>	Defeitos articulares em coelhos	PLA	Bem tolerado, resposta inflamatória mínima
1992	Athanasίου <i>et al.</i>	Defeitos articulares em coelhos	PLA PGA	Boa compatibilidade a longo tempo
1992	Böstman <i>et al.</i>	Fixação de fraturas em coelhos	PGA	Resposta tecidual variável
1992	Böstman <i>et al.</i>	Fixação de fêmur em coelhos	PGA	Sem contra-indicações para aplicações clínicas

1992	Kobayashi <i>et al.</i>	Tecidos moles, córnea de coelhos	PLA PGA	PLA não tóxico e seguro PGA alguma toxicidade
1992	Matsusue <i>et al.</i>	Reparo ósseo de coelhos	PLLA	Sem inflamação ou reação de corpo estranho
1992	Rozema <i>et al.</i>	Tecidos moles em ratos	PLLA	Alguma reação celular
1993	Athanasίου <i>et al.</i>	Defeitos articulares em coelhos	PLA PGA	Sem infecção ou inflamação
1993	Lam <i>et al.</i>	Tecidos moles em camundongos	PLLA	Partículas de PLLA causam dano celular e lesão
1993	Pävärinta <i>et al.</i>	Fixação de fratura de fêmur em coelhos	PLA PGA	Resposta inflamatória insignificante
1993	Robert <i>et al.</i>	Tecidos moles e abdomen de ratos	PLA	Biocompatibilidade excelente de PLLA
1993	Suganuma and Alexander	Reparo ósseo de fêmur de cão	PLLA	Partículas de PLLA induzem reação de corpo estranho
1993	Verheyen <i>et al.</i>	Reparo ósseo femur de cabra	PLLA	Debris de PLLA são encontrados em linfonodos

Aplicações em Humanos

1974	Horton <i>et al.</i>	Sutura no subcutâneo	PGA PLA (Vicryl)	Resposta tissular ao Vicryl não apreciada
1978	Racey <i>et al.</i>	Sutura para tecido oral	PGA PLA (Vicryl)	Resposta tissular ao Vicryl similar a seda
1990	Santavirta <i>et al.</i>	reparação de fratura de tornozelo	PGA	Bomaterial inerte imunologica-mente
1991	Böstman	fratura de tornozelo	PGA	Reação de corpo estranho osteolítica
1991	Devereux <i>et al.</i>	Suporte para parede intestinal	PGA	Bem tolerado
1991	Hope <i>et al.</i>	Fixação de fraturas de cotovelo em crianças	PGA	Sem infecção ou reação de corpo estranho
1991	Wetter <i>et al.</i>	Sutura de apêndice	PGA	Menos infecção que o nylon
1992	Böstman	Dispositivos para fixação de fraturas em tornozelos	PGA	Reação inflamatória não bacteriana observada

1992	Böstman <i>et al.</i>	Dispositivos para fixação de fraturas em tornozelos	PGA	Reações locais não bacterianas observadas
1992	Fraser e Cole	Fixação de fraturas de cotovelo em crianças (umeral)	PGA	Osteólise presente, sem reação de corpo estranho
1993	Böstman <i>et al.</i>	Fixação de fraturas em cotovelo de crianças(umeral)	PGA	Sem efeitos clínicos adversos
1994	Bucholz <i>et al.</i>	Fixação de fraturas em cotovelos	PLA	Considerado seguro e efetivo, sem complicações

Testes de Resposta celular

1976	Schwoppe <i>et al.</i>	Toxicidade <i>in vitro</i>	PLA PGA	Sem reação de corpo estranho
1987	Leenslag <i>et al.</i>	Degradação <i>in vitro</i>	PLLA	Bem tolerado, atividade celular aumentada
1990	van Sliedregt <i>et al.</i>	Fibroblastos, osteosarcoma e resposta de células epiteliais	PLA	Sem redução na proliferação celular
1992	Daniels <i>et al.</i>	Toxicidade <i>in vitro</i>	PLA PGA	Pode produzir soluções tóxicas
1992	Matsusue <i>et al.</i>	Degradação <i>in vitro</i>	PLLA	Sem inflamação ou reação de corpo estranho
1992	van Sliedregt <i>et al.</i>	Osteosarcoma e resposta de células epiteliais	PLA	Biocompatibilidade satisfatória
1993	Mikos <i>et al.</i>	Resposta de hepatócitos de ratos	PGA	Hepatócitos atacam tela de PGA
1994	Taylor <i>et al.</i>	Degradação <i>in vitro</i>	PLA PGA	Soluções tóxicas são produzidas

APÊNDICE 1

Histórico da pesquisa com o PLA e o PGA , em animais, em humanos e in vitro: (adaptado de Athanasiou et al., 1996)

ANO	AUTOR(ES)	APLICAÇÃO	MATERIAL	RESULTADOS
1966	Kulkarni <i>et al.</i>	Sutura em ratos e porcos-da-índia	PLA	Não tóxico e sem reação do tecido
1970	Postlethwait	Suturas em coelhos	PGA	Reação menor que catgut, seda ou Dacron
1971	Frazza e Schmitt	Suturas em coelhos	PGA	Inflamação menor que o catgut
1971	Cutright and Hunsuck	Suturas no músculo de ratos	PLA	Reação de células gigantes induzida pela sutura
1971	Cutright <i>et al.</i>	Suturas em coelhos	PLA / PGA	Reação dos tecidos moles aceitável
1971	Cutright <i>et al.</i>	Suturas em macacos	PLA	Mínima resposta inflamatória
1971	Kulkarni <i>et al.</i>	Suturas em macacos	PDLA	Resposta tissular similar a dos controles
1973	Brady <i>et al.</i>	Abdômen de ratos	PLA PGA	Alto grau de biocompatibilidade
1976	Schwoppe <i>et al.</i>	Tecidos moles em camundongos	PLA PGA	Sem reação de corpo estranho
1977	Nelson <i>et al.</i>	Reparo de dano à tibia de ratos	PLA PGA	Bem tolerado pelo tecido, pouca reação de corpo estranho
1977	Miller <i>et al.</i>	Tecido moles em ratos	PLA PGA	Alto grau de biocompatibilidade
1981	Varma <i>et al.</i>	Suturas em cães	PGA	Reação inicial intensa, inflamação crônica leve
1981	Walter <i>et al.</i>	Suturas em porcos	PGA	Inflamação leve
1982	Christel <i>et al.</i>	Fixação de fratura em tibia de rato	PLLA PGA	Resultados promissores
1983	Christel <i>et al.</i>	Reparo de fêmur em ovelhas	PLA	Compatibilidade satisfatória ao tecido
1983	Hollinger	Reparo de tibia de rato	PLA PGA	Sem reação adversa do tecido hospedeiro