

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA  
TESE DEFENDIDA POR Vitor de Miranda  
Fedrizzi E APROVADA  
PELA COMISSÃO JULGADORA EM 28 / 02 / 2012  
ERUEK  
ORIENTADOR

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

Vitor de Miranda Fedrizzi

**Obtenção de Dispositivos à Base de Poli(L-  
co-D,L Ácido Lático-co-Trimetileno  
carbonato) para Reparação de Fraturas  
Ósseas**

Campinas, 2012

Vitor de Miranda Fedrizzi

# **Obtenção de Dispositivos à Base de Poli(L-co-D,L Ácido Lático-co-Trimetileno carbonato) para Reparação de Fraturas Ósseas**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado da Faculdade de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual de Campinas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Orientador (a): Eliana Aparecida de Rezende Duek

Campinas, 2012

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

F319o      Fedrizzi, Vitor de Miranda  
Obtenção de dispositivos à base de poli(L-co-D,L  
ácido láctico-co-trimetileno carbonato) para reparação de  
fraturas ósseas / Vitor de Miranda Fedrizzi. --Campinas,  
SP: [s.n.], 2012.

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

1. Polímeros. 2. Biomateriais. 3. Ossos. 4.  
Regeneração. I. Duek, Eliana Aparecida de Rezende. II.  
Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de  
Engenharia Mecânica. III. Título.

Título em Inglês: Obtaining devices made of poly (L-co-D, L lactide-co-  
trimethylene carbonate) for repair of bone fractures

Palavras-chave em Inglês: Polymers, Biomaterials, Bone, Regeneration

Área de concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Titulação: Mestre em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior

Data da defesa: 28-02-2012

Programa de Pós Graduação: Engenharia Mecânica

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

# **Obtenção de Dispositivos à Base de Poli(L-co-D,L Ácido Lático-co-Trimetileno carbonato) para Reparação de Fraturas Ósseas**

Autor: Vitor de Miranda Fedrizzi

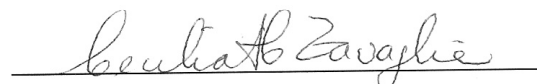
Orientador: Eliana Aparecida de Rezende Duek

A banca examinadora composta pelos membros abaixo aprovou esta dissertação:



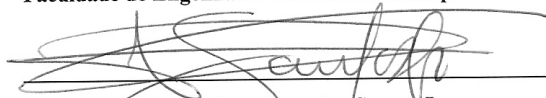
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Eliana Aparecida de Rezende Duek

Faculdade de Engenharia Mecânica/Unicamp



Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia

Faculdade de Engenharia Mecânica/Unicamp



Prof<sup>º</sup>. Dr<sup>º</sup>. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr.

Centro de Ciências Naturais e Humanas/UFABC

Campinas, 28 de fevereiro de 2012

## **Dedicatória**

Dedico este trabalho à minha família em especial aos meus pais, Marco e Márcia; e à minha irmã Natália.

## Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à Professora Eliana Aparecida de Rezende Duek pelos ensinamentos e orientação desde minha iniciação científica. Por ser exemplo de pesquisadora e, principalmente, de ser humano.

À Professora Dra. Maria Lourdes Peris Barbo, pelas valiosas dicas referentes ao estudo *in vivo* e pelas análises das lâminas histológicas.

A Dra. Adriana Motta pela ajuda durante todo o trabalho, mas principalmente pelo auxílio nas análises de caracterização do material.

Ao técnico do Laboratório de Biomateriais e meu grande amigo André Dutra Messias, pelo companheirismo nas horas de estudo e pelo auxílio em diversas etapas do meu trabalho.

À Silvia Mara de Melo Cattani pela confecção das lâminas histológicas.

À Claudinete Vieira Leal por estar sempre à disposição na realização das análises termogravimétricas, dinâmico-mecânica e de microscopia eletrônica de varredura.

À Giselle Cherutti, companheira de estudos.

À Kelly Martins, pelas análises de Cromatografia de permeação em gel.

Ao Vinícius Mello, pelas análises de Calorimetria exploratória diferencial, e pelas caronas para Unicamp.

Ao técnico Zé Luiz, pela realização dos ensaios mecânicos.

À Gimena Venturini Simon pelo apoio durante todo o trabalho.

À Andrea Espósito pelos valiosos conselhos.

À Nadin Kuntze, pelo auxílio na formatação final do trabalho.

A todos os pesquisadores do Laboratório de Biomateriais pelo excelente trabalho em equipe.

Aos funcionários do Biotério da FCMS, Valdir e Reginaldo sempre disponíveis para me auxiliar.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro.

***“A palavra é o fio de ouro do pensamento”***

***Sócrates***

## RESUMO

Polímero sintético biodegradável tem encontrado aplicações em diferentes áreas da medicina, especialmente em dispositivos ortopédicos. A principal vantagem desses materiais comparado com os materiais metálicos é pelo fato dos implantes biodegradáveis não necessitarem de uma segunda cirurgia para remover o dispositivo, resultando em baixo custo e menor risco para o paciente. Pinos de poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato), PLDLA-TMC, contendo 30% de TMC foram obtidos e caracterizados através do estudo *in vitro* e *in vivo* visando aplicação como dispositivos para fratura. Pinos de 2,5 mm de diâmetro foram obtidos por fusão do polímero e imersos em solução tampão fosfato, pH 7,4 para se estudar o processo de degradação *in vitro* e implantados na tíbia de ratos Wistars para avaliar a formação óssea após 15, 60, 90, 120 e 150 dias. Os resultados obtidos a partir do estudo da degradação *in vitro* de pinos PLDLA-co-TMC mostraram que as propriedades térmicas, mecânicas e morfológicas se mantêm praticamente inalteradas até 90 dias em solução tampão fosfato, especialmente temperatura de transição vítrea, módulo de Young, tensão máxima no alongamento e perda de massa, apesar da nítida variação da massa molar já no início do processo de degradação. Esses resultados corroboram com os do estudo *in vivo*, cujos resultados mostraram a ocorrência de neoformação óssea nos tempos iniciais, principalmente 60 e 90 dias, sendo que o grupo implante, no geral, apresentou uma formação óssea mais madura e organizada, com menor presença de fibrose do que o grupo controle. Esse conjunto de resultados indica que o material apresenta potencial para aplicado como dispositivo para recuperação de lesões ósseas, em situações onde seja adequada a permanência do implante durante longo período de tempo e ainda com a vantagem da degradação do mesmo, evitando sua posterior retirada.

**Palavras-Chave:** Polímeros biorreabsorvíveis, Trimetileno carbonato, Regeneração óssea

## ABSTRACT

Biodegradable synthetic polymers have found application in different areas of medicine, especially in orthopedics *devices*. The main advantage of these biomaterials compared to the metals materials is the fact of the use of biodegradable implants avoid the/necessity of a second surgery to removal the device, resulting in a lower costs and minor risks for the patient. Poly(L-co-D,L lactic acid-co-trimethylene carbonate), PLDLA-TMC, pins, content 30% of TMC were obtained and characterized by *in vitro* and *in vivo* study aiming application as fracture devices. Pins with 2,5mm of diameter were obtained by melting of polymer and immersed into the buffer phosphate solution, pH 7,4 to study in vitro degradation process and implanted in Wistars rats tibia to evaluate the bone formation after 15, 60, 90, 120 e 150 days. Results obtained from the *in vitro* degradation of the PLDLA-co-TMC pins showed that thermal, mechanical and morphological properties remained without alterations until 90 days, considering the glass transition temperature, Young modulus, maximum tension at the elongation and loss of mass. In spite of this, variation of molar mass was nitid since the initial of the degradation process. These results are in accordance with *in vivo* study, which showed the occurrence of bone neoformation in the initial times of implant, mainly after 60 and 90 days and presence of bone formation more organized and mature with minor presence of fibrosis than control group. These results are indicative that this material presents a potential to be applied as a device for recuperation of bone lesion in a situation where it is necessary the permanence of the implant for a long period of time and so with the advantage of the degradation, avoiding it to be removed.

**Keywords:** Bioreabsorbable polymers, Trimethylene carbonate, Bone regeneration

## Lista de Figuras

|                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Esquema simplificado da degradação do poli(ácido lático) (BÖSTMAN, 1991).<br>.....                                                                                                                                           | 6  |
| Figura 2. Degradação hidrolítica de poliésteres. (BARBANTI <i>et al.</i> , 2005).....                                                                                                                                                  | 7  |
| Figura 3. Representação da estrutura química do terpolímero PLDLA-co-TMC (MOTTA, 2009) .....                                                                                                                                           | 15 |
| Figura 4. Representação da produção de pinos de PLDLA-co-TMC em uma mini-injetora.<br>.....                                                                                                                                            | 15 |
| Figura 5. Pino de PLDLA-co-TMC com 3mm de comprimento e 2,5mm de diâmetro.                                                                                                                                                             | 21 |
| Figura 6. Seqüência cirúrgica: A) Tricotomia B) Terço superior da tíbia; C) Implante do pino de PLDLA-co-TMC e D) Sutura. ....                                                                                                         | 22 |
| Figura 7. Visão macroscópica da degradação <i>in vitro</i> dos pinos à base do terpolímero PLDLA-co-TMC em função do tempo de degradação A) antes da degradação; B) 15 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias.....     | 26 |
| Figura 8. Variação de Mw e Mn em função do tempo de degradação para os dispositivos de PLDLA-TMC. ....                                                                                                                                 | 28 |
| Figura 9. Perfil da queda no valor de Mw em função do tempo de degradação de pinos de PLDLA-TMC. ....                                                                                                                                  | 30 |
| Figura 10. Termogramas de DSC do 2º aquecimento para os pinos de PLDLA-TMC em função do tempo de degradação. A Tabela 2 mostra os valores obtidos por DSC das amostras do terpolímero PLDLA-TMC em função do tempo de degradação. .... | 31 |
| Figura 11. Variação da Tg em função do tempo de degradação. ....                                                                                                                                                                       | 33 |
| Figura 12. Variação da Tg em função da queda na massa molar durante o estudo <i>in vitro</i> em tampão fosfato. ....                                                                                                                   | 34 |
| Figura 13. Termogramas obtidos a partir das análises termogravimétricas para os pinos de PLDLA-TMC, em função do tempo de degradação.....                                                                                              | 35 |
| Figura 14. Variação da temperatura de início de degradação térmica (Tonset) para o dispositivo de PLDLA-TMC durante a degradação <i>in vitro</i> em meio tampão fosfato...                                                             | 37 |

|                                                                                                                                                                                                                    |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 15. Variação da temperatura de início de degradação térmica (Tonset) e da temperatura de transição vítrea (Tg) durante a degradação <i>in vitro</i> em meio tampão fosfato. ....                            | 38 |
| Figura 16. Curvas de ensaio mecânico de flexão de três pontos referente de pinos de PLDLA-TMC antes da degradação <i>in vitro</i> . ....                                                                           | 39 |
| Figura 17. Valores de módulo de Young para os pinos de PLDLA-TMC em função do tempo de degradação.....                                                                                                             | 41 |
| Figura 18. Valores de tensão máxima no alongamento para os pinos de PLDLA-TMC em função do tempo de degradação. ....                                                                                               | 42 |
| Figura 19. Valores de tensão máxima no alongamento em função da massa molar durante a degradação <i>in vitro</i> para pinos de PLDLA-TMC. ....                                                                     | 43 |
| Figura 20. Gráfico da análise dinâmico-mecânica do material antes de ser submetido à degradação <i>in vitro</i> .....                                                                                              | 45 |
| Figura 21. Gráfico da análise dinâmico-mecânica do material referente ao tempo de degradação de 15 dias. ....                                                                                                      | 46 |
| Figura 22. Gráfico da análise dinâmico-mecânica do material referente ao tempo de degradação de 60 dias. ....                                                                                                      | 46 |
| Figura 23. Gráfico da análise dinâmico-mecânica do material referente ao tempo de degradação de 90 dias. ....                                                                                                      | 47 |
| Figura 24. Perda de massa durante a degradação <i>in vitro</i> dispositivos de PLDLA - TMC.                                                                                                                        | 48 |
| Figura 25. Micrografias obtidas por MEV dos pinos de PLDLA-co-TMC antes da degradação <i>in vitro</i> ....                                                                                                         | 50 |
| Figura 26. Micrografias obtidas por MEV dos pinos de PLDLA-co-TMC após 15 dias de degradação <i>in vitro</i> ....                                                                                                  | 51 |
| Figura 27. Micrografias obtidas por MEV do dispositivo à base de PLDLA-co-TMC após 60 dias de degradação ....                                                                                                      | 52 |
| Figura 28. Micrografias obtidas por MEV dos pinos de PLDLA-co-TMC após 90 dias de degradação.....                                                                                                                  | 53 |
| Figura 29. (A)Micrografia da superfície da fratura de pinos de PLDLA após 32 dias de degradação <i>in vitro</i> e (B) Micrografia da superfície da fratura de pinos de PLDLA-co-TMC (60 dias), (DUARTE, 2009)..... | 54 |
| Figura 30. Fotomicrografia do grupo com implante do dispositivo de PLDLA-co-TMC com 15 dias pós-cirúrgico. ....                                                                                                    | 58 |

|                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 31. Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) com 15 dias pós-cirúrgico.                     | 58 |
| Figura 32. Fotomicrografia do grupo com implante do dispositivo de PLDLA-co-TMC com 60 dias pós-cirúrgico.. | 60 |
| Figura 33. Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) com 60 dias pós-cirúrgico.                     | 60 |
| Figura 34. Fotomicrografia do grupo com implante do dispositivo de PLDLA-co-TMC com 90 dias pós-cirúrgico.  | 62 |
| Figura 35. Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) com 90 dias pós-cirúrgico.                     | 62 |
| Figura 36. Fotomicrografia do grupo com implante do dispositivo de PLDLA-co-TMC com 180 dias pós-cirúrgico. | 64 |
| Figura 37. Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) com 180 dias pós-cirúrgico.                    | 64 |

## Lista de Tabelas

|                                                                                                                                                                                                              |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabela 1. Dados de GPC para os dispositivos de PLDLA-TMC em função do tempo de hidrólise <i>in vitro</i> .....                                                                                               | 29 |
| Tabela 2. Variação da Tg das amostras de PLDLA-TMC em função do tempo de degradação.....                                                                                                                     | 32 |
| Tabela 3. Dados de temperatura de início de perda de massa (T onset) e temperatura onde a perda de massa é máxima (Td) para o dispositivo de PLDLA durante os vários tempos de estudo <i>in vitro</i> . .... | 36 |
| Tabela 4. Valores do módulo de Young e Tensão máxima no alongamento para os pinos de PLDLA-TMC em função do tempo de degradação.....                                                                         | 40 |

## Lista de Equações

|                                  |    |
|----------------------------------|----|
| Equação 1. Módulo de Young ..... | 18 |
| Equação 2. Tensão Máxima .....   | 18 |
| Equação 3. Perda de Massa .....  | 19 |

# Nomenclaturas

## Abreviações

DMA – análise dinâmico-mecânica

DSC – calorimetria exploratória diferencial

EM – ensaio mecânico

FCMS – Faculdade de ciências médicas e da saúde

GPC – cromatografia de permeação em gel

HE – hmematoxilina – eosina

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

PBS – tampão fosfato salino

PCL – poli ( $\epsilon$  – caprolactona)

PGA – poli (ácido glicólico)

PLA – poli (ácido lático)

PLDLA – poli (L-co-D,L ácido lático)

PLDLA-co-TMC – poli (L-co-D,L ácido lático-co-trimetileno carbonato)

PLGA – poli (L-ácido lático-co-glicólico)

PLLA – poli (L-ácido lático)

TGA – termogravimetria

TMC – trimetileno carbonato

## Símbolos

$E'$  - módulo de armazenamento

$E''$  – módulo de perda

IP – índice de polidispersão

$M_n$  – massa molar numérica média

$M_w$  – massa molar ponderal média

$T_g$  – temperatura de transição vítrea

$T_f$  – temperatura de fusão

$T_c$  – temperatura de cristalização

$\Delta H_f$  – entalpia de fusão

$\Delta H_c$  – entalpia de cristalização

$\theta$  – theta

$\sigma$  - tensão

$\varepsilon$  - deformação

### **Unidades**

N – newton

Pa – pascal

MPa – mega pascal

$\text{cm}^{-1}$  – centímetro a menos um

Kg – quilograma

$\text{cm}^2$  – centímetro quadrado

$\text{m}^2$  – metro quadrado

$\text{mm}^2$  – milímetro quadrado

mm – milímetro

nm - nanômetro

$\mu\text{L}$  – microlitro

mL – mililitro

$\mu\text{m}$  – micrometro

Hz – hertz

$\text{min}^{-1}$  – minutos a menos um

$^{\circ}\text{C}$  – grau celsius

# SUMÁRIO

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO .....                                                               | 1  |
| 2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO .....                                               | 3  |
| 2.1 Biomateriais.....                                                            | 3  |
| 2.2 Polímeros Biorreabsorvíveis .....                                            | 5  |
| 2.3 PLDLA-co-TMC.....                                                            | 9  |
| 2.4 Tecido Ósseo/Regeneração Óssea .....                                         | 10 |
| 2.5 Dispositivos Biorreabsorvíveis Como Fixadores de Fraturas .....              | 13 |
| 3 METODOLOGIA.....                                                               | 15 |
| 3.1 Preparação dos Pinos por Fusão .....                                         | 15 |
| 3.2 Estudo da Degradação In Vitro dos Pinos de PLDLA-co-TMC .....                | 16 |
| 3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....                            | 16 |
| 3.4 Análise Termogravimétrica (TGA) .....                                        | 17 |
| 3.5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) .....                                | 17 |
| 3.6 Análise Dinâmico Mecânica (DMA).....                                         | 17 |
| 3.7 Ensaio Mecânico de Flexão.....                                               | 18 |
| 3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....                               | 19 |
| 3.9 Perda de Massa.....                                                          | 19 |
| 3.11 Implante dos Pinos .....                                                    | 21 |
| 3.12 Sacrifício dos Animais.....                                                 | 22 |
| 3.13 Processamento do Material para Análise Histológica .....                    | 23 |
| 3.14 Preparação das Lâminas.....                                                 | 23 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....                                                    | 25 |
| 4.1 Estudo da Degradação In Vitro dos Dispositivos de PLDLA-TMC.....             | 25 |
| 4.1.1 Análise Macroscópica da Degradação In Vitro dos Pinos de PLDLA-co-TMC..... | 26 |
| 4.1.2 Cromatografia de Permeação em Gel.....                                     | 27 |
| 4.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....                          | 30 |
| 4.1.4 Análise Termogravimétrica (TGA) .....                                      | 35 |
| 4.1.5 Ensaio Mecânico de Flexão.....                                             | 38 |
| 4.1.6 Análise Dinâmico Mecânica (DMA) .....                                      | 43 |
| 4.1.7 Perda de Massa.....                                                        | 47 |
| 4.1.8 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV .....                            | 49 |
| 4.2 Estudo In Vivo .....                                                         | 55 |
| 4.2.1 Análise Histológica do Tratamento de 15 dias.....                          | 55 |
| 4.2.2 Análise Histológica do Tratamento de 60 dias.....                          | 59 |
| 4.2.3 Análise Histológica do Tratamento de 90 dias.....                          | 61 |
| 4.2.4 Análise Histológica do Tratamento de 180 dias.....                         | 63 |
| 5 CONCLUSÕES .....                                                               | 66 |
| 6 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS.....                                         | 67 |
| Referências Bibliográficas .....                                                 | 68 |
| ANEXOS.....                                                                      | 78 |

# 1 INTRODUÇÃO

A utilização de polímeros biorreabsorvíveis como dispositivos ortopédicos tem se tornado freqüente nos procedimentos médicos, em decorrência das inúmeras vantagens que esta classe de material apresenta, como por exemplo, o fato de degradar-se no tecido vivo, via hidrólise, formando subprodutos comuns ao organismo. Essa propriedade representa uma grande vantagem frente aos dispositivos permanentes, principalmente na área de consolidação de fraturas, uma vez que implantes a base de polímeros biorreabsorvíveis não necessitam de uma segunda intervenção cirúrgica para retirada do dispositivo, após a regeneração do tecido ósseo ter ocorrido.

Além disso, à medida que as ligações ésteres do polímero se quebram há uma transferência gradual de carga para o osso em recuperação, prevenindo assim o enfraquecimento do local lesionado, permitindo, por outro lado, uma regeneração óssea mais efetiva.

Dentre os polímeros mais estudados para aplicações médicas destaca-se a classe dos poli( $\alpha$ - hidróxi ácidos), dentre eles o poli(L-ácido láctico) e seus copolímeros, como por exemplo, o poli(L-co-D,L-ácido láctico), PLDLA. O que os diferenciam dos outros polímeros são características como biodegradabilidade, biocompatibilidade e facilidade de processamento. Entretanto, a busca por polímeros que atendam a todas as necessidades que uma determinada aplicação requer, levou pesquisadores a desenvolverem combinações mais elaboradas, como por exemplo, a síntese de terpolímeros.

A aplicabilidade do PLDLA em implantes ósseos foi comprovada por Motta e Duek (2009). Testes *in vivo*, realizados em tíbias de coelhos, com o copolímero PLDLA sintetizado no laboratório de biomateriais da PUC-SP, sob a forma de placa/parafuso mostraram resultados muito favoráveis demonstrando assim a biocompatibilidade do material.

Entretanto, como a aplicabilidade dos materiais poliméricos é freqüentemente determinada por características como resistência à tensão e tenacidade à fratura, uma maior flexibilidade do poli(L-co-D,L ácido láctico) poderia aumentar seu campo de aplicações. A

adição de segmentos com características elastoméricas ao longo da cadeia polimérica tem sido usada há alguns anos para melhorar as propriedades vítreas de alguns polímeros, e como o PLDLA faz parte da classe de polímeros, os quais tendem a apresentar fratura frágil, a presença de segmentos de trimetileno carbonato (TMC) ao longo da cadeia do terpolímero poderia sanar essa deficiência do material.

O TMC é um policarbonato alifático elastomérico, hidroliticamente degradável, e sua eficiência na preparação de implantes biomédicos já foi previamente confirmada em usos como dispositivos liberadores de drogas e como copolímeros (PÊGO *et al.*, 2003a e ZHANG *et al.*, 2006). Este é um dos motivos na escolha deste material para fazer parte da cadeia do copolímero PLDLA. No caso de copolímeros de TMC com L ou D,L ácido láctico, por meio de diferentes razões entre os monômeros, pode-se controlar a taxa da degradação do copolímero como também suas propriedades físicas (PÊGO *et al.*, 2003b). Além disso, o trimetileno carbonato é um polímero biodegradável que fornece algumas vantagens, tais como: boas propriedades mecânicas, baixa temperatura de transição vítrea e síntese fácil através de abertura de anel benzênico, o que facilita sua utilização para formação de blendas e copolímeros (WATANABE *et al.*, 2008).

No presente trabalho, é válido ressaltar que o terpolímero do estudo, poli(L-co-D,L-ácido láctico-co-trimetileno carbonato), não existe no mercado. O efeito, portanto, que a presença de unidades de TMC na cadeia polimérica já contendo em sua composição tanto o L-lactide quanto o D,L-lactide poderá ser muito mais expressivo, em termos de melhorias nas propriedades mecânicas, tornando o material mais adequado aos requisitos exigidos no campo de fixação de fraturas, isso comparado a outros copolímeros.

Com isso, esse trabalho teve por objetivo a obtenção e caracterização de pinos do terpolímero biorreabsorvível de poli (L-co-D,L-ácido láctico-co-TMC), contendo 30 % em TMC, e o estudo dos dispositivos por meio da degradação *in vitro* e *in vivo*, visando aplicação como dispositivos para fraturas.

## 2 LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

### 2.1 Biomateriais

A necessidade de promover uma melhora na capacidade regenerativa de tecidos lesionados, seja por causas naturais ou devido a traumas, promoveu o desenvolvimento na área dos biomateriais. Uma área multidisciplinar que envolve conhecimentos dos campos de biologia, medicina e engenharia de materiais (GRIFFITH e NAUGHTON, 2002).

O termo biomaterial foi formalmente definido em 1986 como: um material não viável (não vivo) usado em um dispositivo médico, visando interação com sistemas biológicos (WILLIAMS, 1987). No entanto, a definição de biomateriais sofreu mudanças com o avanço das pesquisas na área e passou a ser considerado um biomaterial: um material destinado a fazer interface com sistemas biológicos para avaliar, tratar, aumentar, ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo (WILLIAMS, 2009).

Para que um biomaterial possa ser implantado no corpo humano ele deve satisfazer uma série de exigências, sendo a principal delas, biocompatibilidade. Isto é, a habilidade de um biomaterial desempenhar uma resposta apropriada no receptor, considerando uma aplicação específica (WILLIAMS, 1987). Sendo que propriedades químicas, físicas e biológicas influenciam na resposta de um tecido receptor a um implante (NAIR e LAURENCIN, 2007). Estas propriedades dos biomateriais os distinguem em cinco categorias: metálicos, cerâmicos, poliméricos, compósitos e materiais de origem biológica (RATNER *et al.*, 1996).

Por sua vez, os biomateriais poliméricos são divididos em degradáveis ou não degradáveis e seus implantes podem ser classificados de acordo com o tempo de exposição ao corpo humano: permanentes ou temporários. O primeiro quase sempre gera fenômenos crônicos de inflamação (DUEK *et al.*, 2005). Dentre eles os mais usados na ortopedia são os metais, que apesar de apresentarem vantagens como elevadas propriedades mecânicas,

mostram como principal desvantagem a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para retirada do dispositivo (MITTAL *et al.*, 2005). Já a permanência desses implantes está relacionada com carcinogenicidade (WARD *et al.*, 1990), imunogenicidade (GALANTE *et al.*, 1991) e corrosibilidade (BLACK, 1988) alterando dessa forma a estrutura fisiológica do tecido ósseo.

Como exemplo clássico de um implante permanente pode-se citar o titânio, que é um material muito utilizado em ortopedia. Em função de o titânio apresentar uma grande superioridade mecânica frente ao osso (KFURI *et al.*, 2001), causa neste, em muitos casos, um enfraquecimento na região do implante, tornando-o suscetível a uma re-fratura, em função desse osso ter sido “poupado” durante todo o tempo de recuperação, da presença de carga sobre ele.

Ao contrário dos implantes permanentes, os temporários, que surgiram na década de 60, feitos de materiais poliméricos biorreabsorvíveis, tem seu uso em franco crescimento na área médica, já sendo aplicados em inúmeras situações no corpo humano como sistemas de liberação de drogas, suturas cirúrgicas, *stents* e dispositivos ortopédicos, na forma de sistema de placas e parafusos para fixação de fraturas (DUEK *et al.*, 2005).

A vantagem do uso de dispositivos biorreabsorvíveis em relação às estruturas metálicas e cerâmicas vai além do fato de dispensarem a necessidade de uma segunda cirurgia. Destacam-se também por não interferirem em técnicas radiológicas e não apresentarem restrição no crescimento e migração de células no tecido lesado (McMANUS *et al.*, 2007). Em função de suas características, são indicados para aplicações como suporte de células (BARBANTI *et al.*, 2001) e dispositivos ortopédicos (PEZZIN, 2001).

No sistema locomotor, esses polímeros já vêm sendo empregados em cirurgias de ligamentos e de menisco de joelhos, nas osteossínteses metafisárias, artrodeses e por fim em fraturas epifisárias de crianças (KFURI *et al.*, 2001).

Na ortopedia os implantes apresentam um grande encargo socioeconômico, o fracasso desses materiais e a substituição destes geram um custo muito alto, dessa forma, um implante ideal que colaborasse com a neoformação óssea seria muito útil para sanar esse problema (SHEKARAN e GARCÍA, 2011).

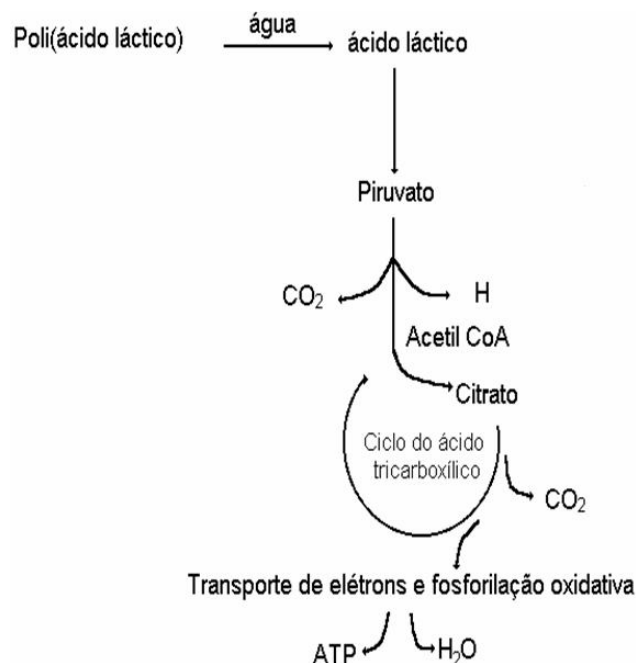
## 2.2 Polímeros Biorreabsorvíveis

Os polímeros biorreabsorvíveis fazem parte de um campo emergente das pesquisas científicas. Sua definição é referente a polímeros sólidos que sofrem degradação, principalmente por hidrólise, formando produtos atóxicos que depois são reabsorvidos pelo organismo e eliminados por caminhos naturais após a sua metabolização (VERT *et al.*, 1992). Os produtos da degradação são incorporados ao ciclo dos ácidos tricarboxílicos e eliminados pelo organismo como dióxido de carbono e água (DUEK e ZAVAGLIA, 1999).

O estudo *in vitro* é uma importante ferramenta para o entendimento da degradação dos polímeros biorreabsorvíveis. Quando situado em um meio aquoso, o polímero absorve água e inicia-se a quebra das ligações resultando em uma diminuição da massa molar. No início, a degradação é mais rápida na superfície do que no centro do material. A difusão dos produtos presentes na superfície para o meio gera um acúmulo de ácidos, fazendo com que as estruturas apresentem inicialmente uma erosão superficial e posteriormente, uma degradação mais acentuada no centro (KELLOMÄKI *et al.*, 2004).

A taxa de degradação é, antes de tudo, função da entrada de água nas cadeias do polímero. Conseqüentemente diferenças na acessibilidade das moléculas de água nas ligações ésteres dessas cadeias, justificam a ocorrência de diferentes taxas de degradação nos polímeros (GRIFFITH, 2000). Diversos fatores são capazes de influenciar a taxa de degradação de um polímero, por exemplo: massa molar, cristalinidade, temperatura de transição vítrea, dimensões do dispositivo e local de implante (GÖPFERICH, 1996).

Esses parâmetros anteriormente citados afetam a taxa de degradação da seguinte forma: a influência que a massa molar tem sobre a degradação é no sentido que, quanto maior a massa molar do polímero, menor sua taxa de degradação. Já para o pH do local do implante, estudos demonstram que para os poliésteres alifáticos como o poli(L- ácido láctico) as terminações ácidas do oligômeros formados, em decorrência do processo de hidrólise, aceleram a taxa de degradação do polímero, sendo o processo de degradação, para este tipo de material, melhor descrito como tipo de reação-difusão (GRIZZZI, 1995), figura 2.

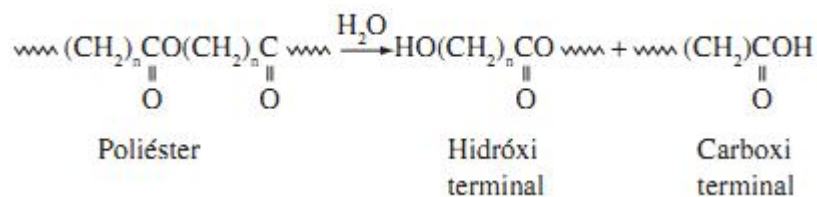


**Figura 1.** Esquema simplificado da degradação do poli(ácido láctico) (BÖSTMAN, 1991).

Como dito anteriormente, os produtos destes materiais podem ser eliminados por vias do metabolismo do próprio organismo, uma vez que são biorreabsorvíveis e biocompatíveis, estimulando assim a neoformação óssea e a remodelação do tecido lesado (LUCIANO *et al.*, 2000).

Uma classe que se destaca por possuir tais características é a dos poli( $\alpha$ -hidróxi ácidos). Esses polímeros são poliésteres alifáticos, representados pela fórmula geral  $-(O-CHR-CO)-$  (VERT *et al.*, 1992). A figura 2 demonstra a degradação hidrolítica de poliésteres.

Fazem parte desse grupo o poli (ácido glicólico) (PGA), poli(ácido láctico) (PLA), poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico), (PCL), poli(p-dioxanona) (PPD) e o poli(L-ácido láctico) (PLLA), entre outros (BARBANTI *et al.* 2005; REZWAN *et al.* 2006).



**Figura 2.** Degradação hidrolítica de poliésteres (BARBANTI *et al.*, 2005).

O poli(ácido lático) possui vantagens como alta resistência mecânica, bom comportamento termoplástico, biocompatibilidade e disponibilidade de fonte renovável. É um polímero semi-cristalino, de natureza hidrofóbica que pode ser encontrado, além da forma L, nas seguintes formas: poli(D – ácido lático) (PDLA) e o poli(D, L- ácido lático) (PDLA), em função dos 3 estereoisômeros existentes ( L, D e DL) (TSUIJI *et al.*, 1991). Como este material se degrada na presença de água é, portanto, adequado para o uso cirúrgico como material reabsorvível e atóxico (BLUMM, 1995).

Em controvérsia o poli(L-ácido lático), PLLA, apresenta um longo período para sua degradação total, associado à alta cristalinidade de seus fragmentos (DUEK *et al.*, 1999) que induzem reações inflamatórias do tipo corpo estranho, diminuindo seu uso em algumas aplicações cirúrgicas.

Com o avanço da tecnologia tem se tornado comum a mistura de polímeros visando a obtenção de materiais com propriedades novas ou otimizadas. Estas propriedades podem ser: rigidez, resistência ao impacto, tenacidade, estabilidade dimensional à alta temperatura, resistência a intempéries e outras (MANO e MENDES, 1999; PAUL e NEWMAN, 1978).

Com o objetivo de melhorar as propriedades do PLLA e diminuir a sua cristalinidade, uma combinação dos monômeros L- lactide e D, L lactide formaram o copolímero poli(L-ácido lático-co-D,L ácido lático) (PLDLA), que exibe características de ser mais rapidamente degradado, sem gerar fragmentos cristalinos, aliando as propriedades mecânicas do Poli (L-ácido lático) (MOTTA e DUEK 2007; YANG *et al.*, 2010).

O poli(D,L-ácido lático) é um polímero completamente amorfo, já que exibe uma distribuição ao acaso das formas isoméricas L e D em sua estrutura, o que impede que haja um rearranjo de forma a gerar uma estrutura ordenada (cristalina) (MIDDLETON e

TIPTON, 2000). Dessa forma o polímero apresenta somente temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), que se encontra na faixa 55°-60°C. Esse material apresenta valores inferiores ao PLLA nas propriedades mecânicas, tal como, tensão e módulo de elasticidade. O tempo de degradação requerido pelo poli(D,L-ácido láctico) também é muito inferior aquele requerido ao PLLA.

Dessa forma, esse homopolímero poli(D,L ácido láctico) apesar de apresentar uma taxa de degradação mais rápida do que a exibida pelo PLLA, tem como limitador das suas aplicações propriedades mecânicas inferiores as do PLLA (MOTTA, 2007).

Já a combinação das unidades L e D, ácido láctico gera um copolímero poli(L-co-D,L ácido láctico) com características interessantes, que são inerentes a cada monômero utilizado (AMANO, 2004), ou seja, com propriedade mecânica superior ao poli(D,L ácido láctico) e com uma taxa de degradação maior do que a do PLLA.

Apesar dessas características, confirmadas no trabalho de Motta (2007), o copolímero poli(L-co-D,L ácido láctico), apresenta alto módulo e baixo alongamento, apresentando, portanto, características de fratura frágil. Assim, seu leque de aplicações é também limitado à fixação de pequenas fraturas, não abrangendo de forma satisfatória outros campos que poderiam ser explorado, como aplicações onde é preciso maior capacidade de alongamento sem que haja fratura do material.

Nesse contexto o emprego de substâncias que originam polímeros elastoméricos, como por exemplo, o trimetileno carbonato (MESSIAS, 2011), se torna extremamente adequado. A inserção de segmentos de 1,3 trimetileno carbonato (TMC) um policarbonato alifático elastomérico, ao longo da cadeia do copolímero PLDLA, agrega as suas propriedades um maior alongamento, agindo, portanto, na deficiência apresentada pelo copolímero.

### 2.3 PLDLA-co-TMC

A literatura recente reporta a necessidade de se usar polímeros do tipo elastoméricos biorreabsorvíveis, voltados para aplicação na área médica, como implantes ou como arcabouços porosos empregados na engenharia tecidual (PÊGO, 2003).

É válido informar que a eficiência na preparação de implantes biomédicos empregando TMC já foi previamente confirmada por estudos (ENGELBERG, 1991), validando assim sua escolha para fazer parte da cadeia do copolímero PLDLA.

A presença simultânea, na cadeia polimérica, de segmentos de L lactide, DL lactide e TMC é algo novo no mercado, o que existe são cadeias poliméricas formadas por L-lactide/ TMC ou DL lactide/ TMC. A principal diferença do terpolímero proposto neste projeto para os copolímeros mencionados anteriormente é que, para o terpolímero o efeito que a incorporação das unidades de TMC terá numa cadeia polimérica já contendo em sua composição tanto o L-lactide quanto o D,L lactide, ou seja, que já tem sanado alguns problemas como alta cristalinidade e longo tempo de degradação (situação corrente quando somente o L-lactide faz parte da cadeia polimérica) poderá ser muito mais expressivo, em termos de melhorias nas propriedades mecânicas, tornando-as mais adequadas às requisitadas no campo de fixação de fraturas, isso comparado aos copolímeros do L-lactide-co-TMC ou D,L lactide-co-TMC.

A literatura (STOCK, 2001; WANG, 2002) reporta a necessidade em se usar polímeros do tipo elastoméricos biorreabsorvíveis, voltados para aplicação na área médica, como implantes ou como arcabouços porosos empregados na engenharia de tecidos.

O leque de aplicações que este terpolímero pode ter é grande, podendo ser aplicado tanto como fixadores, na forma de placas e parafusos, em pequenas fraturas; como dispositivos de liberação controlada de fármacos e também como arcabouços porosos para cultura de células na engenharia de tecidos.

A engenharia de tecidos, assim como as aplicações que envolvem o campo da fixação de fraturas, buscam materiais que possuam boas propriedades mecânicas de forma

que atendam as necessidades específicas do ambiente em que estarão temporariamente presentes. No caso da engenharia de tecidos tem havido um crescente aumento do interesse na aplicação de materiais poliméricos na área da restauração tecidual de forma a regenerar tecidos com base em tecidos pré-existentes. O grande desafio da engenharia de tecidos tem sido no sentido de desenvolver materiais poliméricos capazes de atuar positivamente na interface com os tecidos receptores no organismo (BARBANTI *et al.*, 2005).

Os polímeros sintéticos do tipo biorreabsorvíveis representam uma escolha atrativa na engenharia tecidual, pois esse tipo de material pode ter, durante seu processo de síntese, suas propriedades delineadas, em termos de propriedades mecânicas, macroestrutura e perfil de degradação (PÊGO, 2003). O desenvolvimento de copolímeros ou terpolímeros com alta elasticidade e perfil controlável de degradação também apresenta um potencial de uso na área da engenharia tecidual bastante promissor (STOCK, 2001).

Nesse contexto, a presença do TMC na cadeia do PLDLA permite um aumento da elasticidade do material, elevando o seu número de aplicações nesta área. (PÊGO, 2003)

## *2.4 Tecido Ósseo/Regeneração Óssea*

O osso é o principal tecido de sustentação do corpo, caracterizado por ser uma forma rígida de tecido conjuntivo altamente especializado. Dentre suas funções está à proteção dos órgãos, armazenamento de sais como o cálcio, além de ser à base da mecânica para o movimento (MOORE e DALLEY, 2007).

Os ossos são grandes armazenadores de substâncias, sobretudo de íons de cálcio e fosfato. A extrema rigidez do tecido ósseo é resultado da interação entre os componentes orgânico e mineral da matriz. A matriz óssea é composta por uma parte orgânica e uma parte inorgânica cuja composição é dada basicamente por íons fosfato e cálcio formando cristais de hidroxiapatita (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999). Dentre os tipos celulares que compõem o tecido ósseo se encontram:

1) Células osteoprogenitoras ou pré-osteoblastos, que são derivadas do mesênquima e são as únicas células ósseas capazes de divisão, podendo posteriormente se diferenciar em osteoblastos. São encontradas na porção interna do periósteo, no endósteo e nos canais ósseos que contêm vasos sanguíneos (SOMMERFELDT e RUBIN, 2001).

2) Osteoblastos: Células que sintetizam a parte orgânica da matriz óssea. Durante a alta atividade sintética, os osteoblastos destacam-se por apresentar elevada basofilia, que se atenua a medida que a síntese protéica é reduzida. Essas células apresentam-se com formato poliédrico, possuindo núcleo ovóide e sistemas de comunicação intercelular. Os osteoblastos no momento em que estão envolvidos completamente por matriz óssea dão origem aos osteócitos (ROSS e ROMRELL, 1993; SILVA, 2000).

3) Osteócitos: São células localizadas em cavidades ou lacunas dentro de trabéculas ósseas. Estas células estão associadas à nutrição das trabéculas, possuindo prolongamentos citoplasmáticos que conectam umas as outras (ROSS e ROMRELL, 1993; SILVA, 2000).

4) Osteoclastos: Células que participam dos processos de reabsorção do tecido ósseo. São células gigantes e multinucleadas, extensamente ramificadas, derivadas da fusão de monócitos que atravessam os capilares sanguíneos. Em geral, medem 30 a 50 micrometros, possuem três a seis núcleos ovóides. Nos osteoclastos jovens, o citoplasma apresenta uma leve basofilia que vai progressivamente diminuindo com o amadurecimento da célula, até que o citoplasma torna-se acidófilo. Os osteoclastos através da ação enzimática escavam a matriz óssea, formando depressões conhecidas como superfícies de reabsorção ou lacunas de Howship (ROSS e ROMRELL, 1993; SILVA, 2000).

Embora o tecido ósseo apresente uma grande resistência, ele pode ser lesado. Os defeitos ósseos podem ocorrer devido a uma anormalidade congênita, trauma ou doença (SEAL *et al.*, 2001). O tecido ósseo é continuamente repostado e remodelado de acordo com a tensão aplicada pelos osteoblastos e osteoclastos, sendo capaz de se auto-reparar após ferimentos. Uma fratura significa que existe um osso quebrado, e de maneira geral as causas mais comuns de fraturas envolvem acidentes automobilísticos, quedas e choques

entre jogadores. No caso das fraturas na região da cabeça e da face, se o tratamento não for adequado, pode resultar em deformidades permanentes ao paciente.

O reparo tecidual é um dos fenômenos mais interessantes observado nos organismos vivos, podendo ser considerado como um dos mecanismos primários de sobrevivência (LIZARELLI, LAMANO-CARVALHO e BRENTGANI, 1999). Um dos tecidos com maior capacidade de reparação é o tecido ósseo, exibindo um potencial de regeneração surpreendente capaz de restaurar perfeitamente sua estrutura original e suas propriedades mecânicas (SCHENK, 1996).

O mecanismo de reparação óssea em condições normais, ocorre inicialmente por um aumento da atividade osteoblástica, formando rapidamente tecido ósseo imaturo, matriz orgânica, seguida pelo depósito de sais de cálcio. Os osteoblastos secretam colágeno e substância fundamental amorfa que constituem tecido ósseo não mineralizado, ou osteóide. Esta matriz colágena é passível de mineralização posterior.

O reparo em defeitos ósseos é um bom modelo para o estudo da regeneração óssea. Ao contrário das fraturas, os defeitos são menos propensos a fatores mecânicos e obstruções do suprimento sanguíneo. A cicatrização do defeito, portanto, foi utilizada em muitas experiências clássicas tratando-se da influência de medidas cirúrgicas e farmacológicas para melhorar a regeneração óssea.

A resposta do osso à fratura, perfuração, infecção, interrupção da fonte sanguínea e às lesões de expansão é relativamente limitada. O osso inerte deve ser reabsorvido, e o osso novo deve ser formado, ocorrendo crescimento de vasos sanguíneos na área envolvida (GUYTON, 1993; ROSS e ROMRELL, 1993).

Uma simples lesão produzida pela perfuração de um orifício parece ativar uma sequência programada de eventos, iniciados pelo preenchimento do defeito por formação óssea aposicional e depois conduzida a uma integração estrutural da área do defeito por remodelação harvesiana. Pequenos defeitos ósseos esponjosos revelam um padrão de cicatrização similar ao da cortical. A cicatrização também ocorre em duas fases, começando com formação de osso embrionário atravessando o defeito e no interior dos espaços intertrabeculares adjacentes. Numa segunda fase, a remodelação óssea restaura a arquitetura trabecular (SCHENK, 1996).

O uso de ratos em estudos experimentais é clássico pela sua facilidade de manuseio e baixo custo. A utilização de ratos para estudo da remodelação óssea também é frequente, uma vez que as respostas do tecido ósseo destes mamíferos às injúrias se assemelham as encontradas em humanos (GOUVEIA, 1996; SCHENK, 1996).

As fraturas que envolvem ossos têm uma grande repercussão na saúde pública e estão presentes constantemente na área médica. Apesar de apresentar uma determinada capacidade regenerativa, o tecido precisa de auxílio para exercer essa função (CIANI *et al.*, 2006). É nesse contexto que entram os fixadores de fraturas, capazes de restabelecer a função da região envolvida, sem que haja uma exacerbada resposta inflamatória, em função da sua presença.

## *2.5 Dispositivos Biorreabsorvíveis Como Fixadores de Fraturas*

O copolímero poli(L-co-D,L ácido láctico) se mostra clinicamente adequado na consolidação óssea envolvendo pequenas fraturas, por apresentar a força necessária para a fixação da fratura e um tempo de degradação compatível com sua recuperação, tendo como base o conceito de que diferentes aplicações clínicas requerem diferentes perfis de força e tempo de degradação.

Por sua vez, estudos prévios realizados com o homopolímero Poli(trimetileno carbonato) apontaram que este elastômero apresenta diferentes taxas de degradação para condições *in vivo* e *in vitro*. A rápida erosão de superfície deste homopolímero *in vivo* (PÊGO, 2003) e sua estabilidade nas condições *in vivo*, sugerem que enzimas podem estar envolvidas no processo de degradação (PÊGO, 2002). Além da atividade enzimática, o pH de um ambiente vivo específico pode contribuir para o processo de degradação *in vivo*. Com isso, o estudo *in vivo* torna-se essencial para acompanhar desempenho do terpolímero em um tecido vivo.

A resposta fisiológica ao implante varia em função de sua forma, do tempo de implante, do material implantado e do local do implante (maior ou menor fluxo de fluídos e maior ou menor solicitação mecânica). O estudo *in vivo* do terpolímero serve como uma ferramenta a mais na caracterização desse material, fornecendo informações importantes a cerca da biocompatibilidade do novo material sintetizado (MOTTA e DUEK, 2009).

Na consolidação de fraturas ósseas deve-se considerar o método de imobilização ou fixação. Ao se utilizar fixação rígida com implantes metálicos o osso torna-se menos resistente após sua consolidação. A fim de se evitar a atrofia óssea, implantes ortopédicos temporários vêm sendo desenvolvidos (MOTTA, 2007).

Os implantes ortopédicos temporários a base de polímeros biorreabsorvíveis apresentam como característica comum o fato de serem necessário apenas enquanto ocorre a consolidação óssea. Esses materiais são produzidos para possuir rigidez suficiente para permitir a regeneração óssea, manter as propriedades mecânicas por um período de tempo determinado e então, começar a se degradar (YUEHUEI *et al.*, 2000).

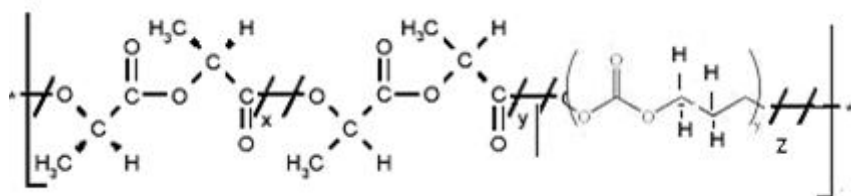
Os requerimentos desejados de materiais poliméricos usados para unir fraturas ósseas ou fragmentos de osteotomias são que eles permaneçam inalterados até que as bordas do defeito ósseo se unam, normalmente por volta de 4-8 semanas, e então comece a degradar completamente uma vez que a sua propriedade mecânica não seja mais necessária (YUEHUEI *et al.*, 2000).

Este trabalho teve como objetivo obtenção e caracterização de pinos do terpolímero de poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato), e o estudo dos dispositivos através de degradação *in vitro* e *in vivo* visando aplicação como dispositivos para fraturas ósseas.

### 3 METODOLOGIA

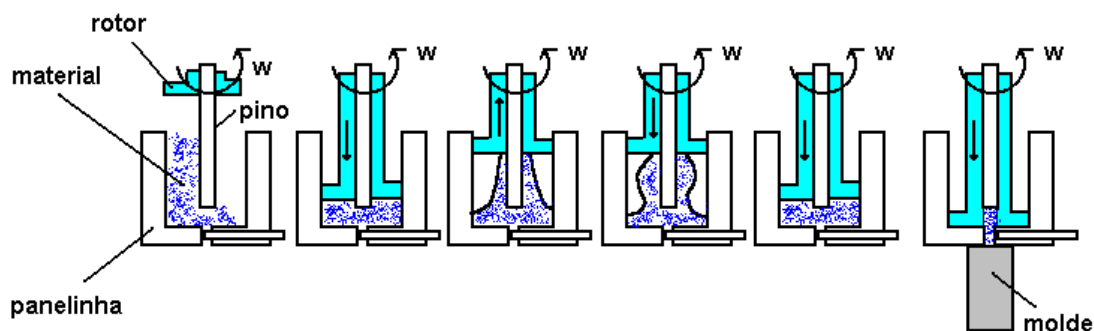
#### 3.1 Preparação dos Pinos por Fusão

O terpolímero PLDLA-co-TMC (Figura 3) foi sintetizado no laboratório de Biomateriais (pedido de patente PI 11021659) de massa molar ( $M_w$  190.000  $\text{g.mol}^{-1}$ ).



**Figura 3.** Representação da estrutura química do terpolímero PLDLA-co-TMC (MOTTA,2009)

Os pinos de PLDLA-co-TMC foram processados por fusão obtendo-se dispositivos com 2,5 mm de diâmetro utilizando-se uma mini-injetora Mini Max Molder modelo LMM - 2017. O esquema de funcionamento do Mini Max encontra-se na Figura 4.



**Figura 4.** Representação da produção de pinos de PLDLA-co-TMC em uma mini-injetora.

As amostras foram colocadas dentro do suporte da mini-injetora e aquecidas a 240°C por 2 minutos, seguido de 2 minutos com cisalhamento (velocidade de cisalhamento constante, de 5 rpm). O molde foi envolto por uma resistência para mantê-lo aquecido a 100 °C. Após esse procedimento injetou-se a mistura no molde, deixando esfriar na temperatura ambiente. Depois de retirada do molde o pino foi armazenado no dissecador.

### *3.2 Estudo da Degradação In Vitro dos Pinos de PLDLA-co-TMC*

Os pinos de PLDLA-co-TMC foram colocados em tubos de ensaios com tampa rosqueada, contendo solução tampão fosfato (PBS) pH 7,4 a  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , sendo retiradas após 15, 60, 90, 120 e 150 dias, lavadas com água destilada e secas sob vácuo. Depois de secas as amostras foram caracterizadas pelas técnicas descritas a seguir:

### *3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)*

As análises de DSC foram realizadas em um equipamento modelo 2920 da TA Instruments. Amostras pesando aproximadamente 7-10 mg foram seladas em panelinhas de alumínio e aquecidas de 25°C a 200 °C a uma taxa de aquecimento de  $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  (primeiro aquecimento), e mantidas a esta temperatura por 5 min. Subsequentemente foram resfriadas a -100°C a uma taxa de  $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  e mantidas nessa temperatura por 5 min. Após, foram aquecidas novamente até 200°C a uma taxa de  $10^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}$  sob atmosfera de nitrogênio.

### *3.4 Análise Termogravimétrica (TGA)*

As curvas termogravimétricas foram obtidas com equipamento STA 409CNETZSCH- Geratebau Gmbr Thermal Analysis. Amostras pesando aproximadamente 20 mg foram submetidas ao aquecimento na faixa de 25-400 °C, a 10°C.min<sup>-1</sup> sob atmosfera de He.

### *3.5 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)*

As massas molares numérica média ( $M_n$ ), ponderal média ( $M_w$ ) e o índice de polidispersão (IP) foram obtidos em um cromatógrafo de permeação em gel (GPC) da marca Waters, a temperatura de 25°C e coluna C18 da Waters, utilizando o tetrahidrofurano (THF) como fase móvel, numa concentração de 20 mg.mL<sup>-1</sup>. O padrão utilizado para calibração da curva foi o poliestireno, utilizando o detector de índice de refração Waters 410.

### *3.6 Análise Dinâmico Mecânica (DMA)*

Foram realizadas análises utilizando o equipamento da marca NETZSCH-Análises dinâmica-mecânico- 242. As amostras foram submetidas à deformação senoidal de 15µm de amplitude a uma frequência de 60 Hz na faixa de -100 a 200°C, a uma taxa de aquecimento de 5°C.min<sup>-1</sup>, usando um sistema de flexão de três pontos.

### 3.7 Ensaio Mecânico de Flexão

Os pinos foram submetidos a ensaios de flexão pelo método de três pontos, segundo a norma ASTM D 790-95a (1999), em uma MTS TestStar II, utilizando uma célula de carga de 100 kgf (com fundo de escala de 20kgf), a uma velocidade de 5 mm.min<sup>-1</sup>. A distância entre as duas extremidades foi de 2 cm.

O módulo de Young (E) e a tensão máxima no alongamento ( $\sigma$ ) foram obtidos segundo Nielsen (NIELSEN, 1974). Sendo o F a força (N), Lo é a distância entre as extremidades (mm),  $\sigma$  a tensão máxima no alongamento (MPa), Y é a deformação (mm) e D é o diâmetro do pino (mm), equações (1) e (2).

$$E = \frac{4 \cdot F \cdot L_0^3}{3 \cdot \pi \cdot D^4 \cdot Y} \quad (1)$$

$$\sigma = \frac{8 \cdot F \cdot L_0}{\pi \cdot D^3} \quad (2)$$

### 3.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para a observação da morfologia da superfície e da superfície da fratura, as amostras foram imersas em nitrogênio líquido por cerca de 5 min para criofratura. Em seguida, foram recobertas com ouro (BALZERS SCD 050) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JXA-840<sup>a</sup>).

### 3.9 Perda de Massa

Para o estudo da perda de massa, dispositivos de PLDLA-TMC foram pesados e a seguir colocados em tubos de ensaio contendo solução tampão de fosfato (pH = 7,4) num banho a 37 °C e retiradas em tempos determinados. Após a retirada esses dispositivos eram lavados em água destilada, secos em estufa a vácuo a 45 °C por 8 horas. As percentagens de perda de massa foram calculadas utilizando-se a equação a seguir:

$$\text{Perda de Massa (\%)} = \frac{100 \times (\text{Massa inicial} - \text{Massa após secagem})}{\text{Massa inicial}} \quad (3)$$

### 3.10 Estudo In Vivo

Este trabalho foi enviado a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) sob o Protocolo nº “A020/CEUA/2011” e está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal.

Uma vez utilizado, o modelo animal deve ser capaz de analisar diversas variáveis, que um tecido vivo possui, em um período de tempo relativamente curto. O modelo animal escolhido, rato Wistar, tem semelhança fisiológica e patológica com os seres humanos (PEARCE *et al.*, 2007).

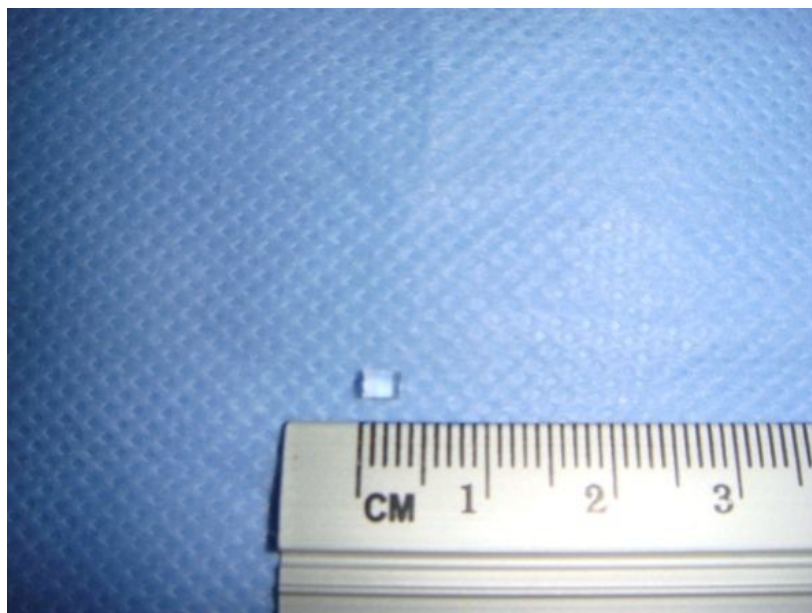
Segundo Schmitz e Hollinger (1986), um defeito ósseo experimental deve ser tão grande que não ocorra reparo espontâneo, pois só nessa situação o potencial osteogênico do implante, enxerto ou medicamento pode ser considerado real. Instituiu-se o conceito de defeito ósseo de tamanho crítico para minimizar diferenças relacionadas à idade, espécie e sítio anatômico em animais experimentais, padronizando-se os defeitos para possibilitar a comparação dos resultados dos vários estudos (SWEENEY *et al.*, 1995), além de poder considerar sem erro o potencial osteogênico do material em teste. Segundo Prado (2006), defeitos na diáfise de tibia de rato a partir de 2mm são considerados defeitos críticos por não se regenerarem espontaneamente.

No presente trabalho, foram utilizados 40 ratos Wistar de ambos os sexos, com idade aproximada de 3 meses e pesando aproximadamente 300 gramas. Esses animais são provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Sorocaba (FCMS/PUC-SP) e permaneceram no Biotério recebendo ração comercial e água “*ad libitum*” durante todo o período do experimento, sendo mantidos em gaiolas à temperatura ambiente. Foram sacrificados 10 animais para cada tempo de 15, 60, 90 e 180 dias após a intervenção cirúrgica inicial. Os animais foram divididos em 2 sub-grupos: teste e controle. No sub-grupo teste realizou-se o defeito na diáfise da tibia direita seguido de implante do pino de PLDLA-co-TMC. Enquanto que no sub-grupo controle houve apenas a criação do defeito.

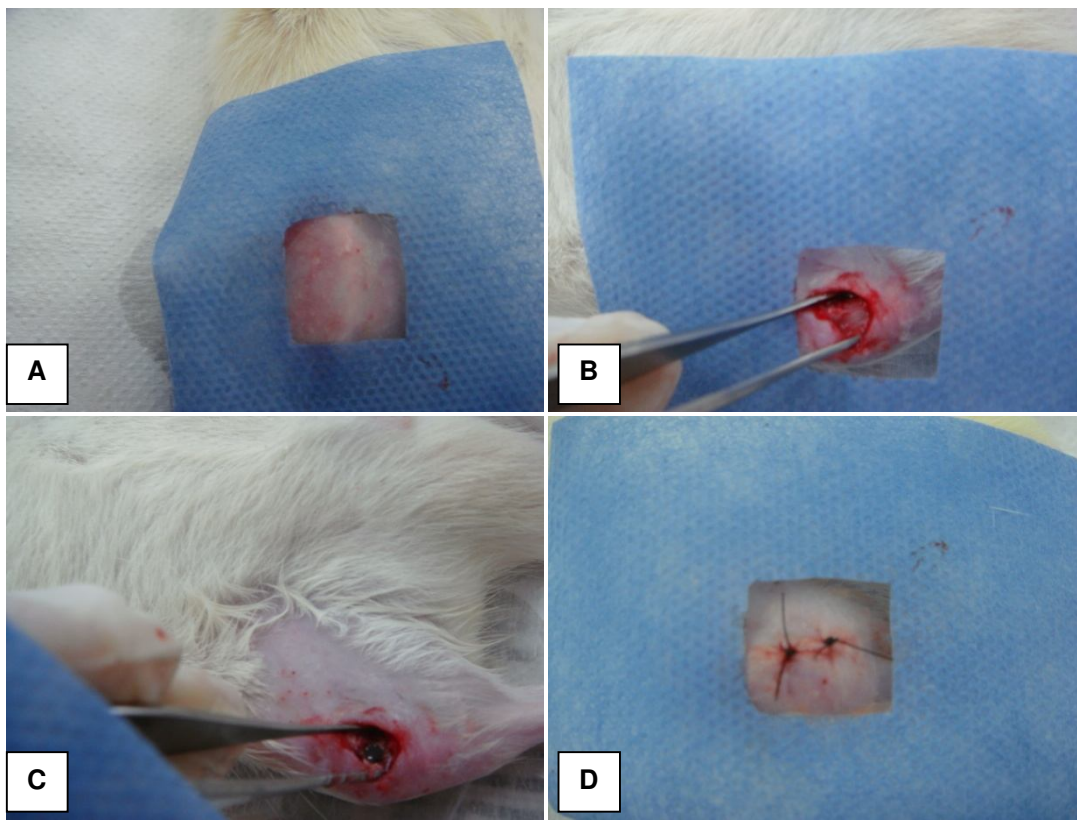
### *3.11 Implante dos Pinos*

Os ratos foram pesados e logo após submetidos a anestesia geral com uma solução de Ketamina 10% (100mg/Kg) e Cloridrato de Xylazina 2% (6mg/Kg), administrados via intramuscular.

Os animais foram submetidos à tricotomia da região medial das patas traseiras seguida de assepsia. Realizou-se uma incisão longitudinal na pele de aproximadamente 2 cm ao longo da borda anterior da perna seguindo a linha da tíbia. Com auxílio do bisturi, o tecido muscular foi seccionado e afastado até a exposição do periósteo. Com o uso de um mini-motor de baixa rotação (odontológico) Beltec® e uma broca Carbide® de 2,5 mm de diâmetro, produziu-se uma cavidade no terço superior da tíbia, perfurando a cortical e estendendo-se até o canal medular o que permitiu a introdução do pino de PLDLA-co-TMC na tíbia lesionada, figura 5. Em seguida, o tecido muscular e a pele do animal foram suturados e aplicada em sua superfície uma solução anti-séptica para a prevenção de infecções, como mostrado na figura 6. Este procedimento ocorreu em metade do grupo dos animais, sendo que o grupo restante foi mantido como controle.



**Figura 5.** Pino de PLDLA-co-TMC com 3mm de comprimento e 2,5mm de diâmetro.



**Figura 6.** Sequência cirúrgica: A) Tricotomia; B) Terço superior da tíbia; C) Implante do pino de PLDLA-co-TMC e D) Sutura.

### *3.12 Sacrifício dos Animais*

Finalizado os tempos de implante programados, os animais foram sacrificados com o líquido anestésico inalante Halotano (Tanohalo ®) seguido de deslocamento cervical. Em seguida as tíbias foram dissecadas e o segmento de cada uma delas contendo o material implantado e os controles foram fixados em paraformoldeído 4% para manutenção da integridade tecidual.

### *3.13 Processamento do Material para Análise Histológica*

Para o processamento histológico, inicialmente, fixou-se o material em paraformaldeído 4% por um período de 24 horas a 4°C. Após a fixação, as amostras foram descalcificadas em solução composta por ácido clorídrico, EDTA tetrasódico, tartarato de sódio, tartarato de sódio e potássio e água destilada por 21 dias.

Posteriormente, prosseguiu-se com a preparação de acordo com as técnicas utilizadas para Microscopia de Luz, utilizando-se parafina como meio de inclusão. Desta forma, o material foi processado da seguinte forma: sequência de três cubas, contendo etanol 80, 90 e 100%, onde permaneceram por 30 minutos em cada cuba. A seguir foram transferidas para o xilol I e II onde permaneceram por mais 30 minutos em cada solução. Os materiais foram banhados em parafina (Histosec-Merck®) I e II pelo período de 30 minutos. Em seguida os fragmentos foram incluídos em formas com parafina.

### *3.14 Preparação das Lâminas*

Depois de gelados e devidamente identificados, os blocos foram colocados no micrótomo (Leica® RM 2245) devidamente regulado, para efetuação dos cortes histológicos. Cinco cortes semi-seriados de cada bloco, com aproximadamente 3µm de espessura e 15µm entre cada nível, foram obtidos para permitir a análise de toda a região do defeito.

As fitas obtidas foram colocadas no banho histológico e retiradas com uma lâmina de vidro. As lâminas foram introduzidas em estufa, a temperatura de 60°C para retirada do

excesso de parafina contida nos cortes histológicos. Por fim, as lâminas foram coradas com H.E. (hematoxilina e eosina).

Nesta técnica utilizou-se 2 corantes: a hematoxilina, um corante básico, que cora os compostos aniônicos (ex: ácidos nucleicos), apresentando uma tonalidade azul arroxeado e a eosina, um corante ácido que cora os compostos catiônicos (a maioria das proteínas, glicoproteínas ácidas, etc) em tom róseo-avermelhado.

As lâminas, primeiramente, foram coradas com hematoxilina (10 min). Em seguida, lavou-se bem a lâmina com água corrente (5 min) e depois com água destilada (5min). Então, colocou-se em eosina aquosa 0.5% (5 a 10 min) e, na sequência, lavou-se rapidamente com água destilada.

Os cortes foram fixados entre lâmina e lamínula com o uso de entelan (Merk®) e as lâminas observadas em microscópio óptico Nikon® Eclipse E800, seguindo-se com análise histológica para observar a interação polímero/tecido.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o objetivo de caracterizar o PLDLA-co-TMC, pinos foram obtidos por fusão do terpolímero, submetidos a ensaios *in vitro* e *in vivo* e caracterizados quanto às propriedades térmicas, mecânicas, morfológicas e histológicas visando aplicação como dispositivos ortopédicos.

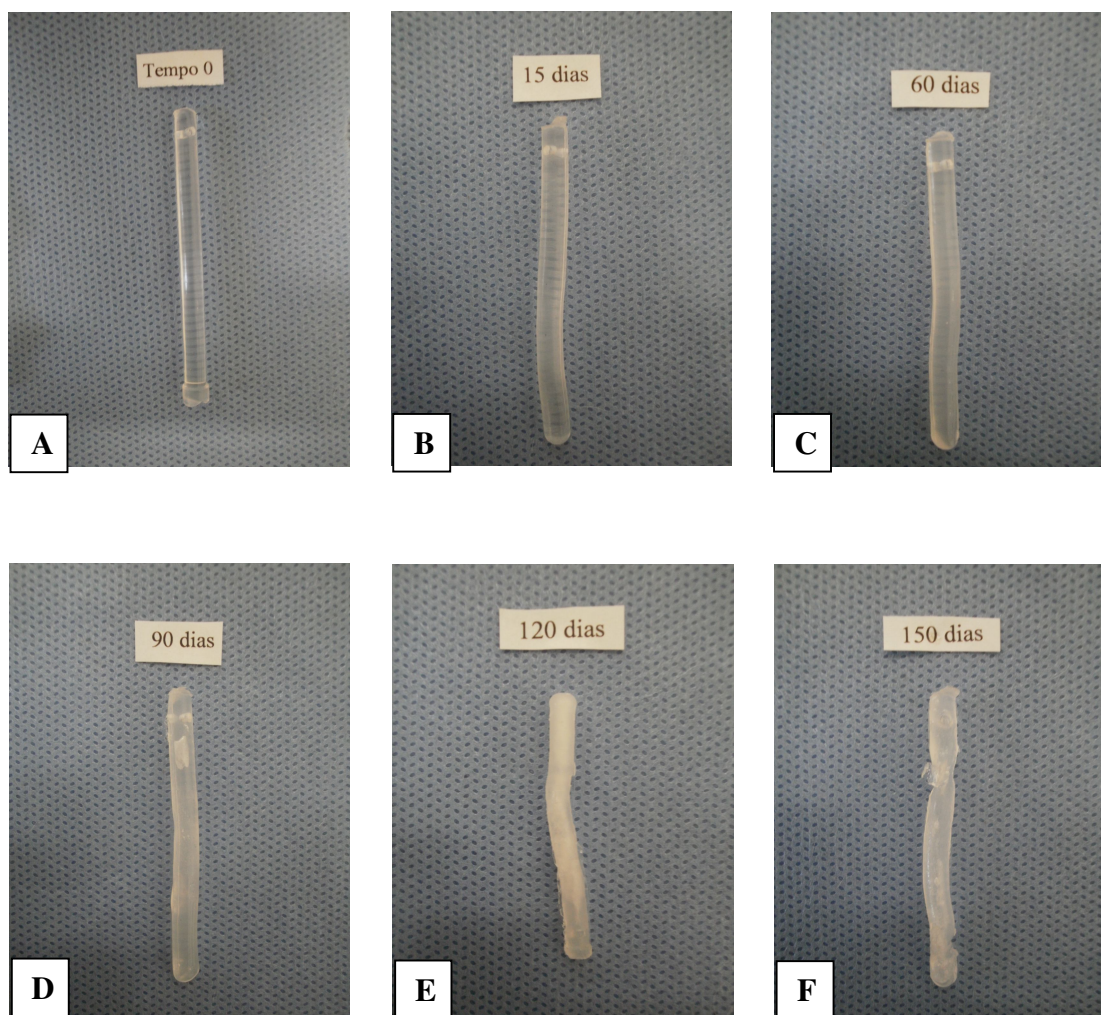
### 4.1 Estudo da Degradação In Vitro dos Dispositivos de PLDLA-TMC

O estudo *in vitro* estima o comportamento do material num ambiente que simula as condições corpóreas de forma aproximada com o que ocorre *in vivo*. Essa simulação é de certa forma aproximada, já que na situação *in vivo* uma série de fatores que não são considerados na situação *in vitro* se fazem presentes, que vão desde tensões a que os materiais estão submetidos, existência de resposta inflamatória, pH do meio e grau de vascularização do local do implante. Entretanto o estudo *in vitro* é de fundamental importância para se conhecer informações do que ocorre com o material num pH e numa temperatura similar ao *in vivo*. No caso de um material novo, como o terpolímero do trabalho o estudo *in vitro* permitirá conhecer o perfil de degradação do material, possibilitando entender como suas propriedades, variam ao longo do tempo.

A seguir serão relatados os resultados obtidos a partir da degradação *in vitro* do poli (L-co-D,L ácido lático-co-TMC). Um total de 7 dispositivos foram colocados em tubos de vidro contendo solução tampão de fosfato salina (PBS, pH 7,4), em um banho termostatizado a  $37,0^{\circ}\text{C} \pm 0,5$  e retiradas nos tempos estipulados ( 0, 15, 60, 90, 120 e 150 dias).

#### 4.1.1 Análise Macroscópica da Degradação In Vitro dos Pinos de PLDLA-co-TMC

A figura 7 mostra a imagem dos pinos de PLDLA-co-TMC nos diferentes tempos de degradação estudados. Macroscopicamente, verifica-se que os pinos apresentaram discretas alterações até 90 dias em solução tampão fosfato, sendo que no tempo de 15 dias já apresentaram uma pequena alteração na forma, a qual era completamente linear. Observa-se também que a transparência apresentada inicialmente diminui em função do tempo de degradação e que a partir de 120 dias as amostras tornam-se de difícil manuseio.



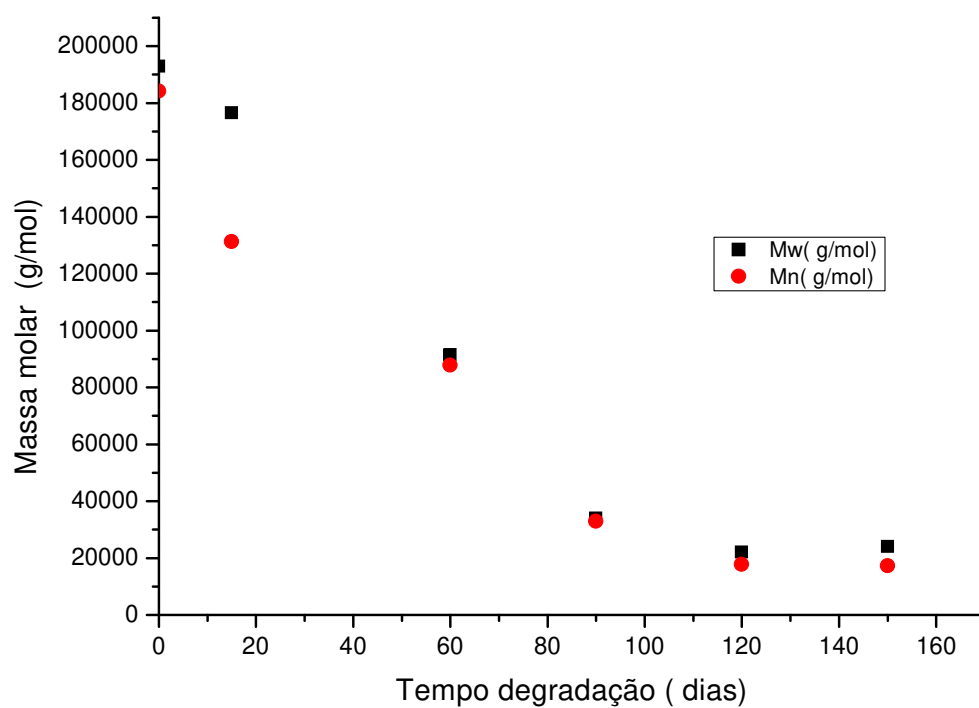
**Figura 7.** Visão macroscópica da degradação *in vitro* dos pinos à base do terpolímero PLDLA-co-TMC em função do tempo de degradação A) antes da degradação; B) 15 dias; C) 60 dias; D) 90 dias; E) 120 dias; F) 150 dias.

#### 4.1.2 Cromatografia de Permeação em Gel

Por meio da análise de GPC foi possível determinar a massa molar média ponderada (Mw), a massa molar média numérica (Mn) e a polidispersividade (IP) em função do tempo de hidrólise para os dispositivos de PLDLA-TMC, cujos valores se encontram na tabela 1. É válido ressaltar que para o estudo de degradação *in vitro* dessa classe de polímeros biorreabsorvíveis, os parâmetros mais sensíveis no acompanhamento desse processo é o perfil da queda nos valores de Mw e Mn apresentada pelo material em estudo. (LEMMOUCHI *et al.*, 1998).

Após 15 dias de estudo *in vitro*, verificou-se uma diminuição discreta da massa molar, nos valores de Mw e Mn. Transcorridos 60 dias houve uma queda acentuada destes valores, próxima a 47% do valor inicial. Essa queda também foi pronunciada no tempo de 90 dias. A partir desse tempo a queda da massa molar foi estabilizada, mas o material já se encontrava bastante degradado, basicamente na forma de oligômeros, conforme pode ser verificado pela Figura 8.

O processo de degradação ocorre por meio da hidrólise das ligações ésteres, originando produtos na forma de oligômeros (ou monômeros) solúveis. A degradação prossegue pela clivagem hidrolítica passiva, sendo caracterizada pela perda de massa, diminuição de massa molar média ponderada (Mw) e massa molar média numérica (Mn).



**Figura 8.** Variação de Mw e Mn em função do tempo de degradação para os dispositivos de PLDLA-TMC.

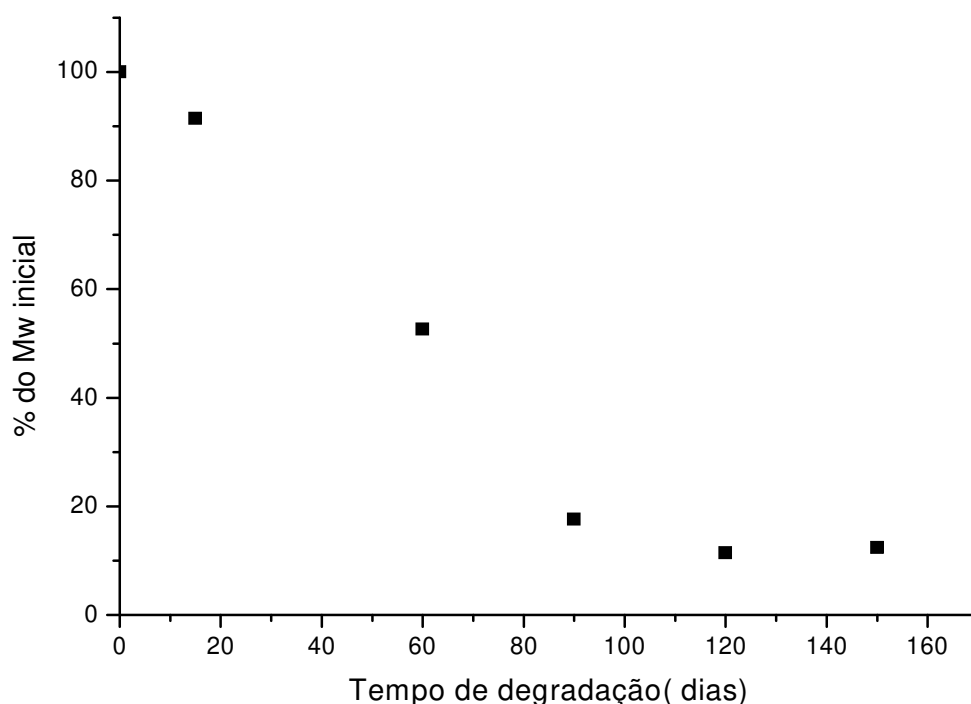
A queda do tamanho das cadeias (Mw) é acompanhada pela queda no número das cadeias (Mn) ao longo do processo de degradação.

**Tabela 1.** Dados de GPC para os dispositivos de PLDLA-TMC em função do tempo de hidrólise *in vitro*.

| PLDLA-TMC<br>(Dias) | Mw<br>(Dalton) | Mn<br>(Dalton) | IP<br>(Mw/Mn) |
|---------------------|----------------|----------------|---------------|
| 0                   | 192.907        | 184.176        | 1,04          |
| 15                  | 176.457        | 131.174        | 1,34          |
| 60                  | 91.463         | 87724          | 1,04          |
| 90                  | 34.002         | 32.840         | 1,04          |
| 120                 | 22.044         | 17.759         | 1,24          |
| 150                 | 23.982         | 17.233         | 1,4           |

Mw = massa molar média ponderada, Mn = massa molar média numérica IP = polidispersividade.

A Figura 9 mostra a porcentagem de queda em relação ao Mw inicial durante a degradação *in vitro* do dispositivo, podendo ser verificado que inicialmente (15 dias) o dispositivo sofre uma discreta diminuição da massa molar, contudo, transcorridos 60 dias a queda é expressiva atingindo um valor próximo a 50% em relação a massa molar inicial.

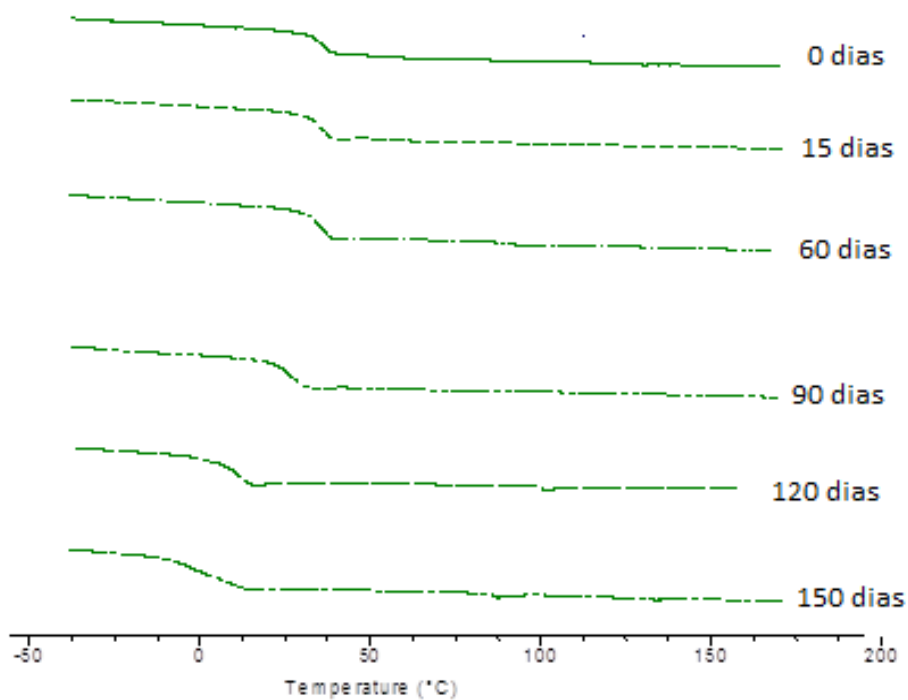


**Figura 9.** Perfil da queda no valor de Mw em função do tempo de degradação de pinos de PLDLA-TMC.

#### 4.1.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A degradação *in vitro* dos pinos de PLDLA-TMC foi acompanhada por meio dos resultados obtidos no 2º aquecimento pela técnica de DSC, Figura 10. Pode ser claramente verificado que o terpolímero PLDLA-TMC se mantém amorfo durante todo o período de estudo *in vitro* realizado, apresentando somente a temperatura de transição vítrea, Tg. Esse comportamento difere do comportamento apresentado pelo copolímero PLDLA durante o processo de degradação, conforme estudado por (MOTTA, 2007), onde verificou-se o surgimento de vestígios de cristalinidade no transcorrer da degradação. No caso do terpolímero, a presença do TMC ao longo da cadeia age de forma a impedir que ocorra,

mesmo de forma discreta, como verificado no caso do PLDLA, a organização das cadeias, responsável pela presença de cristais.



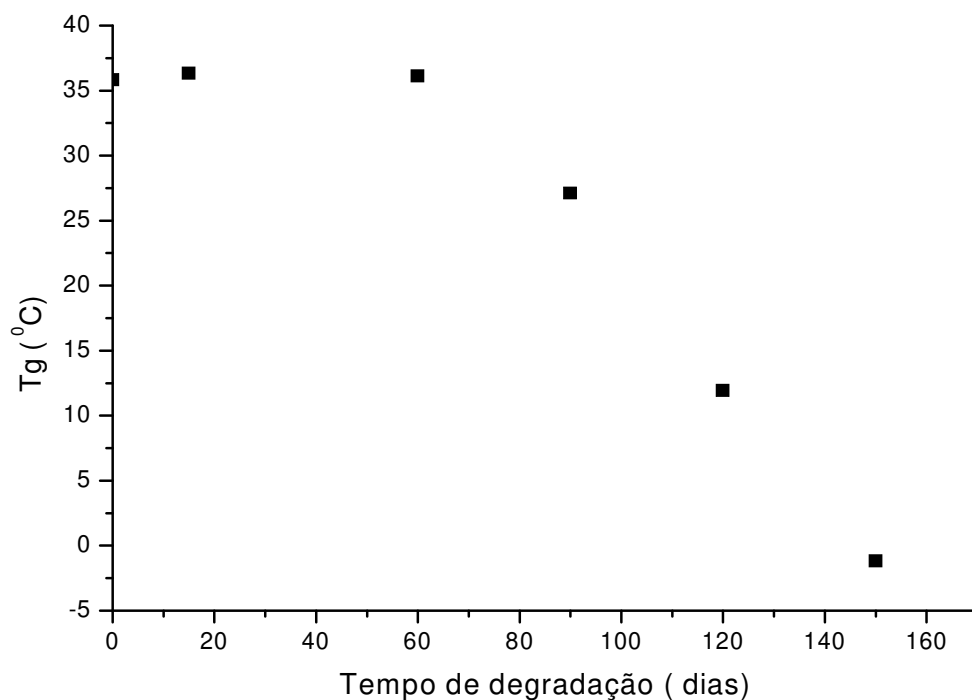
**Figura 10.** Termogramas de DSC do 2º aquecimento para os pinos de PLDLA-TMC em função do tempo de degradação. A Tabela 2 mostra os valores obtidos por DSC das amostras do terpolímero PLDLA-TMC em função do tempo de degradação.

**Tabela 2.** Variação da Tg das amostras de PLDLA-TMC em função do tempo de degradação.

| PLDLA-TMC<br>(Dias) | Tg (°C) |
|---------------------|---------|
| 0                   | 36      |
| 15                  | 36      |
| 60                  | 36      |
| 90                  | 27      |
| 120                 | 12      |
| 150 dias            | -1      |

Por uma questão de comparação é mencionado aqui o valor da Tg do copolímero PLDLA, sem a presença das unidades de TMC na cadeia, que é de 57°C (MOTTA, 2007), demonstrando a influência do TMC nas propriedades térmicas do terpolímero em estudo. Esse dado é importante na questão do processamento do material, pois direciona as condições que devem ser empregadas na obtenção dos dispositivos.

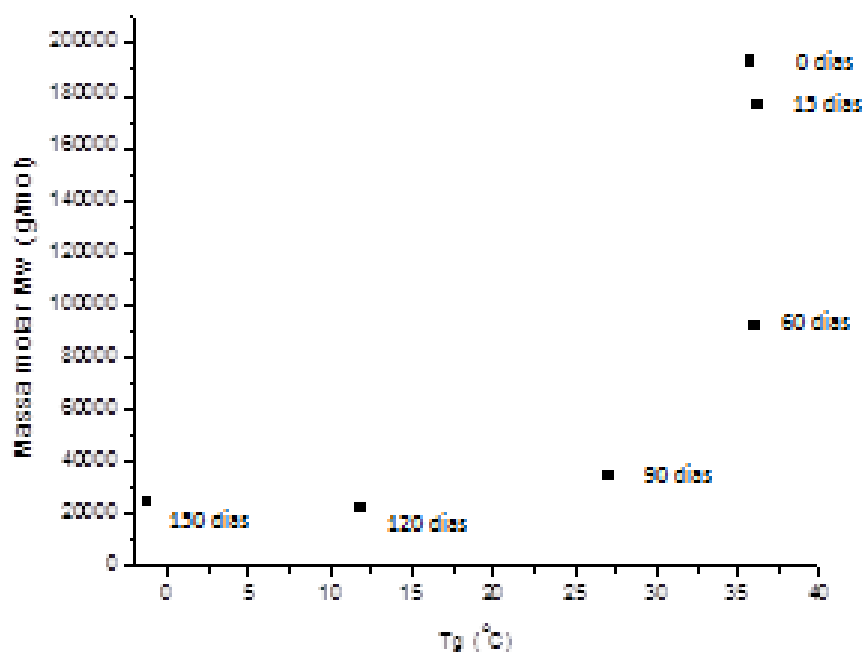
A Figura 11 mostra a queda da Tg em função do tempo de degradação, sendo possível verificar que a Tg é significativamente afetada transcorridos 90 dias.



**Figura 11.** Variação da Tg em função do tempo de degradação.

O fato de existir uma interligação entre vários parâmetros no processo de degradação de dispositivos biorreabsorvíveis, como por exemplo, composição química, massa molar, presença ou não de cristalinidade, entre outros (LI *et al.*, 1990) impede que esses parâmetros sejam tratados de forma isolada, tornando pertinente uma correlação entre as análises.

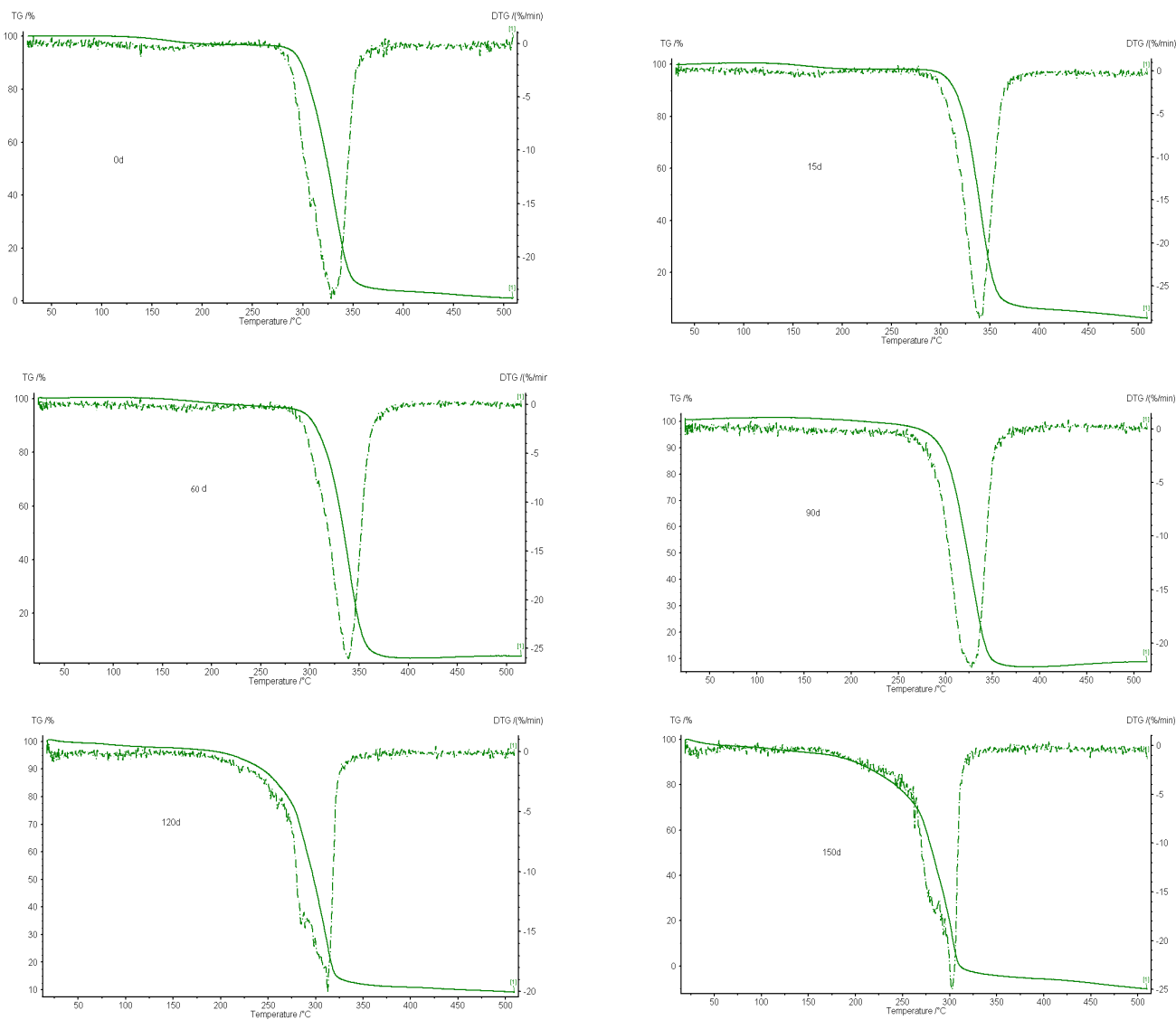
A Figura 12 mostra um paralelo entre a massa molar e a Tg, podendo ser verificado que apesar da massa molar sofrer uma queda significativa por volta de 60 dias, a queda no valor da Tg só é significativa transcorridos 90 dias, período em que a massa molar já havia diminuído suficientemente para tornar possível a mobilidade das cadeias do terpolímero numa temperatura menor.



**Figura 12.** Variação da Tg em função da queda na massa molar durante o estudo *in vitro* em tampão fosfato.

#### 4.1.4 Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos terpolímeros, PLDLA-TMC, durante o processo de degradação, foi analisada por análise termogravimétrica (TGA) (Figura13).



**Figura 13.** Termogramas obtidos a partir das análises termogravimétricas para os pinos de PLDLA-TMC, em função do tempo de degradação.

Pode ser verificado que todas as amostras de PLDLA-TMC apresentaram um único estágio de perda de massa.

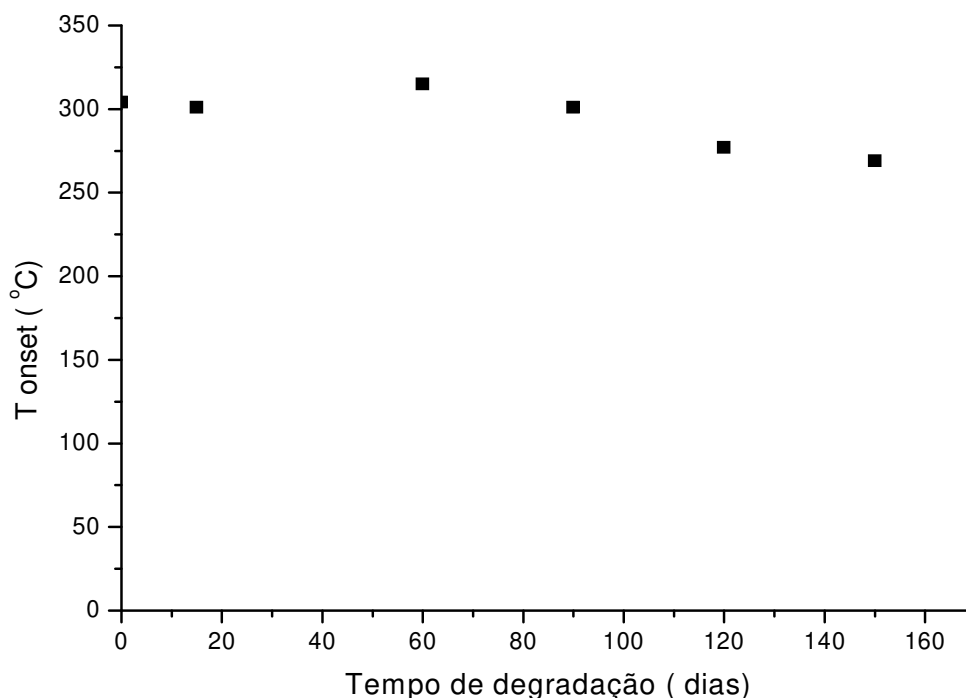
A Tabela 3 é referente às temperaturas de início de perda de massa ( $T_{onset}$ ) durante o processo de degradação e a temperatura onde a perda de massa é máxima ( $T_d$ ), obtidas a partir da figura 13.

**Tabela 3.** Dados de temperatura de início de perda de massa ( $T_{onset}$ ) e temperatura onde a perda de massa é máxima ( $T_d$ ) para o dispositivo de PLDLA durante os vários tempos de estudo *in vitro*.

| <b>Tempo<br/>degradação<br/>(Dias)</b> | <b><math>T_{onset}</math><br/>(°C)</b> | <b><math>T_d</math><br/>(°C)</b> |
|----------------------------------------|----------------------------------------|----------------------------------|
| 0                                      | 304                                    | 330                              |
| 15                                     | 301                                    | 342                              |
| 60                                     | 315                                    | 333                              |
| 90                                     | 301                                    | 327                              |
| 120                                    | 277                                    | 311                              |
| 150                                    | 269                                    | 300                              |

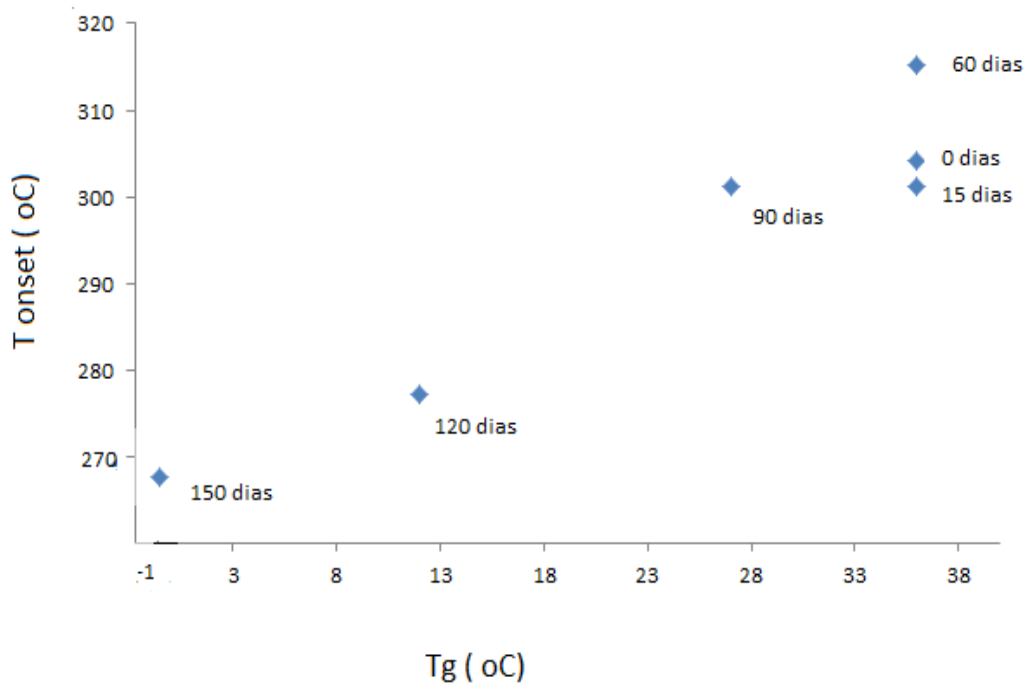
A análise termogravimétrica da degradação *in vitro* do dispositivo de PLDLA-TMC demonstrou que até 90 dias de estudo não ocorreu nenhuma variação significativa na  $T_{onset}$  para o dispositivo, ficando todas próximas à temperatura verificada para o tempo 0, ou seja, aproximadamente 304°C. O tempo de 60 dias apresentou um discreto aumento na temperatura de início de perda de massa, o que pode ser função do efeito de plastificação exercido pela água sobre o TMC, durante o processo de degradação. Essa situação foi verificada para copolímeros que continham TMC em sua estrutura, num trabalho

desenvolvido por Han et al, 2012, no qual se verificou um aumento nos valores de  $T_g$  durante a degradação. A queda no valor de  $T_{onset}$  torna-se significativa por volta de 120 dias, confirmando a estabilidade térmica do material até esse período, conforme mostra a Figura 14.



**Figura 14.** Variação da temperatura de início de degradação térmica ( $T_{onset}$ ) para o dispositivo de PLDLA-TMC durante a degradação *in vitro* em meio tampão fosfato.

A Figura 15 relaciona os valores de  $T_{onset}$  obtidos a partir das análises de TGA com os valores de  $T_g$  obtidos a partir das análises de DSC, durante o estudo da degradação *in vitro*. Até 60 dias de degradação, verifica-se que o material praticamente não se degrada e que a partir desse tempo tanto os valores de  $T_{onset}$  quanto  $T_g$  decrescem. É notado que transcorridos 150 dias o material já sofreu uma degradação intensa, confirmado pelo baixo valor de  $T_g$  (-1 °C) e pela queda na temperatura de início de perda de massa.

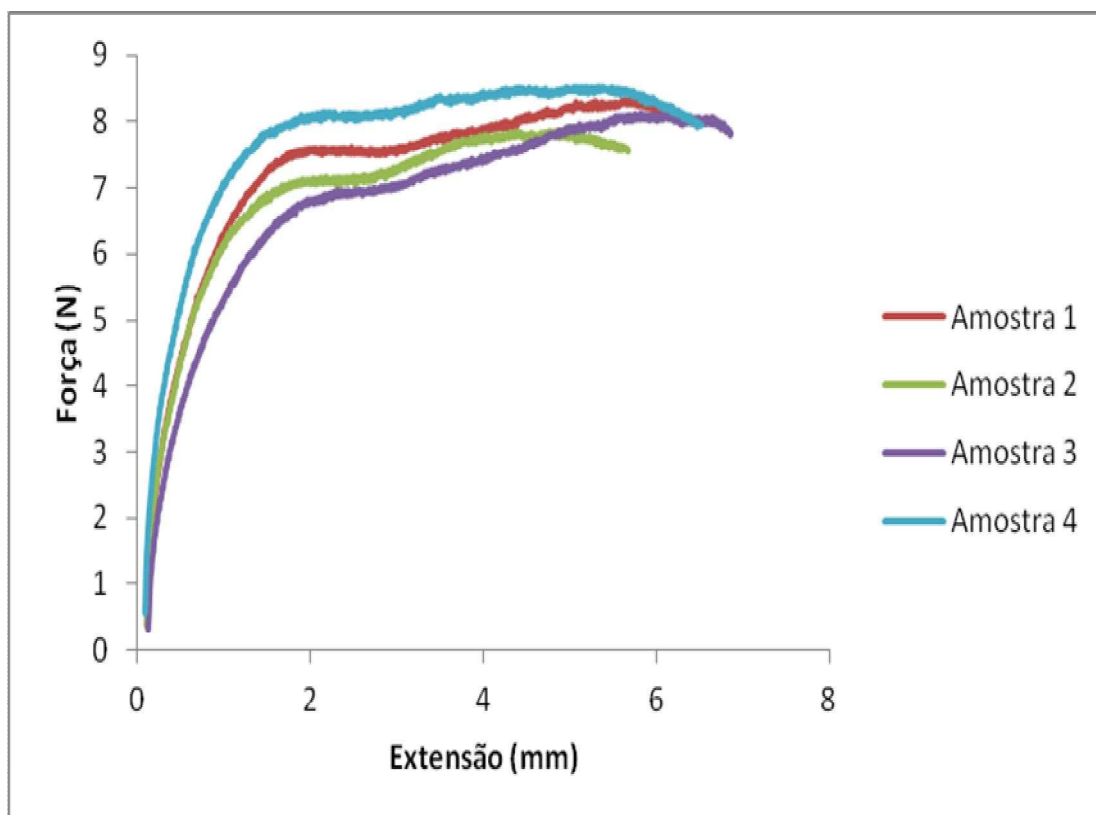


**Figura 15.** Variação da temperatura de início de degradação térmica ( $T_{onset}$ ) e da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) durante a degradação *in vitro* em meio tampão fosfato.

#### 4.1.5 Ensaio Mecânico de Flexão

Foi verificado o comportamento da propriedade mecânica do dispositivo de PLDLA-TMC em função do tempo de degradação. Para isso foram realizados ensaios de flexão pelo método de três pontos, segundo a norma ASTM D 790-95a, como já mencionado no item materiais e métodos.

A Figura 16 mostra as curvas obtidas do ensaio de flexão para o tempo 0 dos pinos de PLDLA-TMC. As demais figuras referentes aos outros tempos encontram-se em anexo. A partir dos dados do gráfico e empregando-se a Equação 3 foram calculados os valores do Módulo de Young.



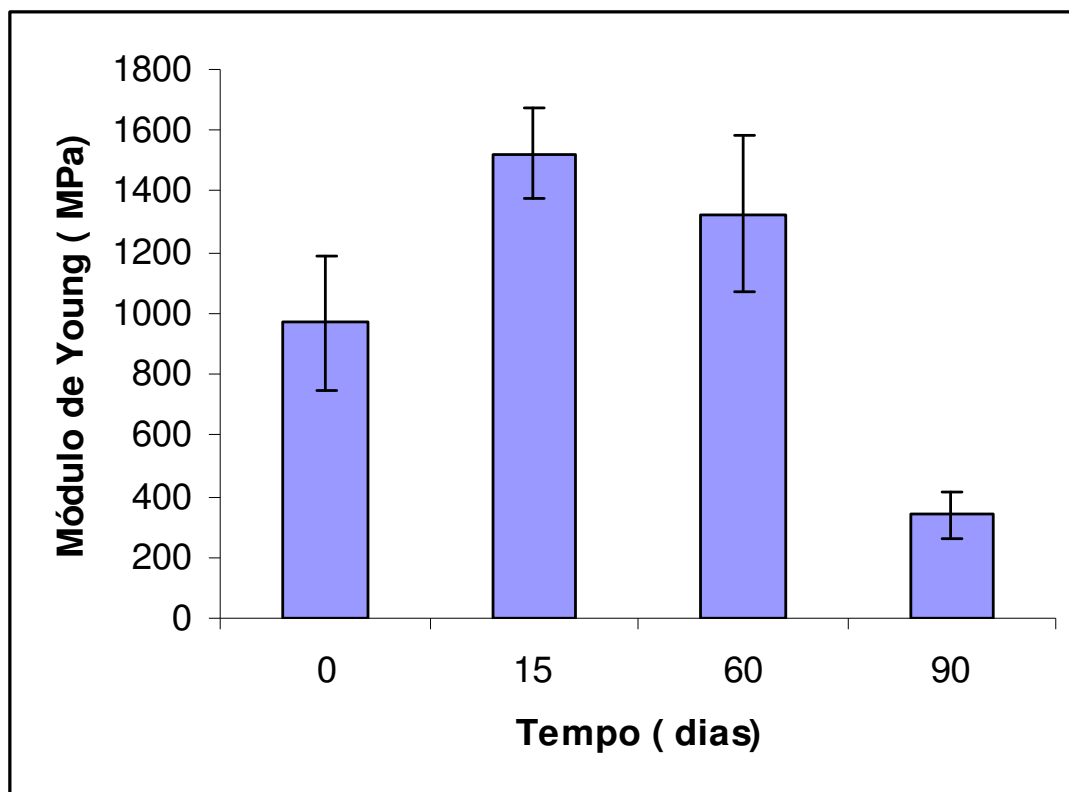
**Figura 16.** Curvas de ensaio mecânico de flexão de três pontos referente de pinos de PLDLA-TMC antes da degradação *in vitro*.

A Tabela 4 é referente aos dados do módulo de Young e da tensão máxima no alongamento para cada tempo de estudo. O ensaio de flexão pôde ser realizado até a amostra referente a 90 dias, pois as de 120 e 150 dias, mostraram-se impróprias para a realização deste ensaio, devido ao estágio avançado de degradação dos pinos.

**Tabela 4.** Valores do módulo de Young e Tensão máxima para os pinos de PLDLA-TMC em função do tempo de degradação.

| <b>Tempo<br/>de<br/>Degrad.</b> | <b>Módulo<br/>de<br/>Young</b> | <b>Tensão<br/>máxima<br/>Along.</b> |
|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| <b>(Dias)</b>                   | <b>(MPa)</b>                   | <b>(MPa)</b>                        |
| 0                               | 970                            | 26,7                                |
| 15                              | 1523                           | 37,4                                |
| 60                              | 1327                           | 33,7                                |
| 90                              | 340                            | 11,1                                |

As figuras 17 e 18 mostram os gráficos referentes aos valores de módulo de Young e da tensão máxima no alongamento, respectivamente, em função do tempo de degradação.

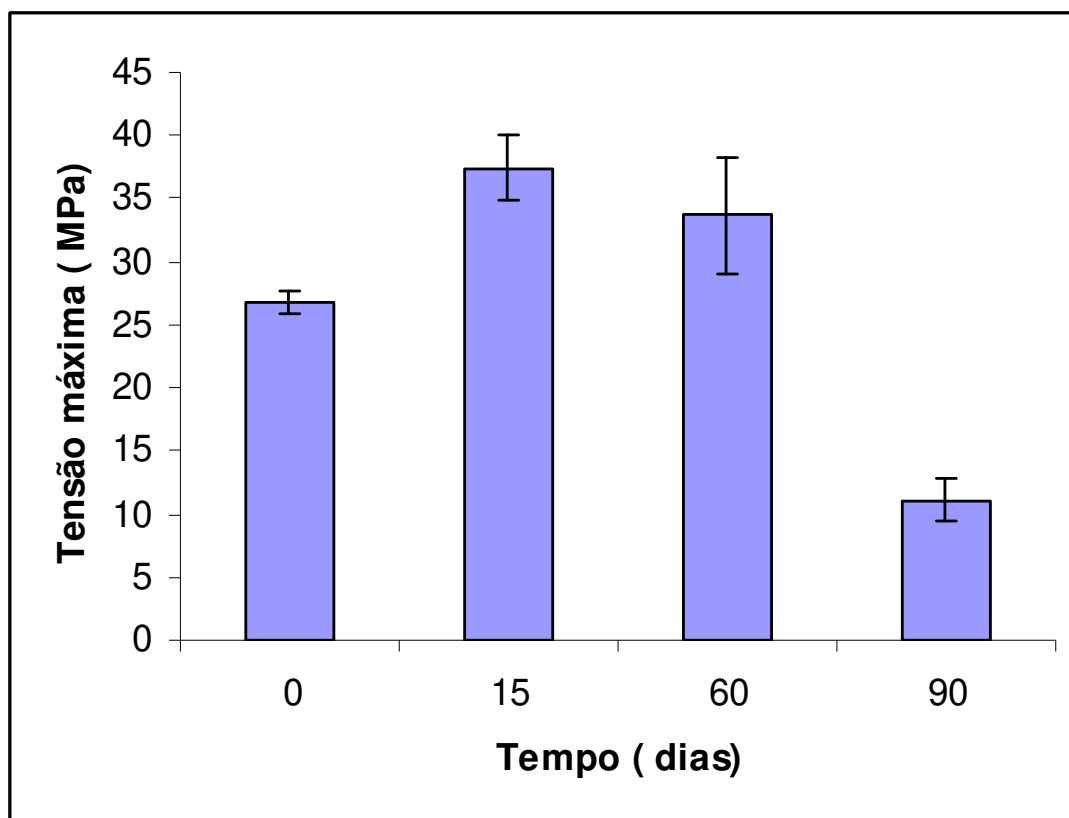


**Figura 17.** Valores de módulo de Young para os pinos de PLDLA-TMC em função do tempo de degradação.

O comportamento apresentado pelos dispositivos de PLDLA-TMC mostrou um relativo aumento no valor de módulo de Young para 15 dias em relação ao tempo inicial. A explicação para isso pode estar na alteração de condições durante o processamento dos dispositivos referente a esse período, ou mesmo ao efeito de plastificação da água passível de ocorrer ao TMC (HAN *et al.*, 2012). Já o resultado de 60 dias está dentro do desvio da análise, podendo ser interpretado como um valor próximo ao tempo zero. O tempo de 90 dias teve uma queda expressiva no valor do módulo de Young, em relação ao tempo inicial, demonstrando que o material em questão perde propriedade mecânica por volta desse período. Dessa forma, o fato do material manter suas propriedades mecânicas até o tempo de 60 dias o torna indicado para recuperação em fraturas, levando em consideração o período de consolidação óssea da mesma.

Além disso, o período em que os dispositivos perderam propriedade mecânica também se mostrou adequado (90 dias), compatível ao tempo requerido a consolidação

óssea, que segundo Tatum *et al.*, (1997) leva em torno de 3 meses para ser efetivada, tornando assim, o material potencialmente aplicável na área de fixação de fraturas.



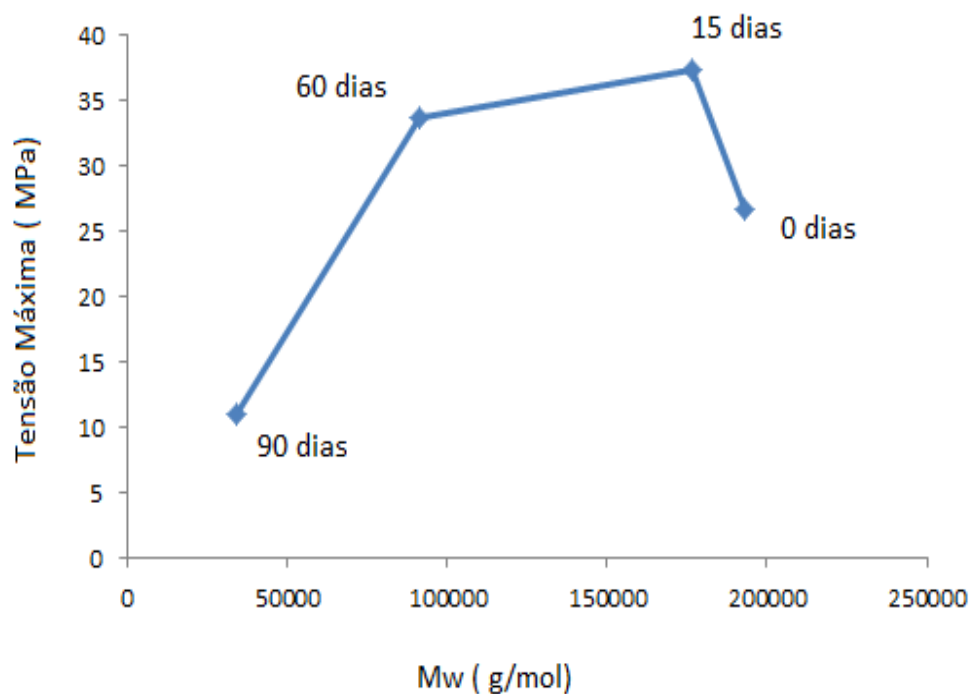
**Figura 18.** Valores de tensão máxima no alongamento para os pinos de PLDLA-TMC em função do tempo de degradação.

A Figura 18 mostra o comportamento dos dispositivos, durante o período de degradação em relação ao parâmetro tensão máxima no alongamento, onde fica constatado a perda de propriedade mecânica para 90 dias de estudo.

Como existe uma relação intrínseca entre massa molar e propriedade mecânica, é interessante analisar como a perda de massa do terpolímero influenciou no decaimento do valor de tensão máxima suportada pelos dispositivos. Segundo Shyamroy (2003), a massa

molar mínima necessária para um polímero biorreabsorvível ser aplicado como dispositivo na fixação de fratura é de 50000 g/mol.

A Figura 19 mostra o comportamento dos dispositivos, durante o período de degradação em relação ao parâmetro tensão máxima, onde fica constatado a perda de propriedade mecânica para 90 dias de estudo.



**Figura 19.** Valores de tensão máxima no alongamento em função da massa molar durante a degradação *in vitro* para pinos de PLDLA-TMC.

#### 4.1.6 Análise Dinâmico Mecânica (DMA)

A análise dinâmico mecânica relaciona o comportamento mecânico em função da temperatura com as relaxações moleculares associadas às mudanças conformacionais e às deformações microscópicas oriundas dos rearranjos moleculares, (CASSU e FELISBERTI, 2005). Nesse sentido, para o caso de materiais poliméricos, essa técnica fornece

informações importantes sobre os processos de relaxações características das fases amorfas ou semicristalinas. Por exemplo, no caso da fase amorfa, verifica-se nitidamente nos termogramas de DMA, picos referentes a temperatura de transição vítrea  $T_g$  ou  $T_\alpha$ , que é a temperatura na qual as cadeias passam do estado vítreo a viscoelástico. Como a  $T_g$  é dependente de fatores tais como, composição de misturas, flexibilidade das cadeias, massa molar do polímero, presença de plastificante, cristalinidade, etc., pode-se obter informações estruturais a respeito das amostras poliméricas as quais em muitos casos não são possíveis de serem detectadas através das análises de DSC.

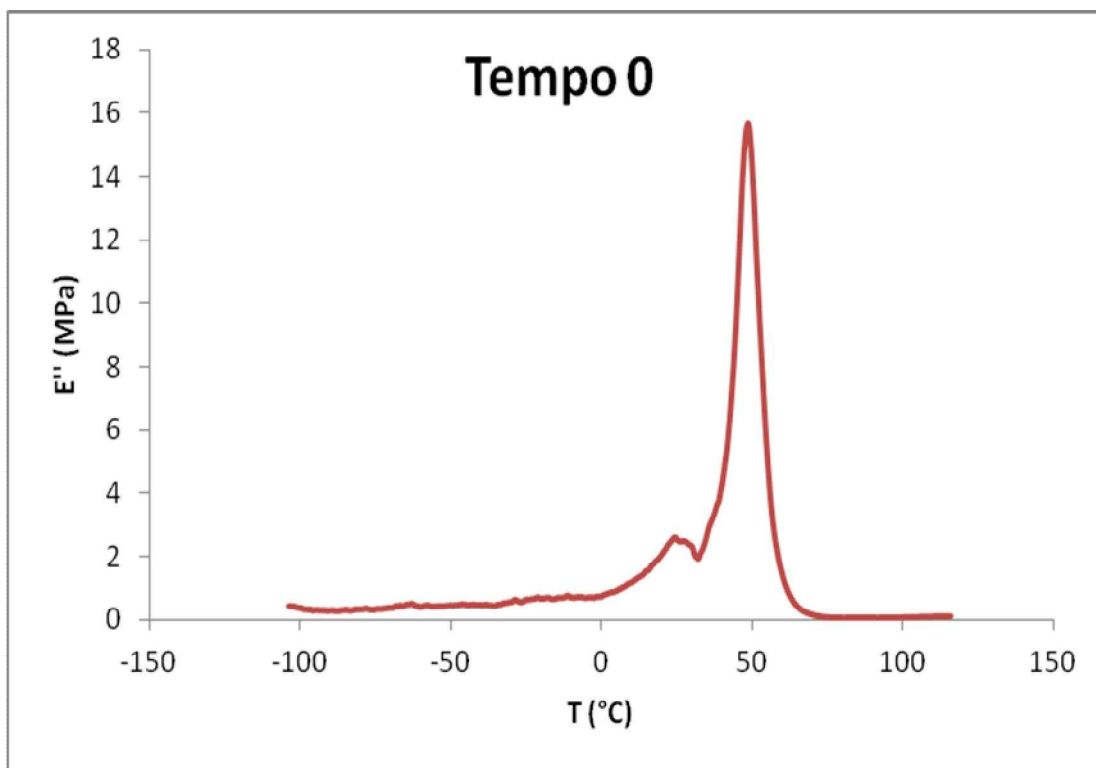
Nesse trabalho as análises de DMA, através do módulo de flexão de três pontos, foram realizadas em pinos de PLDLA-co-TMC na composição de 30 % de TMC e o processo de  $\alpha$ -relaxação associado com a temperatura de transição vítrea da fase amorfa das amostras foram determinadas através dos máximos das curvas do módulo de perda versus temperatura ( $E'' \times T$ ), conforme recomenda a norma ASTM D 4065-2001.

O máximo da curva de  $E'' \times T$ , Figuras 20, 21, 22 e 23, obtidos por DMA, refere-se as amostras de PLDLA-co-TMC submetidas ao processo de degradação *in vitro*. Verifica-se, para todos os tempos estudados, a presença de um pico referente a temperatura de transição vítrea  $T_g$ , na região de 50 °C, característica de um material amorfo, conforme se verificou através das análises de DSC.

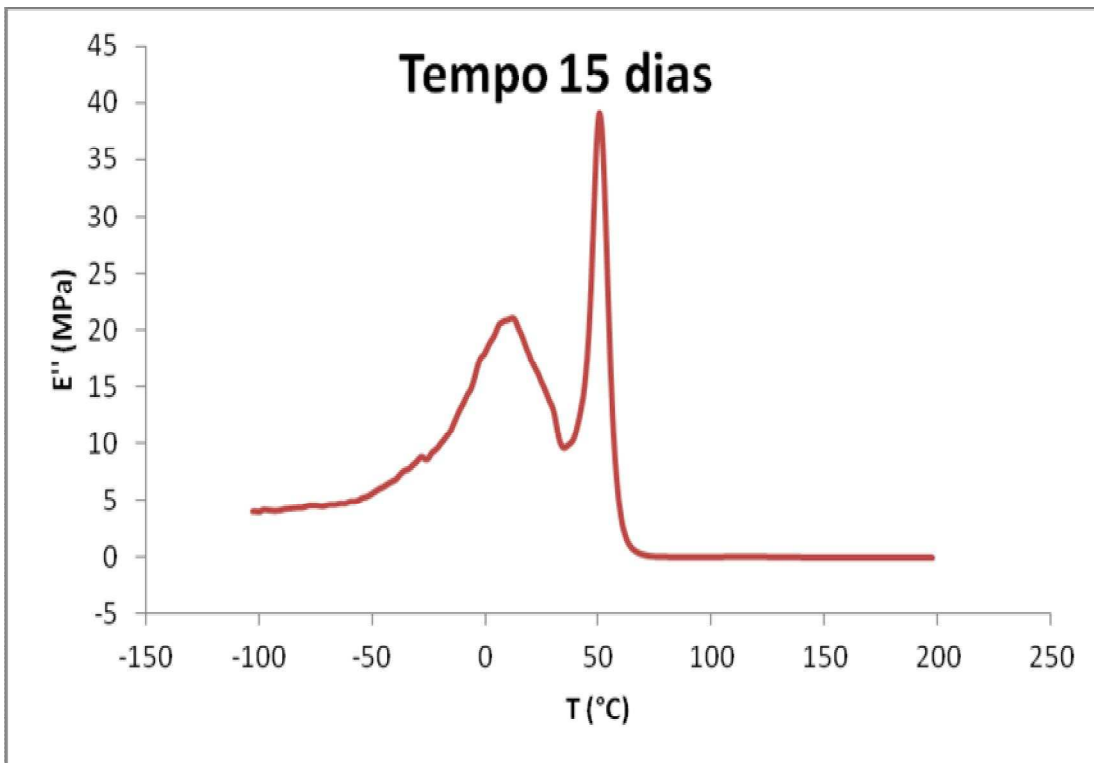
Além da  $T_g$ , verifica-se para todas amostras, a presença de um pico de menor intensidade, na região de 0°C. Esse tipo de relaxação são denominadas de relaxações secundárias referentes também à fase amorfa, ocorrem a temperaturas inferiores a  $T_g$  e também se apresentam em forma de picos nas curvas  $E'' \times T$ . São classificadas em ordem alfabética na sequência em que ocorrem como  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ , etc a partir da  $T_g$ . Nesse caso, essa relaxação pode ser atribuída à mobilidade do grupo metila ligado à cadeia principal do PLDLA, o qual se encontra em maior proporção na amostra. Esses resultados também foram verificados para amostras de PLDLA contendo poli(caprolactona triol) (DUARTE, 2009).

A partir do tempo de 90 dias, não foi possível realizar os ensaios devido ao processo de degradação, o qual não permitiu o manuseio das amostras. De qualquer forma, os resultados obtidos a partir das análises de DMA estão condizentes com as outras técnicas, as quais mostraram que o material mantém suas propriedades até 90 dias de degradação e a

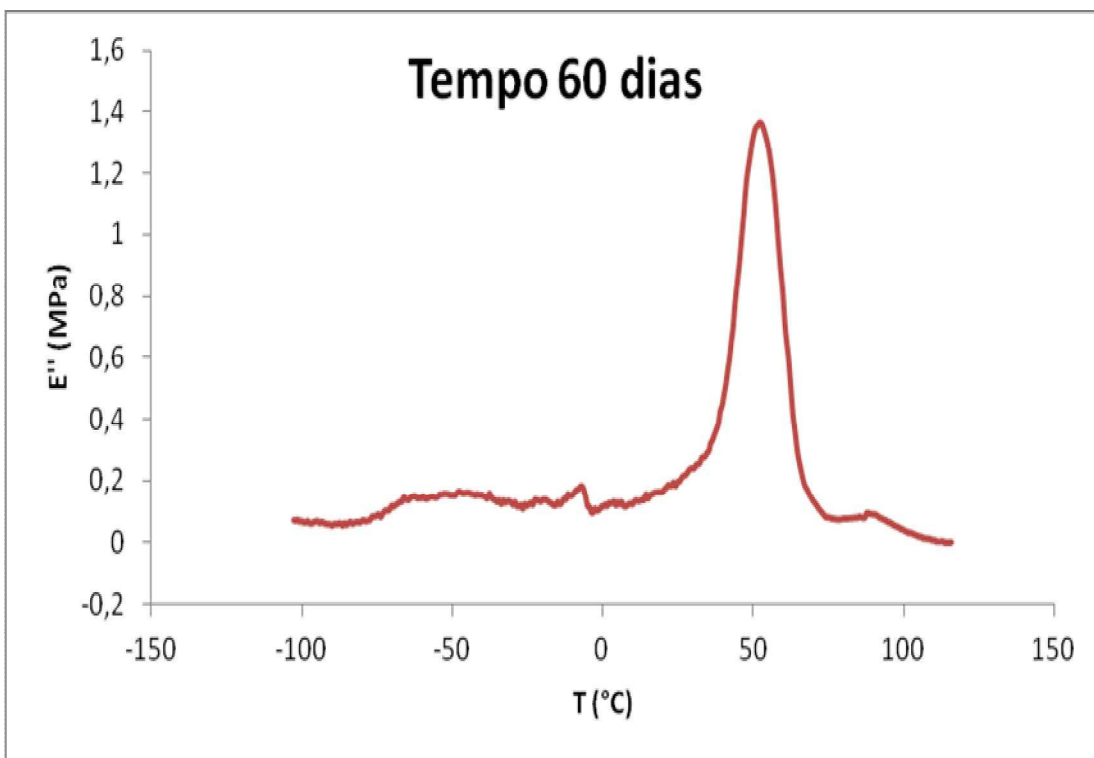
partir desse tempo, perde propriedades mecânicas a ponto de impedir o manuseio do mesmo e as propriedades térmicas mostram uma nítida variação nos valores de Tg.



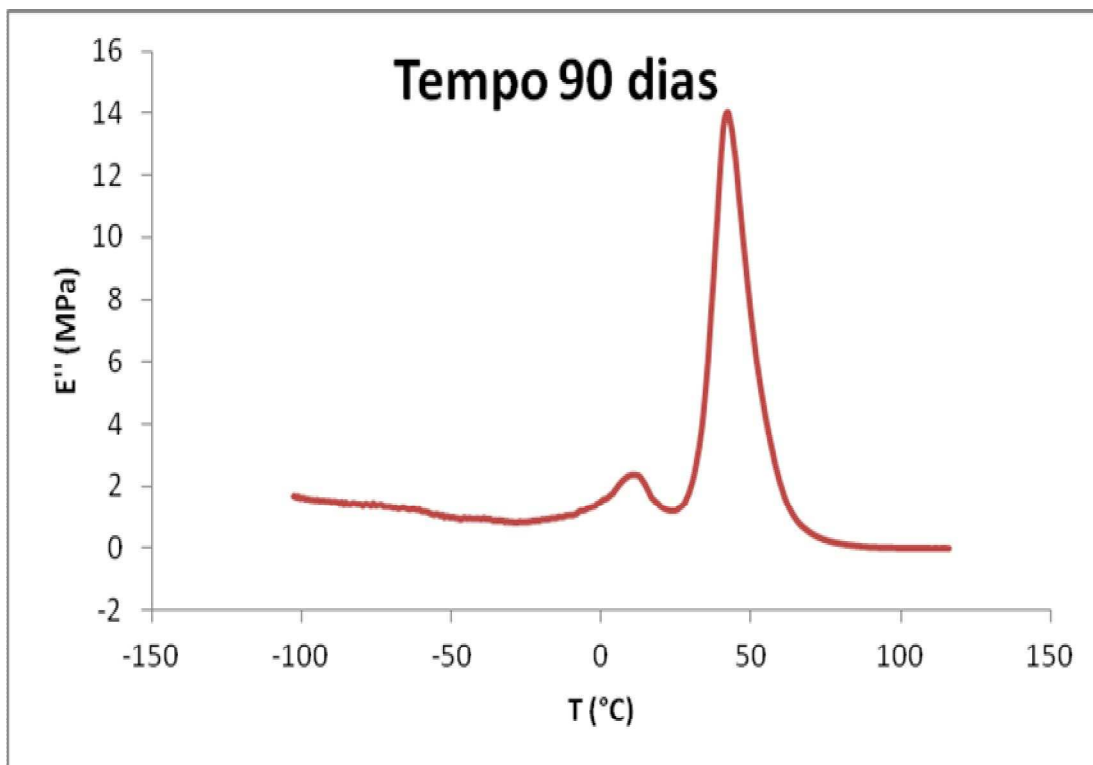
**Figura 20.** Gráfico da análise dinâmico-mecânica do material antes de ser submetido à degradação *in vitro*.



**Figura 21.** Gráfico da análise dinâmico-mecânica do material referente ao tempo de degradação de 15 dias.



**Figura 22.** Gráfico da análise dinâmico-mecânica do material referente ao tempo de degradação de 60 dias.

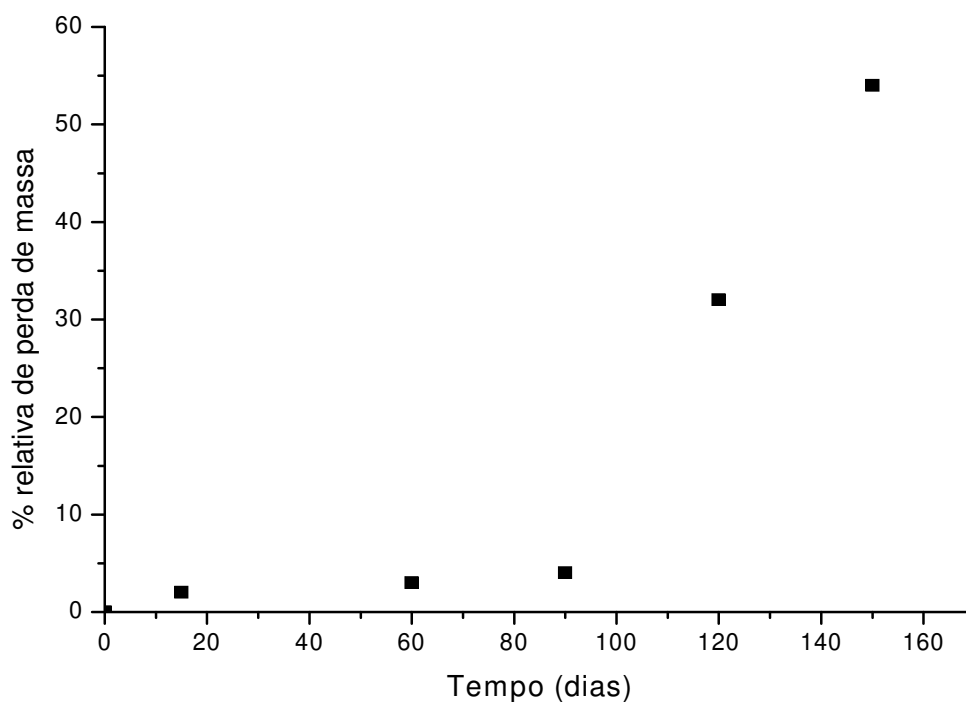


**Figura 23.** Gráfico da análise dinâmico-mecânica do material referente ao tempo de degradação de 90 dias.

#### *4.1.7 Perda de Massa*

A percentagem de massa perdida dos dispositivos de PLDLA-TMC durante o período estudado (150 dias) mostra que a perda expressiva ocorre entre 90 e 120 dias.

A Figura 24 possibilita a visualização do perfil de perda de massa em função da degradação.



**Figura 24.** Perda de massa durante a degradação *in vitro* dispositivos de PLDLA - TMC.

Durante o estágio inicial de degradação, não foi verificado perda de massa (Figura 24). A perda de propriedade mecânica foi resultado da diminuição de Mw e Mn que precede o processo de absorção de água pelo dispositivo. Como consequência do aumento de absorção de água pelo dispositivo, uma rápida perda de massa ocorre (PÊGO, 2002). No caso do PLDLA-TMC a perda de massa significativa ocorreu entre 90 e 120 dias, o que esta completamente de acordo com o relatado anteriormente, tendo em vista que a perda da propriedade mecânica ocorreu em 90 dias.

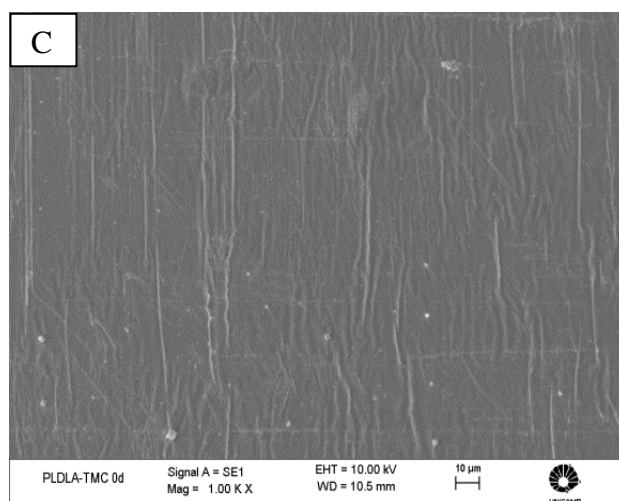
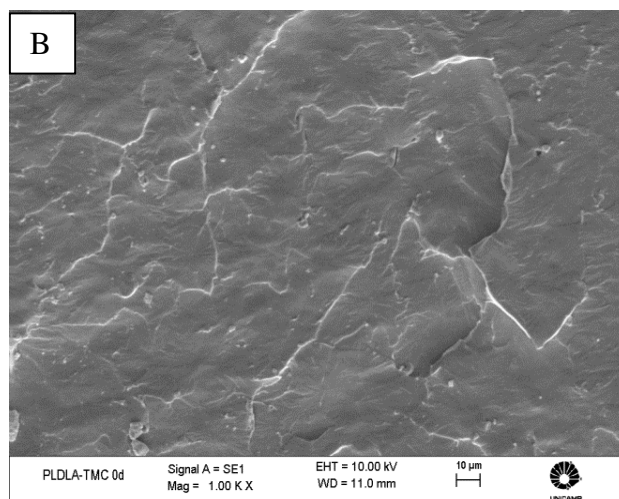
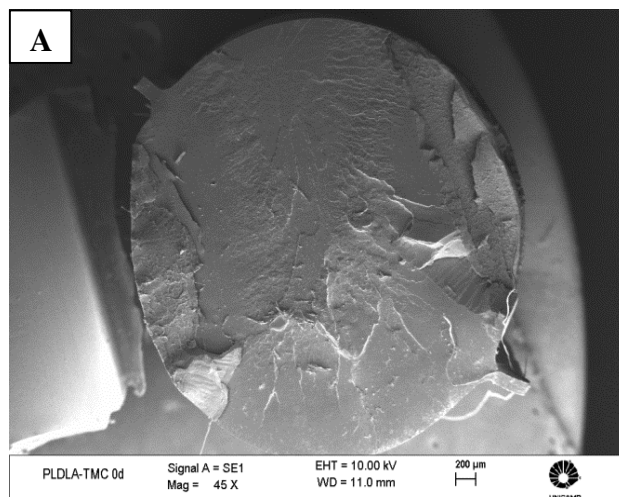
#### 4.1.8 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A Figura 25 apresenta as imagens obtidas a partir da MEV das amostras dos pinos de PLDLA-TMC antes de serem submetidos ao processo de degradação *in vitro*.

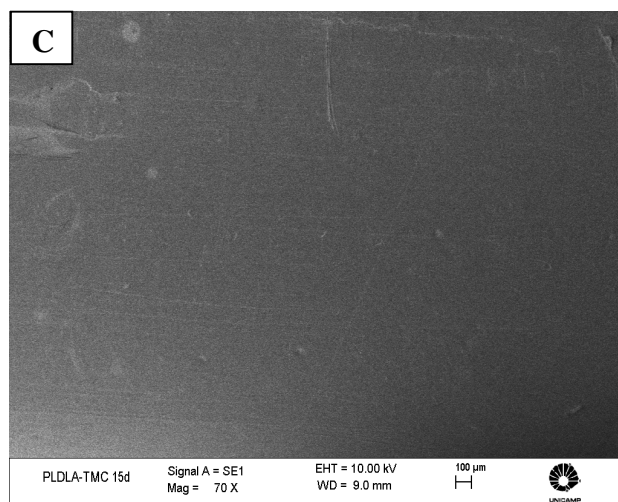
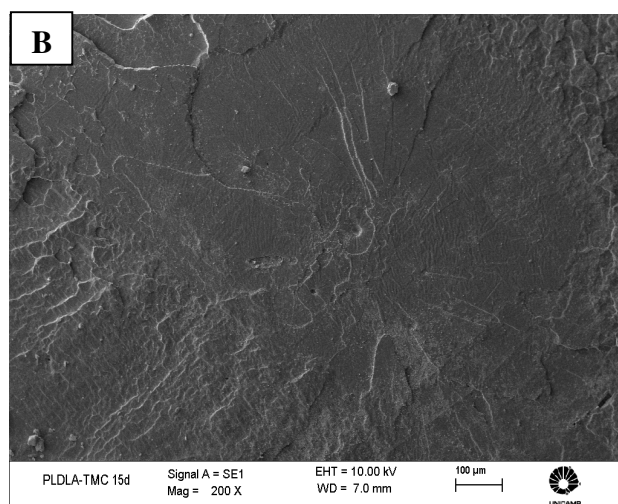
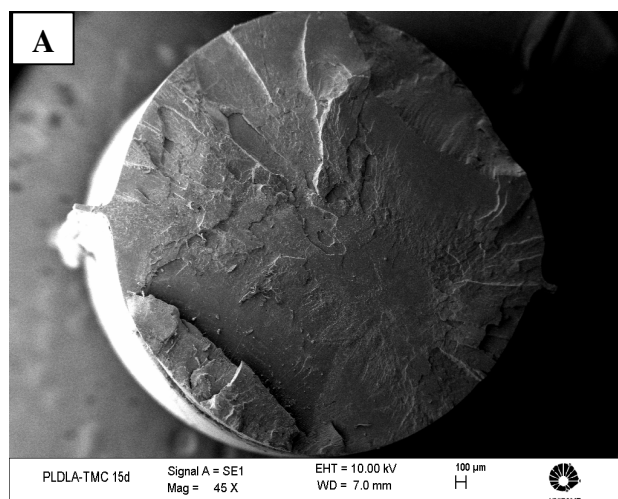
Verifica-se que tanto a superfície do dispositivo quanto a superfície da fratura dos pinos, apresentam uma morfologia completamente densa, característica de dispositivos obtidos pelo processo de fusão, e também indicados para aplicações voltadas para fixação de fraturas. Após 15 e 60 dias de degradação *in vitro*, não se verificou alterações morfológicas nas amostras, conforme pode ser verificado pelas figuras 25, 26 e 27. Após 90 dias de degradação, apesar das imagens, se mostrarem densas, verifica-se trincas em algumas regiões, Figura 28. Finalmente, as amostras submetidas a 120 dias de degradação não permitiram a análise através de MEV, pois se apresentaram totalmente degradadas, dificultando a preparação para as análises de MEV, como pode ser verificado pela foto mostrada pela figura 28 e conforme discutido na análise macroscópica 4.1.1.

As análises discutidas anteriormente para caracterizar o processo de degradação dos pinos de PLDLA/TMC, mostraram um decréscimo nos valores de módulo de Young e tensão máxima no alongamento entre 60 e 90 dias de degradação. Seguindo esse comportamento, os valores de Tg a partir do DSC e DMA, a porcentagem de perda de massa a partir das análises de TGA e a perda de massa em gramas decresceram após 90 dias. Por outro lado e devido a sensibilidade da técnica os dados de GPC apesar de mostrarem diminuição da massa molar desde o primeiro tempo de degradação, verifica-se uma queda expressiva da massa molar no intervalo de 15 para 60 dias.

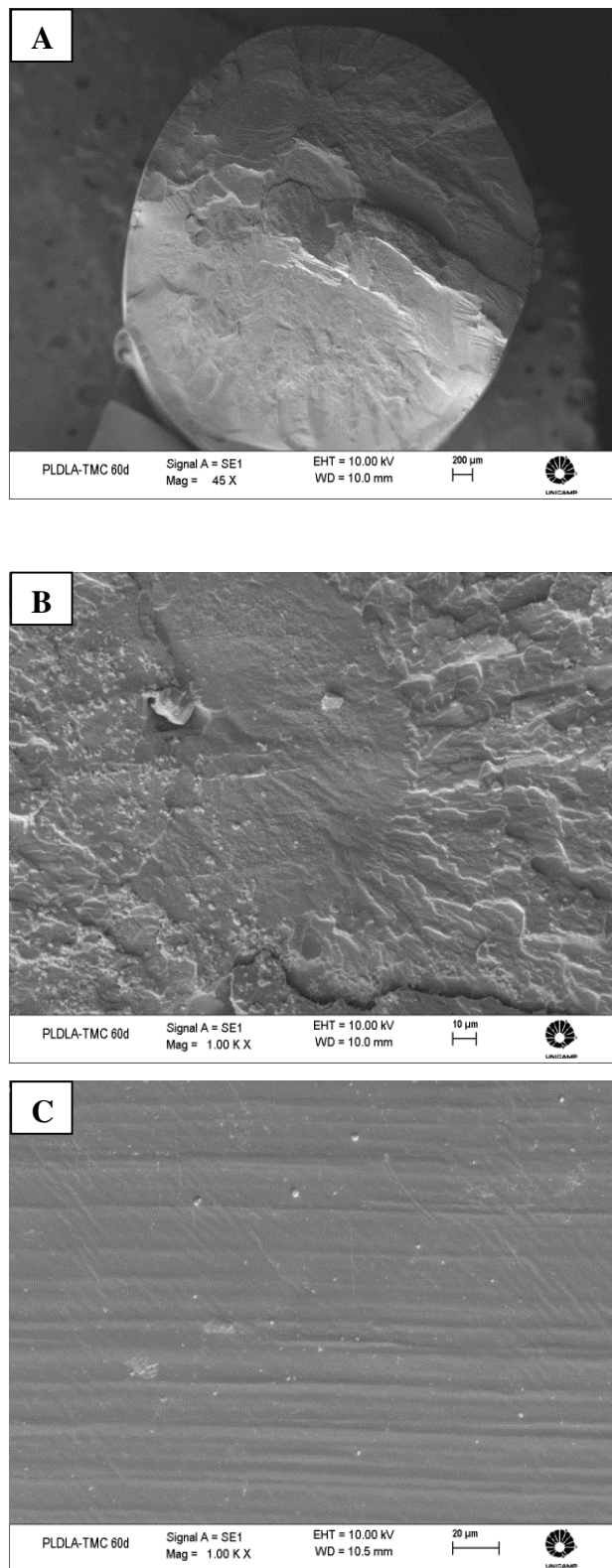
Esses resultados são indicativos de que apesar da variação na massa molar, os pinos mantêm as suas propriedades térmicas e mecânicas até 90 dias, o que pode explicar a discreta variação morfológica verificada através da MEV.



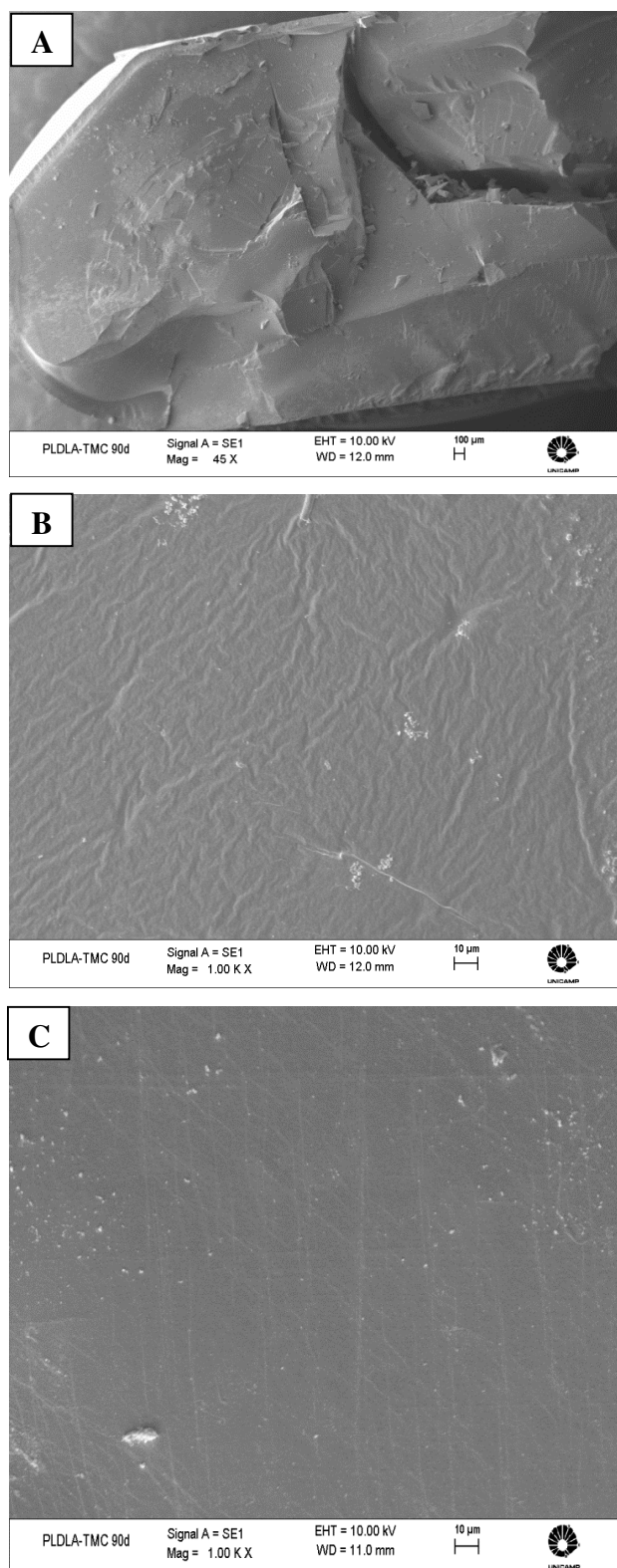
**Figura 25.** Micrografias obtidas por MEV dos pinos de PLDLA-co-TMC antes da degradação *in vitro* A) e B) superfície da fratura e C) superfície do dispositivo



**Figure 26.** Micrografias obtidas por MEV dos pinos de PLDLA-co-TM após 15 dias de degradação *in vitro* A) e B) superfície da fratura e C) superfície.

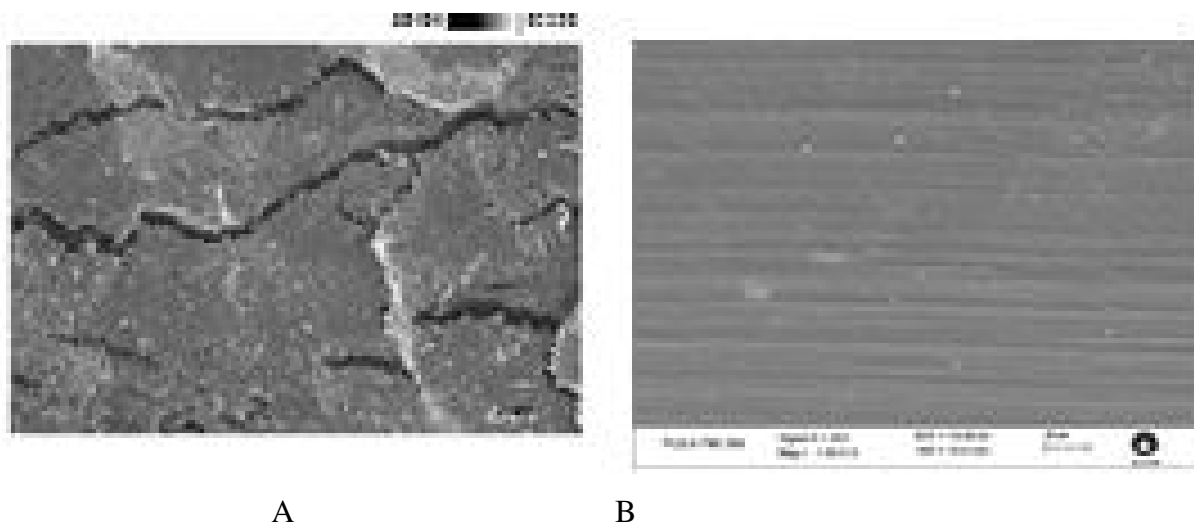


**Figura 27.** Micrografias obtidas por MEV do dispositivo à base de PLDLA-co-TMC após 60 dias de degradação: A) e B) superfície da fratura e C) superfície do dispositivo.



**Figura 28.** Micrografias obtidas por MEV dos pinos de PLDLA-co-TMC após 90 dias de degradação: A) e B) superfície da fratura e C) superfície.

Fazendo um paralelo com os dispositivos estudados por Motta (2007) onde foi acompanhada a degradação de pinos de PLDLA, por meio de MEV, pode ser notado pela Figura 29, que para um período de tempo próximo de degradação as amostras de PLDLA se degradaram de forma mais intensa. Num estudo realizado por Albertsoon (1995) foi constatado que o poli (L,D lactide) degrada mais rápido do que o poli(TMC), sendo sugerido pelo autor que as ligações ésteres são mais susceptíveis a hidrólise do que as ligações carbonatos, as quais estão presentes no TMC. Dessa forma, no caso do terpolímero PLDLA-TMC é de se esperar que o tempo inicial de degradação seja maior do que o verificado simplesmente pelo PLDLA, o que esta de acordo com a menor taxa de degradação constatada nas micrografias do PLDLA-TMC em relação ao PLDLA.



**Figura 29.** (A) Micrografia da superfície da fratura de pinos de PLDLA após 32 dias de degradação *in vitro* e (B) Micrografia da superfície da fratura de pinos de PLDLA-co-TMC (60 dias), (DUARTE, 2009).

## 4.2 Estudo In Vivo

Neste estudo avaliou-se a capacidade de pinos de PLDLA-co-TMC, de serem utilizados em casos de fraturas ósseas, na forma de dispositivos cilíndricos, com a finalidade de não necessitar uma nova cirurgia para a sua retirada. Devido as suas características de degradação e biorreabsorção, PLDLA tem sido largamente estudado na engenharia tecidual como um material de boa biocompatibilidade devido à produção de metabólitos atóxicos (MOTTA, 2007). O TMC, por sua vez, exibe bom desempenho mecânico, incluindo alta flexibilidade, alta resistência à tração, boa biocompatibilidade e sua degradação *in vivo* ocorre por erosão superficial sem liberação de espécies ácidas. Vários estudos mostram o seu potencial como biomaterial. (ZHANG *et al.*, 2006; YANG *et al.*, 2010). A associação desses dois polímeros teve como objetivo desenvolver um novo material com propriedades mecânicas adequadas para aplicação no tecido ósseo.

Todos os animais suportaram bem a anestesia e o procedimento cirúrgico sem registro de ocorrências de óbito no período operatório e pós-operatório, apresentando comportamento semelhante aos ratos não operados, mostrando agilidade e movimentação normal. Nenhum rato apresentou sinais de complicações imediatas ou tardias, como infecções, paralisias, convulsões e complicações respiratórias.

### 4.2.1 Análise Histológica do Tratamento de 15 dias

A morfologia da diáfise da tíbia é caracterizada por um canal medular rico em células mesenquimais, que favorece íntimo contato do material implantado com essas células estimulando a migração e proliferação celular e, conseqüentemente, o restabelecimento da continuidade perdida durante o processo cirúrgico (NOJIMA, 2004).

A migração celular foi constatada em maior grau na interface com a cortical. Como observado por Davies, 1998; e Junqueira e Carneiro, 1995, o trauma gerado pelas brocas

nessa região criou áreas de necrose e posteriormente a ativação de osteoclastos com a função de reabsorção do tecido injuriado. Segundo Lima (2004), somente após a remoção do tecido necrótico e formação de tecido de granulação, ocorre a infiltração de células mesenquimais provenientes da cortical interna.

Inúmeros estudos ilustram a ocorrência de efeitos colaterais oriundos da biodegradação de biomateriais, entre eles a formação de granulomas, reações alérgicas e de corpo estranho, assim como a presença de cápsula fibrosa envolvendo o material implantado (HASEGAWA, 2002; BERGSMA, 1993). Nesse experimento os cortes histológicos revelaram ausência de células inflamatórias e reações de corpo estranho na interface osso-implante após o período de 15 dias.

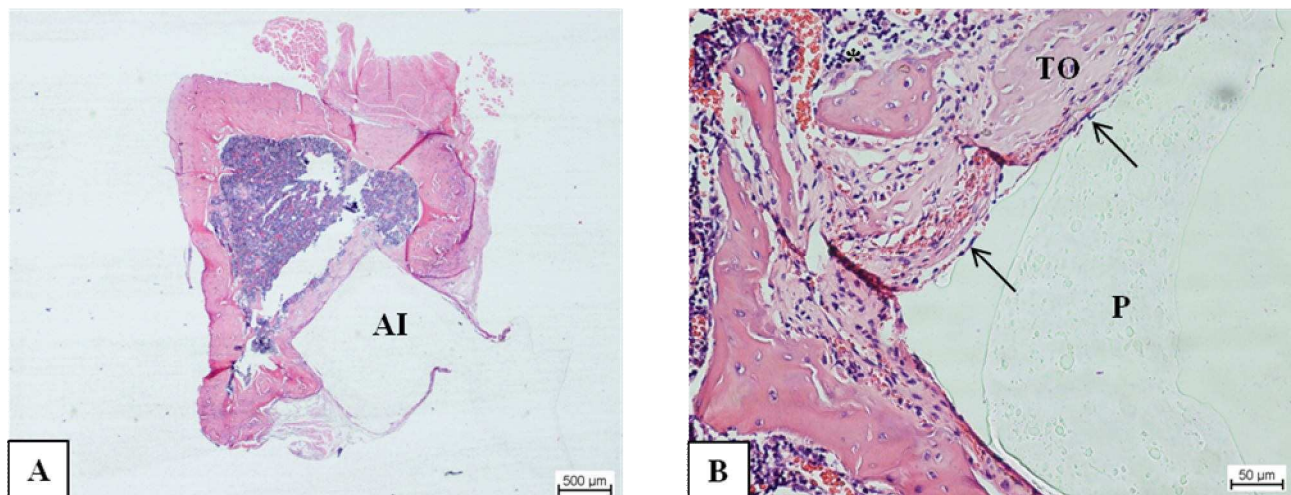
Os resultados obtidos na etapa inicial mostraram reação satisfatória do tecido em relação ao material implantado. Não houve processo inflamatório agudo exacerbado nos implantes de terpolímero.

Após 15 dias de implante não se observou processo inflamatório agudo em nenhum dos animais dos dois grupos. Na cortical óssea lesada pelo processo cirúrgico, pôde-se observar desaparecimento da hemorragia pós-trauma que caracteriza a formação do coágulo no qual se inicia o processo inflamatório necessário para a reparação do trauma. A presença de hematoma faz parte do processo de regeneração óssea (RIEGGER, 1993). O hematoma é invadido por uma frouxa malha de capilares e fibroblastos. As células que se proliferam e se diferenciam são nutridas pela extremidade final do perióstio, endóstio e medula óssea. Separação pelo processo cirúrgico do perióstio estimula a proliferação de células no interior do mesmo e uma nova formação óssea começa em 48 horas.

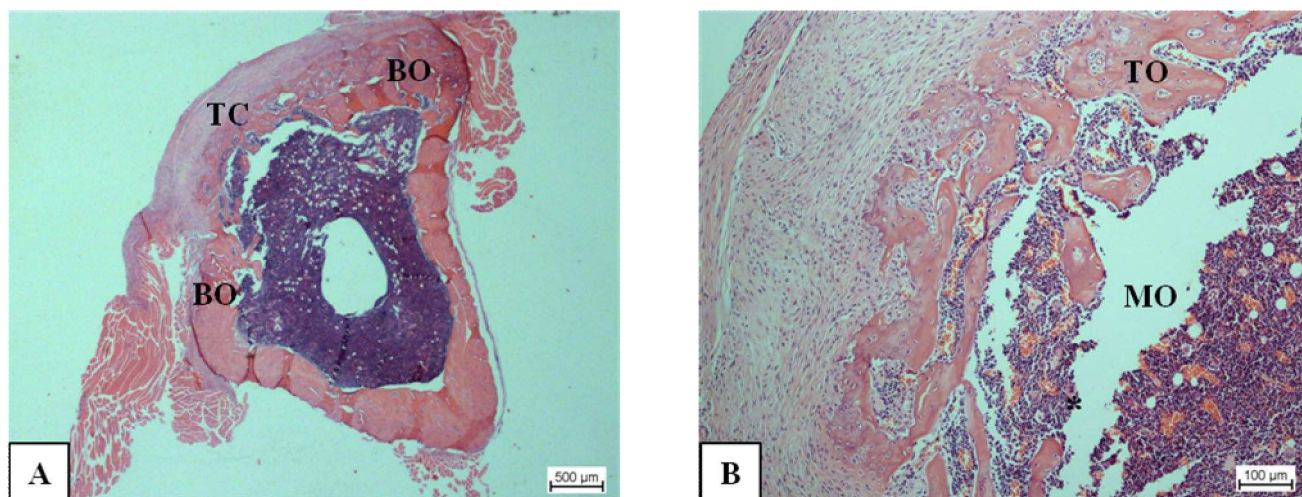
Nos dois tratamentos observou-se o fechamento linear dos defeitos experimentais com trabéculas ósseas imaturas, não lamelares e de distribuição irregular (Figuras 30 e 31). A formação óssea teve origem a partir do perióstio e do endóstio. As microfotografias do grupo controle e do grupo teste apresentaram vasos sanguíneos jovens e células mesenquimais circundantes. Osteoblastos foram vistos ao redor das trabéculas neoformadas indicando que o fenômeno de neoformação óssea está em atividade (Figura 30).

A neoformação óssea ocorre de forma semelhante quer se trate de fraturas, de implantes ou dos fenômenos de remodelação. Em todos os casos as células responsáveis

pela formação do novo tecido ósseo provêm de elementos progenitores derivados da medula óssea. Os ossos maduros sejam os macroscopicamente compactos (cortical) ou esponjosos terão as mesmas características microscópicas. O primeiro osso a ser formado é o chamado osso primário ou imaturo que, com a evolução do processo transformar-se-á em osso maduro, secundário ou lamelar (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995).



**Figura 30.** Fotomicrografia do grupo com implante do dispositivo de PLDLA-co-TMC com 15 dias pós-cirúrgico. A) É possível observar a área do implante (AI) HE, 20x; B) Houve neoformação óssea orientada (TO) interligando as bordas do implante. Notar células osteoblásticas (seta), células mesenquimais (\*) e presença de polímero (P), HE, 200x.



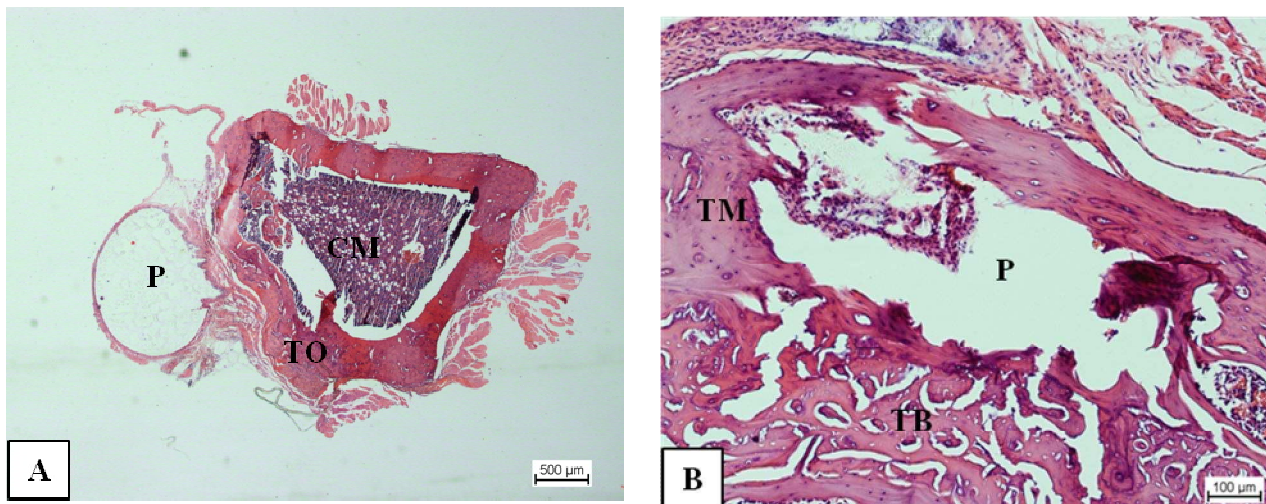
**Figura 31.** Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) com 15 dias pós-cirúrgico. A) É possível observar uma camada de tecido conjuntivo (TC) interligando as bordas do defeito, HE, 20x; B) Houve formação de trabéculas ósseas (TO) em contato com a medula óssea (MO) HE, 100x.

#### 4.2.2 Análise Histológica do Tratamento de 60 dias

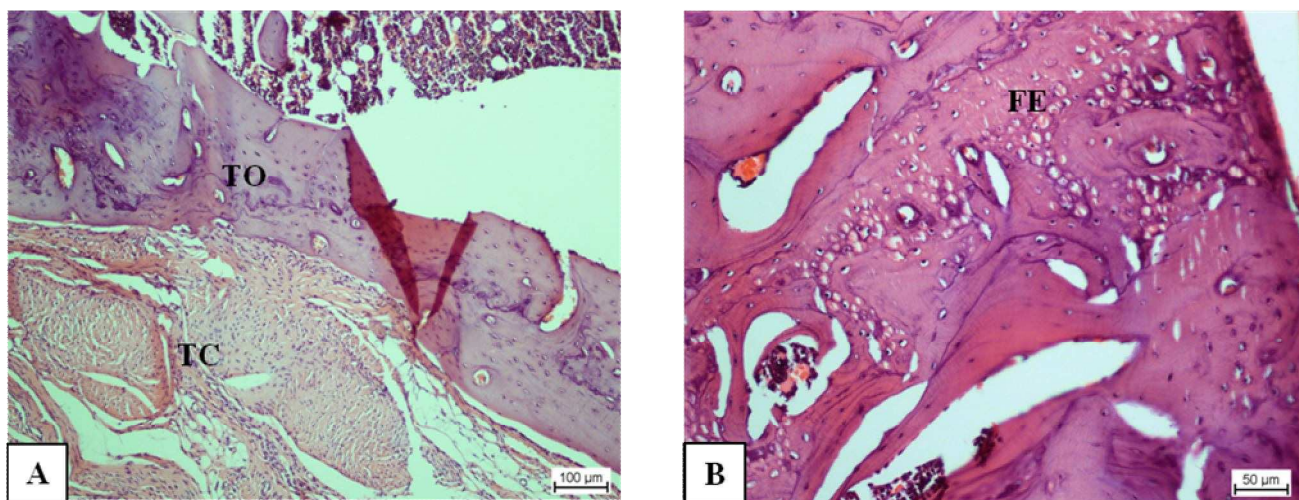
Nos cortes histológicos dos animais sacrificados após 60 dias, observou-se fechamento linear dos defeitos, com tecido ósseo mais compacto e maduro em relação ao tratamento de 15 dias pós-cirúrgico (Figuras 32 e 33). Além de apresentar pouco tecido conjuntivo invadindo a região onde foi realizado o defeito experimental, o grupo implante apresentou uma fina camada de tecido conjuntivo envolvendo o dispositivo ortopédico. Como a implantação cirúrgica sempre causa um trauma, mesmo na ausência do implante haverá a resposta tecidual à agressão, isto começa com a inflamação e prossegue através dos passos da cura da ferida. Adicionado a este fenômeno existe a "reação de corpo estranho" devido à presença do material reconhecido como não pertencente ao hospedeiro (OREFICE *et al*, 2006).

Na cura de feridas ósseas dois tipos de ossificação podem ocorrer ao mesmo tempo numa determinada etapa da recuperação (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995). Os dois mecanismos de formação óssea são: 1) ossificação intramembranosa, na qual ocorre neoformação óssea no interior de uma membrana conjuntiva e 2) ossificação endocondral (Figura 33B), comum na regeneração de ossos longos, que se dá a partir de tecido cartilaginoso.

No processo de regeneração, a liberação de fatores de crescimento estimula a angiogênese e a formação de capilares favorece a manutenção do pH local pela drenagem dos metabólitos a partir do 21 dia pós-operatório. (DAVIES, 2000). Essa infra-estrutura de capilares atua ainda como via de drenagem para os produtos de degradação provenientes do metabolismo anaeróbico na área em regeneração, assim como favorece a migração de células mesenquimais a partir da medula e cortical interna que regulam diretamente a regeneração óssea (DAVIES, 1998; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1995). No presente trabalho, o crescimento ósseo intramedular a partir de células mesenquimais caracterizou a ossificação intramembranosa, mais freqüente no reparo das lesões.



**Figura 32.** Fotomicrografia do grupo com implante do dispositivo de PLDLA-co-TMC com 60 dias pós-cirúrgico. A) Houve o fechamento linear da incisão com tecido ósseo imaturo (TO). Observa-se o canal medular (CM) e presença de uma porção do polímero não degradado (P), HE, 20x; B) Há tecido ósseo maduro (TM) e formação trabéculas ósseas (TB) ao redor da região onde se encontrava partes do polímero (P), HE, 200x.



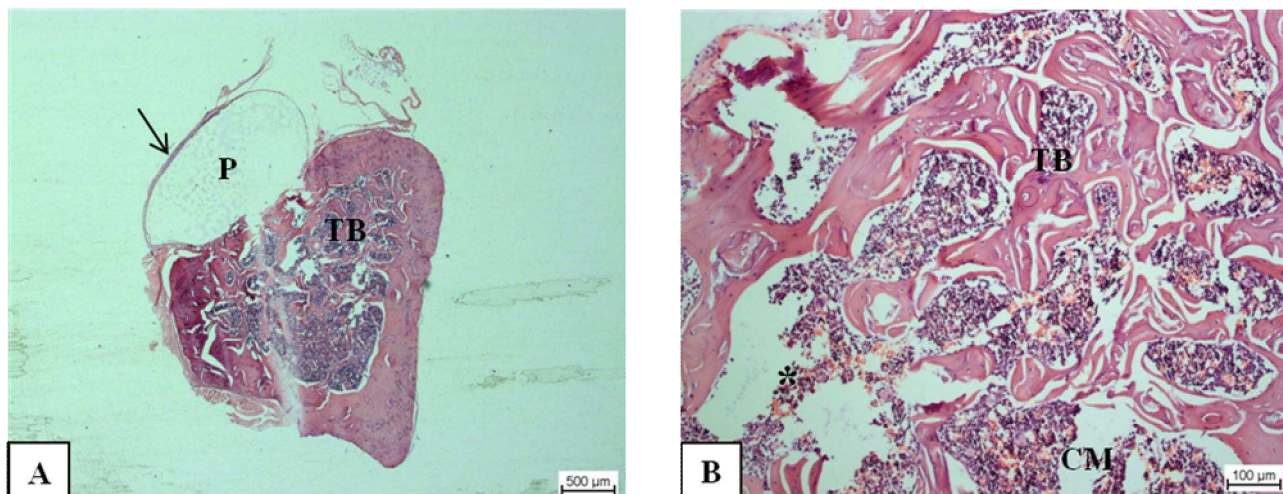
**Figura 33.** Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) com 60 dias pós-cirúrgico. A) Fina camada de tecido ósseo interligado as bordas do defeito ósseo (TO) e presença de tecido conjuntivo frouxo (TC) na região do defeito ósseo, HE, 100x; B) Observa-se formação óssea do tipo endocondral (FE), HE, 200x.

#### 4.2.3 Análise Histológica do Tratamento de 90 dias

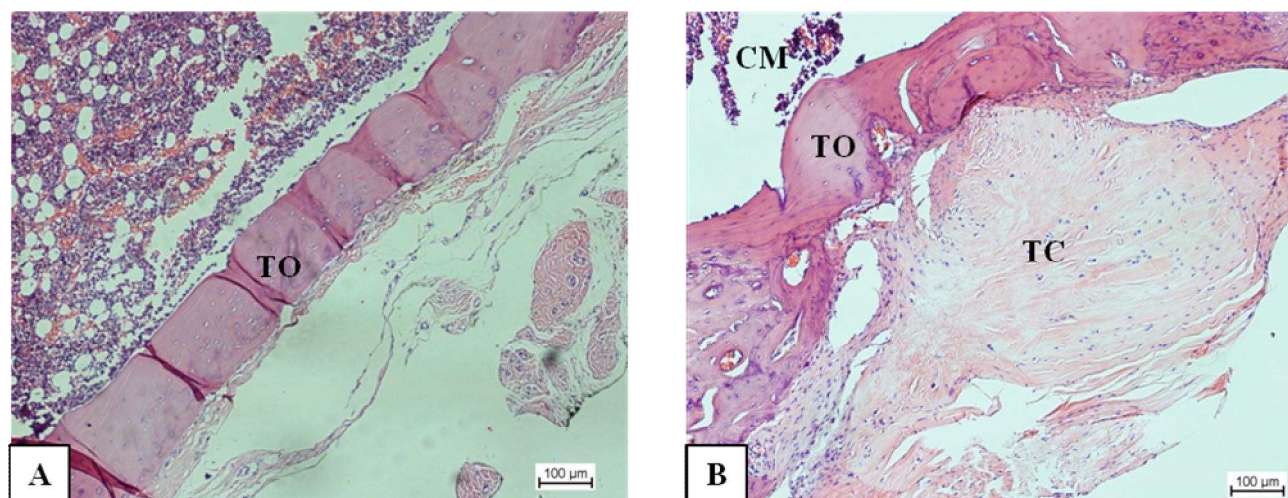
Nos cortes histológicos do grupo controle após 90 dias, células precursoras de células ósseas são evidenciadas nas Figuras 34B e 35B.

A figura 34A apresentou uma fina camada de tecido ósseo primário envolvendo o dispositivo ortopédico, indicando que o material não degradou por completo no período de 90 dias. Esta degradação não pode ser muito acelerada e nem muito tardia. Os pinos de PLDLA-co-TMC devem agir como um suporte físico para o crescimento celular, permitindo que o novo tecido adquira o formato desejado, enquanto o polímero vai sendo degradado. O implante ideal em ortopedia deve ter propriedades de biocompatibilidade e bioabsorção adequadas (KFURI *et al.*, 2001).

Polímeros que degradam rapidamente não são de grande interesse em áreas ortopédicas, quando o modelo ósseo a ser implantado são ossos longos. No processo de degradação *in vivo*, esses polímeros apresentam fendas por onde as células ósseas vão invadir e formar um tecido ósseo neoformado. Porém ao apresentarem fendas, esses materiais também apresentam perda nas suas propriedades mecânicas o que não é de interesse em implantes em ossos longos, pois o material tem que apresentar biocompatibilidade e resistência às tensões mecânicas provocadas pelo sistema ósseo através da locomoção e suporte físico dos animais implantados (PINTO, 2007).



**Figura 34.** Fotomicrografia do grupo com implante do dispositivo de PLDLA-co-TMC com 90 dias pós-cirúrgico. A) Nota-se uma camada de tecido conjuntivo (seta) ao redor da região onde se encontrava o polímero (P). Trabéculas ósseas (TB) são observadas interligando as bordas do defeito. HE, 20x; B) Formação de trabéculas ósseas (TB) invadindo a região medular (CM). Dentre as trabéculas ósseas há abundante tecido hematopoiético, caracterizando a medula óssea HE, 100x.



**Figura 35.** Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) com 90 dias pós-cirúrgico. A) Houve o fechamento linear do defeito com uma fina camada de tecido ósseo (TO), HE, 100x; B) Tecido ósseo (TO) fechando o defeito de forma linear e presença exacerbada de tecido conjuntivo (TC). Canal medular (CM), HE, 100x.

#### 4.2.4 Análise Histológica do Tratamento de 180 dias

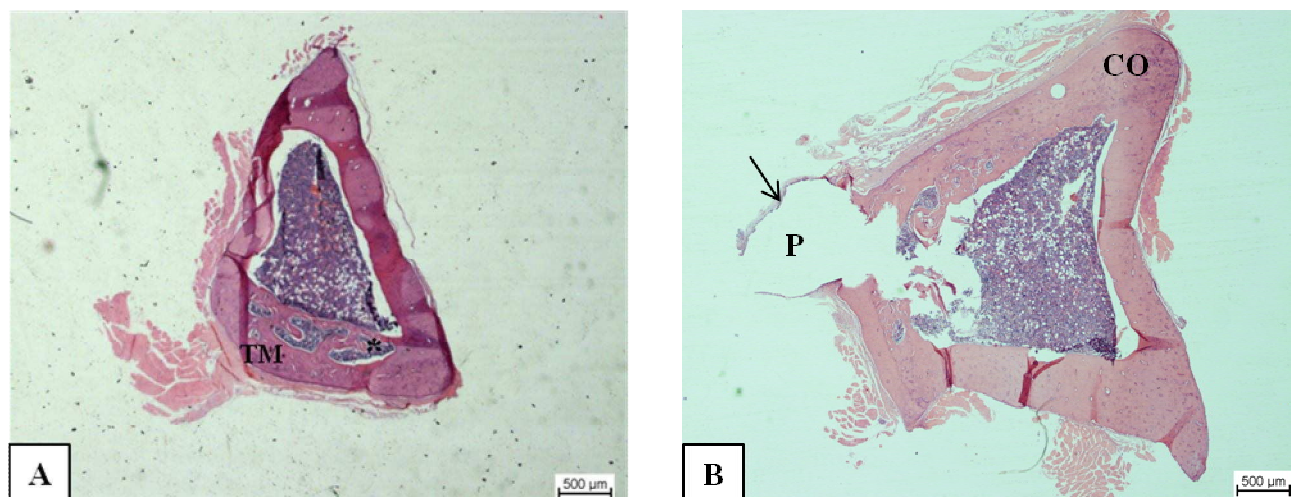
Nos cortes histológicos dos animais sacrificados após 180 dias, foi observado fechamento dos defeitos experimentais, com a formação de ponte de tecido ósseo cortical mais espesso e organizado no grupo implante. As bordas dos defeitos apresentaram-se nítidas, entretanto, o tecido ósseo neoformado do grupo implante apresentou maior semelhança ao tecido ósseo adjacente, o que sugere uma maior maturidade e organização.

A camada de osso neoformado é contínua, de espessura uniforme e os osteócitos apresentando forma arredondada. A cápsula de tecido conjuntivo ao redor do polímero, observada no grupo implante de 180 dias é uma evidência de que o material não degradou por completo. No entanto a parte do material que não se degradou foi “expulso” do sítio do implante. Não influenciando mais na regeneração do tecido lesado.

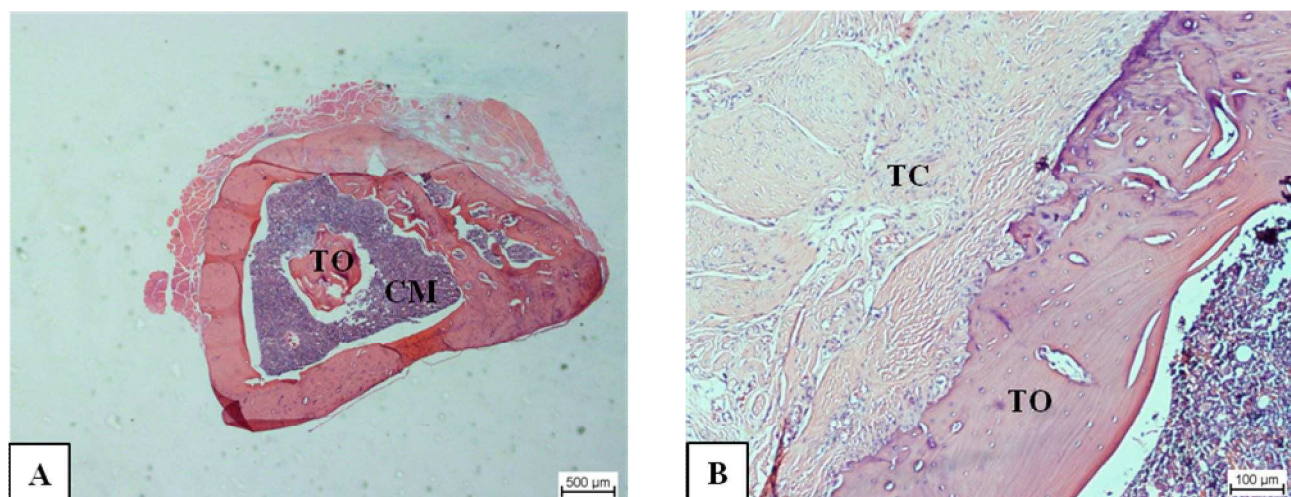
É possível verificar a presença de calo ósseo na figura 36B. O calo, substância formada pela proliferação de células no local do trauma, é composto pela combinação de osso e cartilagem. Com o passar do tempo, este calo deverá ser reabsorvido pelos osteoclastos e a fratura finaliza sua consolidação (RIEGER, 1993). Essa remodelação óssea deve ser contínua durante toda a vida e é realizada através da resposta a estímulos que ocorrem no organismo normalmente. Essa remodelagem é resultante da ativação de células osteogênicas desencadeada pela lesão no osso estimulada durante a falha óssea para colocação do implante (OHASHI *et al.*, 2000 e GUARNIERO *et al.*, 2003). Essa resposta fisiológica varia em função do tempo de implante, da forma do polímero, do material implantado e por fim do local a que se destina o implante, levando em consideração a presença de um fluxo de fluidos (MOTTA e DUEK 2009).

BURG (2000) cita que a degradação dos polímeros biorreabsorvíveis começa desde o contato destes com o tecido *in vivo*. Ao se utilizar fixação rígida com implantes metálicos, o osso torna-se menos resistente após a consolidação. A fim de se evitar atrofia óssea, têm sido desenvolvidos materiais e implantes de fixação semi-rígidos como os que foram utilizados nesse trabalho. Sendo assim, o implante ideal perderia sua resistência gradualmente, transferindo assim o estresse mecânico que lhe é inerente, para o foco

fraturário. Quando o implante não se faz mais necessário, pode então ser absorvido pelo tecido.



**Figura 36.** Fotomicrografia do grupo com implante do dispositivo de PLDLA-co-TMC com 180 dias pós-cirúrgico. A) Fechamento da área implantada com tecido ósseo maduro (TM). Notam-se células hematopoiéticas de permeio às trabéculas ósseas (\*). HE, 20x; B) É possível observar uma fina camada de tecido conjuntivo (seta) ao redor da região onde se encontrava o polímero (P). Houve formação de calo ósseo (CO), HE, 20x.



**Figura 37.** Fotomicrografia do grupo controle (defeito vazio) com 180 dias pós-cirúrgico. A) Fechamento linear da região do implante com tecido ósseo (TO) invadindo o canal medular (CM), HE, 100x; B) Observa-se uma fina camada de tecido ósseo (TO) interligando as bordas do defeito e presença de tecido conjuntivo (TC) exacerbado, HE, 200x.

Observou-se que nos períodos de 15, 60, 90 e 180 dias, a grande maioria dos animais evidenciou fechamento das lesões ósseas. No primeiro tempo de 15 dias, evidenciou-se, no grupo controle, mais fibrose, e ambos os grupos mostravam a presença hemorragia e de células mesenquimais. Nos tempos intermediários, de 60 e 90 dias, que receberam o implante do terpolímero, houve presença escassa de fibrose além do aparecimento de tecido ósseo lamelar (mais organizado) em relação ao grupo controle. Por fim, no tempo de 180 dias, foi possível notar a menor quantidade de fibrose disposta no osso que recebeu o implante de PLDLA-co-TMC, porém não houve degradação total do polímero neste tempo. Logo, o implante, além de acelerar a neoformação óssea durante em tempo maior, mantém-se durante períodos prolongados o que pode ser um fator desejável em certos padrões de lesões ósseas nas quais é necessária uma resistência maior às tensões do meio externo como nas fraturas por estresse contínuo. Além disso, quando comparamos o aspecto morfológico entre os grupos controle e implante parece que o implante estimulou a neoformação óssea de maneira mais adequada com osso maduro e escassa fibrose, pois esta predominou em todos os tempos no grupo controle.

## 5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos a partir do estudo da degradação *in vitro* de pinos PLDLA-co-TMC permitiram concluir que apesar da variação da massa molar nos primeiros dias, o terpolímero é capaz de manter suas propriedades térmicas, mecânicas e morfológicas até 90 dias em solução tampão fosfato e que, a partir desse período, ocorre uma variação brusca principalmente nos valores de temperatura de transição vítrea, módulo de Young, tensão máxima no alongamento e perda de massa. Por outro lado, verificou-se a nítida variação da massa molar já no início do processo de degradação. Isso são indicativos de que, nas condições estudadas, o processo de degradação ocorre tão logo as amostras entram em contato com a solução aquosa, provocando quebra nas ligações ésteres e diminuição na massa molar. Por outro lado, como a perda de massa é mais lenta, faz com que os outros parâmetros sofram pequenas variações.

Esses resultados do estudo *in vitro* vão ao encontro do estudo *in vivo*, no qual se pôde verificar que os pinos, principalmente nos tempos de 60 e 90 dias atuaram de forma a colaborar com o processo de neoformação óssea, servindo de suporte para esta. O grupo implante, no geral, apresentou uma formação óssea mais madura e organizada, com menor presença de fibrose.

O termopolímero manteve-se presente e estimulando a formação óssea, logo o material mostrou degradação lenta o que pode ser benéfico em certos tipos de lesões ósseas. Tais características merecerão, em trabalhos futuros, melhor ser investigadas.

## 6 SUGESTÕES PARA PRÓXIMOS TRABALHOS

Estudo histomorfométrico para avaliar quantitativamente a neoformação óssea.

Realizar estudos *in vivo* e *in vitro* com uma porcentagem diferente de trimetileno carbonato.

Comparar o desempenho *in vivo* de dispositivos à base do terpolímero PLDLA-co-TMC com dispositivos metálicos para fixação de pequenas fraturas ósseas.

## Referências Bibliográficas

ALBERTSSON, A.; EKLUND, M., Influence of molecular structure on the degradation mechanism of degradable polymers: *In vitro* degradation of poly(trimethylene carbonate), poly(trimethylene carbonate-co-caprolactone), and poly(adipic anhydride). **Journal of Applied Polymer Science**, v. 57, p. 87-103, 1995.

AMANO, Y; SEKIGUCHI ,K; SHIBUKAWA,Y; YAMADA, S. Evaluation of a Poly -L-lactic acid membrane and membrane fixing pin for guided tissue regeneration. **Journal of Oral Surgery**, v. 97, p. 155-63, 2004.

BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK, E.A.R. Polímeros biorreabsorvíveis na engenharia tecidual. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.15, n. 1, p. 13-21, 2005.

BERGSMA, J.E.; BRUIJN, W.C.; ROZEMA, F.R.; BOS, R.R & BOERING, G. Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. **Biomaterials**, v.16, n. 1, p. 25, 1995.

BESSHO, K.; IIZUKA, T.; MURAKAMI, K. A bioabsorbable poly-L-lactide miniplat and screw system for osteosynthesis in oral and maxillofacial surgery. **Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v.55, n. 9, p. 941, 1997.

BLACK, J. Does corrosion matter? **Journal of Bone and Joint Surgery**, v. 70-B, n.4, p. 517-520, 1988.

BLÜMM, E.; OWEN, A.J. Miscibility, crystallization and melting of poly(3-hydroxybutyrate)/poly(L-lactide) blends. **Polymer**, v. 36, n. 21, p. 4077-4081, 1995.

BOSTMAN, O.; HIRVENSALO, E.; MAKINEN, J.; ROKKANEN, P. Foreign body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. **Journal of Bone Joint Surgery of Brazil**, v. 72-B, p. 592-596, 1990.

BURG, K.L.; PORTER, S.; KELLAN, J.F. Biomaterial devolopents for bone tissue engeneering. **Biomaterials**, v. 21, n. 23, p. 2347-2359, 2000.

CASSU, S.N.; FELISBERTI, M.I. Comportamento Dinâmico-Mecânico E Relaxações Em Polímeros E Blendas Poliméricas. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 255-263, 2005.

CIANI, R.B.; RAHAL S.C.; VOLPI, R.S.; TAGA, R.; GRANJEIRO, J.M.; CESTARI, T.M.; MAMPRIM, M.J. Mistura de proteínas morfogenéticas ósseas, hidroxiapatita, osso inorgânico e colágeno envolta por membrana de pericárdio no preenchimento de defeito ósseo segmentar em coelhos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**., v.58, n.1, p.59-67, 2006.

DAVIES, J.E.; HOSSEINI, B.; BEASLEY, J.D.; LARSON, W.J.; POSEY, W. Degradation rates of polymers and copolymers of polylactic and polyglycolic acids. **Journal of Oral Surgery**, v. 37, p. 143-152, 1974.

DUARTE, Márcia Adriana Tomaz. **Influência das Concentrações do PCL-T em Membranas de PLDLA. Estudo *in vitro* e *in vivo***. 2009. 116p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

DUEK, E.A.R.; ZAVAGLIA, C.A.C.; BELANGERO, W.D. In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation. **Polymer**, v. 40, p. 6465-6473, 1999.

DUEK, E. A.R.; BARBANTI, S.H.; ZAVAGLIA, C.A.C. Polímeros Biorreabsorvíveis na Engenharia de Tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, n. 1, p. 13-21, 2005.

ENGELBERG, I., KOHN, J., Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: a comparative study, **Biomaterials**, v. 12, n 3, p.292-304, 1991.

GALANTE, J.O.; LEMONS, J.; SPECTOR, M.; WILSON, P.D.; WRIGHT, T.M. The biologic effects of implant materials. **Journal of Orthopaedics Research**, v. 9, p.760-775, 1991.

GÖPFERICH, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. **Biomaterials**, v. 17, p. 103-114, 1996.

GORALTCHOUK, A.; FREIER, T., SHOICHET, M.S. Synthesis of degradable poly(L-lactide-co-ethylene glycol) porous tubes by liquid-liquid centrifugal casting for use as nerve guidance channels, **Biomaterials**, v. 26, p. 7555-63, 2005.

GOUVEIA, C.H.A. **Efeito da administração de hormônio tireoideano na massa óssea de ratas**. São Paulo. 1996. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo.

GRIFFITH, L.G.; NAUGHTON, G. Tissue Engineering-Current Challenges and Expanding Opportunities. **Science**, v. 295, n. 5557, p. 1009-1014, 2002.

GRIZZI, I.; GARREAU, H.; LI, S.; VERT, M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(D,L lactic acid) size-dependence. **Biomaterials**, v. 16, p. 305-311, 1995.

GUARNIERO, R.; CINAGAVA, M. Y.; SANTANA P. J.; BATISTA, M.A.; OLIVEIRA L. A.A.; RODRIGUES C. J.; CINAGAVA F. T. Influence of the protein component upon fracture healing: an experimental study in rats. **Acta Orthopaedica Brasileira**, v.11, n. 4, p.206-210, 2003.

GUYTON, A.C. **Fisiologia humana e mecanismo das doenças**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993. P. 503-504.

HAN, Y.; FAN, Z., LU Z., ZHANG Y., LI S., In vitro Degradation of Poly[( L-Lactide)-co-(Trimethylene carbonate)] Copolymers and a composite with poly[(L-lactide)-co-(glycolide) fibers as cardiovascular stent material. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 297, p.128-135, 2012.

HASEGAWA, Y.; SAKANO, S.; TOSHIKI, I.; WARASHIMA, H. The long-term behavior of poly-L-lactide screws in a minipig fracture model: preliminary report. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 63, p. 679-685, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 488p.

KELLOMÄKI, M.; TORMALA, P. Processing of reabsorbable poly-alpha-hydroxy acids for use as tissue-engineering scaffolds. **Methods in Molecular Biology**, v. 238, p. 1-10, 2004.

KFURI J.F.; PACCOLA A.J.; CHIERICE G.O.; SHIMANO A.C.; Comparação entre pinos absorvíveis de poliparadióxanona e de poliuretana da mamona na fixação de segmentos osteocondrais do fêmur distal de coelhos. **Revista Brasileira de Ortopedia**, v. 36, n. 4, 2001.

LEMMOUCHI, Y., SCHACHT, E., KAGERUKA, P., DEKEN, R., DIARRA, B., DIALLI, O., GEERTS, S. Biodegradable polyesters for controlled release of trypanocidal drugs: *In vitro* and *in vivo* studies, **Biomaterials** v. 19, pp.1827-1837, 1998.

LI, S. M, GARREAU, H., VERT, M. Structure property relationships in the case of massive aliphatic poly-( $\alpha$ -hydroxy acids) in aqueous-media .1. poly(DL-lactic acid), **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v. 1, p. 123-130, 1990.

LIMA, F.M. **Regeneração Tecidual Guiada Entre Duas Superfícies Ósseas Aproximadas Por Distração Osteogênica – In Vivo**. 2004. 65p. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

LIZARELLI, R.F.Z.; LAMANO-CARVALHO, T.L. BRENTGANI, L.G. Histometrical evaluation of the healing of the dental alveolous in rats after irradiation with low-powered GaAlAs laser. **SPIE Conference on Lasers in Dentistry**, v. 3593, p. 49-55, 1999.

LUCIANO, R.M.; ZAVAGLIA, C.A.C.; DUEK E.A.R. Preparation of Bioabsorbable Nerve Guide Tubes. **Artificial Organs**, v. 24, p. 206-208, 2000.

MANO, E.B.; MENDES, L.C. Introdução a polímeros; **Editora Edgar Blucher Ltda**. São Paulo, 1999.

MCMANUS, A. J.; MOSER, R.C.; DABKOWSKI, R.B.; THOMAS, K.A. Enhanced Retention of Polymer Physical Characteristics and Mechanical Strength of 70:30 Poly(L-lactide-co-D,L-lactide) After Ethylene Oxide Sterilization. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, 2007.

MESSIAS, André Dutra. **Arcabouços de poli(L-co-D,L ácido láctico-co-trimetileno carbonato) para o crescimento de células osteoblásticas (SaOS-2)**. 2011. 59p. Tese (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

MIDDLETON, J.C.; TRIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2335-2346, 2000.

MITTAL, R.; MORLEY, J.; DINOPOULOS, H.; DRAKOULAKIS, E.; VERMANI, E.; GIANNOUDIS, P. Use of bio-resorbable implants for stabilisation of distal radius fractures: the United Kingdom patients' perspective. **Journal of Bone Injury**, v.36, n.2, p.333-338, 2005.

MOORE K.L.; DALLEY A.F. **Anatomia orientada para a clínica**. 5ª ed. Editora Guanabara Koogan S/A, 2007, Rio de Janeiro.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Síntese e caracterização do copolímero poli (L-co-D,L Ácido Lático). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 2, p.123-129, 2007.

MOTTA, A. C.; DUEK, E. A. R. Estudo inicial da Degradação “in vivo” de poli (L-co-D,L ácido lático), sintetizado em laboratório, aplicado como prótese tibial em coelhos. **Revista Matéria**, v. 14, n. 3, p. 1070-1075, 2009.

MOTTA, Adriana Cristina de Menezes Monteiro. **Síntese e caracterização de dispositivos de poli(L-co-D,L ácido lático): estudo da degradação *in vitro* e *in vivo***. 2002. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

NAIR, L.S.; LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 32, n 8-9, p. 762-798, 2007.

NIELSEN, L.E. **Mechanical Properties of Polymers and Composites**. New York, Marcel Dekker, Inc, 1974. P. 235.

NOJIMA, L.I. **Novo Sistema de Implantes Subperiosteal e Intra-Ósseo Como Ancoragem Ortodôntica. Estudo Experimental em Coelhos**. Tese (Doutorado). 2004. 77p. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

OHASHI, H.; KOBAYASHI, A.; KADOYA, Y.; YAMANO, Y.; OONISHI, H.; IWAKI, H. Effect of particles and interfaces conditions on fibrous tissue interposition between bone and implant. A particle challenge model in rabbit. **Journal of Materials Science: Materials In Medicine**, v. 11, p. 255-259, 2000.

OREFICE, R. L.; PEREIRA, M. M.; MANSUR, H. S. **Biomateriais: fundamentos e aplicações**. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2006. 538p.

PAUL, D.R.; NEWMAN, S. Polymer blends, **Orlando: Academic Press, Inc.**, 1978.

PEARCE, A.I.; RICHARDS, R.G.; MILZ, S.; PEARCE, S.G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. **European Journal of Cells and Materials**. v 13, p. 1-10, 2007.

PÊGO, A.P., POOT, A., GRIJPM, D., FEIJEN J. In vitro Degradation of trimethylene carbonate based (co)polymers. **Macromolecular Bioscience**, v. 9, n. 2, p. 411-419, 2002.

PÊGO, A.P.; POOT, A.A; GRIJPM, D.W.; FEIJEN, J. Physical properties of high molecular weight 1,3-trimethylene carbonate and D,L-lactide copolymers. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**. Med., v. 14, n. 9, p. 767-773, 2003a.

PÊGO, A.P.; SIEBUM B; Van LUYN, M.J.; GALLEGÓ y Van SEIJEN, X.J.; POOT, A.A.; GRIJPM, D.W & FEIJEN, J. Preparation of degradable porous structures based on 1,3-trimethylene carbonate and D,L-lactide (co)polymers for heart tissue engineering. **Tissue engineering**., v. 9, n. 5, p. 981-994, 2003b.

PEZZIN, Ana Paula T. Obtenção e caracterização de blendas de poli(p-dioxanona)/poli(L-ácido láctico) (PPD)/PLLA) para aplicação como prótese de menisco biorreabsorvível. 2001. 149p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PINTO, Marcelo Roberto. **Osteointegração de Blendas de PLDLA/PCL. Estudo *in vitro* e *in vivo***. 2007, 89p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

PRADO, F.A.; ANBINDER, A.L.; JAIME, A.P.G.; LIMA, A.P.; BALDUCCI, I.; ROCHA, R.F. Defeitos ósseos em tíbias de ratos: padronização do modelo experimental. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo**. v. 18. P. 7-13, 2006.

RATNER, B.D.; HOFFMAN, A.S.; SCHOEN, F.J.; LEMONS, J.E. **Biomaterials Science. An introduction to materials and medicine**. San Diego: Academic Press, 1996, 484p.

REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J.; BOCCACCIN, A.R. Biodegradable and Bioactive Porous Polymer/inorganic Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering. **Biomaterials**, v.27, n. 18, p.3413-3431, 2006.

RIEGER, C.L. **Propriedades mecânicas do osso**. In: Gould Iii, J.A., Fisioterapia na ortopedia e na medicina do esporte. Cap1, p. 3-47, São Paulo, 1993.

ROSS, M.H.; ROMRELL, L.J. **Histologia, texto e atlas**. São Paulo: Panamericana, 1993, p. 141-179.

SCHENK, R.K. Regeneração óssea bases biológicas. **Regeneração Óssea Guiada na Implantologia**. São Paulo: Quintessence Books, 1996.

SCHMITZ, J.P.; HOLLINGER, J.O. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial non unions. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, p. 205, 1986.

SEAL, B.L.; OTERO, T.C.; PANITCH, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration. **Materials Science and Engineering: R: Reports**, v. 34, n.4-5, p. 147-230, 2001.

SHEKARAN, A.; GARCÍA, A.J. Extracellular matrix-mimetic adhesive biomaterials for bone repair. **Journal of Biomedical Materials Research** v. 96, n. 1, 2011.

SHYAMROY, S. **Synthesis of Biodegradable Poly (Lactic Acid) Polymers**. 2003. 203p. Dissertação (Doutorado) University of Poona, India.

SILVA, C.M.O.M. **Avaliação da ação do alendronato sódico sobre a reparação óssea na ausência dos hormônios ovarianos**. 2000. 103p. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

SOMMERFELDT, D.W.; RUBIN, C.T. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. **Journal of European Spine**, v. 1, p. S86-S95, 2001.

STOCK, U.A., VACANTI, J.P., Tissue engineering: Current state and prospects. **Annual. Medicine Review**, v. 52, p. 443, 2001.

SWEENEY, T.M.; OPPERMAN, L.A., PERSING, J.A. OGLE, R.C. Repair of critical size rat calvarial defects using extracellular matrix protein gels. **Journal of Neuro-surg**, 1995.

TATUM, S.A., KELLMAN, R. M., FREIJE, J. E. Maxillofacial fixation with absorbable miniplates: computed tomographic follow-up. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 8, pp.135–140, 1997.

TSUIJI, H.; HORII, F.; HYON, S.H.; IKADA, Y. Stereocomplex formation between enatiomeric poly (lactic acid)s. 2. Stereocomplex formation in concentrated solutions. **Macromolecules**, v.24, p. 2719-2724, 1991.

VERT, M.; LI, M.S.; SPENLEHAULER, G.; GUERRIN, P. Biorreabsorbability and biocompatibility of aliphatic polyeesters. **Journal of Materials Science**, v. 3, n. 6, p. 432-446, 1992.

VERT, M.; SCHWARCHA, G.; Coudane, J. Present and future of PLA polymers. **Journal of Macromolecular Science, Part A: Pure and Applied Chemistry**, v. 32, n. 4, p 787-796, 1995.

WANG, Y.; AMMER, G. A.; SHEPPARD, B. J.; LANGER, R., A. A tough biodegradable elastomer. **National. Biotechnology.**, v. 20, n. 6, p. 602-606, 2002.

WARD, J.J.; THORNBURY, D.D.; LEMONS, J.E.; DUNHAM, W.K. Metal-induced sarcoma: a case report and literature review. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, v. 252, p.299-306, 1990.

WATANABE, J.; AMEMORI, S.; AKASHI, M. Disparate polymerization facilitates the synthesis of versatile block copolymers from poly(trimethylene carbonate). **Polymer**, v.49, p. 3709-3715, 2008.

WILLIAMS, D.F. **Definitions In Biomaterials – Progress In Biomedical Engineering**. New York: Elsevier, 1987, 72p.

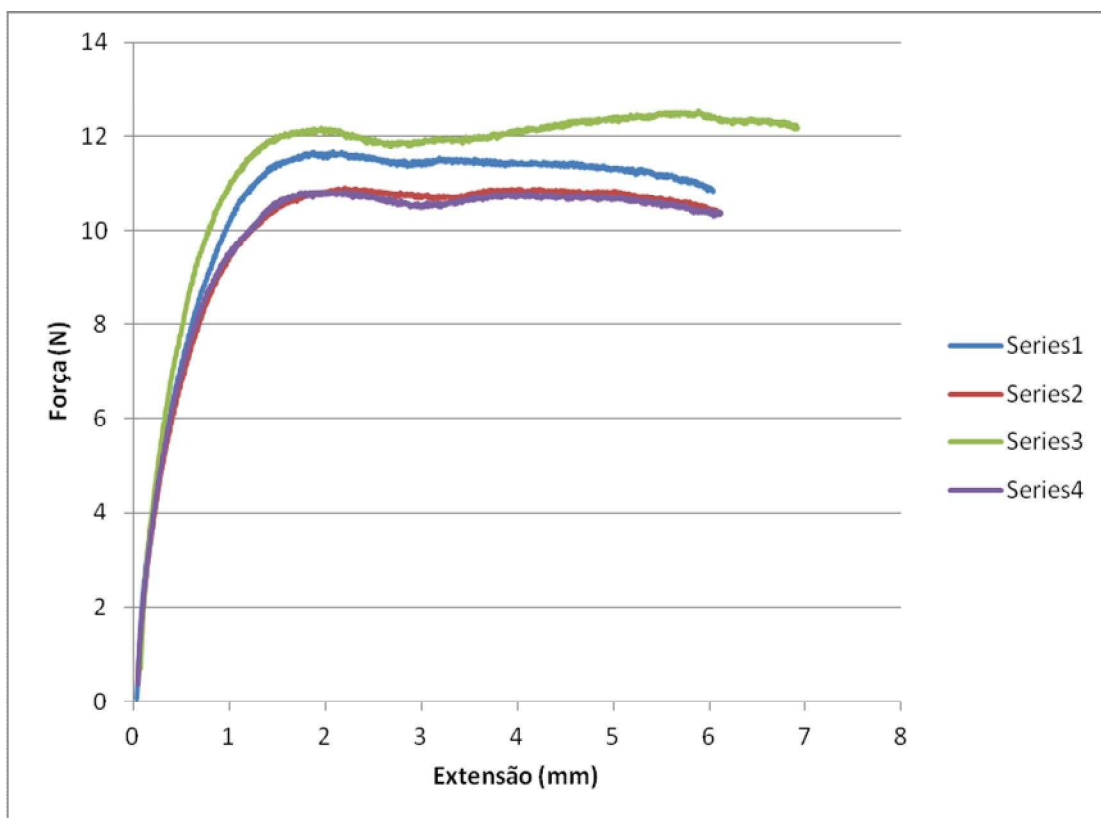
WILLIAMS, D.F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, n. 30, p. 5897-5909, 2009.

YANG, J.; LIU, F.; YANG, L.; LI, S. Hydrolytic and enzymatic degradation of poly(trimethylene carbonate-co-D,L-lactide) random copolymers with shape memory behavior. **European Polymer Journal**, v. 46, p. 783-791, 2010.

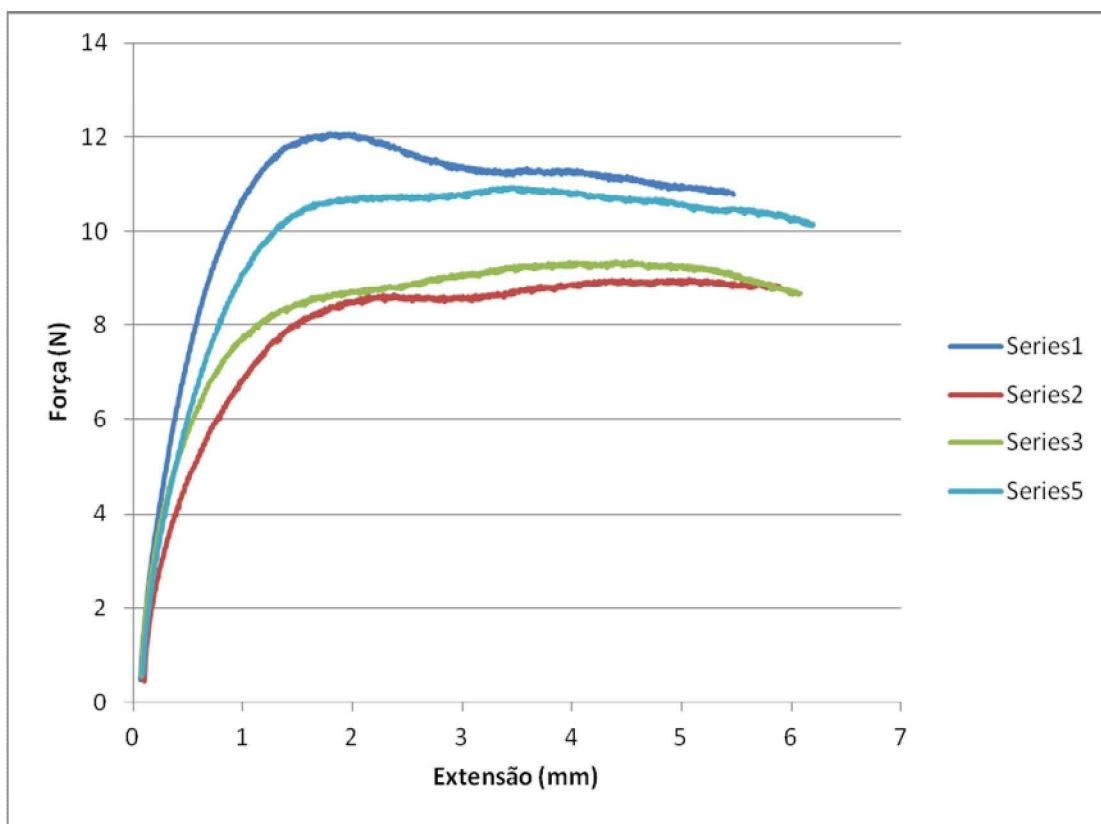
YUEHUEI, H.; WOOLF, S.K.; FRIEDMAN, R.J. Pre-clinical in vivo evaluation of orthopaedic bioabsorbable devices. **Biomaterials**, v. 21, p. 2635-2652, 2000.

ZHANG, Z.; KUIJER, R.; BULSTRA, S. K.; GRIJPMAN, D. W.; FEIJEN, J.; The in vivo and in vitro degradation behavior of poly(trimethylene carbonate). **Biomaterials** v. 27, p. 1741–1748, 2006.

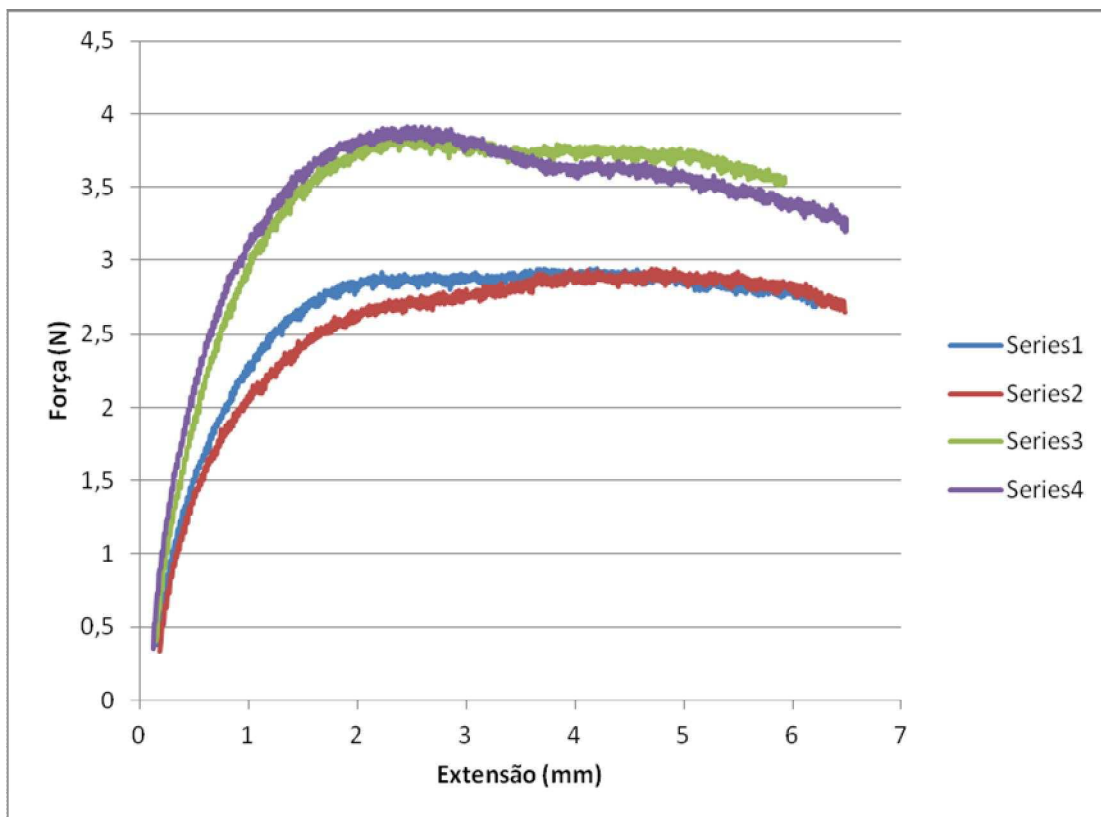
## ANEXOS



**Anexo 1.** Curvas de ensaio mecânico de flexão de três pontos dos dispositivos PLDLA-TMC após 15 dias do início da degradação *in vitro*.



**Anexo 2.** Curvas de ensaio mecânico de flexão de três pontos dos dispositivos PLDLA-TMC após 60 dias do início da degradação *in vitro*.



**Anexo 3.** Curvas de ensaio mecânico de flexão de três pontos dos dispositivos PLDLA-TMC após 90 dias do início da degradação *in vitro*.