

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A REDAÇÃO FINAL DA
TESE DEFENDIDA POR Adriana Cristina
Motta de Menezes Monteiro E APROVADA
PELA COMISSÃO JULGADORA EM 22.02.2007

Stueck

ORIENTADOR

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA

COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA

**Síntese e caracterização de dispositivos de poli
(L-co- D, L ácido láctico). Estudo da degradação
in vitro e *in vivo***

Autora: Adriana Cristina Motta de Menezes Monteiro
Orientadora: Prof.^a Dr.^a Eliana Aparecida de Rezende Duek

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

**Síntese e caracterização de dispositivos de poli
(L-co- D, L ácido láctico). Estudo da degradação
in vitro e *in vivo***

Autora: Adriana Cristina Motta de Menezes Monteiro
Orientadora: Prof^a. Dr^a Eliana Aparecida de Rezende Duek

Curso: Engenharia Mecânica
Área de Concentração: Materiais e Processos de Fabricação

Tese de doutorado apresentada à comissão de Pós Graduação da Faculdade de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Mecânica.

Campinas, 2007
S.P. – Brasil

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

Monteiro, Adriana Cristina Motta de Menezes
M764s Síntese, caracterização de dispositivos de poli (L-co-D, L
 ácido láctico). Estudo da degradação *in vitro* e *in vivo* / Adriana
 Cristina Motta de Menezes Monteiro.--Campinas, SP: [s.n.],
 2007.

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

1. Materiais biomédicos. 2. Copolimerização - Síntese. 3.
Copolímeros - Deterioração. 4. Copolímeros. I. Duek, Aliana
Aparecida de Rezende. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia Mecânica. III. Título.

Titulo em Inglês: Synthesis and characterization of poly (L-co-D, L lactic acid).
Study degradation *in vitro* and *in vivo*

Palavras-chave em Inglês: Poly(L-co-D, L lactic acid), Synthesis, Processing,
Degradation *in vitro*, *in vivo*

Área de concentração: Materiais e processos de Fabricação

Titulação: Doutor em Engenharia Mecânica

Banca examinadora: Célia Marina de Alvarenga Freire, Maria Clara de Felippi,
Arnaldo Rodrigues dos Santos Junior, Derval dos Santos Rosa

Data da defesa: 22/02/2007

Programa de Pós-Graduação: Engenharia Mecânica

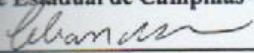
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA MECÂNICA
COMISSÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
MECÂNICA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAIS

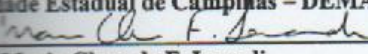
TESE DE DOUTORADO

**Síntese e caracterização de dispositivos de
poli (L-co- D, L ácido láctico). Estudo da
degradação *in vitro* e *in vivo*.**

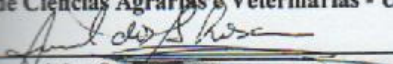
Autor: Adriana Cristina Motta de Menezes Monteiro
Orientadora: Prof^a Dr^a Eliana Ap. de Rezende Duek


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


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


Prof. Dr^a Maria Clara de F. Ierardi
Universidade Estadual de Campinas – DEMA/FEM


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


Prof. Dr. Derival dos Santos Rosa
Universidade São Francisco-Itatiba

Campinas, 2007

Dedico,

As minhas filhas, Larissa e Clarice *sempre...*
Ao meu marido Mário e a minha mãe Olímpia.

Agradecimentos

A Deus antes de tudo....

A Prof^a. Dr^a. Eliana Aparecida de Rezende Duek, pela orientação, amizade, apoio e confiança e exemplo de profissionalismo.

A Prof^a. Dr^a. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia.

Aos professores, funcionários e alunos da Faculdade de Engenharia Mecânica, Departamento de Materiais / UNICAMP, entre eles, em especial à Vanessa, Alberto, Betina, Claudinete, Emília, José Luis e Marcos (Sifem).

Especialmente a Grazielle e Márcia, pela ajuda prestada.

A Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Rincon e a Carolina Lucchesi pela preciosa colaboração na análise histológica.

Ao professor do Instituto de Geociências UNICAMP, Carlos Alberto Lobão da Silveira Cunha.

A amiga Samantha e a grande amiga Daniela.

Ao Sr. José Tadeu Leme da empresa Engimplan.

...muito obrigado, Adriana

Pedras no caminho, guardo todas. Um dia faço um castelo!

Fernando Pessoa

Publicações

Periódicos

MOTTA, A. C.; DUEK, E.A.R..; Síntese, Caracterização e Degradação *in vitro* do poli (L-ácido láctico), **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 16(1), pp.26-32, 2006.

MOTTA, A. C.; DUEK, E.A.R..; Síntese, Caracterização e Degradação *in vitro* do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico), **Revista Matéria**, 11(3), pp.340-350, 2006.

MOTTA, A. C.; DUEK, E.A.R..; Síntese e Caracterização do Copolímero Poli (L-co –D,L ácido láctico), **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, 17 (2), 2007.(em editoração)

Patente

Em função dos resultados obtidos neste trabalho foi redigido um pedido de patente referente à síntese do copolímero Poli (L-co-D,L ácido láctico), que está sendo analisado pelo INPI. (Processo PI 0500893-0)

Resumo

MOTTA, Adriana Cristina, Síntese, Caracterização de dispositivos de poli (L-co D, L ácido láctico). Estudo da degradação *in vitro* e *in vivo*. Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 124 p. Tese de Doutorado.

Dispositivos bioreabsorvíveis têm sido intensivamente estudados para aplicações em ortopedia e traumatologia, no reparo de fraturas ósseas provenientes principalmente de traumas. O poli (L-co-D, L ácido láctico), PLDLA, na relação 70:30 referentes aos monômeros L e D, L ácido láctico, respectivamente é um copolímero utilizado na fixação de fraturas nas regiões bucomaxilo e crânio. Neste trabalho o PLDLA foi sintetizado pela polimerização em massa dos monômeros cíclicos do L-ácido láctico e do D, L ácido láctico, utilizando como catalisador o Sn (Oct)₂, sendo que os monômeros juntamente com o catalisador foram adicionados a uma ampola de vidro selada e imersa num banho de óleo a 130 °C por 72 horas. Obteve-se material com alta massa molar (10^5 g/mol) o qual foi caracterizado por Ressonância magnética de próton e carbono treze (RMN de ¹H e ¹³C), Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), Cromatografia de permeação em gel (GPC), Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica (TGA). O PLDLA foi processado por injeção obtendo-se placas e parafusos, os quais foram submetidos a testes mecânicos de flexão, GPC e Microscopia Eletrônica de Varredura (Mev), além do estudo da degradação *in vitro*, que demonstrou que o copolímero retém 80 % de suas propriedades mecânicas por 4 meses e do estudo *in vivo*, através do implante do sistema placa-parafuso em tíbias de coelhos, sendo verificado o crescimento de tecido ósseo e a ausência de reações inflamatórias no período estudado(três meses).

Palavras-chave: Poli (L-co-D,L ácido láctico,) síntese, processamento, degradação *in vitro* e *in vivo*.

Abstract

MOTTA, Adriana Cristina, *Synthesis and characterization of poly(L-co-D,L lactic acid). Study degradation in vitro and in vivo*. Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, 2007. 124 p. Tese de Doutorado.

The applications of bioreabsorbable polymers as temporary prostheses have been highly used in medical procedures related to fracture. Among the bioreabsorbable polymers the poly(L-co-D, L lactic acid), PLDLA, in the 70:30 rate has been studied to obtain plates and screws to recuperate traumas in the cranium and maxilla facial allowing an adaptation of devices to implant local during the surgery. In this work PLDLA was synthesized by mass polymerization of the cyclical monomers as L-lactic acid and D, L lactic acid, using $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ as catalyst. Polymerization were carried out in vacuum sealed, glass ampouls, it was immersed in an oil bath at 130°C , for 72 hours. It was obtained material with high molar mass (around 10^5 g/mol) which was characterized by: Nuclear magnetic resonance spectroscopy (^1H RMN and ^{13}C RMN) , Gel permeation chromatography(GPC) , FTIR , Dynamical scanning calorimetry (DSC) and Thermogravimetric analysis (TGA). PLDLA was injection molding process obtained screws plates which evaluated by mechanical tests flexural, GPC and Scanning electron microscopy (SEM). The *in vitro* study of the plates PLDLA maintained 80% of this strength for 4 months. An *in vivo* study performed in rabbits tibias showed there was formation osseous tissue and no signs of inflammation tissue were seen (period three months).

Key Words: Poly(L-co-D,L lactic acid); synthesis, processing , degradation *in vitro* and *in vivo*.

Índice

Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xxi
Nomenclatura	xxiii

Capítulo 1 Introdução

01

1.1 Objetivos	03
---------------	----

Capítulo 2 - Revisão da Literatura

2.1 Polímeros Bioreabsorvíveis	05
2.2 Poli (α - hidróxi-ácidos)	07
2.3 Ácido lático e seu diéster cíclico	08
2.4 Histórico poli (ácido lático)	11
2.4.1 Polimerização por policondensação do ácido lático	12
2.4.2 Polimerização por abertura do anel do diéster cíclico	13
2.5 Propriedades dos PLA	16
2.5.1 Poli (L-ácido lático)	16
2.5.2 Poli(D,L ácido lático)	17
2.5.3 Poli (L-co-D, L ácido lático), PLDLA	18
2.6 Processamento de polímeros	20
2.7 Estudo da degradação <i>in vitro</i>	20
2.8 Informações sobre fraturas no osso e reparos com dispositivos bioreabsorvíveis	28

Capítulo 3 - Materiais e Métodos

3.1 Síntese de PLDLA 70:30	34
----------------------------	----

3.2 Caracterização do copolímero	36
3.2.1 Cromatografia por Permeação em Gel (GPC)	36
3.2.2 Ressonância magnética (RMN de H^1 e C^{13}):	36
3.2.3 Análise de infravermelho (FTIR)	36
3.2.4 Calorimetria Exploratória de Varredura (DSC)	36
3.2.5 Análise Termogravimétrica (TGA)	37
3.3 Processamento dos dispositivos na forma de placas e parafusos	37
3.3.1 Cromatografia por Permeação em Gel	37
3.3.2. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	37
3.3.3 Ensaio de flexão	38
3.3.4 Estudo citotoxicidade	39
3.4 Estudo da degradação <i>In Vitro</i> da placa de PLDLA	39
3.4.1 Cromatografia por Permeação em Gel	40
3.4.2. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	40
3. 4.3 Análise Termogravimétrica (TGA)	40
3.4.4 Ensaio de flexão	40
3.4.5 Degradação visual dos dispositivos	40
3.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	41
3.5 Estudo <i>in Vitro</i> e <i>In Vivo</i> do sistema placa parafuso de PLDLA	41
Capítulo 4 - Resultados e Discussões	45
4.1 Síntese do copolímero	45
4.2 Caracterização do PLDLA	49
4.2.1 Cromatografia de permeação a gel (GPC)	50
4.2.2 Ressonância magnética (RMN de H^1 e C^{13})	52

53	4.2.2.1 Ressonância magnética RMN de H^1	
	4.2.2.2 Ressonância magnética RMN de C^{13}	59
	4.2.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)	62
	4.2.4. Calorimetria Exploratória de Varredura (DSC)	65
	4.2.5 Análise Termogravimétrica (TGA)	70
	4.3 Caracterização dos dispositivos obtidos por processamento via injeção	73
	4.3.1 Cromatografia de permeação a gel (GPC)	74
	4.3.2 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	75
	4.3.3 Ensaio de flexão	76
	4.3.4 Estudo Citotóxico do dispositivo PLDLA sintetiza	78
	4.3.5 Estudo da resistência dos parafusos de PLDLA após a inserção dos mesmos na mandíbula sintética a base de poliuretano	78
	4.4 Estudo da degradação <i>in vitro</i> das placas de PLDLA	78
	4.4.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)	78
	4.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	81
	4.4.3 Análise Termogravimétrica (TGA)	86
	4.4.4 Propriedade mecânica durante a degradação	88
	4.4.5 Degradação visual dos dispositivos	93
	4.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	94
	4.5 Estudo <i>In Vivo</i> e <i>in Vitro</i> do sistema placa parafuso de PLDLA	96
	4.5.1 Estudo <i>in vitro</i> do sistema placa-parafuso PLDLA	96
	4.5.2 Estudo <i>in vivo</i> do sistema placa-parafuso PLDLA	100

Capítulo 5 - Conclusões 104

5.1 Trabalhos em andamento nos quais o copolímero PLDLA deste estudo
106
está sendo empregado.

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

107

Anexo I 122

Anexo II 124

Lista de Figuras

- Figura 2.1: Esquema simplificado da degradação do poli (ácido láctico) (Böstman; 1991). 7
- Figura 2.2: Estruturas espaciais dos estereoisômeros do ácido láctico. 9
- Figura 2.3: Ilustração das etapas da reação de policondensação do ácido láctico em duas etapas, sendo inicialmente gerado poli (ácido láctico) e água e posteriormente poli (ácido láctico) e o diéster cíclico. 10
- Figura 2.4: Estrutura química do diéster cíclico do ácido láctico e seus possíveis estereoisômeros (Tsuji, 2002). 10
- Figura 2.5: Representação da equação de policondensação do ácido láctico formando PLA de baixa massa molar. 12
- Figura 2.6: Representação da abertura do anel do dímero cíclico do ácido láctico. (Chabot *et al.*, 1983). 13
- Figura 2.7: Ilustração da estrutura do Sn (Oct)₂. 14
- Figura 2.8: Representação da reação de polimerização do poli (ácido láctico), a partir do diéster cíclico do ácido láctico (lactide). 15

Figura 2.9: Ilustração do processo de quebra das cadeias do copolímero.	22
Figura 2.10: Ilustração do processo de biodegradação.	24
Figura 2.11: Ilustração do comportamento típico do material bioreabsorvível -diminuição de propriedade mecânica e transferência de carga para o osso em recuperação.	24
Figura 2.12: Exemplos de alguns tipos de fratura que podem ocorrer na região cranial: (a) Fratura na região do osso zigomático, (b) Fratura da maxila e mandíbula e (c) Reparos na região cranial.	29
Figura 2.13: Tipos de placas em vários formatos usadas na região cranial.	30
Figura 2.14: Ilustração de um tipo possível de dispositivo de proteção.	31
Figura 2.15: Ilustração da inserção do dispositivo PLDLA em água quente tornando-o temporariamente maleável para contornar de maneira mais eficaz o modelo do crânio (Punja <i>et al.</i> , 2006).	31
Figura 2.16: Ilustração dos dispositivos usados na fixação de fratura mandibular.	32
Figura 2.17: Ilustração do local de implantação do dispositivo bioreabsorvível.	33
Figura 3.1: Ilustração da aparelhagem usada na síntese, onde (a) se refere à ampola, (b) ao béquer contendo o óleo a 130 °C e (c) ao aquecedor e agitador.	35

Figura 3.2: Ilustração do ensaio de flexão pelo método de 3 pontas.	38
Figura 3.3: Desenho ilustrativo do estudo <i>in vitro</i> da degradação das placas.	39
Figura 3.4: Ilustração esquemática da osteotomia transversal fixada com placa e parafusos (a) PLDLA e (b) controle a base de titânio.	43
Figura 3.5: Ilustração esquemática da disposição dos materiais em tíbias direita e esquerda.	43
Figura 4.1: Exemplos de reações de transesterificações intermoleculares e intramoleculares.	47
Figura 4.2: Mecanismo de reação da polimerização tipo cordenação-inserção de diésteres cíclicos por meio de Sn (Oct) ₂ (Kricheldorf ,2001)	48
Figura 4.3: Ilustração da relação dos valores de massa molar em função da relação monômero/catalisador.	52
Figura 4.4: Estrutura química do PLDLA.	53
Figura 4.5: Espectro de RMN de H ¹ referente ao homopolímero poli (L-ácido láctico).	54
Figura 4.6: Espectro de RMN de H ¹ para o polímero PLDLA referente a 3 ^o síntese.	55
Figura 4.7: Comparação entre o espectro (a) referente ao copolímero comercial e o espectro (b) referente à síntese do copolímero PLDLA-3.	56
Figura 4.8: Espectros de RMN de H ¹ para síntese PLDLA-8 (a) e com região ampliada (b) .	58

Figura 4.9: Espectro de RMN de C^{13} para o polímero PLDLA-3.	60
Figura 4.10: Espectro de RMN de C^{13} para o polímero PLDLA comercial.	60
Figura 4.11: Espectro de RMN de C^{13} onde (a) é referente ao para o copolímero PLDLA-3; e (b) ao copolímero PLDLA-8.	61
Figura 4.12: Representação do modelo em 3D da cadeia do copolímero PLDLA.	62
Figura 4.13: Espectros na região do infravermelho dos copolímeros referentes às sínteses de 1 a 9 e espectro do copolímero comercial (Purac).	63
Figura 4.14: Curvas de DSC do primeiro aquecimento das amostras de copolímero PLDLA.	65
Figura 4.15: Temperatura de transição vítrea (T_g) em função da massa molar ponderal média (M_w).	68
Figura 4.16: Curvas de DSC do segundo aquecimento das amostras de copolímero, após resfriamento a taxa constante de $30^\circ C/min$, e novo aquecimento a $10^\circ C/min$.	69
Figura 4.17: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das sínteses de PLDLA realizadas.	70
Figura 4.18: Análises termogravimétricas para algumas sínteses de PLDLA realizadas, onde <i>a,b,c,d,e,f</i> , representam PLDLA-11;PLDLA-13,PLDLA-14,PLDLA-15,PLDLA-16 e PLDLA-17.	72

Figura 4.19: Foto dos dispositivos processados por injeção do PLDLA-11.	73
Figura 4.20: Fotomicrografias das superfícies da fratura das placas de PLDLA-11 a) BAR = 25 μm b) BAR = 10 μm .	75
Figura 4.21: Resultados de tensão (σ) obtida por meio do ensaio de flexão do copolímero PLDLA sintetizado e de um copolímero comercial (Osteo- pin T_m).	76
Figura 4.22: Resultados do módulo de elasticidade do copolímero PLDLA-11 sintetizado (média do módulo de elasticidade = 2088 ± 65 MPa).	77
Figura 4.23: Variação de Mw e Mn em função do tempo de degradação para dispositivo PLDLA.	79
Figura 4.24: Porcentagem de Mw inicial em função do tempo de degradação do dispositivo PLDLA.	80
Figura 4.25: Termogramas de DSC do 1º aquecimento do PLDLA em função do tempo de degradação.	82
Figura 4.26: Termogramas de DSC do 2º aquecimento do PLDLA em função do tempo de degradação.	82
Figura 4.27: Variação da T_g em função do tempo de degradação.	84
Figura 4.28: Variação da T_g em função da queda na massa molar durante o estudo <i>in vitro</i> em tampão fosfato.	85
Figura 4.29: Análises termogravimétricas da degradação <i>in vitro</i> do dispositivo de PLDLA em função do tempo de degradação.	86
Figura 4.30: Variação da temperatura de início de degradação térmica (T_{onset}) para o dispositivo de PLDLA durante a degradação <i>in vitro</i> em meio tampão fosfato.	87

Figura 4.31: Variação da temperatura de início de degradação térmica (*Tonset*) e da temperatura de transição vítrea (*Tg*) durante a degradação *in vitro* em meio tampão fosfato. 88

Figura 4.32: Módulo de elasticidade no ensaio mecânico de flexão de dispositivo PLDLA durante degradação *in vitro* em meio tampão fosfato. 89

Figura 4.33: Tensão (σ) obtida por meio *equação 2*, no ensaio mecânico de flexão de dispositivo PLDLA durante degradação *in vitro* em meio tampão fosfato. 90

Figura 4.34: Porcentagem de retenção do módulo em função do tempo de degradação. 90

Figura 4.35: Porcentagem de retenção da tensão em função do tempo de degradação. 91

Figura 4.36: Acompanhamento visual do processo de degradação (em semanas) do dispositivo PLDLA. 93

Figura 4.37: Microscopia eletrônica de varredura da superfície do dispositivo de PLDLA sendo A) antes degradação B) após 2 semanas; C) após 4 semanas; D) após 8 semanas; E) após 18 semanas e F) após 20 semanas. 94

Figura 4.38: Gráfico contendo valores das médias de carga em deslocamento de 3mm para os parafusos de titânio e reabsorvíveis em aplicação de força em região de incisivo 97

Figura 4.39: Gráfico contendo valores das médias de carga em deslocamento de 3mm para os parafusos de titânio e reabsorvíveis em aplicação de força em região de molar. 97

Figura 4.40: Valores das médias de carga do pico máximo para os parafusos de titânio e reabsorvíveis em aplicação de força em região de incisivo. 98

Figura 4.41: Valores das médias de carga do pico máximo para os parafusos de titânio e reabsorvíveis em aplicação de força em região de molar. 99

Figura 4.42: 2 semanas – A) Polímero – Região em contato com o polímero, presença de grande quantidade de osteoblastos ; B) Região em contato com o titânio. Não se observa reação inflamatória em nenhum dos casos. 101

Figura 4.43: 2 meses – A) Polímero – Região em contato com o polímero, presença de grande quantidade de osteoblastos e neoformação óssea ; B) Região em contato com o titânio, apresentando célula gigante de corpo estranho, caracterizando certa reação inflamatória. 102

Figura 4.44.: 3 meses – A) Polímero – Região em contato com o polímero, apresentando neoformação óssea no local onde o polímero se degradou; B) Região em contato com o titânio, apresentando célula. 103

Lista de Tabelas

Tabela 4.1: Dados das relações molares (M/C) entre o monômero L-lactide e o catalisador Sn(Oct) ₂ usados nas polimerizações em massa do PLDLA (130°C , 72 h.) e valores de (M _n),(M _w) e IP obtidos por meio do GPC.	50
Tabela 4.2: Principais bandas de absorção no infravermelho observadas nos espectros dos copolímeros e as respectivas atribuições.	64
Tabela 4.3: Resultados de T _g , T _m e ΔH _m para as diversas sínteses realizadas.	67
Tabela 4.4: Valores das temperaturas de início (T _{onset}) e máxima (T _d) de perda de massa para as várias sínteses de PLDLA.	71
Tabela 4.5: Valores de M _w e M _n de três sínteses antes e após o processamento via injeção.	74
Tabela 4.6: Variação das massas molares do dispositivo durante a degradação <i>in vitro</i> .	79
Tabela 4.7: Variação da T _g , T _m e ΔH _m das amostras de PLDLA em função do tempo de degradação.	83
Tabela 4.8: Variação da T _m , ΔH _m e χ das amostras de PLLA em função do tempo de degradação.	83
Tabela 4.9: Dados de Temperatura de início de perda de massa para o dispositivo de PLDLA durante os vários tempos de estudo <i>in vitro</i> .	87

Tabela 4.10: Variação da σ (MPa) e módulo de elasticidade (GPa) para o dispositivo PLDLA em função do tempo de degradação em tampão fosfato. 89

Tabela 4.11: Médias e desvio padrão da carga (Kgf) em deslocamento de 3mm, em função do tipo de parafusos e dos locais de aplicação de força dos testes de carregamento. 96

Tabela 4.12: Médias e desvio padrão da carga (Kgf) de pico máximo, em função do tipo de parafusos e dos locais de aplicação de força dos testes de carregamento. 98

Nomenclatura

	Unidade
M _w – Massa molar mássica	(g/mol)
M _n – Massa molar numérica média	(g/mol)
M _w /M _n - Índice de polidispersividade	adimensional
n- número de mol	(mol)
T _d -Temperatura onde a derivada da curva é máxima	(°C)
T _g – Temperatura de transição vítrea	(°C)
T _m -Temperatura de fusão	(°C)
T _{onset} – Temperatura onde se inicia o estágio de perda de massa	(°C)
ΔH _M – Entalpia de fusão experimental	(J/g)
δ = Deslocamento químico	(ppm)

Abreviações

RMN de C¹³ - Ressonância magnética de carbono treze

DSC – Calorimetria exploratória diferencial

FDA-Food and Drug Administration

GPC - Cromatografia de permeação em gel

RMN de H¹ – Ressonância magnética de próton

FTIR - Espectroscopia na região do infravermelho

MEV- Microscopia eletrônica de varredura

MO- Microscopia óptica

PDLA- Poli(D,L ácido láctico)

PGA- Poli(ácido glicólico)

PLA - Poli(ácido láctico)

PLDLA-Poli(L-co-D,L ácido láctico)

PLLA – Poli (L- ácido láctico) ou Poli (L-lactide)

PBS - Solução tampão fosfato salina

ROP- Polimerização por abertura de anel

TGA – Análise Termogravimétrica

THF – Tetrahidrofurano

Sn(Oct)₂- Octanoato de estanho (catalisador)

χ - Grau de cristalinidade

σ - Tensão

E - Módulo de elasticidade

Capítulo 1

Introdução

Inúmeros trabalhos de pesquisa são voltados para a produção de dispositivos cirúrgicos bioreabsorvíveis. A maior vantagem desse tipo de material frente aos implantes metálicos, é que os dispositivos bioreabsorvíveis dispensam a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, o que acarreta tanto na redução do custo total do tratamento, como dos riscos inerentes a qualquer procedimento cirúrgico.

Além disso, as propriedades mecânicas do osso neoformado no local do implante metálico são inferiores quando comparadas as do osso formado quando implantes bioreabsorvíveis são utilizados. Isso se deve ao contínuo processo de degradação que estes implantes apresentam, permitindo uma gradual transferência de carga para o tecido em recuperação, prevenindo assim a atrofia e enfraquecimento do local lesionado, possibilitando, por outro lado, uma recuperação mais efetiva desse osso.

Outra desvantagem do implante metálico frente ao bioreabsorvível é que, para o osso cuja lesão foi reparada com a utilização do implante metálico, existe uma possibilidade maior de re-fratura no local, quando da retirada do implante, em decorrência da fragilização local provocada pela ausência de carga por um período de tempo.

Dessa forma, tem-se percebido uma corrente de pesquisadores que acreditam cada vez mais no emprego de dispositivos bioreabsorvíveis ao invés dos dispositivos metálicos, o que pode ser atribuído tanto as crescentes pesquisas no sentido de melhorar os materiais bioreabsorvíveis, como às inerentes desvantagens dos implantes metálicos.

Poli (α -hidróxi-ácidos), tais como poli (L-ácido láctico) (PLLA), poli (ácido glicólico) (PGA) e seus copolímeros, como, por exemplo, poli (DL ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), estão entre os poucos polímeros sintéticos aprovados para fins clínicos em seres humanos. O que os torna diferenciados perante os outros polímeros são características tais como biocompatibilidade, biodegradabilidade e facilidade de processamento.

Uma outra grande vantagem desses materiais é a vasta possibilidade de obtenção de dispositivos com diferentes propriedades mecânicas e taxas de degradação, em função dos processos como copolimerização ou obtenção de blendas entre seus monômeros. O processo de bioreabsorção desses materiais ocorre por meio da hidrólise de suas ligações ésteres em contato com os fluidos aquosos do corpo, originando produtos na forma de oligômeros e monômeros solúveis e não tóxicos, que após sofrerem a ação metabólica do organismo são transformados em CO_2 e H_2O .

O Poli (ácido láctico) existe em duas formas químicas específicas: Poli (L-ácido láctico), que tem como característica ser altamente cristalino e Poli (D,L ácido láctico), que é completamente amorfo. Essas duas formas (L ou DL) são passíveis de combinação, resultando na formação de um copolímero com propriedades diferentes daquelas exibidas por cada um desses homopolímeros isolados. Trata-se do copolímero Poli (L-co-D,L ácido láctico), PLDLA.

A vantagem do copolímero PLDLA é combinar as propriedades mecânicas inerentes ao poli (L-ácido láctico), sem o inconveniente do elevado tempo de degradação associado a esse homopolímero em função de sua alta cristalinidade. Isso é possível, pois o D, L ácido láctico, ao contrário do L-ácido láctico, apresenta maior taxa de degradação, apesar de ter propriedades

mecânicas aquém das apresentadas pelo Poli (L-ácido láctico). Com a combinação do L-ácido láctico com o D, L ácido láctico é possível obter um produto com boas propriedades mecânicas e com tempo de degradação mais adequado ao requerido pelas fraturas ósseas e mesmo na liberação controlada de fármacos, portanto preferível em muitas aplicações cirúrgicas.

1.1 Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram sintetizar o copolímero poli (L-co-D,L ácido láctico), caracterizá-lo quimicamente e obtê-lo na forma de placas e parafusos, para o estudo da degradação *in vitro* e *in vivo*. Para tanto foi inicialmente realizada uma otimização do processo de síntese do material, quanto a relação monômero/catalisador visando assim produzir o copolímero com alta massa molar. Após a síntese o copolímero foi caracterizado quimicamente, sendo comparado com a literatura e com o material disponível no mercado, por meio de técnicas como: Ressonância magnética de próton e carbono treze (RMN de ^1H e ^{13}C), Espectroscopia na região do infravermelho (FTIR), Cromatografia de permeação em gel (GPC), Calorimetria exploratória diferencial (DSC) e Análise termogravimétrica (TGA). Em seguida o copolímero foi processado via injeção, sendo obtido dispositivos na forma de placas e parafusos. Foi realizado um estudo *in vitro* da degradação das placas em solução de tampão fosfato, tendo sido avaliado, em tempos determinados, suas propriedades mecânicas, térmicas, morfológicas e de massa molar. Para o estudo *in vivo* o sistema placa e parafuso foi empregado em fraturas na tíbia de coelhos, sendo avaliado a parte histológica nos seguintes períodos: 2, 8 e 12 semanas.

Capítulo 2

Revisão da Literatura

2.1 Polímeros Bioreabsorvíveis

Polímeros bioreabsorvíveis podem ser definidos como materiais ou dispositivos que, uma vez implantados no corpo, apresentam a característica de degradarem com o passar do tempo, em produtos atóxicos que são, por sua vez, eliminados do organismo via rotas naturais e, idealmente, não deixam traços de sua presença após terem sua absorção completa (Ciccone *et al.*, 2001).

A utilização de polímeros sintéticos bioreabsorvíveis vem crescendo a cada ano na área médica, em especial no campo da ortopedia. Nessa linha de aplicação destacam-se os dispositivos na forma de pinos, parafusos e placas. O crescimento da utilização desse tipo de material justifica-se em função das inúmeras vantagens que apresentam frente aos tradicionais implantes metálicos, além da grande sofisticação associada aos implantes bioreabsorvíveis atuais (Rokkanen *et al.*, 2000; Toro *et al.*, 2005 e Vaccaro *et al.*, 2002). As aplicações clínicas se estendem também para o campo das suturas cirúrgicas, além dos dispositivos para liberação controlada de fármacos.

A principal atração pelos dispositivos bioreabsorvíveis, especialmente aos cirurgiões, é a forma de degradação desses materiais, que ocorre de maneira gradual, possibilitando que o osso em recuperação receba carga do implante de forma segura em sintonia com a perda de propriedade mecânica que o processo de degradação acarreta no dispositivo. Dessa forma, aquela

idéia, que talvez fosse a base da popularidade dos implantes metálicos, de que quanto mais forte o implante melhor e mais seguro, esbarra nesse conceito mais recente, já que um material que se mostra muito mais forte que o osso, como é o caso do metálico, pode acarretar nesse atrofia, num efeito chamado *stress shielding*, que é o enfraquecimento do osso em recuperação em decorrência da elevada rigidez inerente ao dispositivo metálico (Middleton *et al.*, 2000 e Ashammakhi *et al.*, 2001).

Na verdade, a melhor situação é daquele material que apresenta propriedades mecânicas compatíveis à recuperação óssea, sem, contudo eliminar desse osso toda a carga a que ele estaria exposto durante seu processo de recuperação. Após o osso ter seu processo de recuperação completo, geralmente há necessidade da remoção do implante metálico por uma dessas complicações dos procedimentos citadas anteriormente. Além disso, nos dispositivos bioreabsorvíveis não existe a necessidade de uma segunda intervenção cirúrgica para sua remoção, como ocorre com frequência quando se trata de dispositivos metálicos, reduzindo, portanto o tempo total de tratamento do paciente, além dos custos e riscos associados a uma nova operação.

Em pesquisa recente feita por Mittal *et al.* (2005) foi verificado que 91% dos pacientes questionados disseram que o maior problema dos implantes metálicos se concentrava na operação de remoção do dispositivo. Além disso, os implantes metálicos geralmente apresentam, associado ao seu uso, os seguintes aspectos:

- Acúmulo de metais no tecido devido à corrosão (Jorgenson *et al.*, 1997, Katou *et al.*, 1996 e Agins *et al.*, 1998).
- Hipersensibilidade ao titânio (Hunt *et al.*, 1994 e Katou *et al.* 1996).
- Restrição ao crescimento ósseo (Lowery, 1998).
- Interferência em imagens (tomografias computadorizadas) e radiografias (Castillo *et al.*, 1988, Jorgenson *et al.*, 1999) o que gera uma avaliação da fixação óssea menos efetiva (Peltoniemi *et al.*, 2002).

Nesse contexto, torna-se de fácil entendimento o grande interesse que os polímeros bioreabsorvíveis têm despertado na classe médica. Todavia, o emprego dos dispositivos bioreabsorvíveis em medicina requer um cuidado todo especial, sendo que o material a ser usado como biomaterial deve cumprir todos os requisitos relacionados a biocompatibilidade, como por exemplo, isenção de toxicidade, propriedades mecânicas e tempo de degradação compatíveis com a função que desempenham. De maneira geral, são necessárias as seguintes propriedades físicas para implantes bioreabsorvíveis serem considerados adequados: alta resistência inicial, de forma que o procedimento cirúrgico a que esses dispositivos serão submetidos, durante a fixação de fratura, não afete a estabilidade dimensional destes, módulo de elasticidade inicial apropriado, e lenta queda da resistência e do módulo quando *in vivo* (Tormala *et al.*, 1998).

Dessa forma, as tarefas no desenvolvimento de biomateriais no campo das próteses estão ligadas tanto à sua criação como ao seu aperfeiçoamento de forma que o dispositivo implantável, enquanto restaura a função comprometida, deve também garantir que não exerça, a longo ou em médio prazo, qualquer distúrbio ao corpo do paciente. Portanto, a escolha do material é crítica. Obter a biocompatibilidade representa uma tarefa interdisciplinar, reunindo: médicos, engenheiros, biólogos, entre outros (Schaldach, 2000).

Nesse contexto, são poucos os polímeros e copolímeros que atendem a essas exigências, estando a família dos poli(α -hidróxido ácidos) entre esses raros materiais (Mano *et al.*, 2004).

2.2 Poli (α - hidróxi-ácidos)

Inúmeros trabalhos científicos (Shalaby, 1988; Holland & Tighe, 1992; Hayashi, 1994; Kohn & Langer, 1997; Ashammakhi & Rokkanen, 1997) destacam a importância da família dos poli(α -hidróxi ácidos) entre os polímeros bioreabsorvíveis, pela sua consolidada biocompatibilidade. Essa classe de polímeros tem como principais representantes o poli (ácido láctico), PLA; poli (ácido glicólico), PGA e seus copolímeros; poli (p-diáxonona); poli (caprolactona), e copolímeros de trimetileno carbonato e glicolide. A característica marcante desses polímeros reside no seu modo de degradação, que ocorre por meio de um simples processo de hidrólise das ligações ésteres presentes nas cadeias desses materiais, resultando em produtos totalmente atóxicos que são reabsorvidos pelo organismo fazendo parte do metabolismo de carboidratos, tendo sua eliminação finalizada na forma de CO_2 e H_2O ou mesmo via urina (Beiser 1990 e Huang, *et al.*, 2004)

A Figura 2.1 representa a forma de degradação do PLA:

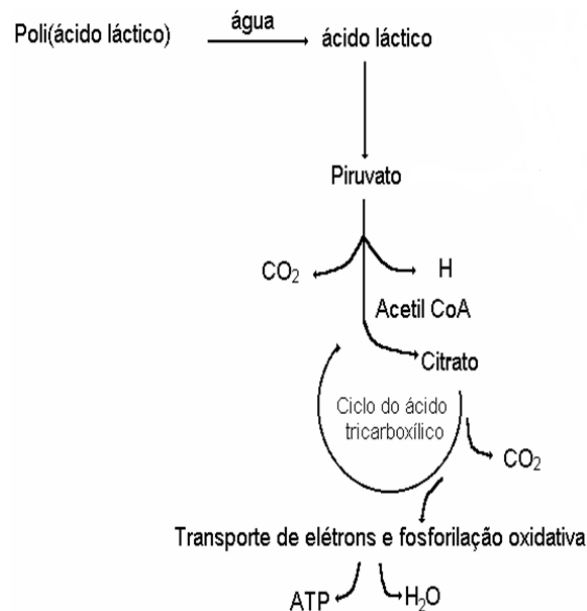


Figura-2.1: Esquema simplificado da degradação do poli (ácido láctico) (Böstman; 1991).

Historicamente a mais conhecida das aplicações dos materiais bioreabsorvíveis se encontra no segmento de suturas, sendo usado ainda no fim da década de 1960. Esse tipo de sutura teve sua utilização aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) há aproximadamente 40 anos. As suturas a seguir são exemplos do tipo bioreabsorvíveis, que estão disponíveis no mercado:

- Sutura Dexon – Poli(ácido glicólico) (PGA)
- Sutura Vicryl - Copolímero poli(ácido glicólico-co-ácido láctico) 90:10
- Sutura PDS - Polidioxanona (PDS)
- Sutura Maxon – Poli (ácido glicólico)/trimetileno carbonato (TMC)

Nas últimas duas décadas o uso dos materiais bioreabsorvíveis se expandiu para a área de fixadores internos, tendo agora mais de 20 anos de história clínica de sucesso dessa utilização na forma de pinos, parafusos e placas. Além disso, são empregados também na forma de membranas, suportes para cultura de células e dispositivos de liberação controlada de fármacos (Barber, 2000 e Pietrzak, 2000).

Dentre os poucos polímeros que podem ser usados no campo da ortopedia, o maior destaque é para o poli (ácido láctico) e seus copolímeros com poli (ácido glicólico). A seguir, apresenta-se breve descrição sobre os monômeros que podem ser usados na obtenção do copolímero do poli (L-co-DL ácido láctico), foco deste estudo.

2.3 Ácido láctico e seu diéster cíclico

O ácido láctico, ou ácido 2-hidroxiopropanóico é o mais simples dos ácidos hidrocarboxílicos, podendo ser produzido a partir do processo de fermentação, seja por meio do açúcar do leite (lactose) com o *Bacillus lactis ácidus*, ou a partir do amido, do açúcar da uva (glicose) ou açúcar da cana (sacarose) utilizando o *Bacillus Delbrücki* (Galactic, 2003).

O ácido láctico produzido pela fermentação é opticamente ativo, e dependendo da enzima envolvida no processo pode ser obtido o L (+) ácido láctico ou o D (–) ácido láctico (Chahal, 1997).

A Figura-2.2 representa as estruturas do ácido láctico:

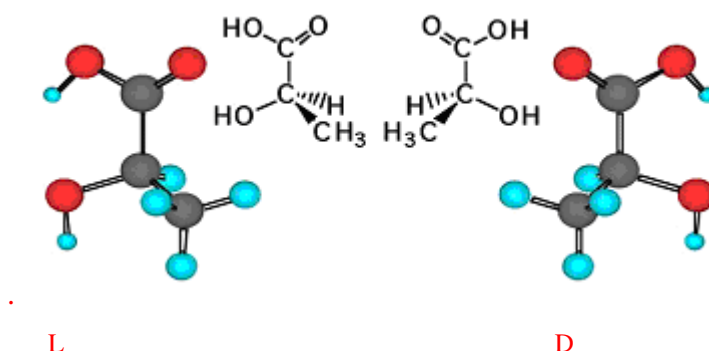


Figura 2.2: Estruturas espaciais dos estereoisômeros do ácido láctico.

A descoberta do ácido láctico em termos químicos foi feita em 1780, por Carl Scheele, o que torna esse composto uma das mais antigas substâncias orgânicas conhecidas. A utilização do ácido láctico é ampla e envolve muitos segmentos, sendo empregado como aditivos alimentares, solventes em cosméticos e também na área médica (Young & Jin, 2006).

Apesar das rotas bioquímicas serem as preferidas na obtenção do ácido láctico, existem também rotas químicas que geram o produto, como por meio da hidrólise da lactonitrila. Mas, de cada 100.000 toneladas de ácido láctico produzido no mundo, 90% são por meio de rotas bioquímicas e somente 10% de rotas químicas.

Já o diéster cíclico do ácido láctico (3,6 dimetil 1,4 dioxana 2,5 diona), que em inglês é chamado de *lactide*, é formado a partir do processo de condensação do ácido, da seguinte forma: inicialmente uma solução de ácido láctico é aquecida a altas temperaturas gerando oligômeros de ácido láctico e água. A água é então eliminada e os oligômeros de ácido láctico são submetidos a condições de pressão reduzida e elevação de temperatura, na presença de um catalisador apropriado, gerando assim o respectivo monômero cíclico. Na Figura 2.3 tem-se a representação

da reação de obtenção do diéster cíclico do ácido láctico a partir da policondensação do ácido e na Figura 2.4 as quatro formas estereoquímicas existentes do diéster cíclico:

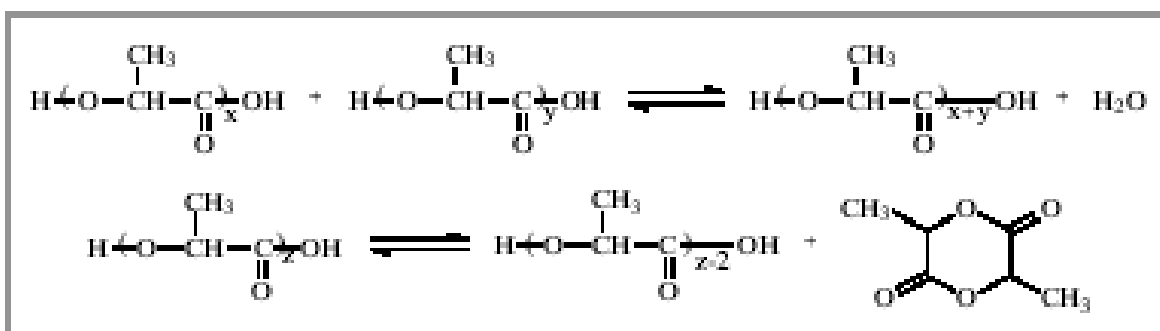


Figura-2.3: Ilustração das etapas da reação de policondensação do ácido láctico em duas etapas, sendo inicialmente gerado poli (ácido láctico) e água e posteriormente poli (ácido láctico) e o diéster cíclico.

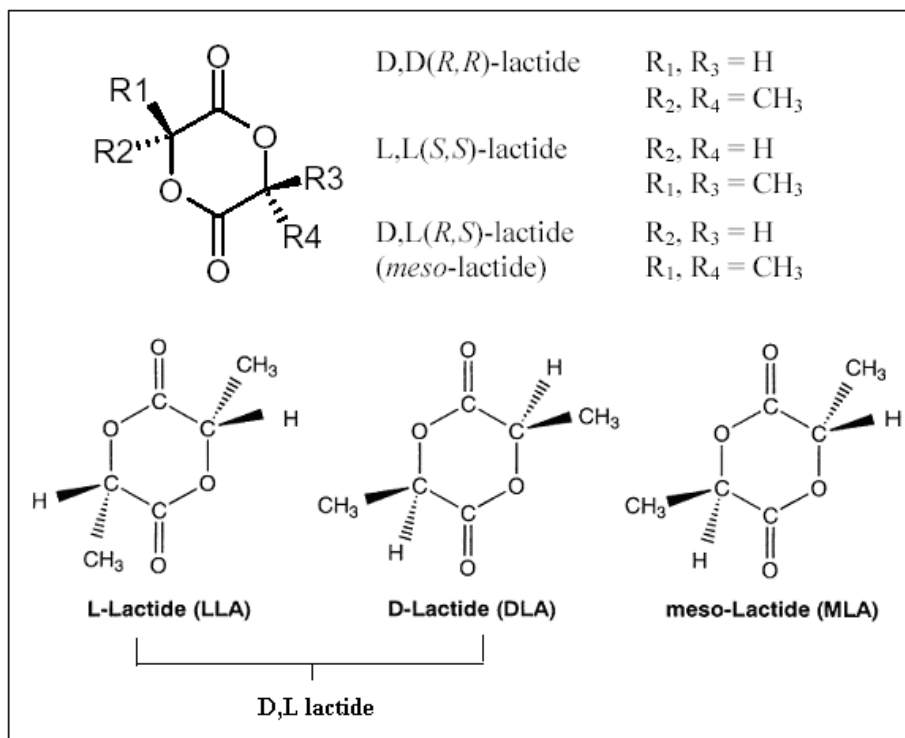


Figura-2.4: Estrutura química do diéster cíclico do ácido láctico e seus possíveis estereoisômeros (Tsuji, 2002).

As quatro formas possíveis de encontrar o diéster cíclico do ácido láctico: L lactide, D lactide, o meso lactide, que é opticamente inativo e contém uma unidade L e uma unidade D no

anel, e a mistura racêmica D, L-*lactide*, são possíveis em decorrência de cada molécula de *lactide* apresentar dois carbonos quirais (Vert *et al.*, 1981). A partir do monômero *lactide*, purificado nas suas diversas formas, (L-*lactide*, D-*lactide*, a mistura dos isômeros na relação 50:50 DL-*lactide* ou *meso-lactide*), é possível obter o polímero correspondente de alta massa molar, por meio da polimerização por abertura de anel do *lactide* na presença de um catalisador, como será visto adiante.

2.4 Histórico do Poli (ácido láctico)

O poli (ácido láctico), PLA, também conhecido como poli (lactide), dependendo do monômero de partida empregado na síntese, tem sido estudado com muito interesse nas últimas décadas. A primeira síntese do PLA foi realizada em 1932 por Carothers (Holten, 1971), quando o pesquisador obteve o material com baixa massa molar e, portanto, com propriedades mecânicas deficientes. Posteriormente a companhia DuPont conseguiu obter o polímero com alta massa molar, patenteando-o em 1954 (Lowe, 1954).

As atividades de pesquisas com o PLA foram interrompidas por alguns anos, a partir de 1954, em decorrência da suscetibilidade do polímero a degradação hidrolítica. A atenção foi voltada novamente ao material somente em 1972, quando a Ethicon introduziu no mercado suturas bioreabsorvíveis, explorando justamente a interessante característica do material, que é a sua degradabilidade em contato com água (Lunt, 1998).

São dois os caminhos pelos quais o PLA pode ser obtido: o primeiro envolve a policondensação do ácido láctico e o segundo envolve a polimerização por abertura do dímero cíclico do ácido láctico (*lactide*), na presença de um catalisador apropriado (Proikakis *et al.*, 2002).

2.4. 1 Polimerização por Policondensação do ácido lático

A existência de ambos os grupos hidroxil e carboxil na molécula do ácido lático torna possível a sua conversão a poliéster por uma simples reação de policondensação, que é uma reação considerada de baixo custo (Södergård & Stolt 2002 ; Kricheldorf, 2001).

Entretanto, a desvantagem desse tipo de reação está no fato de não ser possível obter polímero de alta massa molar, devido à dificuldade de remoção da água formada logo no início do processo de polimerização, a qual age como um limitante para o crescimento da cadeia do polímero.

A massa molar do PLA é um fator crítico para o direcionamento do tipo de aplicação biomédica. De fato, a utilização de implantes poliméricos, por exemplo, na área da ortopedia, como fixadores de fraturas na forma de pinos e placas só é possível se o material apresentar características como dureza e alto módulo de Young, o que torna necessário que o polímero tenha alta massa molar, da ordem de algumas centenas de milhares de g/mol (Manninen, 1993).

Dessa forma, o material obtido pelo processo de policondensação do ácido lático recebe a classificação de frágil e conseqüentemente impróprio para a maioria das aplicações, em especial no campo da ortopedia (Drumright *et al.*, 2000; Lunt 1998, Bendix, 1998).

A Figura-2.5 ilustra a reação de policondensação do ácido lático.

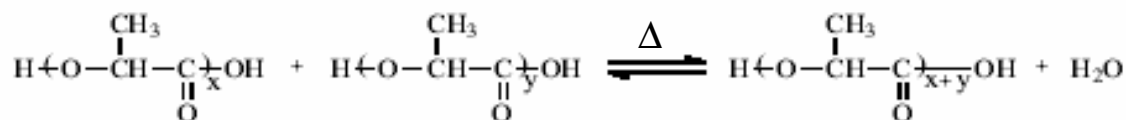


Figura-2.5: Representação da equação de policondensação do ácido lático formando PLA de baixa massa molar.

2.4.2 Polimerização por abertura do anel diéster cíclico do ácido láctico (lactide)

O caminho mais comum para se obter poli (ácido láctico) de alta massa molar é por meio da polimerização por abertura do anel do dímero cíclico do ácido láctico, lactide (Jacobsen et al. 1999, Kricheldorf et al. 1995 e Kricheldorf et al., 2000).

Durante a polimerização por abertura do anel de lactide, cada molécula de lactide é aberta formando um dímero do ácido láctico, que se ligará a outro e assim sucessivamente, proporcionando o crescimento da cadeia do polímero, como mostra a Figura 2.6 (Granger *et al.*, 1983).

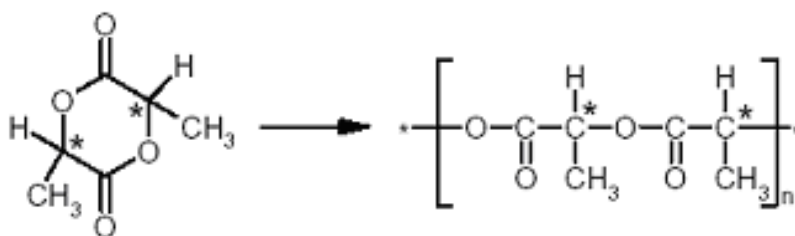


Figure-2.6: Representação da abertura do anel do dímero cíclico do ácido láctico. (Chabot *et al.*, 1983).

O polímero formado é chamado de acordo com o isomerismo correspondente a seu dímero cíclico, dessa forma, poli (D-lactide) é formado a partir do monômero D-lactide; poli (L-lactide) a partir do monômero L-lactide; poli (D,L lactide) a partir do monômero D,L lactide. As duas formas mais comuns de poli (lactide) são as seguintes: poli (L-lactide), de sigla PLLA e poli (D,L lactide) de sigla PDLLA (Zhang *et al.*, 1994).

A polimerização por meio da abertura do anel do dímero cíclico do ácido láctico pode ser executada de diversas formas: em massa (ou seja, na ausência de solvente), em solução, emulsão ou dispersão (Sosnowski *et al.*, 1996).

Um iniciador ou catalisador é necessário para dar início ao processo de polimerização e, dependendo do tipo empregado, o processo estará de acordo com um dos três mecanismos propostos na literatura: polimerização aniônica, polimerização catiônica e polimerização por meio do mecanismo de inserção. No trabalho em questão, a rota de síntese para a obtenção do copolímero PLDLA é a que parte da abertura dos dímeros cíclicos do ácido láctico em massa, sendo o mecanismo de inserção o mais compatível com essa rota empregada (Kricheldorf, 2001; Löfgren *et al.*, 1995 e Mecerreye *et al.*, 1999).

Uma grande variedade de compostos, principalmente óxidos e sais metálicos, tem sido investigadas para serem empregadas como catalisadores. Entretanto para a produção de polímeros com finalidades médicas, somente dois sais de estanho têm sido empregados: Cloreto de estanho II, e 2-etilhexanoate de estanho II, mais conhecido como Sn (Oct)₂, cuja fórmula estrutural se encontra na Figura 2.7:

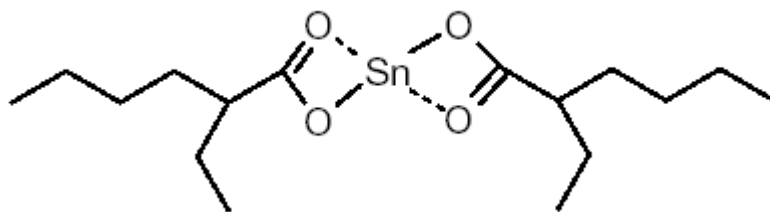


Figura-2.7: Ilustração da estrutura do Sn (Oct)₂

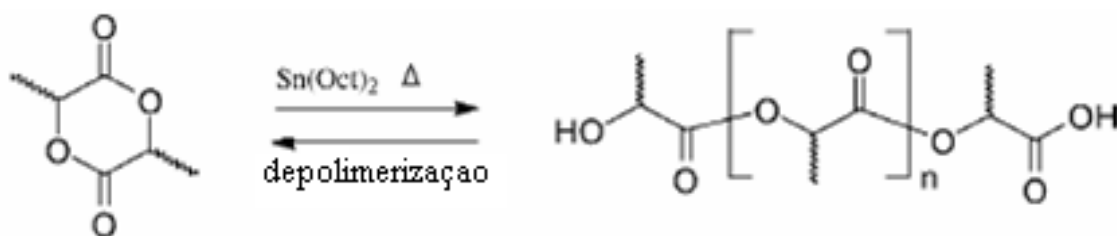
Ambos sais de estanho têm sua aprovação pelo FDA para serem usados como aditivos alimentares, mas o maior destaque vem sendo dado ao Sn(Oct)₂, devido a três fatores principais:

*Alta eficiência do catalisador, o que permite quase uma conversão completa da relação monômero/catalisador, podendo apresentar uma razão da ordem 10⁴:1 (Nijenhuis & Grijpma, 1992 e Drumright *et al.*, 2000).

*Baixo risco de racemização quando se emprega o Sn(Oct)₂, sendo possível obter poli (L-lactide) com uma pureza óptica de até 99%, quando a síntese é realizada em temperaturas de até 150°C, por poucas horas (Kricheldorf, *et al.*, 1995).

*Além destes fatores, o $\text{Sn}(\text{Oct})_2$, como já mencionado anteriormente, é empregado como aditivo alimentar em vários países, o que significa que sua toxicidade é extremamente baixa, quando comparado a outros sais de metal pesado (Kricheldorf *et al.*, 1995).

A polimerização é uma reação de equilíbrio. O esquema é dado na Figura 2.8:



Lactide

Poli(ácido láctico) de alta massa molar

Figura-2.8: Representação da reação de polimerização do poli (ácido láctico), a partir do diéster cíclico do ácido láctico (lactide).

A busca por elevados valores de massa molar está baseada no fato de que este é um dos parâmetros que tem influência direta na qualidade dos dispositivos poliméricos produzidos, no sentido de que valores maiores de massa molar produzirão dispositivos com melhores propriedades mecânicas (Gogolewski *et al.*, 2000).

E justamente pelo trabalho em questão visar à obtenção de polímero de alta massa molar, que esta foi a rota de polimerização escolhida (abertura de anéis do dímero cíclico do ácido láctico).

2.5 Propriedades dos PLA:

A seguir estão dispostas as características inerentes aos homopolímeros Poli (L-ácido láctico) e poli (D L ácido láctico) e ao copolímero poli (L-co-DL ácido láctico). É importante ressaltar que não existe diferença entre as estruturas do poli (ácido láctico) e poli (lactide), dessa forma a partir de agora a terminologia empregada para se referir ao polímero será a compatível com nosso idioma, portanto, poli (ácido láctico), apesar do monômero de partida deste trabalho se tratar do diéster cíclico do ácido láctico.

2.5.1 Poli (L-ácido láctico)-PLLA

O poli (L-ácido láctico), PLLA, é um polímero altamente cristalino que apresenta características como: ponto de fusão 174-184 °C e T_g de 57 -58°C, valores esperados quando a massa molar do polímero é maior do que 100.000 g/mol(Vert et al, 1994; Tormala 1998). Os valores tanto de temperatura de fusão como de temperatura de transição vítrea se encontram entre os mais elevados da classe dos poliésteres alifáticos (Super *et al.*, 1994).

Geralmente, um polímero que apresenta um valor de temperatura de fusão mais elevado é menos susceptível a biodegradação comparado a um polímero da mesma classe que apresenta temperatura de fusão inferior (Tokiwa & Suzuki, 1981). A estrutura isotática do PLLA torna-o bastante cristalino, tendo como uma das conseqüências uma menor taxa de absorção do implante (Bendix, 1998). Por outro lado, os polímeros semicristalinos têm maior força e dureza comparadas aos polímeros amorfos e, portanto, são geralmente preferidos em aplicações que estão sujeitas a maiores cargas (Farrar, 2005 Leiggner *et al.*, 2006).

Há décadas são reportados resultados favoráveis e promissores sobre as propriedades mecânicas do polímero, como boa resistência à tração e força de retenção (Vert et al, 1995). Apesar de inúmeros estudos atestarem também para a excelente biocompatibilidade do polímero (Nelson *et al.*, 1977, Hollinger, 1983, Cai *et al.*, 1996 Matsusue *et al.*, 1995), pesquisas recentes (Walton & Cotton, 2007) têm colocado em cheque o longo tempo de degradação requerido pelo material, já que fragmentos do PLLA podem ser encontrados em pacientes, mesmo após

transcorrido um período de 5 anos da data do implante, gerando nesse período fragmentos altamente cristalinos, que podem provocar reações.

Alguns estudos têm reportado uma conexão entre essa elevada cristalinidade e longo tempo de degradação com um aumento na incidência de reações adversas nos tecidos circunjacentes ao local do implante (Cordewener *et al.*, 1996; Bostman *et al.*, 1990, Bergsma *et al.*, 1993).

2.5.2 Poli (DL-ácido láctico)-PDLA:

O poli (D L-ácido láctico) 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 & 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, sendo degradado em média de 12 a 16 meses, tornando-o mais adequado em aplicações que envolvam liberação controlada de fármacos (Tormala *et al.*, 1998).

Nesse contexto, pode-se verificar, de maneira bastante clara, que o homopolímero poli (L-ácido láctico), apesar das boas propriedades mecânicas iniciais que apresenta, uma taxa de degradação bastante lenta, muito além daquela requerida pelo osso ou tecido lesionado para sua recuperação. Já o homopolímero poli (D, L -lactide) apresenta uma taxa de degradação mais rápida do que a do PLLA, mas propriedades mecânicas inferiores a este, o que também age como um limitador das suas aplicações no campo dos biomateriais.

Dessa forma, uma maneira de se contornar os pontos negativos que cada homopolímero apresenta é por meio da copolimerização do diéster cíclico do L-ácido láctico com o diéster cíclico do D,L ácido láctico.

Assim a combinação dos monômeros L ao D, L ácido láctico gera um copolímero, poli (L-co-DL ácido láctico), de características muito interessantes, que são inerentes a cada monômero utilizado (Amano *et al.*, 2004).

Dessa forma se verifica ainda satisfatória propriedade mecânica no copolímero, o que é uma qualidade que a presença do monômero proveniente do diéster cíclico L ácido láctico confere ao copolímero, bem como uma maior taxa de degradação, que está associada à presença do monômero correspondente ao diéster cíclico D,L (amorfo) na cadeia polimérica, o que torna maior o leque de aplicações do material (Claes *et al.*, 1996 e Leiggener *et al.*, 1998).

2.5.3 Poli (L-co-D, L ácido láctico), PLDLA.

O copolímero poli (L-co-D,L ácido láctico), sintetizado neste trabalho foi obtido com uma proporção 70:30 dos monômeros, respectivamente. A escolha dessa proporção foi baseada no vasto espectro de aplicações que esse material tem comercialmente, em aplicações como:

- Reparos ósseos na região craniomaxilofacial devido a traumas sofrido ou mesmo a presença de alguma síndrome, por meio da estabilização dos ossos da mandíbula em conjunto com a fixação maxilomandibular (Landes *et al.*, 2003);
- Fraturas na região abaixo dos olhos (Punja *et al.*, 2006);
- Cirurgias que envolvam reparos na região craniofacial em pediatria, entre outras (Cohen *et al.*, 2001);

Além disso, é importante mencionar que a alta resistência mecânica inicial do dispositivo é fundamental, já que o implante necessita resistir ao *stress* mecânico que há durante o procedimento cirúrgico, bem como suportar o carregamento externo e fisiológico durante os estágios iniciais do processo de cura, enquanto o tecido ósseo está em fase de recuperação (Tormala *et al.*, 1998). Dessa forma, a percentagem maior do monômero L-lactide na cadeia do polímero (70% em massa) visa atender esse requisito fundamental para o sucesso do dispositivo, enquanto que a percentagem do DL lactide torna a taxa de degradação maior.

A composição do copolímero rege a intensidade de cristalinidade do material. De maneira geral, a inserção de unidades DL lactide na cadeia do polímero resulta em uma diminuição drástica da cristalinidade, podendo se obter copolímeros completamente amorfos, dependendo da relação empregada dos estereoisômeros L/DL. Segundo Bendix, (1998) copolímeros de poli (L-co-DL-ácido láctico) serão amorfos se a quantidade do estereoisômero L for menor que 90 %.

O copolímero poli (L-co-DL-ácido láctico) na proporção 70:30 se mostra, portanto, completamente amorfo, apresentando como consequência dessa ausência de cristalinidade, uma biocompatibilidade maior do que a apresentada pelo PLLA, além de apresentar uma excelente processabilidade. (Bendix, 1998).

As unidades DL-ácido láctico na sequência da cadeia do copolímero impedem a cristalização da parte L-ácido láctico, ao mesmo tempo em que a força do material é mantida durante o período necessário para a recuperação do osso (Moser *et al*, 2005).

A taxa de degradação do copolímero é intermediária entre o poli (L-ácido láctico) e o poli (DL- ácido láctico), se mostrando assim muito interessante para a maior parte das aplicações (Alexander *et al.*, 2002 e Hu *et al.*, 2000)

O copolímero é degradado completamente entre 18-36 meses. As propriedades mecânicas do copolímero decaem da seguinte forma: o material consegue manter 70% de sua resistência por 9 meses e 50% após 12 meses, sendo completamente eliminado entre 24- 36 meses (Steven *et al.*, 2004).

2.6 Processamento de polímeros

O processamento do polímero determina a estrutura e o *design* do dispositivo e influência de maneira intensa na massa molar do material (Rothen *et al.*, 1999).

O efeito que os vários tipos de processamentos comumente usados, como processamento por extrusão, moldagem por injeção e moldagem por compressão causa nos polímeros, está relacionada à queda de massa molar desses materiais (Gogolewski *et al.*, 1993).

Weiler (1996) e colaboradores estimaram, com base em seus estudos, que o efeito do processamento, na família dos poli (ácido láticos), resulta em média em uma queda de 40 % do valor de massa molar anterior ao processo de moldagem para esses tipos de polímeros. Esses resultados também estão de acordo com o verificado neste trabalho, como será visto adiante.

Neste trabalho, o processo de moldagem utilizado para a obtenção dos dispositivos foi o da injeção. Esse tipo de moldagem se destaca muito por suas características como: ciclos de produção curtos, indução de excelentes superfícies dos manufaturados, além de possibilitar a moldagem das mais variadas formas de produtos. (Fung *et al.*, 2003).

A temperatura de processamento é um fator fundamental no êxito do processo de obtenção dos dispositivos, em especial pelo fato dos polímeros biodegradáveis, serem, na maior parte das vezes, sintetizados por meio de polimerização por abertura de anéis de seus monômeros.

Neste tipo de polimerização (abertura de anéis cíclicos) existe um equilíbrio termodinâmico tanto no sentido da polimerização como também no sentido da reação inversa, ou seja, da formação do monômero, sendo que o emprego de temperaturas elevadas, durante o processamento do material, poderia deslocar o equilíbrio da reação no sentido de formação do monômero (Hyon *et al.*, 1997). Esse deslocamento causaria uma queda muito acentuada de massa molar no dispositivo, o que por sua vez comprometeria as suas propriedades mecânicas.

A temperatura, entretanto, não é o único parâmetro responsável por afetar a qualidade do produto final, durante seu processamento. Além dela, podem ser citados os seguintes fatores: velocidade e tempo de injeção, pressão usada no processo, tempo de preenchimento do molde e a própria geometria do molde, entre outros (Fung *et al.*, 2003).

Além disso, uma quantidade excessiva de monômero no polímero sintetizado também pode agir como um plastificante, mudando assim as propriedades mecânicas do dispositivo, além de catalisar a hidrólise do material (Middleton *et al.*, 1998). Portanto, esses materiais devem ser processados na menor temperatura possível.

2.7 Estudo da degradação *in vitro*

A possibilidade de um material usado como uma prótese degradar no ambiente em que se encontra, após ter cumprido sua função, representa, sem dúvida uma imensa vantagem frente às próteses permanentes.

Os polímeros bioreabsorvíveis apresentam, como já mencionado anteriormente, essa possibilidade, já que em ambiente aquoso os poliésteres da família dos poli (α - hidroxí ácidos), como os poli (ácido lácticos) degradam hidroliticamente (Li *et al.*, 1990) podendo ser esta degradação homogênea (ocorrendo em toda a superfície do dispositivo polimérico) ou em *bulk* (ocorrendo no interior do dispositivo), (Hakkarainen, 2002), dependendo do tamanho do dispositivo polimérico, de sua taxa de degradação e a facilidade das moléculas de água penetrarem pelo polímero (Von Burkersroda *et al.*, 2002).

De maneira geral, o que interfere na taxa de degradação de homo e copolímeros da família dos poli (α - hidroxí ácidos), tanto em relação à degradação *in vitro* como a *in vivo*, são os seguintes fatores: estrutura química e composição do polímero, massa molar, presença de oligômeros, monômeros ou catalisador advindos do processo de síntese do material, tamanho e forma do dispositivo a ser implantado, morfologia do material (amorfo ou cristalino) e local do implante (Chu & Browning 1988, Li *et al.*, 1990a-1990b, Therin *et al.*, 1992).

O processo de hidrólise se dá pela quebra das ligações ésteres da cadeia do polímero pelas moléculas de água, formando cadeias menores com terminações ácidas, como representado na Figura 2.9:

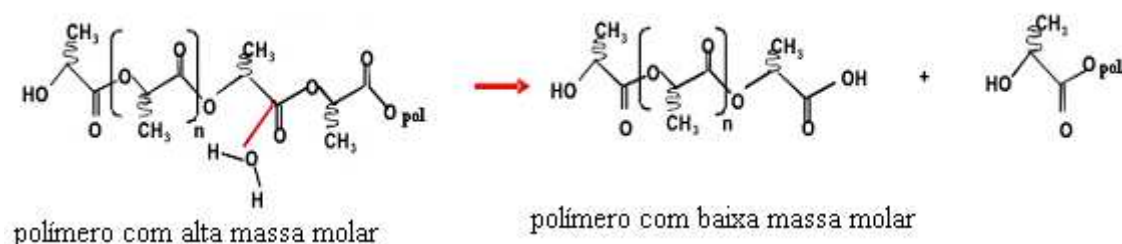


Figura-2.9: Ilustração do processo de quebra das cadeias do copolímero.

A taxa de degradação é, antes de tudo, função da entrada de água nas cadeias do polímero. Consequentemente diferenças na acessibilidade das moléculas de água nas ligações ésteres dessas cadeias, justificam a ocorrência de diferentes taxas de degradação nos polímeros como, por exemplo, PLA e seus copolímeros, PGA, PLGA (Griffith, 2000). Os fatores capazes de influenciar a taxa de degradação de um polímero são: 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 taxa de degradação é no sentido de 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 PLA as terminações ácidas dos 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 do tipo reação-difusão (Grizzi, 1995).

Nesse tipo de mecanismo, inicialmente a água penetra a cadeia do polímero quebrando as ligações ésteres e formando os oligômeros. A seguir, os oligômeros próximos à superfície podem difundir através dela e serem solubilizados no meio, enquanto que aqueles oligômeros localizados mais no centro do dispositivo polimérico, são mantidos ali causando acidez no local e autocatalisando a hidrólise éster. O estudo de Li *et al* (1990b) vem consolidar esse tipo de mecanismo, já que por meio dele foi verificado que dispositivos maiores de PLA ou PLGA têm

uma degradação mais acentuada em seu interior em relação à superfície, gerando, portanto, uma degradação heterogênea.

O grau de cristalinidade e a temperatura de transição vítrea de um material também influenciam na entrada de água nas cadeias do polímero, conseqüentemente na sua taxa de degradação. Para a degradação hidrolítica de poliésteres semicristalinos verificam-se dois estágios (Chu, 1981), sendo que no primeiro deles a água penetra as regiões amorfas do material, já que essas são as áreas com maior mobilidade das cadeias poliméricas, portanto, mais propensas à entrada de água, comparada as regiões cristalinas. Quando estão acima da T_g do material essas regiões amorfas têm sua taxa de degradação aumentada, e quando a maior parte das regiões amorfas tiverem sido degradadas, inicia-se a degradação das regiões cristalinas, que vem a ser o segundo estágio do processo.

Dessa forma, entende-se o porquê da mais lenta taxa de degradação do semicristalino poli (L-ácido láctico), comparado ao polímero amorfo poli (DL-ácido láctico). No caso dos copolímeros, quanto maior a fração do amorfo (DL ácido láctico) no poli (L-ácido láctico) maior será a taxa de degradação do material, o que nos permite ter um controle dessa taxa, por meio de uma simples relação fracionária entre esses monômeros.

A massa molar do implante é o primeiro parâmetro a ser afetado com o início do processo de degradação o que acarreta, conseqüentemente, em uma diminuição das propriedades mecânicas do dispositivo (Peitzak *et al.*, 1997). Em um segundo estágio do processo de degradação, além da queda na massa molar do polímero e propriedades mecânicas, verifica-se também o início da perda de massa do material, o que ocorre a partir do momento em que a degradação interna avança a tal ponto que os oligômeros atravessam a superfície do polímero e são dissolvidos no meio em que se encontram (Li *et al.*, 1990) Nesse estágio, a massa molar dos polímeros são menores que 15000 g/mol.

Por último, esses oligômeros são transformados em monômeros de ácido láctico, que são metabolizados pelo organismo convertendo-se a CO_2 e H_2O , que são expelidos pelo corpo via

respiração ou mesmo via urina (Böstman & Pihlajamäki 2000, Middleton & Tipton 2000) Dessa forma, o processo de absorção do material pelo organismo foi completado.

A Figura 2.10 é uma ilustração do processo de degradação via hidrólise, de um dispositivo bioreabsorvível de poli(L-co DL ácido lático).



Figura 2.10: Ilustração do processo de biodegradação.

A Figura-2.11 relaciona os processos que ocorrem simultaneamente: perda de propriedade mecânica do material e transferência de carga para o osso.

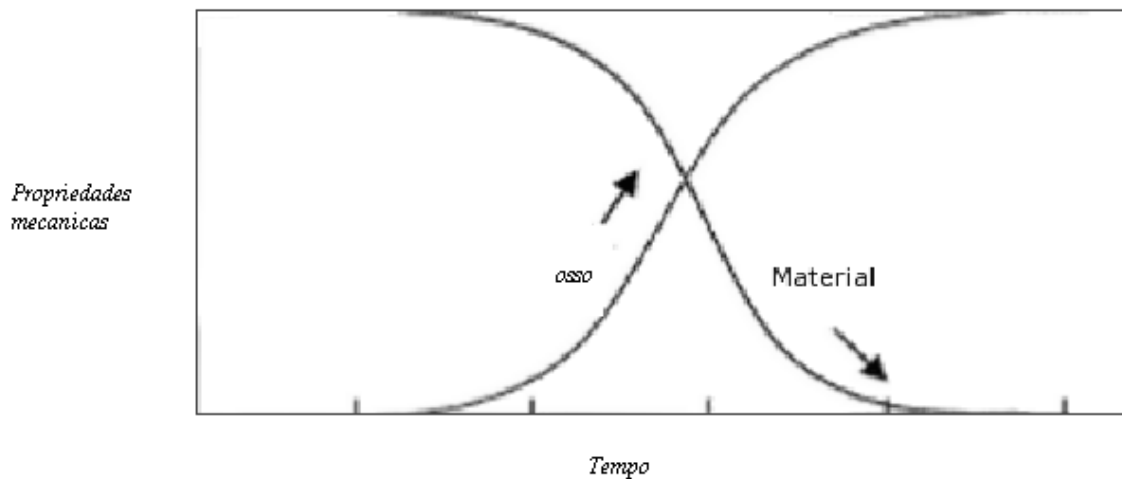


Figura 2.11: Ilustração do comportamento típico do material bioreabsorvível -diminuição de propriedade mecânica e transferência de carga para o osso em recuperação.

Existe, portanto, uma transferência gradual de carga do implante para o osso lesionado enquanto ocorre a degradação do material, sendo que a perda de suas propriedades mecânicas,

coincide com a taxa de recuperação do osso. Dessa forma, ocorre um fortalecimento do local em que o implante se encontrava, o que é mais um diferencial se comparado aos implantes metálicos.

Um estudo realizado com PLLA contendo ^{13}C demonstrou que baixíssima radioatividade é encontrada na urina ou nas fezes, durante a degradação do implante, indicando assim que a maior parte dos produtos de degradação é liberado por meio da respiração (Pathiraja, 2003).

Se a taxa de produtos da degradação do implante produzir mais fragmentos do que o tecido for capaz de tolerar, podem ser verificadas reações adversas nos tecidos, sendo que implantes localizados em regiões de baixa vascularização ou baixa atividade metabólica são mais propensos a ocasionar esse tipo de reações.

Na maior parte dos casos, os sintomas de reações nos tecidos passam despercebidos, mas em alguns pacientes surge manifestação clinicamente inflamatória de reações a corpo estranho. As manifestações clínicas ocorrem em vários níveis, sendo que o acúmulo de fluidos na região do implante é um dos fatores prejudiciais ao tecido. Em adultos essas reações parecem ser independentes da idade do paciente. Em muitos estudos clínicos são relatados que a incidência de reações inflamatórias é pequena e insuficiente para causar efeitos em longo prazo (Ambrose & Clanton 2004).

Essas reações se vierem a ocorrer com os materiais bioreabsorvíveis, tipicamente se manifestarão em estágios avançados da data do implante (6 a 12 meses pós-operatório).

É importante que não se confunda reações nos tecidos com a resposta fisiológica normal dada pelo organismo a qualquer material implantado ou cirurgia. Todas formas de implante envolvem algum grau de dano ao tecido, que induz a uma cicatrização. Isto consiste de dois componentes essenciais: inflamação e processo de recuperação. No caso do implante sua natureza estranha ao organismo tende a induzir uma inflamação crônica caracterizada por reações com granulomas. Já uma infecção aguda pode ser notada se surgirem infecção por bactéria (Kirkpatrick *et al.* 2002).

A taxa de infecção por bactéria, logo após o implante ter sido feito, não é intrínseca ao material implantado, e parece ser a mesma tanto para os metais como para os materiais bioreabsorvíveis, o que diferencia esses materiais, quanto ao parâmetro de reações adversas, é a médio e longo prazo (Sinisaari, 2004).

No caso específico dos implantes bioreabsorvíveis provenientes da família dos poli (α -hidroxi ácidos), os estudos demonstram que a maior parte das reações adversas (inflamatórias) ocorrem quando o material degrada muito rapidamente, como é o caso dos implantes constituídos a partir do poli (ácido glicólico), ou PGA. Para esse material, vários estudos clínicos demonstram a incidência de tais reações, sendo que a porcentagem varia de 2-46,7 % (Böstman & Pihlajamäki 2000). O responsável por isso é a natureza altamente hidrofílica do PGA, que promove uma degradação mais acentuada do que os implantes com natureza mais hidrofóbica, como é o caso do PLLA.

Dessa forma, o acúmulo de produtos de degradação do PGA é elevado no tecido que circunda o implante, levando ao aparecimento de um número maior de reações adversas, já que a taxa de produção desses fragmentos excede a capacidade do tecido de processá-los (Bostman & Pihajamaki 2000). Por outro lado, materiais muito hidrofóbicos, como o PLLA, levam muito tempo para degradarem, o que resulta em danos também para o tecido, já que ocorre a formação de fragmentos com cristalinidade muito elevada no decorrer desse longo processo de degradação.

Assim, a copolimerização, ou mesmo a obtenção de blendas é um recurso a mais para minimizar tais situações. O material em estudo, poli (L-co-DL ácido láctico), se mostra menos hidrofílico que o PGA e menos hidrofóbico que o PLLA, o que torna seu tempo de degradação, e, portanto, suas reações teciduais menos intensas do que os homopolímeros discutidos anteriormente. Além disso, existe o sinergismo do monômero cíclico do L ácido láctico (L lactide) com o monômero cíclico do DL ácido láctico (DL lactide) já que:

L Lactide:

- * fornece força ao implante;
- * Hidrofóbico-degrada lentamente

DL lactide:

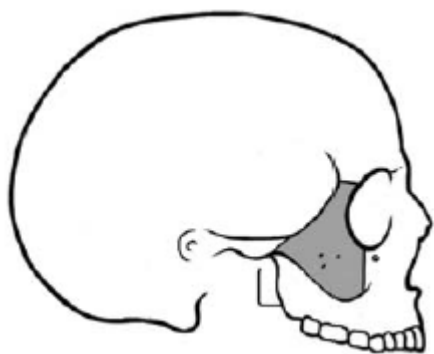
- * ausência de cristalinidade;
- * fornece maior flexibilidade ao material

2.8 Informações sobre fraturas no osso e reparos com dispositivos bioreabsorvíveis.

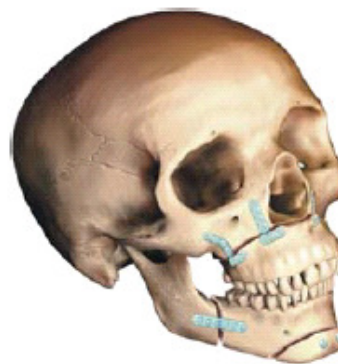
Os defeitos ósseos podem ocorrer devido a uma anormalidade congênita, trauma ou doença (Seal *et al.*, 2001). O tecido ósseo é continuamente repostado e remodelado de acordo com a tensão aplicada pelos osteoblastos e osteoclastos, sendo capaz de se auto-reparar após ferimentos.

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 local fraturado precisa ser mantido na posição correta enquanto o osso se recupera e para isso são utilizados dispositivos na forma de placas e parafusos feitos de material metálico ou polímeros bioreabsorvíveis, como por exemplo, PLDLA o material deste trabalho.

Dentre as fraturas na região craniana, as que mais ocorrem são as fraturas nasais, as fraturas na região abaixo dos olhos e as fraturas de maxilar. A Figura 2.12 ilustra alguns exemplos de fraturas que podem ser corrigidas por meio de dispositivos bioreabsorvíveis, entre esses o PLDLA.



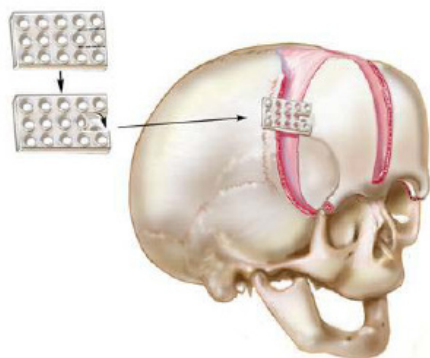
(a)



(b)

Fratura da maxila e mandíbula

Fratura na região do osso zigomático



(c)

Reparos na região cranial

Figura 2.12: Exemplos de alguns tipos de fratura que podem ocorrer na região cranial: **(a)** Fratura na região do osso zigomático, **(b)** Fratura da maxila e mandíbula e **(c)** Reparos na região cranial.

A utilização dessas miniplacas e parafusos, como os empregado na Figura 2.12, ocorre de maneira rotineira em vários centros de tratamento envolvendo a região craniofacial, e esse uso tem se tornado preferido às miniplacas metálicas, especialmente no caso dos pacientes serem

crianças, já que para esse tipo de paciente o crânio ainda está em fase de crescimento, e o dispositivo metálico pode interferir nesse processo.

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.

Serão listados a seguir alguns tipos de dispositivos comerciais disponíveis no mercado internacional (denominação MacroPore Biosurgery), bem como suas aplicações:

MacroPore Fixation (FXTM) System: É usado tanto em aplicações na pediatria, como em adultos, sendo principalmente indicado para traumas, procedimentos de reconstrução e intervenções cirúrgicas na região craniomaxilofacial e em aplicações neurocirúrgicas.

Na Figura 2.13 estão dispostos os dispositivos usados na região neuro cranial:

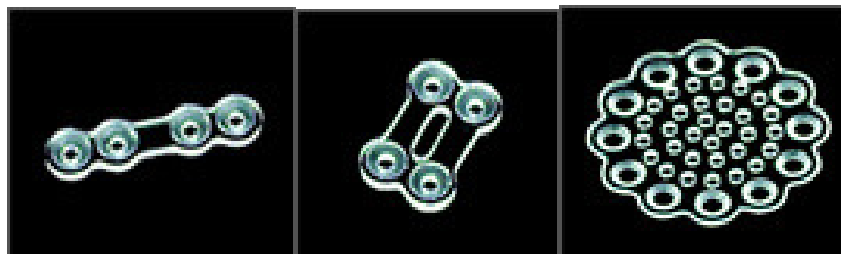


Figura 2.13: Tipos de placas em vários formatos usadas na região cranial.

MacroPore Protective Sheets: Consistem de folhas protetoras para a região cranial, sendo que podem ser confeccionadas numa grande variedade de tamanhos e diferentes configurações. A Figura 2.14 ilustra esse modelo de proteção.

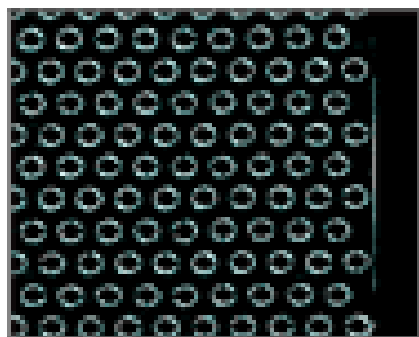


Figura 2.14: Ilustração de um tipo possível de dispositivo de proteção.

No caso de cirurgias em que os implantes necessitam ser moldados à face do paciente, durante o procedimento cirúrgico, a utilização do copolímero PLDLA apresenta a vantagem de poder, com um simples aquecimento num banho termostaticado (por volta de 58°C) se tornar maleável por alguns segundos, permitindo um ajuste mais preciso desse implante ao crânio. A Figura 2.15 mostra esse procedimento sendo realizado.

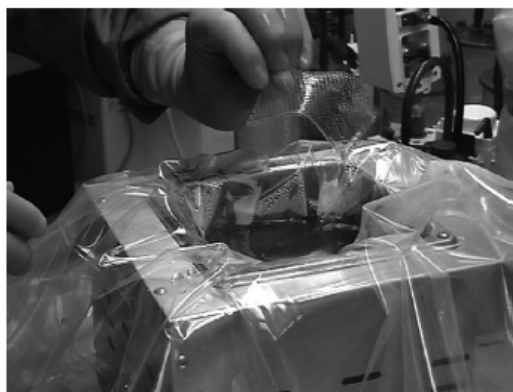


Figura 2.15: Ilustração da inserção do dispositivo PLDLA em água quente tornando-o temporariamente maleável para contornar de maneira mais eficaz o modelo do crânio (Punja *et al.*, 2006).

MacroPore Mandibular Fracture Fixation (MXTM) Dispositivo bioreabsorvível usado na fixação de fratura mandibular. A sua utilização é em conjunto com placas e parafusos, os quais são fixados por meio de um método duplo de chapeamento através das linhas de fratura, na qual uma placa é fixada ao longo da camada superior e a outra ao longo da inferior. A Figura 2.16 ilustra esses dispositivos:

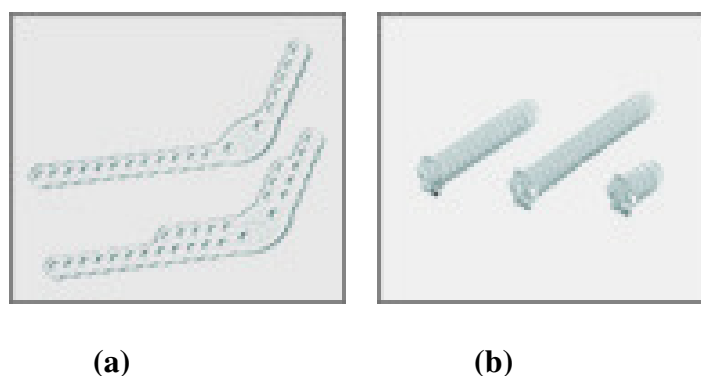


Figura 2.16: Ilustração dos dispositivos usados na fixação de fratura mandibular.

MacroPore Distraction Fixation (DXTM) System: Dispositivo empregado para alongar gradualmente, milímetro por milímetros a face de pacientes que sofrem de problemas como Síndrome craniosinótese, microsomia hemifacial, entre outras doenças. A Figura 2.17 mostra o local onde o dispositivo é alojado na face do paciente.

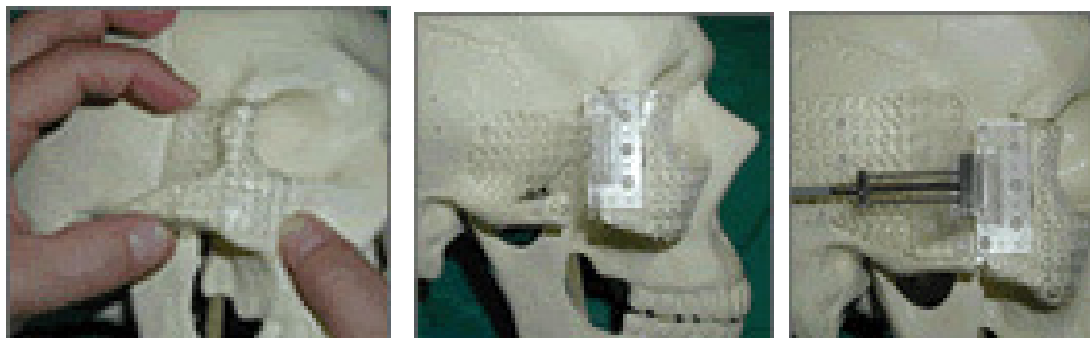


Figura 2.17: Ilustração do local de implantação do dispositivo bioreabsorvível.

A gama de possibilidades de obtenção de dispositivos das mais variadas geometrias de PLDLA é, como pôde ser verificado anteriormente, muito grande, devido a excelente processabilidade que este material apresenta. Por meio destes poucos exemplos mostrados, pode-se avaliar a importância deste tipo de material na recuperação do osso e as vantagens de sua utilização frente aos dispositivos metálicos.

As evidências da vantagem de utilização destes dispositivos são nítidas, no entanto, o que inviabiliza a utilização desses produtos por um número maior de pessoas, é exclusivamente o fato da não disponibilidade desses polímeros no mercado brasileiro, tornando seu uso restrito à população de média e alta renda, mostrando a necessidade imediata de desenvolvimento de novas sínteses no Brasil a fim de atender a necessidade da população menos favorecida.

Capítulo 3

Materiais e Métodos

O presente capítulo apresenta a metodologia de polimerização e caracterização do copolímero poli (L-co-D, L ácido láctico), (PLDLA) na relação 70:30, a obtenção de seus dispositivos na forma de placas e parafusos, pelo processo de injeção e por último o acompanhamento da degradabilidade desses dispositivos através do estudo *in vitro* simulando as condições corpóreas. Paralelamente foram desenvolvidos estudos *in vivo* das placas e parafusos para verificar a biocompatibilidade e resistência mecânica dos dispositivos.

3.1 Síntese de PLDLA

Copolímeros de L-ácido láctico e D,L ácido láctico (PLDLA), foram preparados através da reação de polimerização em massa, por abertura de seus diésteres cíclicos: (L-lactide e D,L lactide), na proporção de 70: 30, respectivamente. O catalisador utilizado em todas as sínteses foi Sn (Oct)₂, e a relação molar monômero/catalisador se manteve na faixa de 5000-7000, como pode ser verificado na Tabela-4.1. As massas dos monômeros e do catalisador foram adicionadas à uma ampola de vidro, a qual foi selada sob vácuo e imersa em um banho de óleo à 130°C por 72 horas.

Decorrido esse tempo o copolímero foi dissolvido em clorofórmio, CHCl₃ (Merck) e precipitado em metanol, CH₃OH (Merck). O material obtido foi seco inicialmente num

dessecador e em seguida numa estufa a vácuo, por 8 horas numa temperatura de 45 °C. Foram realizadas um total de 17 sínteses no decorrer deste trabalho. A Figura 3.1 ilustra o esquema empregado na síntese:

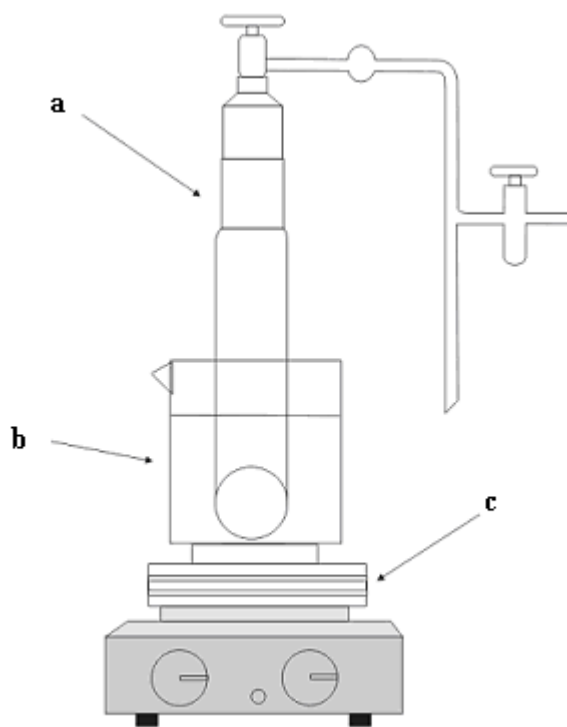


Figura 3.1: Ilustração da aparelhagem usada na síntese, onde (a) se refere à ampola de vidro, (b) ao béquer contendo o óleo mineral a 130 °C e (c) ao aquecedor e agitador.

3.2 Caracterização do copolímero:

3.2.1 Cromatografia de Permeação em gel (GPC):

As massas molares numérica média (M_n), em mássica (M_w) e o índice de polidispersão (IP) foram obtidos em um cromatógrafo de permeação em gel (GPC) da marca CLWA-1, a temperatura de 25°C, utilizando-se (tetraidrofurano), (THF), como fase móvel, numa concentração de 10mg/mL. As colunas utilizadas foram as de poliestireno de 10^2 , 10^4 e 10^5 nm e detector de índice de refração Waters 410.

3.2.2 Ressonância magnética (RMN de H^1 e C^{13}):

Os espectros de RMN foram obtidos em um espectrofotômetro da marca GEMINI 300BB operando a 75 MHz para RMN ^{13}C e 300 MHz para RMN 1H . Foram utilizados tubos de vidro 5mm de diâmetro e clorofórmio deuterado como solvente, a temperatura ambiente, numa concentração de 10 % em massa tanto para o RMN de próton quanto para o de carbono treze.

3.2.3 Análise de infravermelho (FTIR):

Os espectros de infravermelho foram obtidos na região de 4000 a 650 cm^{-1} , em amostras na forma de filmes sobre NaCl, em um espectrofotômetro BOMEN MB-Séries.

3.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC):

Aproximadamente 10 mg do copolímero foram aquecidas de 25 a 200°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, mantidas a 200 °C por 5min, resfriadas até -50°C a 30 °C/min, mantidas a -50 °C por 5 min e a seguir aquecidas novamente até 200 °C a 10°C/min, sob purga de N_2 . Essas etapas foram seguidas para todas as amostras em um equipamento TA modelo MSDC2910.

3.2.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas foram obtidas com equipamento *TA Instruments*. Amostras pesando aproximadamente 10 mg submetidas ao aquecimento na faixa de 25-400°C, a 10°C/min sob atmosfera de hélio (He). Por meio dessa técnica foi possível avaliar a estabilidade térmica dos copolímeros sintetizados.

3.3 Processamento dos dispositivos na forma de placas e parafusos

O copolímero sintetizado, depois de seco a 60 °C foi moldado numa injetora Boy, modelo 22A. A partir dos dados obtidos na caracterização térmica foram estipuladas condições para o processamento do polímero na forma de placas contendo furos de 1 mm de diâmetro para introdução dos parafusos. As temperaturas utilizadas no processo de injeção foram as seguintes: 145°C na Zona dianteira; 150°C na zona central-I; 155°C na zona central-II; e 170°C no bico de injeção, a pressão de injeção foi de 35 Bar.

3.3.1 Cromatografia de Permeação em gel (GPC) para escolha do dispositivo do estudo in vitro.

As massas molares numérica média (M_n), e em mássica (M_w) e o índice de polidispersão (IP) foram obtidos em um cromatógrafo de permeação em gel (GPC) CLWA-1, a temperatura de 25°C, utilizando-se tetraidrofurano (THF) como fase móvel, numa concentração de 10mg/mL. As colunas utilizadas foram as de poliestireno de 10^2 , 10^4 e 10^5 nm e detector de índice de refração Waters 410.

3.3.2 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Amostras da superfície de fratura das placas, fraturadas em N₂ líquido, foram coladas em um suporte metálico e recobertos com ouro, utilizando-se um metalizador de amostras SPUTER COATER BALTEC SCD 050 com corrente de 40mA por 200s. Em seguida, a placa foi analisada morfológicamente ao Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JXA 840A, utilizando tensão de 10 a 20 kv.

3.3.3 Ensaio de flexão:

A placa foi submetido a ensaios de flexão pelo método de três pontas, segundo a norma

ASTM D 790-95a, em uma MTS TestStar II, utilizando uma célula de carga de 100 kgf (com fundo de escala de 20kgf), a uma velocidade de 1,2 mm/min. A distância entre as duas extremidades era de aproximadamente 20 mm. A tensão e o módulo de elasticidade foram determinados por meio das Equações 1 e 2, respectivamente (ASTM, 2003) para as amostras na forma de placas:

$$\sigma = \frac{3PL_0}{2bt^2} \quad \text{Equação 1}$$

onde: σ é a tensão (MPa); P é a carga máxima (N); L_0 é a distância entre as pontas (mm); b é o comprimento do dispositivo (mm) e t é a sua espessura (mm).

$$\varepsilon = \frac{L^3 m}{4bt^3} \quad \text{Equação 2}$$

onde: ε é o módulo de elasticidade (MPa); m (N/mm) é a inclinação do gráfico força x deslocamento.

A Figura 3.2 ilustra o esquema do ensaio aplicado nas placas de PLDLA.

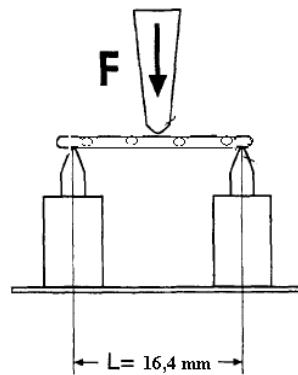


Figura 3.2: Ilustração do ensaio de flexão pelo método de 3 pontas.

3.3.4 Estudo citotoxicidade

O estudo de tototoxicidade do dispositivo obtido a partir do copolímero sintetizado neste trabalho, foi realizado pela empresa Medlab (Medlab Produtos diagnósticos LTDA) sendo

utilizadas linhagens celulares do tipo NCTC Clone 929 de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL1). A descrição completa deste ensaio, bem como os resultados da análise se encontram no Anexo-1.

3.4 Estudo da degradação *In Vitro* da placa de PLDLA

Para o estudo *in vitro* foram escolhidas placas de PLDLA obtidas pelo processo de injeção, provenientes da síntese PLDLA-11 ($M_w = 282700$ g/mol), pois representava uma média do valor de massa molar obtido em todas as sínteses, além de estar dentro da faixa de valores de massa molar dos dispositivos disponíveis no mercado.

Foram utilizadas 9 placas para cada tempo de estudo, as quais foram imersas em tubos de vidro contendo solução tampão de fosfato salina (PBS, pH 7, 4), em um banho termostaticado a $37,0^\circ\text{C} \pm 0,5$, conforme esquema da Figura 3.3.

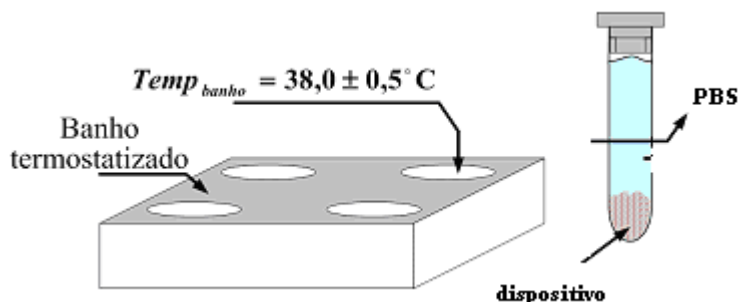


Figura 3.3: Desenho ilustrativo do estudo *in vitro* da degradação das placas.

Após períodos específicos (0, 2, 4, 8, 16, e 30 semanas) as placas foram retiradas, lavadas em água destilada, secas em estufa a vácuo a 50°C por 8 h e caracterizadas pelas seguintes técnicas: Calorimetria exploratória diferencial (DSC), Microscopia eletrônica de varredura (MEV), Cromatografia de permeação em gel (GPC), Análise termogravimétrica (TGA) e Ensaio de flexão. A caracterização do tempo 0 (zero) é referente ao material após o processamento.

3.4.1 Cromatografia de Permeação em gel (GPC):

As condições para a determinação das massas molares numérica média (M_n), e ponderal média (M_w) e do índice de polidispersão (IP) são as mesmas já descritas anteriormente (secção 3.3.1).

3.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC):

As condições de análise de DSC são as mesmas descritas na secção 3.24.

3.4.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

As curvas termogravimétricas foram obtidas nas mesmas condições descritas na secção 3.25.

3.4.4 Ensaio de flexão

As placas foram submetidas a ensaios de flexão pelo método de três pontas, conforme a norma ASTM D 790-95a, segundo o relatado anteriormente (secção 3.3.3).

3.4.5 Degradação visual dos dispositivos

Foi acompanhada a degradação visual da placa submetida ao estudo *in vitro* em tampão fosfato.

3.4.6 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Foram obtidas micrografias das placas durante o processo de degradação *in vitro*, e as condições de análise são as mesmas já descritas na secção 3.3.2.

3.5 Estudo *in Vitro* e *In Vivo* do sistema placa parafuso de PLDLA

Neste trabalho foi realizado um estudo *in vitro* e um estudo *in vivo* dos dispositivos do copolímero sintetizado. Tanto o estudo *in vitro* como o *in vivo* foram realizados na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pelo grupo do professor Renato Mazonetto.

II. Estudo *in vitro*: Estudo da resistência dos parafusos de PLDLA após a inserção dos mesmos na mandíbula sintética a base de poliuretano, utilizando como controle parafusos à base de liga de titânio:

Para a realização deste estudo, foram utilizados, como grupo teste, 60 parafusos reabsorvíveis pldla confeccionados neste trabalho e como grupo controle, foram utilizados 60 parafusos de titânio (engimplan[®] – rio claro-sp), todos com dimensões padronizadas de 2mm de diâmetro e 12mm de comprimento. o encaixe da cabeça dos parafusos de titânio tinham desenho quadrado enquanto os parafusos reabsorvíveis apresentavam-se com encaixe em forma de cruz.

Como substrato para a aplicação dos parafusos, foram utilizadas 20 réplicas de mandíbulas dentadas humanas confeccionadas a base de poliuretano rígido (nacional[®] – jaú-sp), com padronização de morfologia e densidade. Todas as mandíbulas dentadas foram seccionadas na linha média, entre os incisivos centrais inferiores, com a utilização de serra recíprocante (stryker[®]). Metade das hemimandíbulas foram fixadas utilizando 3 parafusos PLDLA, e o restante com 3 parafusos de titânio (Engimplan[®] – rio claro-sp), todos com disposição em I invertido. para a inserção tanto dos parafusos de titânio como para os biorreabsorvíveis, foram realizadas perfurações utilizando uma broca com diâmetro de 1.5mm, porém antes da inserção dos parafusos reabsorvíveis foi realizada a preparação das roscas na perfuração, por meio de chave com ponta ativa com desenho de rosca semelhante ao parafuso.

A seguir as mandíbulas foram dispostas num suporte metálico confeccionado em aço maciço, para a realização do teste mecânico. (Anexo II)

Para a realização do teste de carregamento, as réplicas das mandíbulas foram divididas em quatro grupos, sendo expostas em dois pontos diferentes de carregamento (simulando dentição incisal e a molar), sendo que em cada ponto de aplicação de força foram avaliados grupo com parafusos de titânio e grupos onde a fixação da mandíbula foi realizada com parafusos PLDLA. Todos os testes foram realizados em máquina de ensaio universal Instron, modelo 4411.

II. Estudo *in vivo*: Estudo da biocompatibilidade, após implante de placas e parafusos do copolímero PLDLA, para fixação interna da tíbia de coelhos:

Foram utilizados como controle dispositivos a base de ligas de titânio (Ti-6Al-4V/Grau V) (Bucoplan 2.0, Engimplan® Engenharia de Implantes Indústria e Comércio Ltda., Rio Claro, São Paulo), todos com dimensões padronizadas correspondentes ao sistema de fixação interna 2.0 (com parafusos de 2mm de diâmetro de corpo por 12mm de comprimento e placas correspondentes ao tamanho dos parafusos).

Para realização deste estudo, foram utilizados 15 coelhos adultos, albinos, de linhagem Nova Zelândia, fêmeas, com idade aproximada de 6 meses e peso variando entre 3,8 e 4,5 Kg. Durante a realização do estudo, os animais foram mantidos nas instalações do Biotério da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp, sob as mesmas condições ambientais durante todo o estudo, em gaiolas padronizadas, individuais.

De forma resumida, a preparação dos animais para a cirurgia seguiu o seguinte procedimento: os coelhos receberam uma dose de antibiótico antes da injeção anestésica, que foi realizada por meio de injeção intramuscular de uma mistura de drogas (ketamina e xilazina). Foram realizadas incisões lineares até a exposição da porção medial e posterior da tíbia. Nesta foram realizadas duas osteotomias parciais de secção transversal, uma em porção proximal e outra em porção distal. Após a osteotomia ter sido provocada foi aplicado o sistema de fixação por meio de uma placa de 2 furos e 2 parafusos do sistema 2.0 de 12mm de comprimento (bicortical), sendo posicionado na porção proximal o sistema em titânio (controle) e na porção distal o sistema baseado no copolímero PLDLA.

As Figuras 3.4 e 3.5 representam a fixação da fratura da tíbia de coelhos pelos dois sistemas (PLDLA e o controle –titânio) e a disposição dos materiais em tíbias direita e esquerda.

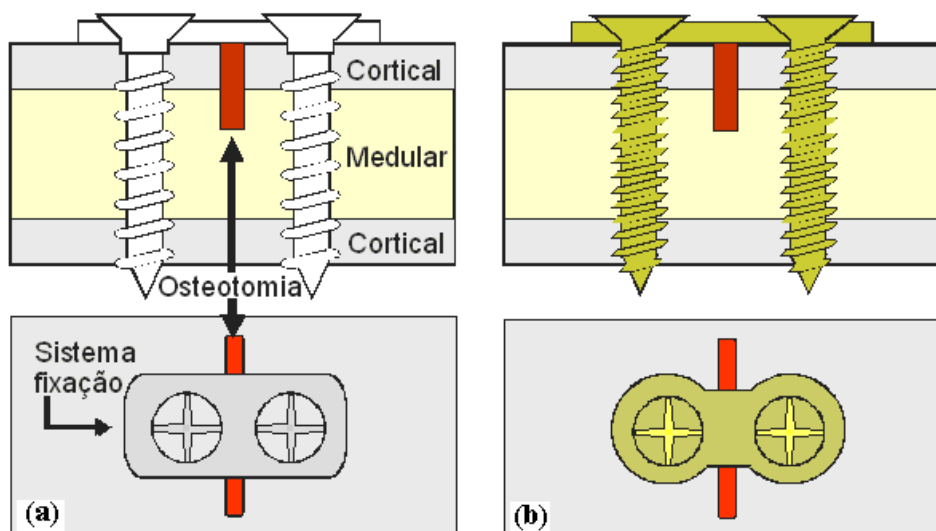


Figura 3.4 Ilustração esquemática da osteotomia transversal fixada com placa e parafusos **(a)** PLDLA e **(b)** controle a base de titânio.

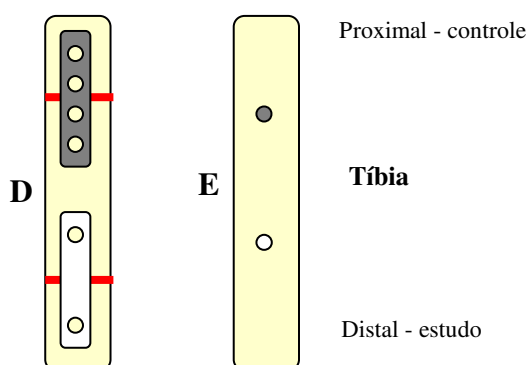


Figura 3.5: Ilustração esquemática da disposição dos materiais em tíbias direita e esquerda.

Após a instalação dos sistemas de fixação o campo foi irrigado com solução salina estéril e a síntese se deu por meio de sutura por planos com fio mononylon 4-0.

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos segundo o período de sacrifício para avaliação histológica: Grupo 1 (5 coelhos): sacrifício no 21º dia pós-operatório, Grupo 2 (5 coelhos): sacrifício no 56º dia pós-operatório e Grupo 3 (5 coelhos): sacrifício no 84º dia pós-

operatório. Os sistemas teste e controle foram instalados no mesmo animal, diminuindo a influência da variabilidade individual sobre o estudo.

Processamento do material para Análise Histológica

Após as amostras terem sido descalcificadas, as seguintes etapas foram realizadas com o material:

1. Inclusão em parafina
2. Cortes histológicos
3. Coloração das lâminas
4. Análise no microscópio ótico (NIKON E-800)

Capítulo 4

Resultados e Discussões

4.1 Síntese do Copolímero

Segundo a literatura, a rota de síntese para obtenção do poli (ácido-lático), PLLA, de alta massa molar, parte da abertura do seu dímero cíclico. Da mesma forma, a rota de síntese para se obter o copolímero poli (L-co-DL ácido lático), PLDLA, de alta massa molar segue a mesma rota partindo dos dímeros: L lactide e D,L lactide.

A importância da obtenção desses materiais com alta massa molar está associada à dependência desse parâmetro com as propriedades mecânicas. 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. Valores elevados de massa molar (igual ou superior a 10^5 g/mol) são de extrema importância para aplicações de dispositivos como fixadores de fraturas, pois garantem valores elevados de módulo e tensão (Harvie, 2000).

A grande vantagem do copolímero PLDLA sobre o PLLA, é o curto tempo de degradação que o mesmo apresenta, devido às suas características amorfas, tornando-o mais susceptível à hidrólise e, portanto, com uma taxa de degradação mais alta, (Andriano *et al.*, 1994).

Esse tipo de reação, através da abertura de monômeros cíclicos, é conhecido pela abreviação ROP (ring-opening polymerization), e ocorre na presença de um catalisador, sendo o

octoato de estanho, Sn (Oct)_2 , um dos mais usados. Com esse catalisador, obtêm-se polímeros com alta massa molar e estreitos valores de polidispersão (Ovitt, & Coates, 2000).

A escolha do catalisador nas sínteses de polímeros biorreabsorvíveis é um fator fundamental e uma das vantagens do uso do Sn (Oct)_2 em relação aos outros catalisadores é a sua baixa toxicidade, o que permitiu sua aceitação pelo FDA, e seu emprego em inúmeros países na forma de aditivos alimentares (Yodthong & Molloy, 2004).

O principal problema da polimerização por condensação, relatado anteriormente no capítulo 1, é a obtenção de polímero com baixa massa molar e remoção de subprodutos da reação, como, por exemplo, H_2O (Kajsa *et al.*, 2002). Além disso, o emprego do catalisador Sn (Oct)_2 na polimerização através da abertura dos anéis dos dímeros cíclicos do ácido láctico na polimerização em massa (ausência de solvente), evita problemas como alta incidência de racemização e reações de transesterificação, situações comuns quando se emprega outros tipos de catalisador como os aniônico ou catiônico. O fato do catalisador Sn (Oct)_2 ter uma alta solubilidade no monômero fundido, torna preferível o processo de polimerização ser realizado na ausência de solvente (Gruber & O'Brien).

Reações de transesterificação intermoleculares, por exemplo, modificam a seqüência de copolímeros, impedindo a copolimerização em blocos, enquanto transesterificação intramolecular causam degradação da cadeia polimérica e formação de oligômeros cíclicos.

O esquema a seguir, Figura 4.1 ilustra esses tipos de transesterificações:

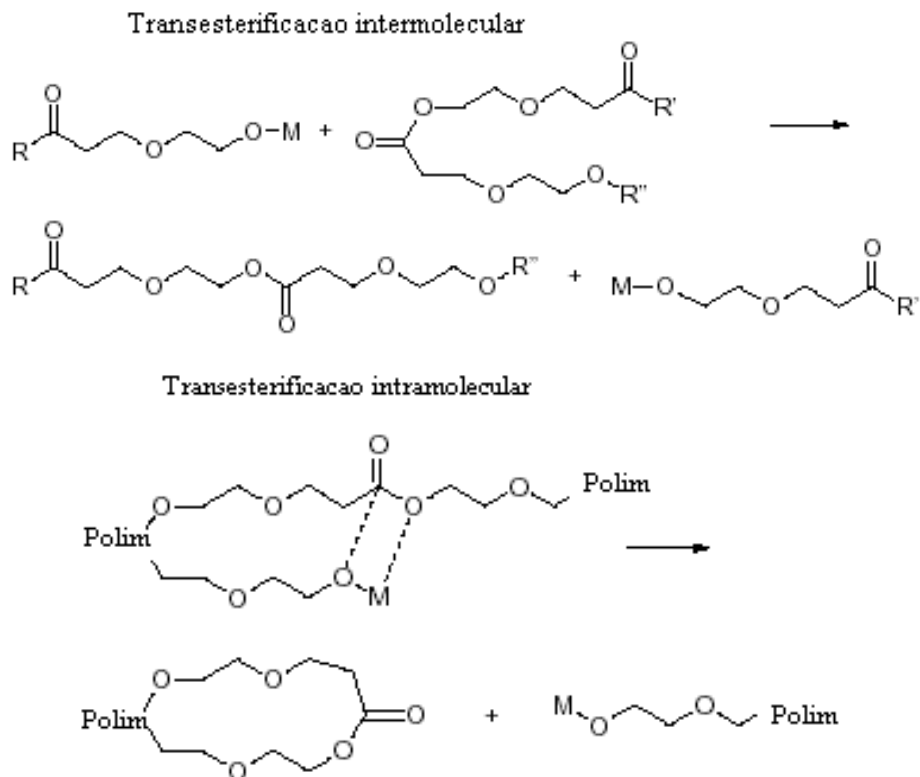


Figura 4.1: Exemplos de reações de transesterificações intermoleculares e intramoleculares.

Dependendo do catalisador empregado, a polimerização procede de acordo com três mecanismos diferentes: (Johns, 1984) mecanismo catiônico, aniônico e de coordenação-inserção (Mecerreyes *et al.*, 1999). O mecanismo de polimerização da maior parte dos compostos contendo Sn ainda é desconhecido, apesar de inúmeros estudos terem sido publicados no sentido desta elucidação. (Kricheldorf *et al.*, 1991; Kohn *et al.*, 1984 e Bassi *et al.*, 1990).

O mecanismo mais promissor, dentre os sugeridos, é o do tipo coordenação-inserção, no qual o catalisador empregado possui uma ligação covalente entre um metal e o oxigênio, comportando-se, como um ácido de Lewis fraco (Kricheldorf, 2001). O primeiro passo do mecanismo de coordenação-inserção ocorre quando o oxigênio do monômero cíclico (lactide) coordena-se, temporariamente, com o átomo metálico do catalisador, aumentando assim a nucleofilicidade deste, bem como a eletrofilicidade do grupo carbonil do monômero.

Num segundo passo, a ligação acil entre o grupo carbonil e o oxigênio é quebrada e a cadeia de lactide produzida é inserida na ligação metal –oxigênio do catalisador. A

polimerização continua, enquanto as moléculas adicionais de lactide forem abertas e inseridas na ligação entre o átomo metálico e seu átomo de oxigênio adjacente. (Kricheldorf *et al.*, 1988). A Figura 4.2 ilustra o mecanismo sugerido:

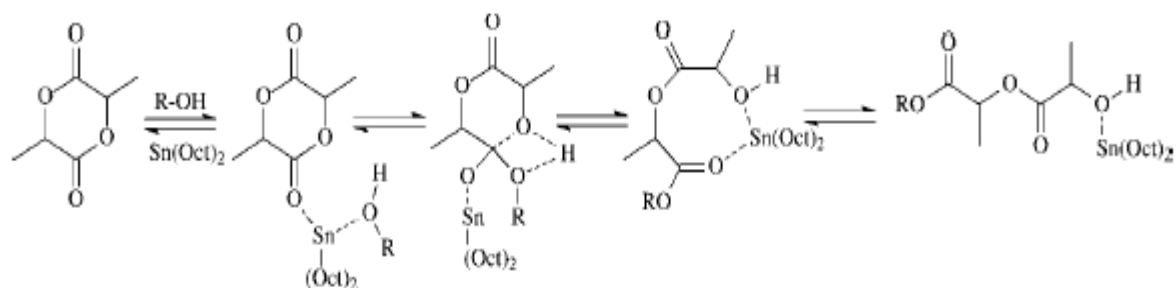


Figura 4.2: Mecanismo de reação da polimerização tipo coordenação-inserção de diésteres cíclicos por meio de $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ (Kricheldorf *et al.*, 1995).

O sucesso da síntese depende da estreita relação entre a concentração molar do catalisador e do monômero, a qual, nesse trabalho foi empregada à relação monômero/catalisador na faixa de 5000-7000 vezes, como pode ser verificado na Tabela-1, que contempla também os resultados de massa molar obtidos em cada síntese com seus respectivos rendimentos em massa. A escolha desta faixa de relação foi baseada, em trabalho anterior Motta & Duek (2006) no qual estudou-se a síntese do poli (L-ácido láctico), utilizando uma relação monômero/catalisador da ordem de 4300 vezes, baseado em estudos desenvolvidos por Hyon *et al.* (1997) para a síntese desse homopolímero.

A temperatura é outro fator que influencia diretamente no êxito da síntese de poliésteres bioreabsorvíveis pelo método ROP, já que temperaturas elevadas levam a um processo de despolimerização, diminuindo, portanto valores de massa molar no material. (Gupta *et al.*, 1982 e Dubois *et al.*, 1991).

É interessante mencionar que, o rendimento de todas as sínteses foi mantido sempre próximo a 80% , tanto no início do estudo, quando a massa almejada de PLDLA era somente de 70 g ou quando a massa era de 300 g, o que ocorreu a partir da 6 º síntese. As condições de síntese foram fixadas a partir da análise dos resultados e das condições utilizadas até a síntese nº 11, que na Tabela 4.1 recebeu uma coloração diferenciada. Todos os copolímeros sintetizados de PLDLA foram secos em estufa a vácuo, para eliminação de solvente, pesados e caracterizados.

4.2- CARACTERIZAÇÃO DO PLDLA

A caracterização do copolímero sintetizado foi realizada pela comparação dos resultados obtidos, por meio das várias técnicas, com os descritos na literatura e com o material comercial.

4.2.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A cromatografia de permeação em gel foram obtidos resultados de massas molares numérica média (M_n), mássica média (M_w) e índice de polidispersividade (IP) para cada copolímero sintetizado, tabela 4.1.

Tabela 4.1- Dados das relações molares (M/C) entre o monômero L-lactide e o catalisador Sn (Oct)₂ usados nas polimerizações em massa do PLDLA (130°C , 72 h.) e valores de (M_n), (M_w) e IP obtidos por meio do GPC.

Síntese	Razão molar M/C	Mw (g/mol)	Mn (g/mol)	IP (Mw/Mn)	Rendimento (%)
PLDLA-1	5330	449400	279000	1,6	89
PLDLA-2	5010	208200	121300	1,7	83
PLDLA-3	6428	206000	120800	1,7	85
PLDLA-4	6518	56617	31846	1,8	85
PLDLA-5	6555	38058	24840	1,5	69
PLDLA-6	6387	364055	219696	1,7	75
PLDLA-7	5935	114889	74126	1,6	76
PLDLA-8	7000	63122	39345	1,6	85
PLDLA-9	5111	242606	138015	1,8	80
PLDLA-10	5637	73377	37971	1,9	80
PLDLA-11	5284	282700	131354	2,2	97
PLDLA-12	5254	266442	158172	1,7	86
PLDLA-13	5305	250403	145730	1,7	91
PLDLA-14	5257	529590	257816	2,0	98
PLDLA-15	5265	448136	229980	2,0	81
PLDLA-16	5225	494140	298802	1,6	80
PLDLA-17	5260	235049	137288	1,7	80
PLDLA®	-----	100000			

PLDLA Macropore

Como pode ser verificado na Tabela-4.1, o valor de massa molar, em praticamente todas as sínteses de PLDLA realizadas, foi da ordem de 10^5 g/mol, o que caracteriza polímeros de alta

massa molar, como é o requerido nas aplicações a que esses materiais se destinam, ou seja, fixadores de fraturas (Gogolewski, 2000).

A relação monômero/catalisador mostrou ter influência direta nos valores de massa molar obtidos em cada síntese. Como pode ser verificado pela Tabela 4.1, as sínteses 4, 5 e 8 e 10 apresentaram valores de massa molar inferior a 10^5 g/mol. Para esses copolímeros a relação monômero/catalisador foi acima de 6500 vezes.

O menor valor de massa molar, para a síntese 10, pode ser atribuído, não à relação monômero/catalisador, mas à presença de O_2 no meio reacional durante o procedimento de evacuação da ampola, já que foi constatada na abertura da ampola a ausência de vácuo. Essa constatação de queda na massa molar, quando a reação ocorre na presença de O_2 , está de acordo com os resultados obtidos por Gupta *et al.* (1982).

E finalmente, foi possível verificar, através da análise da Tabela-4.1, que a relação monômero/catalisador que permitiu maior reprodutibilidade de resultados, em termos de massa molar, foi aquela que mais se aproximou de 5200, sendo este, portanto o valor adotado como ideal para a obtenção de copolímero de alta massa molar nas condições de temperatura e tempo estipuladas. Com isso, houve um estudo sistemático das polimerizações em termos de relação monômero/catalisador.

A Figura 4.3 permite a visualização dos resultados da Tabela 1:

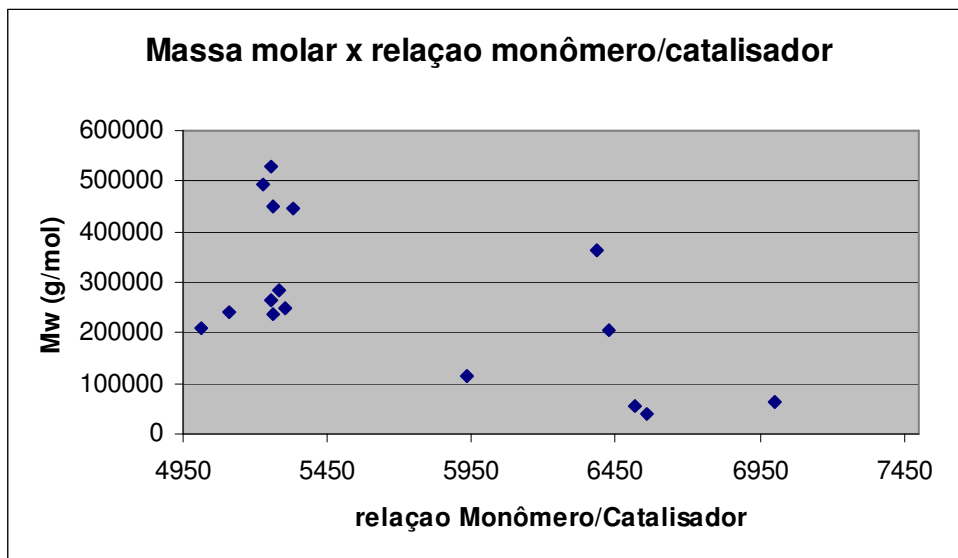


Figura 4.3: Ilustração da relação dos valores de massa molar em função da relação monômero/catalisador.

Pode-se verificar que a região do gráfico que concentra os maiores valores de massa molar é aquela cuja relação monômero/catalisador se aproxima de 5200.

4.2.2 Ressonância magnética (RMN de H^1 e C^{13}):

É bem conhecido que espectros de RMN de polímeros são sensíveis a efeitos de grupos vizinhos, bem como a estruturas configuracionais, sendo assim é fato que o espectro do copolímero em questão, poli (L-co- D, L ácido láctico), se apresente, tanto em relação ao H^1 como de C^{13} , mais complicado do que o correspondente ao homopolímero, poli (L ácido láctico). A figura 4.4 mostra a estrutura referente ao poli (L-co D,L ácido láctico) que foi analisada por RMN de H^1 .

4.2.2.1 Ressonância magnética RMN de H^1

A Figura 4.4 mostra os tipos de hidrogênios presentes na estrutura do copolímero PLDLA:

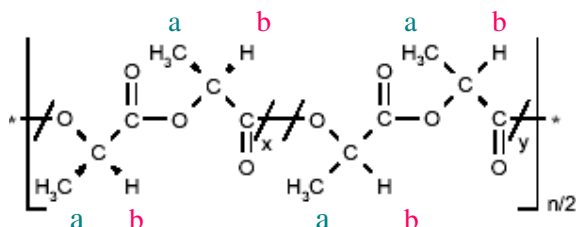


Figura 4.4: Estrutura química do PLDLA.

Os sinais encontrados no RMN de H^1 para o copolímero poli (L-co-D,L ácido láctico), estão de acordo tanto com o reportado pela literatura, (Thakur *et al.*, 1997), quanto ao verificado na amostra referente ao material comercial. No espectro do copolímero, o multiplete em 5,12-5,24 ppm é atribuído aos prótons CH (**b**), enquanto o quarteto em 1,55-1,59 ppm é atribuído aos prótons CH_3 (**a**). Pode-se verificar, por uma comparação do espectro do copolímero com o do homopolímero, poli (L-ácido láctico), que apesar dos deslocamentos, em termos de ppm serem muito próximos um espectro em relação ao outro, existe uma diferença no número maior de desdobramentos de sinais para o copolímero, o que é consequência das estruturas configuracionais mais complexas neste caso, como pode ser verificado nas Figuras 4.5 e 4.6, referentes ao homopolímero poli (L-ácido láctico) e ao copolímero poli (L-co-D,L ácido láctico), respectivamente.

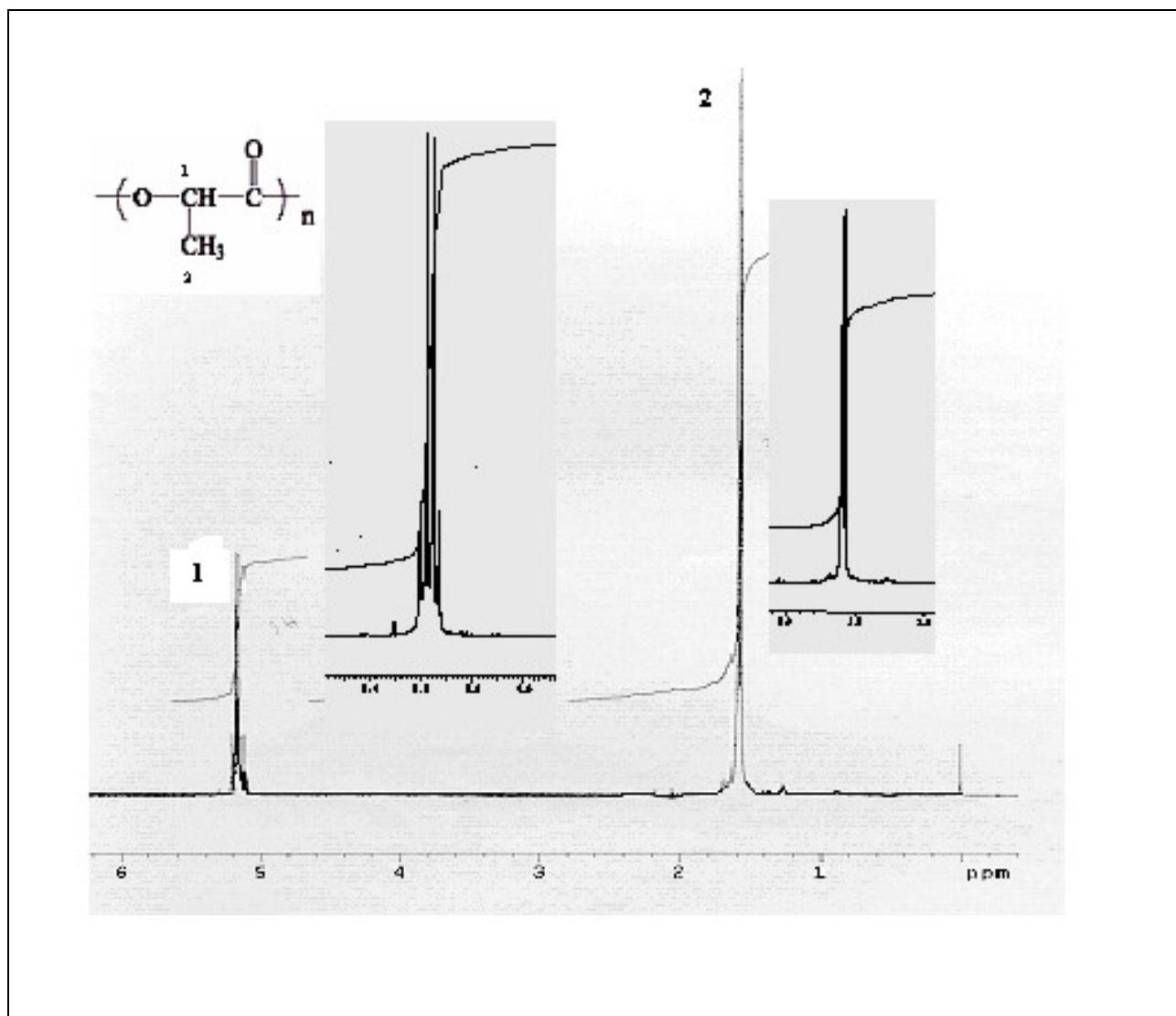


Figura 4.5: Espectro de RMN de H^1 referente ao homopolímero poli (L-ácido láctico).

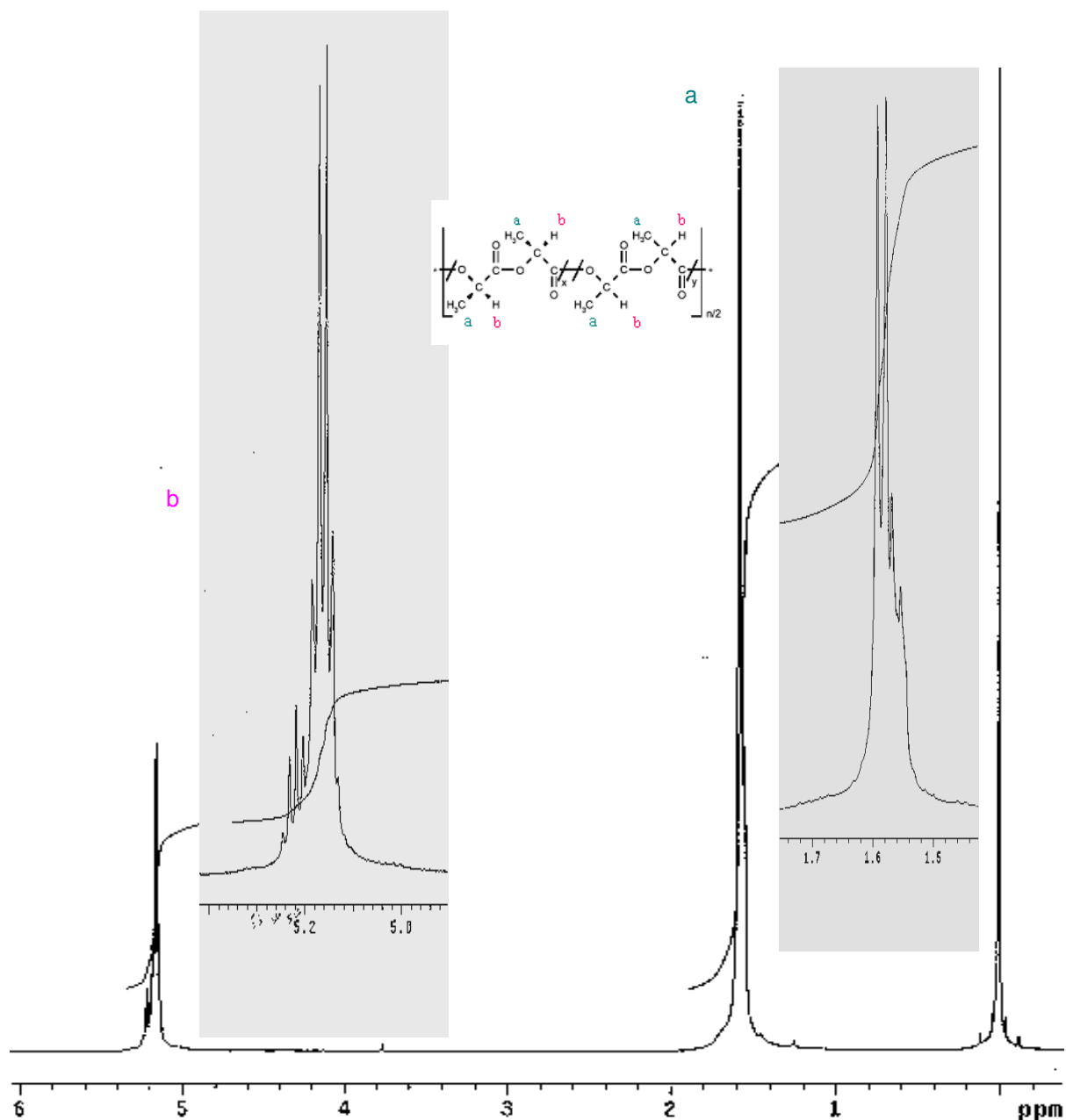


Figura 4.6: Espectro de RMN de H^1 para o polímero PLDLA referente a 3^o síntese.

Pode-se verificar claramente que existem mais desdobramentos nos sinais referentes ao copolímero do que os verificados no homopolímero. Esses desdobramentos de sinais originam-se da estereossensitividade devido à presença de dois pares enantioméricos do ácido láctico no copolímero, que são diastereoisomericamente diferentes, ou seja, pares LL/DD e os LD/DL. DL (Espartero *et al.*, 1996).

A Figura 4.7 compara o copolímero PLDLA-3 com o comercial.

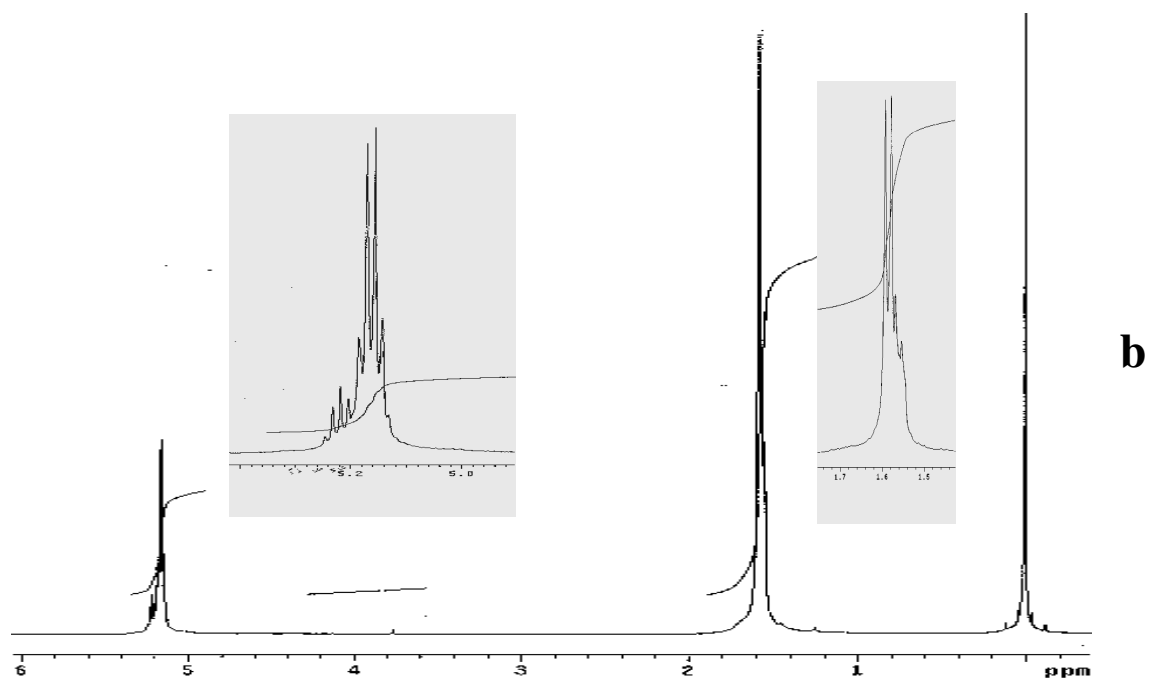
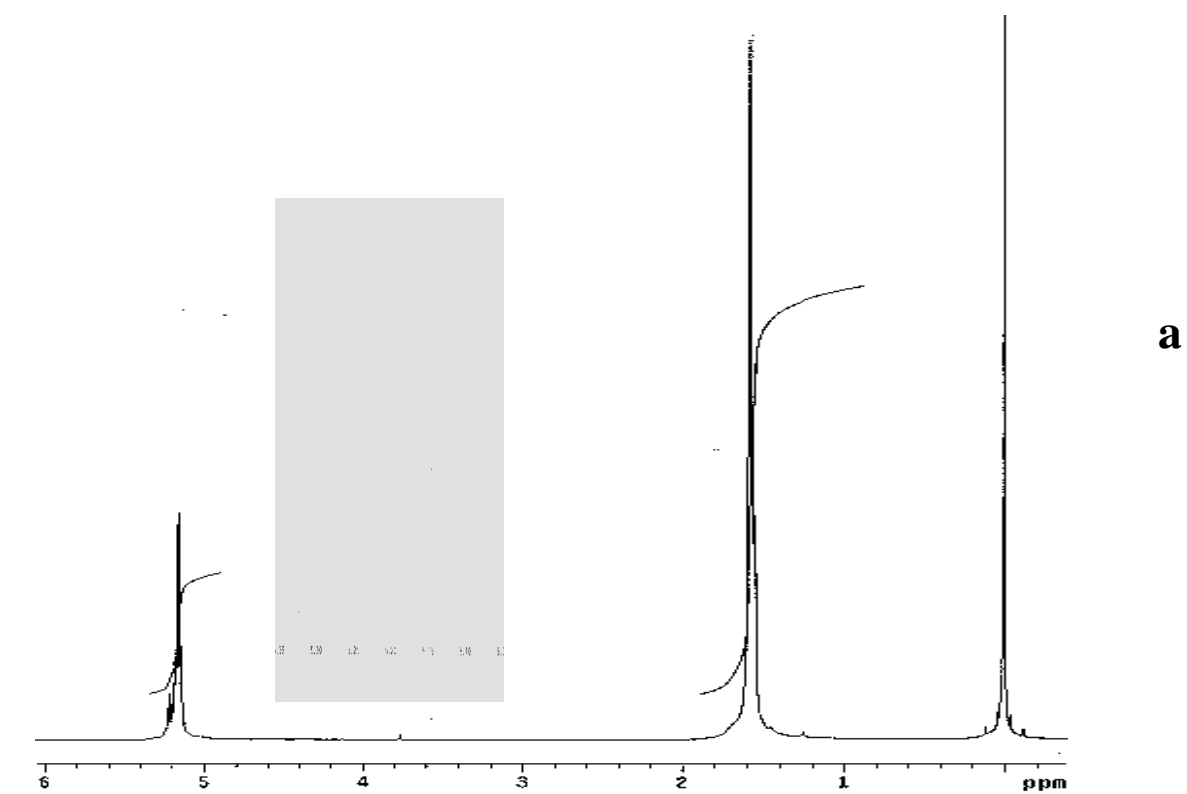


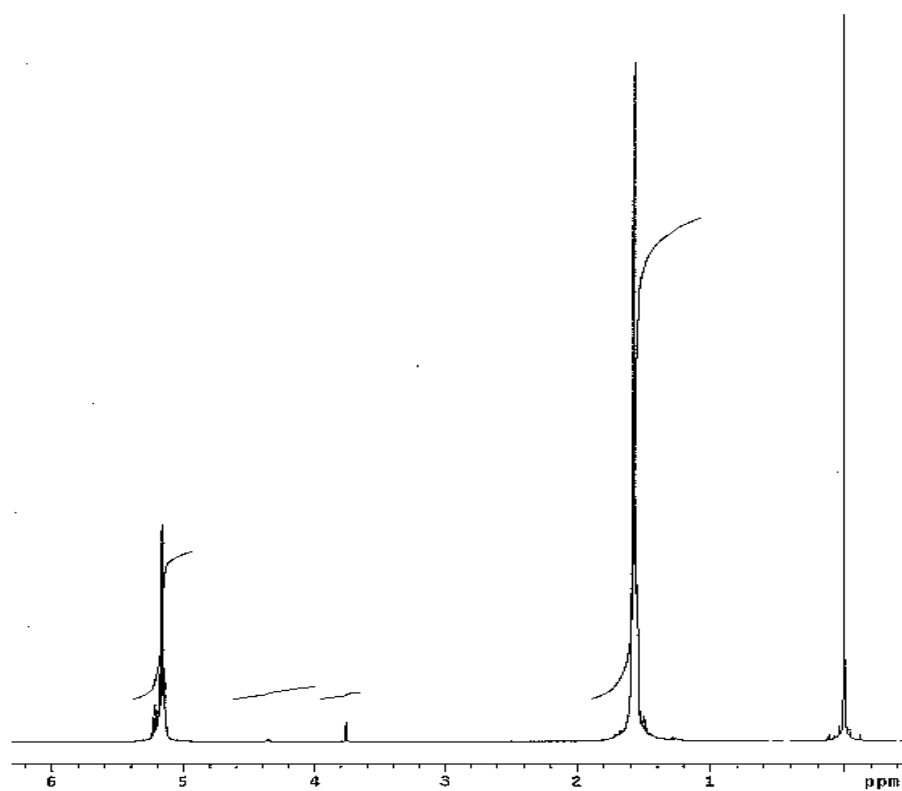
Figura-4.7: Comparação entre o espectro **(a)** referente ao copolímero comercial e o espectro **(b)** referente à síntese do copolímero PLDLA-3.

Pode-se verificar que os espectros se assemelham muito quanto à disposição dos picos (Figura 4.7 **a e b**), o que é uma ferramenta a mais na constatação de que o copolímero sintetizado é quimicamente idêntico ao copolímero comercial.

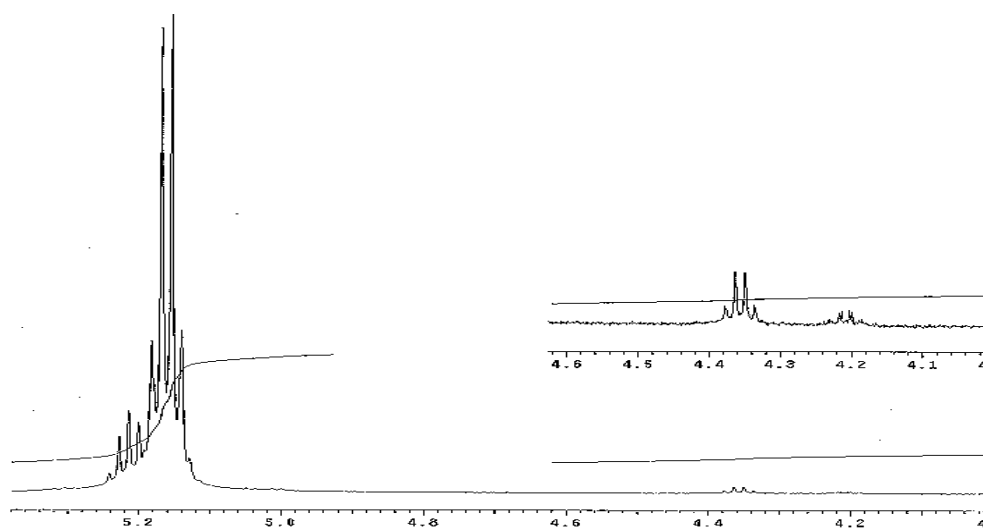
Os espectros das sínteses dos demais copolímeros apresentaram picos com os mesmos deslocamentos químicos que o PLDLA-3, portanto não serão mostrados.

No entanto, as sínteses, PLDLA-4, PLDLA-5 e PLDLA-8 e PLDLA-10, além de apresentarem também os mesmos deslocamentos químicos que o PLDLA-3, se diferenciaram deste no sentido de apresentarem picos muito discretos numa região entre 3,7 e 4,4 ppm, os quais nos espectros PLDLA-1; PLDLA-2; PLDLA-3; PLDLA-6 ;PLDLA-7 , PLDLA-9, PLDLA-11, PLDLA-12, PLDLA-13, PLDLA-14, PLDLA-15, PLDLA-16 e PLDLA-17 não eram verificados.

As Figuras 4.8 **a e b**, representam o espectro do copolímero PLDLA-8, em que é possível visualizar a presença, entre 3,7 – 4,4 ppm, de sinais, ainda que discretos.



a



b

Figura 4.8: Espectros de RMN de H^1 para síntese PLDLA-8 (a) e com região ampliada (b).

A explicação para esses pequenos picos, por volta da região de 4 ppm para as sínteses PLDLA-8; PLDLA-5 e PLDLA-4 está relacionada, provavelmente, ao fato de que nestas sínteses a massa molar obtida para o copolímero ser menor do que nas demais sínteses, o que, como já discutido no item GPC, tem relação com a menor quantidade de catalisador presente nestes casos, que, por sua vez, impede que pequenas quantidades de monômero reajam durante o processo de polimerização.

De acordo com Hiltunen *et al* (1996) espera-se um sinal pouco intenso em 4,36 ppm referente ao hidrogênio do grupo CH próximo à hidroxila terminal para polímeros com massa molar menor, já que nestes casos a detecção dos grupamentos finais das cadeias é mais fácil.

4.2.2.2 Ressonância magnética RMN de C¹³

Os sinais encontrados no RMN de C¹³ para o copolímero poli (L-co-D,L ácido láctico), estão de acordo tanto com o reportado pela literatura, como também o verificado para a amostra referente ao material comercial (Kister *et al.*, 1998). São verificados três sinais: 16,6 ppm referente ao C do CH₃; 69 ppm referente ao C do CH e em 169,6 referente ao C do C=O, sendo que em todos esses sinais ocorrem desdobramentos devido às ressonâncias do Carbono. O sinal a 76,5 ppm é refere-se ao solvente.

As Figuras 4.9 e 4.10 são referentes ao espectro de RMN de C¹³ para o PLDLA-3 e ao PLDLA comercial, respectivamente.

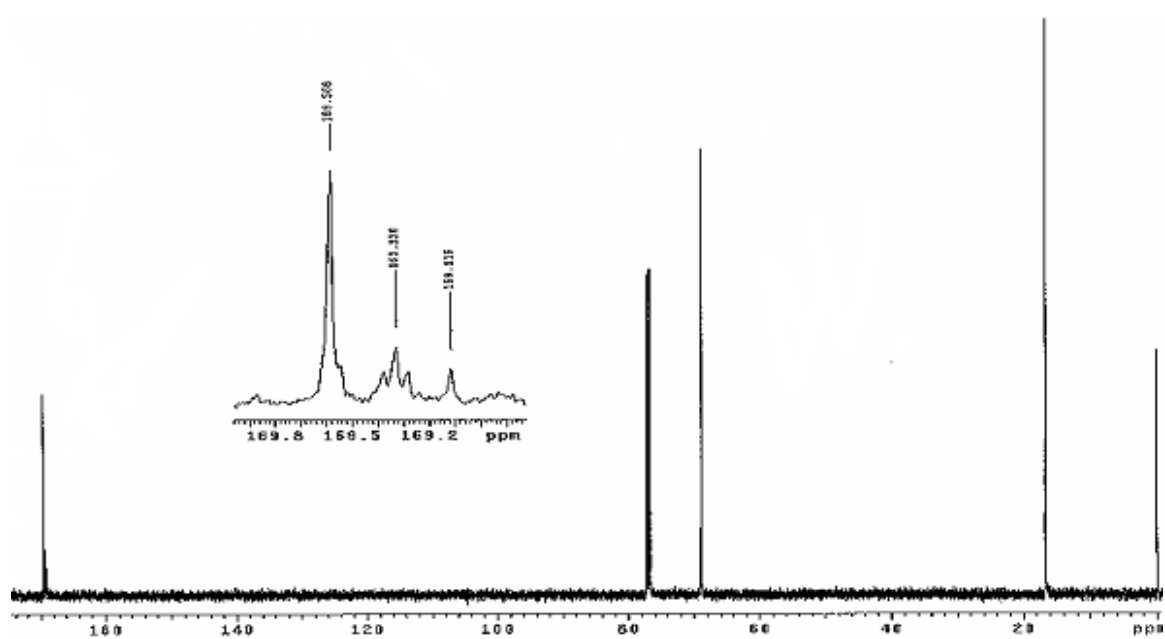


Figura 4.9: Espectro de RMN de C^{13} para o polímero PLDLA-3.

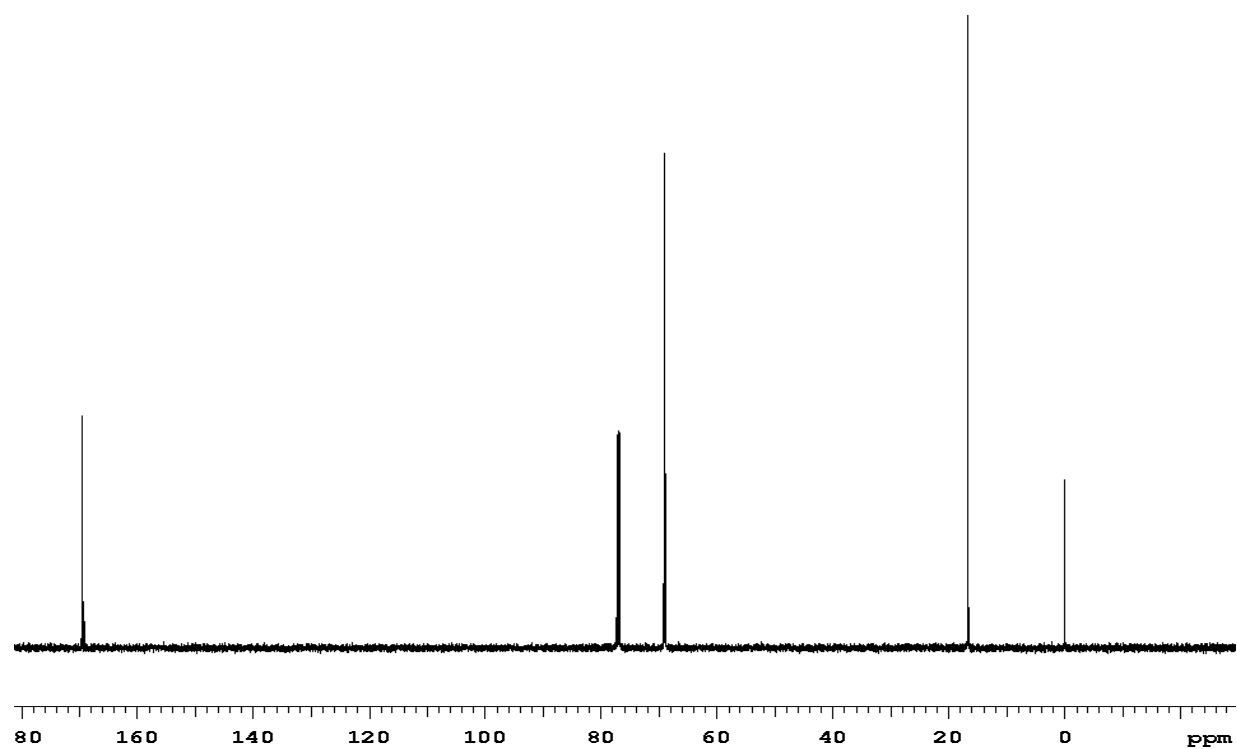


Figura 4.10: Espectro de RMN de C^{13} para o polímero PLDLA comercial.

Os espectros das demais sínteses dos copolímeros apresentaram picos com os mesmos deslocamentos químicos que o PLDLA-3. Portanto, no caso do RMN de C^{13} , a diferença notada de massa molar de algumas sínteses (PLDLA-4; PLDLA-5; PLDLA-8 e PLDLA-10), não influenciou o espectro, o que pode ser visualizado na Figura 4.11 (a) e 4.11 (b) que traz novamente o espectro PLDLA-3 e o espectro PLDLA-8, respectivamente, para efeito de comparação.

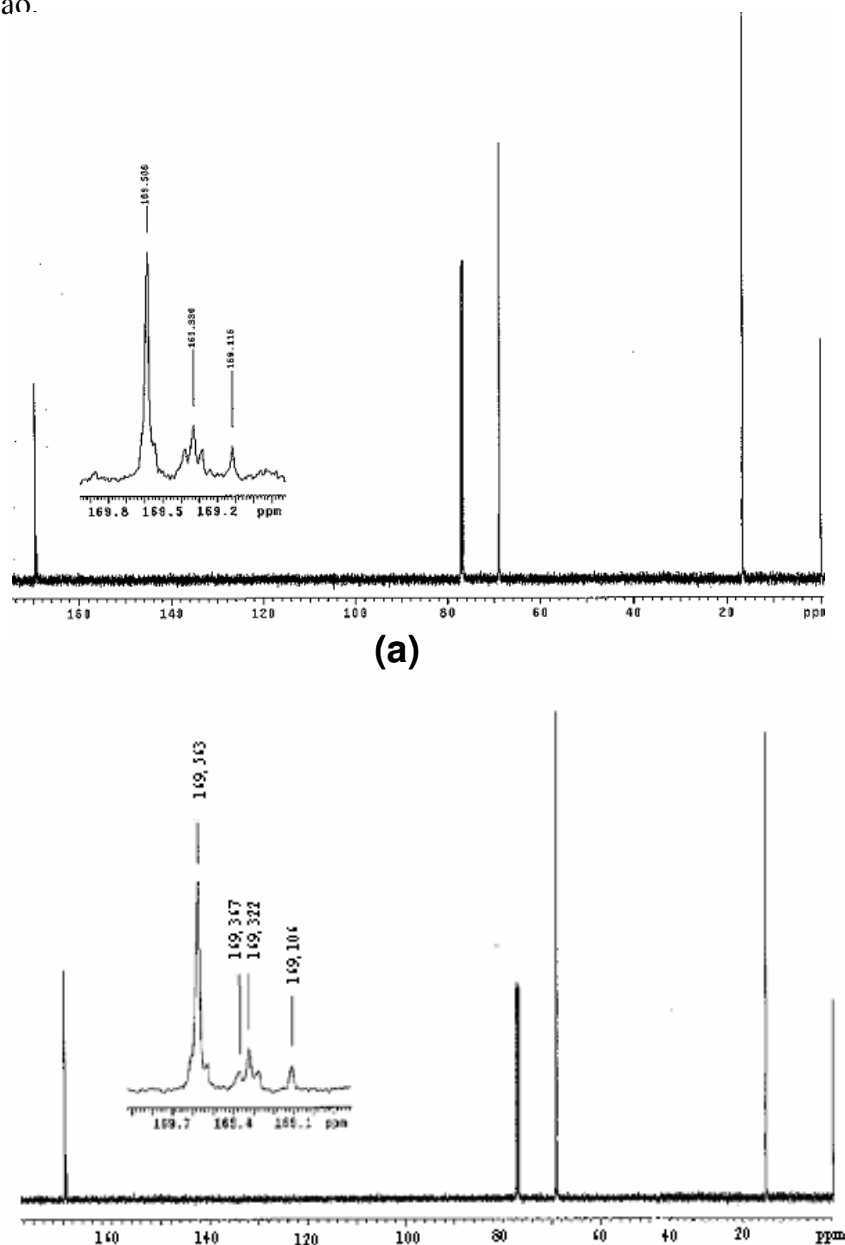
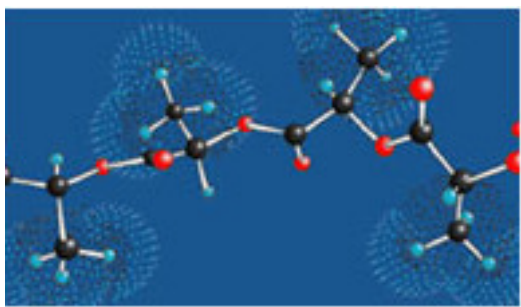


Figura 4.11: Espectro de RMN de C^{13} onde (a) é referente ao para o copolímero PLDLA-3; e (b) ao copolímero PLDLA-8.

4.2.3 Espectroscopia de infravermelho (FTIR)

Os espectros na região do infravermelho são úteis para caracterizar a presença de grupos químicos funcionais que constituem o material. A Figura 4.12 traz uma ilustração do modelo em 3D da cadeia do copolímero poli (L-co-D,L ácido lático), para visualizar as ligações.

Figura 4.12: Representação do modelo em 3D da cadeia do copolímero PLDLA.



Onde:

- Representa o átomo de Carbono
- Representa o átomo de Hidrogênio
- Representa o átomo de Oxigênio

Os espectros vibracionais na região do infravermelho das amostras estão mostrados na Figura 4.13. Todos os espectros apresentam as mesmas bandas de absorção, dessa forma, por uma questão de melhor visualização, não foram colocados os espectros referentes a todas as 17 sínteses obtidas no trabalho. A Figura 4.13 compara a distribuição das bandas dos espectros dos copolímeros sintetizados com o copolímero comercial. A Tabela 4.2 contempla as bandas de absorção com suas respectivas atribuições.

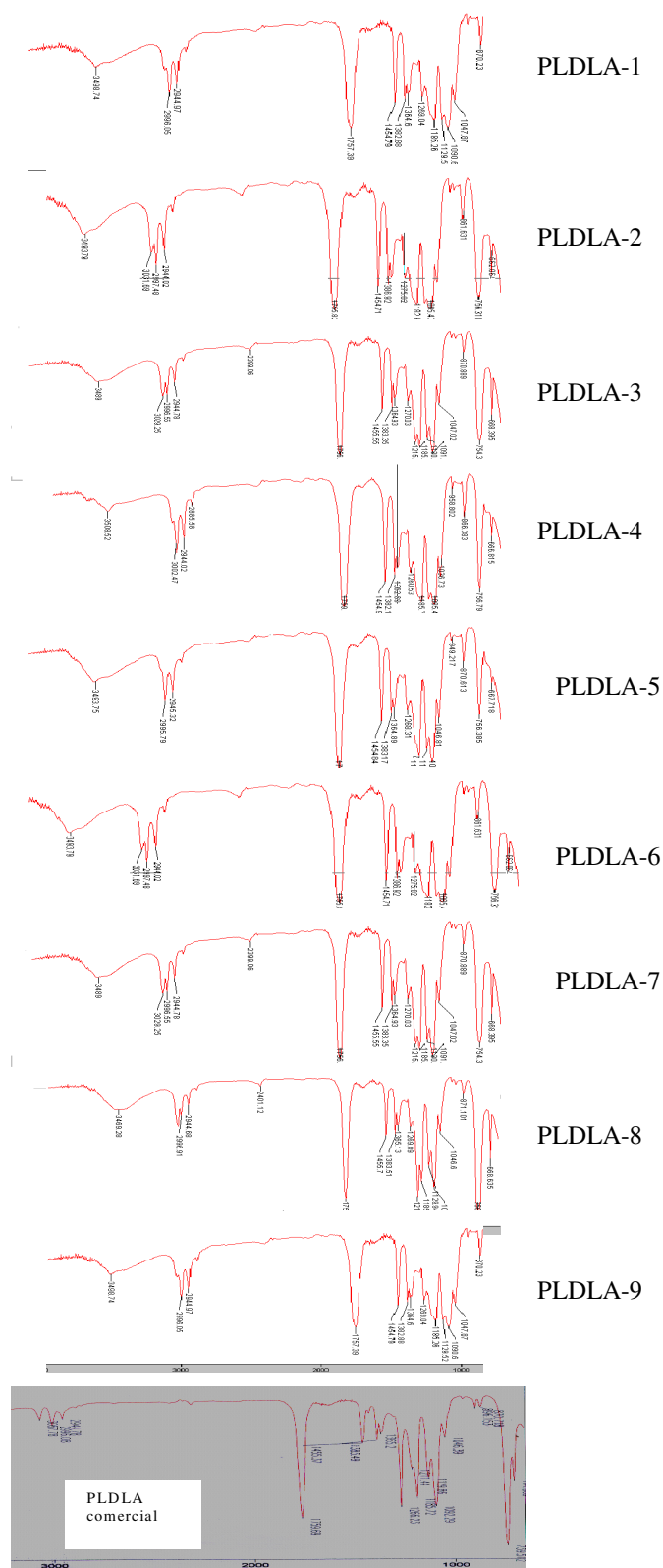


Figura 4.13: Espectros na região do infravermelho dos copolímeros referentes às sínteses de 1 a 9 e espectro do copolímero comercial (Purac).

Tabela 4.2: Principais bandas de absorção no infravermelho observadas nos espectros dos copolímeros e as respectivas atribuições

Banda de absorção (cm^{-1})	Atribuição
3000-2850	ν CH e CH_3
1759	$\nu \text{C=O}$ do COO
1455	δ CH_3
1383	δ CH e CH_3
1266-1185	ν C-O do COO
1130	ν C-O do O-CH

ν deformação axial

δ deformação angular

4.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC do primeiro aquecimento das amostras dos copolímeros sintetizados estão apresentadas na Figura 4.14:

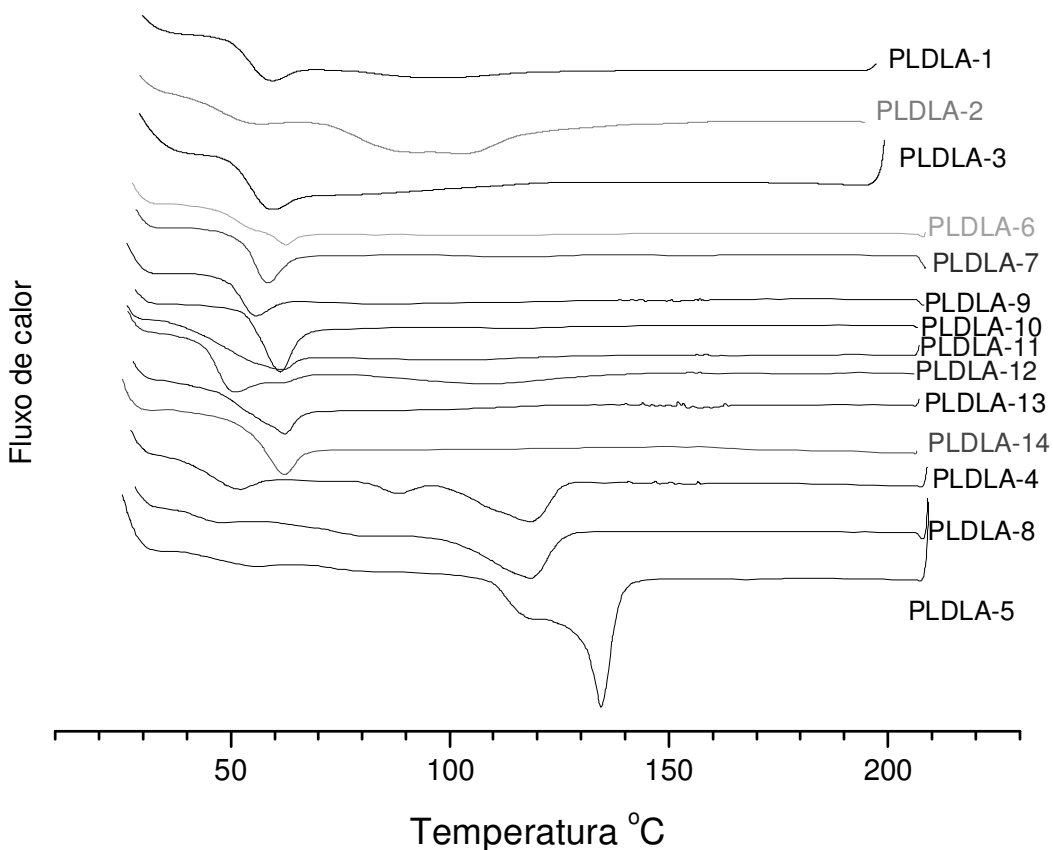


Figura 4.14: Curvas de DSC do primeiro aquecimento das amostras de copolímero PLDLA.

Pode ser verificado claramente que não existem sinais de cristalinidade na maior parte das sínteses obtidas (temperatura próxima a 130 °C), como esperado quando se tem uma relação entre os monômeros (L/DL) igual a 70:30, respectivamente (Leiggener *et al.*, 2006). Todavia, aquelas sínteses numeradas como PLDLA-4, PLDLA-5 e PLDLA-8, apresentaram discretos picos endotérmicos num primeiro aquecimento, o que, provavelmente tem associação com os menores valores de massa molar desses copolímeros, permitindo um alinhamento dessas cadeias de menor tamanho, e o surgimento de vestígios de cristalinidade. Esse argumento está de acordo com

alguns estudos Pistner *et al.*, 1993; Li *et al.*, 1990a, Mainil *et al.*, 1997, os quais associam a queda da massa molar e o surgimento de cristalinidade para a família do PLA.

Para todas as outras sínteses os copolímeros se mostraram completamente amorfos, possuindo somente uma mudança na linha base na curva de DSC em torno de 58 °C, em função da mudança na capacidade calorífica devido a transição vítrea (T_g).

A cristalinidade é, portanto, um parâmetro responsável pela baixa taxa de hidrólise do poli (L-ácido láctico), que tem como consequência rápida perda de suas propriedades mecânicas. Além disso, em aplicações biomédicas, principalmente em ortopedia, a perda das propriedades mecânicas é um fator importante, tendo em vista que os dispositivos devem exercer suas funções até a formação do novo osso. É interessante que os dispositivos apresentem valores de cristalinidade mais baixos do que os apresentados pelo PLLA, para que a taxa de degradação seja mais elevada, diminuindo assim a permanência de fragmentos do material no local do implante o que poderia causar riscos de reações de corpos estranhos a longo prazo. Assim o copolímero do trabalho em questão, PLDLA 70:30, se mostra potencialmente com uma biocompatibilidade maior do que o semicristalino PLLA. (Leiggner, 2006).

A tabela 4.3 é referente às curvas de DSC das amostras dos polímeros sintetizados, sendo que o valor de T_g foi obtido da curva do 2º aquecimento, enquanto que a T_m , nas amostras de copolímero em que foi encontrada, foi obtida da corrida do 1º aquecimento.

Tabela 4.3: Resultados de T_g , T_m e ΔH_m para as diversas sínteses realizadas.

Síntese	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)
PLDLA-1	58	----	-----
PLDLA-2	58	----	-----
PLDLA-3	57	----	-----
PLDLA-4	49	118	12
PLDLA-5	33	135	23
PLDLA-6	59	-----	-----
PLDLA-7	58	-----	-----
PLDLA-8	48	118	14
PLDLA-9	58	-----	-----
PLDLA-10	58	111	9
PLDLA-11	57	----	-----
PLDLA-12	58	----	-----
PLDLA-13	58	----	-----
PLDLA-14	58	----	-----
PLDLA-15	59	----	-----
PLDLA-16	56	----	-----
PLDLA-17			
PLDLA®	60	----	-----

PLDLA Macropore

Pela Tabela 4.3 pode-se notar que as sínteses PLDLA-4, PLDLA-5 e PLDLA-8 são as únicas que destoam no valor de transição vítrea (T_g) para o copolímero, sendo verificado valores de 49 °C, 33 °C e 48 °C, respectivamente, ficando, portanto, abaixo do valor de 58 °C, que é característico do material (Fambri *et al.*, 2006).

Provavelmente são os baixos valores de massa molar dessas três sínteses que contribuíram para esses menores valores de T_g , já que quanto maior a massa molar menor a mobilidade da

cadeia polimérica. A Figura 4.15 relaciona a T_g das sínteses em função da massa molar ponderal média (M_w), sendo facilmente visualizado que a região onde os valores de T_g são os mais baixos é aquela onde as sínteses apresentaram valores mais baixos de massa molar. As demais sínteses, apresentaram valores de T_g bastante próximos ao observado pelo PLDLA da empresa PURAC (T_g 60 °C), cujo valor foi tomado para efeito de comparação.

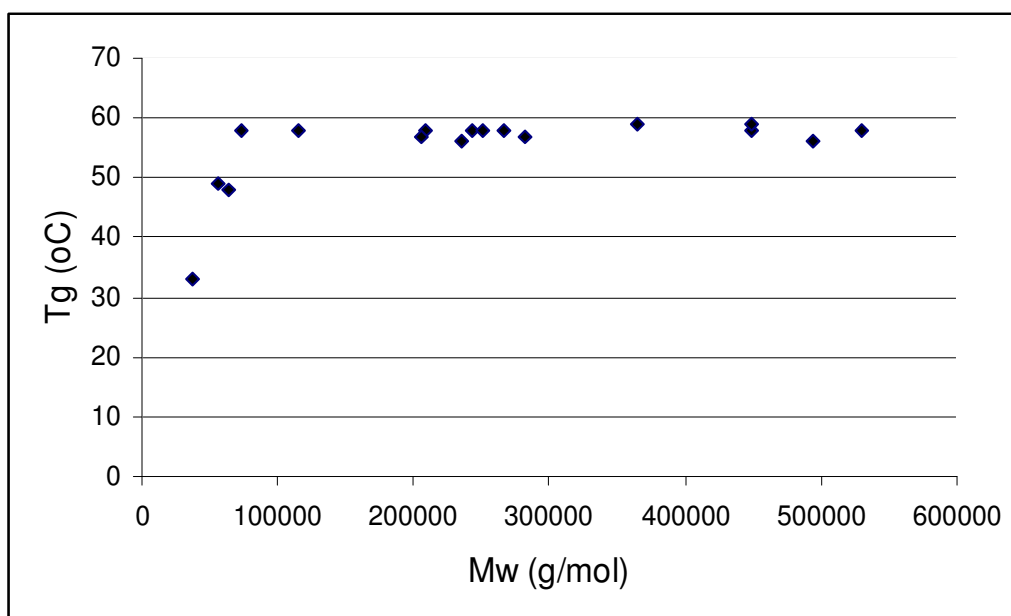


Figura 4.15: Temperatura de transição vítrea (T_g) em função da massa molar ponderal média (M_w).

A Figura 4.16 é referente ao DSC do 2º aquecimento para as sínteses dos copolímeros sendo verificado somente a temperatura de transição vítrea (T_g). Como a história térmica do material nesta corrida já havia sido apagada, não se verificou nenhum resquício de cristalinidade para aquelas amostras mencionadas anteriormente (PLDLA-4, PLDLA-5 e PLDLA-8).

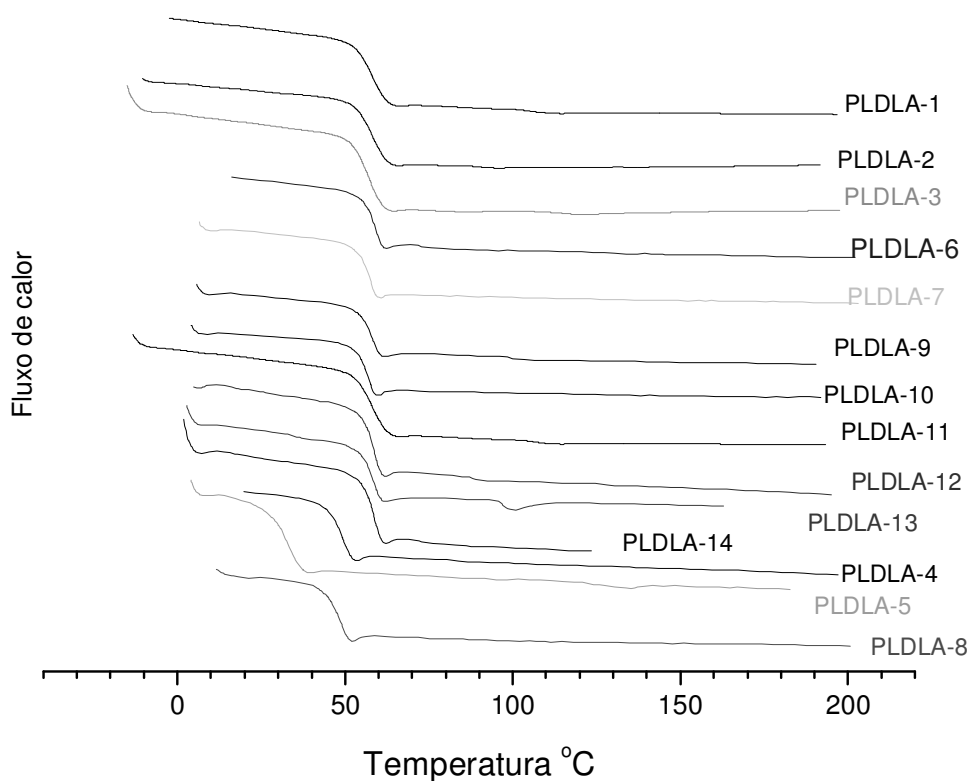


Figura 4.16: Curvas de DSC do segundo aquecimento das amostras de copolímero, após resfriamento a taxa constante de 30 °C/min, e novo aquecimento a 10°C/min.

4.2.5 Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos copolímeros foi analisada por análise termogravimétrica. As curvas termogravimétricas, Figura 4.17, apresentaram um único estágio de perda de massa para os copolímeros sintetizados, com início de perda de massa à temperatura próxima de 300 °C e a temperatura onde a perda de massa é máxima entre 320 e 360 °C.

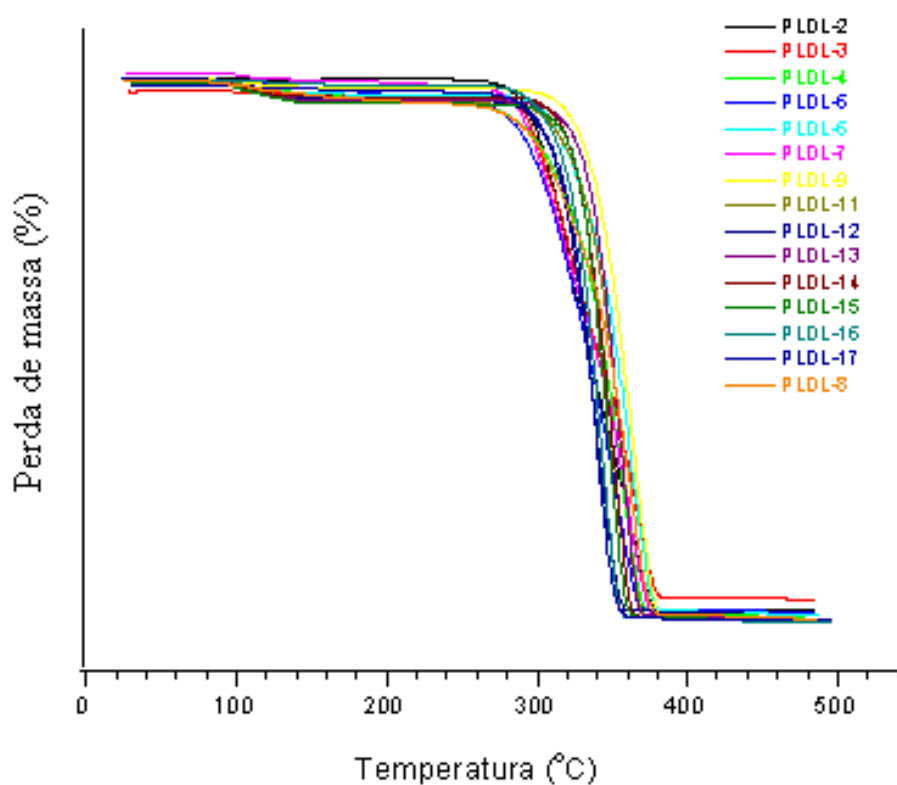


Figura 4.17: Curvas de perda de massa (%) em função da temperatura da análise termogravimétrica (TGA) das sínteses de PLDLA realizadas.

A Tabela 4.4 mostra os valores de temperatura inicial de perda de massa (*T_{onset}*) e temperatura onde a perda de massa é máxima (*T_d*), a qual foi obtida por meio do pico da derivada da curva (% massa x tempo) (dm%/ dt) em função da temperatura (T).

Tabela 4.4: Valores das temperaturas de início (*T_{onset}*) e máxima (*T_d*) de perda de massa para as várias sínteses de PLDLA.

Síntese	<i>T_{onset}</i> (°C)	<i>T_d</i> (°C)
PLDLA-1		
PLDLA-2	297	322
PLDLA-3	308	321
PLDLA-4	321	353
PLDLA-5	305	353
PLDLA-6	329	360
PLDLA-7	308	359
PLDLA-8	323	360
PLDLA-9	336	362
PLDLA-10	–	–
PLDLA-11	330	355
PLDLA-12	337	358
PLDLA-13	334	356
PLDLA-14	326	351
PLDLA-15	327	348
PLDLA-16	319	342
PLDLA-17	317	339

As curvas de TGA ilustradas a seguir, figura 4.18, são referentes às sínteses cujo procedimento já havia sido otimizado, em termos de relação monômero/catalisador. Nestes termogramas pode-se notar que todas os copolímeros, com exceção das sínteses numeradas como 16 e 17, apresentaram perda de massa numa temperatura próxima a 90°C provavelmente referente ainda à presença do solvente metanol, empregado no processo de precipitação do copolímero.

Para eliminar este problema a temperatura de secagem, em estufa a vácuo, a qual o copolímero foi submetido foi elevada de 40 °C para 60 °C , dessa forma, todo o solvente foi eliminado e a perda de massa do material ficou restrita à temperatura que inicia a degradação, por volta de 300 °C, Figura 4.18e e 4.18f.

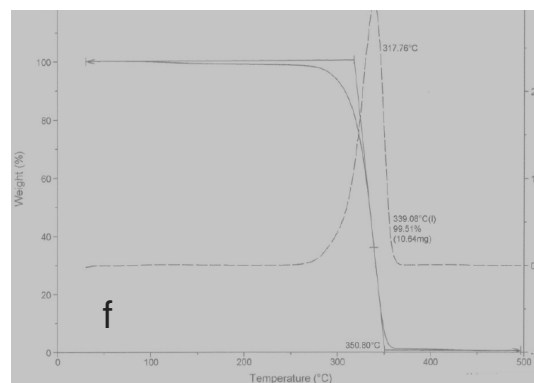
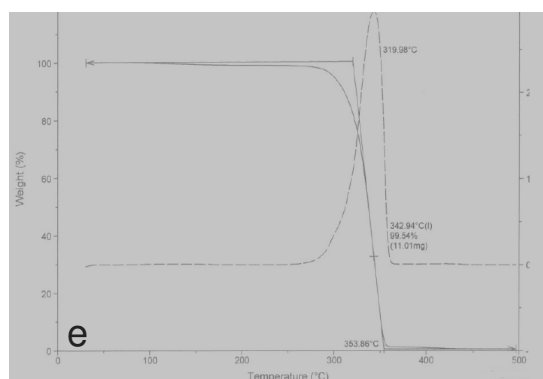
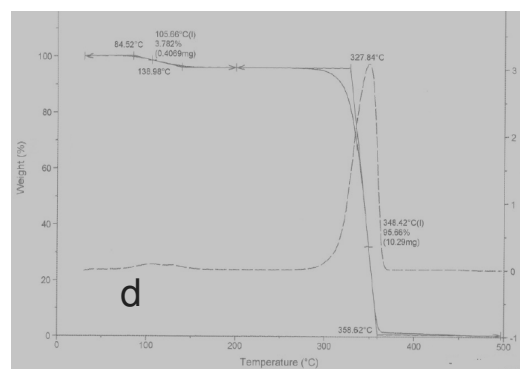
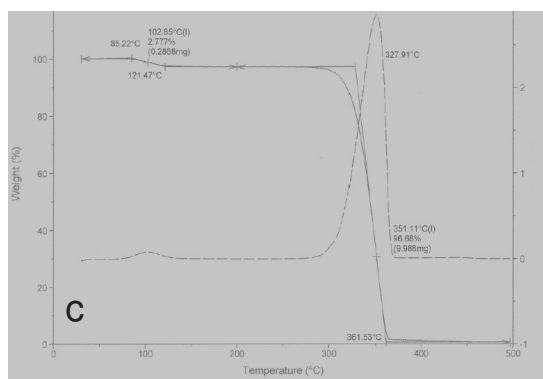
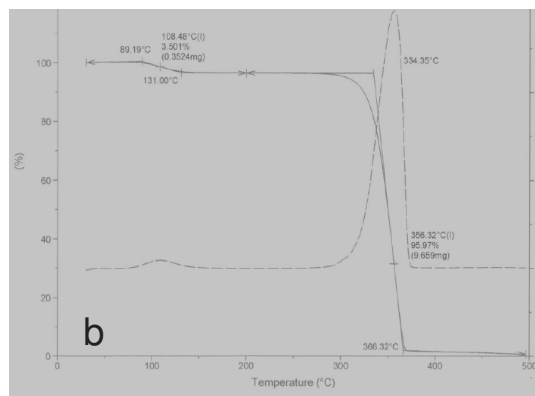
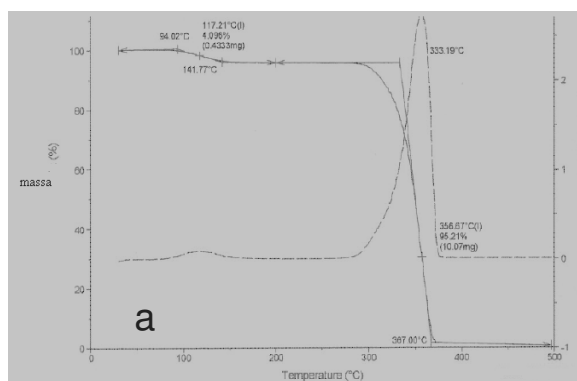


Figura 4.18: Análises termogravimétricas para algumas sínteses de PLDLA realizadas, onde *a,b,c,d, e,f*, representam PLDLA-11; PLDLA-13, PLDLA-14, PLDLA-15, PLDLA-16 e PLDLA-17.

Esse tipo de análise também direciona a escolha da temperatura de injeção mais adequada para a moldagem do material. Assim a temperatura de trabalho de injeção deve se manter muito abaixo da temperatura de início de degradação, sendo que de maneira geral, o ideal é trabalharmos com a mínima temperatura possível para a injeção, já que este é um processo que causa naturalmente queda na massa molar do material. (Gogolewski *et al.*, 1993).

4.3 Caracterização dos dispositivos obtidos por injeção

A moldagem por injeção possibilita a obtenção de dispositivos com geometrias das mais diversificadas possíveis, e nesse estudo foram obtidos dispositivos na forma de placas e parafusos, Figura 4.19.

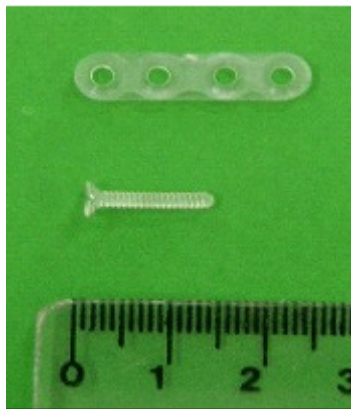


Figura 4.19: Foto dos dispositivos processados por injeção do PLDLA-11.

Como já mencionado na revisão bibliográfica, os vários tipos de processamento empregados na moldagem de polímeros, como o processamento por extrusão, moldagem por injeção e moldagem por compressão causam nestes materiais uma acentuada queda nos valores de massa molar, prejudicando assim suas propriedades mecânicas. (Gogolewski *et al.*, 1993).

4.3.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Para acompanhar o efeito do processo de moldagem por injeção sobre os copolímeros sintetizados, os dispositivos foram submetidos à análise por cromatografia de permeação em gel (GPC). A Tabela 5 compara os valores de massa molar (M_w e M_n) antes e após o processamento, tomando-se como exemplos três sínteses: PLDLA-7, que representa uma síntese de massa molar inicial alta; PLDLA-8, que representa uma síntese de massa molar inicial baixa e PLDLA-11, que possui alto valor de massa molar inicial e representa um material obtido em condições de síntese otimizadas.

Tabela 4.5: Valores de M_w e M_n de três sínteses antes e após o processamento via injeção.

Sínteses	Antes do processamento		Após o processamento	
	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	M_n (g/mol)
PLDL-7	114889	74120	76 727	42 293
PLDL-8	63122	39345	45105	23066
PLDL-11	282700	131354	198000	110000

A queda no valor da massa molar após o processamento do copolímero é bastante expressiva, por volta de 30 %, o que está de acordo com o relatado pela literatura, onde se verificam quedas em torno de 45% após a submissão do material polimérico ao processamento via injeção em decorrência da degradação causada pela associação dos fatores cisalhamento x temperatura, no decorrer do processo. (Weiler & Gogolewski, 1996).

De acordo Shyamroy (2003) os valores de massas molares apresentados pelas sínteses PLDLA-7 e PLDLA-8, não atenderiam às necessidades exigidas para esse tipo de aplicação, portanto das três sínteses selecionadas, o PLDLA-11 foi escolhido para o estudo *in vitro*, pois mantém alta massa molar após o processamento.

4.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A figura 4.20 apresenta as micrografias das análises de MEV da superfície da fratura das placas. Verifica-se uma morfologia completamente densa do material.

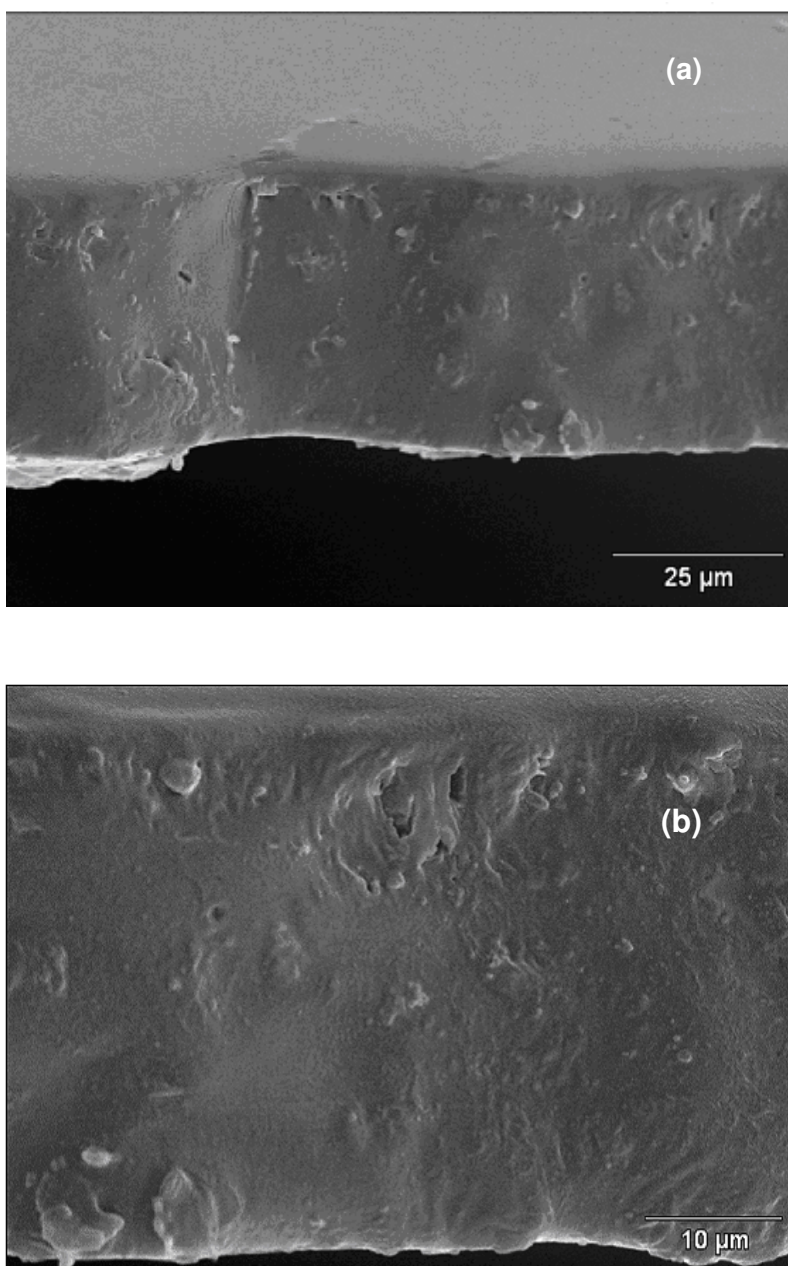


Figura 4.20: Fotomicrografias das superfícies da fratura das placas de PLDLA-11 a) BAR = 25 µm b) BAR = 10 µm

Por meio dessas fotomicrografias pode-se afirmar que o processamento para a obtenção dos dispositivos ocorreu de forma satisfatória, também quanto à morfologia, o que foi evidenciado pela ausência de porosidade em seu interior, além do aspecto homogêneo apresentado pelas placas. Segundo Fang *et al*, 2005 uma morfologia porosa acarreta numa diminuição de propriedades mecânicas, tornando-se um fator limitante para dispositivos destinados à fixação óssea.

4.3.3 Ensaio de flexão

Foram realizados ensaios mecânicos de flexão a 3 pontos nas placas do copolímero sintetizado. O ensaio seguiu os parâmetros da Norma ASTM D 709. A figura 4.21 é uma comparação do valor de tensão (σ) obtido por meio do ensaio de flexão para os dispositivos de PLDLA-11 do trabalho e de placas de um PLDLA comercial (Osteo-pin), sendo que os dados referentes a amostra do copolímero sintetizado representam uma média de 5 medidas.

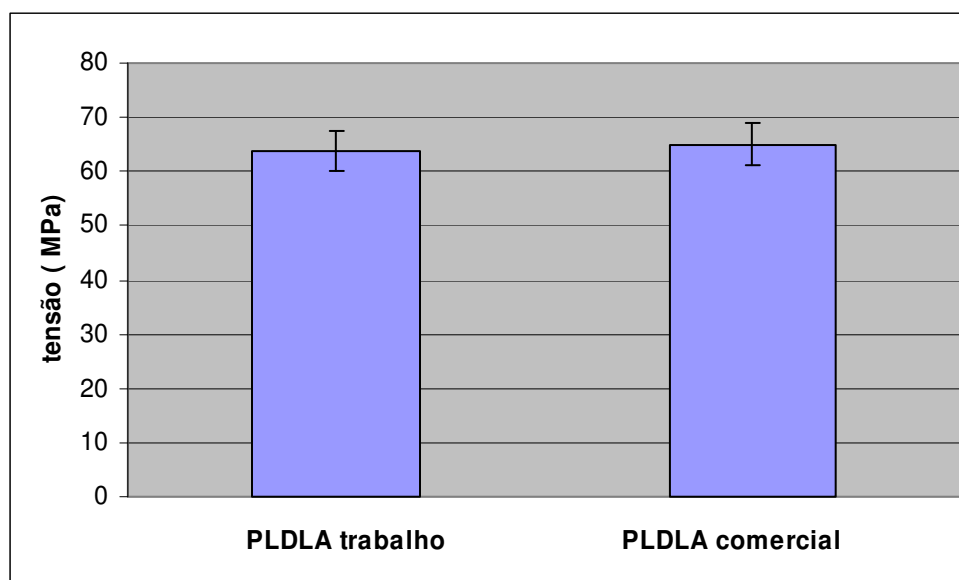


Figura 4.21: Resultados de tensão (σ) obtida por meio do ensaio de flexão do copolímero PLDLA sintetizado e de um copolímero comercial (Osteo-pin Tm)

O dispositivo na forma de placas obtido neste trabalho apresentou valor de tensão (σ) de $63,8 \pm 3,8$ MPa enquanto o PLDLA comercial apresenta σ de $65 \pm 3,6$ MPa (Kellomaki *et al.*, 2000). Os resultados demonstraram que a σ do copolímero do trabalho é muito próxima à verificada pelo copolímero comercial (Osteo-Pin TM), evidenciando a qualidade do dispositivo.

Através do ensaio pôde-se obter também o módulo de elasticidade do copolímero, e a Figura 4.22 mostra os resultados das análises feitas em 5 corpos-de-prova (placa) do copolímero PLDLA-11, sendo que média do módulo para o copolímero sintetizado foi de $2088 \text{ MPa} \pm 66$ MPa.

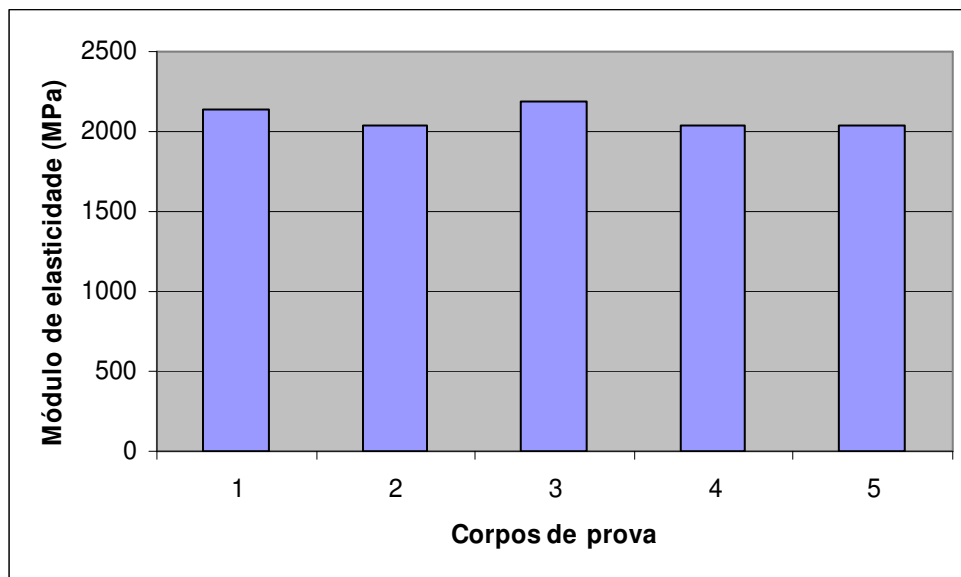


Figura 4.22: Resultados do módulo de elasticidade do copolímero PLDLA-11 sintetizado (média do módulo de elasticidade = 2088 ± 65 MPa).

4.3.4 Estudo Citotóxico do dispositivo PLDLA sintetizado.

O resultado da análise de citotoxicidade, para os parafusos obtidos por moldagem via injeção, mostraram que os dispositivos não apresentaram efeito tóxico para a linhagem celular estudada, como pode ser verificado pelo relatório da empresa Medlab (Anexo 1).

Os demais ensaios (DSC, TGA) referentes ao copolímero PLDLA, após processamento na forma de placas, será apresentado na parte do estudo *in vitro* (tempo 0).

4.4 Estudo da degradação *in vitro* das placas de PLDLA

A seguir serão relatados os resultados obtidos da degradação *in vitro* do poli (L-co-DL ácido láctico). O dispositivo escolhido para o estudo, como já mencionado no capítulo materiais e métodos, foi o PLDLA-11. Um total de 9 placas foram colocadas 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, 2, 4, 8, 16 , 30 semanas)

4.4.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

A massa molar das placas foi acompanhada pela técnica de GPC. Esse é um dos parâmetros fundamentais quando se quer estudar a degradação de um material polimérico, tendo em vista que a perda da massa molar afeta diretamente as propriedades mecânicas do material (Gogolewsk, 2000). A Tabela 4.6 mostra a massa molar em função do tempo de degradação.

Tabela 4.6: Variação das massas molares do dispositivo durante a degradação *in vitro*.

PLDLA	M_w g/mol	M_n g/mol	IP (M_w/M_n)
0 semanas	198000	110000	1,8
2 semanas	168241	99290	1,7
4 semanas	150492	87304	1,7
8 semanas	97830	55591	1,8
16 semanas	66358	34823	1,9
18 semanas	41457	25241	1,6
20 semanas	38973	26552	1,5
26 semanas	2439	1824	1,3

A análise dos resultados da Tabela 6 pode-se afirmar que o processo de degradação *in vitro* influencia a perda de massa molar do dispositivo logo nas 2 primeiras semanas de estudo, sendo que com aproximadamente 8 semanas ocorre uma queda superior a 50 % da massa molar inicial, seguido por um decréscimo expressivo após 16 semanas.

A figura 4.23 mostra a variação de M_w e M_n em função do tempo de degradação, respectivamente.

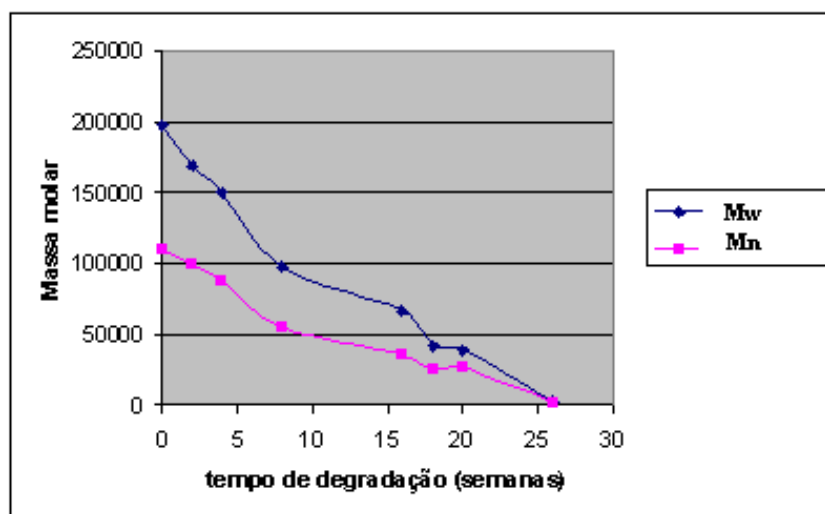


Figura 4.23: Variação de M_w e M_n em função do tempo de degradação para dispositivo PLDLA.

De maneira geral, tanto a massa molar ponderal média (Mw) como a massa molar numérica (Mn) são os parâmetros mais sensíveis para o estudo da degradação *in vitro* dessa classe de polímeros bioreabsorvíveis (Lemmouchi *et al.*, 1998). A queda do tamanho das cadeias (Mw) é acompanhada pela queda no número de cadeias (Mn) ao longo do processo de degradação. O perfil de queda de massa molar apresentado pelo copolímero PLDLA foi compatível com um estudo realizado por Lemmouchi (1998), em que foi verificado o comportamento de queda de massa molar em função do tempo de degradação para vários materiais poliméricos.

A Figura 4.24 mostra a porcentagem de Mw inicial durante a degradação *in vitro* do dispositivo de PLDLA sintetizado neste trabalho:

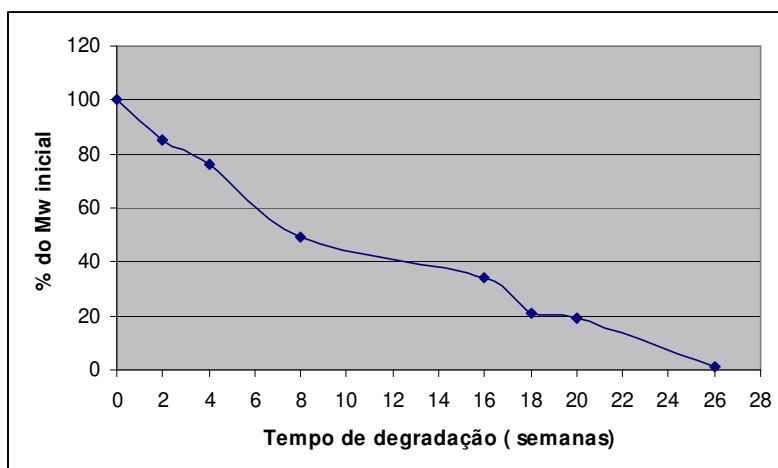


Figura 4.24: Porcentagem de Mw inicial em função do tempo de degradação do dispositivo PLDLA.

A literatura (Pitt *et al.*, 1981) relaciona a queda inicial da massa molar, no processo de hidrólise dos poliésteres alifáticos, à degradação preferencial que as regiões amorfas apresentam durante a entrada das moléculas de água nas cadeias do polímero. Num estudo Lemmouchi *et al.*, verificou que a queda da massa molar de um copolímero da família dos poliésteres alifáticos era mais intensa quanto maior fosse a concentração de partes amorfas DL-lactide em sua sequência.

Como já mencionado na parte da revisão bibliográfica, a queda na massa molar de dispositivos é precedida de queda de propriedades mecânicas, Peitzak *et al.* (1997), sendo assim,

se essa queda da massa molar logo no início do implante se der de maneira muito intensa, o dispositivo perderá suas propriedades mecânicas num período onde a consolidação óssea ainda não ocorreu.

Para este estudo foi verificado, nas duas primeiras semanas, uma queda de massa molar do copolímero de 15%, já num estudo desenvolvido por Duek *et al.* (1999), em que a degradação *in vitro* de pinos de PLLA foi avaliada, a porcentagem de queda da massa molar do homopolímero semicristalino foi de 45% nas 2 primeiras semanas de estudo, o que provocou uma queda significativa das propriedades mecânicas desses dispositivos neste curto período, tornando-os impróprios para determinadas aplicações na fixação de fraturas. No caso do homopolímero, PLLA, a região cristalina age de forma a dificultar a difusão das moléculas de água na cadeia polimérica, prejudicando assim o processo de hidrólise nessas regiões, razão pela qual é possível encontrar fragmentos do PLLA muitas anos após o implante (Moser *et al.*, 2005).

4.4.2 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A degradação *in vitro* das placas de PLDLA foi acompanhada por meio dos resultados obtidos nos 1º e 2º aquecimentos pela técnica de DSC, Figuras 4.25 e 4.26, respectivamente. Pode ser claramente visualizado tanto no 1º aquecimento, quanto no 2º aquecimento que até a segunda semana de degradação o material se mostra completamente amorfo, apresentando, portanto somente temperatura de transição vítrea (T_g). Já na 4ª semana de estudo pode-se verificar a presença do pico endotérmico, o que caracteriza a presença de cristais. Esse pico é mais acentuado após 4 semanas, sendo que na 8ª semana é praticamente imperceptível, e na 16ª semana de estudo é inexistente. Contudo, no período onde restam apenas fragmentos do dispositivo, por volta de 30 semanas de estudo, e onde as cadeias poliméricas do material não passam de oligômeros, verifica-se novamente a presença de cristais.

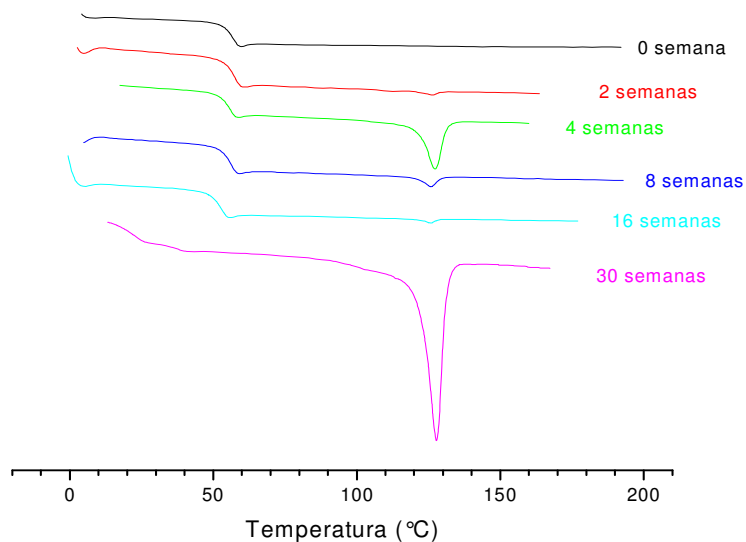


Figura 4.25: Termogramas de DSC do 1º aquecimento do PLDLA em função do tempo de degradação.

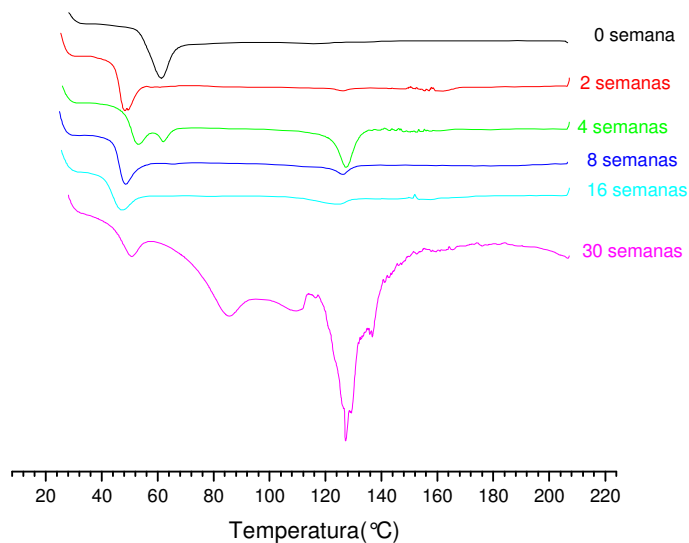


Figura 4.26: Termogramas de DSC do 2º aquecimento de membranas de PLDLA em função do tempo de degradação.

A Tabela 4.7 mostra os valores obtidos por DSC das amostras de PLDLA em função do tempo de degradação.

Tabela 4.7: Variação da T_g , T_m e ΔH_m das amostras de PLDLA em função do tempo de degradação.

PLDLA	T_g (°C)	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)
0 semanas	57	---	---
2 semanas	57	---	---
4 semanas	56	127	7
8 semanas	56	126	2
16 semanas	53	---	---
30 semanas	35	126	19

Esse comportamento está de acordo com o relatado na literatura (Leiggener *et al.*, 2006), que afirma que a degradação do PLDLA não gera fragmentos altamente cristalinos, como pode ser verificado pelos baixos valores de ΔH_m associado aos cristalitos do PLDLA. No caso do homopolímero PLLA, o processo de degradação gera cristais com valores de energia associada ΔH_m muito maiores, como foi verificado por Motta 2006. A Tabela 4.8 mostra os resultados da degradação de filmes de PLLA, para efeito de comparação, com os valores apresentados pelo copolímero PLDLA durante o estudo *in vitro*.

Tabela 4.8: Variação da T_m , ΔH_m e χ das amostras de PLLA em função do tempo de degradação. Motta (2006)

PLLA	T_m (°C)	ΔH_m (J/g)	$\chi(\%)$
0 semanas	180	41	43
2 semanas	181	41	44
4 semanas	180	48	51
8 semanas	180	48	51
16 semanas	178	54	57

onde (χ) grau de cristalinidade

A ausência de fragmentos altamente cristalinos, durante o processo de degradação do copolímero, contribui para que as reações no tecido circunjacente ao implante do copolímero

sejam muito mais leves do que no homopolímero (Landes *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 2001, Rehm, 1997).

Provavelmente o surgimento desse vestígio de cristalinidade para o PLDLA, no decorrer do processo de degradação, esteja associado à diminuição de tamanho das cadeias, o que gera uma maior liberdade para seus segmentos, permitindo assim, que cristalizem sob as condições de degradação (37 °C, meio aquoso) (Li *et al.*, 1990).

A queda apresentada pela T_g do copolímero, em função do tempo de degradação, no período de 0 a 16 semanas de estudo (57 °C com 0 semanas para 53 °C em 16 semanas) é pequena, só ocorrendo de forma significativa num período onde o processo de degradação se mostrava intenso (30 semanas).

A Figura 4.27, mostra a queda da T_g durante o processo de degradação, sendo possível verificar que, a T_g só é significativamente afetada quando a degradação já é intensa (30 semanas).

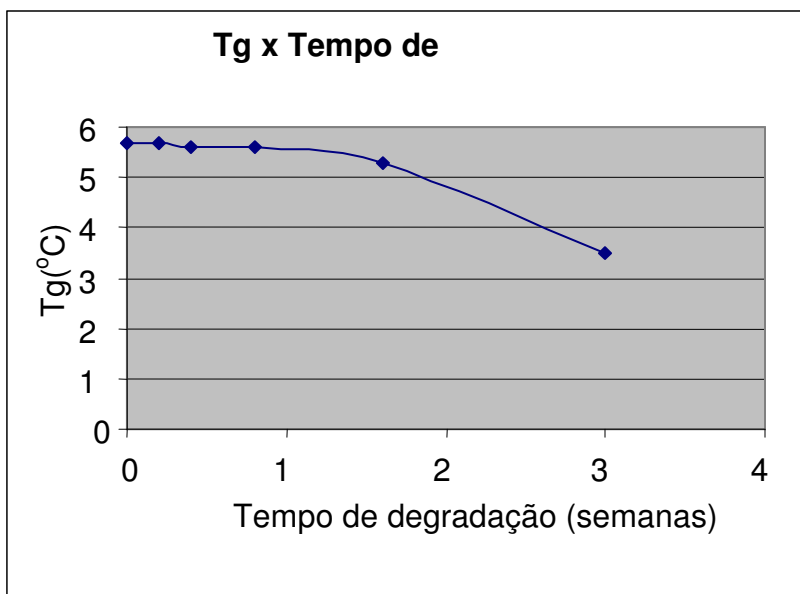


Figura 4.27: Variação da T_g em função do tempo de degradação.

Como o processo de degradação de dispositivos bioreabsorvíveis está sujeito a interferências de vários parâmetros, como composição química, morfologia, presença ou não de cristalinidade, valor de massa molar, entre outros, Li *et al.* (1990b), mostrou que a inter-relação

existente entre esses fatores impede que os mesmos sejam tratados isoladamente. Dessa forma, é válido fazer uma correlação entre as análises.

Um paralelo entre a queda da massa molar e a queda do valor de Tg durante o estudo *in vitro*, é mostrada na Figura 4.28:

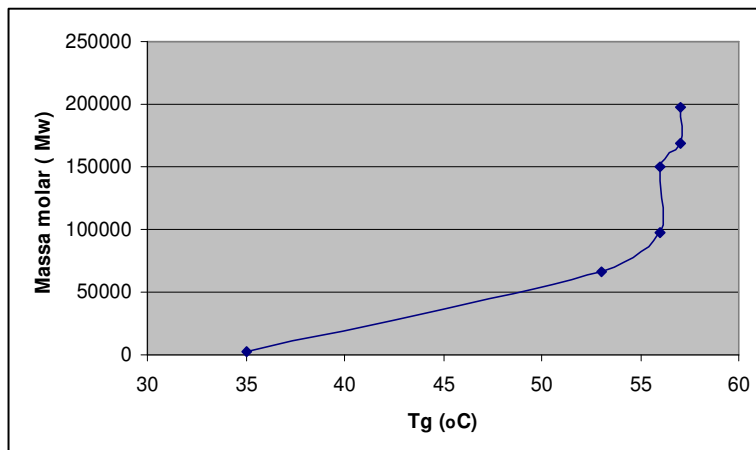


Figura 4.28: Variação da Tg em função da queda na massa molar durante o estudo *in vitro* em tampão fosfato.

Embora a massa molar sofra uma queda significativa entre 4 e 8 semanas de estudo *in vitro* a Tg neste mesmo período não sofre alteração nenhuma, somente apresentando uma queda significativa entre 16 e 30 semanas, período esse em que a massa molar já havia caído a ponto de tornar possível a mobilidade das cadeias do copolímero numa temperatura menor.

A Tg sofre influência da massa molar, sendo que, de maneira geral, quanto maior a massa molar de um polímero maior é sua temperatura de transição vítrea (Tg).

4.4.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

A estabilidade térmica dos copolímeros, durante o processo de degradação, foi analisada por análise termogravimétrica (TGA). As curvas termogravimétricas, apresentadas na Figura 4.29, apresentaram um único estágio de perda de massa para os copolímeros sintetizados.

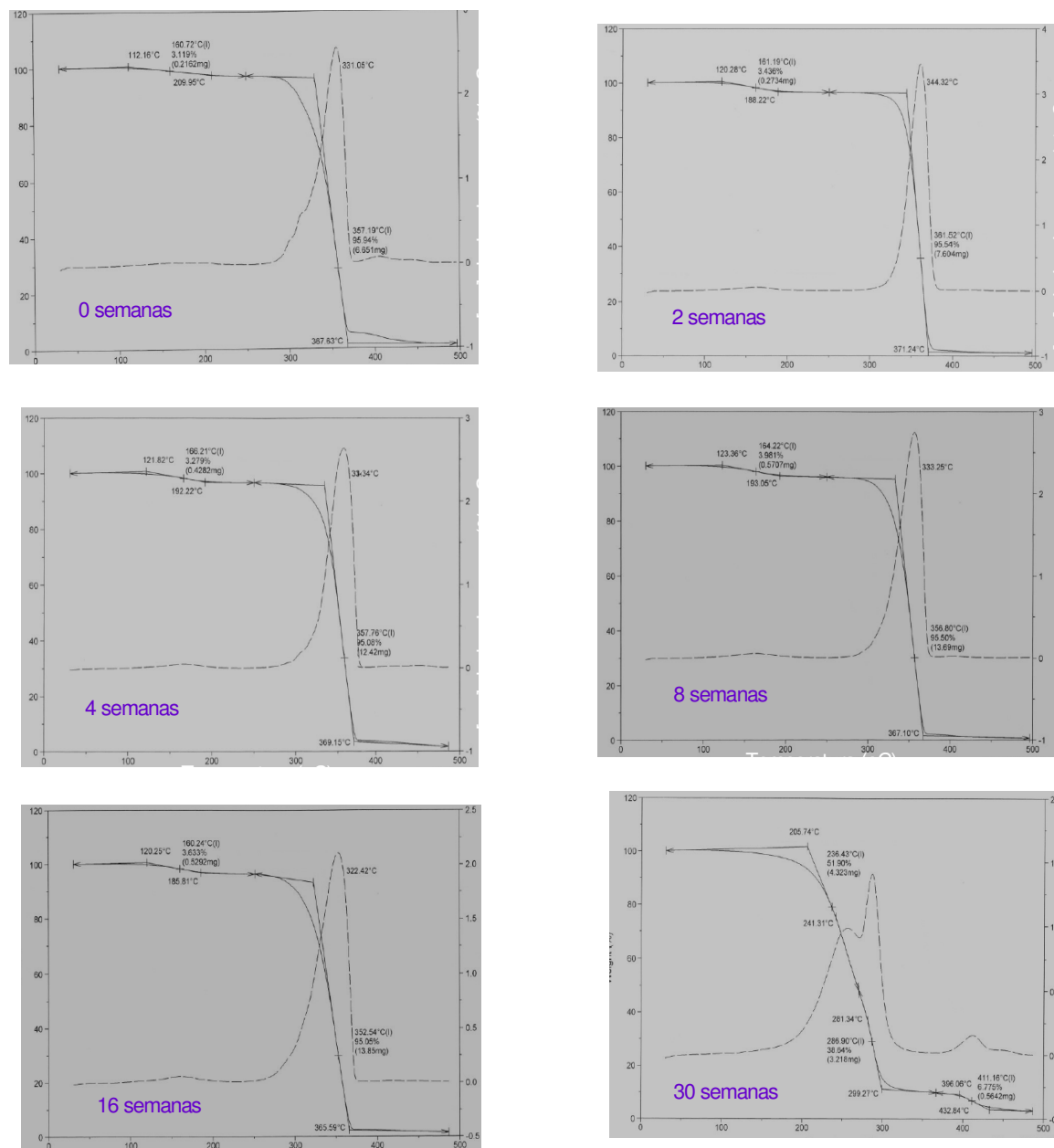


Figura 4.29: Análises termogravimétricas da degradação *in vitro* do dispositivo de PLDLA em função do tempo de degradação.

A Tabela 4.9 é referente às temperaturas de início de perda de massa durante a degradação, obtidas a partir da figura 4.29.

Tabela 4.9 - Dados de Temperatura de início de perda de massa para o dispositivo de PLDLA durante os vários tempos de estudo *in vitro*.

Tempo degradação (semanas)	<i>Tonset</i> (°C)
0	331
2	344
4	331
8	333
16	322
30	205

A Figura 4.30 correlaciona a *Tonset* em função do tempo de degradação das placas.

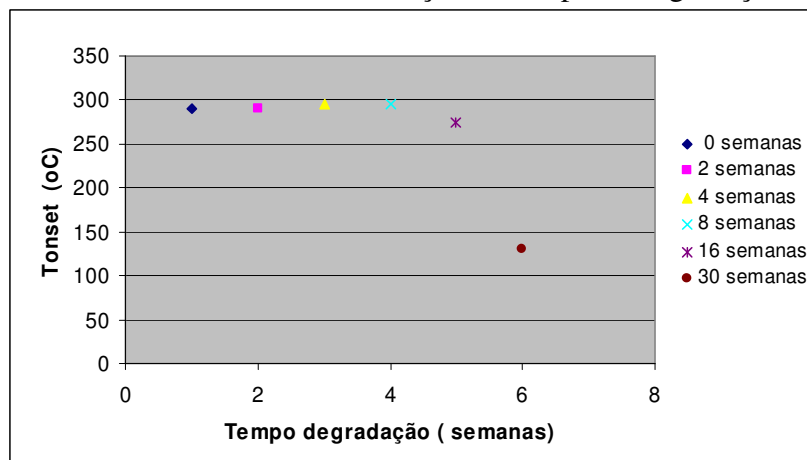


Figura 4.30: Variação da temperatura de início de degradação térmica (*Tonset*) para o dispositivo de PLDLA durante a degradação *in vitro* em meio tampão fosfato.

A análise termogravimétrica da degradação *in vitro* do dispositivo de PLDLA demonstrou que até 16 semanas 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 330 °C.

A queda no valor de T_{onset} torna-se brusca entre 16 e 30 semanas, assim como verificado também para a T_g do material, que sofreu influência somente nesse período, como constatado por meio da técnica de DSC, confirmando a estabilidade térmica do material até 16 semanas.

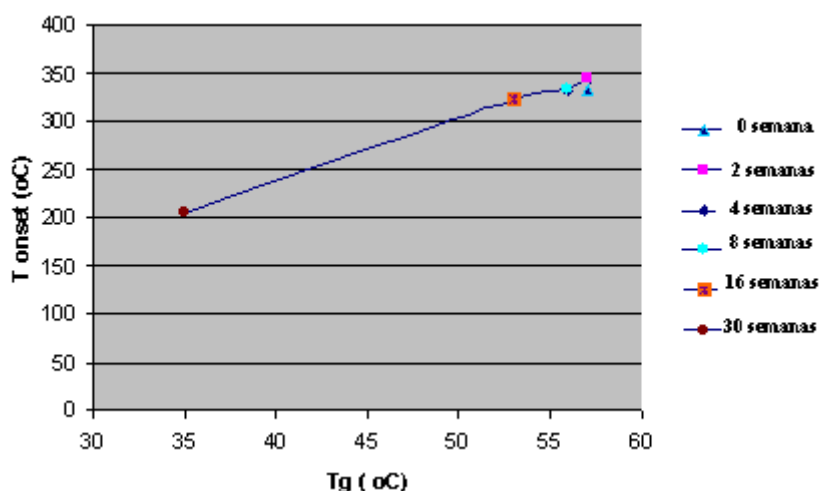


Figura 4.31: Variação da temperatura de início de degradação térmica (T_{onset}) e da temperatura de transição vítrea (T_g) durante a degradação *in vitro* em meio tampão fosfato

4.4.4 Propriedades mecânicas durante a degradação

Foi verificada redução das propriedades mecânica do dispositivo de PLDLA 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 Tabela 4.10 e as Figuras 4.32 e 4.33 são referentes ao módulo de flexão e da tensão em função do tempo de degradação, respectivamente.

A tabela 4.10 é referente aos dados obtidos das análises do PLDLA-11 em função do tempo de degradação em tampão fosfato. Os resultados obtidos foram obtidos até o tempo de 16

semanas, pois com 30 semanas o material se encontrava num estágio avançado de degradação impedindo a realização do teste mecânico.

Tabela 4.10: Variação da σ (MPa) e módulo de elasticidade (GPa) para o dispositivo PLDLA em função do tempo de degradação em tampão fosfato.

Período semanas	σ máx (MPa)	Módulo elasticidade GPa
0	63,8	2,09
2	56,5	1,46
4	56,5	1,46
8	55,6	1,54
16	52,9	1,59

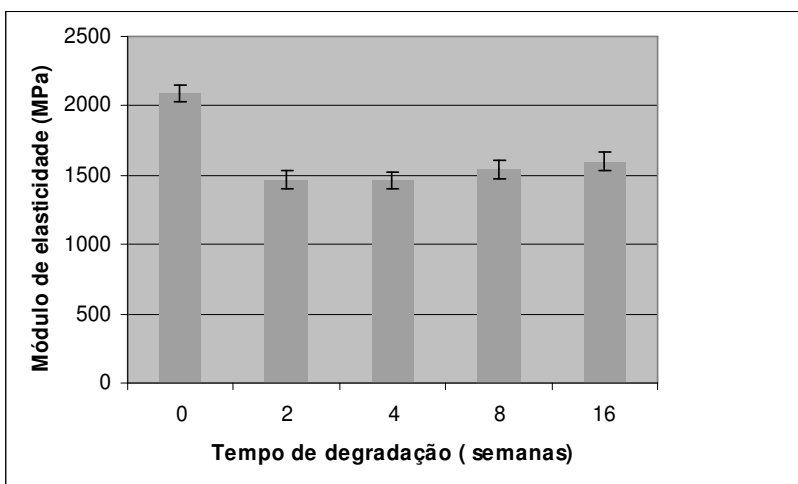


Figura 4.32: Módulo de elasticidade no ensaio mecânico de flexão de dispositivo PLDLA durante degradação *in vitro* em meio tampão fosfato.

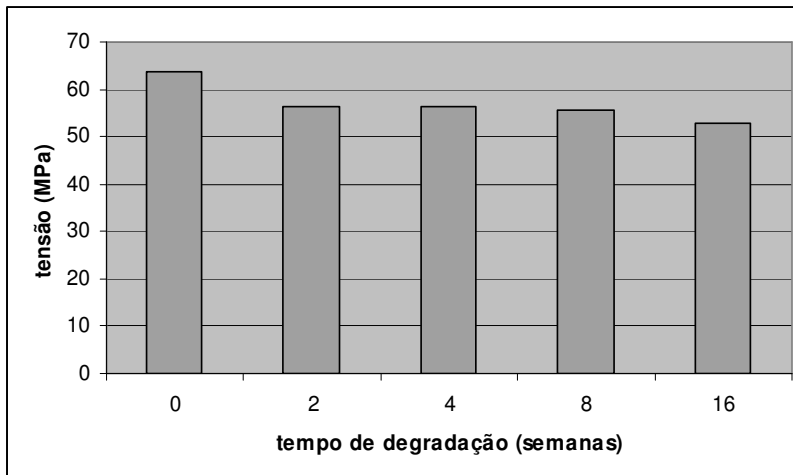


Figura 4.33: Tensão (σ) obtida por meio *equação 2*, no ensaio mecânico de flexão de dispositivo PLDLA durante degradação *in vitro* em meio tampão fosfato.

A Figura 4.34 é referente à retenção do módulo de elasticidade em função do tempo de degradação.

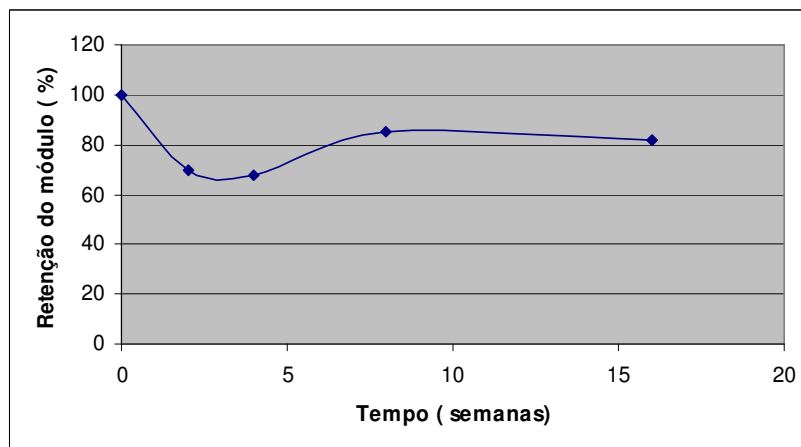


Figura 4.34: Porcentagem de retenção do módulo em função do tempo de degradação.

Pode-se verificar que o dispositivo de PLDLA sintetizado neste trabalho consegue reter praticamente 80 % de seu módulo num período de 4 meses, bastante compatível, portanto, com o tempo requerido para uma consolidação óssea, que segundo Tatum *et al.* (1997) leva de aproximadamente 3 meses. Esse padrão de perda de massa está de acordo com a literatura, que

relata que, para dispositivos na forma de placas e parafusos de PLDLA, ocorre uma perda de resistência do material por volta de 3 a 4 meses (Turvey *et al.*, 2002).

O perfil de perda de propriedade mecânica do copolímero PLDLA mostra mais uma vantagem sob o homopolímero PLLA, o qual possui como característica perder suas propriedades mecânicas muito rapidamente, por volta de 2 semanas (Duek *et al.*, 1999 ; Suming *et al.*, 1990).

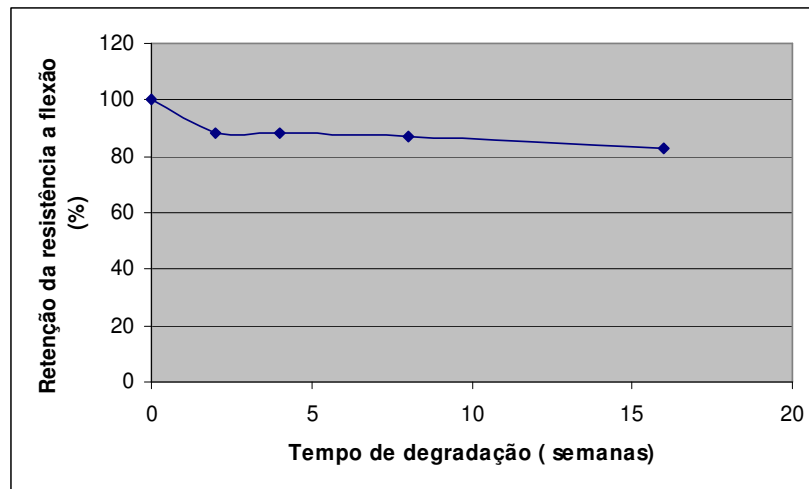


Figura 4.35: Porcentagem de retenção da tensão em função do tempo de degradação.

A comparação entre dados de estudos de degradação *in vitro* publicados na literatura pode ser difícil, devido a inúmeras diferenças entre os estudos. Esses fatores que podem alterar os resultados incluem, a composição do material de estudo, processamento, armazenamento da amostra e tipos de testes mecânicos (Moser *et al.*, 2005).

De qualquer forma, os resultados do estudo *in vitro* apresentados têm o objetivo de servir somente como um simples modelo do comportamento do estudo *in vivo* dos implantes bioreabsorvíveis, tendo em vista que quando implantados esses dispositivos podem estar em contato com vários tecidos que podem afetar as características de degradação dos implantes.

Mouser *et al.* (2005), exemplifica as situações que dificultam a predição exata do estudo *in vitro* para a situação *in vivo*, dizendo que no caso do dispositivo polimérico *in vitro* a exposição à

solução tampão de PBS é muito grande, enquanto na situação *in vivo* os implantes podem estar expostos a um volume muito menor de fluídos. Além disso, a carga a que o implante estará sujeito, durante o período de recuperação óssea, pode variar, dependendo do local do implante, tendo essa carga, às vezes, uma magnitude maior do que a suportada pelo dispositivo.

Nesse contexto, as menores variações entre um estudo *in vitro* e um *in vivo* serão encontradas quando se sabe previamente que o implante estará numa região onde a exposição a carga é baixa, como no caso de certas aplicações craniofaciais, assim como relatado por Mouser *et al.* (2005).

Um dos copolímeros estudados por Mainil *et al.* (1997), quanto a degradação *in vitro* e *in vivo*, foi o poli(L-co-DL ácido lático), na relação 95:5, sendo constatado uma boa correlação entre esses estudos quando os critérios considerados foram variações na resistência mecânica e massa molar.

4.4.5 Degradação visual dos dispositivos:

A degradação visual do dispositivo coincide com os resultados obtidos das análises. A Figura 4.36 permite a visualização do processo de degradação do material.

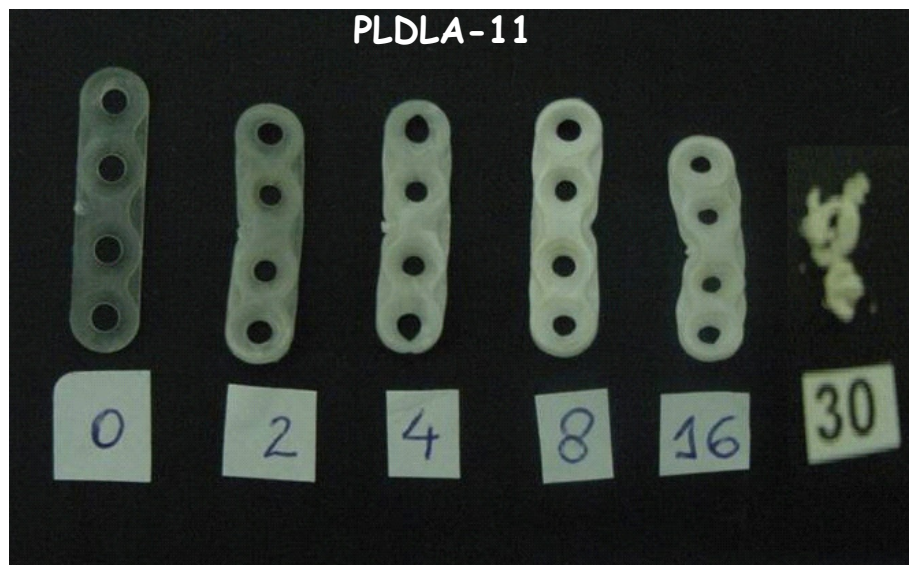


Figura 4.36: Acompanhamento visual do processo de degradação (em semanas) do dispositivo PLDLA.

A foto, Figura 4.36, pode ser observado que a placa inicialmente transparente, torna-se, opaca com o início do processo de degradação. É nítido o esbranquiçamento do dispositivo já a partir de 4 semanas de estudo, o que vem a ser um indício da influência do processo de degradação, em função da organização das cadeias durante a degradação. No decorrer do processo pode ser notada a deformação do material, sendo que em 16 semanas, além de estar completamente branco (sinal de sua fragilização), tem suas dimensões diminuídas.

4.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A morfologia do dispositivo de PLDLA foi acompanhada durante o período de imersão em tampão fosfato (37 °C) . A Figura 4.37 mostra a micrografia de superfície do PLDLA antes de ser iniciado o estudo da degradação e ao longo do tempo de estudo.

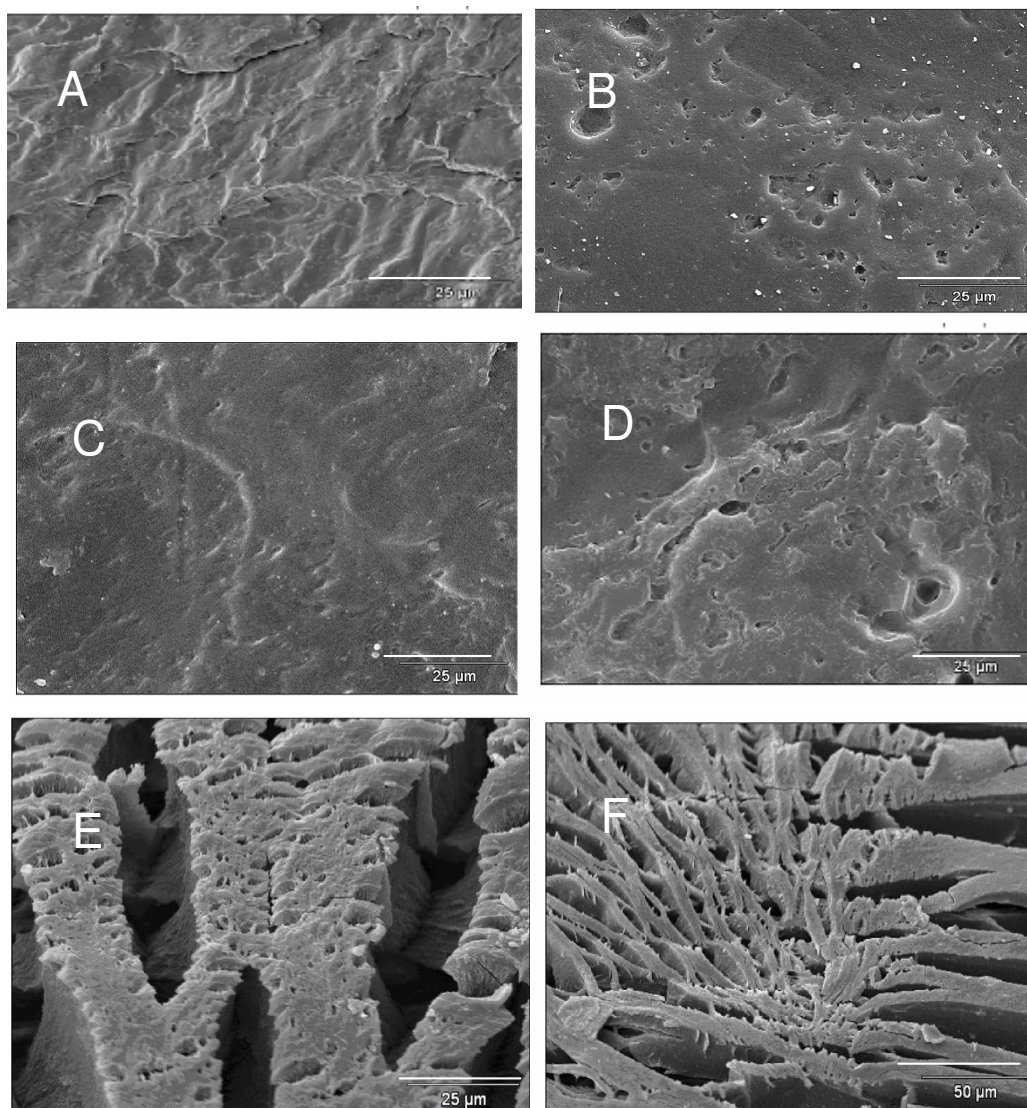


Figura 4.37: Microscopia eletrônica de varredura da superfície do dispositivo de PLDLA sendo A) antes degradação B) após 2 semanas; C) após 4 semanas; D) após 8 semanas; E) após 18 semanas e F) após 20 semanas.

Durante o processo de degradação em tampão fosfato, o dispositivo de PLDLA mostrou-se morfológicamente estável até 8 semanas de degradação *in vitro*, mantendo uma morfologia densa. A morfologia inicialmente densa, apresentada pelo dispositivo, é a requerida em aplicações destinadas a fixação de fraturas.

Ao longo do processo de degradação o aspecto morfológico do dispositivo muda para poroso, como pode ser verificado na (Figura 4.37 E), que mostra também a presença de fendas na superfície, indicando a intensa ação do processo de degradação sobre o material.

A Figura 4.37 F, referente a 20 semanas de degradação, permite a visualização desse aspecto poroso, interligado por fendas, que a superfície apresenta.

A estabilidade morfológica apresentada pelo dispositivo, nas primeiras semanas, está de acordo com os resultados verificados por outras técnicas, como as que avaliaram as propriedades térmicas do dispositivo durante o período de degradação em tampão fosfato. As técnicas de DSC e TGA mostraram, respectivamente, que a Tg do copolímero e a temperatura de início de degradação (*T onset*) mantiveram-se inalteradas durante as primeiras semanas de estudo *in vitro*.

Os resultados de MEV para as placas, durante o tempo de degradação, podem ser relacionados também com as propriedades mecânicas desses dispositivos, podendo ser verificado que durante as primeiras semanas de estudo a morfologia dos dispositivos continua densa ao mesmo tempo em que a % de perda de propriedade mecânica é baixa.

4.5 Estudo *In Vivo* e *in Vitro* do sistema placa parafuso de PLDLA

4.5.1 b) Estudo *in vitro* sistema placa-parafuso PLDLA

Estudo da resistência dos parafusos de PLDLA após a inserção dos mesmos na mandíbula sintética a base de poliuretano, utilizando como controle parafusos à base de liga de titânio:

Para os testes mecânicos foi realizada uma comparação do parafuso bioreabsorvível de PLDLA com parafuso constituído de titânio. Essa comparação é importante, pois fornece uma noção da força que o material sintetizado, no trabalho em questão, tem frente aos materiais metálicos, cuja utilização ainda se dá em grande escala.

Os valores das médias e desvio padrão da carga (Kgf) em deslocamento de 3mm dos parafusos de titânio e reabsorvíveis, nos testes de aplicação de força em incisivo e molar, estão apresentados na Tabela 4.11, e ilustrados nos gráficos das Figuras 4.38 e 4.39.

Tabela 4.11: Médias e desvio padrão da carga (Kgf) em deslocamento de 3mm, em função do tipo de parafusos e dos locais de aplicação de força dos testes de carregamento.

Tipo de parafuso	Locais de aplicação de Força	
	Incisivo	Molar
Titânio	2,05 (0,50)	6,63 (2,30)
Polímero PLDL	1,68 (0,40)	6,01 (1,08)

p incisivo = 0,084; p molar = 0,456

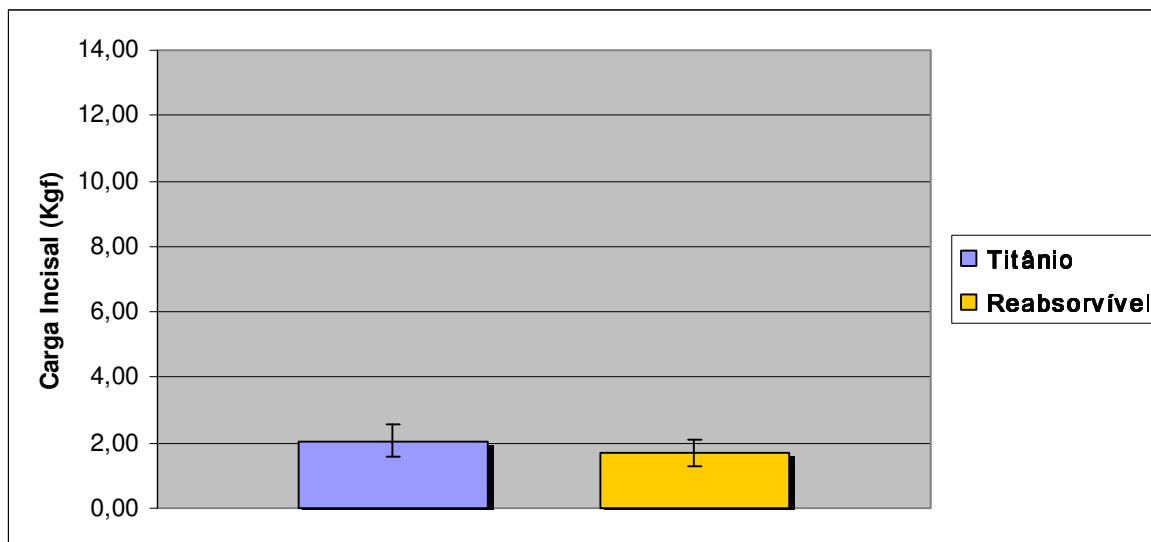


Figura 4.38: Gráfico contendo valores das médias de carga em deslocamento de 3mm para os parafusos de titânio e reabsorvíveis em aplicação de força em região de incisivo.

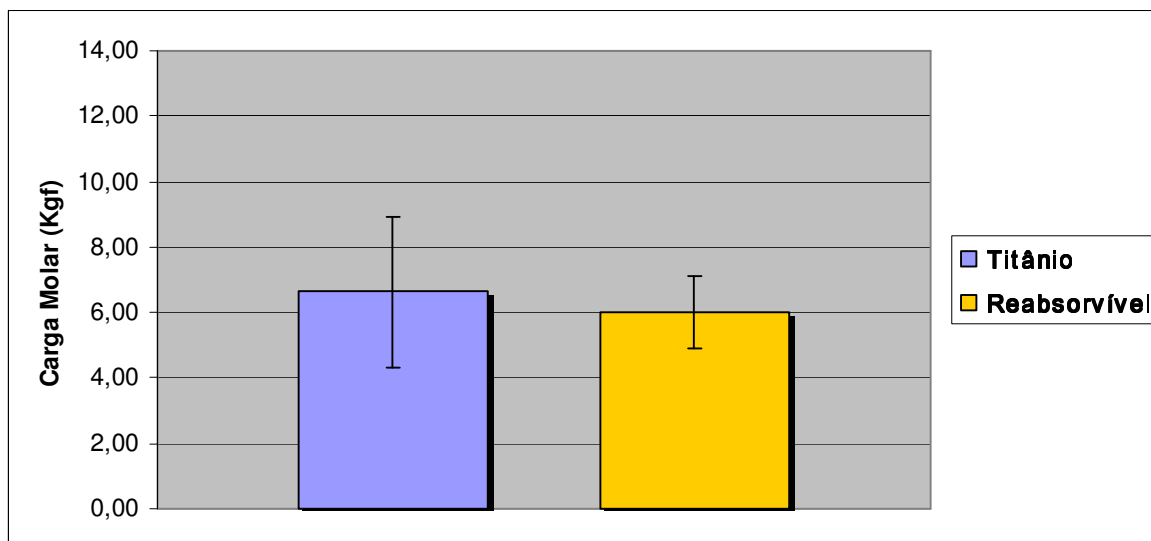


Figura 4.39.: Gráfico contendo valores das médias de carga em deslocamento de 3mm para os parafusos de titânio e reabsorvíveis em aplicação de força em região de molar.

Os valores das médias e desvio padrão da carga (Kgf) de pico máximo dos parafusos de titânio e reabsorvíveis, nos mesmos testes de aplicação de força, estão apresentados na Tabela 4.12, e ilustrados nos gráficos das Figuras 4.40 e 4.41.

Médias e desvio padrão da carga (Kgf) de pico máximo, em função do tipo de parafusos e dos locais de aplicação de força dos testes de carregamento.

Tabela 4.12: Médias e desvio padrão da carga (Kgf) de pico máximo, em função do tipo de parafusos e dos locais de aplicação de força dos testes de carregamento.

Tipo de parafuso	Locais de aplicação de Força	
	Incisivo	Molar
Titânio	4,70 (1,09)	10,52 (2,60)
Polímero PLDL	3,80 (0,57)	8,501 (2,0)

p incisivo = 0.663425; p molar = 0.074678.

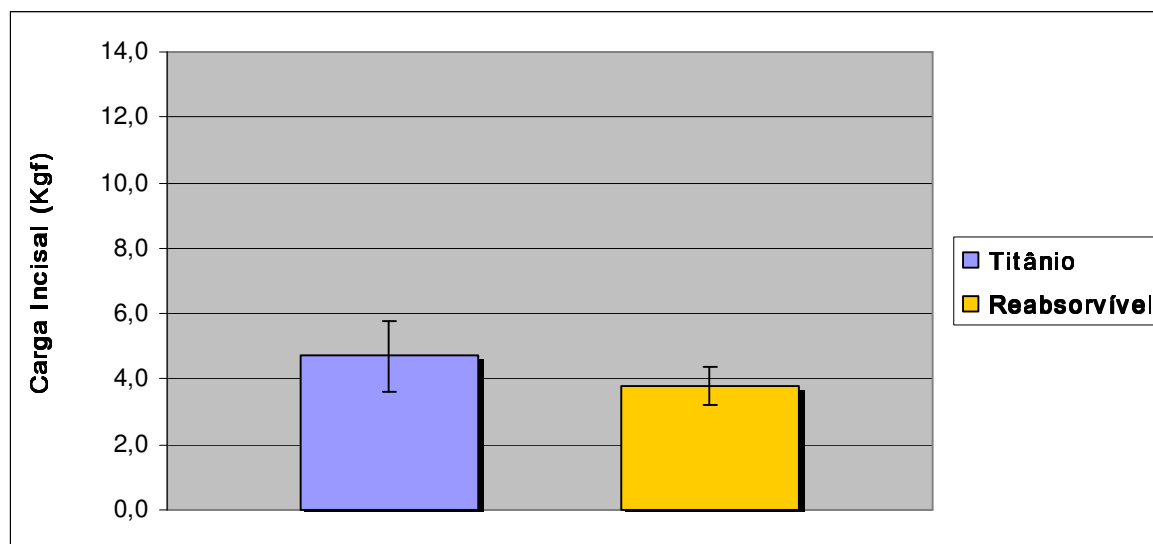


Figura 4.40: Valores das médias de carga do pico máximo para os parafusos de titânio e reabsorvíveis em aplicação de força em região de incisivo.

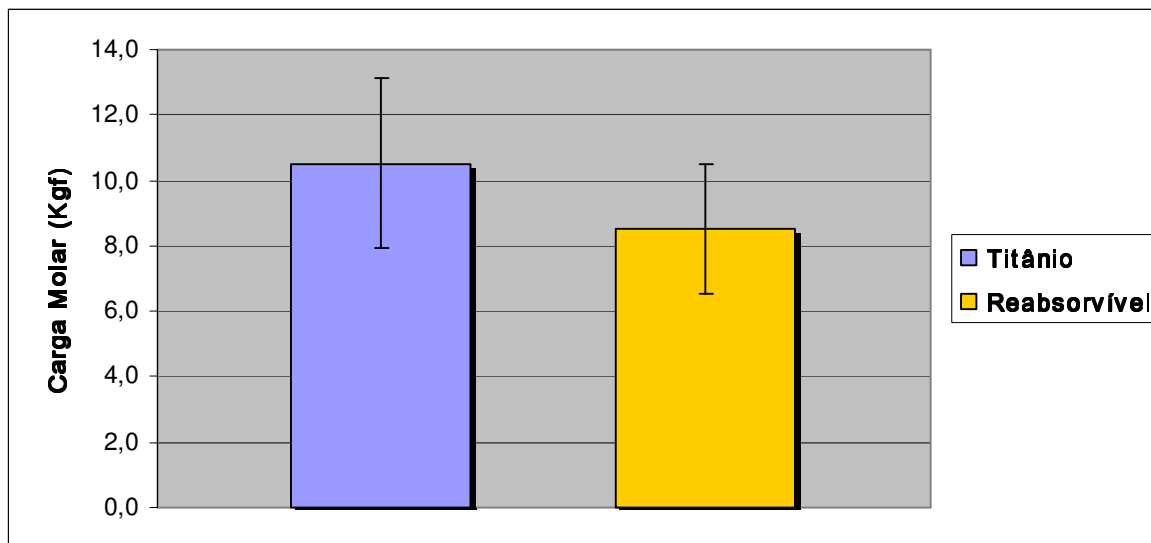


Figura 4.41: Valores das médias de carga do pico máximo para os parafusos de titânio e reabsorvíveis em aplicação de força em região de molar.

As médias e desvio padrão da carga em deslocamento de 3mm e em pico máximo indicaram que, nos testes de carregamento com ponto de aplicação de força no incisivo e no molar, a fixação interna rígida com parafusos de titânio apresentou valores absolutos maiores quando comparada com a fixação interna rígida utilizando parafusos reabsorvíveis, porém não havendo diferença estatisticamente significante, o que aponta para a qualidade do material reabsorvível obtido no trabalho em questão.

4.5.2 Estudo *in vivo* do sistema placa parafuso

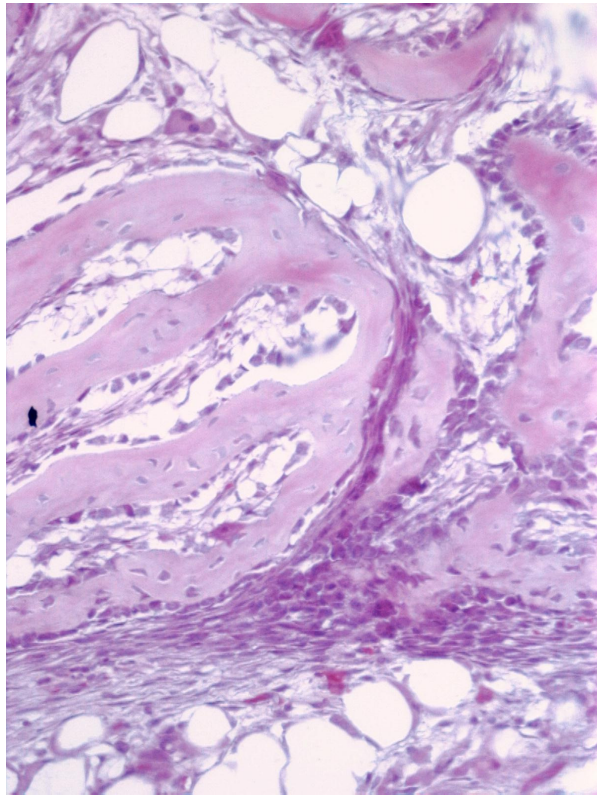
A avaliação do copolímero sintetizado, por meio do seu estudo *in vivo* na forma de placas e parafusos, é fundamental na consolidação da qualidade do material. As Figuras 4.38, 4.39 e 4.40 mostram a resposta apresentada pelo copolímero PLDLA e pelo controle (sistema placa e parafuso metálico) nos três tempos analisados: 2 semanas, 2 meses e 3 meses.

A análise morfológica do tecido circunjacente ao sistema placa e parafuso PLDLA, referente a 2 semanas do implante, mostra a presença de osteoblastos, indicando uma pré formação óssea, Figura 4.38 (A).

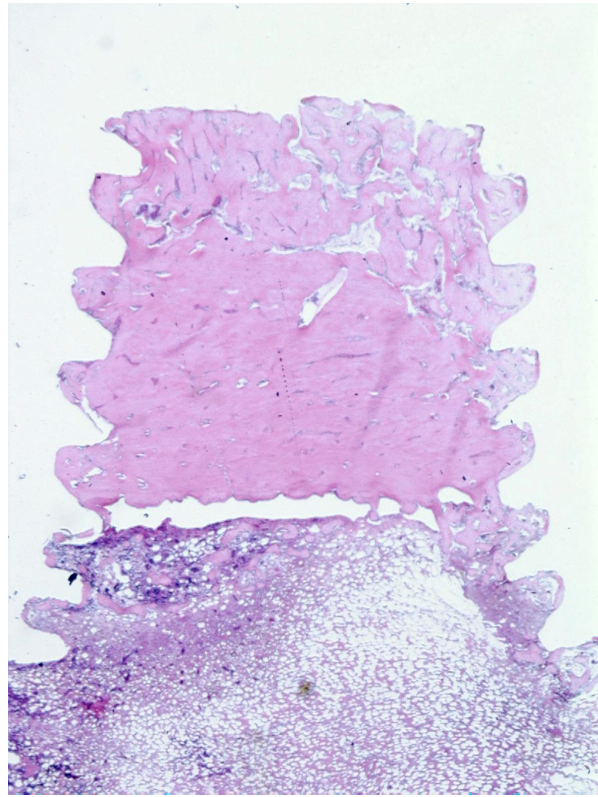
Após 2 meses verifica-se neoformação óssea na região em contato com o polímero. Esse crescimento ósseo ocorre simultaneamente ao processo de degradação do PLDLA, invadindo a região onde havia o polímero, Figura 4.39 (A).

Após 3 meses verifica-se uma intensa degradação do copolímero PLDLA e conseqüentemente uma maior invasão tecidual comparado a 2 meses, sendo caracterizado uma formação óssea na região em que o polímero degradou, Figura 4.40 (A).

A análise do sistema controle (placa -parafuso metálico), mostra que em 2 semanas não há indícios de reação inflamatória na região em contato com o titânio, Figura 4.38 (B). Após 2 meses percebe-se a presença de células gigantes de corpo estranho na região próxima ao metal, caracterizando certa reação infamatória, sem ser verificado neoformação óssea, Figura 4.39 (B). Com 3 meses observa-se a presença de muitas células gigantes e de neoformação óssea, Figura 4.40 (B).

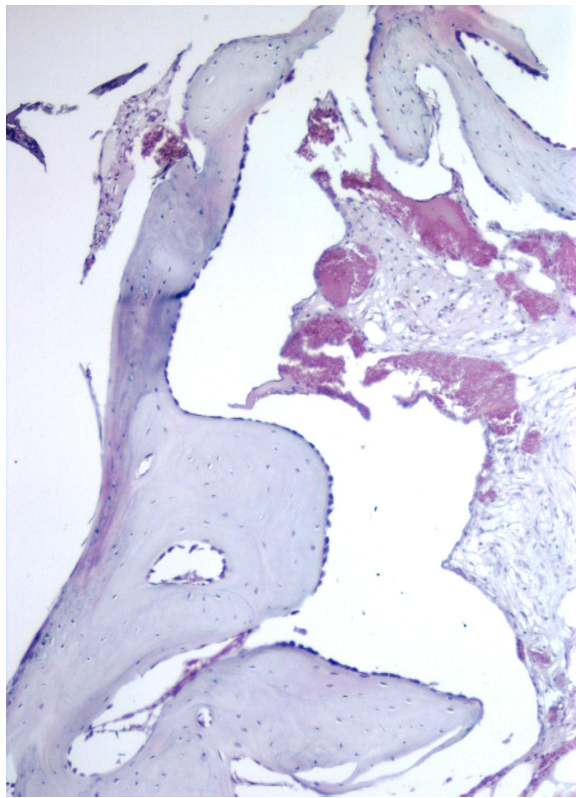


(A)

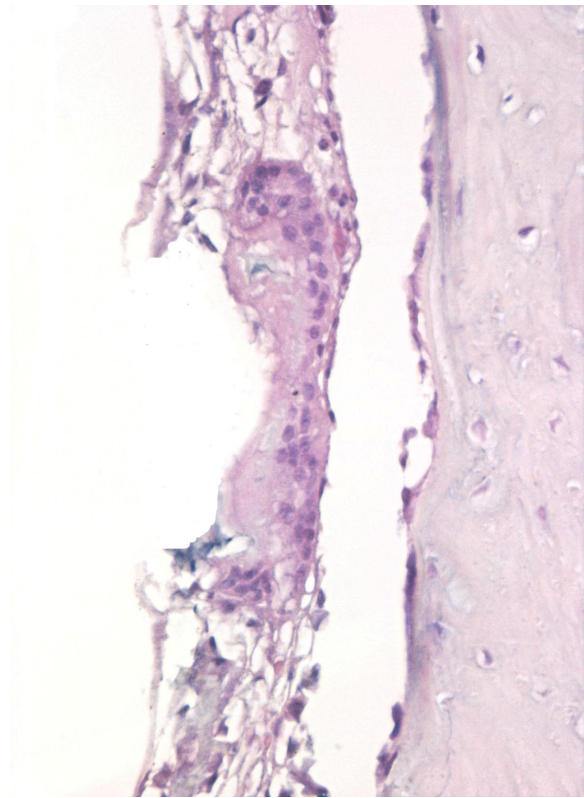


(B)

Figura 4.42: 2 semanas – A) Polímero – Região em contato com o polímero, presença de grande quantidade de osteoblastos ; B) Região em contato com o titânio. Não se observa reação inflamatória em nenhum dos casos.

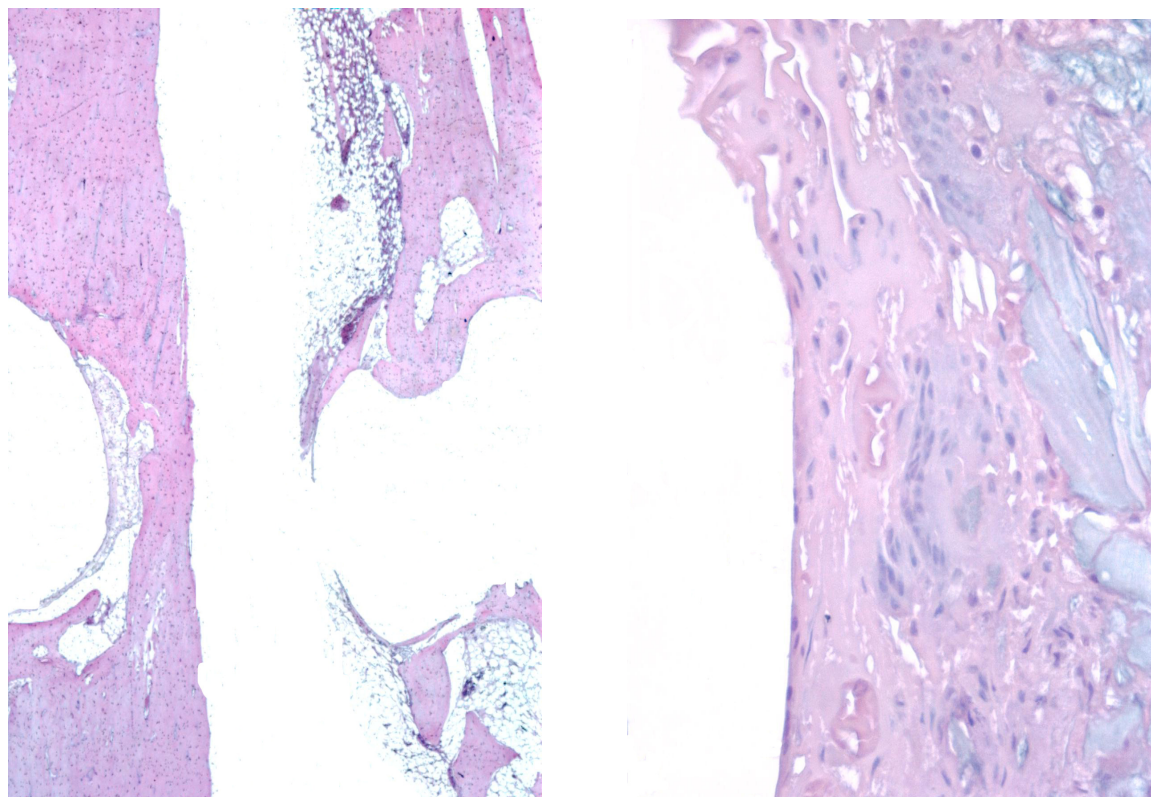


(A)



(B)

Figura 4.43: 2 meses – A) Polímero – Região em contato com o polímero, presença de grande quantidade de osteoblastos e neoformação óssea ; B) Região em contato com o titânio, apresentando célula gigante de corpo estranho, caracterizando certa reação inflamatória.



(A)

(B)

Figura 4.44: 3 meses – A) Polímero – Região em contato com o polímero, apresentando neoformação óssea no local onde o polímero se degradou; B) Região em contato com o titânio, apresentando célula

Macroscopicamente foi verificado que, no momento do implante, o copolímero PLDLA se mostrou bastante resistente ao stress cirúrgico, já que não houve nenhum relato de quebra ou perda do passo da rosca.

Capítulo 5

Conclusões

A otimização da relação monômero/catalisador foi fundamental para o sucesso da síntese do copolímero poli (L-co-DL ácido láctico), sendo constatada maior massa molar quando esta relação era próxima a 5200 vezes. A temperatura da síntese foi mantida em 130 °C e o tempo de síntese em 72 horas. Nestas condições de síntese foi possível obter o copolímero de alta massa molar (10^5 g/mol), assim como o requerido em aplicações voltadas ao campo das próteses temporárias destinadas a fixação de fraturas.

A caracterização química do copolímero, através da técnica de RMN ^1H e ^{13}C e de IV também se mostrou de acordo com a literatura. Por meio da técnica de DSC foi verificado que o PLDLA sintetizado apresenta somente uma T_g por volta de 58°C, demonstrando ser completamente amorfo, situação verificada em todas as amostras cuja massa molar do copolímero era ordem de 10^5 g/mol.

A estabilidade térmica, avaliada pela técnica de TGA, demonstrou que para as amostras correspondentes ao copolímero PLDLA o comportamento termogravimétrico foi o mesmo, no que se refere à temperatura de início de degradação (próxima 300 °C).

O processamento do copolímero, para sua obtenção na forma de placas e parafusos, causa uma queda no valor de sua massa molar da ordem de 35% , condizente com os relatos da literatura.

Pôde-se verificar que o processo de degradação afetou a massa molar do material logo a partir da 2^o semana de estudo *in vitro*. As análises das curvas de DSC demonstram que o material, se manteve completamente amorfo até 2 semanas, com 4 semanas de estudo *in vitro* foi verificado a presença de vestígios de cristalinidade, o que está de acordo com o processo de degradação do dispositivo. Com 8 semanas a presença desses cristais torna-se ainda mais ínfima, deixando de serem notados com 16 semanas de estudo *in vitro*. Após 30 semanas o material se encontra completamente degradado, voltando a apresentar cristalinidade.

O ensaio mecânico de flexão mostrou que o copolímero estudado, PLDLA-11, que representa um material de elevada massa molar, conseguiu reter mais de 80 % de sua resistência num período de 4 meses, bastante compatível com o requerido para a consolidação óssea.

A análise por meio de MEV mostrou que o dispositivo passa de denso para poroso ao longo do processo de degradação, o que ocorre por volta de 18 semanas de estudo *in vitro*. A análise visual do dispositivo está de acordo com os resultados verificados por outras técnicas estudadas como, por exemplo, DSC, podendo ser atribuído o esbranquiçamento do material, ao longo do processo de degradação, a presença de pequenos cristais que se formam em função da organização das cadeias do copolímero.

Através das avaliações histológicas durante o período de consolidação da fratura pôde-se verificar que o sistema placa e parafuso do PLDLA se mostrou muito eficiente, sendo possível verificar formação de tecido ósseo no local do implante, sem a presença de reação inflamatória, como ocorreu no caso do metálico.

Dessa forma, pode-se dizer que esta linha de pesquisa envolvendo síntese de polímeros bioreabsorvíveis se mostra promissora, e sua continuidade significará uma acessibilidade do produto pelo mercado.

5.1 Trabalhos em andamento nos quais o copolímero PLDLA, deste estudo, está sendo empregado.

- Miscibilidade e caracterização de blendas de PLDLA com PCL-triol. Estudo *in vivo* e *in vitro* das membranas e dos pinos das blendas. (projeto de doutorado desenvolvido pela aluna Márcia).

- Obtenção de pino, para aplicação óssea de PLDLA com PCL. (projeto de mestrado desenvolvido pelo aluno Marcelo).

- Obtenção e caracterização de membranas de PLDLA utilizadas como prótese para regeneração nervosa periférica. (projeto de mestrado desenvolvido pela aluna Grazielle).

Capítulo 6

Referências Bibliográficas

Agins, H. J, Alcock , N. W, Bansal, M, Salvati , E. A, Wilson, P. D , Pellicci, P. M, Bullough, P. G. Metallic wear in failed titanium-alloy total hip replacements. A histological and quantitative analysis. *J Bone Joint Surg Am*,70(3), pp.347-56, 1998.

Alexander, J. T, Branch, C. L Jr, Subach , B. R. Applications of a resorbable interbody spacer via a posterior lumbar interbody fusion technique. *Orthopedics* 25 (Suppl 10), pp.S1185–S1189, 2002.

Amano, Y; Sekiguchi ,K; Shibukawa,Y; Yamada, S. Evaluation of a Poly -L-lactic acid membrane and membrane fixing pin for guided tissue regeneration, - *Oral Surg Oral*; 97:155–63, 2004.

Ambrose, C.G. , Clanton, T.O. Bioabsorbable implants: Review of clinical experience in orthopedic surgery. *Annals of Biomedical Engineering*, 32, pp.171-177, 2004.

Andriano, K.P, Pohjonen ,T., Torrmala, P. Processing and characterisation of absorbable polylactide polymers for use in surgical implants. *J Appl Biomat*, 5, pp.133–140, 1994.

Ashammakhi, N., Rokkanen, P. Absorbable polyglycolide devices in trauma and bone surgery. *Biomaterials* 18: 3-9, 1997.

Ashammakhi, N., Peltoniemi, H., Serlo, W. Developments in craniomaxillofacial surgery: use of self-reinforced bioabsorbable osteofixation devices. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v.108,n.1, pp. 167-180, 2001.

Barber ,F. A. Resorbable materials for arthroscopic fixation: a product guide. *Orthop. Sp.* Ed.,6(2), pp. 1–11, 2000.

Bassi, M.B., Padias, A. B., Hall, H. K. The hydrolytic polymerization of ε-caprolactone by triphenyltin acetate. *Polym. Bull.*, v.24, pp. 227, 1990.

Beiser, I.H.; Kanat, I.O. *Journal of the American Pediatric Medical Association*, 80, pp.72, 1990.

Bendix, D. Chemical synthesis of polylactide and its copolymers for medical applications. *Polym. Degrad. Stab*, 59, 129-135, 1998.

Bergsma, J.E., Rozema, F.R., Bos, R.R.M., De Bruijn WC. Foreign-body reactions to resorbable poly(L-lactide) bone plates and screws used for fixation of unstable zygomatic fractures. *J. Oral Maxillofac Surg*, 51: 666-70, 1993.

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

Böstman, O., Pihlajamäki, H. Clinical biocompatibility of biodegradable orthopaedic implants for internal fixation: a review. *Biomaterials*, 21: 2615-2621, 2000.

Bostman, O., Hirvensalo, E., Makinen J., Rokkanen P. Foreign body reactions to fracture fixation implants of biodegradable synthetic polymers. *J Bone Joint Surg Br* ,72-B, pp.592-6, 1990.

Cai, H. V., Dave, R. A. Gross and S. P. McCarthy. Effects of physical aging, crystallinity, and orientation on the enzymatic degradation of poly (lactic acid), *J. Polym. Sci. Part B: Polymer Physics* 40, 2701-2708, 1996.

Carothers, W., Dorough, G., and Van Natta, F. Studies on polymerisation and ring formation. X. The reversible polymerisation of six-membered cyclic esters. *J. Am. Chem. Soc.* 54 , 761-772, 1932.

Castillo, M.H, Button, T. .M., Doerr, R., Homs, M.I., Pruett CW, Pearce JI. Effects of radiotherapy on mandibular reconstruction plates. *Am J Surg* ,156(4), pp.261-263, 1988.

Ciccone, W., Motz, C., Bentley, C., Tasto, J. Bioabsorbable Implants in Orthopaedics: New Developments and Clinical Applications. *J Am Acad Orthop Surg*; 9: 280-288, 2001.

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

Cohen, S. R, Holmes, R. E, Amis, P., Fitchner H., Shusterman EM. Technical strategies tacks: a new technique for craniofacial fixation, *J Craniofac Surg*, 12, pp.596-602, 2001.

Cordewener, F. W, Bos, R. R, Rozema, F. R and Houtman, W. A. Poly(L-lactide) implants for repair of human orbital floor defects: clinical and magnetic resonance imaging evaluation of long-term results. *J Oral Maxillofac Surg*, 54 (1), pp. 9-13, 1996.

Chabot, F. , Vert, M. , Chapelle, S. Stereocopolymers as determined by C-13-labeled (H-1)-NMR. *Polymer*, 24, pp.53-59, 1983.

Chahal, S. P., Lactic Acid. In: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry 5th Edition, Wiley-VCH, 1997.

Chu, C.C., Browning, A. The study of thermal and gross morphologic properties of polyglycolic acid upon annealing and degradation treatments. *J. Biomed. Mater. Res.* 22, 699, 1988.

Chu, C. C. Hydrolytic degradation of polyglycolic acid - tensile-strength and crystallinity study. *J Appl Polym Sci* ;26:1727-1734, 1981.

Dubois, C. , Jacobs, R. Jerome, PhD, Macromolecular Engineering of Polylactones and Polylactides. 4.Mechanism and Kinetics of LactideHomopolymerization by Aluminum Isopropoxide *Macromolecules*, 24, p.2266, 1991.

Duek, E.A.R.; Zavaglia, C.A.C.; Belangero W. In vitro study of poly(lactic acid) pin degradation , *Polymer* 40, p. 6465–6473 ,1999.

Drumright, R. E., Gruber, P. R., and Henton, D. E. Polylactic acid technology, *Adv. Mater.* 12 , pp.1841-1846, 2000.

Espartero, I. Rashkov, S. Li, N. Manolova, M. Vert, NMR analysis of low molecular weight poly (lactic acid) s, *Macromolecules*, 29, pp. 3535-3539, 1996.

Fambri, L. , Bragagna, S. , Migliaresi C., Biodegradable Fibers of poly-L, DL-lactide 70/30 Produced by melt Spinning,; *Macromolecular* , v 234, p.20-25, 2006.

Fang, Z., Starly, B., Sun, W. Computer-aided characterization for effective mechanical properties of porous tissue scaffolds. *Computer-Aided Desegn*, v.37, pp. 65-72, 2005.

Farrar, D., Technology Manager for Biomaterials, Smith & Nephew Research Centre, *Bioresorbable Polymers in Orthopaedics*, business briefing: medical device manufacturing & technology, 2005.

Fung , C.P., Huang C.H., Doong J.L. The study on the Optimization of Injection Molding Process Parameters with Gray Relational Analysis- *Journal of Reinforced Plastics and Composites*, 22 (1) pp.51-66, 2003.

Gogolewski, S. Bioresorbable polymers in trauma and bone surgery. *Injury Int. J. Care Injured*, 31, Supply.4, SD 28-32, 2000.

Gogolewski, S; Pineda, L; Bu, C.M. Bone regeneration in segmental defects with resorbable polymeric membranes: IV Does the polymer chemical composition affect the healing process? *Biomaterials* ;21:2513–20, 2000.

Gogolewski, S., Jovanovic, M., Dilton G., Hughes K. The effect of melt-processing on the degradation of selected polyhydroxyacids: polylactides, polyhydroxybutyrate, and polyhydroxybutyrate-co-valerates. *Polymer Degradation and Stability*, 40, Issue 3, pp.313-322, 1993.

Göpferich, A. Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials*;17,pp. 103-114, 1996.

Granger, P., Chabot, F., Vert, M., Chapelle, S. Configurational structures of lactic acid stereocopolymers as determined by C-13-labeled (H-1)-NMR. *Polymer*, 4, pp. 53-59, 1983.

Griffith, L. G. Polymeric biomaterials. *Acta Materialia* ;48, pp. 263-277, 2000.

Grizzi, I., Garreau, H., Li, S., Vert, M. Hydrolytic degradation of devices based on poly(D,L lactic acid) size-dependence. *Biomaterials* 16, pp.305-311, 1995.

Gruber, P., O'Brien, M., Polylactides NatureWorks PLA, chapter 8, pp. 239.

Gupta, M.C., Deshmukh, V.G.. Thermal Oxidative Degradation Of Poly-Lactic Acid Partii :Molecular And Eletronic Spectra During Isothermal Heating. *Colloid Polymer Sci*, 260, pp.514-517, 1982.

Hakkarainen, M. Aliphatic polyesters: Abiotic and biotic degradation and degradation products. *Degradable Aliphatic Polyesters*, 157,pp. 113-138, 2002.

Harvie, F. Poly L-Lactic –Acid (PLA) in Surgery A Safe and Effective Material , 2000, Introduction, USA.

Hayashi, T., Biodegradable polymers for biomedical applications. *Prog Polymer Sci* 19: 663-702, 1994.

Hiltunen, K., Harkonen, M., Seppala, J. Synthesis and Characterization of Lactic Acid Based Telechelic Prepolymers, *Macromolecules*, 29, pp.8677, 1996.

Holland SJ, Tighe BJ, Biodegradable polymers. In: Advances in Pharmaceutical Science. Academic Press, London, 6, pp 101-164, 1992.

Hollinger, J.O. Preliminary report on osteogenic potential of a biodegradable copolymer of polylactide (PLA) and polyglycolide (PGA). *J Biomed Mater Res* 17, pp.71-82, 1983.

Holten, C. H. Lactic Acid Properties and Chemistry of Lactic Acid and Derivatives Verlag Chemie, Germany, 1971.

Hyon, S. H., Jamshidi, K.; Ikada, Y. Synthesis of polylactides with different molecular weights , *Biomaterials* 18, 1503 ,1997.

Hu, Y., Zhang, Z., Song, D., Wang, Y. Preparation and Properties of Self- reinforced L- and D,L lactide Copolymer Rods, *Chinese Chemical Letters*, 11, no. 11, pp.1023-1026, 2000.

Huang, M.H., Li, S., Hutmacher, D. W., Schantz, J.T., Vacanti, C. A., Braud, C. & Vert, M., Degradation and cell culture studies on block copolymers prepared by ring opening polymerization of caprolactone in the presence of poly(ethylene glycol) *J. Biomed. Mater. Res.*, 69A, pp.417, 2004.

Hunt, J. A., Williams, D.F, Ungersbock, A. , Perrin, S. The Effect of Titanium Debris on Soft-Tissue Response , *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 5:381-383, 1994.

Jacobsen, S., Degée, Ph., Fritz, H. G., Dubois, Ph., and Jérôme, R. Polylactide (PLA)- A new way of production, *Polym. Eng. Sci.* 39, pp. 1311-1319, 1999.

Johns, D. B, Lenz , R. W, Luecke , A. Lactones, In: Ivin KJ, Saegusa T (eds), Ring-opening polymerization. Elsevier,(1984) London, 1:, pp.464.

Jorgenson, D. S, Mayer, M.H. Ellenbogen, R. G, Centeno, JA, Johnson F. B, Mullick FG, Manson, P. N. Detection of titanium in human tissues after craniofacial surgery. *Plast Reconstr Surg* ;99, pp.976-9, 1997.

Jorgenson, D. S, Centeno, J. A, Mayer, M. H, Topper , M. J, Nossov, P. C, Mullick FG, Manson PN. Biologic response to passive dissolution of titanium craniofacial microplates. *Biomaterials*, 20:675– 68, 1999.

Kajsa, M., Stridsberg, M., Ryner, A. A. Controlled Ring-Opening Polymerization: Polymers with designed Macromolecular Architecture, *Advances in Polymer Science*, Vol. 157, pp.41-65, 2002.

Katou, F., Andoh, N., Motegi, K., Nagura, H. J. Immuno-inflammatory responses in the tissue adjacent to titanium miniplates used in the treatment of mandibular fractures. *Craniomaxillofac Surg* ,24 (3), pp.155-62, 1996.

Kellomäki, M, Paasimaa, S., Törmälä, P. Pliable polylactide plates for guided bone regeneration: manufacturing and *in vitro* ,Proccedings of the Instiution of Mechanical Engineers, Part H, *Journal of Engineering in Medicine*, v 214, n6, pp. 615-629, 2000.

Kirkpatrick, C. J, Krump-Konvalinkova, V., Unger RE, Bittinger, F., Otto , M., Peters, K. Tissue response and biomaterial integration: the efficacy of in vitro methods. *Biomolecular engineering* 19: 211-217, 2002.

Kister, G., Cassaras, G., Vert, Effects of morphology, conformation and configuration on the IR and Raman spectra of various poly (lactic acids), *Polymer*, 39 (2), pp. 267-73, 1998.

Kohn, J., Langer, R., Bioresorbable and bioerodible materials. In: *An Introduction to Materials in Medicine*. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemon JE, eds. Academic Press, San Diego. pp 65-73, 1997.

Kohn, F.E., Berg, V.D., Ridder, V.D., Feijein, G. The ring-opening polymerization of D,L lactide in the melt initiated with tetraphenyltin, *J. J.Appl. Polym. Sci.*, v.29, pp.4265, 1984.

Kricheldorf, H.R., Sumbél, M.V., Kreiser-Saunders, Polylactones. 20. Polymerization of E-Caprolactone withTributyltin Derivatives: A Mechanistic Study, *Macromolecules*, v.24, p.1944, 1991.

Kricheldorf, HR., Syntheses and application of polylactides, *Chemosphere*, 43(1), pp.49-54, 2001.

Kricheldorf, H.R., Berl, M., Scharnagl, N. Poly(lactones).9. Polymerization mechanis metal alkoxide initiated polymerizations of lactide and various lactones. *Macromolecules* ; 21, pp.286-293, 1988.

Kricheldorf, H. R., Kreiser-Saunders, I., and Boettcher, C., Polylactones 31. Sn(II)octoate-initiated polymerisation of lactide: a mechanistic study, *Polymer*,36 , pp.1253-1259, 1995.

Kricheldorf, H. R., Kreiser-Saunders, I., and Stricker, A., Polylactones 48. SnOct₂-initiated polymerisations of lactide: A mechanistic study, *Macromolecules*, 33, pp.702-709, 2000.

Landes, C.A., Kriener, S, Menzer, M., Kovacs, A.F. Resorbable plate osteosynthesis of dislocated or pathological mandibular fractures: a prospective clinical trial of two amorphous L-/DL-lactide copolymer 2mm miniplate system. *Plast Reconstr Surg*, 111(2): pp. 601-10, 2003.

Leiggener, C. S, Curtis, R. and Rahn, B. A. Effects of chemical composition and design of poly (L/DLLactide) implants on the healing of cranial defects. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, 26, pp. 151, 1998.

Leiggener, C.S., Curtis, R., Muller, A.A., Pfluger, D., Gogolewski, S., Rahan, B. A., Influence of copolymer composition of polylactide implants on cranial bone regeneration. *Biomaterials*, 27(2), pp. 202-7, 2006.

Lemmouchi, Y., Schacht, E., Kageruka, P., De Deken, R., Diarra, B., Dially, O., Geerts, S. Biodegradable polyesters for controlled release of trypanocidal drugs: *In vitro* and *in vivo* studies, *Biomaterials* 19, pp.1827-1837, 1998.

Li, S. M, Garreau, H., Vert, M. Structure property relationships in the case of massive aliphatic poly-(α -hydroxy acids) in aqueous-media .1. poly(DL-lactic acid), *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 1, pp. 123-130, 1990.

Li, S., Garreau, H. Vert, M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 3: influence of morphology of poly(L-lactic acid). *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.1, pp. 198-206, 1990a.

Li, S., Garreau, H. Vert, M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 2: Degradation of lactide-glycolide copolymers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.1, pp. 342-353, 1990b.

Löfgren, A, Albertsson, A. C, Dubois, P., Jérôme, R, Recent Advances in ring-opening polymerization of lactones and related compounds, *J Macromol Sci Rev Macromol* C35(3):379, 1995.

Lowe, Dupont, C. E. *US 2668162* (1954).

Lowery, G. L, McDonough, R. F. The significance of hardware failure in anterior cervical plate fixation. Patients with 2- to 7-year follow-up. *Spine*, 23, pp.181–186, 1998.

Lunt, J. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers, *Polym. Degrad. Stab*, 59, p.145-152, 1998.

Mainil-Varlet P, Curtis, R., Gogolewski, S. Effect of *in vivo* and *in vitro* degradation on molecular and mechanical properties of various low-molecular-weight polylactides, *Journal of Biomedical Materials Research*, 36, pp.360–380, 1997.

Manninen, M.J. Self-Reinforced poly(L-lactide)screws in the fixation of cortical bone osteotomies in rabbits *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 4: 179, 1993.

Mano, J., Rui S.; Boesel, L.; Neves N., Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments, *Composites Science and Technology*, 64, pp.789–817, 2004.

Matsusue, Y., Hanafusa, S., Yamamuro, T., Shikinami, Y., Ikada, Y. Tissue reaction of bioabsorbable ultra high strength poly(L-lactide) rod. A long-term study in rabbits. *Clin Orthop* 317: 246-353, 1995.

Mecerreyes, D., Jérôme, R., Dubois, P., Novel Macromolecular Architectures Based on Aliphatic Polyesters, *Adv Polym Sci*, 147, pp.1-60, 1999.

Middleton, J.C.; Tipton, A. J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*, v. 21, pp. 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 *Injury. Int J Care Injured* ;36:333-338, 2005.

Moser, R. C, McManus, A., Riley S., Thomas K., Strenght retention of 70:30 Poly(L-lactide-co-D, L lactide) Following Real –Time Aging, *MacroPore Biosurgery, Wiley InterScience*, pp.56-63, 2005.

Motta, A.C., Duek, E.A.R., Síntese, Caracterização e Degradação “ in vitro”do poli(L-ácido láctico), *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, 16(1), pp.26-32, 2006.

Nelson, J. F., Stanford, H. G., Cutright, D. E. Evaluation and comparison of biodegradable substances as osteogenic agents. *Oral Surg* 43, pp. 836-843, 1977.

Nijenhuis, A J., Grijpma, D.W., Pennings, A J., Lewis acid catalyzed polymerization of L-lactide: Kinetics and Mechanism of the Bulk polymerization, *Macromolecules*, 25, pp. 6419-6424, 1992.

Ovitt, T. M., Coates, G. W. *Polym. Prepr.* 41, pp.385, 2000.

Pathiraja, A., Gunatillake, R., Adhikari, Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering, *European Cells and Materials*, 5, pp. 1-16, 2003.

Peltoniemi, H., kontio, R, Lindqvist, C., Suuronen, R. The use of bioabsorbable osteofixation devices in craniomaxillofacial surgery, *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, v.94, n 1, 2002.

Pietrzak , W .S. Principles of development and use of absorbable internal fixation, *Tissue Engineering* , 6 (4), pp. 425–433, 2000.

Pietrzak, W. S, Verstynen, B.S., Sarver, D.R. Bioabsorbable fixation devices: status for the Craniomaxillofacial surgeon. *J. Craniofacial Surg* , 2; pp. 92-96, 1997.

Pistner, H., Bendix, D.R, Muhling, J., Reuther, J. F. Poly(L-Lactide): a long-term degradation study in vivo. Part III. Analytical characterization. *Biomaterials* ;14:291–298, 1993.

Proikakis, C.S., Tarantili, P.A., Andreopoulos, A.G., Synthesis and Characterization of Low Molecular Weight Polylactic Acid. *Journal of Elastomers and Plastics*, v. 34, pp. 49-63, 2002.

Punja, K. D., Morrison, V., G.K., Reconstruction of Complex Orbitocranial Deformities using bioresorbable Mesh , Sterelized Orbiatl Models , and In situ Contouring, *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery*, 22(1), pp.20-24, 2006.

Rehm, K. E, Helling, H. J. Gatzka C. Neue Entwicklungen beim Einsatz resorbierbarer Implantate. *Orthopa" de* 1997;26:489–97

Rokkanen, P. U, Böstman, O., Hirvensalo, E., Mäkelä, E. A., Partio, E. K., Päätiälä , H., Vainionpää, S., Vihtonen, K., Törmälä , P. Bioabsorbable fixation in orthopaedic surgery and traumatology. *Biomaterials*, 21, pp. 2607-2613, 2000.

Rothen, W. A., Besseghir K.,Vuaridel E. Injection-molding versus extrusion as manufacturing technique for the preparation of biodegradable implants, *Eur j Pharm Biopharm*, 48(2), pp. 113-21, 1999.

Schaldach, Max. *Cardiologia Cirúrgica Perspectivas Para o Ano 2000*, Biomateriais-C3.

Seal, B.L., Otero, T.C., Panitch, A. Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration, *Mater.Sci.Eng.*,34(4-5), pp. 147-230, 2001.

Shalaby, S.W. Bioabsorbable Polymers. In: *Encyclopedia of Pharmceutical Technology*. Swarbrick J, Boylan JC, eds. vol 1, pp 465-476, 1988.

Shyamroy, S. Synthesis of Biodegradable Poly (Lactic Acid) Polymers , University of Poona, India , 2003, 203 p., Thesis (Doctorate).

Sinisaari, I. Infections and bioabsorbable implants in orthopaedic and trauma surgery – with special reference to the treatment of ankle fractures. A clinical study. Thesis, University of Helsinki, Helsinki, Finland, 2004.

Sodergard, A., Stolt, M. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Prog Polym Sci*;27, pp.1123–63, 2002.

Sosnowski, S., Gadzinowski, M., Slomkowski, S., Poly(L,L lactide) Microspheres by ring-opening Polymerization, *Macromolecules* 29:pp.4556-4564, 1996.

Standard test methods for flexural properties of unreinforced and reinforced plastics and electrical insulating materials, ASTM Designation D790–00. ASTM Standards. Philadelphia, PA: ASTM; 2001.

Steven, R., Cohen, M.D., Ralph, M. D., Meltzer, M.D., Michael, L. and Miles, Z. B. Craniofacial reconstruction with a fast resorbing polymer: a 6- to 12-month clinical follow-up review, *Neurosurg Focus* 16 (3):Article 12, 2004.

Suming, L., Garreau, H., Vert, M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(α -hydroxy acids) in aqueous media. Part 3. Influence of the morphology of poly(L-lactic acid), *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 1, pp. 198-206, 1990.

Super, H., Grijpma, D. W., Pennings, A. J Incorporation of salicylates into poly(L-lactide), *Polym. Bullet.* 32, 509 (1994).

Tatum, S.A., Kellman, R. M., Freije, J. E. Maxillofacial fixation with absorbable miniplates: computed tomographic follow-up. *J Craniofac Surg* ; 8, pp.135–140, 1997.

Thakur, K, Kean, R, Hall, E., Kolstad, J., Lindgren, T. High- Resolution ^{13}C and ^1H Solution NMR Study of Poly(Lactide), *Macromolecules*, 30, pp. 2422, 1997.

Therin, M., Christel, P., Li, S., Garreau, H., Vert, M. In vivo degradation of massive poly(α -hydroxy acids): validation of in vitro findings. *Biomaterials* 13 (9), 594, 1992.

Tokiwa, Y. and Suzuki, T. Hydrolysis of copolyesters containing aromatic and aliphatic ester blocks by lipase, *J. Appl. Polym. Sci.* 26, pp.441-448, 1981.

Tormala, P.; Pohjonen, T.; Rokkanen, P. Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. Proceedings of Institution of Mechanical Engineers Part H- *Journal of Engineering in Medicine*, v.212, n H, pp.101-111, 1998.

Toro, C, Robiony, M., Zerman, N., Politi, M. Resorbable plates in maxillary fixation. A 5-year experience. *Minerva Stomatol* ;54(4), pp.199-206, 2005.

Tsuji, H. In: Doi Y, Steinbüchel A, editors. Polyesters 3. Biopolymers, vol. 4. Weinheim (Germany): Wiley-VCH; Chapter 5, . pp. 129–77, 2002.

Turvey, T., Bell, B. The Use of Self-Reinforced Biodegradable Bone Plates and Screws in Orthognathic Surgery, *J. Oral Maxillofac. Surg.* ;60(1), pp.59-65, 2002.

Vaccaro, A. R and Madigan, L. Spinal applications of bioabsorbable implants. *J Neurosurg (Spine 4)* **97**, pp.407-412, 2002.

Vert, M., Chabot, F., Leray, J., Christel, P. Stereoregular bioresorbable polyesters for orthopaedic surgery. *Makromol Chem Suppl* , 5:30-41, 1981.

Von Burkersroda, F., Schedl, L., Göpferich, A. Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion., *Biomaterials*; 23:pp.4221-4231, 2002.

Walton, M., Cotton , N., Long-term *in vivo* Degradation of poly-L-(Lactide) PLLA in bone , *Journal of Biomaterials Applications* , 21, pp.395, 2007.

Weiler, W., Gogolewski, S. Enhancement of the mechanical properties of polylactides by solid-state extrusion. 1. Poly (D-lactide). *Biomaterials*, 17, pp.529-535, 1996.

Yodthong, B. and Molloy, R., Synthesis and Characterization of Poly(L-lactide-co- α -caprolactone) Copolymers: Effects of Stannous Octoate Initiator and Diethylene Glycol Coinitiator Concentrations, *ScienceAsia*, 30, pp.327-334, 2004.

Young, J. W., Jin, N.K., Biotchenology Production of Lactic Acid and its recent applications, *Food Technol. Biotechnol*, v 44, 2, pp.163-172, 2006.

Zhang, X., McDonald, M., Goosen, F. A., Auley , K. B. Mechanism of lactide polymerization inthe pre sence of stannous octoate: The effect of hydroxy and carboxylic acid substances. *J Polym Sci*, 32:2965-2970, 1994.



ANEXO I

MEDLAB PRODUTOS DIAGNÓSTICOS LTDA
São Paulo, 28/02/05

MED

59158/2004



Para: ELIANA APARECIDA DE REZENDE DUEK

Fax 015 32129-900)

SOROCABA - SP

Attn: Dra Eliana Apar.(Dep Cientifico)

Total de Pagina(s), incluindo esta: 2

Estamos anexando resultado(s) de teste(s) realizado(s) com amostra(s) de:

AValiação DO POTENCIAL DE CITOTOXICIDADE "IN VITRO"

097565/001 Parafuso Plástico

Lote

Atenciosamente,
Catia

NOVAS ANÁLISES:

- Análise Microbiológica com equipamento de Amostrador de Ar por Impactação
(conforme Resolução - RE nº 09 de 16/01/2003).
- Desintegração
- Dissolução
- Friabilidade
- Dureza
- Comprimido/ Drageas



MEDLAB PRODUTOS DIAGNÓSTICOS LTDA.
Empresa: ELIANA APARECIDA DE REZENDE DUEK

PRAÇA DR. JOSE ERMIRIO DE MORAES, 290
JARDIM VERGUEIRO - SOROCABA - SP - 13098-618

Código: 097565/001/001

Produto: Parafuso Plástico

Condição da Embalagem: Acondicionada em embalagem plástica transparente

Data de Entrada: 27/01/05

Hora: 16:50 h

Data de Início do Ensaio: 04/02/05

Data do Fim do Ensaio: 28/02/05

Analista: J. Fernandes

RELATÓRIO DE ENSAIO AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE CITOTOXICIDADE "IN VITRO" - Nº 097565/001/001

LINHAS CELULARES: NCTC Clone 929 de tecido conjuntivo de camundongo (ATCC CCL1), são semeadas em placas de Petri e incubadas por 48 horas em atmosfera da monocamada celular. O meio de cultura líquido é substituído pelo meio de cobertura sólido, que é composto de partes iguais de meio 2x concentrado e agar com vermelho neutro. As amostras são colocadas sobre esse meio de cobertura e as placas novamente incubadas por 24 horas. Determina-se o Índice de Zona (IZ) que é a área não corada pelo corante vital. As amostras são testadas em quadruplicatas em placas separadas para cada tipo de amostra usada.

IZ	DESCRIÇÃO	CLASSIFICAÇÃO
0	Nenhuma Zona sob e ao redor da amostra	Nenhuma
1	Alguma alteração ou degeneração celular sob a amostra	Fraca
2	Zona limitada sob a amostra	Leve
3	Zona entre 0,5 - 1,0 cm ao redor da amostra	Moderada
4	Zona maior que 1,0 cm ao redor da amostra	Severa

Amostras sólidas: São colocadas diretamente sobre o meio de cobertura.

Amostras em pó: São colocadas dentro de 1 cilindro fixado sobre o meio de cobertura.

Amostras líquidas: Disco de papel de filtro atóxico são embebidos com a amostra e colocados sobre o meio de cobertura.

Amostras submetidas à extração: A relação da área de superfície do material e o volume do veículo de extração não deve ser maior que 1 cm²/mL e o menor do que 0,5 cm²/mL. Quando a superfície da amostra for indeterminada pesar de 0,1 - 0,2 g/mL. Os veículos de extração utilizados são solução salina ou óleo de semente de algodão. As condições de extração recomendadas são 37°C-24h, 50°C-72h e 60°C-24h. Embeber o extrato em discos de papel de filtro e colocar sobre o meio de cobertura.

Controle positivo: fragmento de 0,5 cm x 0,5 cm de látex tóxico.

Controle Negativo: discos de papel de filtro atóxico com 0,5 cm de diâmetro.

Os resultados se encontram sumarizados abaixo:

AMOSTRA	Nº 1	Nº 2	Nº 3	Nº 4
	IZ	IZ	IZ	IZ
Parafuso Plástico	0	0	0	0
Controle Negativo	0	0	0	0
Controle Positivo	4	4	4	4

Conclusão: A amostra não apresentou efeito tóxico para linhagem celular NCTC Clone 929 (ATCC CCL-1).

Observação: O resultado desta análise tem significação restrita e se aplica apenas a amostra analisada.

Referências bibliográficas:

ISO 10993-84: 1984-Standard test method for Agar diffusion cell cultures screening for cytotoxicity ISO 19903.5:1992-Biological evaluation for medical devices test for cytotoxicity, in vitro methods.

Pharmacopéia XXIII, 1995-Biological reactivity tests in vitro.

Amostra única (constituída de 02 unidade(s)).

O resultado desta análise tem significação restrita e se aplica apenas a amostra analisada.

O método de ensaio só pode ser reproduzido por inteiro e sem nenhuma alteração.

Data: 28/02/05

Roberto Arantes

Rochia Marmo de Paula

