



**FACULDADE DE ENGENHARIA DA
UNIVERSIDADE DO PORTO**

**Estudo da degradação de compósitos reforçados
com fibras biodegradáveis para aplicações
biomédicas**

Isabel Pereira

Dissertação realizada no âmbito do Mestrado em Engenharia Biomédica

Orientador: Prof. Rui Miranda Guedes
Co-orientador: Prof. Fernão Magalhães

Setembro 2010

Resumo

A utilização de materiais biodegradáveis com função estrutural temporária para auxiliar na recuperação e regeneração de tecidos vivos lesados, em substituição de biomateriais bioestáveis, tornou-se uma área de pesquisa muito promissora nas últimas duas décadas.

A partir do momento em que a esperança média de vida passou a ser superior aos 80 anos ^[1], houve um aumento de lesões e de defeitos ósseos ^[2]. E, dependendo do estado da lesão óssea, os habituais implantes de substituição ou de fixação de fracturas ósseas provocam respostas inflamatórias nos tecidos, conduzindo a uma necessária cirurgia de substituição. O que se pretende é mitigar esse problema e eliminar a necessidade de uma cirurgia secundária dramática e traumática para o paciente, com um material que resista e acelere o tempo de recuperação necessário à lesão em questão e que, após esse tempo, a sua reabsorção seja, idealmente, acompanhada pela remodelação óssea.

Sendo a rotura do ACL (Ligamento anterior cruzado) uma das mais comuns no joelho tem sido exaustivamente estudada por inúmeros autores e grupos de pesquisa. Uma vez que na recuperação mais célere de uma rotura de ligamentos estão implícitos exercícios de reabilitação com mobilização activa (com acção muscular), torna-se necessário recorrer à aplicação de dispositivos de reforço dos ligamentos para que após um esforço ideal dos mesmos, o conjunto reparado apresente um comportamento mecânico semelhante ao tecido natural não danificado, durante todas as diferentes fases de recuperação do tecido.

Muitos materiais foram desenvolvidos numa tentativa de responder a estas questões, mas levantam-se problemas de adequação e durabilidade das suas propriedades mecânicas durante todo o período espectável, após a implantação no corpo humano. Uma possível solução passa pela utilização de um compósito totalmente degradável, composto por uma matriz de ácido poliláctico (PLA - *polylactic acid*) reforçada com fibras de vidro com base fosfato (PBG - *Phosphate-based glasses*), que a curto e a longo termo seja compatível funcional e biologicamente para ambas as situações, reparação da lesão óssea e de ligamentos.

Esta tese tem como objectivo o estudo da evolução das propriedades mecânicas *versus* o tempo de degradação por hidrólise de fibras biodegradáveis e de compósitos feitos com estas fibras, utilizados na regeneração e/ou substituição de tecidos ósseos e recuperação do ACL do joelho.

Este estudo realizado da degradação por hidrólise de placas de PLA, fibras de PBG do sistema quaternário $(P_2O_5)_{50} - (CaO)_{40} - (Na_2O)_5 - (Fe_2O_3)_5$, e dos compósitos de matriz PLA reforçados com fibras PBG está dividido em 3 técnicas complementares de compreensão da degradação:

- 1- Estudo da evolução de perda de massa em função dos tempos de degradação;
- 2- Estudo da evolução morfológica consequente da degradação por microscopia electrónica de varrimento;
- 3- Estudo das propriedades mecânicas (ductilidade e resistência) em função dos tempos de degradação.

Esta investigação permitiu retirar conclusões subsequentemente descritas.

Para o PLA, os resultados obtidos através da perda de massa permitem induzir que os provetes de sofrem degradação no seio do material uma vez que não se registaram alterações nas suas dimensões. Estes resultados estão de acordo com a literatura usada neste documento.

As fotomicrografias obtidas em SEM permitiram observar que a degradação hidrolítica foi influenciada pelo método de manufactura e obtenção de provetes; e os ensaios de tracção reflectiram os efeitos cumulativos de perda de massa, cristalinidade e o processo de fabrico de polímero e provetes.

Relativamente ao compósito PLA/PBG, o mecanismo de dissolução está efectivamente relacionado com as reacções entre a água e o vidro, onde há inicialmente uma hidratação das ligações P-O-P que ocorre em 2 passos interdependentes conduzindo à dissolução do mesmo. Em relação à perda de massa, este biomaterial demonstrou ter uma perda de massa constante ao longo dos diferentes estágios de degradação.

Através de medição directa de uma das fibras presentes nas fotomicrografias obtidas em SEM foi possível concluir que pelo menos 37% da espessura destas foi afectada pela degradação após 8 semanas em solução salina de tampão fosfato a 37°C. Da mesma análise em SEM, foi também possível inferir que apesar do material ser isotrópico a degradação torna-o altamente anisotrópico com zonas de comportamentos distintos à solicitação mecânica. E, relativamente ao modo de fractura, verificou-se que as fibras vêm alterado o seu modo de fractura à medida que a degradação ocorre, passando de somente transversal para transversal e longitudinal sem direcções preferenciais.

Abstract

The use of biodegradable devices in structural temporary scaffolds to assist in recovery and regeneration of damaged living tissue in replacement of biostable biomaterials used in permanent prosthetic devices used for temporary therapeutic applications has become a very promising area of research in the last two decades.

From the moment that average lifetime was above 80 years there were an increasing number of injuries and bone defects.

Depending on the degree bone damage the usual substituting or fixation bone implants can cause in the future tissue inflammatory reactions conducting to a necessary implant substitution medical intervention. The primordial concern in this medical area is to eliminate that new trauma of the patient recuperation with a material that can resist the necessary recuperation time concerning patient problem and which body can reabsorb during that time.

Being the rupture of ACL (Anterior Cruciate Ligament) one of the most common knee injuries has been exhaustively studied by an uncountable authors and research groups.

To a quicker ligaments recovery, the active involvement (with muscle action) rehabilitation exercises are implicit; so, it is necessary to use reinforcement devices to ensure that succeeding an ideal strengthen of the ligament, the repaired set provides a mechanical behavior similar to a natural and not damaged tissue, during the different stages of tissue recovery.

Therefore, the reinforcement fiber/matrix composite should be short and long-term, functional and biological compatible. These properties can be evaluated through mechanical properties, degradation time of the composite and its biocompatibility.

This thesis aims to study the mechanical properties and molecular weight evolution vs. hydrolysis degradation time of biodegradable fibers and composites made from these fibers used in the regeneration and/or substitution of bone tissues and anterior cruciate ligament (ACL) injury recovery.

The hydrolytic degradation study of PLA scaffolds PBG fibers from the quaternary system $((P_2O_5)_{50}-(CaO)_{40}-(Na_2O)_5-(Fe_2O_3)_5$) and composite scaffolds PLA/PBG is divided in three complementary techniques in order to understand the degradation:

- 1 Study of weight loss as a function of degradation times;*
- 2 Morphological evolution study due to degradation in electronic scanning microscopy;*
- 3 Mechanical properties study (ductility and tensile strength) as a function of degradation times.*

Having this as a starting point, the behavior of the degraded structures allows the following observations:

For PLA:

The weight loss results allow deducing that the tensile specimens have bulk degradation. There were no noticeable dimension changes. This is according to the literature used in this document. The photomicrographs taken in SEM allowed observing the degradation is influenced by the manufacturing procedure of the tensile specimens.

The tensile tests showed the accumulative results of the tensile specimens weight loss crystallinity and manufacturing process.

For PLA/PBG scaffolds:

The dissolution mechanism is deeply related with the reactions between water and the glass. Initially there is the hydration of P-O-P bonds that occurs in two interdependent steps leading to glass dissolution. The weight loss from this biomaterial is constant during the degradation stages.

The direct measurement of one observed fiber in SEM revealed that at least 37% of the thickness from these fibers was affected by 8 weeks degradation. With this it was also possible to deduce that despite this material had a very high isotropy the degradation turned it to a high anisotropy state with distinct behaviors when subjected to mechanical stresses.

It was also verified that the fracture shape is changed as long as the degradation occurs from cross sectional to cross sectional and along the axis length without any perfectly defined directions.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a:

Prof. Rui Miranda Guedes,
Professor auxiliar do departamento de engenharia mecânica da FEUP (orientador)

Prof. Fernão Magalhães,
Professor auxiliar do departamento de engenharia química da FEUP (co-orientador)

Dr. Carlos Sá e Eng.^a Liliana Alves,
Director e Técnica especializada do CEMUP (disponibilidade de equipamento e acompanhamento na avaliação SEM)

André e Joana Vieira,
Investigadores auxiliares da unidade de materiais e estruturas compósitas do INEGI
(contributo no ensaio de degradação realizado)

Eng.º Francisco Cocco,
Director de Produção da Preh Portugal, Lda (material e maquinaria do molde de alumínio)

Andrew Parsons,
Investigador da Faculdade de Engenharia da Universidade de *Nottingham* (PBG)

Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG (PLLA)

Luis Costa,
Director Comercial da Flupol - Aplicações técnicas de polímeros fluorados, LDA (revestimento a Teflon dos moldes de alumínio)

Prof. Lucas Filipe Silva,
Secção de Materiais e Processos Tecnológicos (utilização do Laboratório de materialografia)

Prof.^a Raquel Soares,
Professora auxiliar do departamento de Bioquímica da FMUP (utilização do laboratório de bioquímica)

Um agradecimento especial ao meu marido, Bruno Fragoso, pelo apoio incondicional, tanto a nível emocional como intelectual, durante toda a duração do MEB onde a elaboração desta tese está incluída.

Índice

RESUMO	III
ABSTRACT	VI
ÍNDICE	X
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS.....	XVIII
ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	XX
CAPÍTULO 1.....	24
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
1.1 Engenharia dos tecidos e medicina regenerativa.....	24
1.1.1 Matriz extracelular - estrutura de suporte	26
1.1.2 Células	27
1.1.3 Objectivo da ET	29
1.2 Biomateriais.....	35
1.2.1 Metais	35
1.2.2 Cerâmicos	36
1.2.2.1 PBG.....	37
1.2.2.1.1 Propriedades	37
1.2.2.1.2 Exemplos de processamento	52
1.2.2.1.3 Degradação hidrolítica	53
1.2.3 Polímeros	63
1.2.3.1 Degradação e erosão.....	64
1.2.3.2 Polímeros naturais.....	71
1.2.3.3 Polímeros sintéticos.....	73
1.2.3.3.1 PLA.....	75
1.2.3.3.1.1 Propriedades	75
1.2.3.3.1.2 Exemplos de processamento	85

1.2.3.3.1.3	Degradação	87
1.2.4	Compósitos	93
1.3	Aplicações biomédicas dos biomateriais	94
1.4	Métodos de processamento	105
1.5	Métodos de caracterização	106
1.5.1	Testes funcionais	106
1.5.2	Testes morfológicos	110
1.5.3	Testes biológicos	113
1.6	Osso	114
1.6.1	Constituição óssea	114
1.6.2	Regeneração óssea	116
1.6.3	Lesões traumáticas e histórico de soluções reparadoras	120
1.7	Ligamentos do joelho	124
1.7.1	Caracterização	124
1.7.2	Lesões traumáticas e dados históricos de soluções reparadoras	126
CAPÍTULO 2.....		130
MATERIAIS E MÉTODOS		130
2.1	Materiais	130
2.2	Preparação dos provetes	133
2.3	Ensaio de degradação	141
2.4	Testes de caracterização	142
CAPÍTULO 3.....		148
RESULTADOS E DISCUSSÃO		148
CAPÍTULO 4.....		177
CONCLUSÃO		177
REFERÊNCIAS.....		184
ANEXOS.....		193
A	- Exemplos de processamento do PLA	193
B	- Ficha de especificações do PLA	198
C	- Ensaio de tracção a provetes de PLA, PLA/PBG e espécimes de PBG.....	200
	Ensaio de tracção a espécimes de PBG com diferentes impregnantes	201
	Ensaio de tracção a provetes de PLA e compósitos de PLA/PBG para definição da velocidade de extensão	203
	Influência da velocidade de extensão nas propriedades mecânicas dos provetes de PLA/PBG com 6 semanas de degradação em PBS a 37°C	204
	Exemplo de estricção num provete de PLA	205

Lista de Figuras

Figura 1 - Diferentes estratégias da ET na recuperação da função dos tecidos.	26
Figura 2 - Estrutura tetraédrica básica do óxido fosfato comparativamente à do óxido silicato.	38
Figura 3 - Efeito da adição de um ião metálico monovalente (M^+) na rede de P_2O_5	39
Figura 4 - Efeito da composição e diluição do PBG na proliferação celular. O PBG tem a composição $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_y - (Na_2O)_{55-y}$ com valores de $y = 24, 28, 32$ e 40% mol. [8]	40
Figura 5 - Diferentes configurações das fibras de vidro: orientadas, em malha e aleatórias.	41
Figura 6 - Padrão de proliferação celular para os diferentes tempos de cultura do PBG. [26]	42
Figura 7 - Efeito da variação da %molar de CaO do PBG ternário com P_2O_5 fixo em 45% mol nos parâmetros T_g , T_c e T_f (referenciada como T_m na figura). [48]	45
Figura 8 - Efeito do tamanho das partículas de vidro (μm) em T_c ($^{\circ}C$) para as composições $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_y - (Na_2O)_{55-y}$, $y=8$ e 32% mol. Adaptado de [48]	46
Figura 9 - Variação da densidade (kg/m^3) do sistema quaternário $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_{25} - (Na_2O)_{70-z} - (TiO_2)_z$ para z entre 0 e $2,5\%$ mol. [49]	47
Figura 10 - Variação dos módulos de Young (E , MPa) e corte (G , GPa), em função da percentagem molar de TiO_2 presente no sistema $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_{25} - (Na_2O)_{70-z} - (TiO_2)_z$ com z de 0 a $2,5\%$ mol. [49]	50
Figura 11 - Dependência do coeficiente de Poisson (ν) com a quantidade de TiO_2 no sistema PBG de composição $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_{25} - (Na_2O)_{70-z} - (TiO_2)_z$ para variações de z entre 0 e $2,5\%$ mol. [49]	51
Figura 12 - Gradiente térmico existente no processamento do PBG quaternário $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_{25} - (Na_2O)_{70-z} - (TiO_2)_z$, para z variável de 0 a $2,5\%$ mol.	52
Figura 13 - Perda de massa por unidade de área (mg/cm^2) de PBG ternário do sistema $(P_2O_5)_x - (CaO)_y - (Na_2O)_{100-x-y}$ em função do tempo (h) para quantidades fixas de $P_2O_5 = 45, 50$ e 55% mol. ($\diamond$ para $y=30\%$ mol CaO, $\square$ para $y=35\%$ mol CaO, Δ para $y=40\%$ mol CaO). [45]	55

Figura 14 - Variação da solubilidade do vidro ternário $(P_2O_5)_x - (CaO)_y - (Na_2O)_{100-x-y}$ (mg/cm ² /h) em função da % molar de CaO presente (x = 45, 50 e 55% e y = 30, 35 e 40% a 37°C e x=50% e y=11 a 50% a 40°C). Adaptado de [45, 62]	56
Figura 15 - Efeito da quantidade de CaO (24-40 %mol) na perda de massa por unidade de área (mg/cm ²) vs. tempo de dissolução do sistema ternário $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_y - (Na_2O)_{55-y}$ (h). (Zoom feito na região de 32-40 %mol de CaO). [8]	56
Figura 16 - Variação da concentração dos íons sódio (Na ⁺) na água destilada (ppm) em função do tempo de dissolução do vidro de composição $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_y - (Na_2O)_{55-y}$. [8]	58
Figura 17 - Variação do pH da solução de água destilada vs. tempo de dissolução (h) de compostos ternários de vidro com base fosfato $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_y - (Na_2O)_{55-y}$, para y = 8, 24 e 40%mol. [8]	58
Figura 18 - Efeito do aumento da percentagem molar de K ₂ O (em 0, 10, 15 e 25%mol) na perda de massa em água destilada 37°C, do PBG quaternário (mg/cm ²), com P ₂ O ₅ e CaO fixos. [31]	59
Figura 19 - Variação do pH da solução com o tempo de dissolução (h) do PBG em água destilada a 37°C, em função da percentagem de TiO ₂ presente no mesmo (0-2,5 % molar). [49]	60
Figura 20 - Perda de massa por unidade de área (mg/cm ²) versus o tempo de dissolução (h) em água destilada a 37°C do PBG quaternário do sistema $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_{24} - (Na_2O)_{31-y} - (TiO_2)_y$ para y=0-25 %massa. [49]	61
Figura 21 - Efeito do recozimento na perda de massa (%) de fibras de PBG com a composição $(P_2O_5)_{40} - (CaO)_{16} - (Na_2O)_{20} - (MgO)_{24}$ em função do tempo (h) (perfil azul e vermelho correspondem à produção de fibras sem recozimento, perfil verde corresponde às fibras com tratamento térmico). [46]	62
Figura 22 - Ilustração esquemática das alterações a nível matricial causadas por erosão superficial e erosão no seio do material. Adaptada de [73]	67
Figura 23 - Valores de espessura crítica, L _c (m), do dispositivo acima do qual este sofre erosão superficial. [73]	70
Figura 24 - Ciclo de vida dos polímeros com base PLA. Adaptado de [103]	75
Figura 25 - Estereoisómeros do ácido láctico.	76
Figura 26 - Processos de obtenção do PLA de baixo e alto peso molecular. [105]	77
Figura 27 - Estereoisómeros do ácido láctico opticamente activo.	78
Figura 28 - Termograma DSC de uma fibra de PLA com a razão altura/comprimento=6. [112]	79
Figura 29 - Temperatura de transição vítrea do PLA (T _g , °C) para diferentes composições do isómero L, em função do seu peso molecular em número (M _n). [108]	80
Figura 30 - Gráfico comparativo das temperaturas de transição vítrea (T _g) e de fusão (T _f - no gráfico definido como T _m) do PLA com outros termoplásticos. [108]	84

Figura 31 - Estados metaestáveis do PLA amorfo (em cima) e semi-cristalino (em baixo) de alto peso molecular. ^[109]	84
Figura 32 - Esquema sequencial de <i>melt spinning</i> . (A)-extrusor, (B)-entrançador, (C)-zona de arrefecimento abrupto, (D1 e D2)-1ª e 2ª guias de tensão, (E)-bobine de PGF (<i>phosphate-based glass fibers</i> - fibras de vidro com base fosfato). Adaptada de ^[41]	86
Figura 33 - Esquema de <i>dry-wet phase-inversion spinning</i> . ^[93]	86
Figura 34 - Produtos da degradação térmica do PLA. ^[108]	89
Figura 35 - Fotomicrografia adquirida por microscopia confocal das fissuras de um polímero degradável após 18,5h em PBS, pH 7,4 e 37°C. ^[72]	91
Figura 36 - Esquema representativo das reacções químicas existentes na degradação hidrolítica do PLA.	92
Figura 37 - Tensão (σ) vs. módulo de elasticidade de <i>Young</i> (E) com relevância para os compósitos a considerar para aplicações biomédicas. ^[13]	94
Figura 38 - Exemplo de prótese da perna, da anca, parafuso dentário, cateteres, monitor cardíaco implantável, pacemaker, sistema reparador de válvulas cardíacas, sensor intravascular, suporte externo do rádio, válvula cardíaca de substituição. ^[9, 104, 139]	95
Figura 39 - Várias aplicações de diferentes biomateriais compósitos poliméricos. ^[9]	104
Figura 40 - Exemplo de máquina de ensaio de tracção. ^[114]	107
Figura 41 - Gráfico típico de tensão nominal (σ , Pa) vs. extensão nominal (ϵ , %) obtido num ensaio de tracção uniaxial dum material dúctil (sendo σ_c - tensão de cedência, σ_R - resistência à tracção, ϵ_f - alongamento de rotura e σ_c - tensão final precedentemente à rotura).....	108
Figura 42 - Esquema exemplificativo do modo de funcionamento do SEM. ^[162]	111
Figura 43 - Esquema representativo do funcionamento do equipamento GPC. ^[9]	112
Figura 44 - Sequência de regeneração óssea num osso cortical. ^[164]	115
Figura 45 - Secção longitudinal do osso maduro do fémur humano. ^[166]	117
Figura 46 - Estágios de reparação do osso. ^[167]	119
Figura 47 - Exemplo de doenças ósseas (gigantismo e nanismo, osteogénese imperfeita, osteomielite e tumor ósseo). ^[167]	120
Figura 48 - Exemplo de fracturas ósseas: a) completa e incompleta, b) transversal e cominutiva, c) impactada e d) espiral e oblíqua. ^[167]	121
Figura 49 - Possível regeneração de tecidos ósseos 3D. ^[173]	123
Figura 50 - Articulação do joelho direito. ^[167]	125
Figura 51 - Articulação do joelho direito (cont.). ^[167]	126
Figura 52 - Exemplo de ocorrência de uma lesão traumática no ligamento lateral interno após uma pancada no lado externo do joelho direito. ^[167]	127
Figura 53 - Ilustração da lesão parcial ou total do ACL. Adaptada de ^[181]	128

Figura 54 - Ilustrações dos materiais utilizados: aparas de PLLA, fibras contínuas e aparas de PBG.	131
Figura 55 - Imagem das aparas de fibras de PBG obtida por microscopia óptica com ampliação de 100x	132
Figura 56 - Gráfico da distribuição de tamanhos das fibras de PBG utilizadas.	132
Figura 57 - Aspecto transparente da mistura de PLA/CHCl ₃ e transferência da mesma para o molde de alumínio; aspecto opaco da mistura de PLB/PBG/CHCl ₃ e imagem da mesma no molde de alumínio.	134
Figura 58 - Molde de silicone utilizado na execução dos provetes de PLA; o mesmo molde após deformação dimensional.	135
Figura 59 - Molde de alumínio pré e pós revestimento a Teflon <i>Flucoat 108 Verde</i> , utilizado na manufatura dos provetes de PLA e PLA/PBG.	135
Figura 60 - Placas de PLA deformadas pela utilização inadequada do vácuo na sua produção.	136
Figura 61 - Variação da massa do conjunto molde+mistura de PLA/CHCl ₃ durante a evaporação do solvente recorrendo ao vácuo.	137
Figura 62 - Variação da massa do conjunto molde+mistura de PLA/CHCl ₃ durante a evaporação do solvente recorrendo ao vácuo somente nas 12h iniciais.	138
Figura 63 - Placas de PLA e PLA/PBG obtidas pelo procedimento de <i>solvent casting</i>	138
Figura 64 - Placa de PLA/PBG marcada com as dimensões requeridas dos provetes, corte das marcações feitas e provetes resultantes (1º - exemplar de compósito PLA/PBG, 2º - exemplar de PLA).	139
Figura 65 - Esquema da norma ASTM D 638-03 exemplificativo das medidas dos provetes para materiais do tipo I, II, III e V. ^[183]	139
Figura 66 - Imagem dos espécimes de PBG preparados para tracção.	140
Figura 67 - Imagem do tanque e tubos de <i>Falcon</i> utilizados.	141
Figura 68 - Imagem do porta-amostras com 3 das 8 posições de fixação ocupadas com partes de amostras previamente dissecadas e fixadas vertical e horizontalmente.	143
Figura 69 - Fotografia do equipamento utilizado para aplicar um revestimento de ouro nas amostras a observar em SEM (<i>Joel Fine Coat Ion Sputter JFC - 1100</i>).	143
Figura 70 - Imagem do plasma formado dentro da câmara de deposição e pormenor do revestimento final em ouro das amostras fixadas previamente no porta-amostras.	144
Figura 71 - <i>Jeol Scanning Microscope JSM - 5200</i>	144
Figura 72 - Configuração do equipamento típico de impregnação recomendado para impregnação dos espécimes de PBG a traccionar. ^[184]	145
Figura 73 - Aspecto dos provetes de PLA sem degradação (amostra de referência) e ao longo de 4 estágios de degradação.	148

Figura 74 - Aspecto dos espécimes de PBG sem degradação (amostra de referência) e ao longo de 8 estágios de degradação.	149
Figura 75 - Aspecto dos provetes do compósito PLA/PBG sem degradação (amostra de referência) e ao longo de 6 estágios de degradação.	149
Figura 76 - Gráfico representativo da perda de massa dos provetes de PLA (%) ao longo dos estágios de degradação (semanas), com um desvio absoluto de 0,3.	150
Figura 77 - Gráfico representativo da perda de massa dos espécimes de PBG (%) ao longo dos estágios de degradação (semanas), com um desvio absoluto de 4,2.	151
Figura 78 - Gráfico representativo da perda de massa dos provetes de compósito de PLA/PBG (%) ao longo dos estágios de degradação (semanas), com um desvio absoluto de 0,25.	153
Figura 79 - Imagem de SEM para amostras de PLA sem degradação.	154
Figura 80 - Imagem de SEM para amostras de PBG sem degradação.	156
Figura 81 - Imagem de SEM para amostras de compósito PLA/PBG sem degradação.	157
Figura 82 - Imagem SEM para amostras de PLA após 8 semanas de degradação em PBS a 37°C.	159
Figura 83 - Imagens SEM para amostras de PBG com 1, 4 e 8 semanas de degradação em PBS a 37°C.	161
Figura 84 - Imagem de SEM para amostras de PLA/PBG após 8 semanas de degradação em PBS a 37°C.	165
Figura 85 - Gráfico do comportamento da tensão de cedência, σ_c (MPa) dos provetes de PLA e PLA/PBG ao longo do tempo de degradação (semanas) em PBS a 37°C, com um desvio padrão de $\pm 0,17$ e $\pm 0,42$, respectivamente.	169
Figura 86 - Gráfico da resistência à tracção, σ_R (MPa) dos provetes de PLA e PLA/PBG ao longo do tempo de degradação (semanas) em PBS a 37°C, com um desvio padrão de $\pm 10,77$ e $\pm 2,9$, respectivamente.	170
Figura 87 - Gráfico do alongamento após rotura, ϵ_f (%) dos provetes de PLA e PLA/PBG ao longo do tempo de degradação (semanas) em PBS a 37°C, com um desvio padrão de $\pm 2,1$ e $\pm 0,66$, respectivamente.	172
Figura 88 - Gráfico do módulo de Young, E (MPa) dos provetes de PLA e PLA/PBG ao longo do tempo de degradação (semanas) em PBS a 37°C, com um desvio padrão de ± 15 e ± 10 , respectivamente.	173

Anexo A

Figura A 1 - Circuito fechado típico de secagem antes da extrusão do PLA. ^[108]	194
Figura A 2 - Esquema dos componentes mais relevantes de um equipamento de fundição injectada. ^[108]	194
Figura A 3 - Ilustração da injeção de uma garrafa de PLA por conformação por sopragem (ISBM - <i>injection stretch blow molding</i>). ^[108]	195
Figura A 4 - Linha típica de extrusão orientada biaxialmente e vazamento de filmes. ^[108] ...	195
Figura A 5 - Extrusão seguido de espalmamento e sopragem. ^[108]	196
Figura A 6 - Passos principais do processo de conformação térmica. ^[108]	196
Figura A 7 - Instalação típica do processo <i>electrospinning</i> . ^[108]	197

Anexo C

Figura C 1 - Curva da força aplicada (N) vs o tempo de ensaio de tracção (s) resultante da tracção de uma amostra de fibras de PBG realizada a uma velocidade de 0,4mm/min.	201
Figura C 2 - Curva da força aplicada (N) vs o tempo de ensaio de tracção (s) resultante da tracção de uma amostra de fibras de PBG impregnada com resina epoxi, realizada a uma velocidade de 0,4mm/min.....	201
Figura C 3 - Curva da força aplicada (N) vs o tempo de ensaio de tracção (s) da tracção de uma amostra de fibras de PBG impregnada com cianocrilato, realizada a uma velocidade de 0,4mm/min.	202
Figura C 4 - Curvas da força aplicada (N) vs o tempo de ensaio de tracção (s) resultantes de ensaios de tracção a provetes de PLA realizados a diferentes velocidades. ...	203
Figura C 5 - Curvas da tensão aplicada (N) vs o tempo de ensaio de tracção (s) resultantes de ensaios de tracção a provetes de compósito PLA/PBG realizados a diferentes velocidades.	204
Figura C 6 - Gráfico do comportamento do provete de PLA com 6 semanas de degradação em PBS a 37°C traduzido em dados de força aplicada (N) versus deslocamento entre amarras sofrido pelo provete (mm).	206

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Algumas aplicações representativas da ET. ^[11]	30
Tabela 2 - Considerações críticas para uma estrutura de suporte para aplicação e regeneração óssea. ^[34-36]	34
Tabela 3 - Técnicas de análise térmica. ^[54]	44
Tabela 4 - Velocidade de degradação dos PBG ($\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$) em função da composição dos PBG (%mol), e da solução e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) em que se dá a dissolução dos mesmos.	49
Tabela 5 - Propriedades mecânicas de algumas composições de fibras de PBG.	50
Tabela 6 - Temperaturas de transição vítrea (T_g , $^{\circ}\text{C}$) e fusão (T_f , $^{\circ}\text{C}$) para copolímeros de PLA com diferentes razões dos isómeros L e D,L (ou diferentes % de cristalização). Adaptado de ^[108]	80
Tabela 7 - Propriedades do PLLA. Adaptado de ^[39]	81
Tabela 8 - Solubilidade de alguns copolímeros com base ácido láctico em alguns solventes orgânicos. ^[101]	82
Tabela 9 - Propriedades mecânicas do PLLA (obtido por injeção a 195°C). ^[103]	83
Tabela 10 - Valores de tensão, extensão e módulo de <i>Young</i> para filmes de PLA processados por termo-compressão e <i>solvent casting</i> . ^[115]	83
Tabela 11 - Importância de diversos factores na selecção dos materiais para aplicações biomédicas. ^[9]	93
Tabela 12 - Técnicas de fabricação de matrizes porosas.	106
Tabela 13 - Resistência à tracção (MPa) do osso cortical do fémur humano em função da idade do mesmo (anos). ^[168]	117
Tabela 14 - Ligamentos da articulação do joelho (visíveis na figura seguinte). ^[167]	125
Tabela 15 - Dimensões dos espécimes relativos ao material tipo V referente à norma ASTM D 638-03. ^[183]	140
Tabela 16 - Designações de velocidade do teste de tracção para os diferentes tipos de materiais. ^[183]	146

Anexo C

Tabela C 1- Influência da velocidade do ensaio de tracção nas propriedades mecânicas do compósito PLA/PBG com 6 semanas de degradação em PBS a 37°C	205
--	-----

Abreviaturas e Símbolos

Abreviaturas

ACL	<i>anterior cruciate ligament</i> (ligamento cruzado anterior)	FMUP	Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
AFM	<i>atomic force microscopy</i> (microscopia de força atómica)	GA	ácido glicólico
APS	<i>aminopropyltriethoxysilane</i> (aminopropiltrietoxisilano)	GFP	<i>green fluorescent protein</i> (proteína verde fluorescente)
Auger	Espectroscopia de electrões Auger	GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i> (cromatografia de permeação em gel)
BG	<i>bioactive glasses</i> (vidros bioactivos)	HA	hidroxiapatite
BGC	<i>bioactive glass ceramics</i> (vidros cerâmicos)	HEMA	<i>hydroxyethyl methacrylate</i> (hidroxietil metacrilato)
BMSCs	<i>bone marrow stromal cells</i> (células do estroma da medula óssea)	INEGI	Instituto de Engenharia Mecânica e Gestão Industrial
CL	ϵ -caprolactona	ISBM	<i>Injection Stretch Blow Molding</i> (injecção por conformação por sopragem)
co	copolímero	MEC	matriz extracelular
DLC	<i>diamond like carbon</i>	MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> (meio essencial mínimo)
DMA	<i>Dynamic Mechanical Analysis</i> (análises mecânicas dinâmicas)	NSF	<i>National Science Foundation</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	OCP	<i>octacalcium phosphate</i> (fosfato de octacálcio)
ADN	ácido desoxirribonucleico	PBG	<i>phosphate-based glasses</i> (vidros com base fosfato)
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i> (calorimetria diferencial de varrimento)	PBS	<i>(phosphate buffered saline)</i> solução salina de tampão fosfato
DTA	<i>Differential Thermal Analysis</i> (análise térmica diferencial)	PCL	<i>posterior cruciate ligament</i> (ligamento cruzado posterior)
EDS	Espectroscopia de difracção de electrões		
ET	engenharia dos tecidos		
EVOH	<i>ethylene vinyl alcohol</i>		
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>		

PCL	<i>poly-ε-caprolactone</i> (policaprolactona)	PVC	<i>poly(vinyl chloride)</i> (policloreto de vinilo)
PE	<i>polyethylene</i> (polietileno)	PVP	<i>polyvinylpyrrolidone</i> (polivinilpirolidona)
PEG	<i>polyethylene glycol</i> (polietileno glicol)	rac	mistura racémica
PEO	<i>polyethylene oxide</i> (óxido polietileno)	SBF	<i>simulated body fluid</i>
PET	<i>poly(ethylene terephthalate)</i> (polietileno tereftalato)	SEC	<i>Size Exclusion Chromatography</i>
PGA	<i>polyglycolic acid</i> (ácido poliglicólico)	SEM	microscopia electrónica de varrimento (<i>Scanning electron microscopy</i>)
PGF	<i>phosphate-based glass fibers</i> (fibras de vidro com base fosfato)	SR	<i>silicon rubber</i> (silicone)
PHB	<i>poly(3-hydroxybutyrate)</i> (poli(3-hidroxibutirato))	TCA	<i>tricarboxylic acid</i> (ácido tricarbóxico)
PHV	<i>polyhydroxyvalerate</i> (polihidroxivalerato)	TCP	<i>tricalcium phosphate</i> (fosfato de tricálcio)
PLA	<i>polylactic acid</i> (ácido poliláctico)	TGA	<i>thermogravimetric analysis</i> (análises termogravimétricas)
PTFE	<i>polytetrafluoroethylene</i> (politetrafluoretileno)	XPS	<i>X-ray photoelectron spectroscopy</i> (espectroscopia fotoelectrónica de raios-X)
PVA	<i>polyvinyl alcohol</i> (álcool polivinílico)		

Símbolos

A	alongamento pós rotura	l_f	comprimento final de rotura do provete
A_0	área inicial da secção transversal do provete	L	espessura da amostra polimérica
A_f	área no instante da rotura do provete	L_c	espessura crítica
c'	calor específico mássico	M_n	<i>number-average molecular weight</i> (peso molecular médio em número)
D	coeficiente de difusão da água no polímero	M_{nt}	<i>number average molecular weight at time t</i> (peso molecular médio em número no instante t)
E	concentração de grupos éster	M_{n0}	<i>initial number average molecular weight</i> (peso molecular médio em número no instante inicial)
E	módulo de <i>Young</i>	M_v	<i>viscosity average molecular weight</i> (peso molecular médio em termos de viscosidade)
F	força aplicada	M_w	<i>weight average molecular weight</i> (peso molecular médio em massa)
G	módulo de corte ou distorção		
k	constante		
K	módulo de volume ou “ <i>bulk</i> ”		
l	comprimento instantâneo do provete		
l_0	comprimento inicial do provete que sofre de deformação (entre amarras)		

P	carga	x	dimensão linear do provete
P _{máx.}	carga máxima obtida no ensaio de tracção	X _c	grau de cristalinidade
P _{0,2}	carga que provoca uma extensão permanente de 0,2% no provete	Z	valência iónica
r	raio do ião	Z	redução de área
t	tempo	ΔF	intensidade de campo de dois iões
T	temperatura	ΔH _f ⁰	entalpia de fusão (100% cristalino)
T _{amb}	temperatura ambiente	ΔH _f	entalpia de fusão
T _c	temperatura de cristalização	ΔH _c	entalpia de cristalização
T _f	temperatura de fusão	Δl	variação do comprimento do provete
T _g	temperatura de transição vítrea	ε	extensão nominal
T _g [∞]	temperatura de transição vítrea para o peso molecular médio em massa infinito	ε _f	alongamento de rotura
v	volume	η	viscosidade
V _m	velocidade de hidrólise	η _i	viscosidade intrínseca
w	<i>weight</i> (peso)	ρ	densidade
W _c	<i>water concentration</i> (concentração de água)	σ	tensão nominal
W _s	massa do provete molhado	σ _R	resistência à tracção
W _r	massa do provete seco	σ _c	tensão de cedência
		τ _D	tempo característico de difusão
		τ _H	tempo característico da hidrólise
		ν	coeficiente de <i>Poisson</i>

Elementos/fórmulas químicos(as)

Ag	prata	CO ₂	dióxido de carbono
Al	alumínio	Cr	crómio
Al ₂ O ₃	óxido de alumínio ou alumina	CuO	óxido de cobre II
Au	ouro	(C ₆ H ₈ O ₆) _n	alginato
Bi	bismuto	Fe	ferro
B ₂ O ₃	trióxido de diboro	Fe ₂ O ₃	óxido de ferro III - hematite
C	carbono	Ga	gálio
Ca ²⁺	ião cálcio	H ⁺	ião hidrogénio
CaHPO ₄	monetita	H ₂ O	água
CaHPO ₄ ·2H ₂ O	fosfato de cálcio dihidratado (brushita)	KCl	cloreto de potássio
CaO	óxido de cálcio	KH ₂ PO ₄	hidrogeno fosfato de potássio
Ca ₂ P ₂ O ₇	pirofosfato de cálcio	M	elemento metálico
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	hidroxiapatite	Mn	manganês
Co	cobalto	Mn ²⁺	ião manganês
		Mo	molibdénio

N	azoto	Se	selénio
Na ⁺	ião sódio	Si	silício
NaCl	cloreto de sódio	SiO ₂	dióxido de silício
Na ₂ HPO ₄	hidrogenofosfato de sódio	Ta	tântalo
Na ₂ O	óxido de sódio	Te	telúrio
Ni	níquel	Ti	titânio
O ₂	oxigénio	Ti ⁴⁺	ião titânio
OH ⁻	ião hidróxido	TiO ₂	dióxido de titânio
P	fósforo	V	vanádio
PO ₄ ³⁻	ião fosfato	W	tungsténio
P ₂ O ₅	óxido fosforoso	Zn	zinco
S	enxofre		

Capítulo 1

Revisão Bibliográfica

Neste capítulo é feita uma introdução às áreas engenharia dos tecidos (ET) e medicina regenerativa, aos métodos gerais de processamento dos materiais que utilizam, bem como as particularidades destas áreas na regeneração óssea e de ligamentos.

Resumidamente são descritos os polímeros que estas áreas utilizam e os tipos de degradação a que estão sujeitos; e são enumeradas algumas particularidades, exemplos de processamento e comportamentos de degradação hidrolítica dos materiais utilizados neste trabalho, PLA e PBG.

É posteriormente feito um breve resumo das aplicações biomédicas dos materiais referidos, com a descrição de alguns processos utilizados na sua produção.

Finalmente pretende-se dar a conhecer alguns conceitos e termos específicos de duas áreas de aplicabilidade dos materiais utilizados (regeneração e/ou substituição de tecidos ósseos e recuperação do ligamento cruzado anterior (ACL) do joelho), necessários para a compreensão da evolução dos ensaios deste trabalho.

1.1 Engenharia dos tecidos e medicina regenerativa

A medicina regenerativa classifica a prática clínica que tem como foco os aspectos físicos da recuperação funcional a par das considerações médicas, factores neurológicos e psicológicos. A tecnologia de reabilitação que utiliza é definida como sendo a selecção, o *design*, ou o fabrico de dispositivos auxiliares adequados à incapacidade específica do paciente em questão. Estes dispositivos são seleccionados com base na deficiência específica,

na função a ser restaurada ou melhorada, no desejo do paciente, nas preferências clínicas, nos custos da tecnologia, e no ambiente no qual esse dispositivo será utilizado. ^[3]

A engenharia dos tecidos (ET), associada à medicina regenerativa, surge nos anos 80 ^[4] como uma área multidisciplinar que engloba princípios da bioquímica, engenharia e ciência dos materiais. Uma vez que a maior parte das patologias ou destruição de tecido, tem como resultado a lesão celular associada à perda parcial ou completa da função desse órgão (ex.: cirrose, infecções bacterianas) ^[5], a ET procura desenvolver e/ou manipular moléculas, células, tecidos ou órgãos, com o objectivo de regenerar, reparar anomalias, substituir, melhorar ou apoiar partes do corpo deficientes, degeneradas ou lesadas com vista a uma recuperação das suas funções biológicas e funcionais ^[6, 7]. A NSF - *National Science Foundation* (USA) define a ET como “a aplicação dos princípios e métodos da engenharia e ciências da vida, fundamentais para a compreensão da relação entre a estrutura/função da normal patologia dos tecidos dos mamíferos e o desenvolvimento de substitutos biológicos para reparar, manter ou melhorar funções”. ^[8]

Sendo a prioridade da ET e da medicina regenerativa a reparação em vez da substituição, envolve processos biofísicos naturais, componentes do próprio organismo ^[2], e construções de tecidos artificiais com base em materiais biológicos ou sintéticos ^[5]; com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes ^[9].

O trabalho ao nível da célula ou do tecido é muitas vezes considerado como engenharias distintas: regenerativa das células ou dos tecidos, respectivamente. No entanto, estas estão muitas vezes associadas e torna-se difícil a sua distinção. Actualmente, qualquer reabilitação clínica necessita de manipulações de engenharia a todos os níveis: célula, tecidos e moléculas. ^[5]

A ET assenta em duas diferentes estratégias (Figura 1): o desenvolvimento de materiais porosos com capacidade de alojar células e guiar a regeneração *in vivo*; e o desenvolvimento de estrutura de suporte 3D onde há a implantação de células *in vitro* no sentido de promover a secreção da matriz extracelular (MEC) e a formação de tecido *in vitro*, precedentemente à implantação. ^[3, 10, 11]

Uma das grandes vantagens da ET é reduzir o número de operações cirúrgicas necessárias para a regeneração e/ou substituição de tecidos resultando num curto período de tempo de recuperação do paciente. No entanto, as exigências dos materiais para a ET são múltiplas. ^[12] Numa perspectiva biológica são necessárias a matriz extracelular, células, comunicação intercelular, interacções células-matriz, e factores de crescimento; e para se obter um bom resultado final, todas estas exigências têm que ser combinadas de uma forma coordenada. ^[13]

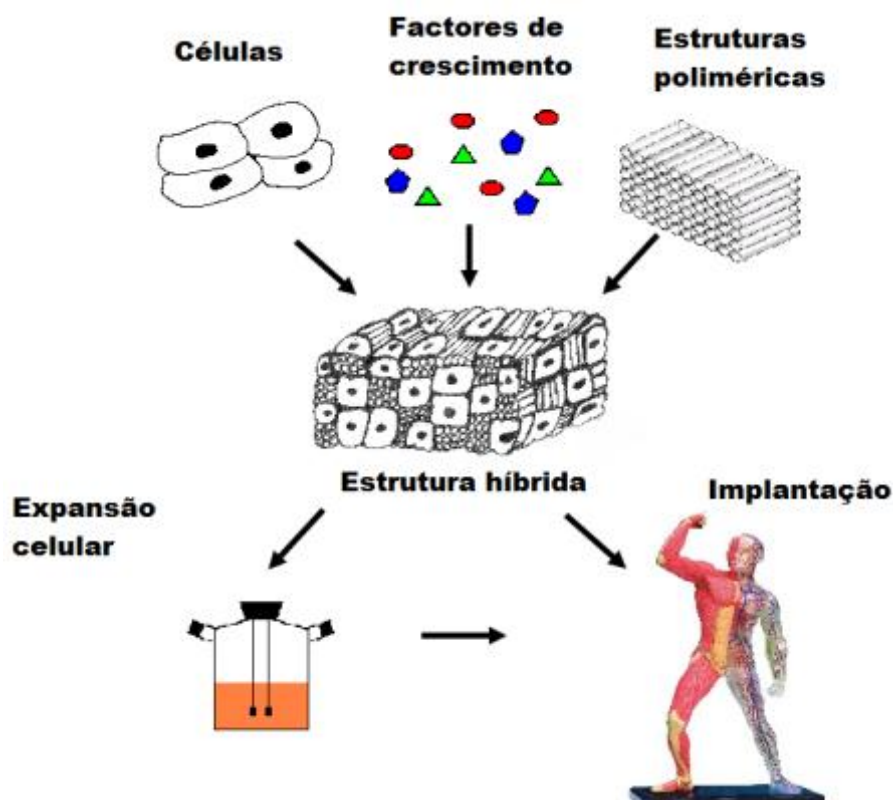


Figura 1 - Diferentes estratégias da ET na recuperação da função dos tecidos.

1.1.1 Matriz extracelular - estrutura de suporte

A MEC humana é uma malha complexa, relativamente flexível, de grandes moléculas orgânicas extracelulares (fibras de colagénio, elásticas ou de lâmina, e proteoglicanos ^[14]), que mantêm ligadas entre si as células animais, uma vez aliada às adesões das membranas plasmáticas das próprias células. ^[6] Constitui o suporte matricial que sustenta fisicamente células organizadas, tecidos e órgãos; contribui para a morfogénese¹ e constituição da forma dos tecidos e órgãos; confere suporte mecânico e protecção aos tecidos e órgãos; e funciona como uma malha que participa na coordenação da adesão, proliferação, migração, forma e função celular. ^[5]

A referida estrutura de suporte necessária na ET pode existir na forma de membranas, malhas, placas, parafusos, tampões ou perfis circulares ^[16]; e poderá ser natural ou sintética, composta por polímeros, cerâmicos ou compósitos. Tem como propósito imitar a MEC humana e, como tal, também visa proporcionar às células um suporte mecânico e físico de modo a mantê-las na orientação desejada, e assegurar as propriedades dos componentes da MEC no sentido de promover o crescimento celular e restaurar a função diferenciada.

¹ Desenvolvimento das formas e estruturas de um organismo. ^[15]

As estruturas de suporte mecânico e físico são necessárias para, por exemplo:

- a) reparação de articulações, ossos, pele, vasos sanguíneos e válvulas cardíacas;
- b) reparação e/ou substituição do fígado e pâncreas através de suportes que guiem a regeneração dos tecidos lesados ou totalmente destruídos, compostos por células e glândulas responsáveis pela secreção de hormonas, enzimas e componentes bioquímicos;
- c) estruturas com factores de crescimento utilizadas na reparação do coração e músculos; e
- d) reparação de nervos recorrendo a suportes que consigam processar sinais eléctricos e químicos. ^[5]

A estratégia mais usual na ET convencionada a utilização de um biomaterial² como estrutura de suporte temporária, e os biomateriais mais atractivos para estas estruturas de suporte são os naturais ou sintéticos biorreabsorvíveis. A matriz ou estrutura ideal de suporte deve ser não-imunogénica³, não-tóxica, biocompatível⁴, biodegradável⁵ e de fácil processamento. ^[2] A vantagem dos materiais sintéticos é a sua grande flexibilidade de *design* em termos de composição do material, processamento, controlo da porosidade e das suas propriedades mecânicas; e de poderem ser simultaneamente biorreabsorvíveis no sentido de serem totalmente degradáveis em metabolitos naturais do próprio corpo por simples hidrólise em condições fisiológicas. ^[6, 7, 19]

1.1.2 Células

As células utilizadas na ET têm diferentes fontes -auto, alo e/ou xenogénicas; podem ser de diferentes tipos -diferenciadas, progenitoras e não diferenciadas ou estaminais⁶; e ainda passíveis de serem manipuladas geneticamente (incorporação de material genético ou modulação para prevenir imunorrejeição). ^[19]

De um modo geral, a transplantação celular como conceito da ET envolve: o isolamento e expansão *in vitro* das células do paciente relevantes para o tecido lesado; a subsequente implantação destas células num substrato de suporte constituído por materiais biocompatíveis e, preferencialmente, biodegradáveis; e por último, a implantação do substrato na área lesada para que este possa continuar o seu desenvolvimento *in vivo*. ^[21]

² Material utilizado como interface com os sistemas biológicos para diagnosticar, tratar ou substituir qualquer sistema vivo (tecido, órgão ou função corporal) ou para funcionar em contacto directo com este. ^[17]

³ Incapaz de suscitar uma reacção imunitária. ^[15]

⁴ Habilidade do material para funcionar e provocar a resposta adequada do hospedeiro, numa aplicação específica. Implica a biocompatibilidade ou harmonia do biomaterial com os sistemas vivos. ^[9]

⁵ Material que não necessita de ser removido cirurgicamente quando deixa de ser necessário, pelo que a sua utilização dá-se em aplicações de curto prazo requerendo apenas a presença temporária do mesmo. Neste material há quebra de ligações covalentes por biofragmentação (ponto 1.2.3.1Degradação e erosão - página 63), com dispersão do material no corpo. ^[18]

⁶ Células que podem diferenciar-se em diversos tipos celulares, tendo igualmente a capacidade de se auto-renovar e dividir indefinidamente. ^[20]

No que diz respeito ao tipo de células a utilizar, uma vez que a maioria das células dos mamíferos depende do sucesso da sua ancoragem para reproduzirem os objectivos propostos, estas devem estabelecer ligação com o substrato e conseguir proliferar no mesmo para que se desenvolvam e funcionem normalmente. Assim sendo, a adesão celular tem uma elevada importância na ET e é normalmente mediada por proteínas específicas da MEC ^[22] como a fibronectina, vitronectina, laminina, colagénio e diferentes glicosaminoglicanos. A adsorção destas proteínas às superfícies e a conformação das proteínas adsorvidas detém um papel preponderante na fixação e crescimento dos substratos sintéticos.

Deste modo, a fixação celular eficiente depende especialmente de 3 pontos: da afinidade da superfície de determinada célula proteica aos componentes da MEC; da força das ligações célula-substrato na superfície do material; e da presença ou não de factores nutricionais. Após a fixação, as células migram pela superfície e adquirem uma forma estável, sendo que a sua morfologia final depende essencialmente da aderência do substrato para aquelas células ^[20, 22] (depende da afinidade e número de locais disponíveis para adesão celular), da rigidez do substrato (capacidade de resistir às forças de tracção geradas pelas células), e da aderência célula-célula. Ou seja, pode aumentar-se a proliferação celular com o aumento da quantidade de fibronectina adsorvida à superfície, conduzindo assim a um aumento de síntese de ADN (proliferação celular).

No entanto, deve ser tida em conta a diferença quantitativa entre as forças de adesão célula-substrato e célula-célula, num substrato rígido, pois pode ser também um factor que afecta significativamente a organização das células nesse substrato. ^[11]

Alguns dos casos em que é necessário incorporar células funcionais na construção do suporte de tecido é na reparação de tecidos hepáticos, cardíacos, pancreáticos e nervosos ^[5]. As células maioritariamente utilizadas para o efeito são usualmente fibroblastos, osteoblastos e células-tronco ou derivadas destas (derivadas do osteossarcoma humano⁷, por serem consideradas representativas do comportamento dos osteoblastos, osteoblastos humanos de fragmentos ósseos alveolares tratados enzimaticamente, fibroblastos humanos craniofaciais ou do tendão ^[21]).

Por outro lado, para alguns tipos de tecidos como o osso, articulações, vasos sanguíneos e válvulas cardíacas, não é necessário a incorporação de células vivas na construção do tecido, embora a sua presença possa melhorar a eficácia do tecido de substituição. ^[5] São muitas vezes isoladas células da medula óssea do próprio paciente, derivadas do estroma e recolhidas durante cirurgias de substituição total da anca. Neste caso recorre-se a um veio heparinizado⁸ de medula óssea do fémur que é mergulhado num gradiente *Ficoll*⁹ onde são separadas as células mononucleadas para posterior implantação em frascos de poliestireno e

⁷ Também denominado por sarcoma osteogénico, é um tumor maligno no interior de um osso. ^[21]

⁸ Tratado com heparina com a finalidade de aumentar o tempo de coagulação ou a incoagulabilidade. ^[15]

⁹ Polímero sintético de sacarose utilizado para separar diferentes tipos de células durante a sedimentação. ^[15]

incubadas com o meio essencial mínimo apropriado (MEM - *Minimum Essential Medium Eagle*, meio sintético de cultura celular ^[23]), soro fetal bovino, glutamina ¹⁰ e solução antibiótica (penicilina/estreptomicina) a 37°C, numa atmosfera com 5% de CO₂. O tratamento posterior das células difere consoante a adesão destas ao meio foi ou não bem sucedida; as células que não aderiram são removidas após 4 dias de incubação e as células da medula óssea humana aderidas são, na mesma data, subcultivadas em meio padrão com ascorbil 2-fosfato¹¹ e separadas. ^[25]

A cultura celular pode também ser reproduzida pela utilização de osteoblastos humanos (MG63, HOS (TE85), por exemplo) incubados *in vitro* a 37°C em atmosfera humidificada e 5% de CO₂, na presença de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM), soro fetal bovino, glutamina, penicilina e estreptomicina. Esta cultura é renovada periodicamente (2 vezes por semana); e numa subcultura, as monocamadas celulares são lavadas com solução salina de tampão fosfato (PBS - *phosphate buffered saline*) e incubadas com tripsina-EDTA durante 5 min a 37°C para serem isoladas antes de serem novamente sujeitas a cultivo por 48h em placas de titulação. As células são posteriormente incubadas por alguns dias antes de serem sujeitas aos testes acima mencionados. ^[26]

1.1.3 Objectivo da ET

A ET parte do princípio que polímeros biodegradáveis combinados com células de tecido específicas em culturas, regeneram tecidos e órgãos para posterior implantação; e segue a estratégia de desenvolver estruturas biomiméticas¹² e anisotrópicas¹³, orientadas de acordo com a morfologia do esqueleto natural dos tecidos hospedeiros. ^[7] Este paradigma assenta na possibilidade de desenvolver tecidos e órgãos *in vitro* e/ou *in vivo* a partir do isolamento celular por dissociação enzimática do tecido dador, deixando de ser necessária a utilização de animais cobaias para o mesmo efeito. ^[11]

O desenvolvimento *in vitro* inclui a utilização de tecidos bioartificiais¹⁴ em alternativa à transplantação de órgãos; que para além da potencial utilização clínica, a reconstrução de órgãos pode ser utilizada como ferramenta no estudo *in vitro* de funções e morfogénese complexas de tecidos. A estratégia *in vivo* da ET tem como objectivo modificar o crescimento e funções celulares *in situ*. ^[11]

¹⁰ Nutriente energético das células que também promove o seu crescimento. ^[15]

¹¹ Pró-vitamina C estável e solúvel em água. ^[24]

¹² Que têm por objectivo imitar estruturas biológicas e as suas funções naturais - imitar a natureza.

¹³ Que possuem alguma propriedade física dependente da orientação dada (por exemplo: orientação das fibras que compõem a estrutura).

¹⁴ Tecidos compostos por substâncias naturais e sintéticas. ^[11]

Como exemplos de necessidades de regeneração *in vivo* recorrendo ao desenvolvimento de estruturas de suporte 3D *in vitro* podem-se enunciar: a) a reparação de uma lesão das células nervosas; ou seja, uma vez que o crescimento das células nervosas geralmente é aleatório e não se propaga desde o tecido lesionado até ao tecido hospedeiro, a melhor estratégia para solucionar esta incapacidade é conseguir orientar fisicamente o crescimento linear dos axónios através do tecido lesado, permitindo deste modo uma continuidade da arquitectura original dos mesmos e aumentando a possibilidade de uma recuperação funcional total ^[7]; b) o preenchimento de uma lesão óssea com uma estrutura de suporte 3D, cultivada com células ou incubada em factores de crescimento (providos através de sistemas de libertação poliméricos ^[22]). A estrutura de suporte é lentamente infiltrada pelo novo osso (que cresce no espaço entre os dois segmentos ósseos lesados através de proliferação celular dando-se deste modo a formação da MEC), e o tecido acaba por regenerar corrigindo o defeito (há uma modelação fenotípica, uma organização da MEC e a degradação da estrutura de suporte). ^[19, 27]

Outros exemplos representativos de aplicações da ET estão resumidos na tabela seguinte.

Tabela 1 - Algumas aplicações representativas da ET. ^[11]

APLICAÇÃO	EXEMPLOS
Dispositivo implantável ¹⁵	Enxertos vasculares endoteliais
Dispositivo extra corpóreo	Osso e cartilagem
Produção celular	Pele bioartificial
Reparação e crescimento de tecidos <i>in situ</i>	Pequenas porções pancreáticas bioartificiais Células neurotrasmisoras-secretoras Fígado bioartificial Hematopoese ¹⁶ <i>In vitro</i> Regeneração nervosa Pele artificial

Todos os progressos na biologia celular, especialmente no campo das células estaminais, têm atribuído aos factores de crescimento um papel importante no controlo da proliferação e diferenciação dos tipos de células específicas. Para além disso, os procedimentos protocolares criteriosos de culturas celulares permitem-nos actualmente conseguir multiplicar e/ou modificar geneticamente populações de células específicas; e, deste modo, todas as células de tecidos provenientes de dadores ou do próprio paciente, incluindo as células

¹⁵ Implante - dispositivo médico que poderá não ser permanente, constituído por um ou mais biomateriais, e que é intencionalmente inserido no corpo, total ou parcialmente abaixo da superfície epitelial. (vs Prótese - dispositivo normalmente permanente, utilizado para substituição de um membro, órgão ou tecido do corpo.) ^[28]

¹⁶ Processo de formação, desenvolvimento e maturação dos elementos do sangue (eritrócitos, leucócitos e plaquetas) a partir de um precursor celular comum e indiferenciado. ^[29]

indiferenciadas ou estaminais adultas, podem ser reproduzidas e multiplicadas em cultura, e associadas a biomateriais reabsorvíveis de origem sintética ou biológica.

Posto isto, virtualmente todas as lesões de qualquer tecido, mesmo aquelas incapazes de ser solucionáveis pelas técnicas tradicionais médicas, seriam tratáveis. E é neste campo que o uso dos biomateriais especificamente desenvolvidos para um tecido específico e para as necessidades das células cultivadas *in vitro*, surge como promotor de novas investigações e desenvolvimentos de uma nova era de dispositivos transplantáveis. De grande importância também, é o facto de a ET poder dar respostas a estas questões através da utilização de pequenas quantidades de materiais. ^[2]

O desafio é então conseguir imitar a natureza e para isso a ET deve ser capaz de sintetizar polímeros capazes de realizar funções biológicas e ter em conta que as propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas de um material biodegradável vão inevitavelmente variar com o tempo, assim como há a possibilidade de os produtos de degradação que possam eventualmente ser produzidos, possam apresentar diferentes níveis de compatibilidades relativamente ao material inicialmente adjacente. ^[17]

Para tal, alguns requisitos essenciais nos materiais utilizados em ET prendem-se com o facto de ^[2, 6, 7, 10, 17, 27]:

- i. serem biocompatíveis a longo termo para não invocarem uma reacção tóxica ou inflamatória adversa, nem uma resposta imune após a sua implantação. ^[17] Esta biocompatibilidade deve ser ao nível da superfície dos materiais (em termos da sua química, biologia, física e morfologia) e da sua estrutura (propriedades mecânicas como o módulo elástico ou módulo de *Young* (E) e resistência, *design* do implante final, e transmissão de carga óptima (tensão mínima de coerência interfacial) na interface do implante/tecido. ^[9] Alguns dos factores que podem influenciar a biocompatibilidade dos biomateriais incluem a já referida química do mesmo, o seu peso molecular, solubilidade, forma e estrutura do implante, hidrofiliidade/hidrofobicidade, lubrificidade, energia de superfície, capacidade de absorção de água, a degradação e mecanismo de erosão ^[17];
- ii. terem produtos de degradação não -tóxicos e que possam ser eliminados por simples filtração ou metabolizados para serem eliminados do corpo - biorreabsorvíveis ^[17];
- iii. serem capazes de promover a viabilidade, adesão, proliferação, migração e diferenciação de células específicas - esta capacidade aumenta significativamente se a matriz for porosa ^[2];
- iv. serem osteointegráveis - nas redondezas do implante o comportamento deve ser semelhante ao que ocorreria aquando de uma reparação natural de uma fractura, envolvendo sucessivos eventos celulares e extracelulares conduzindo deste modo a uma regeneração do tecido danificado após implantação, cirurgia ou lesão ^[1];
- v. terem uma biodegradabilidade controlada adequada à velocidade de formação da nova MEC, tempo de cura e processo de regeneração ^[17]. Esta biodegradabilidade

depende da composição química do material (estabilidade química dos grupos hidroliticamente susceptíveis e o carácter hidrofílico/hidrofóbico da cadeia) ^[18]; do peso molecular e da sua distribuição (existência na sua composição de fosfato de tricálcio (TCP - *Tricalcium Phosphate*), ou a presença de matriz parcialmente cristalizada) ^[2]; das dimensões e geometria do dispositivo (forma, tamanho, porosidade, relação superfície/volume) ^[2]; do grau de cristalinidade (cristalino ou amorfo relacionado com a temperatura de transição vítrea T_g); do histórico de processamento (injecção, moldação, extrusão, esterilização); do mecanismo de hidrólise (autocatalítica, não catalítica ou enzimática páginas 53, 64 e 87); de factores físico-químicos (pH, força iónica, temperatura (T)) e aditivos existentes (solvente, monómeros e catalisador); e local de implantação ^[18]. O grau de degradabilidade baseia-se na capacidade de um material polimérico ser degradável num sistema biológico ^[30];

- vi. em alguns casos, possuírem um potencial para libertação de agentes específicos como sinais biológicos;
- vii. serem estéreis antes de qualquer incorporação biológica;
- viii. apresentarem uma integridade estrutural ao nível do suporte, protecção, elasticidade e resistência ^[5], com propriedades mecânicas ^[7] e geometria ^[5] adequadas ao tecido alvo, e com variações destas propriedades mecânicas compatíveis com o processo de cura ou regeneração ^[17];
- ix. possuírem uma porosidade ^[7] e permeabilidade ^[17] adequada à situação específica para permitir o provimento de nutrientes e oxigénio, a colonização celular e uma boa vascularização -macroporos que permitam o crescimento do novo tecido e a sua vascularização e microporos capazes de promover a adesão proteica e consequente adesão celular e proliferação ^[10];
- x. serem de fácil processamento ^[3, 7] e terem o tempo de vida útil necessário para a situação específica para que foram desenvolvidos desde meros dias ou poucos meses após a implantação ^[17].

Cada tecido ou órgão tem as suas próprias características de organização arquitectónica que estão fortemente associadas às suas funções fisiológicas. ^[9] E alguns tecidos específicos, como o osso, os tendões, os ligamentos, a espinal medula, os nervos periféricos, o uréter e o intestino, têm arquitecturas tubulares ou lamelares.

Hoje em dia, a reparação destes tecidos mantém-se uma questão não resolvida devido à fraca capacidade de regeneração natural dos mesmos ^[7] e aos inúmeros factores necessários conjugar para que a regeneração auxiliada tenha êxito.

ET para regeneração óssea

A regeneração óssea guiada é uma subárea especializada da ET em que os principais objectivos são a regeneração do tecido ósseo e crescimento do mesmo ao longo da superfície, e o desenvolvimento da estrutura de suporte para o implante. Este crescimento do osso reforçado pode ser conseguido através da selecção dos materiais, porosidade (serve simultaneamente de guia e previne o crescimento de tecidos não desejados como os fibrosos no local lesado), e aparência física (dependente da aplicação e do local de implantação) do implante. ^[16]

No caso do osso a estrutura de suporte 3D visa imitar a MEC num ambiente de regeneração óssea. Deste modo, esta não pode ser simplesmente um simples apoio mecânico, mas também deve ser “informativa” para as células. O biomaterial apropriado para desempenhar este suporte deverá integrar-se facilmente e ter uma composição similar à do osso adjacente ^[31], ser estável por longos períodos de tempo ^[31], favorecer a adesão, proliferação e diferenciação celular ^[32] para garantir o crescimento do tecido ósseo ^[2, 33], ter uma arquitectura que permita que os vasos sanguíneos irriguem mesmo as estruturas de grandes dimensões ^[2, 33], deve ser compatível e reabsorvível de forma controlada ^[2, 32, 33], e sofrer corrosão mínima limitando as possibilidades de infecções e reacções inflamatórias ^[31].

Pelo seu tamanho (grande quando comparado a outros casos de ET) e lenta ou inexistente degradação, os parafusos, tampões e perfis circulares têm sido mais utilizados como estruturas de suporte em aplicações cirúrgicas uma vez que o osso regenerado não consegue preencher estas estruturas. Já as estruturas de suporte em formato de placas e membranas são adequadas em diversas situações clínicas como as cirurgias crânio-maxilo-faciais ou em aplicações de ortopedia que exijam baixa rotação-carga, respectivamente. As placas são também utilizadas em aplicações mais exigentes em termos de comportamento mecânico, embora possam causar irritações e outros problemas mencionados no ponto 1.3 Aplicações biomédicas dos biomateriais - página 94. As membranas, pelo contrário, são eficientes em locais onde o esforço mecânico não é elevado - algumas áreas do crânio e maxilo-faciais, aplicações dentárias, cobertura de defeitos ósseos preenchidos ou não. As placas podem ser de superfície texturada ou revestidas com esferas de vidro bioactivo (mencionado no ponto 1.2.2 Cerâmicos - página 36), e as membranas flexíveis ou são oclusivas ou totalmente porosas.

Também muito utilizados na ET aplicada à regeneração óssea é ainda um outro tipo de dispositivo (em termos de aparência física): compósitos de polímeros e vidros bioactivos. ^[16]

Alguns requisitos desejáveis numa estrutura de suporte para a regeneração óssea estão resumidos na tabela seguinte.

Tabela 2 - Considerações críticas para uma estrutura de suporte para aplicação e regeneração óssea. ^[34-36]

Qualidades desejáveis numa estrutura de suporte para a ET aplicada à regeneração óssea
Disponível para o cirurgião a curto prazo
Esterilizável sem perda de propriedades
Propriedades mecânicas e físicas apropriadas para a aplicação
Com média de tamanho de poros 200-400 µm
De componentes biocompatíveis
Previsivelmente absorvível e em concordância com o crescimento ósseo
Promove o crescimento ósseo
Crescimento máximo ósseo através de osteoindução ¹⁷ e/ou osteocondução ¹⁸
Boa aposição óssea
Não induz o crescimento de tecidos moles na interface osso/implante
Sem efeitos prejudiciais para os tecidos vizinhos ao implante
Adaptável a lesões irregulares - maleável

ET para reparação de ligamentos

No caso particular da reparação de ligamentos, a ET terá que desenvolver um sistema de substituição funcional do ACL, que permita aos pacientes estarem aptos para a sua actividade imediatamente após a lesão. Deste modo, este sistema deve possuir especificamente ^[3, 37]:

- células reparadoras capazes de promover a proliferação e síntese matricial com uma biodegradabilidade compatível com a velocidade de formação do novo ligamento;
- uma estrutura de suporte com porosidade adequada que facilite a adaptação e proliferação celular sem provocar resposta inflamatória - ou seja, deve ser biocompatível;
- um ambiente capaz de permitir o transporte de nutrientes, factores reguladores e com compatibilidade mecânica funcional.

Estes constituintes podem ser aplicáveis num sistema *in vivo* ou *in vitro*; isto é, a engenharia do ligamento *in vivo* utiliza uma estrutura desenhada especificamente para ser implantada no hospedeiro e que incentiva o crescimento do tecido e a formação de neoligamentos. Esta estrutura de suporte pode ser construída a partir de células de auto ou alo-enxertos, ou modificada no sentido de melhorar a sua biocompatibilidade e a resposta celular por parte do hospedeiro. Inversamente, nos sistemas *in vitro* é utilizado um

¹⁷ Definida como a habilidade de causar células pluripotenciais, partindo de um meio sem osso, dá-se a diferenciação celular que culmina na formação óssea (ver ponto 1.6.1 Constituição óssea- página 112. ^[36]

¹⁸ Suporta o crescimento de capilares e células do hospedeiro na estrutura de suporte 3D para formar osso. ^[36]

biorreactor no interior do qual o ligamento é desenvolvido numa estrutura de suporte, para posterior implantação no hospedeiro.

Até à data, todos os estudos concluem que quer as estruturas naturais, quer as sintéticas conseguem promover adesão celular, crescimento e deposição matricial sob condições apropriadas; e que os factores de crescimento e a estimulação mecânica têm um papel importante na resposta celular. No entanto, ainda não foi conseguido o sistema ideal de substituição do ACL com a arquitectura biológica e resistência mecânica apropriadas para a implantação *in vivo*; muito devido ao facto das condições locais precisas que conduzem ao desenvolvimento e à reparação com sucesso deste ligamento ainda não estarem definidas. ^[4]

1.2 Biomateriais

Dos biomateriais utilizados na ET espera-se que estes consigam funcionar no ambiente interno corporal humano bastante agressivo, de modo contínuo ou intermitente. Uma vez que as propriedades dos materiais da estrutura de suporte determinam em grande parte as propriedades da mesma, a selecção dos materiais para a produção da estrutura é uma das etapas mais importantes na ET.

Os materiais podem dividir-se em diferentes classes: metais e ligas, cerâmicos, polímeros, vidros, compósitos e materiais naturais ^[38]. Para além destas designações, existem ainda os designados materiais: bioinertes e bioactivos ^[9], bioestáveis e biodegradáveis ^[9], nanomateriais e inteligentes ^[18]. E, embora a utilização de biomateriais venha das antigas civilizações - foram encontrados olhos, orelhas, dentes e narizes artificiais nas múmias egípcias ^[9] - a ET, através das novas tecnologias e conhecimento existente, tenta produzir estruturas com benefícios regenerativos para o Homem em áreas tão distintas como o esqueleto, sistemas cardiovascular, gastrointestinal, epidérmico e urinário ^[30]; e desenvolver os chamados implantes de 3ª geração - para além de temporários, têm parte activa nos processos de regeneração de tecidos. ^[8]

1.2.1 Metais

Adicionando ao facto de os metais serem resistentes à fractura, dúcteis, bons condutores de electricidade e de calor, de aparência lustrosa e de serem susceptíveis à corrosão, apresentam ainda propriedades mecânicas únicas, uma resistência à degradação, desempenho, estabilidade e biocompatibilidade compatíveis com as características específicas de ortopedia. ^[9] Conseguem ser biotoleráveis¹⁹ e podem ou não ser texturados, ou seja, serem possuidores de uma superfície modificada importante para se conseguir uma osteointegração satisfatória entre a interface do osso e do implante. Dos metais mais

¹⁹ Não são capazes de se ligar ao tecido vivo, induzem resposta mínima do sistema imunitário, mas são aceites pelo receptor. ^[36]

utilizados em biomateriais podem distinguir-se o ouro (Au) ^[9], o tântalo (Ta) ^[9], o ferro (Fe), o crómio (Cr), o cobalto (Co), o níquel (Ni), o titânio (Ti), o molibdénio (Mo) e o tungsténio (W) ^[30] - também utilizados como componentes de ligas que possuem propriedades favoráveis para a produção e desempenho de biomateriais (ex.: ligas de Co-Cr, NiTi - liga com memória de forma e Ti ^[9]), e os aços inoxidáveis ^[9].

Com as ligas Co-Cr, compostas principalmente por Co e Cr com diferentes quantidades de outros elementos metálicos referidos anteriormente, conseguem-se benefícios ao nível da tensão de cedência (~450MPa para a liga CoCrMo e 240-655MPa para a liga CoNiCrMo) e resistência à corrosão; o que traz benefícios na sua utilização em ossos e articulações artificiais.

O Ti, caracterizado pela sua alta resistência à tracção, resistência à corrosão e baixa densidade (Ti - 4,5g/cm³ vs. Fe - 7,9g/cm³), é frequentemente utilizado em ligas em que o alumínio (Al) e o vanádio (V) são adicionados para conferir à liga uma superior tensão de cedência e resistência à corrosão (o Ti puro tem tensão de cedência na gama de 170 a 485MPa enquanto que a liga Ti-6Al-4V apresenta uma tensão de cedência de ~795MPa).

Os aços, formas artificialmente modificadas do Fe com vários teores de carbono (C), conhecidos pelas suas propriedades mecânicas dependentes dos teores de C e da temperatura, são candidatos a materiais de reparação do sistema esquelético. No entanto, o lado negativo da sua utilização como biomaterial é a corrosão a que ele é sujeito aquando em meio biológico. Questão que normalmente encontra resolução pela adição de crómio ao aço, tornando-o inoxidável. No que diz respeito aos biomateriais, são adicionados ao aço o crómio com uma concentração de 17-20%, e o níquel com uma concentração de 12-14% - estabiliza a estrutura de Fe, previne a formação de carbonetos e melhora a resistência à corrosão.

Os dois potenciais problemas da utilização de materiais metálicos como biomateriais são a corrosão e a incompatibilidade biológica dos mesmos. Estes acarretam potenciais influências na desempenho e resistência dos biomateriais metálicos, especialmente quando utilizados em áreas como a substituição óssea e articulações. ^[30]

1.2.2 Cerâmicos

Os materiais cerâmicos, compostos por elementos metálicos e não metálicos, geralmente duros e frágeis ^[9], opticamente opacos, semitransparentes ou transparentes, apresentam fraca condutibilidade eléctrica e térmica (geralmente até são isolantes), boa resistência química²⁰, resistência à corrosão ^[9], são inertes aos fluidos iónicos fisiológicos ^[30], e apresentam uma resistência à compressão tipicamente 10 vezes superior à resistência à tracção. ^[39] Relativamente à sua interacção com os tecidos biológicos, podem ser biotoleráveis/bioinertes - utilizados em aplicações com transferência de carga uma vez que

²⁰ Capacidade de resistir a danos causados pelas reactividades químicas ou acção solvente.

tem elevada resistência ao desgaste e corrosão ^[30]; ou podem ser bioactivos²¹ - utilizados muito frequentemente para fixações ao osso conduzindo por vezes, a longo termo, a alguns problemas de rejeição pela sua baixa resistência à tracção e fadiga.

No primeiro caso, cerâmicos biotoleráveis/bioinertes, temos como exemplo alguns óxidos metálicos duros - alumina e zircónia ^[9]; cerâmicos técnicos - TiC/TiN e Si₃N₄; e carbono DLC (*diamond like carbon*) ^[38]. Estes não causam reacções tóxicas, inflamatórias e alérgicas significativas, e são relativamente biocompatíveis. A alumina ou óxido de alumínio (Al₂O₃) é o típico cerâmico bioinerte, existe na natureza como *corundum* cristalino e é caracterizado pela elevada resistência ao desgaste e corrosão, comportamento inerte em meio fisiológico, baixa toxicidade e imunogenicidade. Deste modo, torna-se adequado como biomaterial ortopédico. ^[30]

Relativamente aos cerâmicos bioactivos temos os fosfatos de cálcio com composição semelhante à componente mineral dos tecidos duros (hidroxiapatite -HA ^[9], TCP, OCP - *octacalcium phosphate*, entre outros), os vidros cerâmicos ^[30] e os biovidros ou vidros bioactivos ^[9]. ^[18, 38] Os vidros cerâmicos e biovidros são conhecidos pelas suas propriedades osteocondutivas (apropriados para a regeneração guiada do tecido ósseo) e podem ser produzidos em formas porosas (melhora o crescimento ósseo e as ligações). ^[16]

Os cerâmicos biodegradáveis, são cerâmicos que conseguem ser degradados e absorvidos em sistemas biológicos, tornando-os desejáveis na ET. Neste grupo estão incluídos o fosfato de cálcio, fosfato de cálcio e alumínio, a coralina ^[40], o óxido fosforoso-cálcio-zinco e o sulfato de zinco-fosfato de cálcio. Na sua maioria, os cerâmicos biodegradáveis, contém cálcio e são materiais indicados para a medicina regenerativa na área da ortopedia; o fosfato de cálcio, por exemplo, tem sido utilizado em ossos artificiais, é não-tóxico e biocompatível. Este pode ser cristalizado como HA, que apresenta uma estrutura semelhante à estrutura dos ossos mais duros do corpo humano que compõe os ossos compactos e o esmalte dentário. ^[30]

1.2.2.1 PBG

1.2.2.1.1 Propriedades

Os vidros com base fosfato (PBG - *Phosphate-based glasses*), introduzidos nos anos 60 ^[41], mostram-se um recurso promissor em aplicações para reparação óssea devido ao seu elevado módulo de elasticidade ^[42]; à sua rápida absorção *in vivo* ^[43] (ponto 1.2.2.1.3 Degradação hidrolítica - página 53); e à possibilidade de controlo das propriedades e razões de degradação destes compósitos através da manipulação das propriedades do vidro, variação do tipo de fibra, fracções volúmicas e pela alteração da sua matriz polimérica ^[44].

²¹ Permitem uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo (interagem ^[30]), possibilitando assim a criação de ligações químicas fortes aos tecidos vizinhos e deste modo resistem a solicitações mecânicas consideráveis. ^[18, 36]

Já no início dos anos 70, definido o conceito de bioactividade²², os vidros bioactivos (BG - *bioactive glasses*) são propostos e estudados para aplicações em implantes ósseos. Inicialmente a sua rede matricial era composta por óxidos de elementos que formam vidros por si só, maioritariamente dos grupos IV e V da tabela periódica (dióxido de silício -SiO₂, trióxido de diboro -B₂O₃, óxido fosforoso -P₂O₅), e óxidos intermediários (de Al, gálio -Ga, Ti, C, V, bismuto -Bi, Mo, W, S, selénio -Se, telúrio -Te).

Os BG apresentam, na sua maioria, propriedades físicas pobres que afectam a sua habilidade de suportar cargas em estruturas móveis como a interface de tecidos duro/mole^[21], e os vidros de fosfato simples não apresentam durabilidade química suficiente para as aplicações biomédicas^[45].

Os PBG, tendo uma composição química próxima da fase mineral do osso, permitem interacções favoráveis material-células e proliferação celular^[8]; e muitos deles têm a capacidade de formar, *in vitro* e *in vivo*, nas suas superfícies, camadas de HA compatíveis com a fase mineral óssea^[26, 32]; e são biocompatíveis^[8]. Embora sejam raramente absorvidos, os que têm na sua composição SiO₂, chamados vidros de sílica^[46], ainda mantém a incerteza do efeito a longo termo *in vivo*, muito por responsabilidade do silício (Si)^[26, 32]; no entanto, na sua maioria não têm revelado citotoxicidade quando utilizados em culturas *in vitro*.^[10]

É a assimetria da unidade tetraédrica (PO₄³⁻) (Figura 2), que representa a unidade estrutural dos PBG^[47], que se acredita estar na origem da sua baixa durabilidade, alta reactividade, e facilidade de hidratação das ligações P-O-P. Os vidros puros de fosfato apresentam uma higroscopia natural e o P₂O₅ cristalino apresenta 3 formas polimórficas possíveis: hexagonal, ortorrômbica e tetragonal. Consoante a forma cristalina em questão, o P₂O₅ puro forma anéis com diferentes números de unidades tetraédricas. No entanto, estas estruturas conseguem ser retidas quando utilizados tempos curtos de fusão. Mas, uma vez que as suas propriedades (P₂O₅) só convergem quando utilizados elevados tempos de fusão, é necessário um balanceamento desta propriedade.^[8]

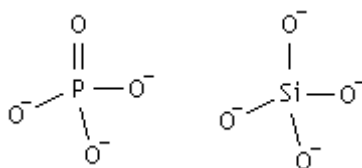


Figura 2 - Estrutura tetraédrica básica do óxido fosfato comparativamente à do óxido silicato.

Não só para aumentar a sua durabilidade mas também para aumentar a percentagem de *cross linking*, o que torna a estrutura do vidro menos susceptível de ser atacada pela água, são adicionados dopantes aos PBG.^[48] Os mais comumente introduzidos são o óxido de sódio e óxido de cálcio (Na₂O e CaO, respectivamente)^[8], porém o Al₂O₃^[32], GeO, B₂O₃, SrO, BaO^[8], SnF₂, SnO, PbO, ou o B₂O₅^[48] também podem agir como modificadores. O metal (M)

²² Bioactividade - capacidade de certos materiais se ligarem ao osso e estimular a osteogénese (ou ossificação é a formação do osso pelos osteoblastos^[15] - ver ponto 1.6.1 Constituição óssea - página 112).

adicionado forma inicialmente ligações com as terminações de átomos de oxigénio existentes em excesso, P-O-M (Figura 3); e uma vez ocupados todos os átomos de O, pelo contínuo aumento de M, desenvolve-se uma rede aleatória. Habitualmente, os vidros do sistema P_2O_5 - M_2O contêm quantidades de M_2O entre 30 - 50 %mol. Estas adições de M são também utilizadas para diminuir a volatilidade do componente base do vidro. ^[8]

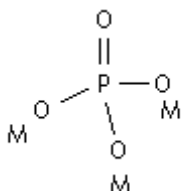


Figura 3 - Efeito da adição de um ião metálico monovalente (M^+) na rede de P_2O_5 .

Há uma diversidade considerável nas possíveis formulações dos PBG: binários, ternários e quaternários. Adicionalmente, o tamanho ^[49] e a valência ^[46] dos iões adicionados têm um papel dominante na estabilidade química ^[49] e propriedades ^[46] dos vidros. Deste modo, os iões metálicos com raios iónicos pequenos e elevadas cargas eléctricas contribuem para a formação de ligações P-O-M fortes ^[49], e a substituição de um óxido monovalente por um alternativo divalente melhora as propriedades mecânicas e diminui a velocidade de dissolução do vidro ^[46].

Através da terminologia Q^n , em que n representa o número de pontes de oxigénio do fosfato tetraédrico (PO_4^{3-}) - Q, consegue-se descrever o que acontece quando se dopa um PBG. Quando não há pontes de hidrogénio estabelecidas, Q^0 corresponde ao PO_4 simples. E normalmente, quando é adicionado um óxido alcalino aos vidros com base fosfato, o grupo estrutural altera-se de Q^3 para Q^2 , Q^1 ou Q^0 dependendo da razão de M_2O (ou MO) / P_2O_5 que passa de 0 para 1, 2, ou 3. ^[49]

Os vidros binários com base fosfato, produzidos na sua maioria por condensação, não respondem, para além de outras questões, em termos de velocidade de degradação do vidro. Desta feita, são os vidros ternários com base fosfato que têm sido alvo de estudos permanentes. Grande parte dos mesmos junta dois óxidos anteriormente referidos em sistemas $(P_2O_5)_x$ - $(CaO)_y$ - $(Na_2O)_{1-x-y}$, para valores de $0,45 < x < 0,60$ e $0,30 < y < 0,40$. ^[8]

Os vidros oxi-nitreto, essencialmente vidros onde há a substituição de átomos de O por azoto (N), conduzem no caso dos PBG a unidades estruturais PO_3N e PO_2N_2 dependendo da razão N/P existente. A introdução de azoto nos vidros com base fosfato proporciona uma melhoria nas propriedades ópticas²³ e de resistência química através de um processo *cross-linking*. Tal como a substituição de O por N nos vidros com base silício, também neste caso, há aumento da η (viscosidade), T_g , ponto de amolecimento dilatométrico, índice de refração, módulo de *Young* (E), e micro-dureza, com o aumento de N. No entanto, o

²³ Índice de refração, brilho, transparência, cor, anisotropia óptica.

coeficiente de expansão térmica diminui embora haja uma melhoria da durabilidade química dos PBG. ^[50]

Os testes de biocompatibilidade e proliferação celular, necessários para a aprovação da utilização dos PBG na ET, têm-se mostrado dependentes da composição do vidro. Através destes é possível mensurar a influência de extractos de vidro no crescimento celular e nos antígenos (sialoproteína óssea, osteonectina e fibronectina) que desempenham um papel fulcral na integridade dos tecidos conectivos duros. ^[47] Os resultados obtidos demonstram que a proliferação das células é influenciada pela solubilidade dos vidros (ponto 1.2.2.1.3 Degradação hidrolítica - página 53). Para vidros ternários com quantidades elevadas de CaO, ou seja, vidros com baixa taxa de dissolução, há um aumento da adesão, crescimento, diferenciação ^[21] e proliferação celular ^[8] (Figura 4) com aparente não influência na morfologia das mesmas ^[26], seja ela qual for, constante em toda a superfície do vidro ^[21], e na informação genética ^[47]. Em contraste, os resultados mostram que a proliferação celular foi adversamente afectada pelos vidros com solubilidade elevada, o que também conduz a uma baixa expressão de proteínas ósseas. ^[47] Testes adicionais revelam ainda que à medida que a quantidade de CaO diminui e a de Na₂O aumenta, as células que se desenvolvem tornam-se mais redondas. ^[51] As razões destes efeitos na proliferação celular e expressão proteica não são claros, mas estão indubitavelmente relacionados com as diferentes influências das diferentes espécies de iões libertadas dos vidros no meio onde se encontram, e talvez também pelas diferenças evidentes no pH da solução que os extractos de vidro induzem. ^[52] Estes factores, induzidos pelas diferentes composições químicas e diferentes razões de dissolução dos vidros, têm grande impacto no crescimento e funções celulares. ^[51] O que significa que com a modificação dos vidros podem-se obter uma resposta biológica e eficácia clínica excelentes. Por exemplo, os iões divalentes, em particular os Ca²⁺, tem um papel chave nos mecanismos de activação celular, controlando assim muitos processos associados ao crescimento e actividades funcionais das células. ^[51]

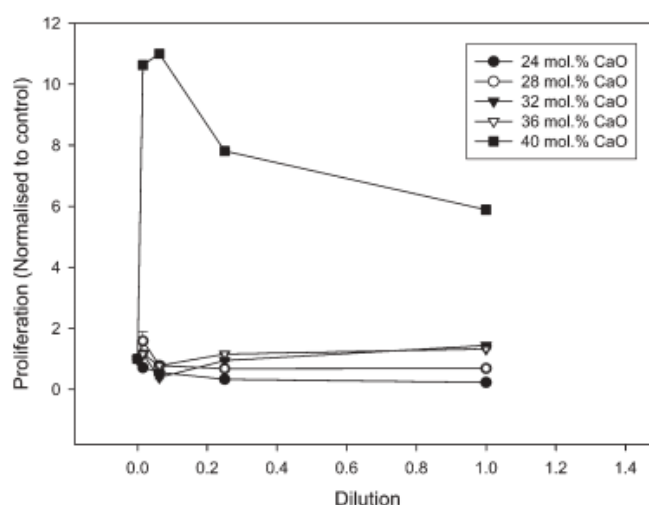


Figura 4 - Efeito da composição e diluição do PBG na proliferação celular. O PBG tem a composição $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_y - (Na_2O)_{55-y}$ com valores de $y = 24, 28, 32$ e 40% mol. ^[8]

Estudos análogos foram feitos para diversos sistemas ternários de PBG. E, embora o sistema P_2O_5 -CaO- K_2O tenha revelado proliferação celular e expressão proteica semelhante ao sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O , a sua solubilidade é considerada elevada para o uso biomédico. [8]

Os PBG, compostos por iões que quando libertados não são tóxicos e com perfis controláveis de degradação [32], quando utilizados como fibras, possuem excelentes propriedades químicas e físicas [21] - elevada superfície de área por volume [32], permitindo uma excelente área de adesão celular [32] e a possibilidade de serem moldados mais facilmente ao local lesado [21]. Adicionalmente, as fibras curtas não têm a propriedade de reforço efectivo como as fibras contínuas devido à dificuldade de controlo da sua direcção e ao rácio desfavorável de anisotropia de esforços. [53]

Os vidros maciços são geralmente fundidos em moldes a temperaturas pré-determinadas e imediatamente após a sua solidificação faz-se um recozimento (ainda a alta temperatura) para controlar a sua taxa de arrefecimento. [46] As fibras são submetidas a um arrefecimento rápido [46] e podem ter arranjos diferentes no sentido de se conseguir uma estrutura tridimensional [32]. Pode-se provocar a separação das fibras para lhes conferir um arranjo unidireccionalmente orientado, em malha, ou um arranjo aleatório [32] (Figura 5).

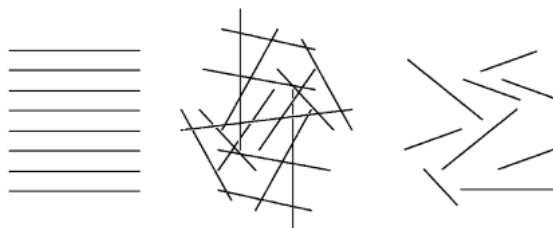


Figura 5 - Diferentes configurações das fibras de vidro: orientadas, em malha e aleatórias.

Como não é possível a produção de fibras a partir de vidros com a composição $(P_2O_5)_{0,45} - (CaO)_y - (Na_2O)_{0,55-y}$ [26], facto este atribuído à conectividade da rede ou grau de polimerização da mesma, possibilidade de *cross linking* abaixo de 0 (corresponde a uma elevada fluidez e baixa viscosidade) e comprimento médio da cadeia do vidro muito baixo [47]; são os restantes sistemas $(P_2O_5)_x - (CaO)_y - (Na_2O)_{1-x-y}$ com $x=0,5$; $0,55$ e $0,6$ e $y=0,3$; $0,35$ e $0,4$ os mais apetecíveis para aplicações onde estas exigências são fulcrais [26].

A resistência mecânica, as propriedades elásticas, a estrutura [47], e a proliferação celular [26] conseguida nas fibras com a mesma composição dos vidros a granel, são diferentes; e, nomeadamente a proliferação celular é menor. Isto acontece porque o vidro e as suas fibras são produzidos sob diferentes parâmetros o que induz diferentes histórias térmicas e mecânicas [47], e em termos de proliferação, as células ficam mais fracamente aderidas visto a taxa de dissolução ser função da área superficial [26]. Como método alternativo de redução da taxa de dissolução das fibras de vidro e para um aumento da adesão celular, tem-se

utilizado o óxido de ferro III - hematite (Fe_2O_3) como dopante das mesmas. Uma adição de apenas 1-5 %mol consegue reduzir drasticamente a taxa dissolução das fibras, e uma adição de 4-5 %mol foi já considerada a quantidade adequada para se conseguir a adesão e proliferação celular. [8] Testes de biocompatibilidade celular feitos ao sistema particular $(\text{P}_2\text{O}_5)_{50}-(\text{CaO})_y-(\text{Na}_2\text{O})_{50-y-z}-(\text{Fe}_2\text{O}_3)_z$ com $y=0,46$ e $0,48\%$ mol e $z=1; 2$ e 3% mol mostram que, quando comparado com o seu composto ternário base sem a inclusão do ferro, este é biocompatível até 14 dias em cultura para as composições molares de 2 e 3% de Fe (Figura 6). Neste teste feito por *M Bitar et al.* [26] foi verificado não só um padrão de proliferação celular ao longo do tempo, como também as células aderentes ao PBG mostraram encontrar-se bem espalhadas e morfologicamente alinhadas com a orientação das fibras de vidro. [26]

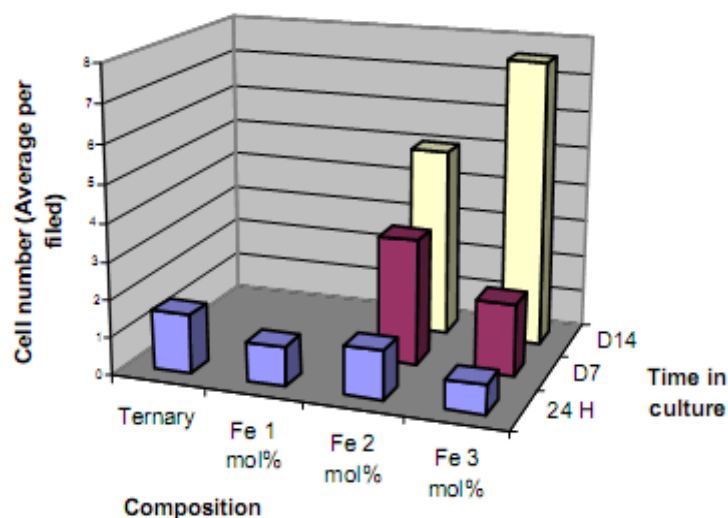


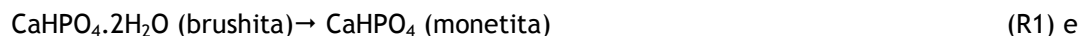
Figura 6 - Padrão de proliferação celular para os diferentes tempos de cultura do PBG. [26]

Actualmente, os sistemas ternários apresentam algumas limitações e uma adicional flexibilidade em termos de solubilidade que pode ser alcançada pelo uso de sistemas de vidro quaternários mais complexos. [31] Adicionalmente pode ser possível, pela cuidada escolha dos iões componentes do vidro, melhorar a adesão, proliferação e manutenção das propriedades fenotípicas²⁴ das células *in vitro* [21], com o objectivo de aumentar a velocidade de regeneração do tecido *in vivo* [31].

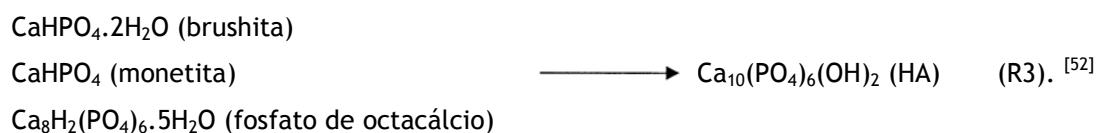
Partindo da base P_2O_5 - CaO - Na_2O , para além dos modificadores já referidos, adicionam-se componentes como K_2O para investigar a presença de efeitos alcalinos (observados no decréscimo e posterior aumento de T_g com o aumento de K_2O em detrimento de Na_2O), com particular interesse na alteração das propriedades dinâmicas (a solubilidade do vidro é mais linear com o tempo de acordo com a regeneração dos tecidos) e derivações significativas da linearidade do vidro. Também como modificadores são utilizados o MgO e CaF_2 - que pela sua componente de fluoreto pode ter uma acção biológica activa. [50] O ião titânio (Ti^{4+}), quando adicionado, melhora a estabilidade e propriedades mecânicas dos vidros. [49]

²⁴ Morfologia, desenvolvimento, propriedades bioquímicas e fisiológicas, e comportamento.

Outra grande vantagem dos PBG é a possibilidade de ao precipitarem formarem HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), benéfico para a regeneração óssea - - ponto 1.6.1 Constituição óssea - página 114. Tomando como base os sistemas $(\text{P}_2\text{O}_5)_x - (\text{CaO})_y - (\text{Na}_2\text{O})_{1-x-y}$, normalmente o precipitado formado é altamente amorfo, e só através do recozimento deste a 400°C é possível ser inequivocamente identificada a existência do pirofosfato de cálcio ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$). Isto pode indicar a formação de fosfato de dicálcio dihidratado (brushita, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) que por aquecimento reage do seguinte modo:



De acordo com *Videau et al.* ^[52], existem vários caminhos de precipitação do fosfato de cálcio em que a HA é um dos produtos finais.



Propriedades termofísicas

De um modo geral as propriedades termofísicas podem ser determinadas segundo as técnicas de análise térmica resumidas na tabela seguinte.

Tabela 3 - Técnicas de análise térmica. ^[54]

TÉCNICA	ABREVIATURA	PROPRIEDADE DETERMINADA	UTILIZAÇÃO
Termogravimetria	TG	massa	decomposições oxidações
Análise térmica diferencial	DTA	diferença de temperatura	alterações de fase reações
Análise calorimétrica diferencial de varrimento	DSC	diferença de potência aplicada ou fluxo de calor	capacidade calorífica alterações de fase reações
Análise termomecânica	TMA	deformações	alterações mecânicas
Análise mecânica dinâmica	DMA	modificações dimensionais	expansões
		módulos	alterações de fase
			transições vítreas
			cura polimérica
Análise térmica dielétrica	DETA	elétricas	expansões
			alterações de fase
			transições vítreas
			cura polimérica
Análise de evolução gasosa	EGA	evolução ou reação de gases	decomposições
Termoptometria		ópticas	alterações de fase
			reações de superfície
			alterações de cor
Termosonimetria	TS	som	alterações mecânicas e químicas
Termoluminescência	TL	luz emitida	oxidação
Termomagnetometria	TM	magnéticas	alterações magnéticas pontos Curie

Os PBG em geral apresentam ponto de ebulição baixo, baixas T_g e baixas temperaturas de amolecimento ^[48], dependendo no entanto das suas composições. *Uo et al.* ^[48] encontrou uma correlação entre T_g e temperatura de cristalização (T_c) e a composição dos PBG, particularmente com a composição de P_2O_5 presente. Através da síntese de um sistema ternário conseguiu estabelecer que o aumento de P_2O_5 traduz-se numa diminuição de T_g e T_c . ^[48]

Relativamente à adição de CaO na rede de um PBG, este aumenta a T_c e temperatura de fusão (T_f), para composições fixas de 50%mol de P_2O_5 ; no entanto, o mesmo aumento de CaO diminui T_c , quando a composição de P_2O_5 é fixa em 55%mol. ^[47] Para composições fixas de P_2O_5 45% mol, a figura seguinte mostra os efeitos da adição de CaO em T_g , T_c e T_f .

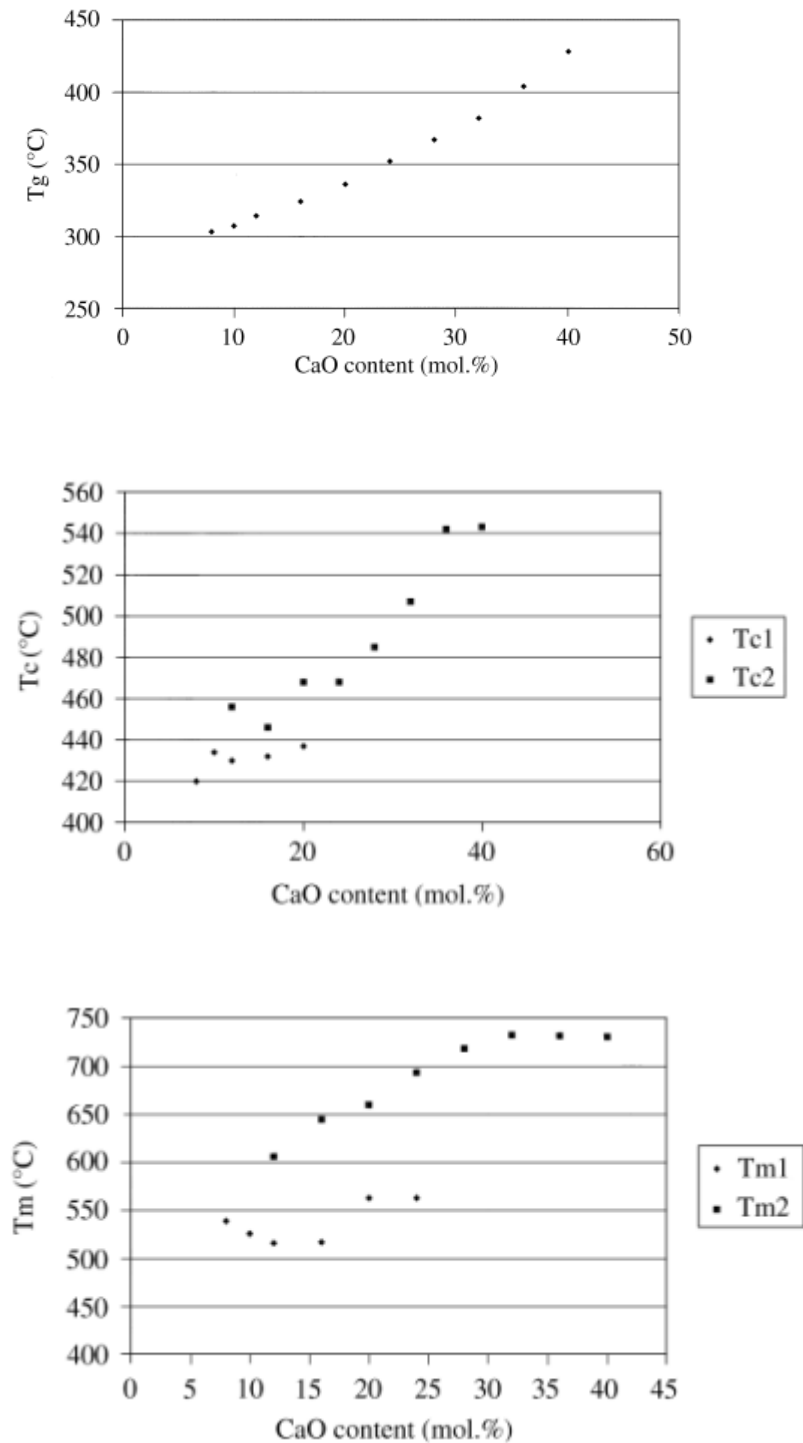


Figura 7 - Efeito da variação da %molar de CaO do PBG ternário com P₂O₅ fixo em 45%mol nos parâmetros T_g, T_c e T_f (referenciada como T_m na figura). ^[48]

Como é visível na Figura 7, T_g aumenta de forma praticamente linear com o aumento do conteúdo de CaO na composição de PBG. Isto é expectável uma vez que o CaO é um material refractário, e por isso aumenta T_g quanto mais incorporado está no vidro.

T_c também aumenta com o aumento de CaO. No entanto, a certa altura podemos ver duas T_c (T_{c1} e T_{c2}) definidas para composições médias de CaO; isto dá-se pois nessa gama de CaO

verificam-se duas fases cristalinas do vidro na solução ($\text{Ca}_{12}\text{Na}_{43}\text{P}_{45}$ e $\text{Ca}_8\text{Na}_{47}\text{P}_{45}$ [48]). Para as altas temperaturas, há novamente uma única T_c , e as transições de uma para duas fases podem ser claramente distinguidas. Finalmente é também evidente a variação de T_g com %mol CaO. Esta pode ser relatada como um espelho do comportamento de T_c ; ou seja, baixas percentagens de CaO correspondem à T_f de uma única fase cristalizada, seguido de uma região com duas T_f (T_{m1} e T_{m2}) e finalmente outra região com uma única T_f . A variação de T_f com a composição não é linear o que pode indiciar alguma ligeira variação na composição individual das fases.

De estudos sobre o tamanho das partículas de vidro, procurou-se verificar se T_c era dependente do tamanho das partículas, para se concluir se a nucleação ocorreria ou não na superfície ou corpo do vidro. Se esta dependência não fosse verificada, era um indicativo que a nucleação ocorreria no corpo do vidro. O estudo feito por *K. Franks et al.* [48] comparou as T_c para PBG do sistema $(\text{P}_2\text{O}_5)_{45} - (\text{CaO})_y - (\text{Na}_2\text{O})_{55-y}$ com $y=8$ e 32%mol para tamanhos de partículas de vidro na gama de <75 a 200 μm . Os resultados estão explícitos na Figura 8.

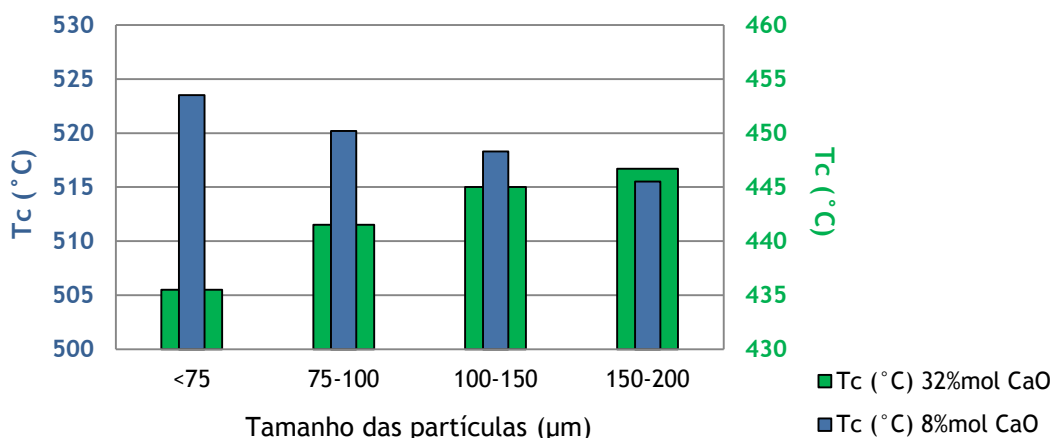


Figura 8 - Efeito do tamanho das partículas de vidro (μm) em T_c (°C) para as composições $(\text{P}_2\text{O}_5)_{45} - (\text{CaO})_y - (\text{Na}_2\text{O})_{55-y}$, $y=8$ e 32 %mol. Adaptado de [48]

Para a composição com 8%mol CaO, T_c diminui poucos graus com o aumento do tamanho das partículas de vidro. No entanto, para a composição de PBG com 32 %mol CaO, o mesmo já não acontece. Aqui há um decréscimo marcado de T_c com a diminuição do tamanho das partículas do vidro. Esta contrariedade pode ser explicada pelo fenómeno de separação de fases.

Comparando com os pressupostos de *A. Dietzel et al.* [48] para um sistema binário de vidro com base silicato; este postula que quando o vidro arrefece há três acontecimentos possíveis: se a diferença entre a intensidade de campo de dois catiões ΔF é superior a $0,3*Z/r^2$, onde Z é a valência e r o raio do ião, há cristalização e ocorre a formação de composto; se $\Delta F=0Z/r^2$,

ocorre uma separação de fase; e para $\Delta F > 1,33Z/r^2$, há formação de vidro. Sendo $\Delta F(P)=2,1$; $\Delta F(Na)=0,19$ e $\Delta F(Ca)=0,33$ e como neste caso a gama de vidros varia a sua composição em termos de razão CaO/Na_2O , ocorre um fenómeno diferente. Por um lado, baixas percentagens molares de CaO e altas de Na_2O não provocam nenhuma separação de fase; quando a relação CaO/Na_2O está balanceada, ocorre separação de fase; no outro extremo, com percentagens elevadas de CaO e baixas de Na_2O , só é formada uma fase. Para explicar este fenómeno de separação de fases na gama intermédia de percentagens molares, foi acompanhado o efeito do aumento de CaO ao sistema binário $P_2O_5-Na_2O$. No caso do sistema binário, forma-se somente uma fase, o que significa que a diferença entre a intensidade de campo não é 0 (o que levaria a separação de fase). Como adicionalmente só foi introduzido CaO e há uma separação de fase, tudo leva a crer que o aumento de CaO conduz a um $\Delta F=0$; e se essa quantidade adicionada de CaO levar a um conteúdo de Na extremamente baixo, deixa de haver formação de fase outra vez. [48]

Destes resultados torna-se claro que no primeiro caso a nucleação de $NaPO_3$ é feita no corpo do vidro, e no segundo caso, para 32 %mol CaO , a nucleação de $Na_4Ca(PO_3)_6$ é na superfície.

Em termos de densidade (ρ), medida pelo princípio de Arquimedes e utilizando a água destilada como fluido, temos para o sistema quaternário $(P_2O_5)_{45}-(CaO)_{25}-(Na_2O)_{70-z}-(TiO_2)_z$ com variações de $0 < z < 2,5$ %mol, os valores em kg/m^3 representados com uma linha de tendência na figura seguinte.

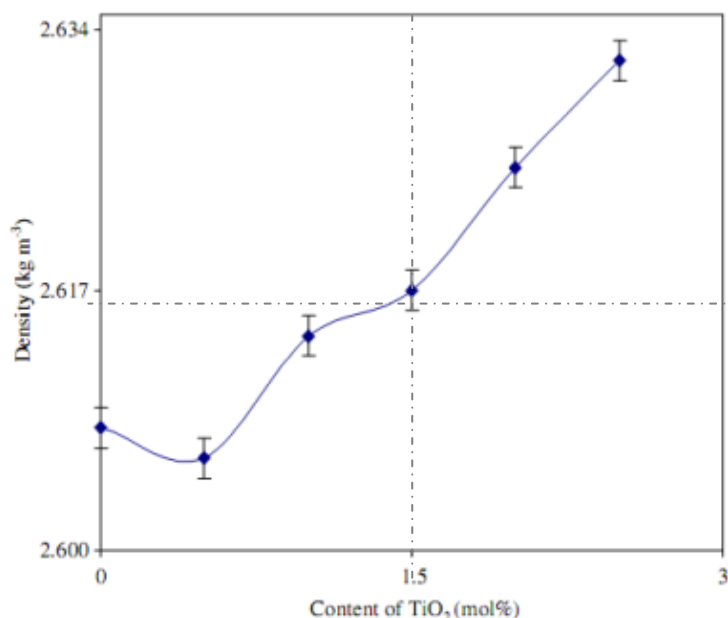


Figura 9 - Variação da densidade (kg/m^3) do sistema quaternário $(P_2O_5)_{45}-(CaO)_{25}-(Na_2O)_{70-z}-(TiO_2)_z$ para z entre 0 e 2,5 %mol. [49]

A densidade, importante ferramenta na exploração da compacidade estrutural, alterações de configurações geométricas, números de coordenação e densidade de *cross linking*, auxilia a percepção do grau de modificação da estrutura do PBG com a variação da sua composição. Na generalidade, quando há adição de óxidos metálicos na rede de vidro ou há um decréscimo ou aumento proporcional da densidade; no entanto, a Figura 9, mostra um comportamento anormal para TiO_2 0,5 %mol. Para este valor de dióxido de titânio há um mínimo na densidade. Este facto pode ser explicado pela perturbação que o aumento inicial de TiO_2 provoca na estrutura atômica do PBG. Há uma quebra das ligações fosfato P-O-P e formação de oxigénios terminais. Posteriormente, os aumentos de TiO_2 , até 2,5 %mol, engrandecem a densidade do sistema quaternário pela diminuição do volume da rede do PBG devido à polaridade de carga dos átomos que provoca uma compactação da rede pela criação de ligações iónicas entre os oxigénios terminais das duas cadeias, reforçando deste modo a estrutura do PBG. ^[55-57]

Conclui-se por isso, que a dopagem dos PBG com iões acarreta implicações na estabilidade química dos mesmos, e que iões metálicos (M) com baixo raio iónico e elevada carga eléctrica contribuem para a formação de ligações P-O-M fortes no sistema $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-MO}$. ^[49]

Solubilidade e miscibilidade

Os PBG dissolvem-se tanto em água, água destilada ou em PBS. No entanto, os seus iões constituintes dissolvem-se mais facilmente nas duas primeiras do que em PBS. Isto porque que a velocidade de dissolução dos PBG depende do pH, da temperatura e da concentração da solução, e estamos perante uma solução, PBS, que já possui alguns iões.

O pH básico assim como o aumento da temperatura conduz a uma aceleração da mesma e a concentração da solução é dependente da solubilidade dos constituintes dos vidros. Quando a solução fica saturada com a espécie menos solúvel das lixiviadas, a dissolução do vidro é provavelmente inibida. ^[46] E para que o único parâmetro intrínseco ao PBG que afecta a sua solubilidade seja a sua composição, é necessário que na sua síntese sejam recozidos abaixo do seu ponto de cristalização para obtermos vidros sem tensões. ^[48]

A tabela seguinte reúne alguns estudos feitos sobre as variações da velocidade de dissolução de diferentes sistemas de PBG, em diferentes meios e gamas de temperaturas também diferentes. Estes efeitos estão mais detalhadamente explicados no ponto 1.2.2.1.3 Degradação hidrolítica - página 53 desta dissertação.

Tabela 4 - Velocidade de degradação dos PBG ($\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$) em função da composição dos PBG (%mol), e da solução e temperatura ($^{\circ}\text{C}$) em que se dá a dissolução dos mesmos.

Composição do PBG	Solução	T ($^{\circ}\text{C}$)	Velocidade ($\text{gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$)	Autor
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{40}\text{CaO}_{16}\text{NaO}_{20}\text{MgO}_{24}$	água desionizada	37	$1,00 \times 10^{-5}$	L. K. Burling [58]
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{45}\text{CaO}_{10}\text{NaO}_{23}\text{MgO}_{22}$	água destilada	37	$8,0 \times 10^{-3}$	Franks et al. [46]
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{44,5}\text{CaO}_{44,5}\text{NaO}_6(\text{TiO}_2)_5$	água destilada	37	$3,3 \times 10^{-6} \pm 1,38 \times 10^{-7}$	M. Navarro et al. [59]
	PBS	37	$3,2 \times 10^{-7} \pm 1,03 \times 10^{-7}$	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{54}\text{CaO}_{27}\text{NaO}_{2,5}\text{ZnO}_{12}(\text{Fe}_2\text{O}_3)_{4,5}$	PBS	37	$6,5 \times 10^{-7} \pm 1,7 \times 10^{-7}$	Rinehart et al. [60]
		60	$2,5 \times 10^{-6} \pm 1,3 \times 10^{-6}$	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{55}\text{CaO}_{30}\text{NaO}_{15}$	água destilada	37	$3,455 \times 10^{-4}$	I. Ahmed et al. [45]
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{55}\text{CaO}_{35}\text{NaO}_{10}$	água destilada	37	$2,940 \times 10^{-4}$	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{55}\text{CaO}_{40}\text{NaO}_5$	água destilada	37	$3,125 \times 10^{-4}$	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{50}\text{CaO}_{10}\text{NaO}_{40}$	água desionizada	20	3×10^{-3}	Bunker et al. [61]
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{50}\text{CaO}_{20}\text{NaO}_{30}$	água desionizada	20	$1,8 \times 10^{-4}$	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{50}\text{CaO}_{30}\text{NaO}_{20}$	água destilada	37	$2,833 \times 10^{-3}$	I. Ahmed et al. [45]
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{50}\text{CaO}_{35}\text{NaO}_{15}$	água destilada	37	$1,260 \times 10^{-3}$	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{50}\text{CaO}_{40}\text{NaO}_{10}$	água destilada	36	$0,5883 \times 10^{-3}$	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{49,7}\text{CaO}_{30,3}\text{NaO}_{20,0}$	água	40	$1,4 \times 10^{-3}$	Delahaye et al. [62]
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{49,6}\text{CaO}_{50,4}$	água	40	3×10^{-4}	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{49,5}\text{CaO}_{40,2}\text{NaO}_{10,3}$	água	40	6×10^{-4}	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{49,4}\text{CaO}_{16,4}\text{NaO}_{34,2}$	água	40	11×10^{-2}	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{49,1}\text{CaO}_{11,8}\text{NaO}_{39,1}$	água	40	69×10^{-2}	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{49,0}\text{CaO}_{19,9}\text{NaO}_{31,1}$	água	40	$4,5 \times 10^{-2}$	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{45}(\text{CaO})_{30}(\text{Na}_2\text{O})_{25}$	água destilada	37	$12,68 \times 10^{-4}$	I. Ahmed et al. [45]
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{45}(\text{CaO})_{35}(\text{Na}_2\text{O})_{20}$	água destilada	37	$2,038 \times 10^{-4}$	
$(\text{P}_2\text{O}_5)_{45}(\text{CaO})_{40}(\text{Na}_2\text{O})_{15}$	água destilada	37	$1,557 \times 10^{-4}$	

Propriedades mecânicas

A tabela seguinte (Tabela 5) resume algumas propriedades mecânicas de fibras de PBG binários, ternários e quaternários. Desta pode-se inferir que as fibras dos vidros ternários e quaternários vêm aumentada a sua resistência à tracção e módulo de *Young*, relativamente aos binários.

A diferença de valores obtidos nos diferentes estudos para a mesma composição de PBG está dependente não só do diâmetro de fibras utilizado nos testes mas também do histórico

de processamento. No estudo de *Ahmed et al.* [53] foram utilizadas fibras com 20 µm de diâmetro, já *Kurkjian* [63] e *Karabulut* [64] utilizaram fibras com uma gama 70-250 µm; em termos de processamento foram utilizadas fibras não revestidas ou protegidas superficialmente - *Ahmed et al.* [53] - estas sofrem maior desgaste abrasivo com o seu manuseamento e bobinagem da fibra relativamente às fibras revestidas.

Tabela 5 - Propriedades mecânicas de algumas composições de fibras de PBG.

Composição PBG	Módulo Young (MPa)	Resistência à tracção (MPa)	Metodologia utilizada
$(P_2O_5)_{50}CaO_{50}$	44	474	Ensaio de tracção
$NaPO_3$	37	1800	Teste de flexão a 2 pontos
$Zn(PO_3)_2$	42	2400	
$(P_2O_5)_{50-20}(Na_2O.K_2O)_x(Al_2O_3)_{10}$	55	240	Teste de flexão a 2 pontos
$(P_2O_5)_{60}(Al_2O_3)_{20}Na_{20}$	60	2800	Teste de flexão a 2 pontos
$(P_2O_5)_{60}(Al_2O_3)_{15}Na_{20}(Fe_2O_3)_5$	67	3700	Teste de flexão a 2 pontos
$(P_2O_5)_{60}(Al_2O_3)_{10}Na_{20}(Fe_2O_3)_{10}$	67	4200	Teste de flexão a 2 pontos
$(P_2O_5)_{60}(Al_2O_3)_{10}Na_{20}(Fe_2O_3)_{20}$	69	2800	Teste de flexão a 2 pontos

Efeitos mais detalhados da variação da composição do PBG quaternário do sistema (P_2O_5) -(CaO)-(Na₂O)-(TiO₂) nas suas propriedades mecânicas, são enunciados seguidamente.

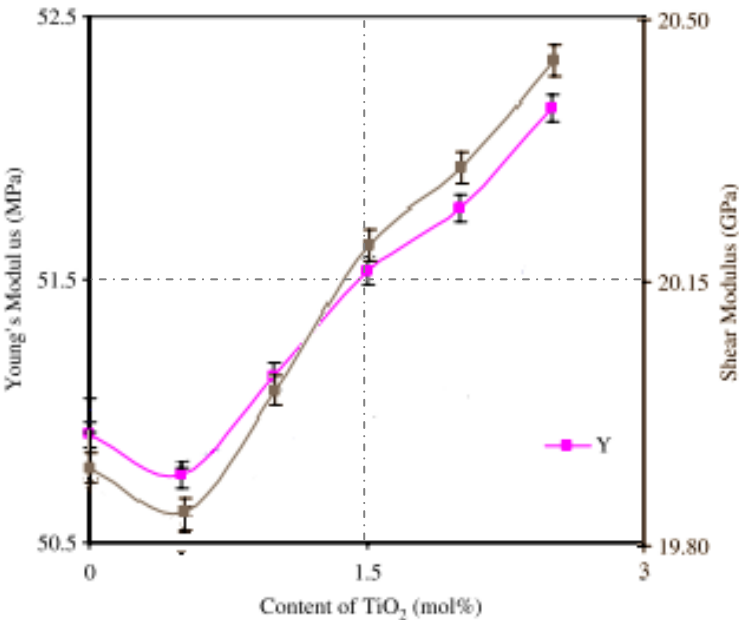


Figura 10 - Variação dos módulos de Young (E, MPa) e corte (G, GPa), em função da percentagem molar de TiO₂ presente no sistema $(P_2O_5)_{45}-(CaO)_{25}-(Na_2O)_{70-z}-(TiO_2)_z$ com z de 0 a 2,5%mol. [49]

Como visível na Figura 10 (onde as linhas presentes servem apenas como guias de tendências), há um decréscimo inicial das constantes elásticas do material, módulo de *Young* E e módulo de corte G , para composições de TiO_2 até 0,5%mol; acima da qual passa a haver um aumento gradual destes módulos, com o incremento da percentagem molar de TiO_2 . Estes valores são justificados pelo facto de que nas baixas concentrações a rede do PBG é composta por cadeias curtas ou anéis com os catiões metálicos; e a adição de TiO_2 para além dos 0,5%mol conduz a uma alteração desta rede inicialmente com grupo estrutural Q^2 para unidade terminais Q^1 [65], traduzindo-se num reforço da estrutura. Para além do referido, como o raio iónico do TiO_2 é baixo e a sua carga elevada, os iões Ti^{4+} conseguem estabelecer ligações com o fosfato formando ligações fortes Ti-O-P , em alternativa às P-O-P . É este reforço adicional da estrutura do PBG que a torna mais compacta e, por isso, provoca um aumento de E e G , para composições de TiO_2 superiores a 0,5%mol.

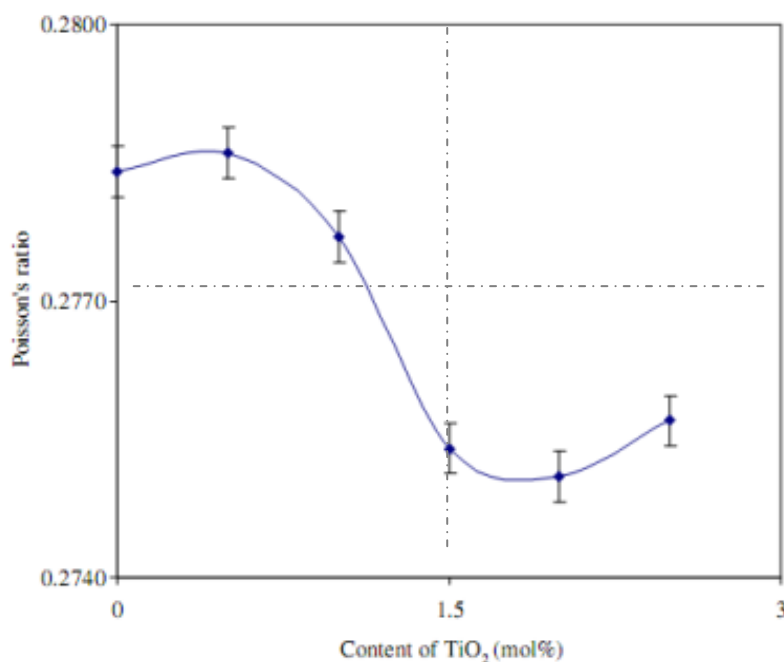


Figura 11 - Dependência do coeficiente de *Poisson* (ν) com a quantidade de TiO_2 no sistema PBG de composição $(\text{P}_2\text{O}_5)_{45} - (\text{CaO})_{25} - (\text{Na}_2\text{O})_{70-z} - (\text{TiO}_2)_z$ para variações de z entre 0 e 2,5%mol.^[49]

Por outro lado, como visível na Figura 11, onde mais uma vez a linha apresentada é simplesmente uma guia, o coeficiente de *Poisson* ν permanece praticamente constante, com oscilação entre 0,278 e 0,275 para %mol de TiO_2 de 0 a 2,5; respectivamente.

1.2.2.1.2 Exemplos de processamento

Independentemente da sua composição binária, ternária ou quaternária, os métodos de processamento dos PBG são em tudo idênticos aos a seguir mencionados, diferindo apenas nos elementos e quantidades necessárias para a situação específica em questão.

Os vidros oxi-nitreto são preparados pela mistura dos pós apropriados (sílica, alumina, o(s) óxido(s) modificadores(s) e nitreto de silício ou nitreto de alumínio) em álcool isopropílico, num moinho de bolas com meio de moagem à base de sialon, seguido de evaporação do álcool. Os vidros são posteriormente fundidos em cadinhos de nitreto de boro revestidos a grafite, numa atmosfera de azoto a 0,1MPa a 1600-1750°C durante 1h. Posteriormente a este procedimento, os vidros fundidos são rapidamente removidos do forno e vertidos para um molde de grafite previamente aquecido a cerca de 850-900°C. O PBG é recozido a esta temperatura durante 1h (para remoção de tensões internas causadas pelo gradiente térmico de solidificação), e posteriormente lentamente arrefecido. ^[50]

No processamento de um PBG do sistema quaternário $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_{25} - (Na_2O)_{70-z} - (TiO_2)_z$, em que z é a quantidade em %mol variável de 0 a 2,5%, são utilizadas técnicas de fusão e recozimento, com purezas dos compostos constituintes de 99,99%. O P_2O_5 é introduzido na forma de dihidrogenofosfato de amónio, o titânio é adicionado na sua forma pura metálica, e os restantes elementos na sua forma carbonada anidra. As quantidades estipuladas são fundidas em cadinhos cerâmicos num forno eléctrico a 1100°C ^[49] e 1200°C ^[31, 48, 51, 52], durante aproximadamente 2 e 1h, respectivamente, até estar garantida a completa homogeneidade.

O PBG resultante, agora à temperatura ambiente, é vertido para moldes com uma cavidade capaz de conceber um fundido de forma paralelepípedica de baixa espessura - placas. Estes moldes, construídos em aço inoxidável ^[49] ou grafite pré-aquecida a 300-400°C ^[31, 48, 51, 52], são transferidos para muflas de recozimento cuja temperatura permanece constante e ligeiramente abaixo de T_g . Passadas aproximadamente 2 horas, a mufla é arrefecida a 25°C/h até ser atingida a temperatura ambiente. ^[49] O gráfico seguinte demonstra o gradiente térmico durante o procedimento referido.



Figura 12 - Gradiente térmico existente no processamento do PBG quaternário $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_{25} - (Na_2O)_{70-z} - (TiO_2)_z$, para z variável de 0 a 2,5%mol.

O PBG é posteriormente cortado nos tamanhos desejados, consoante os testes/medições que se pretendem efectuar e normas que se pretendem seguir, e as duas faces finamente polidas. Todos os provetes são lavados em acetona para remover quaisquer partículas de sujidade, e a composição final dos mesmos pode ser verificada por espectroscopia de absorção atómica.

As fibras de PBG podem ser obtidas através de um dispositivo de manufactura de fibras que consiste num forno de enchimento pelo topo, com um cadinho (de platina ligado ao Ródio (10%)) e uma camisa cilíndrica (com um furo de 1mm diâmetro e 15mm de comprimento) no seu interior. O vidro é colocado nesse cadinho durante uma hora para fundir e homogeneizar, e a temperatura do forno foi posteriormente diminuída no sentido de se atingir a viscosidade adequada para a formação de fibras de vidro. Conseguem-se obter fibras de diferentes diâmetros estirando o vidro a diferentes rotações por minuto. ^[47]

As estruturas porosas para o mesmo sistema de PBG conseguem ser obtidas através da adição de H_2O_2 a uma barbotina com as partículas de vidro em suspensão. Isto origina a formação de uma espuma que pode posteriormente ser sinterizada. Para o controlo do grau de vitrificação do vidro, são aplicados diferentes tratamentos térmicos, resultando em materiais com percentagens de porosidade entre 40-50% com uma gama de poros desde 20 a 500nm de diâmetro. ^[10]

1.2.2.1.3 Degradação hidrolítica

Os BG sofrem degradação em meio aquoso e a sua degradabilidade e está dependente da sua composição. Uma vez previsível ^[32], pode dizer-se que a solubilidade dos PBG consegue ser mais controlada que os vidros de sílica ^[45] pela adição de modificadores. Esta adição de modificadores (CaO ou Na_2O , por exemplo) que interrompe a estrutura física do vidro tem influência directa no tempo de dissolução do mesmo; e é a proporção dos modificadores no PBG que determina a variação desse tempo de dissolução - oscilante entre poucas horas a alguns meses. ^[26]

Os seus produtos de degradação por hidrólise, nomeadamente dos BG que têm na sua composição o SiO_2 como componente, são produtos altamente tóxicos. ^[21] Esta é uma das razões para que os BG mais comuns sejam os PBG pertencentes ao sistema $(P_2O_5)_x-(CaO)_y-(Na_2O)_{100-x-y}$; já que os seus produtos de degradação são iões normalmente existentes no corpo humano, sobretudo na fase mineral inorgânica do osso, e são, maioritariamente, cálcio e fosfatos ^[43], inofensivos para o homem ^[32].

O mecanismo de dissolução dos vidros está relacionado com as reacções entre a água e o vidro. ^[46] Neste mecanismo de degradação há uma hidratação das ligações P-O-P que ocorre

em 2 passos interdependentes conduzindo à dissolução do vidro ^[10]. No primeiro passo, a água difunde-se no vidro formando uma camada hidratada ^[46] e dá-se a reacção de hidratação com a troca de iões sódio do vidro com iões hidrogénio da água ^[10]. No segundo estágio, tem lugar a reacção de hidrólise ^[46] que corresponde há quebra da rede matricial na camada hidratada pela quebra das ligações P-O-P ^[10]. A cadeia polimérica é deste modo hidrolisada pelas moléculas de água.

A adição de um componente ao fosfato aos vidros, compondo os vidros binários com base fosfato, produzidos na sua maioria por condensação, não tem grande efeito na velocidade de dissolução do vidro ^[47]. Por exemplo, a adição de Al_2O_3 diminui a velocidade de dissolução do vidro ^[46]; já o mesmo não acontece em compostos ternários. A figura seguinte (Figura 13) representa a variação da perda de massa por unidade de área de um PBG ternário $(\text{P}_2\text{O}_5)_x - (\text{CaO})_y - (\text{Na}_2\text{O})_{100-x-y}$, com valores fixos de $x=45, 50$ e 55% mol, variando $y=30, 35$ e 40% mol.

Esta variação foi obtida através da medição da massa inicial e ao longo do tempo (t) de cada amostra, M_0 e M_t , respectivamente. Para a perda de massa por unidade de área, considerou-se A como a área de superfície do vidro em cm^2 e fez-se: perda de massa = $(M_0 - M_t)/A$. A solubilidade, em termos de $\text{mg.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$, é-nos dada pelo declive do gráfico da perda de massa por unidade de área versus o tempo.

Como é visível na Figura 13, a perda de massa por unidade de área do PBG diminui com o aumento da % molar de CaO em função do tempo de dissolução deste em água destilada a 37°C ; de salientar que este decréscimo é quase linear para a quantidade fixa de 50% mol P_2O_5 (Figura 13 (B)), particularmente $(\text{P}_2\text{O}_5)_{50} - (\text{CaO})_{30} - (\text{Na}_2\text{O})_{20}$, onde foi também obtida a maior taxa de solubilidade. Na parte (C) da mesma figura, são visíveis valores semelhantes de perdas de massa para as diferentes quantidades de CaO, que correspondem a taxas de solubilidade com os valores $3,455$; $2,940$ e $3,125 \times 10^{-4} \text{ mg.cm}^{-2}.\text{h}^{-1}$ (Figura 14), respectivamente.

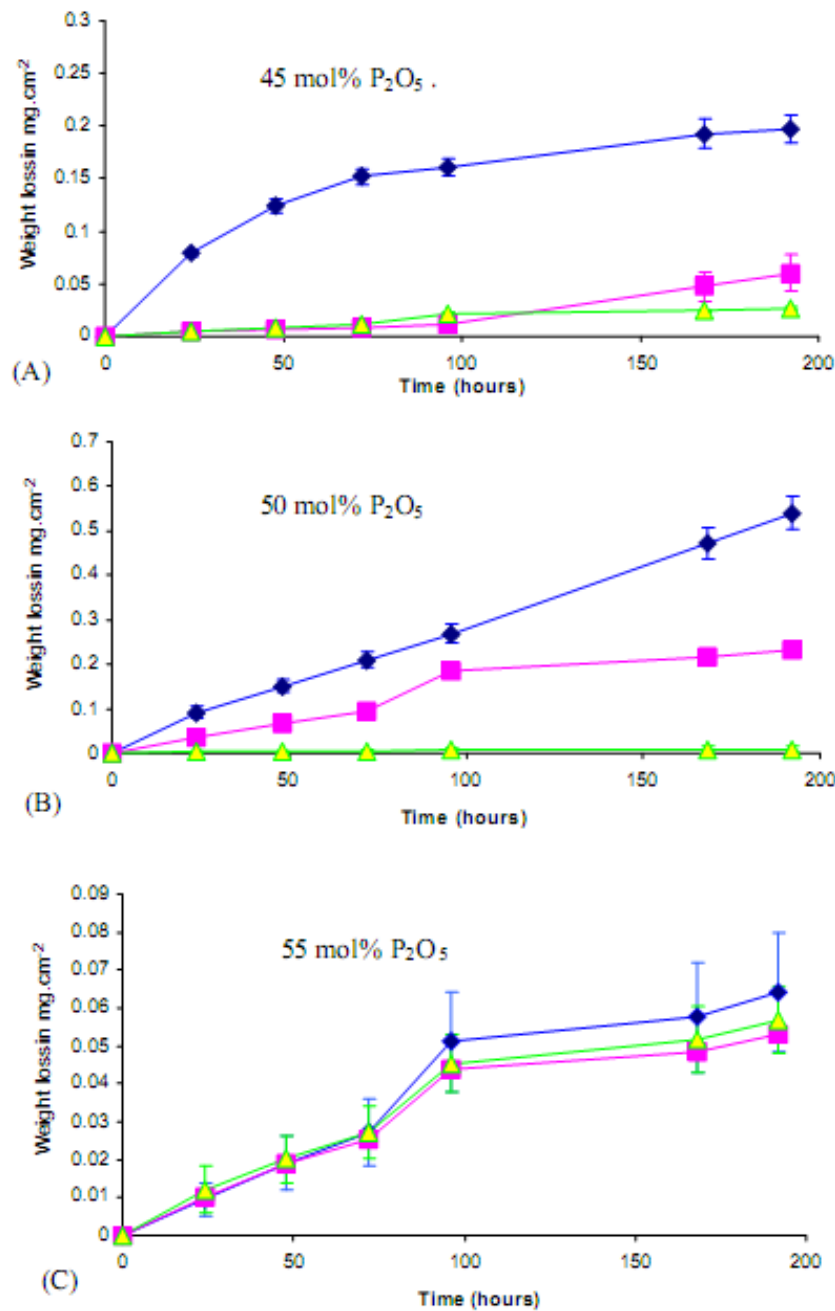


Figura 13 - Perda de massa por unidade de área (mg/cm²) de PBG ternário do sistema (P₂O₅)_x - (CaO)_y - (Na₂O)_{100-x-y} em função do tempo (h) para quantidades fixas de P₂O₅ = 45, 50 e 55 %mol. (◇ para y= 30%mol CaO, □ para y=35%mol CaO, Δ para y=40%mol CaO). ^[45]

Na Figura 14, onde estão reproduzidos os dados provenientes do teste de solubilidade feito por *M. Ahmed et al.* ^[45] a 37°C para valores fixos de x=45, 50 e 55 %mol variando y=30, 35 e 40 %mol ^[45]; e valores x=50 %mol com variações de y=11 a 50 %mol a 40°C do teste feito por *F. Delahaye et al.* ^[62]; é ainda visível que, de um modo geral, há uma relação inversa da quantidade de CaO e a razão de dissolução do vidro; ou seja, à medida que a % molar de CaO presente no vidro é maior, a taxa de dissolução deste diminui.

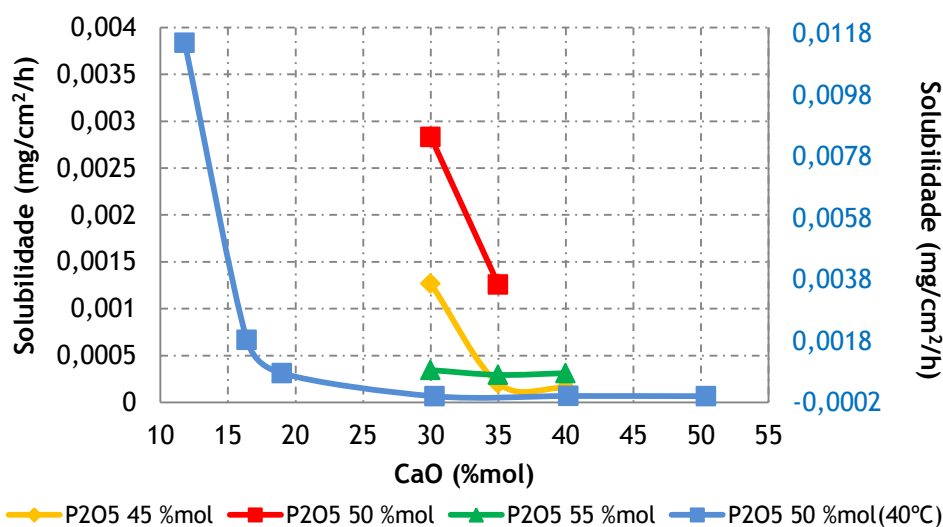


Figura 14 - Variação da solubilidade do vidro ternário $(P_2O_5)_x - (CaO)_y - (Na_2O)_{100-x-y}$ ($mg/cm^2/h$) em função da % molar de CaO presente ($x = 45, 50$ e 55% e $y = 30, 35$ e 40% a $37^\circ C$ e $x=50\%$ e $y=11$ a 50% a $40^\circ C$). Adaptado de [45, 62]

Outros dados que corroboram esta proporcionalidade estão evidentes na Figura 15. Esta apresenta a perda de massa por unidade de área vs. o tempo de dissolução (em água destilada a $37^\circ C$ e $pH=5,5$ [52]) e quantidade de CaO presente no vidro com base fosfato, particularmente do sistema $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_y - (Na_2O)_{55-y}$ [8]. Pela ampliação feita, verifica-se uma não-linearidade inicial que começa com uma degradação elevada e decresce significativamente após as primeiras 10-20 h [8], aproximadamente, o que está de acordo com a Figura 13 (A).

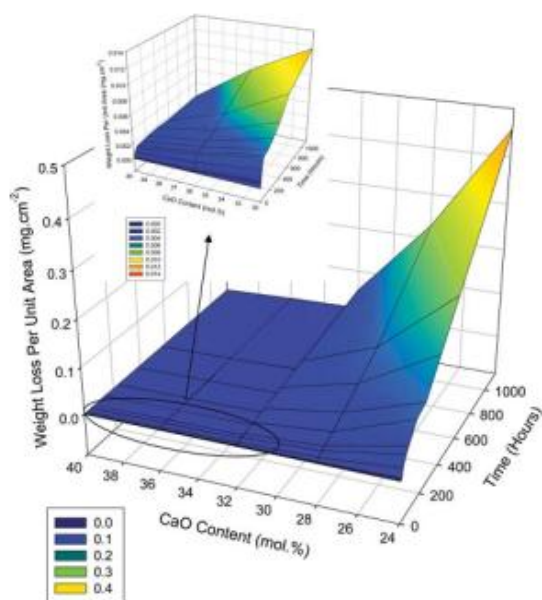


Figura 15 - Efeito da quantidade de CaO (24-40 %mol) na perda de massa por unidade de área (mg/cm^2) vs. tempo de dissolução do sistema ternário $(P_2O_5)_{45} - (CaO)_y - (Na_2O)_{55-y}$ (h). (Zoom feito na região de 32-40 %mol de CaO). [8]

Em todos os casos foi estudada a cinética de dissolução dos PBG e proposta a dependência da diminuição da taxa de dissolução pela formação de uma camada superficial no vidro que dificulte a difusão iônica, ou por um processo de trocas iônicas, ou pela mudança do carácter iónico da solução.

A possibilidade de formação de uma camada cristalina na superfície do vidro, que diminuiria o processo de dissolução, só consegue ser verificada para PBG com composições de CaO entre 20-28%mol uma vez que quantidades superiores de CaO induzem uma dissolução extremamente rápida não deixando que esta camada se forme. O processo de trocas iônicas conduziria a uma cinética com $t^{1/2}$, o que não se verifica. [52]

A dependência da diminuição da taxa de dissolução pode ser explicada pela existência um processo de dois estágios de degradação; e confirmados pela aplicação do modelo de difusão por *K. Franks* [8]. Através da medição de pH da solução, verifica-se que o seu valor aumenta rapidamente para todas as composições de vidros, iniciando num pH=5,5 para a água destilada. Uma análise aos iões sódio libertados durante a dissolução do vidro mostra que estes são libertados em grandes quantidades para os vidros com altas taxas de dissolução (com menor % de CaO), com incidência de libertação nos estágios iniciais de dissolução (Figura 16). Por esta razão os valores de pH variam entre 5,5 e 8,5; dependendo da composição do vidro (ver Figura 17). Para todos os vidros, a solução de água destilada aumentou de pH nas primeiras horas, seguindo-se um decréscimo; e os vidros com alta solubilidade demonstraram um aumento superior de pH relativamente aos vidros de baixa solubilidade. [52]

Como seria expectável, o vidro com a maior quantidade de Na₂O (com a mais elevada taxa de dissolução) liberta grandes quantidades de iões sódio; o que, inevitavelmente, influencia o pH da água de destilada uma vez que à medida que os iões de Na⁺ vão sendo libertados, iões hidrogénio (H⁺) migram para o vidro com a finalidade de estabelecerem um balanço de cargas, provocando um excesso de iões hidróxido (OH⁻) e o aumento do pH. Pelo contrário, como consequência dessa migração, à medida que vai diminuindo a quantidade de Na⁺ em solução, o pH diminui.

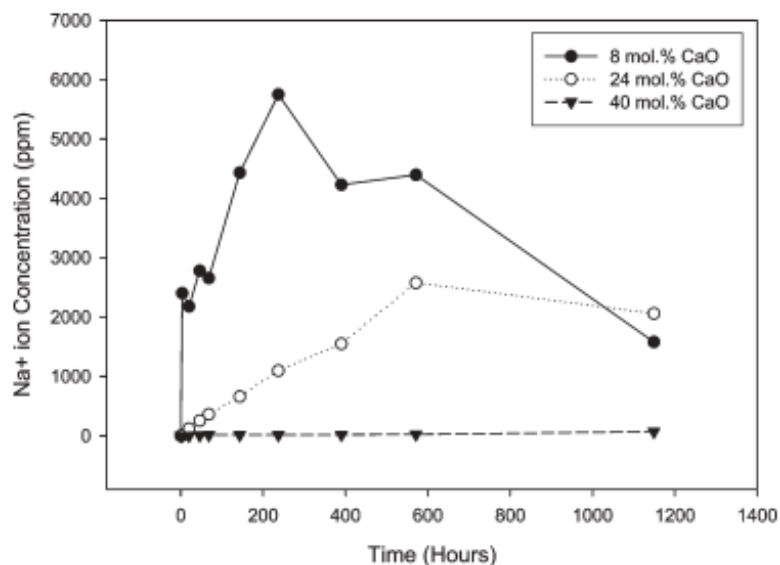


Figura 16 - Variação da concentração dos íons sódio (Na^+) na água destilada (ppm) em função do tempo de dissolução do vidro de composição $(\text{P}_2\text{O}_5)_{45} - (\text{CaO})_y - (\text{Na}_2\text{O})_{55-y}$.^[8]

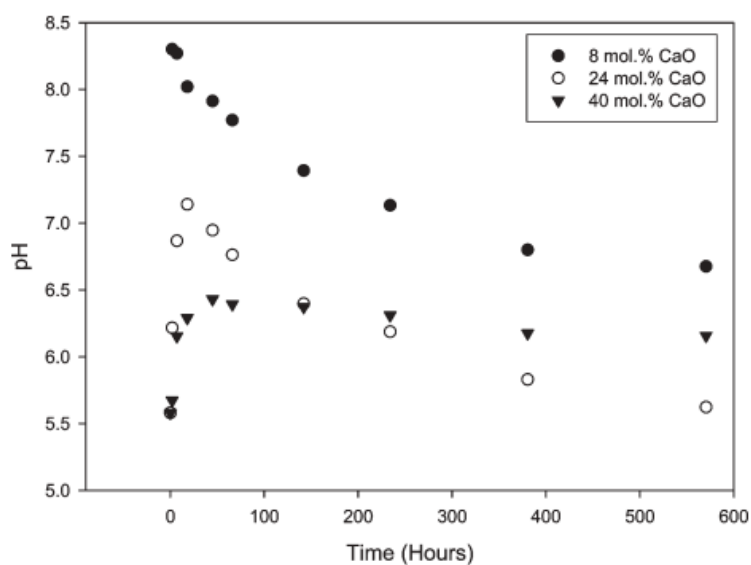


Figura 17 - Variação do pH da solução de água destilada vs. tempo de dissolução (h) de compostos ternários de vidro com base fosfato $(\text{P}_2\text{O}_5)_{45} - (\text{CaO})_y - (\text{Na}_2\text{O})_{55-y}$, para $y = 8, 24$ e 40% mol.^[8]

Relativamente ao sistema $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-K}_2\text{O}$, pode dizer-se que a sua solubilidade é considerada elevada para o uso biomédico^[8], e está dependente da quantidade de K_2O ; quanto maior for a sua representação no PBG, maior é a solubilidade do mesmo^[31]. O aumento da solubilidade pela adição de K_2O a um vidro, é justificada pelo raio iónico do potássio. Tendo um amplo raio iónico comparativamente ao sódio, o potássio, como modificador, tem um maior efeito perturbador na estrutura do vidro e, como tal, enfraquece a rede de suporte.^[31]

Nos vidros oxi-nitreto o aumento de N altera o mecanismo de dissolução dos mesmos, passando de um ataque aquoso rápido para uma reacção química directa entre H_2O e as ligações P-O-P ou P-N=P. [50]

Em PBG quaternários, a percentagem do ião cálcio na sua composição, traduz-se no mesmo comportamento referenciado para os ternários; ou seja, um aumento de CaO induz um decréscimo na solubilidade do vidro. No entanto, o efeito da permuta de um ião mono ou divalente por outro com similaridade de carga tem um comportamento desconhecido. Para o caso do sistema, P_2O_5 -CaO- Na_2O - K_2O , por exemplo, fixando a percentagem de P_2O_5 e CaO em quantidades conhecidas, variando a razão de Na_2O e K_2O , o resultado foi equivalente ao referenciado para o PBG ternário P_2O_5 -CaO- K_2O . Como visível na figura seguinte, o aumento de K_2O em detrimento de Na_2O , induz um aumento de solubilidade do vidro *in vitro*.

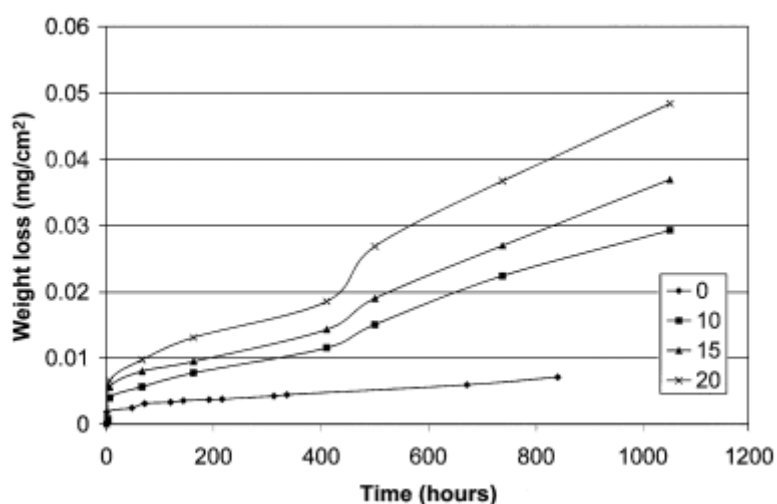


Figura 18 - Efeito do aumento da percentagem molar de K_2O (em 0, 10, 15 e 25%mol) na perda de massa em água destilada 37°C, do PBG quaternário (mg/cm^2), com P_2O_5 e CaO fixos. [31]

O aumento da solubilidade, independentemente da sua variação efectiva, representa um aumento dos iões presentes na solução e, conseqüentemente, uma alteração do pH da mesma. No que diz respeito ao sódio, a sua libertação aparenta ser na ordem inversa à do ião potássio e pode ser descrita pelo facto de a solubilidade aumentar com o aumento de K_2O e conseqüente decréscimo de Na_2O . [31]

Particularmente nos vidros do sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - TiO_2 , num estudo equiparado ao apresentado anteriormente, foram fixados os valores $(P_2O_5)_{0,45}$ - $(CaO)_{0,24}$, e variada composição de TiO_2 na gama 0-2,5 %molar balanceada com Na_2O . Os valores máximos de pH e Ca^{2+} libertados em solução ocorreram para vidros em que o conteúdo de TiO_2 é baixo, nomeadamente PBG com TiO_2 inferior ou igual a 1,0 %mol (Figura 19).

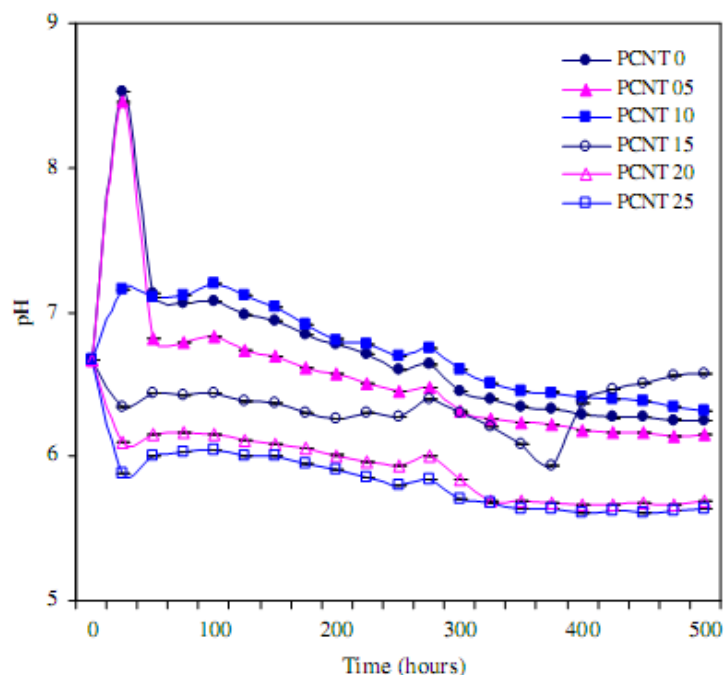


Figura 19 - Variação do pH da solução com o tempo de dissolução (h) do PBG em água destilada a 37°C, em função da percentagem de TiO₂ presente no mesmo (0-2,5 % molar). ^[49]

No entanto, como é visível na Figura 20, à medida que o conteúdo de TiO₂ aumenta, a solubilidade do vidro diminui e a perda de massa revela dois estágios de cinética de dissolução do PBG; isto é, o primeiro estágio em que a perda de massa é proporcional a $t^{1/2}$, e o segundo estágio em que o comportamento observado é linear.

A dependência da perda de massa com $t^{1/2}$ no componente livre ou com baixas quantidades de titânio, deve-se à alta solubilidade destes vidros relativamente aos vidros com composições superiores a 1,0 %mol de TiO₂. Resultados que estão de acordo com o já referenciado por *Bunker et al.* ^[49]. Por outro lado, pode-se inferir que o aumento do conteúdo de TiO₂ no vidro aumenta a força iónica da solução de lixiviação, que por sua vez diminui a velocidade de dissolução. Este decréscimo na razão de dissolução é atribuído ao aumento da interacção electrostática que tem lugar nas camadas hidratadas devido ao aumento da força iónica. Tudo isto confirma o já anteriormente relatado: a taxa de dissolução dos compostos com base fosfato diminui com o aumento de TiO₂ na sua composição, o que reafirma os resultados obtidos para composições de vidro ternárias com os constituintes P₂O₅, CaO e Na₂O. ^[49]

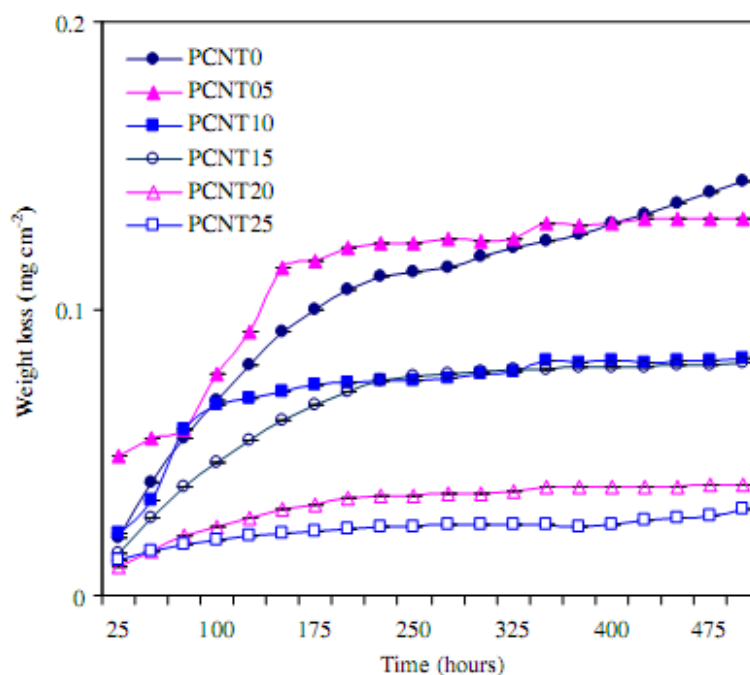


Figura 20 - Perda de massa por unidade de área (mg/cm^2) versus o tempo de dissolução (h) em água destilada a 37°C do PBG quaternário do sistema $(\text{P}_2\text{O}_5)_{45}-(\text{CaO})_{24}-(\text{Na}_2\text{O})_{31-y}-(\text{TiO}_2)_y$ para $y=0-25$ %massa. ^[49]

O mecanismo de dissolução descrito para os PBG aplica-se tanto a vidros maciços como a fibras. ^[10] Contudo, como consequência da história térmica destas duas diferentes formas ser diferente ^[10], os efeitos de recozimento podem ser mais significativos nas fibras devia à razão menor de área de superfície/volume. ^[46]

Como já referido, o mecanismo de dissolução das fibras é o mesmo que para PBG em placas; no entanto, nas fibras sem tratamento térmico há formação da camada hidratada e há delaminação ^[60, 62], nas fibras com recozimento há esfoliação dessa camada hidratada. ^[66] Embora o tratamento térmico permita movimentos moleculares (relaxamento) das cadeias poliméricas no sentido de se alcançar uma configuração mais estável, se não for suficiente podem permitir a ocorrência simultânea da delaminação pela presença residual de camadas poliméricas orientadas na estrutura da fibra. ^[46]

Hayden *et al.* ^[67] mostrou que os vidros metafosfato recozidos, preparados com P_2O_5 , Al_2O_3 , K_2O , MgO e Nd_2O_3 , à temperatura ambiente formam planos de tensão na superfície do vidro. Isto alivia tensões residuais resultantes da sua elaboração e do rápido arrefecimento através de movimentos moleculares para configurações mais estáveis. ^[66] Choueka *et al.* ^[66] mostra que as fibras do sistema $(\text{PO}_4)_{54}-\text{CaO}_{27}-\text{ZnO}_{12}-(\text{Fe}_2\text{O}_3)_{4,5}-(\text{NaPO}_3)_{2,5}$ apresentam uma velocidade de dissolução inversamente proporcional à sua temperatura de recozimento.

Tomando como base fibras com a composição quaternária $(P_2O_5)_{40}-(CaO)_{16}-(Na_2O)_{20}-(MgO)_{24}$, a figura seguinte mostra a diferença de perda de massa entre fibras sem recozimento e dimensionalmente específicas, e fibras com tratamento térmico.

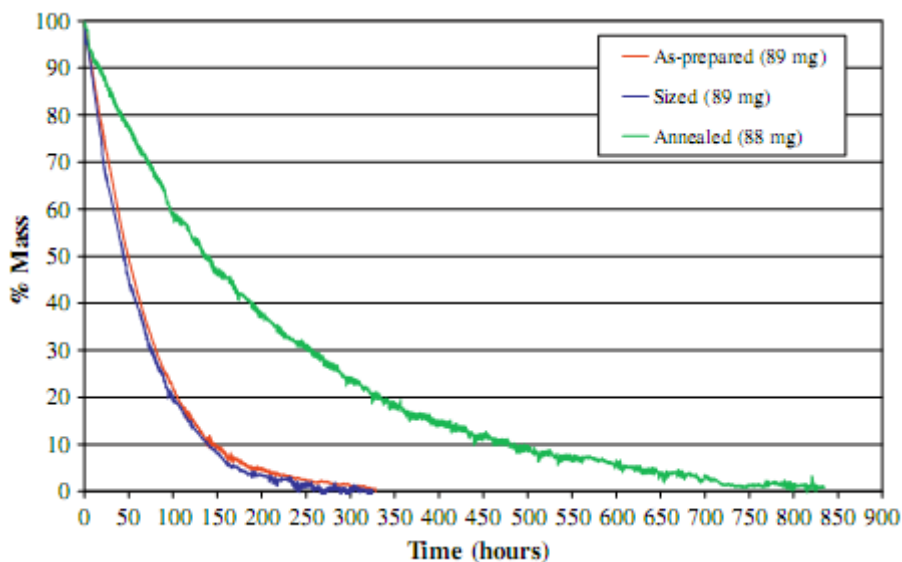


Figura 21 - Efeito do recozimento na perda de massa (%) de fibras de PBG com a composição $(P_2O_5)_{40}-(CaO)_{16}-(Na_2O)_{20}-(MgO)_{24}$ em função do tempo (h) (perfil azul e vermelho correspondem à produção de fibras sem recozimento, perfil verde corresponde às fibras com tratamento térmico). [46]

Estes perfis de degradação mostram que as fibras produzidas sem recozimento têm comportamentos de dissolução semelhante, decrescente e não-linear com o tempo, com valores de velocidades de degradação em água desionizada a 37°C duvidosos de $1,2 \times 10^{-5} \pm 4,7 \times 10^{-5}$ e $1,7 \times 10^{-5} \pm 5,0 \times 10^{-5} \text{ gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$, respectivamente; bastante diferente do comportamento das fibras que passaram por um tratamento térmico, cuja velocidade de dissolução é $6,7 \times 10^{-6} \pm 6,3 \times 10^{-5} \text{ gcm}^{-2}\text{h}^{-1}$. [46] Os dois primeiros tipos de fibras têm curvas de dissolução com perdas superiores a 50% de massa inicial em 50h mas, em contraste com *Bunker et al.* [61] não apresentam uma dependência com o tempo de $t^{1/2}$ seguida de uma fase linear. Para as primeiras 50h, a relação é aproximadamente linear, correspondendo aos ensaios de *Rinehart et al.* [60]. Passadas as 50h iniciais, a dissolução passa a ser marcadamente não-linear. Já as fibras com tratamento térmico a 5°C abaixo de T_g , perdem massa de modo linear nas primeiras 200h com posterior e gradual abrandamento da velocidade de dissolução; em 50h, mostram uma redução de massa de 22% em oposição à redução de 50% das não tratadas termicamente; e necessitam de 140h para perder a mesma quantidade de massa - 50%. Deste modo, mostram ser mais resistentes à degradação hídrica do que as suas homônimas sem tratamento térmico; pelo que se pode concluir que o tratamento térmico das fibras a altas temperaturas conduz à diminuição da sua velocidade de dissolução, pelo que este recurso pode ser útil aquando da sua aplicação médica.

Eventualmente podem ser utilizadas substâncias químicas (por exemplo: amino-silano) capazes de reagir com os componentes do PBG de modo a fortalecer as interações entre eles. De referir que alguns destes agentes não alteram ^[46, 60] a velocidade de dissolução das fibras de PBG em estudo, pois não estabelecem ligação química com a superfície da fibra, pelo que não oferecem resistência à água. O mesmo autor, *Rinehart et al.* ^[60], verifica que a velocidade de degradação das fibras com a composição 54% PO₄ 27% CaO 12% ZnO 4,5% Fe₂O₃ 2,5% NaPO₃ é $6,6 \times 10^{-7} \pm 1,7 \times 10^{-7} \text{ g cm}^{-2} \text{ h}^{-1}$, e portanto menor em PBS do que em água desionizada. ^[60]

Por estes exemplos apresentados pode-se concluir que não só a composição do PBG é um factor importante nos processos de bioactividade como também a sua degradação também tem um factor preponderante.

1.2.3 Polímeros

Os polímeros são moléculas de grandes dimensões com ligações covalentes entre monómeros, e que podem ser modificáveis química ou bioquimicamente, adaptando-se deste modo à aplicação pretendida em termos de composição, propriedades e formas (sólidos, fibras, tecidos, filmes e géis). Têm a particularidade de conseguir absorver líquidos e inchar, e lixiviar produtos indesejáveis, se assim se desejar. ^[9]

Dividem-se em polímeros sintéticos e naturais ou biopolímeros. ^[18] Claramente que a utilização de polímeros naturais na recuperação de qualquer parte do corpo humano tem vantagens. Para além de serem substâncias de ocorrência natural, são muitas vezes idênticos a substâncias macromoleculares que o ambiente biológico está preparado para reconhecer e lidar metabolicamente, pelo que têm baixas toxicidades e reacção crónica inflamatória. ^[68] A maioria deles são biocompatíveis e biodegradáveis, quer por enzimas de ocorrência natural ou resultam em fragmentos não tóxicos de baixo peso molecular e solúveis em água ^[30] que podem ser reabsorvíveis e eliminados do corpo por processos metabólicos normais. Podem ser manipulados e adaptados à função pretendida, são fisiológicos (estáveis a variações de T e pH em condições fisiológicas), renováveis e apresentam compatibilidade ambiental. ^[69] Algumas limitações que podemos apontar são a grande dificuldade em: reproduzir estes polímeros em quantidades industriais e sempre iguais, uma vez que são de origem animal ^[68]; a necessidade de controlo em termos de biodegradabilidade, uma vez que são susceptíveis a degradação microbiana e enzimática (por exemplo no armazenamento ^[18]); terem uma variabilidade natural; e a sua química ser menos conhecida quando comparados com os sintéticos, o que torna a sua manipulação tecnológica mais elaborada. ^[69]

1.2.3.1 Degradação e erosão

A degradação polimérica em ambiente biológico é um fenómeno natural mas complexo. Os materiais poliméricos quando expostos a condições externas podem ver alterada a sua capacidade de serem biodegradáveis por meios diferentes de degradação: biodeterioração - física, química e enzimática; biofragmentação - hidrólise enzimática, oxidação enzimática e oxidação radicalar; assimilação; e em ambiente abiótico podem sofrer degradação mecânica, térmica, química e por luz. ^[70] Alguns processos de degradação podem envolver uma combinação de dois ou mais mecanismos individuais ^[18]; no entanto, a biodeterioração envolve sempre a clivagem das ligações hidroliticamente ou enzimaticamente sensíveis, conduzindo à corrosão do polímero. ^[17]

A biodeterioração é o resultado da actividade de crescimento dos microorganismos na superfície e/ou no interior do material. Estes microorganismos agem normalmente por meios mecânicos, químicos e/ou enzimáticos; e o seu desenvolvimento depende da constituição e das propriedades dos materiais poliméricos. Fisicamente, as espécies microbianas aderem às superfícies do material devido à secreção de uma espécie de muco composto por uma complexa matriz de polímeros, interferindo na resistência e durabilidade do mesmo, enfraquecendo-o. Quimicamente, os polímeros extracelulares produzidos pelos microorganismos, ao agir como surfactantes e facilitando a alteração entre fases hidrofílicas e hidrofóbicas, favorecem a razão de penetração de microorganismos no material e a acumulação de poluentes do meio envolvente no mesmo, acelerando a sua biodeterioração. Enzimaticamente existem alguns materiais que podem estar sujeitos a biodeterioração microbiana, e a sua vulnerabilidade pode ser atribuída à biossíntese de lipases, esterases, ureases e proteases.

A biofragmentação é o processo lítico necessário para a assimilação, em que os microorganismos utilizam diferentes *modus operandi* para decompor os polímeros. Os microorganismos segregam diferentes tipos de enzimas específicas ou geram radicais livres. Estas enzimas são proteínas catalíticas que diminuem o nível de energia de activação das moléculas, favorecendo as reacções químicas. Esta biofragmentação pode resultar de hidrólise enzimática, oxidação enzimática ou oxidação radicalar.

A assimilação permite ao microorganismo crescer e reproduzir-se enquanto consome substratos nutritivos do ambiente envolvente - por exemplo, polímeros. Esta depende da habilidade do microorganismo crescer e reproduzir-se em condições aeróbias ou anaeróbias.

Outra configuração de caracterização dos diferentes mecanismos conducentes à degradação das propriedades dos polímeros, que complementa a anteriormente descrita, passa por simplesmente agrupá-los em físicos e químicos. Nos físicos teremos a absorção, inchamento, amaciamento, dissolução, mineralização, extracção, cristalização, descristalização, fissuração sob tensão, fractura por fadiga e fractura por impacto; e nos químicos, a termólise (quebra de radicais, despolimerização), oxidação (química e termoxidativa), solvólise (hidrólise, alcoólise, aminólise, etc.), fotólise (visível, ultravioleta,

etc.), radiólise (raios gama, raios X, feixe de electrões, etc.), e reacções radiculares induzidas por fractura. ^[18]

Em ambiente abiótico, a degradação mecânica pode ser induzida por compressão, extensão e/ou forças de tensão. Estes factores mecânicos não são predominantes durante o processo de biodegradação, no entanto os seus efeitos podem activá-lo ou acelerá-lo. A degradação térmica ocorre à T_f do material e acontece quando a temperatura do ambiente envolvente é próxima à sua T_f . O material é transformado de sólido a líquido e muitas vezes altera a sua estrutura molecular (mobilidade e volume das cadeias), quando o meio envolvente apresenta uma temperatura igual à sua T_g . Acima da T_g , a desorganização das cadeias facilita a acessibilidade de degradação química e biológica.

A transformação química, um dos mais importantes parâmetros nas degradações abióticas, é a alteração das propriedades macromoleculares resultantes da interacção dos polímeros com poluentes do seu ambiente envolvente e agroquímicos. Esta interacção pode ser oxidativa ou por hidrólise e conduz à erosão do polímero. ^[17] A primeira depende da estrutura polimérica e provoca cisão de ligações covalentes da cadeia por acção de espécies oxidativas e radiação de alta energia (por exemplo UV); a segunda provoca cisão de ligações covalentes da cadeia polimérica por reacção de grupos funcionais com moléculas de água, muitas vezes catalisada por ácidos, bases, sais ou enzimas, e depende de parâmetros como T, pH e tempo. As moléculas bem organizadas - cristalinas, previnem a difusão de oxigénio (O_2) e água (H_2O), limitando deste modo a degradação química. ^[71]

A degradação polimérica é definida como o processo que descreve os acontecimentos da cisão da cadeia polimérica durante o qual esta é clivada para formar oligómeros e finalmente monómeros ^[72]; a erosão, como a perda de massa da matriz polimérica degradável ^[73] provocada pelo facto de os oligómeros e monómeros deixarem o polímero ^[72]; e a hidrólise, como sendo a reacção biomolecular na qual a água e a ligação instável do grupo funcional estão envolvidos. A velocidade desta reacção é determinada pela “concentração” de ambos os intervenientes envolvidos ^[74].

A degradação de um dispositivo biodegradável é um processo complicado; e para que esta consiga ser definida completamente num modelo matemático, este tem que incluir todos os passos de reacção e todos os detalhes morfológicos e estruturais do dispositivo ao longo da sua degradação. Deste modo, serão sempre necessários testes extensivos para o determinar.

Durante a degradação há alterações químicas e físicas dos polímeros, como a cristalização dos oligómeros ^[75] a monómeros ^[76] ou alterações de pH ^[77]. Alguns destes factores podem ter grandes consequências na velocidade de degradação, por exemplo: um polímero amorfo será mais facilmente degradável que um cristalino, e um polímero de baixo peso molecular e/ou lineares será mais rapidamente degradável que um com alto peso molecular e/ou ramificado.

Para além disso, uma temperatura elevada no meio envolvente, facilita a degradação polimérica.^[30]

Uma vez que a degradação polimérica é o processo chave da erosão, há alguns parâmetros que avaliados, determinam a velocidade de degradação. Destacam-se:

- i. o tipo de ligação química - sendo a ligação existente na espinha dorsal do polímero que determina, maioritariamente, a velocidade de hidrólise^[72];
- ii. o pH - uma alteração de pH pode conduzir à alteração da ordem de magnitude das reacções dos ésteres presentes devido à catálise^[78];
- iii. a composição do copolímero - ao introduzir-se um segundo monómero na cadeia polimérica muitas das propriedades do polímero original podem ser influenciadas (cristalinidade ou T_g)^[79]; e
- iv. a absorção de água - a velocidade de hidrólise depende não só da água como também do grupo funcional do polímero em questão, isto é, polímeros lipofílicos não conseguem absorver grandes quantidades de água, pelo que este parâmetro reduz a sua velocidade de degradação^[80, 81]. Em contraste, os polímeros hidrofílicos absorvem grandes quantidades de água conduzindo a um aumento da sua velocidade de degradação^[72].

Dos referidos, o parâmetro mais importante para monitorizar a degradação é a composição do polímero através do seu peso molecular; no entanto esta também pode ser medida pela perda de força mecânica, completa degradação em monómeros ou libertação de monómeros. Por outro lado, sabe-se que embora estejam todos relacionados, não obedecem necessariamente à mesma cinética.^[72]

Nos casos em que os polímeros não apresentam a velocidade de degradação adequada, ou seja, esta é demasiado lenta para aquela aplicação específica, consegue-se adequar a velocidade de degradação pela adição de substâncias que regulam o pH^[72], pela alteração da estrutura polimérica por co-polimerização ou mistura de polímeros^[72], ou numa abordagem completamente diferente, *Kost and Langes*^[82] recorrendo a ultra-sons.

Apesar dos diferentes tipos de degradação anteriormente mencionados, há algumas particularidades:

- i. a degradação térmica desempenha um papel importante nos polímeros não-degradáveis^[83], e como todos os polímeros biodegradáveis contêm ligações hidrolisáveis, o seu mecanismo mais importante de degradação é por degradação térmica via hidrólise ou hidrólise catalisada por enzimas (biodegradação²⁵)^[84];
- ii. a degradação mecânica afecta os polímeros biodegradáveis que são sujeitos a stress mecânico^[72] ou biodegradáveis utilizados como fixadores ou materiais de estrutura^[72].

²⁵ A degradação é mediada pelo menos parcialmente por um sistema biológico.^[84]

- iii. todos os polímeros compartilham a propriedade de sofrerem erosão sob influência de luz UV ou radiação γ ^[85], e os polímeros degradáveis partilham a propriedade de sofrer erosão como consequência da degradação ^[72].

A degradação e a erosão são parâmetros de desempenho decisivos de um dispositivo composto por polímeros degradáveis. E estes últimos podem ser classificados como polímeros que sofrem erosão na sua superfície (heterogêneos) ou no seio do material (homogêneos) - Figura 22.



Figura 22 - Ilustração esquemática das alterações a nível matricial causadas por erosão superficial e erosão no seio do material. Adaptada de ^[73]

Tal como pode ser visto na figura anterior, durante a aplicação de um dispositivo no caso em que a erosão dos polímeros é superficial, a perda do material dá-se a uma velocidade constante durante todo o tempo da erosão ^[86] e o dispositivo mantém a forma geométrica original ^[72], supondo que a área exposta é constante e não há reentrâncias na mesma; para o caso em que a erosão é no seio do material, a degradação e erosão não estão confinadas à superfície do dispositivo. Deste modo, não existindo uma constante de velocidade de erosão ^[87], o tamanho do dispositivo permanece constante num período de tempo durante a sua aplicação ^[72]. Habitualmente este processo não acontece por longos períodos de tempo, sendo que a partir de determinado instante a erosão passa a ser espontânea. Ainda por clarificar está a razão que justifica que uns polímeros sofram erosão superficial e outros erosão aplicada á massa. ^[73] A vantagem da erosão superficial polimérica é a previsibilidade do processo de erosão, muito utilizado em polímeros para a libertação controlada de fármacos. ^[88]

A erosão polimérica é um processo mais complexo do que a degradação pela sua dependência de diversos processos entre os quais a degradação, inchamento, a dissolução e difusão dos oligómeros²⁶ e monómeros do polímero, e alterações morfológicas. No entanto, é a degradação o processo mais importante de erosão ^[72] e o conhecimento do mecanismo de

²⁶ Molécula composta por um número finito de monómeros.

erosão a que um polímero degradável está sujeito é de elevada importância no que diz respeito ao sucesso da sua aplicabilidade.

As primeiras mudanças morfológicas durante a erosão estão confinadas à superfície do polímero e à medida que a erosão prossegue, o polímero adquire uma estrutura mais porosa; macro e/ou microporosa. Através da cisão da cadeia polimérica, os polímeros são transformados em oligómeros e monómeros cujos grupos funcionais são diferentes dos do polímero original, pelo que os produtos de degradação do polímero inicial influenciam o pH do meio de degradação assim como do meio presente dentro dos poros. Durante a degradação da cadeia polimérica, embora sejam formados oligómeros e monómeros, estes não têm de ser necessariamente libertados no imediato; os oligómeros do PLA formam sais com propriedades diferentes das dos componentes protonados. [72]

Durante a erosão polimérica há também duas causas gerais da alteração da cristalinidade dos polímeros. Uma prende-se com o facto já referido da criação de monómeros e oligómeros cristalizados, a outra com o comportamento dos monómeros e oligómeros parcialmente cristalinos durante a erosão. Uma vez que a erosão é mais rápida na região amorfa do que na região cristalina do polímero, a cristalinidade geral das amostras em observação/estudo aumenta. Este aumento de cristalinidade pode conduzir a uma possível diminuição da biocompatibilidade de alguns implantes. [72]

A degradação hidrolítica está dependente de parâmetros que variam durante a degradação polimérica como a estrutura e peso molecular, grau de hidrofiliicidade, dimensões, concentração de grupos éster e cristalinidade do material polimérico, e da temperatura e pH do meio envolvente. E, embora se mantenham imprevisíveis as alterações no processo de erosão quando a velocidade de degradação é alterada [73], sabe-se que um compósito biodegradável vê a sua resistência perdida na designada primeira fase da biodegradação. Para colmatar esta imprevisibilidade são normalmente desenvolvidos modelos teóricos específicos para o compósito em questão que permitam fazer previsões sobre o tipo de erosão a que a matriz polimérica é sujeita²⁷.

Nesta 1ª fase de degradação, o material é visto como sendo constituído por quatro espécies [89]:

- a) uma cadeia polimérica amorfa que pode ser hidrolisada mas que não sofre difusão, e da qual, parte, pode ainda cristalizar;
- b) monómeros produtos da reacção de hidrólise e susceptíveis de sofrer difusão;
- c) cadeias poliméricas de regiões cristalinas, que são inertes (embora os grupos éster da superfície cristalina destas cadeias poliméricas possam ser hidrolisados);
- d) moléculas de água.

²⁷ Alguns pressupostos comuns a estes modelos de erosão assentam no facto de os polímeros em estudo não serem solúveis em água, a degradação hidrolítica despoleta a erosão e nenhum outro processo de degradação tem influência no processo de erosão. [73]

De modo a simplificar, no estudo de degradação dos compósitos, a distribuição de tamanhos da cadeia polimérica e dos produtos de hidrólise não será avaliada; e a penetração da água no dispositivo será assumida como sendo muito mais rápida do que outro qualquer processo cinético²⁸. [90]

Assim sendo, a difusão compete num polímero biodegradável com a degradação hidrolítica, que pode ocorrer em três níveis: matricial, do reforço, e na interface.

Baseando-nos no caso ideal de degradação por hidrólise em que a concentração da água é constante, está uniformemente dispersa em todo o volume da amostra, e em que a reacção inversa de esterificação é desprezável; a degradação polimérica pode ser descrita por uma equação de 1ª ordem relativamente à concentração de grupos éster (E) no polímero e à concentração de água (W_c), com uma constante k dependente somente da temperatura (Eq. 1).

$$\frac{dE}{dt} = -kEW_c \quad (\text{Eq. 1}).$$

Considerando V_m como a velocidade de hidrólise, e sabendo que a concentração de grupos éster é inversa ao peso molecular médio em número no instante t (M_{nt}) (Eq. 2) podemos inferir a (Eq. 3); útil para nos dar a noção da dependência da velocidade de degradação das fibras biodegradáveis em função do seu diâmetro - parâmetro previamente conhecido para cada amostra,

$$E = \frac{1}{M_{nt}} \quad (\text{Eq. 2}),$$

$$\frac{dE}{dt} = -V_m W_c \quad (\text{Eq. 3}).$$

Podemos deste modo obter uma equação que nos dá a evolução do peso molecular do material em função do tempo (Eq. 4) com base no peso molecular médio em número do material no instante inicial (M_{n0}).

$$M_{nt} = M_{n0}e^{-kW_t} \quad (\text{Eq.4}).^{[91]}$$

O verdadeiro comportamento de degradação hidrolítica dos materiais poliméricos deriva deste caso ideal em aspectos químicos, como a variação da concentração de água ou a cisão de cadeias não ao acaso, e em aspectos físicos, como o controlo cinético pela difusão, deterioração osmótica, etc.

²⁸ Nos polímeros hidrofóbicos este princípio também é assumido, desde que a biodegradação não seja controlada pela difusão hidrolítica. No entanto, se esse não for o caso, e a biodegradação for realmente controlada pela lenta penetração da água no dispositivo, será a erosão na interface a dominar a biodegradação. [89]

Assumindo o caso em que a difusão controla a cinética da hidrólise, tendo em conta a (Eq. 1), podemos definir um tempo característico da hidrólise, τ_H :

$$\tau_H = \frac{1}{kE} = \frac{1}{V_m} \quad (\text{Eq.5}).$$

No entanto, para que a água possa reagir com um grupo éster é necessário que haja difusão da água para este grupo. Fazendo D o coeficiente de difusão da água no polímero e L a espessura da amostra polimérica define-se τ_D como o tempo característico de difusão:

$$\tau_D = \frac{L^2}{D} \quad (\text{Eq.6}).$$

As condições críticas são definidas para $\tau_D = \tau_H$.

Quando $\tau_H \gg \tau_D$, a água difunde até ao núcleo do material antes de começar a reacção, e a degradação é homogénea (caso dos poliésteres alifáticos); quando o inverso acontece, $\tau_H \ll \tau_D$, a água reage totalmente na camada superficial chegando raramente ao núcleo do material, e a degradação é heterogénea.

Das duas últimas equações, (Eq. 5) e (Eq. 6), tem-se a espessura crítica L_c , na qual estes comportamentos variam.

$$L_c = \sqrt{\frac{D}{V_m}} \quad (\text{Eq.7})^{[91]}.$$

Assim, se a dimensão da matriz polimérica for superior a esta espessura crítica, a matriz sofre erosão superficial; e se, pelo contrário, a matriz tiver espessura inferior a L_c , sobre erosão no seio do material. Este valor de espessura crítica é uma característica individual de cada polímero e podem ser vistos na figura seguinte alguns valores retirados da literatura para polímeros degradáveis. Nesta são apresentados valores de espessura desde 10^{-4} a 10m para polímeros poli-anidros a poliamidas, respectivamente.

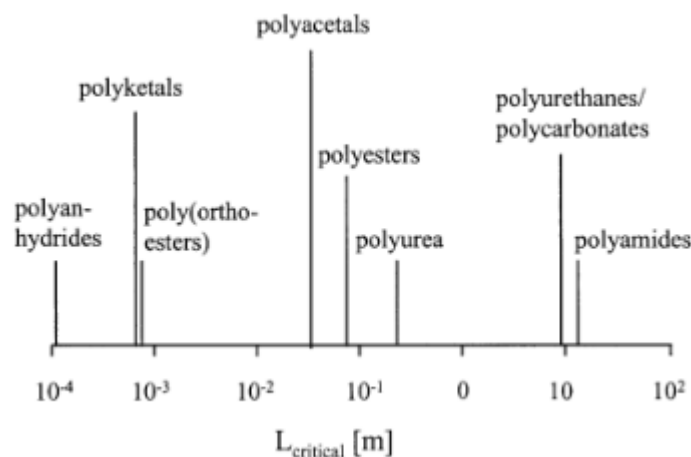


Figura 23 - Valores de espessura crítica, L_c (m), do dispositivo acima do qual este sofre erosão superficial. ^[73]

1.2.3.2 Polímeros naturais

Dos polímeros naturais podem-se destacar-se os componentes da MEC - colagénio, elastina e proteoglicanos, muitas vezes referidos como os materiais biológicos. ^[30] A MEC pode ser utilizada como material biológico para a regeneração de tecidos e órgãos destruídos pois uma vez comparando com os materiais poliméricos sintéticos, os componentes da MEC são de ocorrência natural, não-tóxicos, e compatíveis com as células e tecidos do hospedeiro e ainda coopera com a manutenção e coordenação das funções celulares. Particularmente, a matriz de colagénio tem sido utilizada na construção de suportes em modelos experimentais para a reconstrução de variados tecidos como o fígado, pâncreas, ossos, e vasos sanguíneos. ^[5]

O colagénio/gelatina sendo a proteína mais abundante no corpo humano pode ser encontrada em tecidos conjuntivos como o tecido subcutâneo, ossos e em algumas camadas dos vasos sanguíneos, vias respiratórias, esófago, estômago e intestinos. ^[30] Embora a utilização do mesmo derive de tecidos conjuntivos e duros ^[18] de fontes xenogénicas (maioritariamente de porco ou pele de vaca), as presentes técnicas de purificação permitem a sua utilização como suporte mecânico através da eliminação dos telopéptidos imunogénicos ^[2] - a actual maior causa de resposta imunitária à sua implantação, apesar de não poder ser descurada na sua utilização, a possibilidade de transmissões microbianas resultantes da xeno-transplantação ^[92] (por exemplo a doença das vacas loucas ^[18]). Uma vez que a matriz de colagénio pode ser considerada como o promotor da ligação célula/tecidos ^[38] promovendo a adesão celular, proliferação e migração, os suportes desenvolvidos com base em colagénio melhoram a regeneração dos órgãos e tecidos eventualmente danificados ^[30]. Tal como qualquer outro material polimérico, a matriz de colagénio pode ser desenhada e fabricada na forma e tamanho desejados ^[5], mantém as suas características biológicas e mecânicas, e apresenta uma biocompatibilidade elevada ^[68], é por estas razões, considerada um material adequado para a construção de estruturas de suporte; sendo sempre preferível o colagénio nativo ao produzido *in vitro*. ^[30]

A elastina, quando madura²⁹, é uma proteína insolúvel e hidrofóbica, formada pela reticulação do seu precursor tropoelastina, e abundantemente presente em fibras elásticas e lamina. ^[68] Estas têm uma função importante na constituição de tecidos e órgãos, assim como na manutenção da estabilidade dos mesmos. A lamina elástica contribui também para a elasticidade dos tecidos moles³⁰ e tem um papel preponderante na regulação da morfogénese³¹ e patogénese³² arterial - inibe a proliferação e migração das células de músculos moles, prevenido deste modo a hiperplasia sob condições fisiológicas. Para além do já referido, a lâmina elástica apresenta ainda efeitos anti-inflamatório e inibe a adesão, activação e transmigração dos leucócitos relativamente à matriz de colagénio. ^[30] Assim

²⁹ Fibras mais espessas, na última fase de formação de fibras elásticas.

³⁰ São encontrados nas paredes de todos os órgãos ocos do corpo (com excepção do coração). A sua contracção reduz o tamanho dessas estruturas. Estes músculos são utilizados para regular o fluxo de sangue nas artérias, para realizar os movimentos peristálticos no intestino, etc. A contracção dos músculos moles não é feita, em geral, sob controlo voluntário. ^[93]

³¹ Constituição e evolução da forma e da estrutura.

³² Desenvolvimento e origem das doenças e dos mecanismos que as provocaram.

sendo, a incorporação da elastina em biomateriais torna-se especialmente significativa quando a sua elasticidade e efeitos biológicos podem ser explorados. No entanto, podem ocorrer algumas dificuldades quando se utiliza a elastina como um biomaterial; uma delas é a calcificação, um fenómeno pouco conhecido na ciência biomaterial, que ocorre frequentemente em implantes proteicos cardiovasculares. Esta calcificação pode no entanto ser prevenida ou reduzida com tratamentos com cloreto de alumínio ou etanol/EDTA, presença de glicosaminoglicanos ou factor de crescimento de fibroblastos, co-implantação com osteoclastos, entre outros. ^[94]

Os glicosaminoglicanos, polissacarídeos lineares, são compostos por repetidas unidades de dissacarídeos presentes em tecidos conectivos dos mamíferos como a cartilagem e vasos sanguíneos. São caracterizados pela alta densidade de cargas negativas, altas hidrofobicidade e solubilidade em água, e baixa cristalinidade. Uma vez que são moléculas naturais, são biocompatíveis e não provocam reacções tóxicas e inflamatórias significativas. Também podem ser degradadas em diferentes velocidades, uma vez que a razão de degradação depende da sua composição química. ^[30]

Destacam-se ainda o fibrinogénio/fibrina - polímero natural com origem no sangue animal ^[95, 96] e o maior constituinte dos coágulos sanguíneos formado por polimerização do monómero da fibrina, seguido de reticulação enzimática ^[97] - (ponto 1.7.2 Lesões traumáticas e dados históricos de soluções reparadoras - página 126); o alginato ((C₆H₈O₆)_n), extraído de algas marinhas castanhas, forma reticulações na presença de catiões divalentes (maioritariamente Ca²⁺ e Mn²⁺ ^[30]) para formar um hidrogel láctico aberto. ^[2] Este gel tem a característica de possuir uma malha grande que permite a difusão fácil de macromoléculas, funcionando como suporte mecânico ^[98]; e o ácido hialurónico - de origem animal, liga-se especificamente a proteínas da MEC e à superfície celular, e a sua esterificação parcial aumenta a sua estabilidade ^[2] tornando esta molécula particularmente adequada para a libertação controlada de peptídeos ou proteínas contribuindo para um suporte mecânico ^[99].

Também a celulose, um polissacarídeo linear ^[18] sintetizado por diferentes microrganismos, algas, fungos e bactérias, entre os quais a bactéria *Acetobacter xylinu* - frequentemente encontrada em frutas, vegetais e bebidas alcoólicas, tem sido utilizada em aplicações da ET. Em cultura esta bactéria pode produzir uma rede de fibras de celulose susceptíveis de poderem ser posteriormente adaptadas às formas desejadas das estruturas de suporte da ET. A celulose apresenta baixa solubilidade em água e, deste modo, uma baixa razão de degradação quando implantada em tecido animal. Um decréscimo na cristalinidade e hidrofobicidade da celulose, geralmente resulta num aumento da sua biodegradabilidade. ^[68] Dada à sua composição química, a celulose bacteriana tem uma elevada biocompatibilidade e não toxicidade para com o hospedeiro. Acrescentando ainda o facto, desta ser um material altamente moldável pelo que pode ser utilizada para produzir estruturas de suporte nas mais diversas formas. ^[30] O amido é outro polímero natural muito utilizado em estruturas na ET. ^[18] Pode ser encontrado em todas as sementes de plantas e em alguns tubérculos, e ao estabelecer ligações químicas com o EVOH (*ethylene vinyl alcohol*) e com o acetato de

celulose, cria matrizes possíveis de ser utilizadas como estruturas de suporte na ET ou substratos de sedimentação e cultura celular; e pode ainda ser reforçado pela mistura com HA, de modo a conseguir-se um material compósito. Este tipo de materiais não tem grande influência no crescimento e funcionalidade das células em cultura, e, embora o amido isoladamente não seja mecanicamente forte, a adição de componentes de reforço podem melhorar significativamente esta propriedade. Os materiais com base em amido são normalmente não-tóxicos e biocompatíveis. ^[30]

1.2.3.3 Polímeros sintéticos

Os polímeros sintéticos possuem características únicas adaptáveis às aplicações biológicas, podem igualmente ser moldados no sentido de alterar as suas propriedades químicas e mecânicas, serem processados em diferentes formas e em quantidades uniformes. Adicionalmente, estes materiais são leves, fortes e inertes. ^[17]

Alguns exemplos de polímeros sintéticos incluem os polímeros não degradáveis como o polietileno (PE - *polyethylene*) ^[9], o policloreto de vinilo (PVC - *poly(vinyl chloride)*), Dacron (Polietileno teraftalato - PET *Poly(ethylene terephthalate)*) ^[9], nylon, Teflon (Politetrafluoretileno - PTFE *Polytetrafluoroethylene*) ^[16] e o silicone (SR - *silicon rubber*). ^[30] Mais pormenorizadamente o PE, polímero composto por monómeros de etileno, tem a vantagem de poder ser sintetizado em materiais poliméricos de diferentes densidades. Isto é, se o objectivo for obter um material resistente e flexível devemos utilizar um material de PE de baixa densidade (0,91 - 0,93 g/cm³) ou de alta densidade (0,945 - 0,96 g/cm³) para um material ainda mais resistente. ^[30]

O Dacron tem como características principais a sua hidrofobicidade, resistência à hidrólise e alta resistência e tenacidade. No campo da ET, é importante para os compostos onde está presente a sua capacidade de induzir reacções inflamatórias e a trombogénese ³³. ^[30]

Por sua vez o Teflon, caracterizado pela sua alta percentagem de cristalização (cerca de 90% das moléculas), pela sua relativamente alta densidade (~2 g/cm³), baixa tensão de superfície em água e fricção se comparado a outro tipo de polímeros, quando utilizado em enxertos é capaz de manter durante anos, após implantação, as suas propriedades mecânicas. Adicionalmente tem a vantagem de conseguir estimular reacções inflamatórias e a trombogénese. ^[30]

Os polímeros sintéticos biodegradáveis, quando utilizados não necessitam de ser retirados cirurgicamente se deixarem de o ser, podem ser melhor controlados em termos de propriedades físico-químicas e mecânicas ^[30], em princípio, na cinética de libertação de moléculas e células específicas, quando comparados com os polímeros naturais. No entanto

³³ Formação do coágulo sanguíneo durante o processo de coagulação. ^[15]

podem causar problemas se os seus produtos de degradação forem eventualmente tóxicos ^[69] e, na sua maioria, induzir respostas imunitárias/inflamatórias após implantação. Outra vantagem do uso de polímeros sintéticos é a redução do risco de potenciais complicações perigosas a nível biológico, associadas aos polímeros naturais. ^[2] Dentro dos mais populares e importantes polímeros biodegradáveis, alguns deles utilizados em aplicações clínicas desde os anos 70, são os homo e heteropolímeros do ácido poliláctico (PLA - *polylactic acid*) ^[16], a policaprolactona (PCL - *polycaprolactone*), óxido polietileno (PEO - *polyethylene oxide*), poli(3-hidroxibutirato) (PHB - *poly(3-hydroxybutyrate)*), polihidroxivalerato (PHV - *polyhydroxyvalerate*), o ácido poliglicólico (PGA - *polyglycolic acid*) ^[16], hidrogéis de álcool polivinílico (PVA - *polyvinyl alcohol*) e os seus compósitos com o polietileno glicol (PEG - *polyethylene glycol*), polifosfatos, esponjas gelatinosas e proteínas não-colagenosas. ^[2, 17, 100] Estes têm sido aplicados em desenvolvimentos biomédicos em duas áreas primordiais: cicatrização de ferimentos e sistemas de libertação controlada de fármacos.

Os poliésteres alifáticos lineares, alguns mencionados anteriormente como o PLA, o poliglicol (PG), PGA, PCL, e PHB, têm sido exaustivamente utilizados no campo biomédico pela sua estrutura, propriedades materiais, compatibilidade biológica, por serem de fonte independente dos produtos petroquímicos e pela sua não-toxicidade, nomeadamente em termos de reparação e regeneração de tecidos. Isto porque, desde os anos 90, a síntese e caracterização dos polímeros biodegradáveis tem vindo a aumentar as áreas de abrangência da ET. ^[30]

No que diz respeito ao PGA, este consegue ser sintetizado a partir do ácido glicólico e apresenta como principais propriedades para a utilização em engenharia biomédica o facto de ser biocompatível, biodegradável, bioreabsorvível, de processamento fácil, com boas propriedades mecânicas, e aprovado actualmente pelas autoridades de saúde. ^[18] No entanto, o seu curto tempo de reabsorção é uma desvantagem em algumas aplicações. ^[16]

Outro tipo de poliéster utilizado em aplicações e desenvolvimentos biomédicos é o PCL. Estes materiais têm normalmente uma T_f na ordem dos 60°C e T_g de $\sim -60^\circ\text{C}$; mecanicamente podem ser deformados a uma extensão de 0,3 (30%) com uma tensão de rotura equivalente de aproximadamente 11 MPa, e o seu módulo elástico é cerca de 0,3 GPa. Também o PCL pode ser degradado por hidrólise. ^[30]

O PHB pode ser gerado por fermentação natural ou sintetizado pela planta do linho geneticamente modificada com construções genéticas específicas para a síntese do PHB. A degradação deste material amorfo, com uma $T_g \approx -40^\circ\text{C}$ e $T_f \approx 160^\circ\text{C}$, é induzida por hidrólise. A sua extensão após rotura é de 0,15 (15%). ^[30]

1.2.3.3.1 PLA

1.2.3.3.1.1 Propriedades

O ácido láctico é um ácido orgânico produzido por animais, em plantas e pelos microrganismos na natureza. ^[101] Nos mamíferos é produzido nos seus músculos durante a glicogenólise³⁴ em regime anaeróbio e está envolvido no ciclo de *Kreb's*; mas é facilmente preparado com alto rendimento através da fermentação de carboidratos do melaço, da fécula da batata ou da glicose do milho. ^[102] Também pode ser derivado de intermediários com origem em materiais renováveis (ex.: acetaldeído, etanol), ou de químicos derivados do carvão (ex.: acetileno) ou óleo (ex.: etileno). ^[101] Actualmente a forma mais popular de obter é por fermentação, na qual a glicose de milho é convertida em ácido láctico por fermentação bacteriana em que é utilizada uma estirpe otimizada da *Lactobacillus*. ^[102] Este tipo de produção tem como vantagens a capacidade de se produzir PLA a partir de fontes renováveis agrícolas, desta consumir dióxido de carbono e assegurar um gasto de energia económico; do PLA ser reciclável e compostável, melhorar a economia agrícola, e de as suas propriedades mecânicas e físicas poderem ser manipuladas através da sua arquitectura. Na figura seguinte é visível um modelo de ciclo de vida para os polímeros com base PLA. ^[103] Deste são constituintes as fases de produção, purificação e condensação; os produtos resultantes das fases anteriores assim como a sua posterior reciclagem e compostagem.

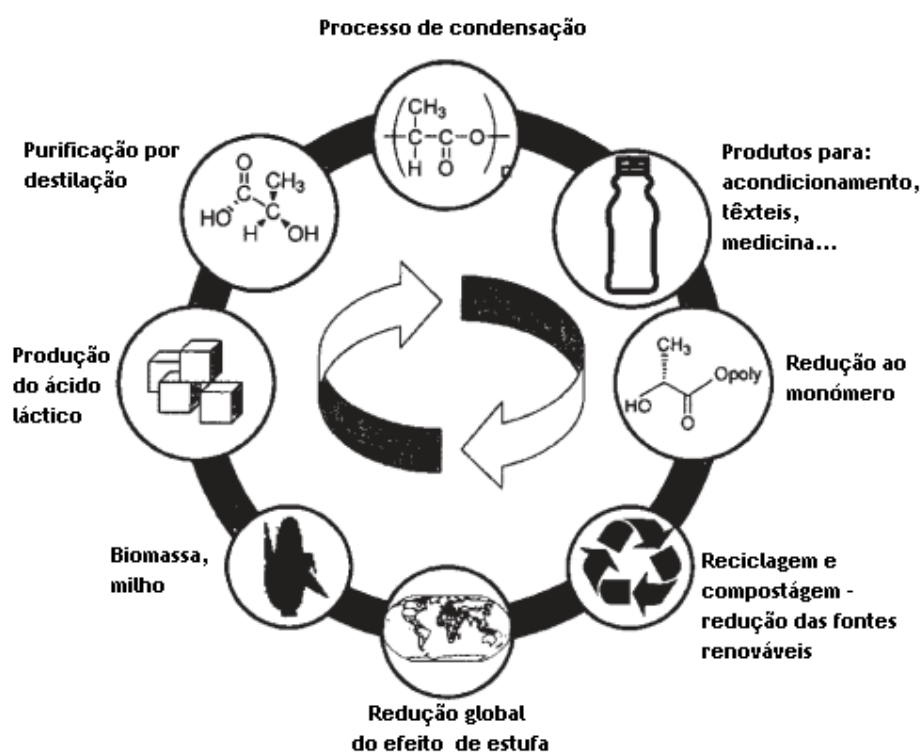


Figura 24 - Ciclo de vida dos polímeros com base PLA. Adaptado de ^[103]

³⁴ Transformação do glicogénio hepático ou muscular em glicose, sob acção de enzimas. ^[15]

É uma das moléculas mais pequena activa opticamente³⁵, que pode ter os estereoisómeros³⁶ L(S) ou D(R) e a mistura racémica³⁷ (rac), visíveis em (a), (b) e (c) da Figura 25, respectivamente. ^[101] O isómero L roda o plano da luz polarizada no sentido horário, o isómero D roda-o no sentido anti-horário, e a mistura racémica L,D é opticamente inactiva. ^[102] O estereoisómero L é o presente nos sistemas mamíferos, ambos os estereoisómeros, L e D, podem ser encontrados em sistemas bacterianos ^[101], na fermentação o produto é exclusivamente PLA, e da produção proveniente da petroquímica resulta a mistura racémica ^[105].

Todas as propriedades dos polímeros com base em PLA estão dependentes da razão e da distribuição dos dois estereoisómeros; ^[101] e a proporção e a sequência das unidades L e D do ácido láctico no polímero final, são estabelecidas através do controlo do tempo de residência e temperatura em combinação com o tipo de catalisador utilizado e a sua concentração. O isómero L do ácido láctico confere polímeros com alta resistência mecânica, mas é a quantidade do isómero D que tem influência dominante na cristalização e propriedades mecânicas. ^[102]

Como todos os ácido láctico de proveniência biológica, o ácido láctico produzido por fermentação bacteriana é exclusivamente o isómero L (>99,5%) ^[105], ou seja, esta é mais uma das razões que favorece a produção de ácido láctico a partir de fontes renováveis, em oposição aos produtos petroquímicos ^[106]. Actualmente, *Cargill Dow Polymers* opera a maior unidade do mundo de produção PLA. ^[102]

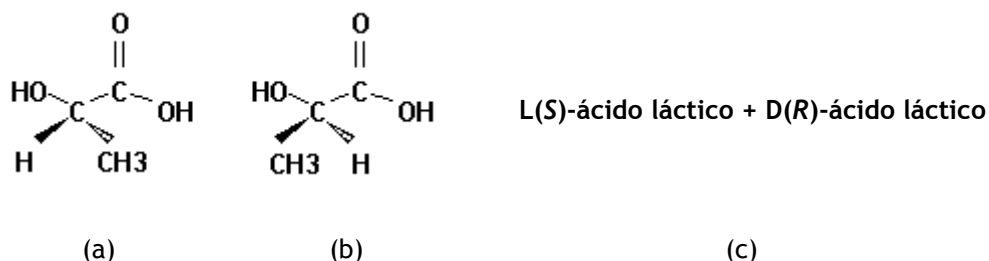


Figura 25 - Estereoisómeros do ácido láctico.

Todos os poliésteres alifáticos lineares, como o PLA, são cadeias poliméricas nas quais os seus monómeros estão ligados pelo grupo éster (R-COOR', onde R e R' são radicais orgânicos); e todos os polilácticos podem ser sintetizados a partir dos ácidos lácticos - pelo método de polimerização por condensação directa, que envolve solventes sob alto vácuo ^[102], quando são

³⁵ A actividade óptica é uma propriedade de determinados compostos químicos que, tanto no estado sólido como em solução, desviam o plano da luz polarizada, desvio esse que tem um valor característico para cada composto (ângulo de desvio). Todos os compostos opticamente activos existem sob a forma de dois isómeros denominados isómeros ópticos ou enantiómeros, dos quais um faz rodar o plano da luz polarizada para a direita (+ ou D), denominando-se de forma dextrógera e o outro para a esquerda (- ou L), denominando-se de forma levógera. ^[104]

³⁶ Isómeros (mesma fórmula molecular) com diferente estereoquímica - arranjo espacial.

³⁷ Mistura racémica ou racemato - mistura em quantidades equimolares de dois enantiómeros (objecto | imagem) sem actividade óptica (se os dois enantiómeros estiverem presentes em igual quantidade numa dada amostra, ao realizarem-se determinações de actividade óptica, o plano da luz polarizada não vai rodar, pois o efeito provocado por um enantiómero anula o efeito do outro).

de baixo peso molecular 1-5 kDa^[103], 2-10 kDa^[102]), e por destilação azeotrópica (há remoção da água da condensação contínua) ou polimerização de adição através da abertura do anel e formação do dímero cíclico intermediário, livre de solventes^[102], para altos pesos moleculares (>100 kDa^[102, 103]). Na condensação directa (Figura 26), é utilizado um solvente sob alto vácuo e temperatura para remoção da água produzida na condensação. O polímero resultante é um material intermediário de baixo peso molecular que pode ser utilizado desse modo, assim como pode ser utilizado conjugado com isocianatos, epóxidos ou peróxidos para produzir outras gamas de pesos moleculares.^[102] A segunda categoria mencionada, é a comumente mais utilizada pela possibilidade de haver um controlo preciso da química dos polímeros resultantes e assim permitir um melhor controlo da variação das propriedades do mesmo, preenchendo por completo as necessidades de aplicação. A polimerização por abertura do anel (visível na Figura 26) inclui a policondensação do ácido láctico seguido pela despolimerização controlada do dímero cíclico desidratado (3,6-dimetil-1,4-dioxano-2,5-diona), que pode ser posteriormente polimerizado por abertura do anel em polímeros de alta massa molecular.^[101]

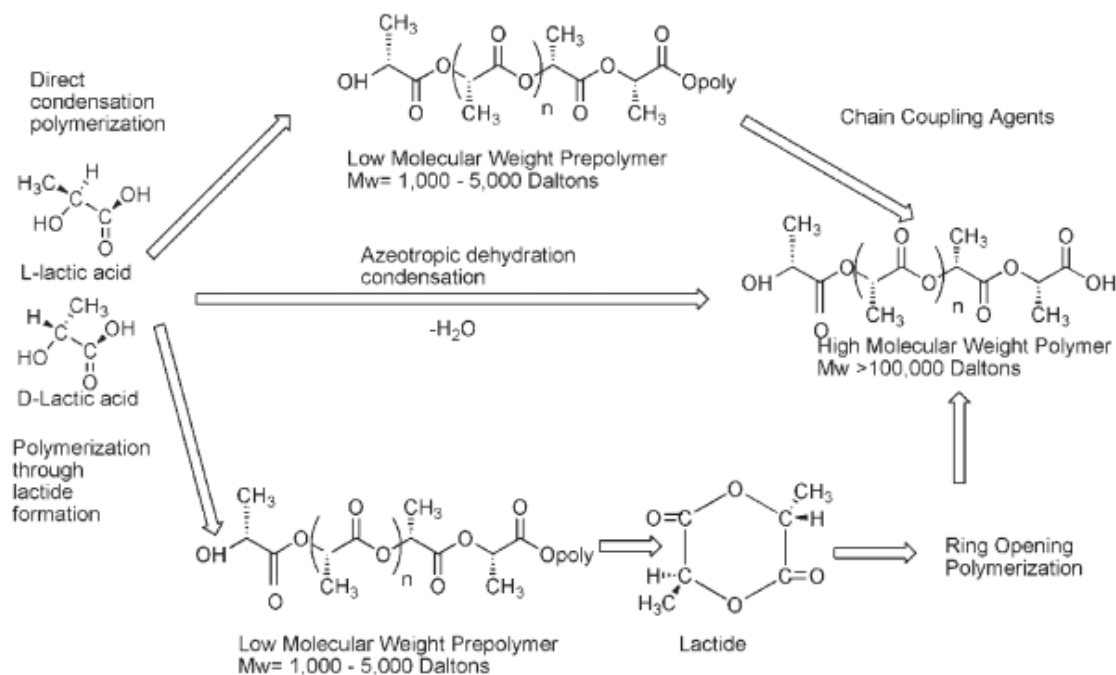


Figura 26 - Processos de obtenção do PLA de baixo e alto peso molecular.^[105]

Devido aos dois possíveis estereoisómeros do ácido láctico, o ácido láctico opticamente activo correspondente tem duas versões: (D,D) - ácido láctico e (L,L) - ácido láctico (Figura 27 (a) e (b), respectivamente)³⁸. Adicionalmente poderá formar-se o (D,L) - ácido láctico ou meso-ácido láctico³⁹ (Figura 27 (c)).

³⁸ Também neste caso se pode formar a mistura racémica, não opticamente activa, do D,D-ácido láctico com o L,L-ácido láctico.

³⁹ Sendo aquiral, um composto meso também não roda o plano da luz polarizada, pelo que também não exhibe actividade óptica.

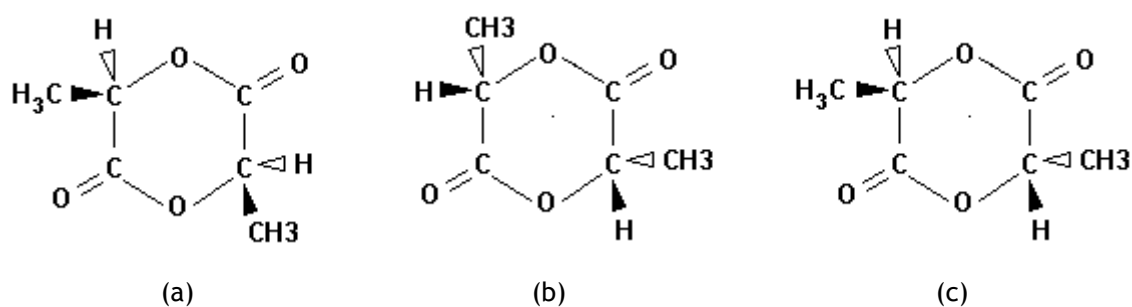


Figura 27 - Estereoisómeros do ácido láctico opticamente activo.

Uma vez que o ácido láctico é uma molécula quiral⁴⁰, a sua estereoquímica pode ser projectada para requisitos específicos. E é a sua estereorregularidade que faz do PLA um polímero altamente cristalino ($\approx 40\%$ ^[102]). ^[107] O homopolímero⁴¹ de um estereoisómero do ácido láctico (L ou D) é um polímero semi-cristalino (PLLA e PDLA, respectivamente); e a polimerização da mistura racémica e meso, conduz à formação de polímeros amorfos. ^[17] Outras combinações de diferentes estereoisómeros são designadas copolímeros (co) do ácido láctico e variam na sua percentagem de cristalinidade. Os materiais totalmente amorfos são conseguidos através da inclusão de elevados conteúdos do isómero D ($>20\%$ ^[102]), enquanto os materiais altamente cristalinos são obtidos quando o teor do isómero L na sua composição é superior a cerca de 90% ^[108]. Assim sendo, o PLLA é considerado um polímero cristalino com aproximadamente 25-40% de cristalinidade para 94 e 98% do isómero L, respectivamente. ^[109]

Podem ainda ser incorporados ao PLA outros monómeros formados igualmente por abertura de anel. Os mais comumente utilizados são o glicóide (GA) e o ϵ -caprolactona (CL). ^[102] O processamento e capacidade de processamento dos polímeros com base ácido láctico estão interligados a uma série de outras propriedades dos materiais. Quando estes são produzidos por fusão, este processo é dependente da estabilidade térmica e comportamentos de fusão e cristalização do polímero em questão; por solução ou mistura, o processamento está dependente de parâmetros de solubilidade dos componentes do sistema polímero(s)/solvente(s). ^[101]

Propriedades termofísicas

As propriedades térmicas do PLA são importantes critérios em determinadas aplicações; e podem ser determinadas por:

- i. calorimetria diferencial de varrimento (DSC - *differential scanning calorimetry*, que mede a energia calorífica absorvida ou libertada durante o aquecimento ou arrefecimento de uma substância, em relação a uma amostra de referência. Permite obter informações referentes a alterações de propriedades químicas e/ou

⁴⁰ Não sobreponível à sua própria imagem no espelho.

⁴¹ Composto pela repetição de um único monómero.

físicas como por exemplo T_f , T_c , T_g , grau de cristalinidade de um polímero, diagramas de fase, entalpias de transição de fase e de reacção, estabilidade térmica e oxidativa, grau de pureza e cinética de reacções ^[110], etc.),

Um DSC típico para o PLA pode ser visto na Figura 28. O primeiro pico, entre 60-70°C é referente a sua T_g , o segundo pico, entre 150-160°C é alusivo ao seu comportamento de fusão. ^[102]

- ii. análises termogravimétricas (TGA - *thermogravimetric analysis*, técnica utilizada para medição de diferenças de massa durante aquecimento e envelhecimento a determinada temperatura ^[111]), e
- iii. análises mecânicas dinâmicas (DMA - *dynamic mechanical analysis*) que mede a resposta mecânica sob uma tensão periódica (frequência) durante o aquecimento ou arrefecimento). ^[102]

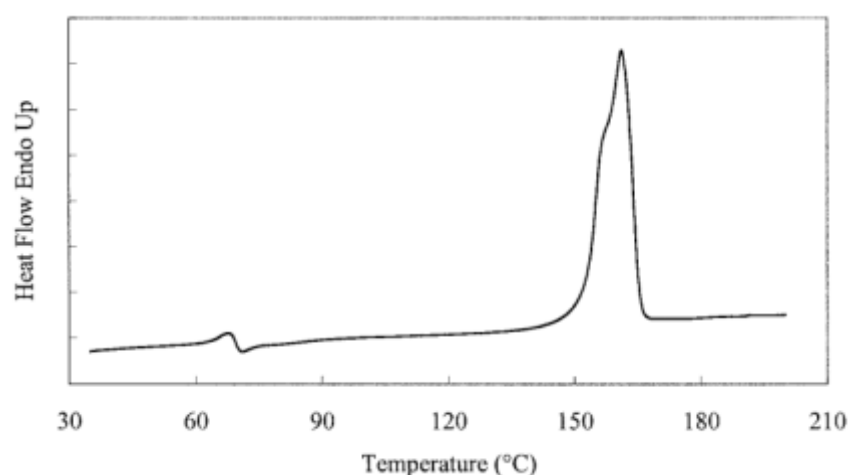


Figura 28 - Termograma DSC de uma fibra de PLA com a razão altura/comprimento=6. ^[112]

Conforme enunciado, as propriedades térmicas de um material poliláctico podem ser descritas em termos de T_f e T_g ; que para o PLA puro semi-cristalino têm tipicamente os valores ≈ 130 ^[103] - 180 °C ^[102, 103] e ≈ 50 - 80 °C ^[103], respectivamente; e para o PLLA $T_f \approx 175$ °C e $T_g \approx 60$ - 65 °C. ^[17] Estas dependem fortemente de peso molecular e do grau de cristalinidade ou pureza óptica do polímero, como é possível verificar na Figura 29 e Tabela 6. T_f é função da pureza óptica do copolímero, sendo o valor máximo ≈ 180 °C para o PLLA e PDLA puros; e T_g aumenta com o peso molecular - aumenta de 54,6, 56 e 60,2-63 °C para 50, 80 e 100% de conteúdo L no copolímero de PLA, respectivamente. Os mesmos conteúdos de D não correspondem aos mesmos valores de T_g referidos; na verdade, são menores pela diferença de cristalinidade entre os dois polímeros. De um modo geral, T_g pode ser representada pela equação de *Flory-Fox*:

$$T_g = T_g^\infty - \frac{k}{M_w} \quad (\text{Eq. 8})$$

onde (M_w) é o peso molecular médio em massa, T_g^∞ é a temperatura de transição vítrea para o peso molecular médio em massa infinito e k é a constante representativa do excesso de volume livre dos grupos finais das cadeias poliméricas ^[103]. (Jamshidi *et al.* ^[103] atribui para o PLLA de baixa cristalinidade os valores $T_g^\infty=58$ °C e $K=5,50 \times 10^4$; e $T_g^\infty=57$ °C e $K=7,30 \times 10^4$ para PDLLA amorfo ^[103]).

T_g depende igualmente da história térmica do polímero, ou seja, um arrefecimento brusco desde T_f resulta num polímero altamente amorfo; e polímeros PLA com baixa cristalinidade estão sujeitos a um rápido envelhecimento (dias) sob condições ambientais. ^[109, 113]

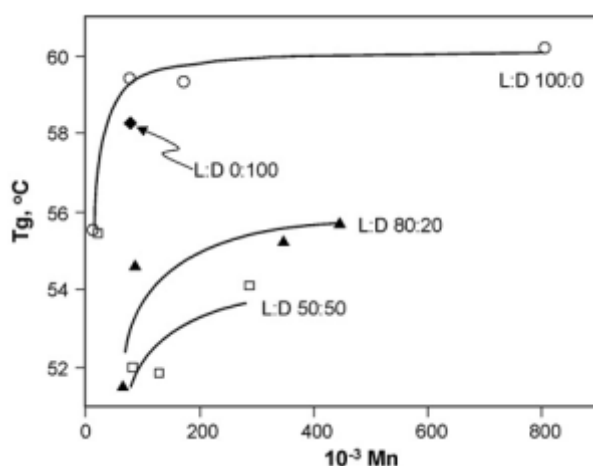


Figura 29 - Temperatura de transição vítrea do PLA (T_g , °C) para diferentes composições do isómero L, em função do seu peso molecular em número (M_n). ^[108]

Tabela 6 - Temperaturas de transição vítrea (T_g , °C) e fusão (T_f , °C) para copolímeros de PLA com diferentes razões dos isómeros L e D, L (ou diferentes % de cristalização). Adaptado de ^[108]

Copolímero	T_g (°C)	T_f (°C)
100:0(L:D,L)PLA	63	178
95:5(L:D,L)PLA	59	164
90:10(L:D,L)PLA	56	150
85:15(L:D,L)PLA	56	140
80:20(L:D,L)PLA	56	125

A entalpia de fusão estimada para o PLA 100% de cristalino (ΔH_f^0) é 93 J/g ^[101] (embora também se encontrem na literatura valores mais elevados - até 146 kJ/mol ^[102]). O grau de cristalinidade está dependente da massa molar, história térmica e pureza do polímero e pode ser calculado através da equação:

$$\text{cristalização (\%)} = \frac{\Delta H_f - \Delta H_c}{93,1} \times 100, \quad (\text{Eq. 9})$$

onde ΔH_f é a entalpia de fusão, ΔH_c a entalpia de cristalização, e 93,1 J/g é ΔH_f^0 para homopolímeros PLLA e PDLA. ^[108]

Estes valores de entalpias podem ser reduzidos pela co-polimerização aleatória do PLA com outros polímeros, conduzindo deste modo à introdução de unidades perturbadoras dos segmentos cristalinos do PLA. Para a cristalização ocorrer, é necessário haver pelo menos 72-75% de pureza óptica. ^[101]

Na Tabela 7 encontram-se valores de algumas características físicas do PLLA, entre eles a viscosidade intrínseca (η_i) dependente do tipo de PLA, do solvente utilizado, e da temperatura da solução.

Tabela 7 - Propriedades do PLLA. Adaptado de ^[39]

Propriedade	Condição	Símbolo	Valor	Unidade
Grau de Cristalinidade	PLLA	X_c	0-37	%
Densidade	Amorfo	ρ	1,248	g/cm ³
	Semi-cristalino		1,29	g/cm ³
Calor de fusão	PLLA completamente cristalino	ΔH_f^0	146	kJ/mol
	PLLA fibra extrudida	ΔH_f	2,5	kJ/mol
	PLLA fibra após moldação a quente	ΔH_f	6,4	kJ/mol
Calor específico mássico	PLLA com $M_v=5300$	c'	0,6	J/K/g
	PLLA com $M_v=(0,2-6,91)\times 10^5$		0,54	J/K/g
Temperatura de transição vítrea		T_g	53-64	°C
Temperatura de fusão		T_f	145-186	°C
Temperatura de decomposição			227-255	°C
Inchamento em água	Padrão pH 7		2	%
Viscosidade intrínseca em clorofórmio a 25°C		η_i	3,8-8,2	dL/g

Solubilidade e miscibilidade

Também a solubilidade dos polímeros com base ácido láctico é altamente dependente da massa molar, do grau de cristalinidade, e de outras unidades de monómeros presentes no polímero. Uns bons solventes para os enantiómeros de PLA puro são os solventes orgânicos clorados ou fluorados, os dioxanos, dioxolanos e furanos. Polímeros rac e meso-ácido láctico são também solúveis em solventes orgânicos como a acetona, piridina, lactato de etilo, tetrahidrofurano, xileno, acetato de etilo, dimetilsulfóxido N,N-dimetilformamida, e metiletilcetona. Os não-solventes típicos para os polímeros base ácido láctico são a água, álcool (metanol, etanol, propileno glicol) e hidrocarbonetos (com o hexano, heptano, etc.). ^[101]

A solubilidade dos copolímeros do ácido láctico está fracamente documentada, mas sabe-se que a composição e natureza do solvente têm um papel fulcral no desenvolvimento morfológico do polímero final e nas suas propriedades mecânicas.

Tabela 8 - Solubilidade de alguns copolímeros com base ácido láctico em alguns solventes orgânicos. ^[101]

Solvente	Polímero						
	PLLA	P(<i>rac</i> -LA)	PLLA+GA	PLLA+CL			
Isopropil eter					Solúvel		
Cicloexano					Inchamento		
Xileno					Não solúvel		
Acetato de etil							
Tetrahidrofurano							
Clorofórmio							
Metiletilcetona							
Furano							
Acetona							
1,4-dioxano							
Etil lactato							
1,3-dioxolano							
Piridino							
Dimetilsulfoxido							
N,N-dimetilformamido							
Etanol							

A mistura de polímeros é um possível método de obter propriedades que os polímeros individualmente não possuem, e tem sido frequentemente usada para os polímeros com base ácido láctico. A mistura do PLA com outros polímeros oferece a possibilidade de serem alterados parâmetros como por exemplo a velocidade de degradação, desempenho biológico, características de permeabilidade, morfologia, perfis de liberação de fármacos, e propriedades térmicas e mecânicas. ^[102] No sentido de serem alcançadas as propriedades desejadas os polímeros devem, em geral, ser miscíveis para que não ocorra uma fase de separação. As misturas imiscíveis são preferíveis quando a resiliência⁴² é um requisito desejado. Muitas das misturas de PLA estudadas são imiscíveis ou somente parcialmente miscíveis e podem exigir algum tipo de compatibilizador de modo a torná-los miscíveis, como por exemplo os copolímeros PLA-co-PCL e PLA-co-PGA. ^[101]

Propriedades mecânicas

As propriedades mecânicas reflectem os efeitos cumulativos do peso molecular, orientação da cadeia molecular e cristalinidade desenvolvidas durante o processo de fabrico do polímero; no entanto, embora os valores dos polímeros ramificados sejam ligeiramente superiores aos do mesmo material linear, a arquitectura das ramificações não tem grande influência nestas propriedades. ^[102] Assim, mecanicamente, os polímeros de ácido láctico podem variar na gama de plásticos macios e elásticos a materiais duros e de elevada resistência. ^[101] Por isso mesmo apresentam um módulo de elasticidade na gama 1,2 GPa ^[30] a

⁴² Capacidade de absorver energia no domínio elástico. ^[114]

4,8 GPa^[17], uma tensão de cedência de 28^[30]-70^[101] MPa, módulo de flexão de 5 GPa^[101], resistência à flexão de 100 MPa^[101], e uma deformação máxima na região não linear de 2-6%^[30] do seu comprimento original antes de atingir o seu ponto de fractura.

O módulo de elasticidade e tensão de cedência do PLLA aumentam num factor de 2 quando a massa molar média varia de 50 a 100 kDa, porém um acrescento adicional de massa até 300 kDa parece deixar de influenciar significativamente as propriedades do polímero.^[101]

A tabela seguinte resume alguns valores de propriedades mecânicas para o PLLA obtido por injeção a 195°C.

Tabela 9 - Propriedades mecânicas do PLLA (obtido por injeção a 195°C).^[103]

	PLLA (Mv=66000)	PLLA recozido (Mv = 66000)	PDLLA (Mv=114000)
Extensão após rotura (%)	7,0	4,0	5,4
Módulo de elasticidade (MPa)	3750	4150	3900
Tensão de cedência (MPa)	70	70	53
Resistência à flexão (MPa)	106	119	88
Resistência ao choque sem entalhe (J/m)	195	350	150
Resistência ao choque com entalhe (J/m)	26	66	18
Dureza <i>Rockwell</i>	88	88	76
Temperatura de deflexão (°C)	55	61	50
Penetração Vicat (C)	59	165	52

As propriedades mecânicas dos polímeros de massa molar similar, mas fabricados por diferentes métodos, não diferem; ou seja, a preparação do PLA por policondensação ou polimerização com abertura de anel é indiferente neste sentido.^[101] Porém o seu método de processamento posterior pode influenciar as suas propriedades mecânicas finais. Na tabela seguinte temos o exemplo da variação da tensão de tracção (σ), extensão (ϵ) e módulo de *Young* (*E*) de filmes de PLA quando processados por termo-compressão e *solvent casting*.

Tabela 10 - Valores de tensão, extensão e módulo de *Young* para filmes de PLA processados por termo-compressão e *solvent casting*.^[115]

PLA film	$\sigma_{\max}$ (MPa)	$\epsilon_{\max}$ (%)	<i>E</i> (MPa)
Thermocompressed	44.0 ± 2.2	3.0 ± 0.1	2170.6 ± 18.8
Solvent-cast	16.6 ± 1.0	203.4 ± 20.8	927.1 ± 59.1

Como é visível, os valores de tensão e módulo de *Young* são menores para os filmes de PLA processados por *solvent casting* e o valor da extensão é duas ordens de grandeza superior em relação ao valor obtido por termo-compressão.

Propriedades reológicas

Similarmente, as propriedades reológicas de fusão do PLA têm um efeito significativo nos processos de *design*, otimização processual, e processos de simulação; e estão dependentes da temperatura, peso molecular, e taxa de tensão de corte.

Há alguns autores que equiparam o PLA semi-cristalino a alguns polímeros termoplásticos⁴³, afirmando que acima de T_g ($\approx 58^\circ\text{C}$) o PLA é viscoelástico, e abaixo de 58°C , tem comportamento de vidro (Figura 30); outros há que comparam a fusão de PLA de alto peso molecular a um comportamento de fluido não-Newtoniano⁴⁴ pseudoplástico⁴⁵.^[108]

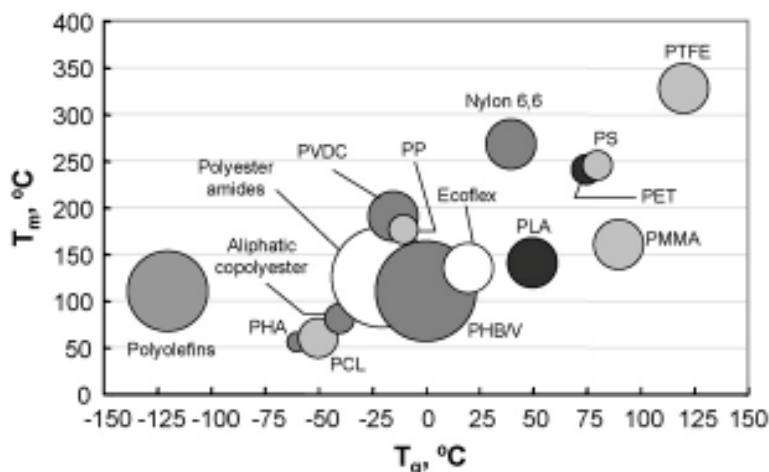


Figura 30 - Gráfico comparativo das temperaturas de transição vítrea (T_g) e de fusão (T_f - no gráfico definido como T_m) do PLA com outros termoplásticos.^[108]

A Figura 31 ilustra casos representativos do PLA amorfo e semi-cristalino de alto peso molecular. Estas propriedades podem ser alteradas pela introdução de ramificações na arquitetura da cadeia polimérica de diversos meios: iniciadores de polimerização multifuncional, ésteres multicíclicos, e *cross-linking* via adição de radicais livres.^[108]

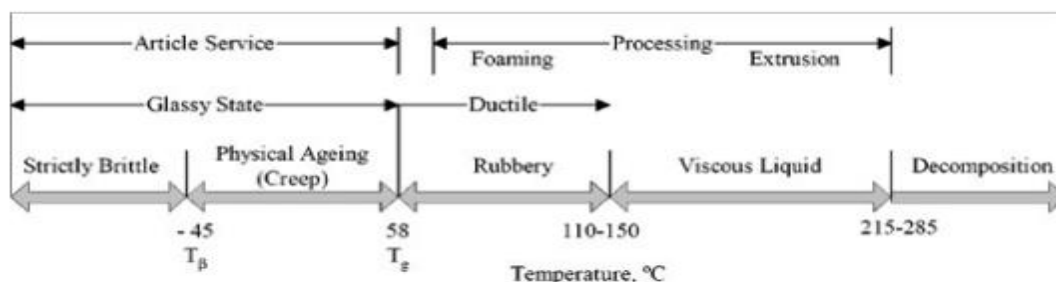


Figura 31 - Estados metaestáveis do PLA amorfo (em cima) e semi-cristalino (em baixo) de alto peso molecular.⁴⁶ ^[109]

⁴³ Polímero sintético que quando sujeito a temperatura elevada deforma-se, podendo ser moldado, reciclado indefinidamente. Antes de atingir o seu estado fundido passa pela chamada temperatura de transição vítrea.

⁴⁴ Fluido cuja viscosidade varia de acordo com o grau de deformação aplicado.

⁴⁵ A viscosidade diminui com o aumento da tensão.

⁴⁶ T_β - temperatura de relaxação β (dependendo das condições de preparação o PLA pode cristalizar em 3 formas - α , β e γ). A forma β do PLLA tem uma célula unitária - menor unidade repetitiva que reproduz a estrutura de um cristal - do tipo ortorrômbica. T_m - *melting temperature* (T_f).^[109]

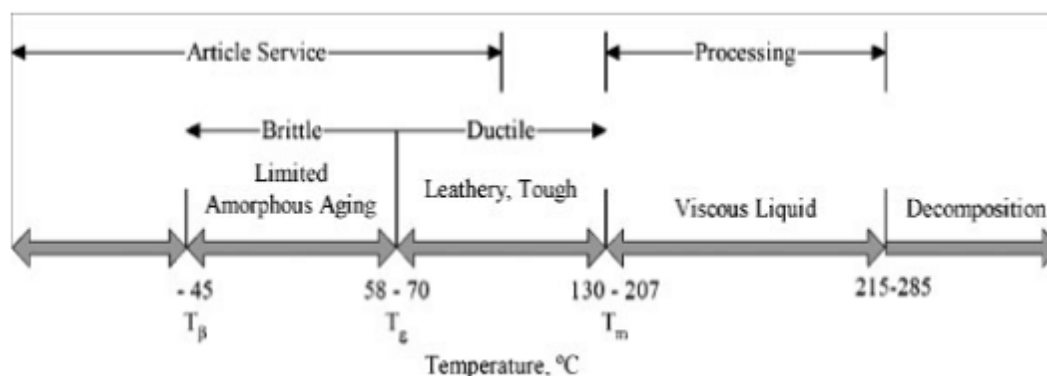


Figura 31 - Estados metaestáveis do PLA amorfo (em cima) e semi-cristalino (em baixo) de alto peso molecular (cont.).⁴⁷ [109]

1.2.3.3.1.2 Exemplos de processamento

Como já referido, o PLA pode ser fabricado em diferentes formas (filamentos, cordas, não-tecido, filmes, compósitos, membranas porosas, esponjas etc. [102]), e por diferentes processos (secagem e extrusão, fundição injectada, conformação por sopragem, vazamento de filmes e chapas, extrusão seguido de espalmamento e sopragem, conformação térmica, conformação, *spinning* de fibras, *electrospinning* de fibras ultra-finas, misturas com outros polímeros, compósitos, e nanocompósitos, [108] - alguns destes processos têm os esquemas explicativos no Anexo A, consoante as exigências em questão.

As estruturas de suporte porosas de PLA necessárias para as reconstruções de tecidos e órgãos referenciadas podem ser adquiridas através dos processos de dissolução do polímero e lixiviação/extracção, emulsão por sublimação, agentes formadores de gás-espuma, técnicas de saturação gasosa por alta pressão, inversão de fase por precipitação de imersão, e separação de fase por indução térmica. [101]

Os filamentos de PLA, utilizados por exemplo em suturas, têm sido produzidos por *melt spinning* (Figura 32). Neste emprego específico, a partir de filamentos de PDLLA e PLLA, é utilizado o *melt spinning* para se conseguir filamentos contínuos com uma razão de altura/comprimento de 4-12 no sentido de ser alcançada a robustez necessária nesta aplicação. As suturas são posteriormente conseguidas através do entrançamento dos filamentos torcidos em cordas de 520 denier⁴⁸ e utilizadas em ambiente cirúrgico com comportamento semelhante às aprovadas pela *Food and Drug Administration* (FDA) americana. [116]

⁴⁷ T_{β} - temperatura de relaxação β (dependendo das condições de preparação o PLA pode cristalizar em 3 formas - α , β e γ . A forma β do PLLA tem uma célula unitária - menor unidade repetitiva que reproduz a estrutura de um cristal - do tipo ortorrômbica. T_m - *melting temperature* (T_f). [109]

⁴⁸ Unidade de medida da densidade de massa linear de uma fibra têxtil. É a massa em g por 9000 metros.

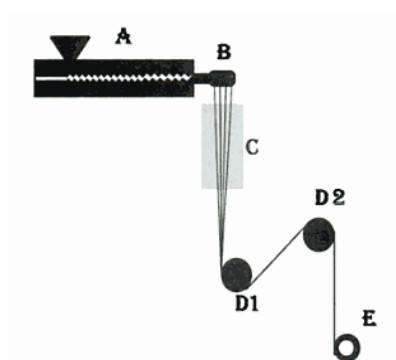


Figura 32 - Esquema sequencial de *melt spinning*. (A)-extrusor, (B)-entrançador, (C)-zona de arrefecimento abrupto, (D1 e D2)-1ª e 2ª guias de tensão, (E)-bobine de PGF (*phosphate-based glass fibers* - fibras de vidro com base fosfato). Adaptada de [41]

As micro e nanopartículas de PLA podem ser processadas directamente por polimerização por abertura de anel ou diferentes processos de pós-polimerização (evaporação de solvente e extracção de solvente, por exemplo).

Já as fibras de PLA podem ser processadas pelos métodos de *solvent casting* ou *melt-spinning* e desenhadas sobre diferentes condições no sentido de orientar as cadeias poliméricas. Normalmente, as produzidas por *solvent-spinning* têm propriedades mecânicas superiores, uma vez que no segundo processo há degradação térmica. [101]

As fibras ocas de PLA, produzidas por *dry-wet phase-inversion spinning* (Figura 33), são adequadas para os sistemas de libertação controlada de fármacos e estas são construídas por PLLA dopado com polivinilpirolidona (*PVP - polyvinylpyrrolidone*). A parede porosa das fibras é revestida, interna e externamente, por uma película com cerca de 0,3-0,4µm de espessura, garantindo a possibilidade de preenchimento das fibras com o fármaco específico (num estudo que utilizou especificamente PLLA-PVP, a hormona foi libertada de modo constante, durante 60 dias). [117]

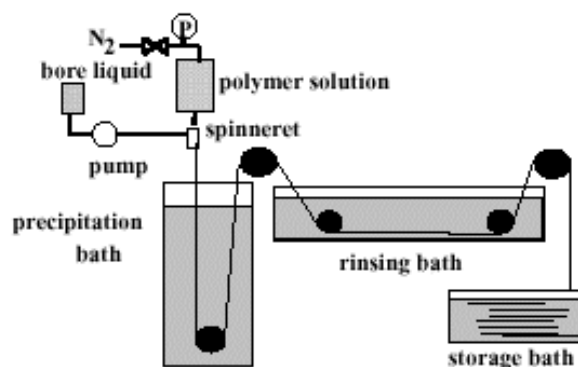


Figura 33 - Esquema de *dry-wet phase-inversion spinning*. [93]

A produção de nanofibras porosas de PLLA como estrutura de suporte, utilizada para crescimento de células nervosas, é fabricada por separação de fases líquido-líquido em que a solução de PLLA é preparada em tetrahydrofurano, arrefecida a -30°C, posteriormente emergida em água fria (4°C) e consequentemente seca por secagem supercrítica. [118]

Por extrusão e estampagem, fabricam-se perfis circulares de PLA, que após 6 semanas de implantação, conseguem produzir osso novo e histologicamente maduro, na forma cilíndrica pré-desenhada. ^[102]

1.2.3.3.1.3 Degradação

Alguns biopolímeros são facilmente degradados pelos microrganismos; deste modo a biodegradação dos polímeros com base ácido láctico tem sido estudada *in vivo*, em sistemas biológicos, e na presença de diferentes enzimas, para satisfazer necessidades específicas de aplicações biomédicas. Para além destes estudos, têm sido feitos trabalhos de investigação onde são investigadas as habilidades dos microrganismos utilizarem os polímeros com base ácido láctico como fonte de carbono (os microrganismos *Fusarium moniliforme* e *Penicillium roqueforti* são capazes de assimilar os polímeros hidrolisados do rac-ácido láctico). Estes ensaios demonstraram que a velocidade de degradação do PLLA aumenta na presença de uma cultura mista de microrganismos, quando comparada com a degradação abiótica. ^[119] Outros estudos feitos por *Karjomaa et al.* ^[120] evidenciam o efeito da massa molar do PLLA numa gama de 0,26 a 2,88 kDa. A degradação diminui com o aumento da cadeia do polímero e dá-se mais rapidamente em ambiente abiótico. ^[120] Já o efeito da esteroestrutura do P(rac)LA na degradação hidrolítica aquando na presença da proteinase K, estudo feito por *Tsuji and Miyauchi* ^[121], demonstra que a presença de mais de 10 unidades sequenciais do D-ácido láctico e menos de 0,3 unidades do L-ácido láctico, reduzem a degradabilidade enzimática do estereoisómero. Os efeitos do envelhecimento físico e morfologia na degradação enzimática do PLLA, estudados por *McCarthy et al.* ^[109], afectam a velocidade de degradação. As alterações morfológicas devido ao envelhecimento reduzem a mobilidade das cadeias poliméricas pelo que a velocidade de degradação é diminuída. A presença dos ácidos láctico (monómero e dímero linear), aumentam a degradação biótica do PLLA ^[122], e a presença de misturas dos enantiómeros do P(rac)LA e PDLA afectam a sua biodegradação. ^[101] O PDLA é sempre amorfo e demora 12-16 meses a biodegradar-se, enquanto o PLLA é semi-cristalino e, sendo mais hidrofóbico, necessita de mais de 24 meses para se biodegradar. ^[89]

A estabilidade térmica dos poliésteres alifáticos é, de uma maneira geral, limitada; pelo que a estabilidade térmica dos polímeros com base ácido láctico é pobre a altas temperaturas - consequência da quebra da ligação carbono-oxigénio por aquecimento. A cinética de degradação do PLA é de 1ª ordem e envolve reacções de termo-hidrólise, despolimerização por abertura de anel (ou “fecho éclair”), degradação termo-oxidativa ou reacções de transesterificação. ^[108]

O PLA semi-cristalino tem tendência a aumentar a sua massa pela absorção de água ^[123], no entanto, vestígios de moléculas de água podem iniciar a sua hidrólise. ^[108] Alguns estudos reológicos demonstram que a degradação térmica do PLLA é acelerada quando o teor de humidade no polímero aumenta, e que condições óptimas de secagem, reduzem a degradação durante a extrusão. Outras pesquisas mostram que a extensão da degradação térmica entre uma secagem controlada e não controlada do PLLA não varia. ^[123]

A despolimerização do polímero por abertura de anel, na presença de um catalisador ou vestígios do mesmo, é um mecanismo importante na degradação do PLA. A presença do catalisador, e especialmente a concentração deste, tem grande influência na estabilidade térmica do PLA. Foi já referenciada uma forte relação entre a quantidade de catalisador e a degradação do polímero; ou seja, a purificação do polímero, no sentido de diminuir a quantidade de catalisador, provoca um atraso na degradação térmica. No entanto, esta purificação não só remove o catalisador não vinculado mas também o monómero residual existente e outras impurezas. ^[101]

A cisão aleatória da cadeia principal por termo-oxidação também é proposta como contributiva para a degradação térmica do PLA. ^[124] Pela adição de diaminoantraquinona consegue-se retardar a velocidade de volatilização dos produtos de decomposição do PLA; todavia, a presença de oxigénio conseguiu estabilizar o efeito de fusão no PLLA durante os minutos iniciais.

Trans-esterificações inter e intramoleculares são reacções típicas de permuta para os polímeros de condensação acima e próximo dos seus pontos de fusão. ^[101] A trans-esterificação intermolecular dá-se para monómeros e oligoméricos⁴⁹ de ésteres, a trans-esterificação intramolecular resulta na formação de monómeros e oligoméricos de lácticos de baixa massa molecular. ^[108]

São diversos os estudos feitos sobre a degradação térmica do PLA. De entre outros, *Kopinke et al.* ^[125] propõem que acima de 200 °C o PLA se degrade através de permutas éster intra e intermoleculares, por eliminação do isómero *cis*⁵⁰, e reacções radiculares combinadas com não-radicalares. ^[125] Numa postulação em contrário, *McNeill and Leiper* ^[126], e *Kopinke et al.* ^[125] afirmam que a degradação do PLA se resume apenas a reacções não-radicalares; ao intercâmbio de reacções éster com os grupos terminais -OH da cadeia, e dependendo do ponto da molécula onde ocorre a reacção, o produto final poderá ser uma molécula de láctico, um anel oligomérico, ou acetaldeído e monóxido de carbono (Figura 34). E, embora o acetaldeído seja considerado não-tóxico e esteja naturalmente presente em muitos alimentos, o acetaldeído gerado durante o processo de fusão do PLA deve ser minimizado uma vez que a migração deste pode provocar a perda de sabor, o que pode trazer impacto nas propriedades organolépticas⁵¹ e aceitação do consumidor ao produto. ^[108]

⁴⁹ Estrutura complexa formada por mais de uma cadeia.

⁵⁰ Forma de estereoisomerismo que descreve a orientação dos grupos funcionais na molécula. *Cis* significa que os grupos funcionais estão do mesmo lado (da ligação dupla), e *trans* significa que estão em lados opostos.

⁵¹ Características de uma substância que podem ser percebidas com nossos sentidos. ^[15]

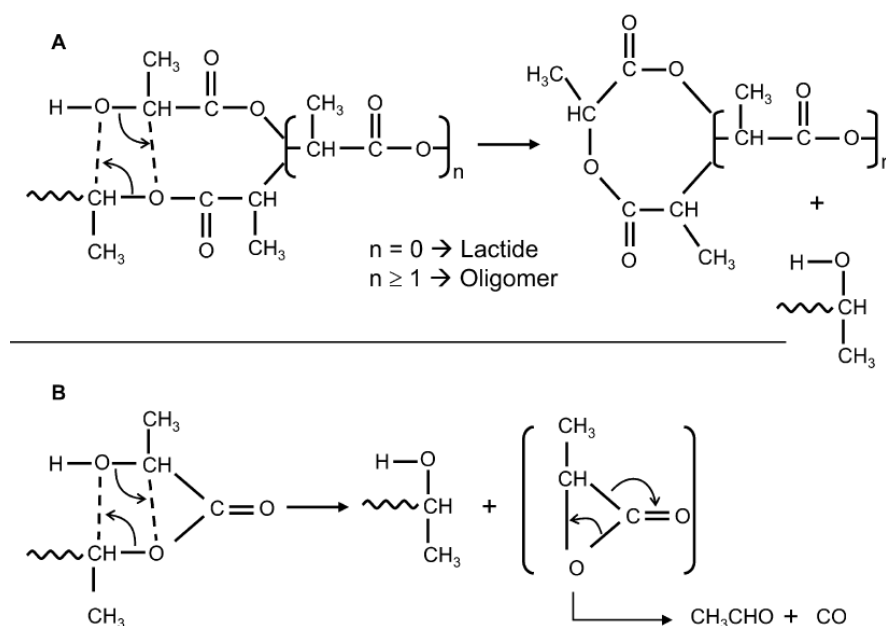


Figura 34 - Produtos da degradação térmica do PLA. ^[108]

A irradiação, outro mecanismo conducente à degradação, aumenta a percentagem de cisão das ligações *cross-linking* nos poliésteres alifáticos em função do aumento da razão de CH_2/COO na cadeia principal. Embora a estabilidade do PLLA à radiação, do copolímero racémico do ácido (L)lático e ácido (D)lático, e dos copolímeros do ácido lático já tenha sido sujeita a estudos, a informação disponível é limitada. O PLA sofre cisões na cadeia quando exposto a valores abaixo de 250kGy. Quando exposto a valores superiores, as reacções de *cross-linking* aumentam em função dos valores de irradiação, quer em atmosfera inerte ou no ar. Também foi proposto que a irradiação tem como consequência reacções na fase amorfa do polímero pelo que são expectáveis efeitos diferentes em polímeros dos estereoisómeros *rac* e *L* do ácido lático. ^[101]

A hidrólise dos polímeros conduz à fragmentação molecular, ou seja, à policondensação inversa. ^[101] Este é um processo complexo, afectado por factores mencionados, como a estrutura química do material, a sua pureza, o peso molecular e a sua distribuição, as condições/história de processamento, o tamanho, a sua forma e pelas condições em que se dá a hidrólise (água, ar, pH, T ^[127]). ^[128] A degradação dos polímeros com base ácido lático, nem sempre desejável (por exemplo no armazenamento) mas benéfica noutras circunstâncias (ex.: alguns dispositivos médicos), inicia com uma fase de absorção de água seguida da separação hidrolítica das ligações éster de modo aleatório, segundo o princípio de *Flory* (que postula que todas as ligações têm a mesma reactividade) ^[129]. O grau inicial de cristalinidade dos poliésteres afecta a velocidade de degradação hidrolítica uma vez que os segmentos cristalinos reduzem a permeabilidade de água na matriz. Deste modo, a parte amorfa sofre hidrólise precedentemente à região cristalina.

As condições em que se dá a hidrólise, nomeadamente a temperatura, são de máxima importância para a velocidade da degradação; a elevadas temperaturas, a degradação polimérica é superior; porém, a flexibilidade do polímero, quando a temperatura ultrapassa a sua T_g , aumenta. ^[101]

O PLA degrada-se em ácido láctico - metabolito natural de baixa toxicidade ^[102, 130] produzido em condições normais em regimes anaeróbios nos mamíferos que entra no ciclo do ácido tricarbóxico (TCA - *tricarboxylic acid*) ^[30], e é metabolizado e excretado do corpo sob a forma de energia, dióxido de carbono (CO_2) e água (H_2O).^[27] À medida que a degradação vai ocorrendo, o polímero torna-se mais hidrofílico, aumenta a sua capacidade de absorção de água e acelera a própria degradação. ^[102]

O tempo de degradação de homopolímeros de PLLA varia desde alguns meses para filmes de PLLA de baixa massa molar ^[131] (redução de 63,2% em massa em 168 dias - teste feito em suturas ^[132]), 2 ^[133] a 4 ^[102]-5,6 ^[133] anos para PLLA de alto peso molecular, a uns prováveis 50-60 anos quando em causa estão fibras orientadas de PLLA ^[131]. As razões para esta diferença encontram-se em factores microestruturais como a pureza do polímero, massa molar e sua distribuição, cristalinidade e orientação ^[30]; pelo que a degradabilidade destes compostos é de algum modo imprevisível. ^[52] Um típico material poliláctico semi-cristalino apresenta perda de massa após 30 semanas a 37°C num padrão fosfato. ^[30]

A degradação do PLA já foi estudada em diferentes composições: PLLA, P(rac)LA, PLLA-co-PGA, P(rac)LA-co-PGA, P(rac)LA-co-PCL e PLLA-co-PCL, e com diferentes massas molares. ^[101] Quando a matriz polimérica de um compósito é composta por PLA e uma fase inorgânica, a complexidade desta degradação é aumentada. ^[128] No entanto, a degradação hidrolítica dos homo- e copolímeros de PLA é homogénea, ou seja, a massa molecular média decresce significativamente antes de ser noticiada qualquer perda de peso. ^[101] Estes degradam-se por hidrólise e podem, teoricamente, ser metabolizados em CO_2 e H_2O . No entanto, existem problemas imediatos com a degradação dos homo- e copolímeros, uma vez que estes são constituídos por uma fase cristalina e outra amorfa ^[45], e quando estes degradam, a componente amorfa é preferencialmente hidrolisada ^[31] convertendo as longas cadeias poliméricas em fragmentos pequenos solúveis em água. ^[89] No segundo estágio da hidrólise, a degradação hidrolítica da região cristalina do poliéster, conduz ao aumento da perda de massa e consequentemente à reabsorção completa. ^[101] Assim sendo, a certa altura da hidrólise, o implante colapsa e liberta pequenos extractos cristalinos que podem provocar inflamações. ^[31]

A degradação hidrolítica das misturas de poliésteres alifáticos está dependente da forma como estas misturas são feitas. Normalmente estas misturas são preparadas recorrendo-se a um molde com compressão, coprecipitação e evaporação de solvente da emulsão água-solvente dos polímeros. ^[101]

A degradação em meio aquoso do PLA foi já descrita como sendo mais rápida no interior do material - sofre erosão no seio do material (explicado no ponto 1.2.3.1 Degradação e erosão - página 64); isto porque existe um efeito autocatalítico devido ao aumento da quantidade de compostos com grupos carboxílicos. Estes componentes de baixa massa molar não conseguem permear para fora do revestimento, e os produtos de degradação na camada superficial do revestimento são, em contradição, dissolvidos na solução tampão envolvente. ^[101] No entanto, *Li and Vert* ^[134] observaram que o PDLLA é capaz de cristalizar durante a degradação das suas cadeias poliméricas, confirmando a teoria de que os oligómeros e monómeros criados durante a degradação podem não ser imediatamente libertados para o meio. Estes identificaram cristais de estereocomplexos oligoméricos de cadeias de PDLA e PLLA anteriormente identificados e estudados ^[75]. Também já reportada, foi a libertação de oligómeros de microesferas de PDLLA ^[135], e perfis complexos (em forma de sigmóide) de libertação de ácido L-láctico do PDLLA, ou libertação dos ácidos láctico e glicólico de copolímeros de PLLA-co-PGA (75:25 e 50:50).

A perda de peso molecular pode ser substancial nas primeiras 12h ^[72] e, pelo contrário, não há alterações de geometria e perda de massa ^[76]. As primeiras alterações morfológicas estão confinadas à superfície polimérica e há formação de fissuras imediatamente após o contacto com o meio. ^[76] A Figura 35 mostra as fissuras presentes num polímero degradável após 18,5h em PBS e pH 7,4, através de microscopia confocal.

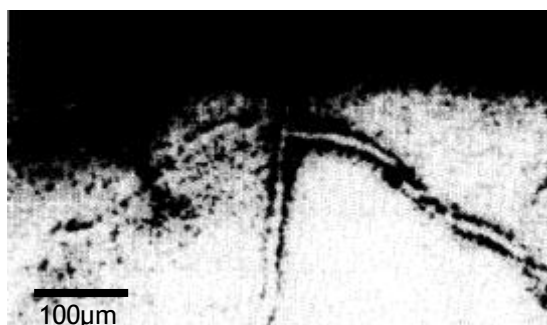


Figura 35 - Fotomicrografia adquirida por microscopia confocal das fissuras de um polímero degradável após 18,5h em PBS, pH 7,4 e 37°C. ^[72]

Com o avançar da erosão, a forma polimérica altera-se para uma estrutura mais porosa: macroporosa com diâmetros aproximadamente de 100µm que resultam da formação das fissuras anteriormente referidas e microporosa cujos diâmetros rondam os 0,1µm resultante da erosão no seio do material do polímero. ^[72]

As reacções químicas que podem existir durante a degradação hidrolítica são reacções de difusão de água, difusão de enzimas (hidrólases) e difusão de oligómeros, reacção hidrolítica da água e reacção hidrolítica enzimática (visíveis no esquema da Figura 36).

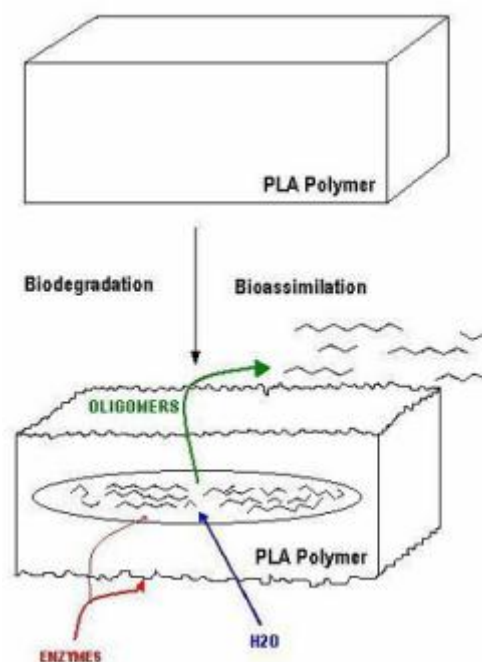


Figura 36 - Esquema representativo das reacções químicas existentes na degradação hidrolítica do PLA.

No corpo humano, há degradação do PLA igualmente em duas fases: primeiramente por hidrólise química e à posteriori por metabolismos activos. Na primeira fase, a água penetra no dispositivo biodegradável de composição PLA, atacando preferencialmente as ligações éster da fase amorfa do polímero; na segunda fase, as enzimas libertadas pelos glóbulos brancos atacam estes fragmentos causando a degradação adicional do polímero em monómeros naturais comuns no corpo humano, como o ácido láctico. Estes ácidos entram no ciclo de ácido cítrico e são excretados naturalmente como água e dióxido de carbono. Um factor que influencia negativamente a biodegradação do PLA é o facto de a reacção de hidrólise ser autocatalítica ^[136], isto é, a velocidade de hidrólise aumenta com o aumento da concentração do produto de reacção. A hidrólise de um poliéster apresenta genericamente como produtos cadeia pequenas com grupos de terminação ácido e álcool. No caso do PLA, o ácido de terminação possui um elevado grau de dissociação dando origem a um ambiente envolvente ácido, o que acelera significativamente a velocidade de hidrólise. Para além do referido, a difusão de cadeias pequenas têm um papel preponderante no controlo da velocidade de degradação total do polímero. Uma consequência da interacção entre a difusão e reacção de hidrólise traduz-se na questão de que uma placa maior se degrada mais rapidamente que uma de menor dimensão uma vez que as cadeias pequenas com grupos terminais ácidos não se difundem tão rapidamente de modo a criar um ambiente ácido no interior da placa maior. ^[90] Outro factor implicativo na biodegradação prende-se com o grau de cristalinidade do polímero que aumenta frequentemente ao longo da degradação. ^[137, 138] Assim que as moléculas de água penetram na fase amorfa, causando a cisão da cadeia polimérica, a mobilidade da cadeia aumenta facilitando o processo de cristalização na fase amorfa.

1.2.4 Compósitos

Diferentes combinações de metais, cerâmicos e polímeros formam os materiais compósitos (ex.: PLA-PEG ^[30], HA/PE, sílica/SR, fibra de C/PE de ultra alto peso molecular - UHMWPE *ultra high molecular weight polyethylene*, fibra de C/epoxi ^[9]), cujas especificidades e particularidades tornam-nos adequados para aplicações singulares em diversas áreas biomédicas. Esta abordagem permite combinar a osteocondutividade dos polímeros com a dureza dos materiais cerâmicos. ^[16] Adicionalmente os materiais compósitos, pelo controlo das fracções volúmicas constituintes e o arranjo local e global da fase de reforço, podem ter as propriedades e *design* específicos desejados para se conseguirem as condições mecânicas e fisiológicas para o tecido hospedeiro. Conseguem ter uma biocompatibilidade estrutural superior aos materiais homogéneos monolíticos, e uma resistência razoavelmente adequada.

Sumarizados na tabela seguinte estão alguns dos mais importantes factores considerados na selecção dos materiais de um biomaterial a aplicar no corpo; onde estão incluídas algumas das características justificativas, referenciadas nos próximos pontos, dos materiais escolhidos para o processamento da estrutura auxiliar 3D óssea e de ligamentos deste trabalho, o PLA e o PBG.

Tabela 11 - Importância de diversos factores na selecção dos materiais para aplicações biomédicas. ^[9]

FACTORES	DESCRIÇÃO		
	Características químicas/biológicas	Características físicas	Características mecânicas/estruturais
1º nível de Propriedades dos materiais	Composição química (superfície e interior)	Densidade	Módulo de elasticidade Coeficiente de Poisson Tensão de cedência Resistência à tracção Resistência à compressão
2º nível de Propriedades dos materiais	Adesão	Topologia da superfície (textura e rugosidade)	Dureza Módulo de corte Resistência ao corte Módulo de flexão Resistência à flexão
Especificações funcionais com base na aplicação	Biofuncionalidade Bioinerte Bioactivo Bioestabilidade Biodegradabilidade	Forma (sólido, poroso, revestido, filme, fibra, malha, pó) Geometria Coeficiente de expansão térmica Condutividade eléctrica Cor, estética Índice de refracção Opacidade ou translucidez	Rigidez Resistência à fractura Resistência à fadiga Resistência à fluência Resistência à fricção e desgaste Resistência de adesão Resistência ao impacto Resistência à abrasão
Processamento e fabrico	Reprodutibilidade, qualidade, esterização, embalamento, processamento secundário		
Características do hospedeiro	Tecido, órgão, espécie, idade, sexo, raça, condições de saúde, nível de actividade, resposta sistémica		
Procedimento cirúrgico, período de aplicação/uso			
Custo			

Na figura seguinte estão ilustradas as características mecânicas tensão e módulo de elasticidade de *Young* de alguns biomateriais com principal interesse para a manufactura de compósitos para aplicações biomédicas.

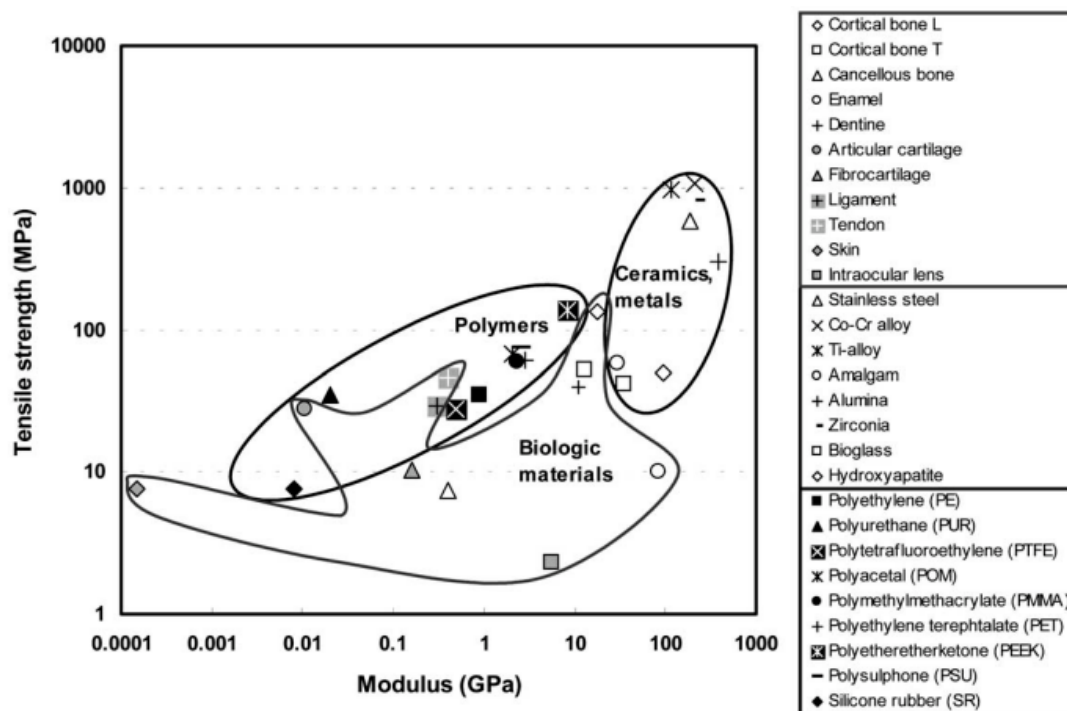


Figura 37 - Tensão (σ) vs. módulo de elasticidade de *Young* (E) com relevância para os compósitos a considerar para aplicações biomédicas. ^[13]

De destacar os valores de tensão e módulo de *Young* para as áreas em estudo, osso e ligamento, que se inserem dentro dos referenciados para os materiais biológicos no limite com os materiais poliméricos e metais cerâmicos.

1.3 Aplicações biomédicas dos biomateriais

O desempenho de um possível implante está dependente do sucesso do seu desenvolvimento e posterior implantação. No desenvolvimento de um implante está implícita a escolha apropriada dos biomateriais a utilizar e do *design* mais adequado para a situação em questão, e a realização de testes *in vitro*, ensaios em animais e clínicos. ^[19] Para a sua implantação, deve haver disponível a matéria-prima em quantidade e condições necessárias, esta deve ser passível de ser processada e esterilizada para posterior embalagem, transporte e armazenamento ^[19]; e no final deste percurso, o implante deve encontrar-se em condições óptimas de conservação para ser implantado no paciente com o fim de o ajudar a recuperar as funções biológicas e funcionais reparando, substituindo ou apoiando partes do corpo deficientes ou lesionadas.

Após a aprovação nos testes *in vitro*, o tecido construído poderá ser implantado no tecido alvo, num órgão específico ou cavidade corporal, existindo diferentes estratégias para o fazer

dependendo do tipo de função do tecido alvo. Para tecidos que vão promover suporte mecânico, dureza, e uma função (ossos, articulações, vasos sanguíneos e válvulas cardíacas ^[5]), é necessário que a substituição do tecido seja conduzida especificamente para determinado local, ou que a substituição seja feita no local original do tecido lesado. Para tecidos que produzem hormonas, enzimas e moléculas de regulação (tecido glandular hepático, endócrino e pancreático ^[5]), o tecido construído deve interligar-se ao sistema vascular para que consiga libertar directamente na corrente sanguínea as hormonas e factores bioquímicos produzidos. No entanto, não é necessário que sejam implantados no local original do tecido lesado.

Sintetizando, o sucesso de um biomaterial implantado no corpo depende, entre muitos outros factores já mencionados, também da técnica cirúrgica seleccionada para implementar o biomaterial no corpo na medida em que o grau de trauma cirúrgico imposto pela operação é crucial, assim como os métodos de esterilização utilizado na mesma, a condição de saúde e actividade física do paciente. ^[9]

Na figura seguinte estão alguns exemplos de materiais biomédicos constituídos por biomateriais actualmente implantáveis/aplicáveis no ser humano.



Figura 38 - Exemplo de prótese da perna, da anca, parafuso dentário, cateteres, monitor cardíaco implantável, pacemaker, sistema reparador de válvulas cardíacas, sensor intravascular, suporte externo do rádio, válvula cardíaca de substituição. ^[9, 104, 139]

Seguidamente estão descritas algumas das mais relevantes e vencedoras aplicações biomédicas dos biomateriais utilizados na ET referenciados no ponto 1.2 Biomateriais - página 35.

Dos metais, os mais utilizados como biomateriais são os aços inoxidáveis com uma composição mais comum em termos de percentagens elementares de 60-65% Fe, 17-20% Cr, 12-14% Ni, <0,03% C e N, Mn (manganês), Mo, P (fósforo), S (enxofre) ^[18], as ligas com base cobalto (Co) (Co-Cr-Mo ^[18]), e as ligas de Ti (Ti-6Al-4V, Ti-Al-Fe, Ni-Ti ^[38]), pela sua biocompatibilidade elevada, excelente resistência à corrosão, leveza, boas propriedades mecânicas (módulo relativamente baixo), não-magnetismo e não-toxicidade. Estes metais são empregues em aplicações como articulações ^[30] e próteses da anca, implantes ósseos ^[30], próteses dentárias, e *stems* femorais ^[18].

Uma vez que os fluidos fisiológicos do corpo humano contêm espécies químicas oxidativas, o que potencia um ambiente severo para os implantes metálicos, a corrosão dos metais ocorre a diferentes velocidades dependendo do tipo de metal e do ambiente local. Isto é, as ligas de aço podem ser facilmente corroídas na presença de água e oxigénio, enquanto o Cr, Co Ni e o Ti são consideravelmente resistentes à corrosão; relativamente ao local, a concentração de oxigénio nos fluidos intersticiais varia consideravelmente consoante o local do corpo; e uma elevada concentração de oxigénio facilita a corrosão metálica. Para além destes factores químicos, factores físicos como as cargas e o atrito aceleram a corrosão metálica; ou seja, a deformação elástica repetitiva dos implantes metálicos pode induzir a fadiga mecânica, o que facilita a corrosão química. Embora já existam soluções para reduzir a corrosão metálica dos implantes, como por exemplo a adição de Cr nos implantes de aço, todos estes factores mecânicos deve ser tidos em conta no *design* dos implantes metálicos uma vez que a corrosão do implante é causadora de inchamentos e dores localizadas, e influencia a funcionalidade do implante artificial. A corrosão deste tipo de implantes, após aplicação no paciente, pode ser detectada com um simples teste de raio-X e corrigida através da substituição do mesmo. As cirurgias de substituição são aconselhadas aos pacientes cujo implante apresente uma corrosão severa, uma vez que esta acelera o desgaste metálico e a falha do implante por fadiga. É comum encontrar-se reacções inflamatórias e partículas metálicas nos tecidos adjacentes ao implante metálico. ^[30]

Os cerâmicos, essencialmente utilizados em aplicações estruturais pelas suas boas propriedades mecânicas, são aplicados na medicina dentária e ortopedia ^[30] em reparação e regeneração de tecidos duros, assim como em medicina dentária também pela sua boa aparência estética. Uma vez que possuem boa resistência química, são preferidos em aplicações onde estejam presentes ataques microbianos, variações de pH, T, e condições de esterilização. ^[18]

Os cerâmicos duros ou bioinertes podem ser encontrados nas esferas das próteses da anca, placas ósseas, parafusos e ossículos da orelha média; especificamente a alumina é

frequentemente utilizada no fabrico de articulações artificiais e próteses totais da anca. ^[30] Já os cerâmicos bioactivos, dada a sua resistência mecânica e dureza, encontram-se em revestimentos finos de componentes de próteses ortopédicas do joelho e anca para promover a bioactividade em materiais inertes (ex.: revestimentos de HA em implantes metálicos ortopédicos e dentários) ^[38]. Nas últimas 3 décadas, particularmente os derivados de P_2O_5 , têm sido utilizados em regeneração e reparação de tecidos, uma vez que em ambiente fisiológico conseguem suportar a formação de camadas de osso mineral nas suas superfícies. E esta camada mineralizada demonstrou ter a capacidade de se ligar ao colagénio sintetizado pelas células do tecido conectivo. ^[21] Os cerâmicos biodegradáveis são usualmente utilizados na medicina/engenharia regenerativa, na substituição de ossos artificiais (ex.: HA) ou sistemas de libertação controlada de fármacos, hormonas ou factores de crescimento (ex.: fosfatos de cálcio), assim como para a reparação de lesões ósseas devido a traumas, remoção de tumores e outras patologias. É através da degradação do material cerâmico que os fármacos ou proteínas são libertados; e através do controlo da sua densidade ou componentes do sistema de libertação, pode-se regular a quantidade de libertação de fármacos. ^[30]

PBG

Embora diferentes tipos de materiais tenham sido desenvolvidos com propriedades osteocondutivas e osteoindutivas, o desenvolvimento dos PBG tem tido relevante interesse em toda a área biomédica e clínica ^[41]. Na corrente busca de materiais mais leves e rígidos, e com custos mais reduzidos, os vidros que melhoram as propriedades mecânicas como elevado módulo *Young*, dureza, resistência e tenacidade, têm sido os potenciais candidatos ^[50]; e a sua gama de utilização está dependente da sua cristalização e dos efeitos que dela possam advir, assim como da relação entre a sua solubilidade e a actividade celular ^[48].

A conversão dos PBG em fibras ^[47] foi um avanço de grande interesse para a possibilidade de guiar *in vitro* células musculares ^[21] e têm sido também alvo de estudo no que diz respeito aos efeitos de sedimentação de osteoblastos e fibroblastos humanos orais, e fibroblastos do tensor flexor da mão ^[21].

Choueka et al. ^[47] conclui que as fibras de PBG são o mais indicado para o reforço dos implantes biodegradáveis ^[47], e as gamas mais utilizadas são os PBG com P_2O_5 fixo em 45%mol ^[48].

Os BG e os vidros cerâmicos (BGC - *bioactive glass ceramics*) trouxeram um grande potencial no campo da medicina regenerativa, tanto no que diz respeito à engenharia de tecidos duros, como, recentemente, na engenharia de tecidos moles. ^[10] Os BG são propostos e estudados para aplicações em implantes ósseos ^[42], os BGC têm sido utilizados para substituição óssea e regeneração de tecidos moles ^[30]; e os PBG revelam um recurso prometededor em aplicações para reparação óssea ^[42], procedimentos odontológicos ^[47], e na reparação de qualquer tecido que tenha uma anisotropia média a elevada, como é o caso dos ligamentos e músculos ^[8].

Um BG é capaz de formar ligações coesas com tecidos duros e macios quando exposto a ambientes *in vivo* ou *in vitro* apropriados, como por exemplo o fluido sanguíneo estimulado pelo desenvolvimento de uma camada superficial de HA pela libertação de espécies iónicas do corpo do material. ^[41] A primeira geração dos BG, vidros com base silicato nos quais o SiO_2 agia como rede matricial e onde os óxidos de sódio (Na_2O) e o óxido de cálcio (CaO) eram adicionados à composição como modificadores, foram os primeiros vidros capazes de formar uma ligação interfacial com o osso vivo após implantação, nomeadamente os vidros do sistema $\text{P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O-SiO}_2$. ^[25] O objectivo principal da produção destes materiais era a sua utilização em sistemas de libertação de fármacos nas células musculares com a finalidade de as regenerar. ^[47]

Os BGC, nomeadamente os vidros cerâmicos com Si-Ca, podem ser implantados no sistema esquelético no sentido de libertarem iões Si e Ca para estimularem o crescimento dos osteoblastos e diferenciação celular (ponto 1.6.1 Constituição óssea - página 114). Também é sabido que a libertação controlada de Ca e Si de um material compósito de BG ou polímero reabsorvível aumenta a vascularização nos tecidos moles. Deste modo, pelo controlo da composição e taxa de libertação do Ca e Si, os BGC podem ser utilizados na mediação do crescimento de tecido ósseo. ^[30]

Muitos dos BG ou BGC são utilizados em implantes cirúrgicos. O chamado biovidro (*Bioglass*®), é um vidro rico em sílica utilizado no campo biomédico na substituição de tecidos moles e duros, que funciona como dispositivo de longo termo. A sua biocompatibilidade é condicionada pela dupla camada constituída por uma camada de fosfato de cálcio e outra rica em sílica. Inicialmente, quando exposto em solução fisiológica ou tecido vivo, há uma transformação da camada de fosfato de cálcio numa camada de apatite; no entanto, a longo termo, a reacção local e sistémica especialmente da camada de sílica não é conhecida. ^[52]

O maior interesse no desenvolvimento dos PBG recai sobre a possibilidade de combinar a sua elevada resistência à tracção e a sua versatilidade estrutural ^[21], com a capacidade de controlar a sua solubilidade e, deste modo, conseguir-se a utilização dos mesmos na promoção de regeneração ^[47] e substituição ^[45] de tecidos moles e conectivos, e cirurgias de tecidos duros, uma vez que há a possibilidade de produção destes materiais com uma rigidez semelhante à encontrada no osso. ^[50]

Os PBG binários, como por exemplo o $\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H-NaPO}_4\text{H}_2$, induzem respostas imunitárias não significativas e conseguem que os osteoblastos craniofaciais, quando neles implantados, exibam características citoesqueléticas e alguns níveis de síntese do colagénio. ^[21] Mas também têm sido amplamente investigados como veículos de libertação controlada de iões antibacterianos como a Ag, o C, o Zn e o Ga. ^[140] Consegue-se um efeito bacteriano perante algumas bactérias com a mistura de Ga_2O_3 dopado com PBG (particularmente a composição C14^[140]); e sendo este um material duradouro oferece vantagens sobre os agentes terapêuticos convencionais e pode ser utilizado como um sistema único na libertação

controlada de iões Ga, tratamentos de prevenção de infecções bacterianas no osso, bem como *coating* sub e transcutâneo para, por exemplo, parafusos de fixação. ^[140]

Similarmente, PBG ternários e quaternários têm sido estudados para aplicações no campo da regeneração do tecido ósseo sob a forma de pós ou estruturas de suporte, isolados ou juntamente com polímeros em materiais compósitos; assim como têm sido desenvolvidos e testados *in vivo* com bons resultados, guias nervosos como tubos e mechas de fibras não-tecido, e construções 3D para reparações de tecidos musculares. ^[25] No passado, a incorporação de cobre e prata em PBG foi utilizada em ligaduras preventivas de infecções e no controlo de infecções do trato urinário em pacientes com necessidade de utilizar cateteres internos. ^[140] Actualmente são utilizados em áreas diversas. A título exemplificativo, os PBG do sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - K_2O são utilizados em equipamentos electroquímicos ^[8] e biomédicos pelo facto da adição do K_2O permitir uma adaptação da solubilidade e efeito terapêutico do PBG ternário base ^[31]; o sistema P_2O_5 -CaO- Na_2O - CaF_2 , pela sua componente de fluoreto, tem uma acção biológica activa na fixação da estrutura de HA no osso e, portanto, é utilizado em produtos de higiene oral ^[8]; e o composto $CaNaPO_4$ é utilizado em implantes ósseos por se transformar em apatite após 6 semanas de implantação ^[52].

Os polímeros naturais podem ser considerados os primeiros biomateriais biodegradáveis utilizados clinicamente. Estes possuem inúmeras vantagens inerentes como a bioactividade, a habilidade de funcionar como ligante entre receptor e células, e a susceptibilidade de desencadear a degradação proteolítica e remodelação natural nas células. ^[17] Pelas suas características funcionais e estruturais, a matriz de colagénio tem um longo uso na construção de sistemas de libertação de fármacos e estruturas de suporte da ET. Tem sido utilizada em diversas formas: géis de colagénio, malhas, compósitos com diferentes moléculas, e como MEC natural isenta de células - preparada pela recolha de tecido da submucosa intestinal, adventícia ou serosa dos vasos sanguíneos e tecidos subcutâneos, e posterior eliminação enzimática ou hidrolítica das células presentes. Os géis e a malha de colagénio são apropriados para os sistemas de libertação de fármacos, enquanto a matriz de colagénio, produzida com a forma desejada e isenta de células para eliminar a imunogenicidade celular dos tecidos halogéneos, pode ser utilizada em estruturas de suporte ou enxertos para reparação ou regeneração de vários tecidos e órgãos como os vasos sanguíneos, intestinos e bexiga. Também os géis de colagénio quando incorporados em fibras podem ser utilizados na construção de estruturas de suporte para regenerar e reparar tecidos. ^[30]

A elastina pode ser utilizada em biomateriais nas diferentes formas de elastina insolúvel (nos auto, alo e xeno-enxertos, e MEC isenta de células), e preparações de elastina não pura. A primeira pode também se hidrolisada para obter preparações de elastina solúveis. ^[94] Pelas propriedades da elastina, esta torna-se num potencial material para uma ampla variedade de aplicações, desde a reconstrução vascular ^[30, 141], válvulas cardíacas, substituição da pele, e cartilagem elástica. ^[94, 142]

Os glicosaminoglicanos e os polímeros compósitos com base de glicosaminoglicanos têm sido utilizados na construção de hidrogéis e matrizes para diferentes aplicações biomédicas como os sistemas de libertação de fármacos, sedimentação e transplantação celular, reparação e regeneração de tecidos. [30]

O fibrinogénio ou fibrina é correntemente utilizado como cola clínica⁵² para selar tecidos em cirurgia. [97]

As características do alginato tornam-no um material apetecível para as aplicações da ET como a transplantação e sedimentação celular, reparação de tecidos e sistema de libertação de fármacos. O gel de alginato reticulado com o ião cálcio, por exemplo, tem sido utilizado em inúmeras aplicações biomédicas como em microesferas de alginato para libertação controlada de genes. Estas microesferas podem ser introduzidas nos tecidos alvo, onde se dá a libertação de genes, que pela biodegradabilidade do alginato, é controlada pela sua velocidade de degradação do mesmo. De igual modo, a matriz ou gel de alginato pode ser usada para mediar o controlo de sistemas de libertação de fármacos e proteínas. Adicionalmente, os materiais com base em alginato têm sido produzidos e utilizados para mediar a cicatrização de ferimentos; isto é, o gel de alginato tem sido utilizado como cobertura de pele lesada para prevenção de perda de fluidos corporais e infecções bacterianas. Podem ainda ser utilizados para construir diferentes formas de estruturas matriciais para a reparação e regeneração de diferentes tipos de tecidos como a cartilagem, fígado e osso, ou para construir cápsulas para a transplantação celular - as células são encapsuladas com cápsulas de alginato e libertadas nos tecidos alvo, deste modo as cápsulas protegem as células de inflamações induzidas por qualquer tipo de lesão. [30]

Recorre-se a materiais constituídos por celulose em aplicações biomédicas como as membranas celulósicas para a hemodiálise, transportadores de enzimas para os biosensores, libertação de fármacos, e estruturas de regeneração de diferentes tipos de tecido (osso, cartilagem, fígado, pele e vasos sanguíneos). Investigações feitas sobre o assunto têm demonstrado consistentemente que os materiais constituídos por celulose provocam pequenas reacções inflamatórias e tóxicas. Deste modo, a celulose tornou-se um material promissor para a construção de estruturas de suporte da ET. [30]

No que diz respeito ao amido e os seus compósitos, estes têm sido utilizados em substratos de culturas celulares, como transportadores para transplantação celular, e em aplicações biomédicas *in vivo* como a regeneração e reparação de tecidos, a par de sistemas de libertação de fármacos. [30]

⁵² Comercialmente disponível como a mistura de fibrinogénio concentrado e trombina com origem no plasma humano. [97]

Relativamente aos polímeros sintéticos referenciados como materiais da ET, destacam-se as aplicações abaixo descritas para o PE, Dacron, Teflon, PCL, PGA e PLA.

O PE de baixa densidade é usualmente referenciado como material para fabricar tubos e recipientes médicos; o PE de alta densidade para implantes ortopédicos tais como cápsulas sujeitas a cargas e rolamento para articulações artificiais. ^[30]

O Dacron numa primeira instância tem sido utilizado para a construção de enxertos vasculares. Através da tecelagem de fibras PET em materiais tipo malha, conseguem-se construir enxertos porosos que facilitam a integração celular na sua rede quando implantados na artéria hospedeira, e por esta razão, tem-se recorrido ao Dacron para substituir as aortas torácica e abdominal não funcionais. Como qualquer outro material polimérico, o Dacron induz reacções inflamatórias e a trombogénese. Assim, este tipo de enxerto só é aplicado em artérias cujo diâmetro é superior aos 4mm. ^[30]

Comummente aplicado como biomaterial de substituição de tecidos moles, o Teflon é utilizado como substituto de tecidos vasculares uma vez que os enxertos vasculares de Teflon são suficientemente fortes para suportar as forças induzidas pela pressão arterial sanguínea. E, uma vez que o Teflon estimula reacções inflamatórias e a trombogénese, tal como o Dacron, este só pode substituir artérias com diâmetro superior a 4mm. Também pode ser utilizado como folha de suporte que envolve exteriormente os enxertos de veias, abordagem esta que permite moldar o diâmetro do enxerto da veia, reduzindo as diferenças de diâmetro induzidas pela turbulência do fluxo sanguíneo e suprimindo a turbulência impelida pela hiperplasia. ^[30] Tem sido estudado com experiências em animais e clínicas o seu propósito como membrana não absorvível para a regeneração óssea e em diversos casos incrementa a regeneração. ^[16]

Os materiais com PCL e os seus híbridos com HA, PLA e sílica, são utilizados em aplicações biomédicas como suportes estruturais e em reparações de tecidos moles e ósseos. O tempo de degradação de um implante de PCL ronda os 2-4 anos; ao fim deste tempo o implante está completamente degradado. No entanto, a co-polimerização ou ligação com os glicóides e/ou lácticos aumenta a velocidade de degradação. Alguns testes *in vivo* têm demonstrado, a par do tempo de degradação referenciado, uma baixa toxicidade dos materiais de PCL e uma não influência na função dos tecidos e células hospedeiras. ^[30]

O PGA é muito provavelmente a membrana bioabsorvível mais estudada em modelos animais, culturas celulares, e usos clínicos; e tem demonstrado um crescimento e adesão celular das células “semeadas” na sua superfície o que evidencia uma boa compatibilidade ao tecido ósseo. ^[16] Desde os anos 60 que tem sido utilizado com sucesso em sistemas de suturas. ^[17]

PLA

O PLA é um dos polímeros biodegradáveis mais promissores devido às suas características mecânicas, termoplásticas, métodos de processamento e propriedades biológicas como a biocompatibilidade e biodegradabilidade. Apesar da morfologia da superfície, porosidade e química superficial serem questões cruciais nas aplicações médicas, têm sido feitos esforços no sentido de conseguir particularizar as características arquitectónicas do PLA. ^[102] Deste modo, é actualmente um material popularmente utilizado em diferentes funções como suturas (VICRYL - sutura bioabsorvível de alta resistência (90PGA:10PLA) comercializável desde 1972 pelo Ethicon ^[102]), parafusos cirúrgicos, sistemas de libertação controlada de proteínas e fármacos, manufactura de equipamentos médicos, pensos cirúrgicos e estruturas de suporte para a engenharia dos tecidos. ^[22, 100]

Para os sistemas de libertação controlada de fármacos têm sido produzidas fibras ocas de PLLA. ^[101] As micro e nanopartículas, de baixa toxicidade e degradabilidade hidrolítica, são fundamentais na categoria dos sistemas de libertação controlada em medicina ^[101]; devido à alta resistência das fibras de PLLA, estas têm sido utilizadas como estruturas de suporte para dispositivos de substituição ou aumento de ligamentos, de modo a revezar as fibras não degradáveis como o Dacron ^[37, 143]; e condutas permanentes para vasos sanguíneos. ^[17]

Os polímeros de PLA têm sido utilizados com sucesso em processos de cura e cicatrização de ferimentos ^[30] e estudos recentes mostram que a utilização de placas de PLA tem conseguido melhores resultados no que diz respeito à regeneração óssea quando comparada com as placas não degradáveis de Ti ^[16] e sistemas de fixação de fracturas e osteotomites ^[102]. Foi recentemente aprovada pela FDA Americana, uma forma injectável de PLLA (*Sculptra*®), para a restauração e correcção da perda de gordura ou lipoatrofia facial em pessoas com vírus da imunodeficiência humana. ^[17]

São actualmente utilizados em tecidos subcutâneos *in vivo* (ratos) filamentos de PLA entrançados para aumento de ligamentos. É medida a sua capacidade de carga após a implantação, e tem-se verificado que esta diminui rapidamente e que, após 12 semanas de implantação, já é muito baixa. ^[144] Também sob objecto de estudos está a utilização de filamentos para a regeneração de nervos paralisados de um paciente. Embora os nervos não possam crescer, é possível a sedimentação e proliferação de células específicas (*Schwann*) num polímero que as suporte. Esta abordagem assenta na possibilidade de unir as duas pontas do nervo através de um segmento artificial que preencha o *gap* existente; e que, com o passar do tempo, o suporte desapareça, deixando um canal contínuo de células nervosas. Sozinho ou combinado com outros polímeros biodegradáveis, o PLA providencia um bom suporte para o crescimento celular. ^[102]

O PLLA de alto peso molecular tem robustez suficiente para ser utilizado como material de suporte de carga em aplicações biomédicas, embora sua a degradação seja lenta pelo seu reforço cristalino. ^[101] Alguns produtos ortopédicos com base em PLLA incluem: *Phantom Soft Thread Soft Tissue Fixation Screw*®, *Phantom Suture Anchor*® (DePuy), *Full Thread Bio Interference Screws*® (Arthrex), *BioScrew*®, *Bio-Anchor*®, *Meniscal Stinger*® (Linvatec), e

Clearfix Meniscal Dart® (*Innovative Devices*).^[17] Os perfis circulares de PLA têm sido frequentemente utilizados como estruturas de suporte para a formação óssea no músculo para enxertos na tíbia.^[102]

Numa tentativa de expansão da aplicabilidade dos polímeros alifáticos, e porque quer a HA ou outros cerâmicos de fosfato de cálcio, quer os BG com base em silício, dificilmente, ou muito vagarosamente, se dissolvem em condições fisiológicas não preenchendo deste modo completamente os requisitos em algumas aplicações em termos de propriedades mecânicas e características de degradação, torna-se necessário desenvolver um compósito em que as duas fases sejam completamente degradáveis para que haja erosão total do material.^[128] Nesse sentido têm sido utilizados compósitos de polímeros reabsorvíveis e uma fase inorgânica bioactiva nas estruturas de suporte/matrizes^[145], sendo que esta fase inorgânica poderá ser constituída por fibras ou partículas de diferentes compostos cerâmicos ou vidros.^[128]

Com a utilização dos compósitos referidos em aplicações biomédicas conseguem-se ultrapassar factos como a existência de corrosão e falha por fadiga das ligas metálicas e libertação de iões metálicos (Ni e Cr, que provoca o desgaste do implante, desconforto ao paciente e reacções alérgicas), e a baixa tenacidade à fractura dos materiais cerâmicos^[9]. Deste modo, as utilizações dos materiais de suporte de estruturas da ET são mais individualizadas - por exemplo através da utilização simultânea de materiais biológicos e poliméricos conseguimos estruturas de substituição de vasos sanguíneos; e com estruturas compostas por materiais metálicos e biológicos, a reparação/substituição de válvulas cardíacas.^[30] O facto dos tecidos humanos serem essencialmente materiais compósitos com propriedades anisotrópicas, dependentes do papel e rearranjos estruturais dos diferentes componentes (colagénio, elastina, HA) dos tecidos^[9], faz-se com que seja possível a utilização de materiais compósitos poliméricos em diversas aplicações no corpo humano como as representadas na figura seguinte.

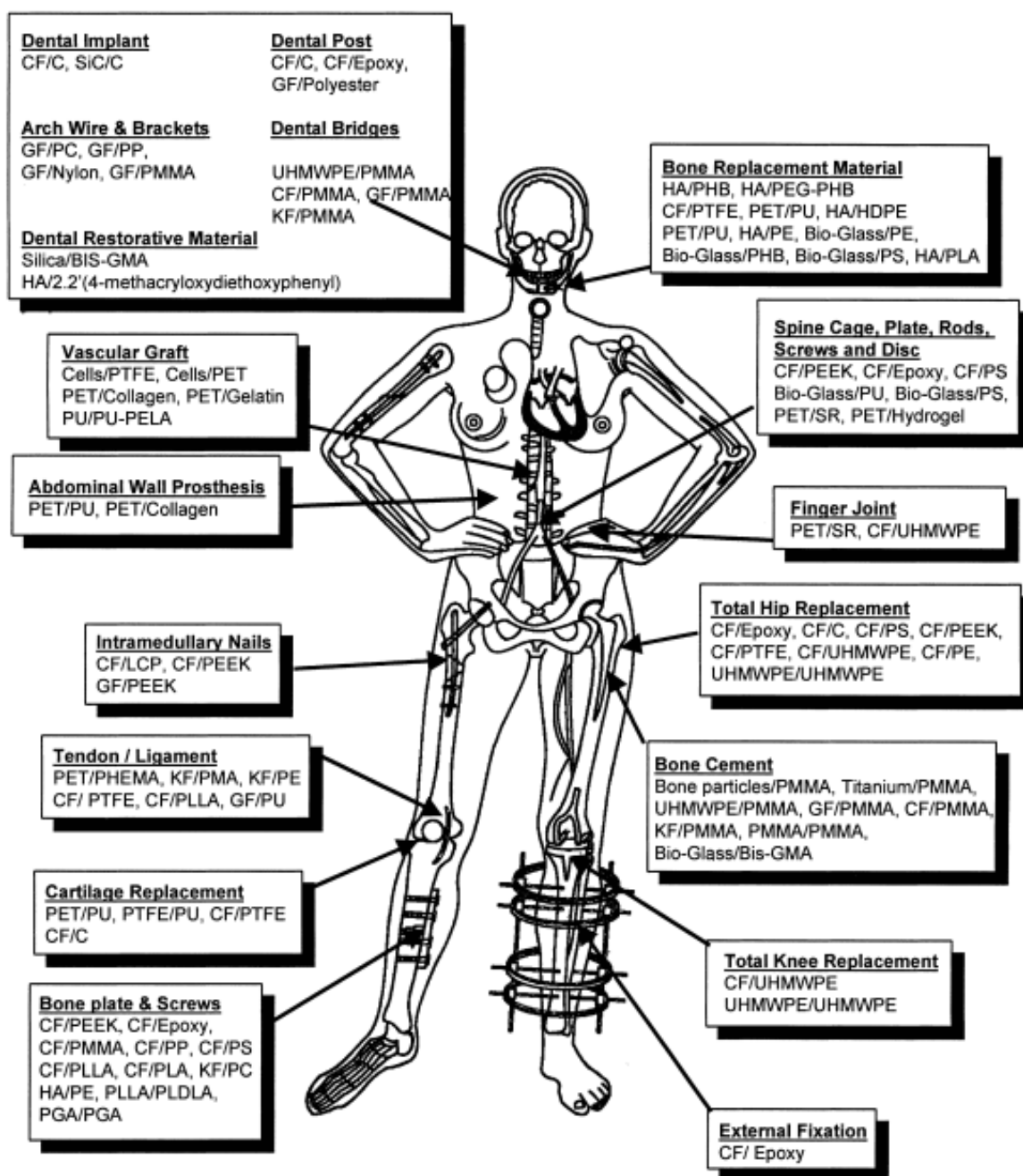


Figura 39 - Várias aplicações de diferentes biomateriais compósitos poliméricos⁵³. [9]

Com o desenvolvimento de novas tecnologias de síntese e análise de biomateriais, é expectável que novos biomateriais sejam desenvolvidos com melhorias implementadas em termos de desempenho e biocompatibilidade. [30]

⁵³ CF - fibra de carbono, C - carbono, GF - fibras de vidro, KF - fibras de Kevlar, PMMA - polimetilmetacrilato, PS - polisulfona, PP - polipropileno, UHMWPE - polietileno de ultra alto peso molecular, PLDLA - poli(L-DL)lático, PLLA - ácido poli(L)lático, PGA - ácido poliglicólico, PC - policarbonato, PEEK - polietetereterecetona, HA - hidroxiapatite, PMA - polimetilacrilato, BIS-GMA - bisfenol A-glicidil metacrilato, PU - poliuretano, PTFE - politetrafluoroetileno, PET - polietilenotereftalato, PEA - polietilacrilato, SR - silicone, PELA - copolímero de ácido lático e polietileno glicol, LCP - polímero cristalino líquido, PHB - polihidroxibutirato, PEG - polietilenoglicol, PHEMA - poli 20 hidroxietil metacrilato). [9]

1.4 Métodos de processamento

Após a escolha do material adequado, a etapa seguinte é a escolha ou o desenvolvimento da técnica para o seu processamento mais adequado. Em termos gerais, devem ser cumpridos os seguintes critérios:

- a) o processo ou produção não deve afectar as propriedades dos materiais em termos de biocompatibilidade ou propriedades físico-químicas;
- b) a técnica deve permitir um controlo de porosidade, tamanho de poros, a sua distribuição e interconectividade; e
- c) grupos diferentes de matrizes devem exibir variações mínimas nas suas propriedades, quando processadas igualmente nas mesmas condições.

Alguns métodos para a elaboração das estruturas de suporte 3D vítreas ou cerâmicas passam pela introdução de diferentes tipos de porosidades, agentes de espuma e emulsificadores, técnica de produção de um sólido de forma livre e a impregnação de um esqueleto de espuma de poliuretano porosa com emulsões cerâmicas, entre outros. ^[10] E para conseguir responder a todos os requisitos específicos das estruturas de suporte e processar estruturas tubulares simples e multitubulares, quando necessárias, a ET utiliza diferentes técnicas processuais que se baseiam em tecnologias têxteis, na separação de fases termicamente induzida, na dissolução selectiva de um polímero num solvente (*solvent casting*) /lixiviação de partículas ^[101], no fabrico de pré-formas de fibras, extrusão com fusão associada, e na combinação de algumas delas. ^[7]

As construções ocas parecidas com condutas podem ser fabricadas por processos com técnicas que têm como princípio a fusão dos materiais. Dentro destas técnicas estão compreendidas a extrusão de misturas de sais com polímeros, seguidos de lixiviação dos primeiros ^[146]; o alinhamento radial de poros ao longo de um tubo através da rotação de uma solução polimérica, seguida de secagem supercrítica e sublimação ^[147]; formação de estruturas tubulares por enrolamento de filmes posteriormente secos ^[148]; a combinação de um polímero que reveste um tecido não-tecido, envolto num mandril ^[149]; ou a junção de vários filamentos que são mergulhados numa solução polimérica, seguida de congelamento e sublimação ^[7]. Acrescente-se ainda o facto de as estruturas multitubulares poderem ser preparadas pelas técnicas de separação de fases: congelamento e sublimação do solvente ^[7]; congelamento do polímero/solvente num gradiente térmico uniaxial seguido de sublimação ^[150]; injeção da suspensão polimérica em moldes com canais pré-fabricados, seguido de sublimação do solvente ^[151, 152]; congelamento seguido de secagem num gradiente térmico uniaxial ^[153]; através do fabrico de pré-formas das fibras ^[154, 155]; e revestimento na solução polimérica seguida de génese de poros degradativa ^[156].

A Tabela 12 resume algumas vantagens e desvantagens de algumas das técnicas anteriormente descritas.

Tabela 12 - Técnicas de fabricação de matrizes porosas.

Métodos	Vantagens	Desvantagens
Separação de fases termicamente induzida ^[9]	Controlo da estrutura e tamanho dos poros através das condições de preparação Consegue-se alta porosidade Possibilidade de obter poros anisotrópicos, tubulares e poros altamente interligados	Utilização de solventes orgânicos Longos tempos de sublimação do solvente (48h) Problemas de contracção
Moldação por compressão seguido de libertação de partículas ^[157]	Porosidade controlável Possível classificação da porosidade das estruturas Não utilização de solventes orgânicos	Pobre interligação e baixa porosidade Dificuldade em conceber-se estruturas de grandes dimensões (espessuras superiores a 3mm) Nem todas as partículas são dissolvidas Possibilidade de danos na encapsulação de moléculas ou células pelo calor
Evaporação de solvente/libertação de partículas ^[158]	Porosidade e interligação controláveis	Estruturas geralmente isotrópicas Utilização de solventes orgânicos
Sinterização de microesferas ^[159]	Porosidade controlável Possibilidade de fabricação de formas complexas	Utilização de solventes orgânicos Estruturas geralmente isotrópicas
Prototipagem rápida ^[160]	Possibilidade de fabricação das estruturas com a exacta medida do tecido alvo Viável a encapsulação de proteínas e células	Alguns métodos recorrem a solventes orgânicos

1.5 Métodos de caracterização

A caracterização física, química, mecânica e biológica das matrizes de utilizadas em ET, que agem como biomateriais através de testes funcionais, morfológicos e biológicos, permite avaliar as propriedades intrínsecas do material e as implicações decorrentes do seu uso.

1.5.1 Testes funcionais

Uma estrutura de substituição e/ou de orientação deve ser testada em termos da sua funcionalidade precedentemente à sua utilização na substituição ou reparação de um tecido alvo, respectivamente o teste funcional é dependente do tipo de estrutura em questão e das funcionalidades requisitadas à mesma. Mas de uma forma geral, os testes funcionais incluem testes mecânicos, contráteis e bioquímicos.

Tal como as restantes propriedades dos materiais, as propriedades mecânicas estão também dependentes de diversos factores como as condições de fabrico, armazenagem e de utilização do material; e dimensões, geometria e defeitos internos do provete a testar. Deste modo foram definidos testes padrão que permitem comparar o comportamento de diferentes materiais. Fazem parte desses testes padrão os ensaios de tracção, compressão pura e flexão.

Os testes mecânicos são normalmente exigidos em estruturas utilizadas na substituição de estruturas de condução de fluidos, suporte mecânico e desempenho, como os vasos sanguíneos, as válvulas cardíacas, os ossos e articulações. São comumente avaliadas as propriedades mecânicas da estrutura em termos de módulo de elasticidade ou módulo de

Young, tensão de cedência, alongamento após rotura e máxima resistência mecânica ^[30]. Estes dados são posteriormente representados pela relação entre tensão e extensão, descrita por expressões matemáticas - equações constitutivas. Estas equações podem ser utilizadas posteriormente como modelo de propriedades mecânicas dessa estrutura e os coeficientes dessas equações constitutivas podem ser usados para representar a rigidez do material da estrutura de suporte construída. A resistência máxima da estrutura pode ser avaliada pelo teste de tensão de cedência do material utilizado na construção da mesma. ^[5]

Um dos testes mais úteis para conhecimento do comportamento mecânico do material é o teste de tracção (Figura 40). Neste ensaio submete-se um provete do material a uma força continuamente crescente até se observar a sua rotura. A força aplicada é uniaxial e faz-se uma observação e registo simultâneo do alongamento sofrido pelo provete. Os provetes são geralmente normalizados com dimensões e proporções geométricas previamente estabelecidas (normas portuguesas, DIN - Alemanha, BS - Inglaterra, ASTM - EUA).

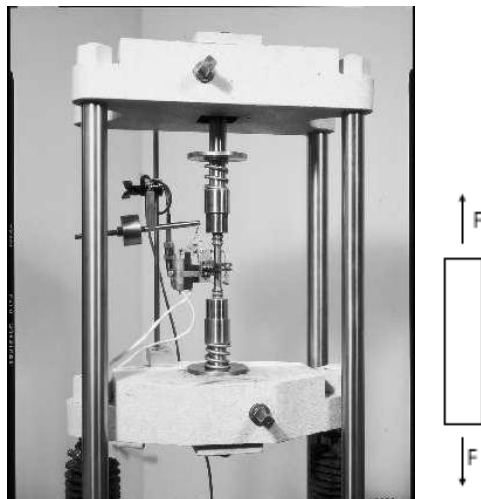


Figura 40 - Exemplo de máquina de ensaio de tracção. ^[114]

Obtida continuamente durante o ensaio ou a partir de medições simultâneas de carga e deslocamento do comprimento de deformação do provete, a curva típica de carga-extensão de um material dúctil é representada na figura seguinte.

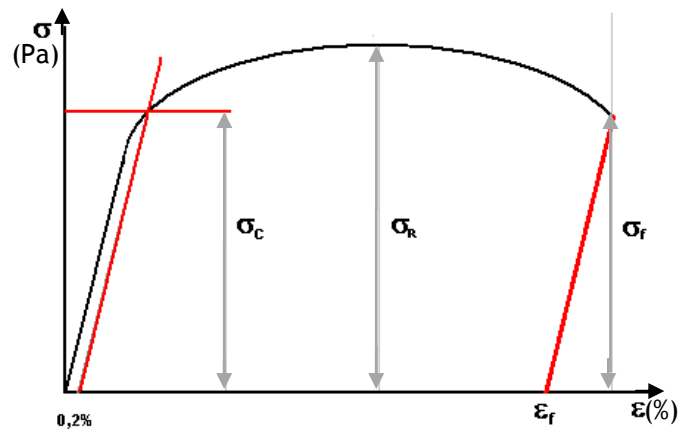


Figura 41 - Gráfico típico de tensão nominal (σ , Pa) vs. extensão nominal ⁵⁴ (ϵ , %) obtido num ensaio de tracção uniaxial dum material dúctil (sendo σ_c - tensão de cedência, σ_R - resistência à tracção, ϵ_f - alongamento de rotura e σ_c - tensão final precedemente à rotura).

A tensão nominal (σ) obtém-se pela divisão da carga (P) pela menor área inicial da secção transversal do provete (A_0):

$$\sigma = \frac{P}{A_0} \quad (\text{Eq. 10})$$

A extensão nominal utilizada (ϵ) é a extensão linear média obtida pela divisão do aumento do comprimento do provete - Δl , pelo comprimento do provete que sofre deformação - l_0 . Deste modo,

$$\epsilon = \frac{\Delta l}{l_0} = \frac{l - l_0}{l_0} \quad (\text{Eq. 11})$$

em que l é o comprimento instantâneo.

A forma e os resultados numéricos da curva tensão-extensão, Figura 41, dependem da composição, tratamento térmico, história de carga, velocidade de deformação, temperatura e estado de tensão impostos durante o ensaio; e os parâmetros que a descrevem são os parâmetros de resistência - resistência à tracção, σ_R e tensão de cedência, σ_c ; e os parâmetros de ductilidade - alongamento à rotura, ϵ_f e redução de área, Z .

$$\text{A resistência à tracção, } \sigma_R = \frac{P_{\text{máx.}}}{A_0} \quad (\text{Eq. 12})$$

é a carga máxima obtida no ensaio a dividir pela área inicial da secção transversal do provete.

O início da deformação plástica de um material pode ser caracterizado pelo seu ponto de cedência ou tensão de cedência, σ_c (Figura 41). Esta é a tensão necessária para produzir uma

⁵⁴ Esta curva não tem em conta a variação efectiva da área da secção transversal do provete que decresce durante o ensaio, provocando uma diminuição na carga necessária para prosseguir a deformação. A curva que nos dá a indicação verdadeira das características de deformação do material é a curva tensão verdadeira - extensão verdadeira obtida com valores instantâneos da área do provete e extensão, também conhecida como curva de deformação.

extensão plástica de 0,2%, e obtém-se a partir da intersecção da curva tensão-extensão com uma linha recta paralela à região elástica da curva e desviada de um valor de 0,2%. Assim, a

$$\text{tensão de cedência, } \sigma_c = \frac{P_{0,2}}{A_0} \quad (\text{Eq. 13})$$

em que $P_{0,2}$ é a carga que provoca uma extensão permanente de 0,2% no provete.

As medidas de ductilidade têm interesse em diferentes aspectos pois podem indicar o grau de deformabilidade de um material até à sua rotura. A ductilidade pode ser caracterizada pelo

$$\text{alongamento de rotura, } \varepsilon_f \text{ (Figura 41): } \varepsilon_f = \frac{l_f - l_0}{l_f} \quad (\text{Eq. 14})$$

em que l_f é o comprimento final de rotura do provete; e pela

$$\text{redução de área: } Z = \frac{A_0 - A_f}{A_0} \quad (\text{Eq. 15})$$

onde A_f é a área final ou área no instante da rotura do provete.

Um material capaz de sofrer grandes deformações plásticas antes de atingir o seu ponto de rotura é considerado dúctil; em oposição, os materiais que atingem a rotura para pequenas deformações plásticas são frágeis. No entanto, muitos materiais apresentam, pelo menos no seu ramo elástico, uma proporcionalidade entre a tensão e deformação, pelo que são intitulados materiais elásticos lineares. Uma das constantes elásticas dos materiais advém desta proporcionalidade

$$\sigma = E \varepsilon \quad (\text{Eq. 16})$$

em que E é o módulo de elasticidade de *Young*. Assim, um maior valor do módulo de elasticidade de *Young* indica um material que, para o mesmo nível de tensão, se deforma menos. A relação anterior representa uma relação linear, portanto, é válida apenas na região onde o material tem um comportamento elástico, ou seja, na região inicial da curva de tracção. ^[114]

Os testes contrácteis são específicos para a apreciação da função de tecidos musculares contrácteis. As estruturas-tecido substitutas de tecidos musculares podem ser construídas através da integração do tronco muscular ou células progenitoras em estruturas de suporte, através da ET. A contractilidade da estrutura-tecido substituta do tecido muscular pode ser mensurada pela medição das forças geradas pelas células musculares integradas e/ou pela deformação do substituto muscular. Estas forças podem ser testadas pelo uso de transdutores de força, e a deformação pela medição das alterações nas dimensões do substituto muscular. Na prática, a contracção das células musculares pode ser induzida por estimulação eléctrica ou química; e, para um dado nível de estimulação, quanto maior a força gerada ou a deformação, maior é a contractilidade. ^[161]

Os testes bioquímicos podem ser concebidos e realizados para testar as funções das construções-tecido como a produção de hormonas, enzimas e factores reguladores; e podem ser estabelecidos vários ensaios para esse propósito, dependendo das funções de um

determinado tipo de células. Por exemplo, para uma construção artificial de substituição do tecido pancreático é necessário testar o nível de insulina; e para um tecido fabricado para auxiliar a recuperação do fígado é parâmetro indicativo crítico de funcionamento a albumina. [5]

1.5.2 Testes morfológicos

Após a implantação de uma estrutura-tecido é necessário testar a sua morfologia e relação estrutural com os seus tecidos vizinhos, o que dará informação crucial na avaliação do desempenho e integração desta construção-tecido implantada no tecido hospedeiro.

Como primeiro passo, a estrutura-tecido implantada deve ser identificada em termos de propriedades estruturais dos materiais utilizados na sua construção, muitas vezes através de marcadores específicos como a proteína verde fluorescente (GFP - *green fluorescent protein*).

O segundo passo passa por examinar a anatomia da construção-tecido, a microestrutura das células implantadas e a MEC associada. Pode ser utilizada uma abordagem histológica para avaliar a morfologia global desta construção tecido [5] com recurso à microscopia de força atómica (AFM - *atomic force microscopy*) para conhecer a topografia da estrutura, e espectroscopia fotoelectrónica de raios X (XPS - *X-ray photoelectron spectroscopy*) para caracterizar a composição superficial [22]. E uma abordagem a nível de microscopia electrónica para avaliar a microestrutura das células da MEC. Para além disso, a estrutura e organização dos tecidos inflamatórios e os vasos sanguíneos recém-formados, como 1ª resposta imunitária à implantação da estrutura tecido, devem ser avaliados por abordagens similares. [5]

A utilização da técnica DSC permite saber o grau de cristalinidade do polímero.

Nesta técnica é medida a energia calorífica absorvida ou libertada durante o aquecimento ou arrefecimento de uma substância, em relação a uma amostra de referência. Ambas, a amostra e a referência, são mantidas à mesma temperatura durante a análise e, de um modo geral o aumento ou decréscimo da temperatura varia linearmente com o tempo. A capacidade calorífica da amostra de referência deve ser conhecida na gama de temperaturas a testar. [110]

Outra das aplicabilidades desta técnica que aparece como um degrau na linha de base do sinal DSC e pode ocorrer à medida que a temperatura de um sólido amorfo aumenta, é T_g . À medida que a temperatura é aumentada, as moléculas constituintes do sólido amorfo ganham liberdade para se movimentarem espontaneamente e reorganizarem-se numa forma cristalina (T_c). E, uma vez que esta transição de sólido amorfo para sólido cristalino é um processo exotérmico, resulta num pico no sinal DSC. [54]

A microscopia electrónica de varrimento, SEM - *Scanning electron microscope*, permite-nos obter imagens de alta resolução da superfície de uma amostra, pelo que esta técnica é utilizada para avaliar a morfologia da amostra. O SEM é um microscópio que utiliza electrões

ao invés de luz para formar a imagem, o que traz vantagem relativamente aos microscópios tradicionais, isto é, tem uma elevada profundidade de campo e uma resolução superior.

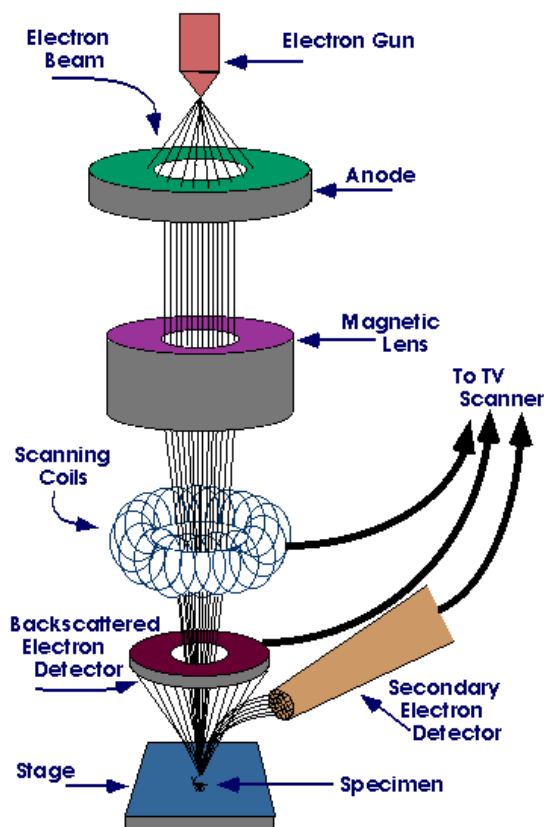


Figura 42 - Esquema exemplificativo do modo de funcionamento do SEM. ^[162]

Na figura anterior é visível o modo de funcionamento do SEM. Inicialmente há produção de um feixe de electrões que atravessa verticalmente a coluna do microscópio e que é mantido em vácuo. Posteriormente, esse feixe de electrões percorre lentes e campos electromagnéticos que o focam na direcção da amostra. Uma vez atingida a amostra, são ejectados electrões e raios-X da amostra que são detectados e convertidos em sinais produzindo uma imagem final. ^[162]

A degradabilidade do dispositivo pode ser um aspecto morfológico a considerar, e esta pode ser inferida pelo método de perda de massa ou pela cromatografia de permeação em gel (GPC - *Gel Permeation Chromatography*).

No método de perda de massa é inicialmente verificada a massa da estrutura e posteriormente imersa em água destilada, solução tampão tris-HCL (tris(hidroximetil)aminometano), ou soro fisiológico (SBF - *simulated body fluid*) a 37°C. Após um certo período de tempo, a água é removida e as amostras de novamente pesadas depois de secas a 60°C durante 24h ^[47]. A perda de massa é expressa em mg g^{-1} e o declive do gráfico da perda de massa em função do tempo em h permite obter o valor da velocidade de degradação em termos de $\text{mg g}^{-1} \text{h}^{-1}$.

O GPC é uma técnica cromatográfica que tem por princípio a separação de moléculas com volumes hidrodinâmicos diferentes; e o que distingue esta técnica da vulgar SEC (*Size Exclusion Chromatography*) é o uso de um solvente orgânico como fase móvel. Com esta técnica é possível determinar o peso molecular, viscosidade molecular, entre outros parâmetros da amostra.

O funcionamento desta técnica (Figura 43) reside na separação de moléculas que estão diluídas no interior de um solvente e que passam numa coluna com uma determinada porosidade. O tipo de interação que existe é de apenas interferência do tamanho das moléculas com o tamanho dos poros, ao contrário de outras técnicas onde podem ser usadas interferências químicas ou/e físicas. O tempo de residência das moléculas de análise no interior dos poros é em função do tamanho destas.

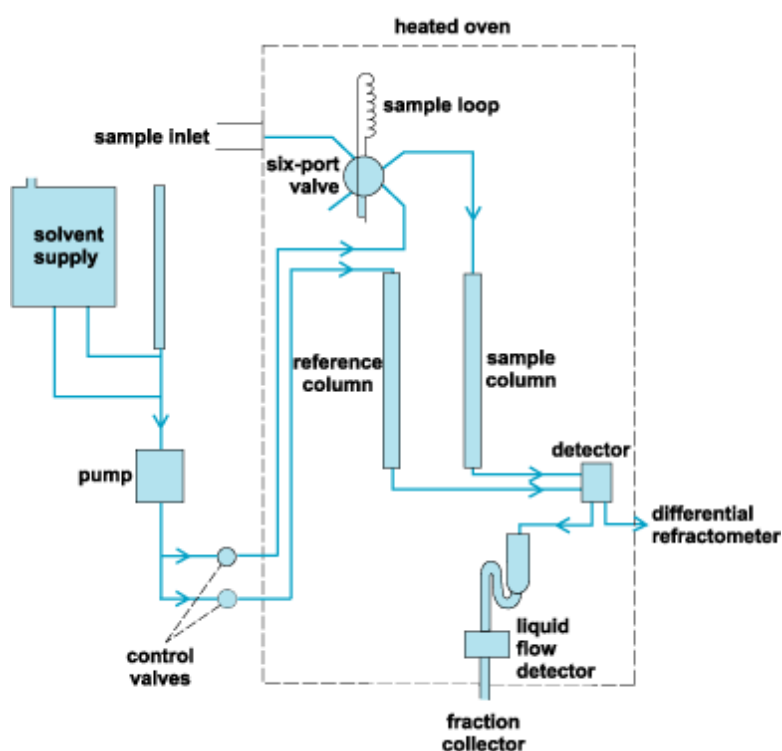


Figura 43 - Esquema representativo do funcionamento do equipamento GPC.^[9]

Um dos aspectos mais importantes reside na escolha da coluna de retenção adequada, pois se o polímero a ser analisado é demasiado pequeno, ou grande, não será contabilizado, originando erros, pois o volume que é analisado é inferior ao de origem. Deste modo, se o comprimento do polímero estiver compreendido numa gama demasiado extensa, será necessário acoplar tantas colunas quantas as necessárias para garantir a cobertura total dessa gama.

A grandeza que a técnica GPC mede verdadeiramente é o volume molecular e a viscosidade intrínseca que em presença de padrões podem traduzir-se em pesos moleculares com $\pm 5\%$ de precisão.

Este tipo de técnica oferece vantagens na determinação do peso molecular, pois a análise consegue ser realizada num curto espaço de tempo. Existe ainda a perda reduzida do polímero a analisar, pois este não reage com a coluna de retenção. Além disto, é possível observar os picos de concentração de uma forma definida.

1.5.3 Testes biológicos

A aplicação da engenharia dos tecidos no desenvolvimento *in vitro* de um tecido com características similares às do local receptor baseia-se na tríade de células, mediadores e estrutura de suporte. As células apropriadas são cultivadas em associação com mediadores solúveis (factores de crescimento, e proteínas morfogenéticas) que estimulam a divisão celular ou a indução morfogenética. Estas células são posteriormente colocadas numa estrutura de suporte que possibilita um crescimento tridimensional. Neste sentido, torna-se indispensável testar o crescimento e viabilidade das células resultantes desse cultivo.

As amostras a testar podem ser colhidas periodicamente para serem posteriormente analisadas em diferentes abordagens - teste da densidade celular, proliferação e apoptose.

O teste da densidade celular pode ser avaliado pela identificação e contabilização dos núcleos das células mononucleadas por unidade de área - os núcleos das células podem ser identificados com pigmentos fluorescentes diferentes para ADNs (Ácido desoxirribonucleico) específicos, ou pigmentos histológicos. Este teste de densidade celular é de fácil execução e fiável em termos de avaliação da viabilidade celular.

O teste de proliferação celular pode ser conduzido para estimar se as células da estrutura-tecido construída estão sujeitas ao crescimento e divisão celular (MTT que utiliza o substrato 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazoliumbromide e ELISA - *enzyme-linked immunosorbent assay* ^[26]); e o teste de apoptose pode ser utilizado para avaliar a razão de morte celular. ^[5] As células são muitas vezes marcadas recorrendo ao fluorescente do filamento intermediário da proteína vimentina⁵⁵, e a contagem celular feita recorrendo à microscopia fluorescente. ^[26]

O teste biológico pode também ser designado pelo teste de biocompatibilidade. Ou seja, a determinação de possíveis efeitos de toxicidade ou da viabilidade destes dispositivos no processo de adesão, crescimento e diferenciação celular após implantação.

A cultura celular anteriormente referida para avaliação da densidade e proliferação celular, pode também ser utilizada para o conhecimento da citotoxicidade de um material. Para que este possa ser designado não citotóxico, deve necessariamente, não causar a morte das células ou de algum modo alterar as funções das mesmas. A avaliação deste comportamento pode ser realizada através da análise da morfologia celular recorrendo à já referenciada indicação de actividade metabólica pela utilização de corantes.

⁵⁵ Os filamentos intermediários são fibras proteicas duras e resistentes encontradas no citoplasma da maioria das células animais e podem ser agrupados em 3 classes: filamentos de queratina, vimentina e filamentos relacionados com esta, e neurofilamentos. ^[15]

Um resultado negativo em termos de citotoxicidade indica que à partida o material está livre de componentes que possam ser danosos ou que estes estão presentes em quantidades ínfimas no dispositivo e insuficientes para originar efeitos agudos em células isoladas, sob condições extremas. Um resultado positivo indicia que o material contém na sua constituição uma ou mais misturas de substâncias que são libertadas e que podem ter importância clínica. No entanto, em ambos os casos devem ser feitos estudos que corroboram os obtidos na bibliografia e no caso de haver citotoxicidade confirmada, os estudos devem ser feitos no sentido de determinar a utilidade do material.

1.6 Osso

O osso é um tecido⁵⁶ conjuntivo vivo, especializado, em crescimento constante, de estrutura mineralizada porosa constituída por uma matriz e células ósseas, e que tem como funções suportar o peso corporal, proteger os órgãos⁵⁷ internos, acumular minerais e produzir eritrócitos. ^[163] A sua composição varia consoante a espécie, idade, sexo, o osso específico e se esse osso está ou não afectado por alguma lesão. ^[164]

1.6.1 Constituição óssea

A composição da matriz óssea é responsável pelas características do osso; e as células ósseas, enclausuradas na matriz, produzem-na e posteriormente destroem-na para que haja uma renovação da matriz velha por uma nova. ^[29, 165] Embora seja uma das substâncias mais duras do corpo humano, o osso é um tecido dinâmico, que muda de forma, constantemente, dependendo da força aplicada. Por exemplo, as pressões aplicadas ao osso levam à sua reabsorção, enquanto a tracção aplicada ao osso resulta no desenvolvimento de osso novo. ^[165]

No que diz respeito ao seu peso, a matriz óssea é constituída aproximadamente por cerca de 35% de material orgânico e 65% de material inorgânico ^[1]. O material orgânico é fundamentalmente o osteoide (glicoproteínas, fibras de colagénio e proteoglicanos ^[163]), que fornece a flexibilidade e resistência à tracção; proteínas não-colagenosas onde são incluídos os factores de crescimento ($\leq 1\%$) ^[1]; e o material inorgânico, composto por cristais de fosfato de cálcio - HA ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), que conferem ao osso a sua excepcional resistência à compressão. ^[38, 166, 167]

O colagénio e os componentes minerais são responsáveis pelas principais características funcionais do tecido ósseo. ^[163] Comparando-se frequentemente a matriz óssea ao betão armado; o colagénio seria a verga de aço reforçado, conferindo a resistência flexível à matriz, e os componentes minerais seriam equiparados ao cimento, conferindo à matriz a sua

⁵⁶ Um tecido é um conjunto de células especializadas, iguais ou diferentes entre si, que realizam uma determinada função num organismo multicelular. ^[19, 20]

⁵⁷ Os órgãos são compostos de dois ou mais tecidos diferentes, têm funções específicas e geralmente apresentam uma forma reconhecível. ^[19, 20]

resistência à compressão. Ou seja, se fossem retirados a um osso longo todos os seus constituintes minerais, o colagénio tornar-se-ia o seu principal constituinte e o osso tornar-se-ia muito flexível. Por outro lado, se isto sucedesse o componente mineral tornar-se-ia o principal constituinte do osso e este tornar-se-ia frágil e quebradiço. ^[165]

As células ósseas classificam-se em osteoprogenitoras (ou células progenitoras osteocondrais), osteoblastos, osteócitos e osteoclastos, que têm funções e origens diferentes. ^[20, 38, 163]

As osteoprogenitoras são células indiferenciadas que estão na superfície dos ossos e em ossos com medula e artérias que sofrem mitose e se desenvolvem como osteoblastos.

Os osteoblastos produzem o colagénio, os proteoglicanos, e formam vesículas que acumulam iões cálcio (Ca^{2+}), iões fosfato (PO_4^{2-}) e várias enzimas. Através da união dos prolongamentos celulares entre osteoblastos, chamadas *gaps*, seguida da formação da MEC óssea mineralizada que segregam, dá-se a ossificação ou osteogénese - formação do osso pelos osteoblastos.

A partir do momento em que um osteoblasto fica rodeado por matriz óssea, torna-se uma célula madura designada osteócito. Os osteócitos constituem a maioria das células ósseas e encontram-se dentro da matriz óssea. Os espaços ocupados pelos seus corpos celulares chamam-se lacunas e os espaços ocupados pelos seus prolongamentos celulares, canalículos. É pelo facto do prolongamento das células ósseas estarem em contacto uns com os outros através dos canalículos, que o osso é distinguível da cartilagem. Também por esta razão é que os nutrientes e gases podem circular através da pequena quantidade de líquido que envolve as células nos canalículos e nas lacunas, ou passar de célula para célula através das *gaps* que unem os prolongamentos celulares, em vez de se difundirem através da matriz mineralizada.

Os osteoclastos são células grandes com vários núcleos e são responsáveis pela destruição da matriz através da reabsorção ou destruição do osso. Isto porque, no local em que a membrana celular dos osteoclastos contacta com a matriz óssea, formam-se numerosas projecções que constituem um bordo pregueado, e os iões de hidrogénio bombeados através desse bordo, produzem um meio ácido que provoca a descalcificação da matriz óssea. Adicionalmente, os osteoclastos também libertam enzimas que digerem os componentes proteicos da matriz. Finalmente, através de endocitose, alguns dos produtos que resultam da reabsorção do osso são conduzidos para o interior do osteoclasto. ^[167]

A figura seguinte mostra a sequência de desenvolvimento de células ósseas num osso cortical humano.

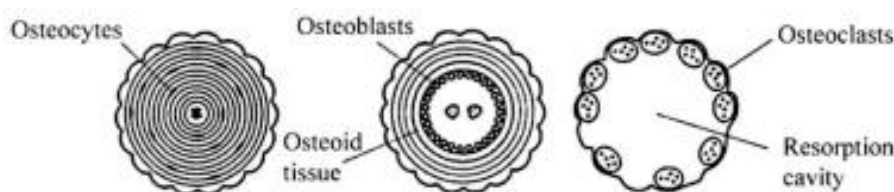


Figura 44 - Sequência de regeneração óssea num osso cortical. ^[164]

1.6.2 Regeneração óssea

O tecido ósseo, continuamente em remodelação durante o tempo de vida na maioria dos vertebrados, onde se inclui o ser humano ^[2], classifica-se em osso reticular ou lamelar de acordo com a organização das fibras de colagénio no seio da matriz óssea ^[164]. No caso do osso reticular⁵⁸, as fibras de colagénio orientam-se aleatoriamente em muitas direcções. Este é o primeiro a ser formado no decurso do desenvolvimento fetal ou da reparação de uma fractura. Uma vez formado, os osteoclastos degradam o osso reticular e os osteoblastos constroem, em seguida, uma nova matriz. A esta renovação óssea dá-se o nome de remodelação; e o osso reticular é reorganizado de modo a formar-se osso lamelar.

Quer o osso reticular, quer o osso lamelar podem ser classificados de acordo com a relação entre a quantidade de matriz óssea e a quantidade de espaços contidos o osso. O osso esponjoso contém menor quantidade de matriz óssea e mais espaço do que o osso compacto; o osso compacto apresenta as quantidades inversas.

O osso lamelar é um osso maduro que se organiza em finas camadas de cerca de 3-7µm de espessura - lamelas. De um modo geral, as fibras de colagénio de cada lamela estão dispostas paralelamente entre si, e anguladas relativamente às fibras de colagénio das lamelas adjacentes. E os osteócitos, no interior das suas lacunas, dispõem-se em camadas “comprimidas” entre as lamelas.

O osso esponjoso é constituído por bastonetes ou placas ósseas interligadas e denominadas trabéculas. Entre as trabéculas existem espaços que, no osso vivo, são preenchidos por medula óssea e vasos sanguíneos. Estas encontram-se orientadas ao longo das linhas de stress mecânico (ou linhas de tensão) no interior do osso, que se realinham de acordo com novas linhas de stress, caso a direcção do stress de compressão se altere (por exemplo, porque um fractura se consolida numa posição inadequada). O osso esponjoso é assim designado devido ao seu aspecto esponjoso.

O osso compacto é mais denso e possui menos espaços do que o osso esponjoso. Os vasos sanguíneos penetram na própria substância óssea, e os osteócitos e as lamelas do osso compacto orientam-se predominantemente em torno desses vasos sanguíneos. ^[20, 29, 167]

A figura seguinte mostra o exemplo do fémur, osso longo claramente não homogéneo, constituído por dois tipos de ossos: o tecido cortical/compacto ósseo e o tecido trabecular ósseo/esponjoso.

⁵⁸ Também denominado por osso neoformado, não lamelar ou imaturo, *woven bone*. ^[167]

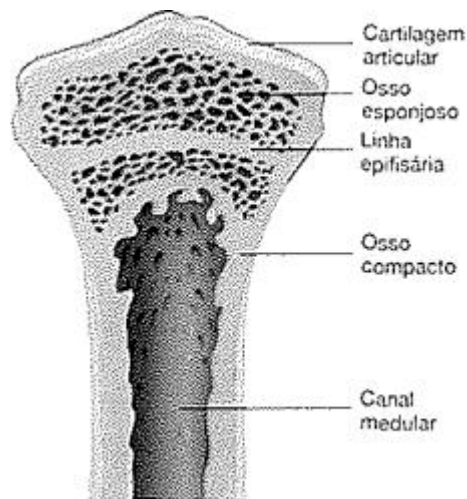


Figura 45 - Secção longitudinal do osso maduro do fêmur humano. ^[166]

O osso pode crescer, modificar a sua forma (remodelação externa ou modelação), auto-reparar-se e continuamente renovar-se através de remodelação interna. Todos estes processos são geridos por padrões mecânicos, hormonais e fisiológicos.

O crescimento e modelação ocorre maioritariamente durante a infância, a auto-reparação durante a reparação de uma fractura, e a renovação contínua dá-se ao longo da vida, tendo um papel fundamental na evolução da microestrutura do osso e, consequentemente, nas propriedades estruturais e micro-reparações. ^[164]

As diferentes estruturas e constituintes do osso cortical e trabecular, resultam em diferentes propriedades mecânicas que estão dependentes de, entre outros aspectos, da espécie específica em análise, da idade do indivíduo, do local anatómico do osso e do seu conteúdo líquido, etc.

A tabela seguinte evidencia a consequência da idade nas propriedades mecânicas do osso cortical do fêmur humano.

Tabela 13 - Resistência à tracção (MPa) do osso cortical do fêmur humano em função da idade do mesmo (anos). ^[168]

Property	Age (years)						
	10 - 20	20 - 30	30 - 40	40 - 50	50 - 60	60 - 70	70 - 80
Ultimate strength (MPa)							
Tension	114	123	120	112	93	86	86
Compression	-	167	167	161	155	145	-
Bending	151	173	173	162	154	139	139
Torsion	-	57	57	52	52	49	49

O desenvolvimento ósseo, durante a fase fetal ^[169], existe em dois padrões - ossificação de membrana ou membranosa e ossificação endocondral⁵⁹; e em ambos, o processo inicia-se pela produção do osso reticular que posteriormente é remodelado. Após a remodelação o osso produzido pelos dois padrões é indistinguível.

O crescimento ósseo não pode ser feito intersticialmente, ou seja, só pode ser feito aposicionalmente (a formação do novo osso é feita na superfície do osso antigo ou da cartilagem). Por exemplo, as trabéculas crescem através da deposição na sua superfície, pelos osteoblastos, de nova matriz óssea. O crescimento ósseo pode ser feito em termos de comprimento e em espessura; a sua forma e tamanho potenciais assim como a estatura final de um indivíduo adulto são determinadas geneticamente, embora factores como a nutrição e as hormonas possam modificar grandemente a expressão desses factores genéticos. ^[163]

Na remodelação óssea, resultado de um balanceamento entre os osteoclastos e os osteoblastos, os osteoclastos removem/reabsorvem o osso velho e os osteoblastos depositam o osso novo em igual quantidade. ^[2, 170] Esta remodelação converte deste modo o osso reticular em osso lamelar, e está envolvida no crescimento ósseo, na modificação da configuração óssea - renovação do esqueleto, na adaptação dos ossos ao *stress* mecânico - manutenção da integridade do osso, na reparação óssea e na regulação dos iões cálcio no organismo - homeostase mineral. ^[20, 38, 163, 167]

Sendo o osso um tecido vivo, pode ser reparado após uma lesão; e esta reparação tem como base 4 etapas ^[33, 167, 171]:

- i. Formação do hematoma (Figura 46 - 1.)- massa localizada de sangue provocada após a fractura do osso quando os vasos sanguíneos aí existentes extravasam sangue, confiando-o a um órgão ou espaço. Habitualmente, o sangue do hematoma forma um coágulo, ou seja, proteínas que detêm a hemorragia. A cisão dos vasos sanguíneos centrais resulta num aporte de sangue inadequado aos osteócitos, pelo que o tecido ósseo adjacente à fractura morre. Muitas vezes, após a lesão, surge a inflamação e edema dos tecidos em torno do osso fracturado.
- ii. Formação do calo ósseo (Figura 46 - 2.)- massa de tecido que se forma no local da fractura e que une os topos ósseos fracturados. O chamado calo interno forma-se entre as extremidades fracturadas do osso e canal medular (no caso de fractura de um osso longo). Após vários dias, começam a crescer vasos sanguíneos para o interior do coágulo e à medida que este se dissolve, os macrófagos removem os restos celulares, os osteoclastos destroem o tecido ósseo morto e os fibroblastos produzem fibras de colagénio e outros materiais extracelulares, com o objectivo de formar uma rede fibrosa mais densa que ajuda a manter o osso unido. Os condroblastos⁶⁰ começam a produzir cartilagem nessa rede fibrosa e os osteocondrais transformam-se em osteoblastos e produzem novo osso. Uma vez que

⁵⁹ A formação do osso tem lugar em membranas de tecido conjuntivo e na cartilagem, respectivamente. ^[167]

⁶⁰ Derivados das células progenitoras osteocondriais.

a produção de cartilagem é mais rápida que produção do osso forma-se um colar osteocartilagíneo - calo externo - em torno dos topos opostos dos fragmentos ósseos, estabilizando-os. É nesta fase que a medicina moderna e a ET auxiliam a natureza, utilizando aparelhos exteriores de imobilização ou implantação cirúrgica de suportes.

- iii. Ossificação do calo (Figura 46 - 3.)- à semelhança do que se passa durante o desenvolvimento fetal, a cartilagem do calo externo é substituída por osso esponjoso reticular por meio de ossificação endocondral.
- iv. Remodelação óssea (Figura 46 - 4.)- preenchimento do hiato entre os fragmentos ósseos com um calo interno de osso reticular e substituição deste, e do osso morto adjacente, por osso compacto. Esta remodelação é morosa, mas pode ser tão perfeita ao ponto de não serem visíveis quaisquer marcas da fratura óssea. No entanto, a zona reparada permanece mais espessa do que o osso adjacente. Se a fratura ocorrer num osso longo, a remodelação restaura também o canal medular.

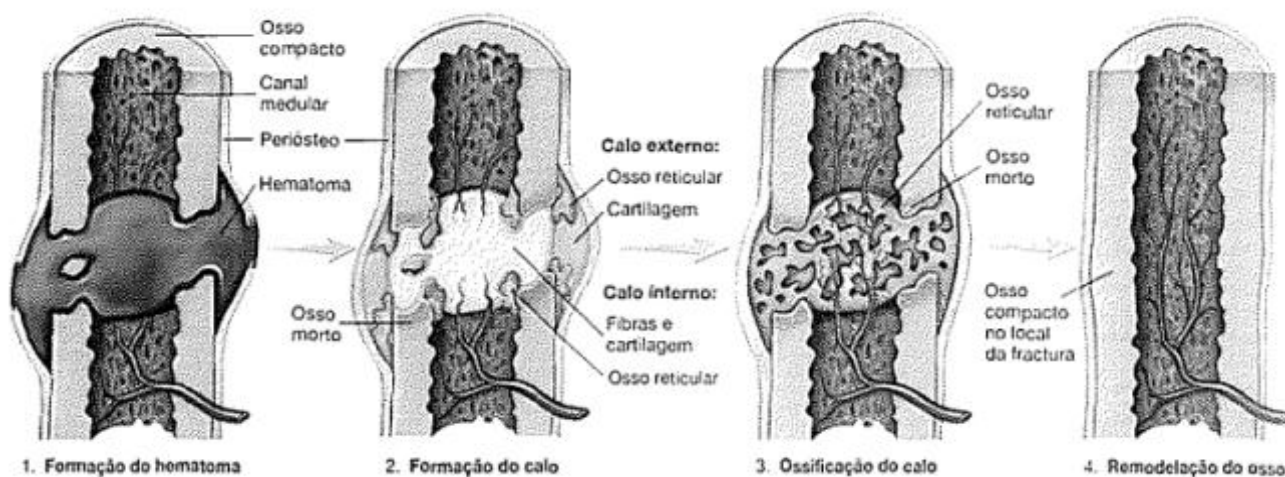


Figura 46 - Estágios de reparação do osso.^[167]

O controlo do crescimento dos tecidos reparados e das suas funções passa por, num primeiro estágio, suprimir a adsorção de peptídeos ou proteínas não específicas ao material polimérico utilizado como cultura celular; uma vez que alterada a superfície do polímero⁶¹ é possível funcionalizá-lo através do estabelecimento de ligações com proteínas ou peptídeos específicos.^[22] O que é facilmente percebido no exemplo de cura de defeitos ósseos em que, quando o agente específico de adesão, a fibronectina, estabelece ligação com a superfície do polímero, esta passa a estar apta para promover adesão celular específica, e a supressão de proteínas não específicas medeia a adesão de outro tipo de células. Nesta área de reparação de defeitos a nível dos ossos, o desafio é conseguir excluir os tipos de células não desejados do local de cicatrização.^[22]

1.6.3 Lesões traumáticas e histórico de soluções reparadoras

A partir do momento em que a esperança média de vida passou a ser superior aos 80 anos ^[1], houve um aumento de lesões e os defeitos ósseos ^[2].

Algumas das doenças ósseas relativas ao crescimento e desenvolvimento humano são o gigantismo⁶², o nanismo⁶³, a osteogénese imperfeita⁶⁴, a osteomielite⁶⁵, os tumores, a osteomalacia⁶⁶ e a osteoporose⁶⁷ (indubitavelmente a mais frequente ^[1]) - Figura 47. ^[167] O envelhecimento e a osteoporose são ambos responsáveis por modificações na proliferação celular, na actividade sintética celular, na reactividade celular aos factores locais, e no número de células estaminais. Estas diferenças biológicas, associadas às diferenças das propriedades ósseas biomecânicas e microarquitectónicas, fazem parte do elevado número de falhas, em termos de osteointegração, dos implantes ósseos de biomateriais em pessoas idosas. ^[1]



Figura 47 - Exemplo de doenças ósseas (gigantismo e nanismo, osteogénese imperfeita, osteomielite e tumor ósseo). ^[167]

Uma vez que o osso consegue regenerar espontaneamente a maioria das suas lesões, algumas fracturas conseguem ser solucionadas com cirurgias ou terapias convencionais. Sempre que há massa óssea suficiente, recorre-se à enxertia óssea, caso contrário, à substituição óssea. Algumas das terapias mais usuais para a resolução destas questões podem ser cingidas a dois grupos: método *Ilizarov* ou transporte do osso e utilização em transplantes

⁶² Perturbação caracterizada por uma estatura anormalmente elevada, que habitualmente resulta da formação excessiva de osso e cartilagem nas placas epifisárias dos ossos longos.

⁶³ Estado em que a pessoa humana tem estatura anormalmente baixa.

⁶⁴ Grupo de doenças genéticas que condicionam os ossos muito frágeis (fracturam facilmente), que ocorrem pela insuficiente formação de colagénio capaz de fortalecer os ossos adequadamente.

⁶⁵ Inflamação do osso que resulta frequentemente de uma infecção bacteriana, e que pode conduzir à destruição completa do osso. Uma osteomielite comum é a tuberculose óssea.

⁶⁶ Ou amolecimento dos osso, que resulta da depleção do cálcio ósseo. Muitas vezes frequente durante a gravidez em que o crescimento do feto requer uma necessidade invulgar de cálcio, e este consegue removê-lo dos ossos da mãe, que conseqüentemente se tornam moles e frágeis.

⁶⁷ Descalcificação óssea causada pelo avançar da idade, hipogonadismo, doenças reumáticas, alterações na tireóide e paratireóide, ou neoplasias, geralmente tratada com terapias de estrogéneos, vitamina D capazes de interferir em processos de crescimento ósseo. ^[1]

de enxertos ósseos (auto, alo e xeno-enxertos, e implantes de diferentes biomateriais). ^[2] A Figura 48 mostra alguns exemplos de fracturas do osso.

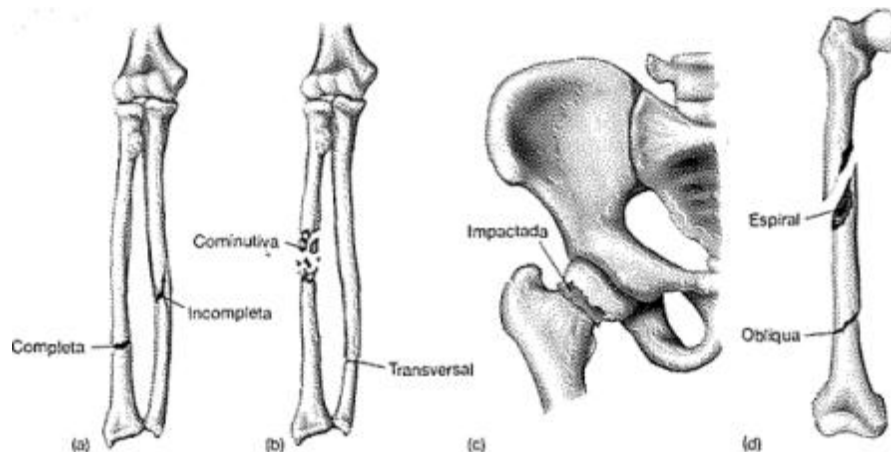


Figura 48 - Exemplo de fracturas ósseas: a) completa e incompleta, b) transversal e cominutiva, c) impactada e d) espiral e oblíqua. ^[167]

A técnica de *Ilizarov*, que consiste em osteotomia seguida de distração óssea, tem vantagem sobre a potencial regeneração óssea natural; no entanto, e embora os problemas posteriormente referenciados dos enxertos deixem de existir, este procedimento cirúrgico acarreta grande transtorno ao paciente uma vez que exige grande tempo de recuperação, muitas vezes também bastante problemática. ^[2]

Os auto, alo e xeno-enxertos ósseos, nomeadamente os utilizados, a par dos substitutos ósseos, em cirurgias maxilofaciais e ortopédicas no auxílio do tratamento de grandes traumatismos ou defeitos pós-cirúrgicos e deformidades congénitas ósseas, embora apresentem resultados satisfatórios sob determinadas condições específicas, ostentam algumas limitações como a disponibilidade dos mesmos, a morbilidade da área dadora, problemas anatómicos e o risco de indução de doenças transmissíveis. Para além destas restrições, apesar da sua alta eficácia, os enxertos vascularizados, presentemente muito requisitados e utilizados na cirurgia, acarretam ainda complicações de infecção e possibilidades de não-união. Acrescentando ainda o facto de este procedimento cirúrgico (enxertia) não ser capaz de responder a questões de grandes reconstituições uma vez que seriam necessárias enormes quantidades de tecido ósseo saudável resultando numa igualmente grande zona do dador com morbilidade local. ^[2, 18, 19, 171]

Os tradicionais implantes metálicos, como as placas para fixação de fracturas ósseas, são muito rígidos quando comparados directamente com o osso e por isso há uma incompatibilidade de módulo elástico. Esta incompatibilidade traz consequências a longo prazo nomeadamente no que diz respeito a absorção de impactos ou cargas exteriores por parte do implante. Há inicialmente uma recuperação da lesão com aumento da resistência do osso fracturado; no entanto, a longo termo podem ocorrer alguns pontos de reabsorção do osso associados a um enfraquecimento pontual e a placa é normalmente removida. ^[8]

Para além dos referidos enxertos e próteses metálicas que incluem variadíssimos metais com o aço inoxidável, ligas de cobalto-crómio e titânio, as opções de reconstrução óssea tradicional comportam também as matrizes ósseas desmineralizadas, colas ósseas, polimetilmetacrilatos, marfim, gesso de Paris e os vidros. Esta abrangente gama de materiais disponíveis para a reconstrução óssea reflecte não só as limitações existentes na imitação óssea como revela também a extrema necessidade de reconstrução do esqueleto ósseo.

Cada método referido tem as suas vantagens na reparação óssea, no entanto todos eles possuem algumas limitações inerentes, entre as quais a morbilidade, possibilidade de transmissão de doenças, o balanceamento entre a doença do enxerto *versus* doença do hospedeiro e insuficiência de recursos para auto-enxertos já referidos, a obrigatoriedade de haver uma fase de reabsorção para que o seu local seja substituído por osso regenerado, irregularidades na interface/topografia, divergências em termos de histocompatibilidade, falhas estruturais, *stress shielding* e infecções. ^[172]

Face às limitações referenciadas e com o propósito de as minorar ou eliminar, o desenvolvimento de biomateriais e a sua implementação na ET e na medicina regenerativa é uma alternativa. Estes substitutos devem ser especialmente desenhados para simular a regeneração óssea e suportar a formação do novo tecido ósseo, conferindo integridade mecânica e funcional ao mesmo. ^[10] A presença dos biomateriais poderá acelerar ou atrasar estes processos, pelo que algumas investigações mostram que, por exemplo, pormenores como a topografia superficial do biomaterial podem influenciar a razão de activação de plaquetas, a agregação dos glóbulos vermelhos, a adesão e actividade macrófaga, a adesão e retracção do coágulo, a vascularização, a adesão de células estaminais e osteoblastos, a proliferação, actividade sintética, e composição e concentração dos factores locais; importantes nos processos de regeneração óssea e osteointegração do biomaterial. ^[1]

Na figura seguinte podem ser vistos os passos de uma regeneração óssea 3D recorrendo à ET. É inicialmente necessária a proliferação *in vitro* de células derivadas da medula óssea, posterior adesão às estruturas de suporte (neste caso, partículas de HA/TCP) e finalmente a transplantação de defeitos segmentares com subsequente regeneração 3D *in vivo*.

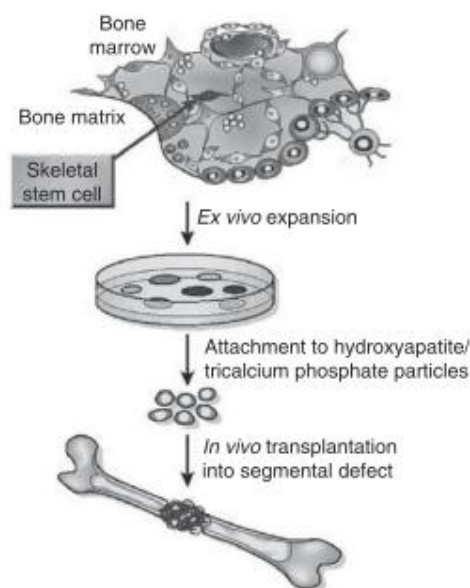


Figura 49 - Possível regeneração de tecidos ósseos 3D. ^[173]

Têm sido desenvolvidos inúmeros materiais de suporte para regeneração óssea, mas a maioria pode ser classificada segundo os seus componentes em estruturas de suporte naturais, sintéticas ou com base mineral natural/sintética (constituídos pelos materiais descritos no ponto 1.2 deste relatório).

Como consequência das suas propriedades de osteocompatibilidade e da sua habilidade de integração com o tecido ósseo, os biocerâmicos com HA, TCP ou uma mistura dos dois na sua composição, são os mais utilizados na reparação óssea. Uma concentração relativamente elevada de TCP nos materiais biocerâmicos resulta normalmente numa elevada capacidade de reabsorção, um dos objectivos dos ET. Propriedade que tem sido significativamente melhorada pela produção/utilização de estruturas de suporte porosas com a arquitectura interna muito semelhante ao osso natural, uma vez que a superfície disponível para a regeneração do tecido e para a libertação de células é muito superior. A acrescentar o facto de a presença de uma matriz parcialmente mineralizada na estrutura de suporte do compósito, ser um factor microambiental que favorece o início da osteogénese. Têm sido utilizadas estruturas de suporte alternativas com proveniência em cadáveres ou ossos de animais, e naturais com estrutura intrínseca altamente compatível com o crescimento do tecido. Um exemplo de uma estrutura natural compatível é o exoesqueleto dos corais cuja estrutura porosa com boas propriedades mecânicas. ^[2] No entanto, os biocerâmicos por si só não respondem a todos os requisitos exigidos a uma estrutura de suporte óssea ^[2, 174], conseguem actuar somente como uma superfície óssea pré-existente na qual as células ósseas depositam a nova matriz óssea ^[175], mas têm sido alcançados melhores resultados pela associação de biocerâmicos porosos com células do estroma da medula óssea (BMSCs - Bone

marrow stromal cells)⁶⁸, onde as propriedades intrínsecas dos biocerâmicos são integradas com as propriedades das células do osteoprogenitor para formarem tecido ósseo vascularizado, com desempenho biomecânico vital [2, 173]

As estratégias até agora seguidas para a reparação óssea através da ET garantem a reconstrução segmentar óssea com propriedades mecânicas iniciais apropriadas e o estímulo necessário para a formação de osso novo na região afectada. O grande objectivo é então conseguir introduzir estruturas de suporte com base cálcio que sejam gradualmente degradáveis a uma velocidade semelhante à de formação do novo osso. Isto conduzirá à restituição e integração completa do osso danificado. [2]

1.7 Ligamentos do joelho

1.7.1 Caracterização

Uma articulação é um local onde dois ossos se reúnem. São habitualmente considerados móveis, mas nem sempre é o caso; muitas articulações apenas permitem movimentos limitados. As articulações móveis são os lugares do corpo onde os ossos deslizam uns sobre os outros. A estrutura de uma determinada articulação relaciona-se directamente com o seu grau de movimento e uma lesão ou doença numa articulação dificulta esse movimento. [167]

A articulação do joelho classifica-se tradicionalmente como uma articulação trócleo-bicôndilo-meniscartrose⁶⁹, localizada entre o fémur e a tíbia (Figura 51). O perónio não articula com o fémur mas apenas com a parte lateral da tíbia. É uma articulação complexa bicondilar que permite movimentos de flexão, extensão e pequena rotação da perna.

O fémur articula-se com a extremidade proximal da tíbia, achatada e lisa lateralmente, e que apresenta uma crista denominada espinha da tíbia. Os rebordos das cavidades glenoideias da tíbia são reforçados por espessas fibro-cartilagens - os meniscos (de forma semilunar), que acentuam a sua cavidade.

Os dois ligamentos cruzados do joelho estendem-se entre a espinha da tíbia e os côndilos do fémur. O ligamento cruzado posterior (PCL) evita a deslocação posterior da tíbia e o ligamento cruzado anterior (ACL) evita a deslocação anterior da tíbia. A articulação é ainda fortalecida pelos ligamentos laterais, ligamentos poplíteus, e pelos tendões dos músculos da coxa, que se estendem em torno do joelho.

⁶⁸ As BMSCs são responsáveis pela manutenção da remodelação óssea ao longo da vida e podem ser consideradas precursoras/progenitoras das populações de células derivadas das células indiferenciadas ou estaminais adultas. As culturas de BMSCs podem ser estimuladas com o propósito de se diferenciarem em osso, cartilagem, músculo, estroma da medula óssea, tendão, gordura e outros tecidos conjuntivos, e sob determinadas condições, também em células tipo derivadas de camadas germinativas diferentes. [2]

⁶⁹ Resultado da trocleartrose da articulação secundária fémuro-rotuliana com a bicondilarartrose da fémuro-tibial e com os dois meniscos interarticulares interpostos. [176]

A tabela seguinte resume os ligamentos existentes a articulação do joelho fazendo uma breve referência à sua descrição.

Tabela 14 - Ligamentos da articulação do joelho (visíveis na figura seguinte). ^[167]

Ligamento	Descrição
Rotuliano ou tendão rotuliano	Banda fibrosa, muito espessa e resistente, entre a rótula e a tuberosidade anterior da tíbia; constitui parte integrante do tendão do quadríceps
Asas da rótula	Bandas delgadas que vão dos bordos da rótula às tuberosidades dos côndilos femorais
Popliteu oblíquo	Espessamento da cápsula posterior; extensão do tendão do semi-membranoso
Popliteu arqueado	Estende-se do lado posterior da cabeça do peróneo até à face posterior da cápsula
Lateral interno (lateral tibial)	Espessamento lateral bem desenvolvido da cápsula; insere-se na tuberosidade do côndilo interno do fémur e no bordo interno da tíbia
Lateral externo	Ligamento arredondado que se estende da tuberosidade do Côndilo externo femoral à cabeça do perónio
Cruzado anterior	Estende-se obliquamente, para cima e para trás, da parte anterior da espinha da tíbia até à face interna do côndilo femoral externo
Cruzado posterior	Estende-se para cima e para diante, da parte posterior da espinha da tíbia até à face externa do côndilo interno
Freios meniscais (ligamento coronário mediano e lateral)	Une os meniscos côndilos tibiais
Transverso	Une as porções anteriores dos meniscos interno e externo
Menisco-femoral (anterior e posterior)	Unem a parte posterior do menisco externo ao côndilo interno do fémur, passando adiante e atrás do ligamento cruzado posterior

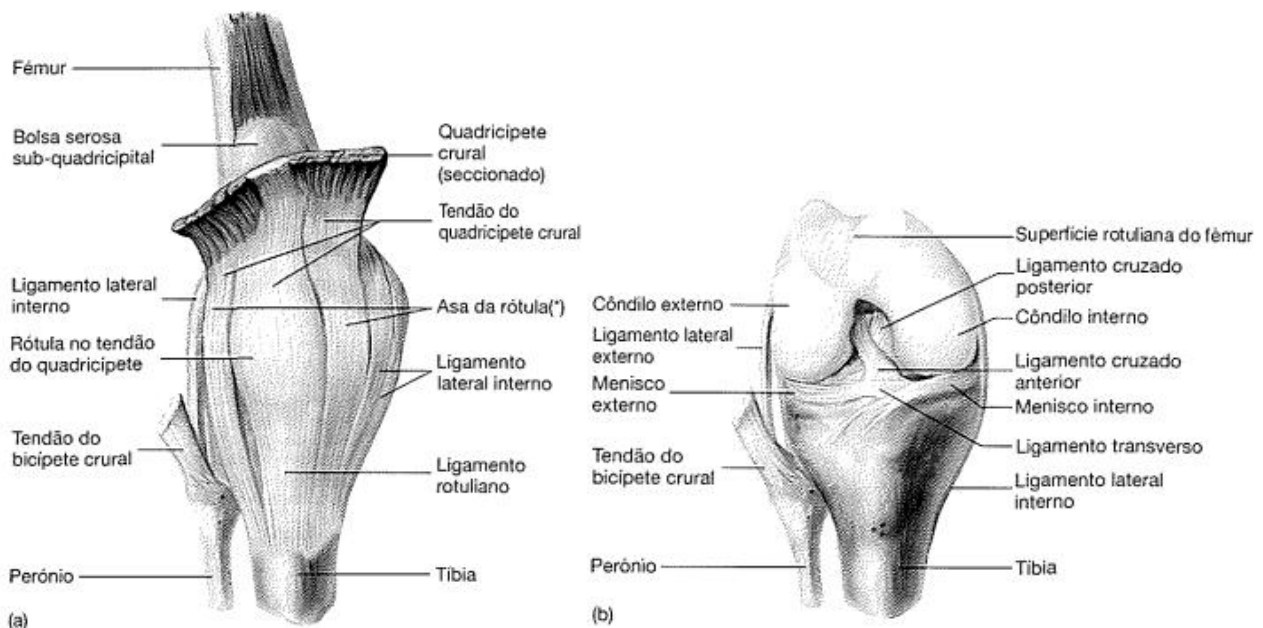


Figura 50 - Articulação do joelho direito. ^[167]

(a) vista anterior superficial, (b) vista anterior profunda - joelho flectido

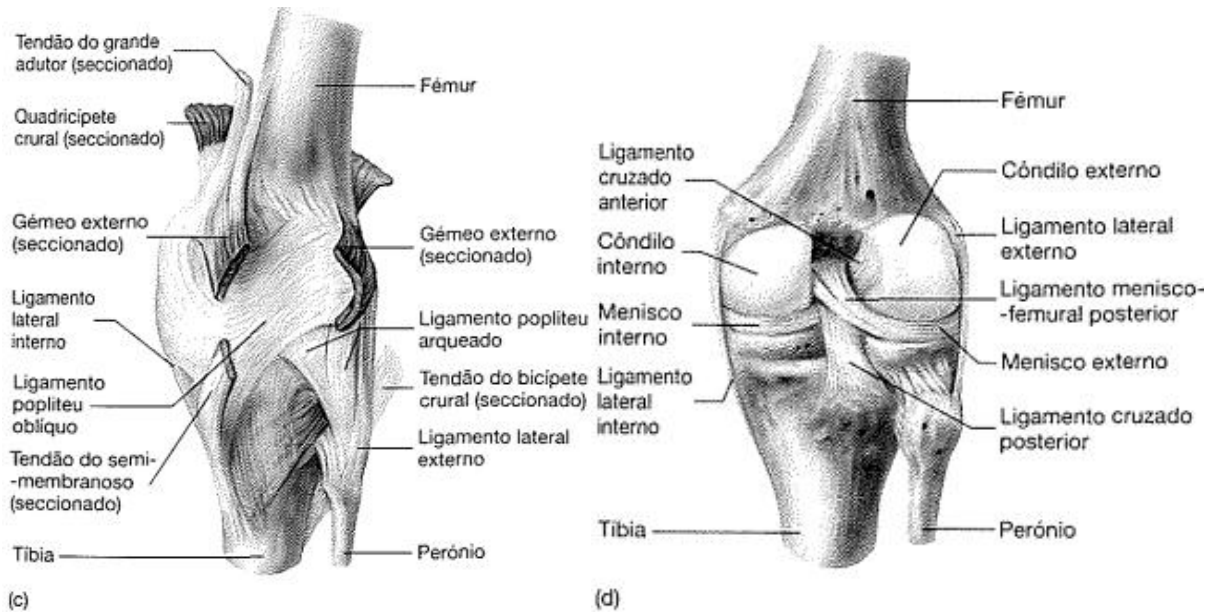


Figura 51 - Articulação do joelho direito (cont.). ^[167]
(c) vista posterior superficial e d) vista posterior profunda).

O ACL é o mais importante ligamento do corpo humano. Situa-se na maior articulação humana - o joelho. Funciona como uma união estabilizadora, evitando a deslocação anterior da tibia em relação ao fêmur, isto é, não deixando que a perna se desloque para a frente da coxa, e restringindo igualmente as rotações na articulação. Tem um comprimento total de 31-38mm ^[177]; um módulo de elasticidade para o homem de 93 - 163 MPa e para a mulher de 49 - 149 MPa; e uma tensão na rotura de 16,3-36,4 MPa e 13,7-31,5 MPa para o homem e mulher, respectivamente. ^[178]

1.7.2 Lesões traumáticas e dados históricos de soluções reparadoras

Dentro das lesões traumáticas do joelho podem destacar-se:

- 1) as do lado interno e externo - provocadas por pancadas violentas no lado oposto do joelho e conduzem a lesões nos ligamentos laterais internos e externos, respectivamente. São mais comuns as lesões traumáticas do lado interno do joelho uma vez que o ligamento lateral externo é mais forte que o ligamento lateral interno;
- 2) as que conduzem à rotura do menisco - nas lesões traumáticas do joelho, o menisco interno é atingido com uma frequência 20 vezes superior do que o menisco externo. Esta rotura é caracterizada por um “estalo” durante a extensão da perna ou, quando mais grave, um fragmento solto da cartilagem lesada pode interpor-se entre as superfícies articulares da tibia e do fêmur, fazendo com que o joelho fique em lesão parcial - bloqueado;

- 3) as que levam à rotura do ligamento cruzado posterior (PCL - *posterior cruciate ligament*) - quando o joelho é forçado a deslizar para trás; e
- 4) as que conduzem à rotura do ACL - quando há uma rotação interna da tíbia no fémur (representa 80% dos casos de rotura do ACL), uma rotação externa (lesão mais comum em praticantes de ski), uma hiperextensão, ou quando há uma flexão com posterior extensão (típica de impactos que ocorrem em acidentes de automóveis em que o joelho bate no tablier). ^[167, 177, 179]

Como exemplo de uma lesão traumática encontram-se as lesões futebolísticas, que resultam de um bloqueio ou placagem sobre a face externa do joelho, fazendo com que o joelho se dobre para dentro, abrindo o lado interno da ligação e rasgando o ligamento interno. Frequentemente o menisco interno também sofre rotura nestes casos. Nos traumatismos graves do joelho, o ACL também é atingido, pois o ligamento lateral interno está muito próximo do menisco interno, e o ACL tem inserções nesse menisco (Figura 52).

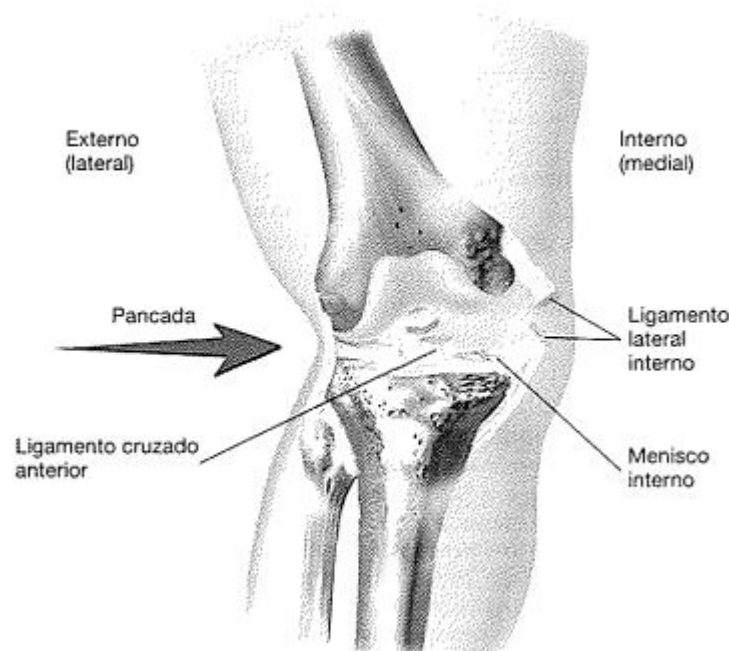


Figura 52 - Exemplo de ocorrência de uma lesão traumática no ligamento lateral interno após uma pancada no lado externo do joelho direito. ^[167]

Também são exemplos: a bursite pré-rotuliana subcutânea, vulgarmente designada por “joelho da mulher-a-dias”, pode resultar de um trabalho prolongado apoiado sobre as mãos e os joelhos; e o “joelho sacerdote”, outra bursite, que resulta da estadia de longos períodos de tempo ajoelhado afectando a bolsa infra-rotuliana subcutânea. Este último tipo de bursite é muito frequente em aplicadores de alcatifas e telhados.

Outros problemas frequentes do joelho são a condromalácia, que é um amolecimento da cartilagem e resulta de um movimento anormal da rótula na tróclea femoral; e o “síndrome da almofada adiposa”, que consiste numa acumulação de líquido na almofada adiposa posterior do joelho. Uma tumefacção - inchaço - aguda no joelho que surge logo após um traumatismo traduz habitualmente uma acumulação de sangue na articulação que se designa por hemartrose. A acumulação de líquido mais lenta, “o joelho de água”, pode ser causada por bursite. ^[167]

No entanto, sendo a rotura do ACL uma das mais comuns no joelho, acontece com uma incidência de 1 para 3000 ^[4, 180]; deste modo, tem sido exaustivamente estudada por inúmeros autores e grupos de pesquisa.

O ACL pode sofrer lesão em toda a sua largura ou apenas numa percentagem da mesma (Figura 53); sendo que as lesões parciais são as mais frequentes, pois conduzem a uma incapacidade temporária podendo ser estáveis e não havendo rotura total na sua evolução. ^[179] Quando há rotura total, é aconselhado o tratamento cirúrgico para a reabilitação da estabilidade do joelho, uma vez que o ACL tem uma fraca capacidade de auto-cura e uma vascularização limitada. ^[4, 37]

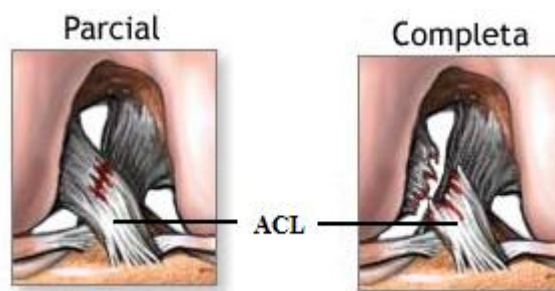


Figura 53 - Ilustração da lesão parcial ou total do ACL. Adaptada de ^[181]

Dados estatísticos apontam para 100000 ^[4] - 150000 ^[37] reconstruções cirúrgicas do ACL anuais nos EUA.

As estratégias de reconstrução passam pela utilização de auto e alo-enxertos locais. Estes demonstram ser 90% bem sucedidos em termos de reabilitação da estabilidade do joelho, satisfação final do paciente, e retorno a actividades desportivas. ^[4] No entanto, questões como infecções locais, lesões nervosas e fracturas provocadas por problemas anteriores do próprio paciente; ou potenciais transferências de doenças infecciosas, infecções bacterianas, problemas de rejeição do enxerto, reacções imunológicas não pretendidas, para além da escassez de doadores, são levantadas quando se utilizam auto e alo-enxertos, respectivamente. ^[37]

No sentido de ultrapassar estas dificuldades, desde os anos 70 têm sido estudados enxertos de materiais sintéticos para implementação humana ^[4]; mas apesar dos excelentes

resultados por estes alcançados num curto espaço de tempo, a longo termo estes revelam incompatibilidades biomecânicas, bioquímicas e biofuncionais ^[21], um elevado número de falhas resultantes de desgaste (abrasivo e/ou adesivo), e uma integração pobre/limitada entre o enxerto sintético e o tecido hospedeiro. ^[37]

A solução posteriormente encontrada, já nos anos 80, foi a utilização de próteses com base de carbono. ^[4] O desenvolvimento das próteses já tinha em conta as propriedades químicas e físicas dos seus materiais constituintes e a sua pureza, as suas características de superfície (rugosidades, geometria, carga de superfície), a estrutura 3D do implante, as suas propriedades mecânicas, resistência à fadiga, fractura, fissuração e a sua esterilização.

A própria intervenção cirúrgica era realizada mediante casos de possível sucesso após análise de vários pontos como a idade, o estado de saúde, o sistema imunitário e o metabolismo do paciente; uma vez que este implante poderia causar efeitos locais (reações inflamatórias, infecções ou reacções imunes), ou sistémicos (embolismo, sensibilização, presença de elementos do implante no sangue, acumulação de partículas de material nos nódulos linfáticos). ^[19, 180]

Capítulo 2

Materiais e métodos

Neste capítulo inclui-se a descrição dos materiais, métodos, equipamentos e tecnologias utilizados no estudo da degradação por hidrólise de fibras PBG e de compósitos de matriz PLA reforçados com fibras PBG. Descreve-se a evolução da degradação através das propriedades mecânicas em função dos tempos de degradação do PLA, PBG e do respectivo compósito PLA/PBG; da medição da perda da massa das fibras PBG, PLA e compósito, em função dos tempos de degradação; e através da visualização de alterações morfológicas em SEM.

2.1 Materiais

As propriedades dos polímeros com base ácido láctico descritas no capítulo anterior demonstram indubitavelmente que esta categoria de polímeros apresenta um grande e diversificado potencial em aplicações de ET, devido à sua possibilidade de adequar as suas propriedades pela modificação dos seus constituintes. Este facto, aliado à possibilidade de degradabilidade em sistemas biológicos, à sua comprovada biocompatibilidade, processamento termoplástico^[102], não-toxicidade, e possibilidade de ser facilmente quebrado por hidrólise térmica^[102] - o que é preferível em termos de implantes uma vez que há variações mínimas de local para local e de paciente para paciente, quando comparados com os polímeros degradáveis enzimaticamente^[17], fazem do PLA especialmente dotado para as aplicações biomédicas. Em particular, o PLLA é um polímero de degradação lenta, que apresenta boa resistência à tracção, baixa extensão e elevado módulo de elasticidade.^[17]

No entanto, embora um único polímero consiga mostrar-se eficiente em determinadas aplicações pela já mencionada possibilidade de modificar a sua estrutura físico-química, em muitos casos são utilizadas misturas de polímeros ou polímeros com não-polímeros de modo a

alcançar os comportamentos desejados. E, apesar do PLLA ter produtos aceitáveis (metabolitos naturais) no que diz respeito a tratamentos médicos/cirúrgicos, sozinho não é admissível no campo da ET onde a organização precisa dos tecidos e proliferação celular é fundamental para o sucesso da aplicação. ^[32]

É com este propósito que entram os PBG. Estes são capazes de manter vivas, fenotípica e morfológicamente, as células do osso e ligamentos humanos aderentes, provando deste modo serem materiais ideais de ET para as áreas específicas de ligamentos/tendões e defeitos de fixação óssea. ^[26] Do ponto de vista biomédico, as suas propriedades mais interessantes são o facto de terem a capacidade de se dissolver em meio aquoso, podendo o seu comportamento de dissolução ser modificado em grandes ordens de magnitude por alteração da sua química constituinte; e o facto de haver a possibilidade de poder ser sintetizado de modo a que sejam incluídos iões usuais no corpo humano e desta feita ser perfeitamente adaptável em termos de composição à sua aplicação final. ^[8] Apresentam ainda a vantagem de serem inteiramente amorfos quando processados correctamente, e de terem uma degradabilidade previsível, o que influencia a sua rapidez de degradação. ^[31]

Neste trabalho utilizaram-se aparas de PLLA L210 da *Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG*, cuja ficha de especificação está presente no Anexo B; e fibras contínuas de PBG do sistema quaternário 50%P₂O₅, 40%CaO, 5%NaPO₃ e 5%Fe₂O₃, da universidade de *Nottingham* (Figura 54). O vidro foi manufacturado através da fusão a alta temperatura de uma mistura apropriada de sais fosfato, posteriormente transportado até uma fieira onde foi refundido num cadinho de platina e estirado a alta velocidade (com 80% do PBG do cadinho convertido em fibras). Após este processo foi ainda recozido durante 12h ^[182] e mais tarde cortado em aparas para melhor dispersão aquando da manufactura dos provetes (Figura 54).

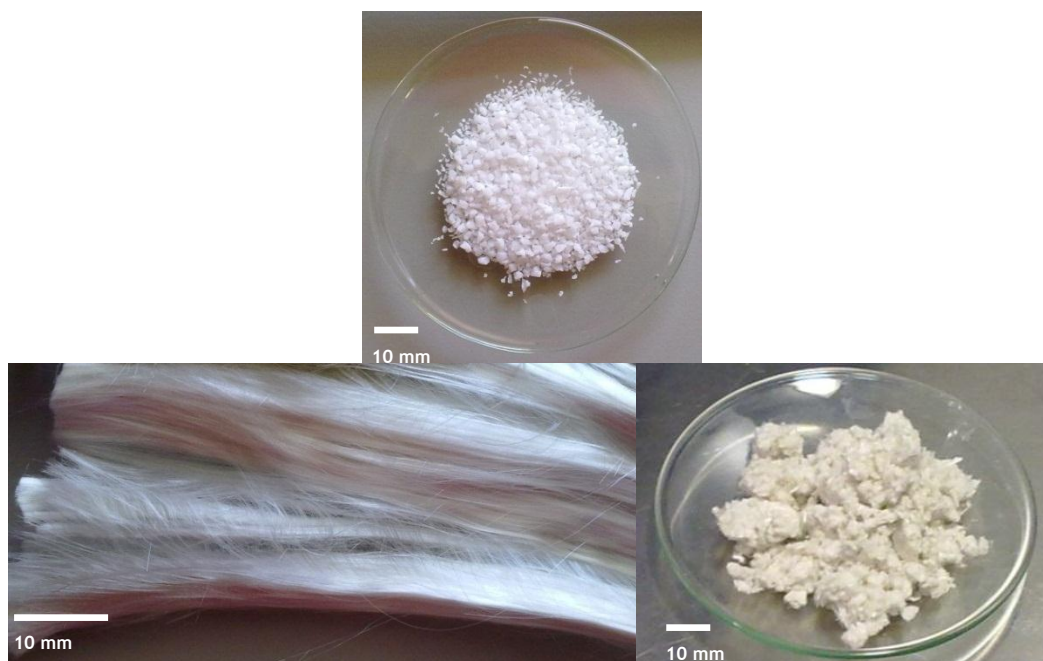


Figura 54 - Ilustrações dos materiais utilizados: aparas de PLLA, fibras contínuas e aparas de PBG.

A Figura 54 mostra fotograficamente o aspecto e tamanho dos materiais utilizados: aparas de PLA e PBG na sua forma original de fibras contínuas e as aparas resultantes do corte feito com o intuito de se obter uma melhor homogeneidade na composição do compósito de PLA/PBG aquando da sua manufactura.

No sentido de serem conhecidas quantitativa e qualitativamente as amostras de PBG utilizadas, recorreu-se à microscopia óptica (Microscópio *Carlzeiss Axiotech 100HD*) para visualização e quantificação da distribuição de tamanhos e morfologia das fibras de PBG.

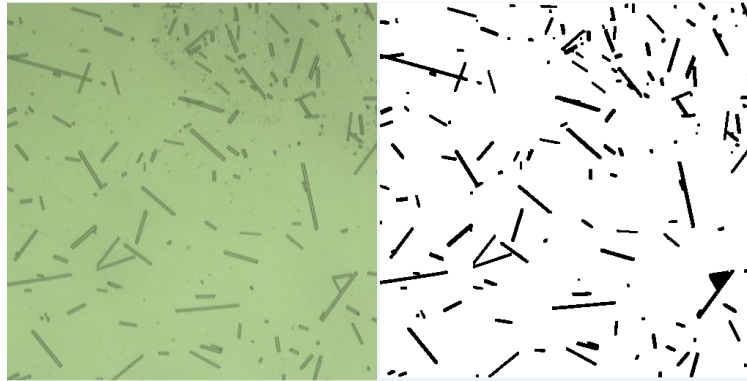


Figura 55 - Imagem das aparas de fibras de PBG obtida por microscopia óptica com ampliação de 100x .

A fotomicrografia anterior, Figura 55, foi obtida por dispersão das fibras de PBG em água destilada num conjunto lâmina/lamela de microscopia óptica, adquirida através do *software* PAQI e analisada no ImageJ. Desta pode-se inferir que as fibras de PBG têm formato de bastões de dimensões na sua maioria menores que 20µm. A amostragem foi de 32 fotomicrografias e nesta análise foi utilizada uma ampliação de 100x, da qual resultou a contabilização da distribuição de comprimentos das fibras de PBG revelada na Figura 56.

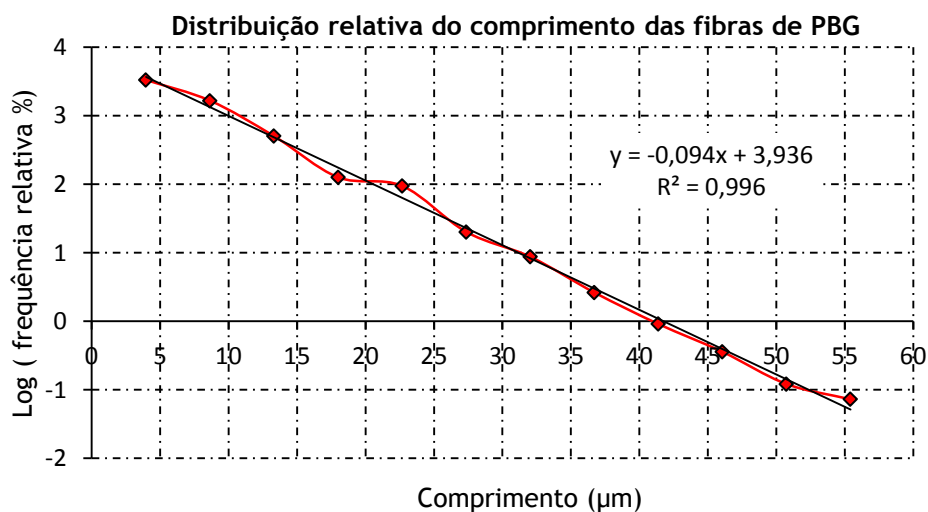


Figura 56 - Gráfico da distribuição de tamanhos das fibras de PBG utilizadas.

Pela figura anterior pode concluir-se que as frequências relativas percentuais de fibras de PBG são superiores para comprimentos menores, e que a distribuição de comprimentos de tamanhos se assemelha a uma distribuição logarítmica. A equação apresentada na Figura 56, representa a linha de tendência do gráfico ilustrado, logaritmo de base 10 da frequência relativa percentual das fibras de PBG vs. o comprimento das mesmas (μm).

Através desta aquisição de dados conclui-se que cerca de 82% das fibras de PBG utilizadas neste projecto têm comprimentos na gama de 0-18 μm .

2.2 Preparação dos provetes

Todos os provetes de PLA e de compósito PLA/PBG foram preparados recorrendo à técnica de *solvent casting*. Este método, muito utilizado para manufacturar estruturas de suporte compósitas, foi desenvolvido por Mikos *et al.* ^[128] para, entre outros, o PLA puro. Por exemplo, algumas combinações utilizadas no processo de fabricação de estruturas de suporte 3D, recorrendo ao método de dissolução selectiva do polímero num determinado solvente, são: PLLA/poliestireno, PLLA/PCL e PCL/PEO. ^[7]

O método consiste na dissolução do polímero num solvente apropriado e em deixar a mistura formada a evaporar ao ar de forma controlada, ou sob vácuo, até a completa remoção do solvente e formação de filmes. No que diz respeito à manufactura dos provetes compósitos, há a adição de uma segunda fase à solução do polímero/solvente antes da evaporação do último.

No caso da preparação dos provetes de PLA, este foi dissolvido em clorofórmio numa proporção de 5% (w/v) ^[128] e foi deixado evaporar o solvente em vácuo durante 12h e durante mais 93h em hotte à P e T ambiente num molde de alumínio revestido a Teflon. Para os provetes de compósito PLA/PBG, foi feita a adição do PBG à solução previamente feita de PLA/ CHCl_3 na proporção 30%PBG/70%PLA (w/w), e a evaporação do clorofórmio foi realizada nas mesmas condições anteriormente referidas para a formação das placas de PLA.

A figura seguinte evidencia a preparação dos provetes de PLA e PLA/PBG. Mostra o aspecto das duas soluções feitas (PLA/ CHCl_3 e PLA/PBG/ CHCl_3) e a sua transfega para o referido molde de alumínio utilizado como pré-forma dos filmes a obter por *solvent casting*.

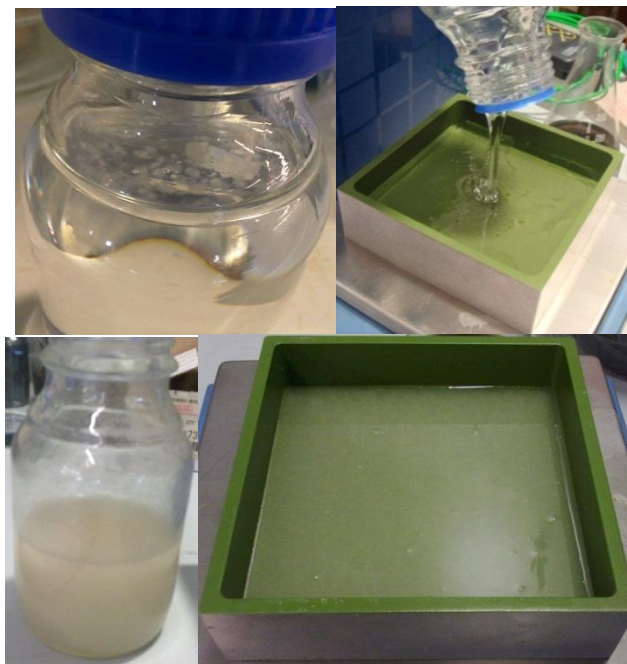


Figura 57 - Aspecto transparente da mistura de PLA/CHCl₃ e transferência da mesma para o molde de alumínio; aspecto opaco da mistura de PLB/PBG/CHCl₃ e imagem da mesma no molde de alumínio.

As vantagens deste método são o facto de ser simples e razoavelmente reprodutivo; como desvantagens incluem-se a limitação de espessura intrínseca ao processo de evaporação do solvente, sedimentação de partículas e a limitação das propriedades mecânicas conseguidas. Alguns autores referem também como *deficit* do método questões como a heterogeneidade das estruturas (variações de densidades ao longo dos filmes) e presença residual do solvente nas mesmas. ^[53]

No sentido de minimizar estas questões, as misturas de PLA/CHCl₃ e PLA/PBG/CHCl₃, feitas em frascos de vidro, foram sujeitas a ultra-sons com agitação até dissolução completa, por um período de 2 e 12h, respectivamente para as duas soluções; e para garantir a evaporação total do solvente assim como uma densidade uniforme ao longo do filme, as placas resultantes do processo de evaporação do solvente foram sujeitas a uma prensa de pratos quentes a 170°C ^[128], durante 15min a 24,54bar ⁷⁰.

Em seguida encontram-se descritas algumas particularidades do método *solvent casting* utilizado na manufactura dos filmes no que concerne à escolha do molde pré-forma assim como o tempo e procedimento de evaporação do solvente.

⁷⁰ O cálculo desta pressão foi feito com base na fórmula: $P_{\text{provete}} = (P_{\text{mostrador}} - P_{\text{fecho dos pratos}}) \times A_{\text{cilindro}} / A_{\text{provete}}$; em que P é pressão e A a área. Uma vez que $P_{\text{mostrador}}=40\text{bar}$ (igual à pressão no cilindro pneumático), $P_{\text{fecho pratos}}=20\text{bar}$, $A_{\text{cilindro}}=122,7\text{ cm}^2$ e $A_{\text{provete}}=100\text{ cm}^2$, então $P_{\text{provete}}=24,54\text{bar}$.

Inicialmente, os moldes utilizados para a formação de placas de PLA e PLA/PBG foram projectados em silicone (Figura 58), com dimensões internas de 10cm x 10cm x 3cm ⁷¹.

Este material foi antecipadamente sujeito a um teste de compatibilidade com o solvente - clorofórmio; no entanto, durante a evaporação do mesmo em vácuo, houve uma absorção de clorofórmio por parte do silicone, alterando as características dimensionais do molde, anulando esse ensaio de evaporação e invalidando a escolha deste material como constituinte do molde.

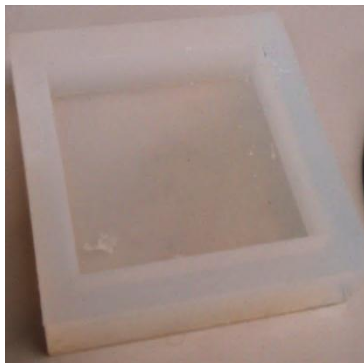


Figura 58 - Molde de silicone utilizado na execução dos provetes de PLA; o mesmo molde após deformação dimensional.

Assim sendo, optou-se pela utilização de moldes de alumínio (um molde maquinado pela Preh Portugal, Lda com dimensões internas 10cm x 10cm x 5cm e um segundo molde maquinado pelo INEGI - Instituto de Engenharia Mecânica e Gestão Industrial com dimensões internas 10cm x 10cm x 3cm) revestidos a Teflon *Flucoat 108 Verde* (revestimento feito por Flupol - Aplicações técnicas de polímeros fluorados, LDA), ambos visíveis na Figura 59.

Esta escolha de materiais foi feita de acordo com o procedimento já descrito por vários autores ^[128].

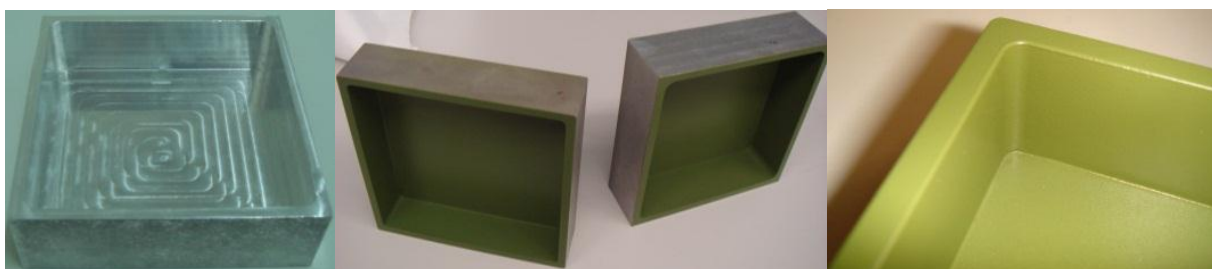


Figura 59 - Molde de alumínio pré e pós revestimento a Teflon *Flucoat 108 Verde*, utilizado na manufactura dos provetes de PLA e PLA/PBG.

⁷¹ Estas dimensões foram seleccionadas para que fosse possível a utilização de um excicador como auxiliar da instalação onde foi feito o vácuo para evaporação do solvente das misturas de PLA/CHCl₃ e PLA/PBG/CHCl₃. Deste modo o molde teria de ter dimensões que possibilitassem a sua permanência no interior do excicador mas que de igual modo tivesse o máximo de rendimento em número de provetes (pelo que a forma circular foi de imediato descartada).

Após a formação de 3 placas recorrendo somente ao vácuo para evaporação do solvente houve inclusão de bolhas e deformações nas placas resultantes, incorrigíveis após a prensa de pratos quentes e impossibilitando deste modo a manufactura de provetes (Figura 60). Estes defeitos, provocados após as 15h de evaporação em vácuo como mostrado na Figura 61, revelavam uma taxa de evaporação rápida conduzindo à existência de bolhas de gás retidas no interior do polímero.



Figura 60 - Placas de PLA deformadas pela utilização inadequada do vácuo na sua produção.

Colocou-se então a questão sobre qual processo de evaporação seguir na manufactura das placas antecedentes dos provetes: evaporação recorrendo ao vácuo ou evaporação ao ar de forma controlada. Para essa escolha ser tomada optou-se pela realização de ensaios teste.

Foram feitos 3 ensaios teste para definir a metodologia de evaporação e nesse sentido foram feitas 3 misturas de PLA/ CHCl_3 com a mesma proporção a utilizar nos filmes, 5% (w/v) e conforme procedimento previamente descrito, sendo que a evaporação foi feita recorrendo ao vácuo. Para controlo dessa evaporação foram feitos registos da massa total do conjunto molde e mistura para cada 1h ao longo do tempo de evaporação do clorofórmio e assim que esse registo se apresentava constante, considerou-se que a evaporação do solvente tinha terminado.

A figura seguinte apresenta os registos de massa da totalidade desse conjunto (molde+mistura de PLA/ CHCl_3 , g) *versus* o tempo considerado de evaporação (h) para os 3 ensaios teste realizados.

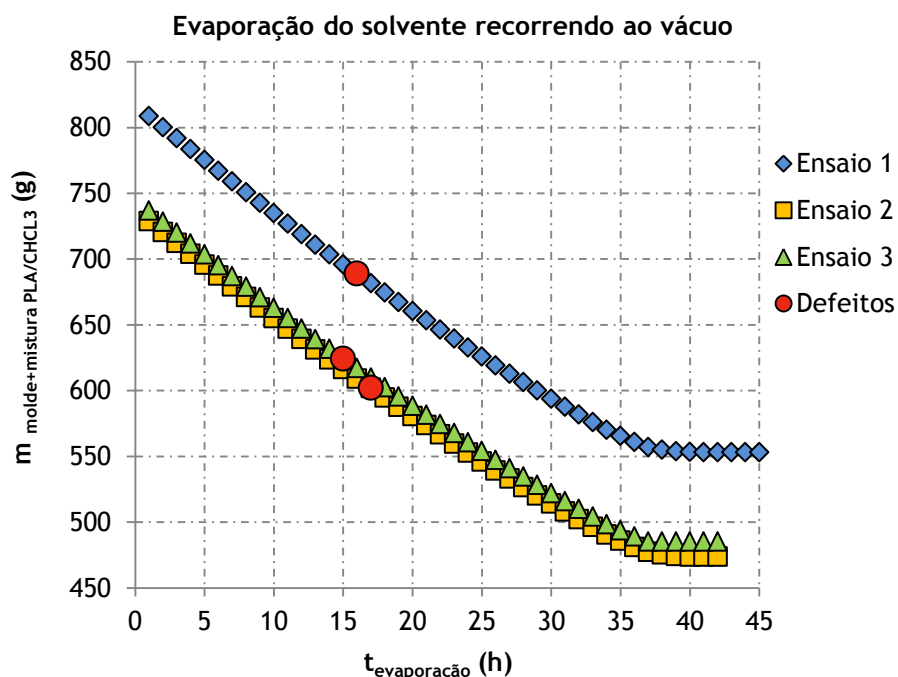


Figura 61 - Variação da massa do conjunto molde+mistura de PLA/CHCl₃ durante a evaporação do solvente recorrendo ao vácuo. ⁷²

Os valores a vermelho marcam o momento em que era visível o início da inclusão de bolhas e deformação da placa nos ensaios realizados.

No primeiro ensaio essas alterações ocorreram às 16h de evaporação com $\approx 14,8\%$ de perda de massa, no segundo ensaio verificaram-se alterações após 17h, correspondendo a uma perda de massa de $\approx 15,4\%$, e no último ensaio, os defeitos foram posteriores às 15h de evaporação do solvente (cerca de $15,3\%$ de perda de massa). ⁷³

Para a evaporação em vácuo do clorofórmio foi utilizado um excicador, uma bomba de vácuo e feito um circuito com mangueiras reforçadas.

Após estas verificações concluiu-se que seria mais económico e célere optar pela manufatura das placas recorrendo a vácuo durante as primeiras 12h. E concluídas as mesmas procedeu-se à evaporação do solvente de forma controlada à P e T_{amb}. Após cerca de 93h deixou de se verificar alteração de massa deste conjunto pelo que foi definido este tempo de evaporação como o suficiente para a evaporação do solvente das placas.

A Figura 62 evidencia a variação de massa do conjunto molde e mistura de PLA/CHCl₃ durante a evaporação do solvente por este processo (12h em vácuo mais 93h em ar controlado) em 3 novos ensaios. O tracejado às 12h de evaporação representa o momento em

⁷² Uma vez que os moldes de alumínio tinham massas iniciais diferentes, por terem alturas diferentes, a massa inicial do conjunto é distinta.

⁷³ A percentagem de perda de massa foi calculada segundo a equação ^[128] $\%M = (M_0 - M_t) * 100 / M_0$, onde M_0 é a massa inicial do conjunto molde mais mistura de PLA/CHCl₃ e M_t é a massa do conjunto referido no instante t.

que foi eliminado o vácuo e a evaporação do solvente passou a ser efectuada à T e P_{amb} em hotte. Este tempo de evaporação sob vácuo representou uma perda de massa de 11%, 11% e 12% no 4º, 5º e 6º ensaio, respectivamente.

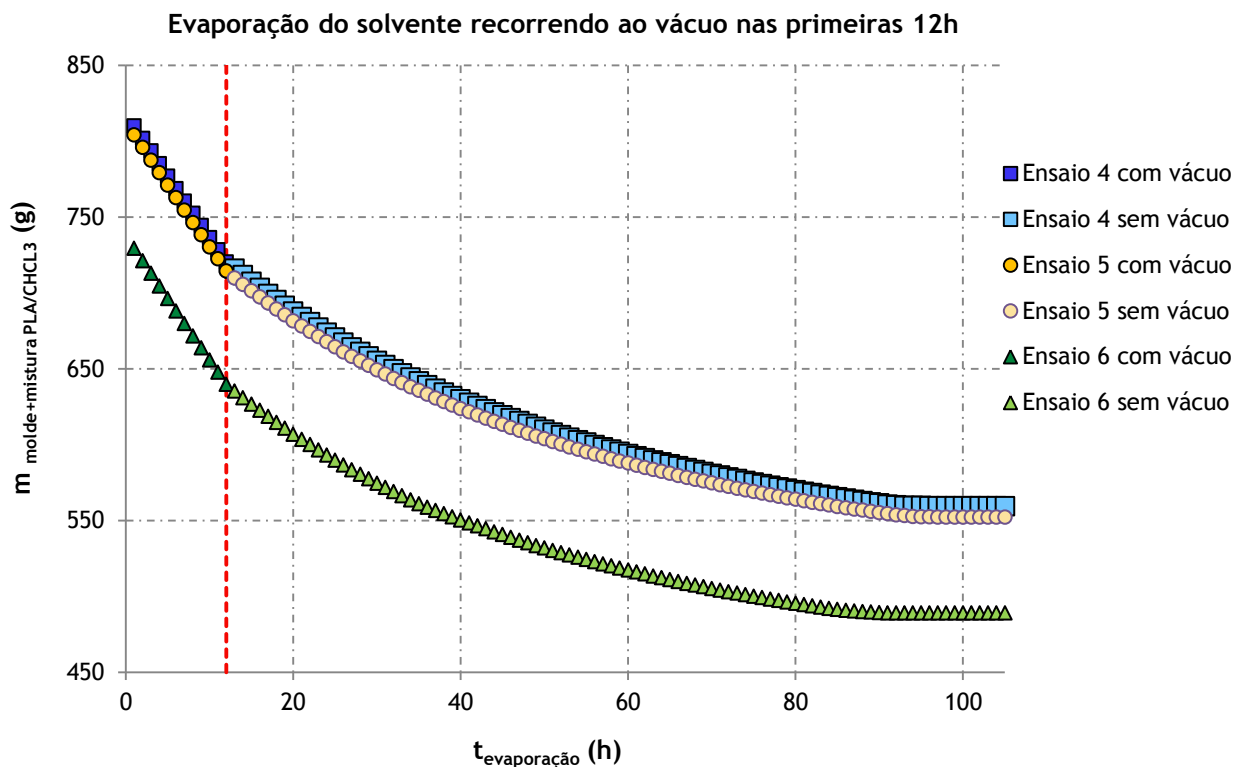


Figura 62 - Variação da massa do conjunto molde+mistura de PLA/ CHCl_3 durante a evaporação do solvente recorrendo ao vácuo somente nas 12h iniciais.

O aspecto das placas resultantes deste processo de evaporação pode ser verificado na figura seguinte e confrontado com o anteriormente obtido por vácuo. Através deste método as placas não apresentam bolhas nem deformações irreversíveis de forma; a forma côncava observada, consequência da retracção da superfície exposta à atmosfera e a qual viu o solvente evaporar primeiramente, foi eliminada após se submeterem as placas à prensa de pratos quentes.



Figura 63 - Placas de PLA e PLA/PBG obtidas pelo procedimento de *solvent casting*.

Posteriormente à evaporação do solvente as placas foram submetidas à prensa das placas quentes de forma a conseguir-se a total evaporação do solvente e uma densidade constante para um espessura de 1mm.

As placas foram posteriormente marcadas e cortadas a partir de um modelo (na Figura 64 a preto) nelas decalcado.

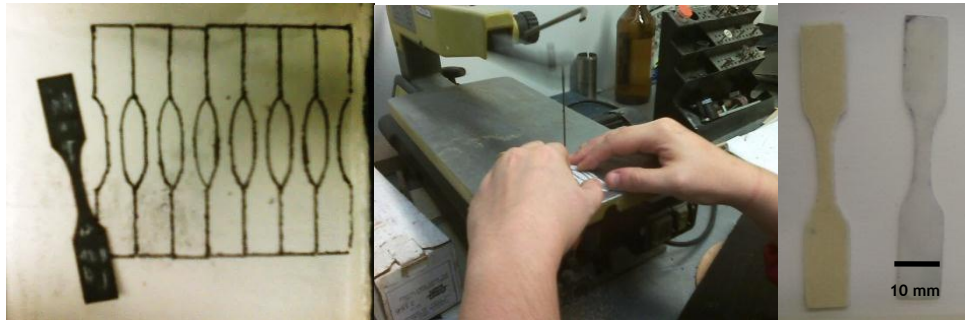


Figura 64 - Placa de PLA/PBG marcada com as dimensões requeridas dos provetes, corte das marcações feitas e provetes resultantes (1º - exemplar de compósito PLA/PBG, 2º - exemplar de PLA).

Na figura anterior pode verificar-se que as placas foram aproveitadas em quase toda a sua totalidade; foram desprezadas as zonas que continham algumas imperfeições visíveis a olho nu, como pequenas bolhas. O corte das placas foi feito recorrendo a uma serra de corte, também visível na Figura 64.

Estas dimensões de provetes foram seleccionadas de acordo com a norma ASTM D 638 - 03 *Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics* ^[183] onde está presente a figura demonstrativa seguinte (Figura 65). No nosso caso, foi considerado que o PLA é um material do tipo V - quando há material limitado, com espessura menor ou igual a 4mm, ou quando um grande número de espécimes terá de ser sujeito a testes (de estabilidade térmica ou ambiental, por exemplo) em locais limitados ^[183] - pelo que as dimensões dos provetes são os enunciados na Tabela 15, retirada da norma referida.

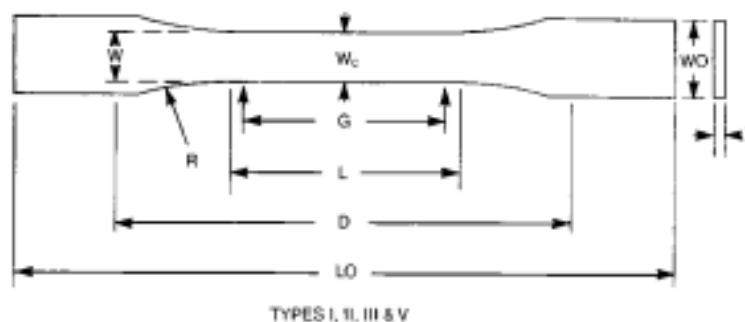


Figura 65 - Esquema da norma ASTM D 638-03 exemplificativo das medidas dos provetes para materiais do tipo I, II, III e V. ^[183]

Tabela 15 - Dimensões dos espécimes relativos ao material tipo V referente à norma ASTM D 638-03. ^[183]

Specimen Dimensions mm [in.] ^A		
Dimensions (see drawings)	Type V ^{C,D}	Tolerances
W—Width of narrow section ^{E,F}	3.18 [0.125]	±0.5 [±0.02] ^{B,C}
L—Length of narrow section	9.53 [0.375]	±0.5 [±0.02] ^C
WO—Width overall, min ^G	...	+ 6.4 [+ 0.25]
WO—Width overall, min ^G	9.53 [0.375]	+ 3.18 [+ 0.125]
LO—Length overall, min ^H	63.5 [2.5]	no max [no max]
G—Gage length ^I	7.62 [0.300]	±0.25 [±0.010] ^C
G—Gage length ^I	...	±0.13 [±0.005]
D—Distance between grips	25.4 [1.0]	±5 [±0.2]
R—Radius of fillet	12.7 [0.5]	±1 [±0.04] ^C
RO—Outer radius (Type IV)	...	±1 [±0.04]

Das 10 placas de PLA e 6 placas de PLA/PBG manufacturadas, foram recortados 15 provetes de PLA e 35 provetes de PLA/PBG. A diferença de rendimento das placas, em termos de número de provetes conseguido, deveu-se às condições atmosféricas adversas verificadas nesse período de tempo, chegando a obter-se valores de 38°C como T_{amb} no laboratório. Estas condições provocaram defeitos como rugas, bolhas e distorções geométricas que impossibilitaram o aproveitamento das placas manufacturadas.

Foram ainda feitos 35 espécimes de PBG para tracção com um comprimento de 250mm, uma vez que segundo a norma ASTM D 2343 - 03 *Standard Test Method for Tensile Properties of Glass Fiber Strands, Yarns, and Rovings Used in Reinforced Plastics* ^[184], seguida para traccionar os espécimes de PBG, estes deverão ter pelo menos o comprimento referido e estar impregnados com resina (ver ponto 2.4 Testes de caracterização - página 142).



Figura 66 - Imagem dos espécimes de PBG preparados para tracção.

2.3 Ensaio de degradação

Para a análise da degradação dos materiais em estudo, os provetes anteriormente preparados foram colocados em tubos de *Falcon* onde estavam imersos em PBS⁷⁴. Esses tubos de *Falcon* foram colocados num tanque com água e com uma solução de permanganato a 1%, para manter a desinfecção do mesmo, mantido a 37°C (Figura 67).

Na Figura 67 é apresentada uma fotografia do tanque utilizado com a cabeça controladora de temperatura onde foram colocados os tubos de *Falcon* com os provetes em PBS.



Figura 67 - Imagem do tanque e tubos de *Falcon* utilizados.

Nos tubos de *Falcon*, os estágios de degradação foram feitos com diferentes quantidades de provetes mediante e consoante o material disponível e o conhecimento prévio de cada um em termos de propriedades mecânicas e perdas de massa.

Os estágios de degradação realizados tiveram a duração de: 1,5; 3; 6 e 8 semanas para os provetes de PLA, 1; 2; 3; 4; 5; 6; 7 e 8 semanas para os provetes de PBG, e 1,5; 3; 5; 6; 7 e 8 semanas para os provetes de PLA/PBG. Uma vez que há registos teóricos para o comportamento de degradação do PLA processado por *solvent casting* (ponto 1.2.3.3.1.3 Degradação - página 87), cada estágio de degradação foi realizado apenas com 2 provetes cada, no sentido de se confirmar a bibliografia existente e para reservar matéria-prima para o compósito. Para o PBG quaternário, uma vez que a sua composição é muito específica, cada ensaio de degradação foi realizado com 5 provetes; e para o PLA/PBG foram realizados ensaios com 4 provetes atendendo à quantidade limitada de PLA disponível.

⁷⁴ Para 1L de PBS dissolveram-se 8g de NaCl, 0,2g de KCl, 1,44g de Na₂HPO₄, 0,24g de KH₂PO₄ em 800mL de água destilada. Ajustou-se o pH a 7,4 e perfez-se 1L com adição de água destilada. Esta solução foi esterilizada recorrendo a um autoclave e foi produzida na FMUP - Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

No final de cada estágio de degradação, os provetes foram retirados do banho, sujeitos a uma secagem de 48h numa estufa a 37°C e a sua massa registada (balança *Mettler Toledo AB 204* - 5 d=0,1mg). ^[128]

2.4 Testes de caracterização

No sentido de documentar o estudo de degradação realizado, foram utilizadas algumas técnicas/testes de caracterização:

- 1- Perda de massa
- 2- SEM
- 3- Ensaio de tracção

1- Perda de Massa

A perda de massa dos provetes e espécimes em estudo foi controlada através da contabilização da variação massa perdida dos mesmos após cada estágio de degradação e secagem em estufa a 37°C por um período de 48h.

2- SEM

Foi feita a observação da morfologia das amostras através de imagens de alta resolução da superfície das mesmas. Esta foi conseguida através da utilização de microscopia electrónica de varrimento.

Antes da visualização em SEM das amostras de PLA e PLA/PBG com e sem deformação por tracção, houve uma preparação prévia das mesmas. Ou seja, foram dissecadas partes relevantes dos provetes e espécimes a analisar com uma pinça e tesoura - para controlar possíveis contaminações. Posteriormente, estas partes destacadas foram fixadas vertical e horizontalmente com Araldite⁷⁵ num porta-amostras de alumínio previamente marcado com 8 espaçamentos igualmente distribuídos. Foi aplicado um revestimento lateral nas amostras com a mesma resina de modo a colmatar a porosidade das mesmas e as preparar para o revestimento final a ouro antecedente à visualização em SEM. Uma vez que é necessária que a amostra a observar em SEM seja condutora para não influenciar a análise pretendida, a resina anteriormente aplicada na amostra foi tornada condutora através da sua pintura com tinta de carbono para microscopia electrónica. Ao longo destes procedimentos foi deixado em todas as amostras apenas um anel de 1mm de altura sem qualquer tipo de revestimento - resina ou tinta de carbono. A figura seguinte mostra 3 partes de amostras dissecadas e fixadas no porta-amostras com Araldite.

⁷⁵ Mistura de iguais partes de componentes epoxi.

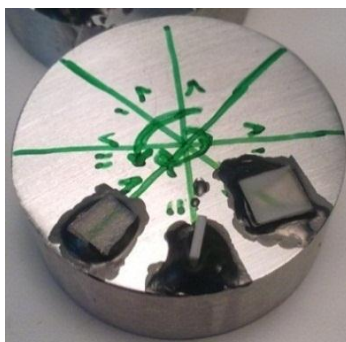


Figura 68 - Imagem do porta-amostras com 3 das 8 posições de fixação ocupadas com partes de amostras previamente dissecadas e fixadas vertical e horizontalmente.

Após 1h de exposição á luz Infravermelha, as amostras do porta-amostras foram sujeitas a mais 20s de ar quente (secador) para garantir a secagem total dos revestimentos feitos. Colocou-se o porta-amostras num arco de fixação e instalou-se o mesmo numa câmara de deposição de vapor (Figura 69). Fez-se vácuo até aproximadamente 10^{-1} mbar e, para que o gás residual presente na câmara de deposição fosse árgon de elevada pureza, foram feitas algumas purgas. Este procedimento prolongou-se durante 15-20min.



Figura 69 - Fotografia do equipamento utilizado para aplicar um revestimento de ouro nas amostras a observar em SEM (Joel Fine Coat Ion Sputter JFC - 1100).

Foi ligada a fonte de tensão em corrente contínua (1kV) e controlado o vácuo presente no plasma formado no interior da câmara através de um mano-regulador (até serem atingidos 5,5 mA).

Sendo o cátodo o alvo de ouro e o ânodo as amostras, houve deposição de ouro nas amostras tornando o anel de 1mm anteriormente não revestido igualmente condutor. Na Figura 70 está fotografada esta deposição de ouro e o resultado final da amostra revestida. Esta deposição teve um tempo de duração de cerca de 7min, findo o qual desligou-se o vácuo e procedeu-se à visualização das amostras preparadas em SEM.



Figura 70 - Imagem do plasma formado dentro da câmara de deposição e pormenor do revestimento final em ouro das amostras fixadas previamente no porta-amostras.

Relativamente à preparação das fibras de PBG antes da sua visualização em SEM, estas foram coladas numa fita de carbono e revestidas a ouro de modo a torná-las condutoras.

Para visualização SEM foi utilizado o equipamento *Jeol Scanning Microscope JSM - 5200*, visível na Figura 71, e ampliações de 100-10000 vezes com focagens às 20000 vezes.

A tensão de aceleração de feixe foi de 15kV para PLA e compósito PLA/PBG (uma vez que um valor superior, por exemplo 20kV, decompunha as amostras), de 20kV para as fibras de PBG, e não foram revelados efeitos de cargas electrostáticas durante as observações, o que valida o revestimento/preparação anteriormente feito.

A captura das fotomicrografias foi realizada entre 2 a 4 ciclos de integração no sentido de minimizar o ruído de fundo presente.



Figura 71 - *Jeol Scanning Microscope JSM - 5200*.

3- Ensaio de tracção

Para avaliação da evolução de algumas das propriedades mecânicas foram realizados ensaios de tracção. Estiveram na base da realização destes ensaios as normas ASTM D 638 - 03 - *Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics* e ASTM D 2343 - 03 *Standard Test Method for Tensile Properties of Glass Fiber Strands, Yarns, and Rovings Used in Reinforced Plastics*, para os provetes de PLA e PLA/PBG e espécimes de PBG, respectivamente.

Nestes ensaios submeteram-se os provetes a uma força continuamente crescente até se observar a rotura dos mesmos. Particularmente os espécimes de PBG a traccionar sofreram antecipadamente uma impregnação com resina, pois segundo a ASTM D 2343 - 03 ^[184], para além da imposição de terem pelo menos 250mm, os espécimes devem ser impregnados com uma resina compatível com o material de reforço - PBG, uma vez que os resultados produzidos são mais representativos da verdadeira resistência mecânica do material quando utilizado no produto final. A falha prematura do impregnante poderá no entanto ocorrer se o alongamento deste for inferior ao do material impregnado. A constituição do espécime final a traccionar deverá ser de $70 \pm 5\%$ do material impregnado, no caso PBG, sendo o restante a resina.

A norma induz a utilização de um equipamento de impregnação semelhante ao visível na figura seguinte; no entanto, foi utilizado um método mais rudimentar no sentido de se conseguir uma adaptação do pressuposto. Apenas foi utilizado um tanque de impregnação e utilizado cianocrilato e resina epóxida como impregnantes teste. O espécime a traccionar está visível no ponto 2.2 Preparação dos provetes - Figura 66 (página 140).

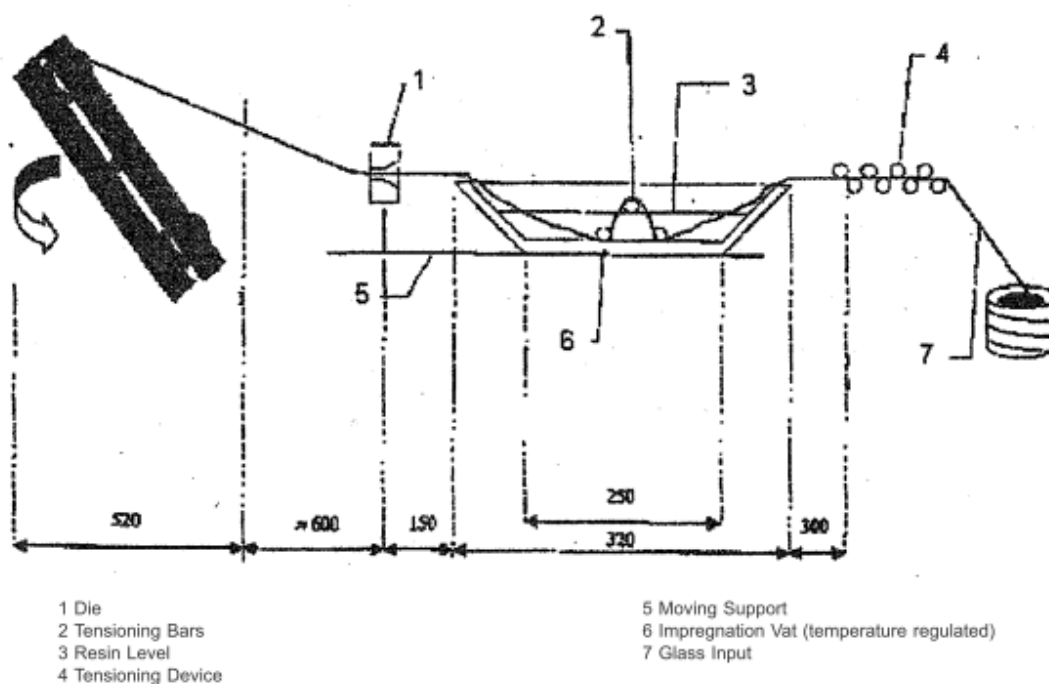


Figura 72 - Configuração do equipamento típico de impregnação recomendado para impregnação dos espécimes de PBG a traccionar. ^[184]

Os ensaios de tracção teste para definir a velocidade a utilizar no caso dos espécimes de PBG podem ser consultados no Anexo C (Figura C 1, Figura C 2 e Figura C 3 - páginas 201 e 202). Pelos resultados obtidos, quer da impregnação, quer da curva de tracção obtida nas diferentes tentativas, foi abortada a hipótese de realização de ensaios de tracção aos espécimes de PBG.

Todos os provetes a traccionar foram mantidos durante as 48h que antecederam o ensaio de tracção a uma $T=23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e $50 \pm 5\%$ de humidade relativa, e os ensaios foram realizados nas mesmas condições referidas.

A força aplicada foi uniaxial e a uma velocidade constante mas variável segundo a composição e estágio de degradação do provete; ou seja, foi utilizada uma velocidade para traccionar as amostras de PLA e utilizada uma velocidade diferente para traccionar os provetes de compósito de PLA/PBG, assim como houve a utilização de uma velocidade para as amostras que não tinham sido sujeitas a degradação e outra distinta para as amostras que pertenciam ao último estágio de degradação.

Segundo a norma adequada, a velocidade utilizada para traccionar os provetes de PLA e PLA/PBG seria entre 1-10mm/min (Tabela 16); no entanto, é advertido que a velocidade escolhida deve ser a menor que conduza à rotura dos provetes para que o ensaio tenha a duração de 30s a 5min.

Com o propósito de definir esse valor foram feitos alguns ensaios teste reproduzidos no Anexo C (Figura C 4 e Figura C 5 - páginas 203 e 204), que conduziram a valores finais de velocidade de testes de tracção de 3mm/min para provetes de PLA com tempos de degradação entre 0 e 6 semanas, de 2mm/min para provetes de PLA com 8 semanas de degradação, 0,5mm/min para provetes de PLA/PBG com tempos de degradação de 0-5semanas, e velocidade de tracção de 0,4mm/min para provetes de compósito com tempos de degradação superiores a 6 semanas inclusive.

Tabela 16 - Designações de velocidade do teste de tracção para os diferentes tipos de materiais. ^[183]

Classification ^B	Specimen Type	Speed of Testing, mm/min [in./min]	Nominal Strain ^C Rate at Start of Test, mm/mm·min [in./in.·min]
Rigid and Semirigid	I, II, III rods and tubes	5 [0.2] $\pm$ 25 %	0.1
		50 [2] $\pm$ 10 %	1
		500 [20] $\pm$ 10 %	10
	IV	5 [0.2] $\pm$ 25 %	0.15
		50 [2] $\pm$ 10 %	1.5
		500 [20] $\pm$ 10 %	15
	V	1 [0.05] $\pm$ 25 %	0.1
Nonrigid	III	10 [0.5] $\pm$ 25 %	1
		100 [5] $\pm$ 25 %	10
		50 [2] $\pm$ 10 %	1
	IV	500 [20] $\pm$ 10 %	10
		50 [2] $\pm$ 10 %	1.5
		500 [20] $\pm$ 10 %	15

^A Select the lowest speed that produces rupture in ½ to 5 min for the specimen geometry being used (see 8.2).

Previa e posteriormente ao ensaio de tracção, foram controladas as dimensões dos provetes, nomeadamente o seu comprimento útil inicial l_0 e final l_f , assim como a menor área inicial da secção transversal do provete, A_0 .

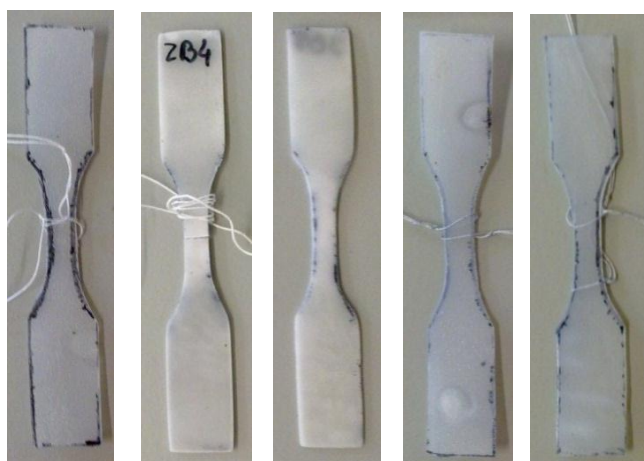
Neste trabalho utilizou-se o equipamento de tracção Tira Test 2705, com uma célula de carga de 500N. Este equipamento é equipado com um sistema de ar comprimido para fechar as amarras pneumaticamente e mede a distância percorrida das amarras desde o início do ensaio de tracção até à rotura do provete. O *software* TiraTest devolve valores de tempo de ensaio (s), distância percorrida pelas amarras (mm) e força aplicada (N) para cada intervalo de tempo de aquisição.

Capítulo 3

Resultados e Discussão

1 - Degradação Hidrolítica: perda de massa

Resultante do ensaio de degradação, para os diferentes provetes e espécimes degradadas, podemos verificar nas figuras seguintes o aspecto dos mesmos ao longo dos estágios de degradação.

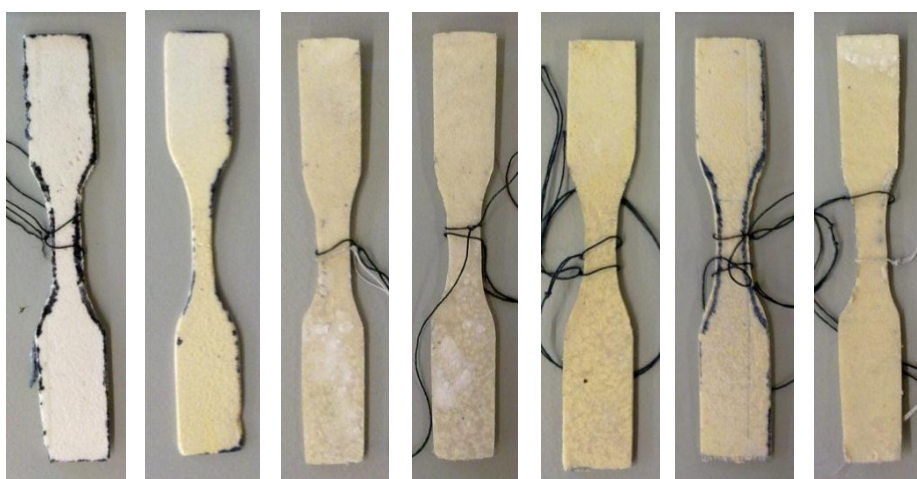


Referência 2ºEstágio 4ºEstágio 7ºEstágio 9ºEstágio

Figura 73 - Aspecto dos provetes de PLA sem degradação (amostra de referência) e ao longo de 4 estágios de degradação.



Referência 1ºEstágio 3º Estágio 4ºEstágio 5ºEstágio 6ºEstágio 7ºEstágio 8ºEstágio 9ºEstágio
 Figura 74 - Aspecto dos espécimes de PBG sem degradação (amostra de referência) e ao longo de 8 estágios de degradação.



Referência 2ºEstágio 4ºEstágio 6º Estágio 7ºEstágio 8ºEstágio 9ºEstágio
 Figura 75 - Aspecto dos provetes do compósito PLA/PBG sem degradação (amostra de referência) e ao longo de 6 estágios de degradação.

Correspondendo o 1º, 2º, 3º, 4º, 5º, 6º, 7º, 8º e 9º estágio a 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 7; e 8 semanas de degradação hidrolítica em PBS a 37°C, respectivamente, e a amostra de referência a uma amostra sem degradação; pode verificar-se que houve alteração da cor inicial dos provetes de PLA e PLA/PBG e espécimes de PBG para uma cor amarelada. Com maior evidência no compósito de PLA/PBG e espécimes de PBG. No entanto, para além da alteração visual, através do manuseamento dos provetes e espécimes no decurso dos diferentes testes de caracterização, foi notória a degradação sua física. Mais particularmente no que diz respeito aos provetes de compósito PLA/PBG que se tornaram mais ásperos e aos espécimes de PBG, onde o manuseio se tornou crítico, pela fragmentação que causava.

Nas figuras seguintes é visível a perda de massa em percentagem sofrida pelos provetes de PLA, compósito PLA/PBG e espécimes de PBG ao longo dos estágios de degradação, em semanas.

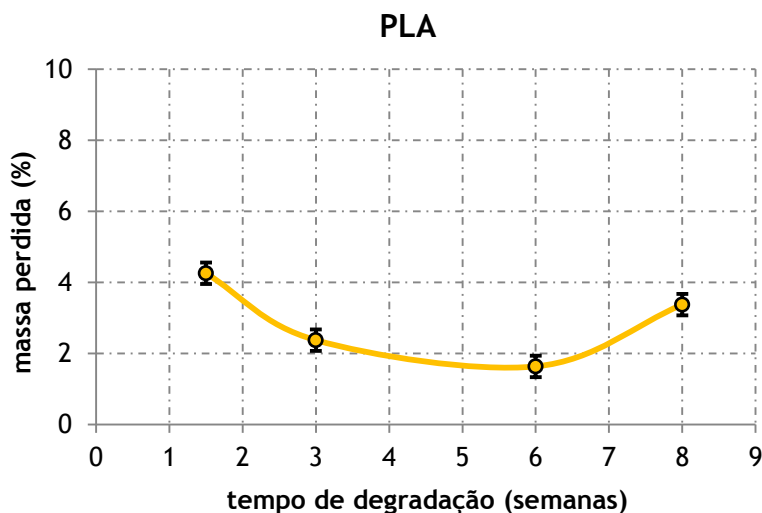


Figura 76 - Gráfico representativo da perda de massa dos provetes de PLA (%) ao longo dos estágios de degradação (semanas), com um desvio absoluto de 0,3.

Como é possível observar, a Figura 76 evidencia a perda de massa dos provetes de PLA (em percentagem) ao longo do ensaio de degradação (contabilizado em semanas), com um desvio absoluto de 0,3.

A perda de massa do provete de PLA varia entre 2-4% $\pm$ 0,3, e uma vez que o PLA não apresenta degradação física visível (alteração de cor e/ou porosidade, por exemplo) ou alteração de dimensões mensuráveis através de paquímetro, mas apresenta perdas de massa, pode induzir-se que a degradação do PLA é mais rápida no interior do material, sofrendo deste modo erosão no seio do material, como referenciado na bibliografia. ^[101]

O valor máximo de perda de massa, cerca de 4%, corresponde ao estágio inicial de degradação - 1,5 semanas. Este facto pode ser explicável pelo grau de cristalinidade inicial do PLA (facilmente verificado por DSC) que afecta a sua velocidade de degradação, e a compacidade do provete ou o seu espaçamento livre para a permeabilidade da água, que têm consequências na sua perda de massa. A proporção de fase amorfa e cristalina existente no PLA utilizado, na medida em que a parte amorfa sofre hidrólise precedentemente à região cristalina uma vez que os segmentos cristalinos reduzem a permeabilidade de água na matriz, traduz-se numa perda de massa inicial do provete ^[101]. Aliado ao facto do método utilizado na manufactura dos provetes, *solvent casting*, ser preferencialmente utilizado para a manufactura de estruturas porosas ^[115], prevê-se que, apesar das tentativas de melhoria do método no sentido de fabricar placas/provetes compactos de PLA, estes apresentem algumas porosidades internas que justificariam esta perda de massa inicial elevada. (Em termos de

porosidade, poder-se-á confirmar a veracidade desta influência na perda de massa, pela análise SEM feita à posteriori).

No entanto, este efeito de perda de massa é contrabalançado pela tendência de ganho de massa através da absorção de água - fase de iniciação de hidrólise do PLA, seguida da separação hidrolítica das ligações éster. ^[129] Por esta razão, para tempos de degradação onde estes pressupostos se encontram quase compensados, a perda de massa de PLA é mínima ($<2\% \pm 0,3$).

Todavia, a contínua perda da fase amorfa e aumento de absorção de água por parte do provete, agora com mais espaço interno e maior área de superfície exposta, acelera o seu processo de hidrólise e aumenta a sua perda de massa novamente. Ou seja, a água torna-se nesta fase um acelerador de perda de massa pois à medida que a degradação ocorre, o polímero torna-se mais hidrofílico e aumenta a sua capacidade de absorção de água, acelerando a própria degradação. ^[102] Provavelmente será este o efeito ténue visto a partir das 6 semanas de degradação.

No limite, a degradação hidrolítica da região cristalina do poliéster conduz ao contínuo aumento da perda de massa e consequentemente à reabsorção completa ^[101]; deste modo, a certa altura da hidrólise, o provete deve colapsar e libertar pequenos extractos. ^[31] No entanto, uma vez que a interacção entre a difusão e reacção de hidrólise se traduz na questão de que uma placa maior se degrada mais rapidamente que uma de menor dimensão (as cadeias pequenas com grupos terminais ácidos não se difundem tão rapidamente de modo a criar um ambiente ácido no interior da placa maior) a velocidade de degradação do PLA deve diminuir ao longo da evolução da degradação, já que se vai tornando mais pequeno. ^[90]

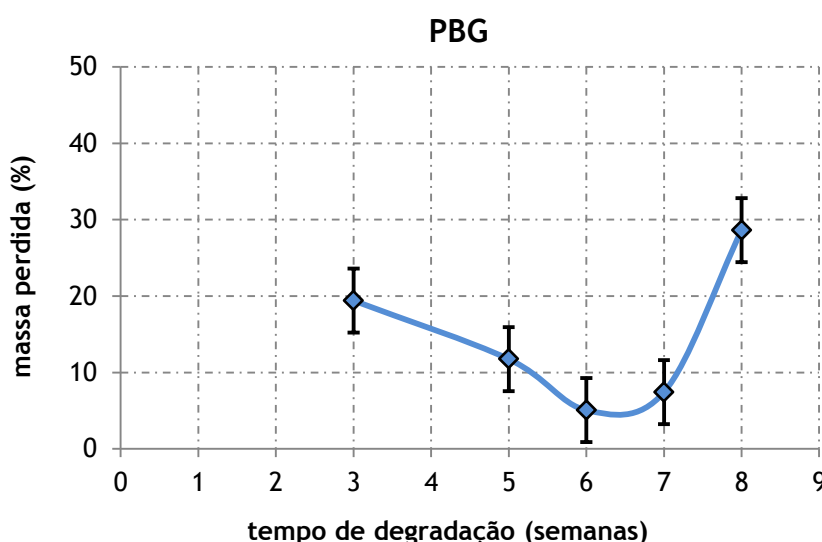


Figura 77 - Gráfico representativo da perda de massa dos espécimes de PBG (%) ao longo dos estágios de degradação (semanas), com um desvio absoluto de 4,2.

Relativamente ao PBG (Figura 77), os seus espécimes apresentaram perdas de massa percentuais entre os 5 e 30% $\pm$ 4,2 ao longo do tempo de degradação de ensaio, desde 3 a 8 semanas.

Pelo observável na figura anterior, o comportamento de perda de massa para o PBG assemelha-se ao já referido para o PLA; isto é, embora numa ordem de grandeza superior, a perda de massa observada para os espécimes de PBG quando sujeitos à degradação em PBS a 37°C mostra igualdades para com os provetes de PLA. Como referido no Capítulo 1, o mecanismo de dissolução dos vidros está relacionado com as reacções entre o meio e o vidro ^[46], e inicia-se com a hidratação das ligações P-O-P presentes ^[10], através da formação de uma camada hidratada à superfície da fibra ^[46]. Pelo facto da espessura desta camada hidratada ser crescente, até à sua formação seria previsível alguma perda de massa; porém este valor obtido, cerca de 20% de perda de massa do espécime, pode ser influenciado por deficiências de processamento do PBG. (Após avaliação SEM poderemos avaliar se eventuais defeitos de processamento influenciaram este valor de perda de massa; por exemplo, o aumento da área exposta ao meio de degradação traduzir-se-ia num aumento de perda de massa inicial pontual uma vez que a área contabilizada como inicialmente exposta não traduziria a realidade verificada.)

No entanto, à medida que esta camada hidratada se torna mais espessa, o que acontece ao longo dos estágios de degradação com a troca de iões sódio do vidro com iões hidrogénio da água ^[10] e consecutiva reacção de hidratação, esta compensa parcialmente a perda de massa, reduzindo o valor percentual deste valor. E, após esta primeira fase de hidratação dá-se a reacção de hidrólise, que provoca a quebra da rede matricial na camada hidratada pela quebra das ligações P-O-P ^[10] e onde a cadeia polimérica é hidrolisada pelas moléculas de água ^[46]. Esta sequência de acontecimentos provoca um novo aumento da perda de massa do espécime de PBG em estudo e está visível na Figura 77 a partir das 6 semanas de degradação. Também este pormenor pode ser confirmado pela observação SEM.

A possibilidade de formação de uma camada cristalina na superfície do vidro referenciada por alguns autores ^[52] como um retardador de dissolução do vidro, não se verifica neste caso; pelo contrário, uma vez que o PBG em estudo apresenta 40%mol de CaO, esta quantidade induz uma dissolução extremamente rápida não deixando que esta camada cristalina se forme. ^[52]

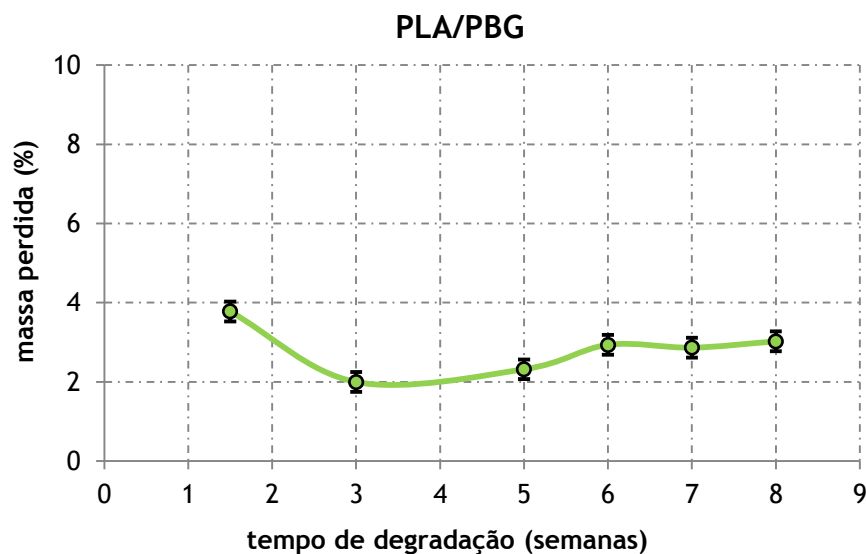


Figura 78 - Gráfico representativo da perda de massa dos provetes de compósito de PLA/PBG (%) ao longo dos estágios de degradação (semanas), com um desvio absoluto de 0,25.

O comportamento em termos de perda de massa em percentagem para o compósito de PLA/PBG pode ser visto na figura anterior.

Pode-se afirmar que a perda de massa é quase constante ao longo dos diferentes estágios de degradação em estudo, tendo como extremos, perdas de 2 e 4% $\pm$ 0,25. Este comportamento ao longo do ensaio de degradação em PBS a 37°C é resultado da conjugação da degradação individual dos seus componentes, PLA e PBG; e a ordem de grandeza dos valores para a sua perda de massa é a mesma que para o PLA.

A degradação do compósito varia com a proporção dos seus constituintes e com a proporção de fase amorfa em relação à cristalina existente no mesmo.

Sendo que a parte amorfa sofre hidrólise anteriormente à fase cristalina, e que a matriz de PLA vê preenchidos todos os espaçamentos eventualmente provenientes do seu processamento através da adição de PBG, a degradação do compósito baseia-se na dissolução do vidro no meio e formação de uma camada hidratada em redor das fibras quando expostas. Posteriormente dá-se a hidrólise da parte cristalina do compósito, facto não contemplado no ensaio de degradação feito.

2 - SEM

Através da técnica microscópica SEM foram identificadas as diferenças morfológicas e comportamentais dos materiais utilizados neste projecto ao longo do ensaio de degradação.

Foram adquiridas fotomicrografias para os extremos do ensaio de degradação para os provetes de PLA e compósito de PLA/PBG, o que corresponde à amostra de referência sem degradação e ao 9º estágio - 8 semanas de degradação; e para duas zonas distintas dos

provetes. Sujeito à aquisição de imagem microscópica esteve o antes e o após ensaio de tracção, sendo que nesta última análise avaliou-se a zona de rotura do provete sujeita à tracção.

No que diz respeito aos espécimes de PBG, foram adquiridas fotomicrografias para os extremos e ponto central de degradação, correspondendo a 1, 4 e 8 semanas de degradação em PBS a 37°C.

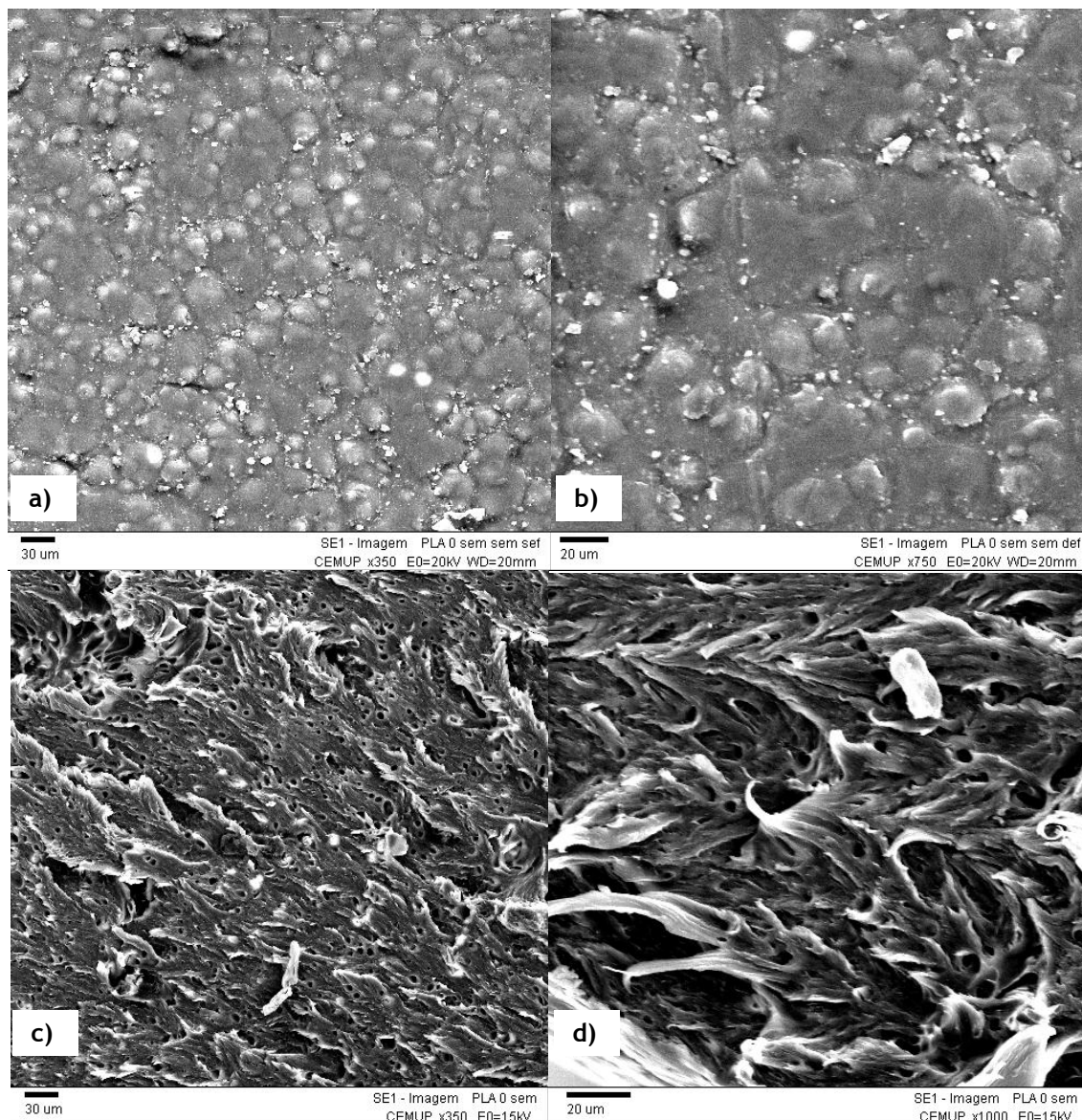


Figura 79 - Imagem de SEM para amostras de PLA sem degradação.

(a) Pólipos na amostra de PLA sem degradação com uma ampliação de 350x; b) Pólipos na amostra de PLA sem degradação com uma ampliação de 750x; c) Direcção de deformação do PLA sem degradação com uma ampliação de 350x; d) Pormenor da deformação do PLA sem degradação com uma ampliação de 1000x)

Na Figura 79 a) são visíveis através de uma ampliação de 350x alguns pólipos presentes na amostra de PLA sem degradação. Esta fotomicrografia diz respeito a uma placa de PLA anteriormente sujeita ao método de *solvente casting* e prensa de pratos quentes, não correspondendo deste modo ao aspecto “original” do PLA - apesar mas sim à morfologia do PLA que foi sujeita à degradação em forma de provete. Na Figura 79 b) está fotografada a mesma amostra desta vez com uma ampliação superior, 750x.

A fotomicrografia c) da mesma figura representa o direccionamento de deformação do PLA sem degradação, provocado pelo ensaio de tracção a que foi submetido este provete realizado a uma velocidade de 3mm/mim. Esta morfologia diz respeito somente à secção de rotura do provete. A Figura 79 d) representa, com uma ampliação de 1000x, o pormenor descrito em c).

Fazendo uma análise do antes e pós deformação, pode-se induzir que os pólipos presentes nos provetes de degradação são simples bolhas de clorofórmio ou ar que ficaram retidas na estrutura de PLA, com diâmetros aproximados de 15µm. Estas bolhas consequentes do método utilizado ^[185] - *solvent casting*, terão sido provocadas aquando da manufactura das placas - na mistura do PLA com clorofórmio auxiliada por ultra-sons e agitação, evaporação forçada do solvente através do vácuo e/ou na subjugação das placas formadas à prensa de pratos quentes. Esta designação de bolhas, e não de agregados de PLA mal dissolvidos, é apoiada pelas fotomicrografias c) e d) da figura em análise onde são visíveis estes espaços vazios e não espaços concentradamente preenchidos com PLA. A particularidade de estas serem de clorofórmio ou ar só seria diferenciada se fossem adquiridas fotomicrografias de uma amostra de PLA antes e após a placa ser submetida à pressão e temperatura existente na prensa de pratos quentes ou através da observação de secções finas de amostra em microscopia óptica de transmissão nas mesmas duas situações. Desta análise complementar poderia concluir-se que as bolhas são de clorofórmio caso estas só fossem visíveis na situação pós prensa. Uma possível melhoria no método *solvent casting* e consequente diminuição ou eliminação deste efeito previsto do mesmo, a presença de bolhas, passaria eventualmente pela pressurização da 2ª etapa de evaporação de solvente ao invés de esta acontecer à P_{amb} .

Esta figura confirma o pressuposto aquando da medição da perda de massa dos provetes de PLA para estágios de degradação iniciais - Figura 76 - página 150; ou seja, que uma vez poroso, o PLA teve uma perda de massa inicial superior à prevista para um provete de PLA compacto.

A Figura 79 c) e d) demonstram a deformação orientada provocada pela deformação a que foi sujeito o provete de PLA quando foi traccionado. Nas fotomicrografias referidas da figura em observação é visível a presença de planos de clivagem em áreas bem definidas. A fronteira destas áreas de clivagem é composta por zonas fibrosas de muito elevada deformação com histerese associado. É de salientar ainda que as zonas de muito elevada deformação estão orientadas perpendicularmente às faces do perfil do provete.

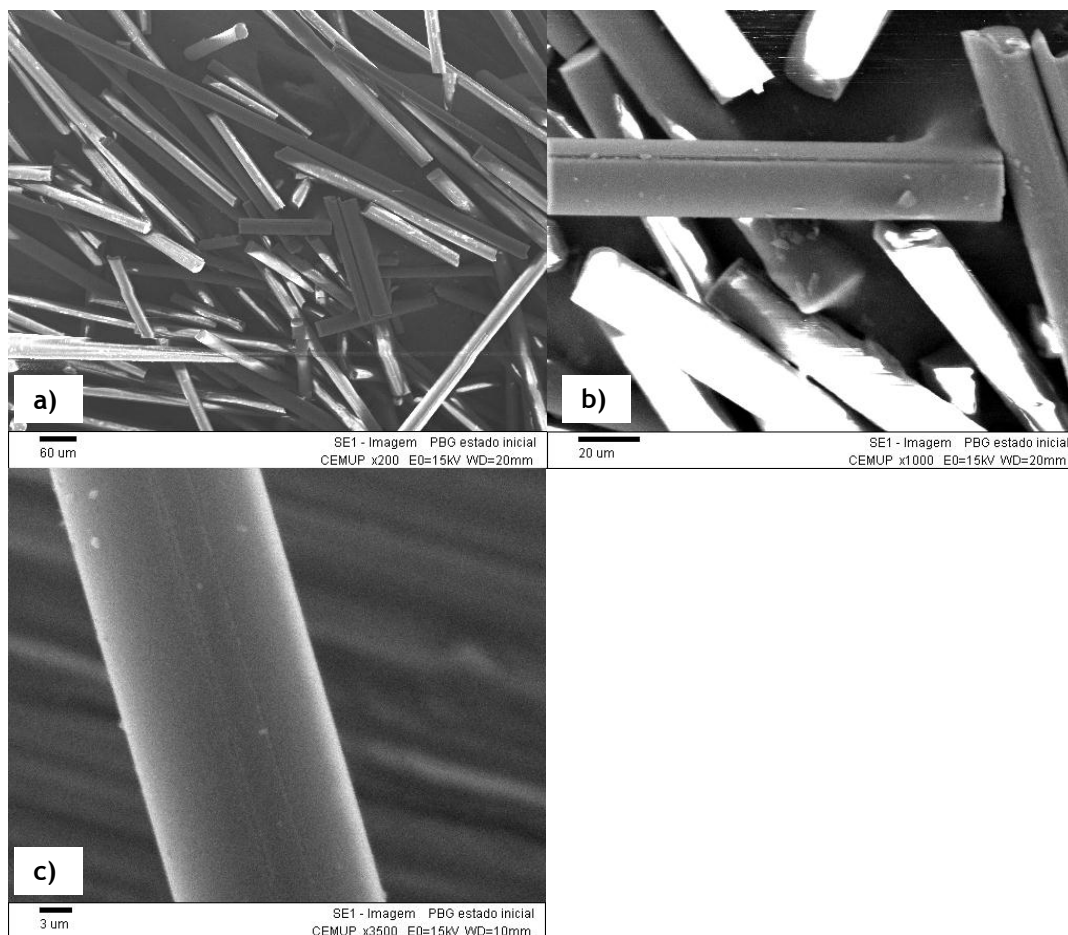


Figura 80 - Imagem de SEM para amostras de PBG sem degradação.

(a) Conjunto de fibras de PBG sem degradação com uma ampliação de 200x; b) Pormenor da morfologia superficial do PBG sem degradação com uma ampliação de 1000x; c) Pormenor da morfologia superficial de uma fibra de PBG sem degradação com uma ampliação de 3500x)

Como é visível na Figura 80 a) as fibras de PBG sem degradação têm forma de bastão, confirmando deste modo o já registado na Figura 75 - página 149, por microscopia óptica. Ao longo da observação também foi conseguida uma estimativa do seu diâmetro - 5µm.

Para ampliações de 1000x e 3500x, Figura 80 b) e c) respectivamente, é possível verificar que o seu processamento influenciou a estrutura superficial das fibras de PBG. Em ambas as fotomicrografias são notórias algumas depressões longitudinais nas fibras; depressões visíveis na maioria dos bastões visualizados nesta análise SEM.

Algumas pequenas partículas que são igualmente visíveis nas figuras poderão ser fragmentos resultantes da dissecção das amostras feita na preparação para visualização SEM, que estão aderidas electrostaticamente com uma força superior à sua massa, ficando deste modo coladas à superfície da fibra.

De referir que o tamanho (comprimento) das fibras aqui exposto não reproduz o tamanho original das fibras contínuas (Figura 54 - página 131) nem o tamanho das dimensões das aparas de PBG utilizadas na manufactura dos provetes (Figura 55 - página 132). Corresponde ao corte aleatório necessário para observação das amostras em SEM.

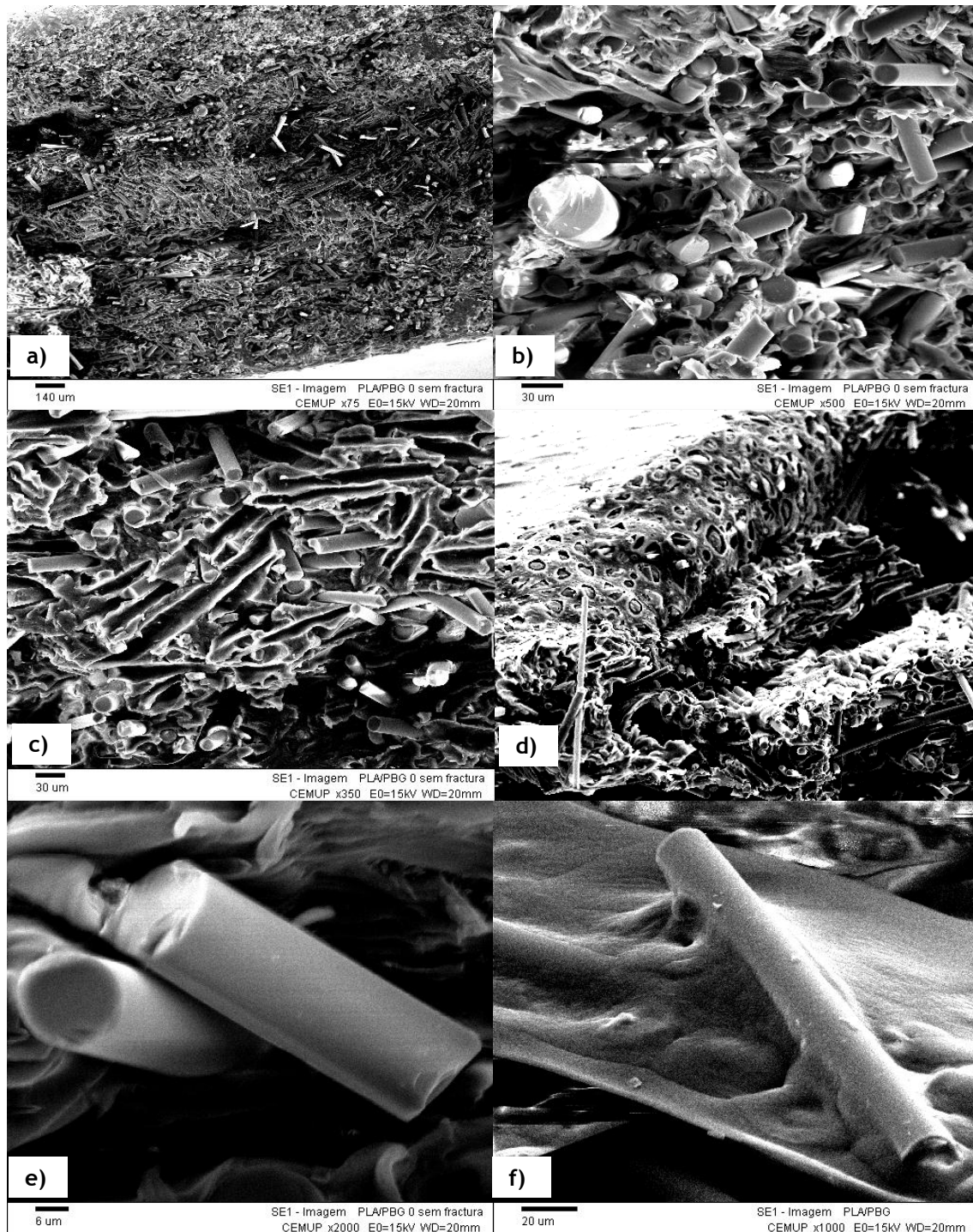


Figura 81 - Imagem de SEM para amostras de compósito PLA/PBG sem degradação.

- (a) Morfologia interna do compósito sem degradação com uma ampliação de 75x; b) Microestrutura do PLA/PBG sem degradação com uma ampliação de 500x; c) Morfologia interna da zona de deformação do provete de PLA/PBG sem degradação com uma ampliação de 350x; d) Microestrutura da zona de deformação do compósito PLA/PLB sem degradação com uma ampliação de 100x; e) Pormenor da fibra de PBG no compósito PLA/PBG sem degradação e deformação com ampliação de 2000x; f) Pormenor da zona de deformação e fibra de PBG do compósito PLA/PBG sem degradação com uma ampliação de 1000x)

Na Figura 81 podem-se observar diferentes fotomicrografias de SEM referentes ao compósito de PLA/PBG sem degradação; para o caso da morfologia inicial do provete Figura 81 a), b) e e) e após o provete ter sido traccionado Figura 81 c), d) e f).

Na Figura 81 a) pode-se identificar a morfologia superficial e interna do provete de compósito PLA/PBG sem degradação com uma ampliação de 75x; e na Figura 81 b), está visível o pormenor da morfologia interna do mesmo provete com uma ampliação superior, de 500x. Em ambas as fotomicrografias são visíveis as fibras de PBG envolvidas em PLA. Relativamente às dimensões dos bastões encontradas há na sua maioria diâmetros de $\approx 15\mu\text{m}$ e, como visível na Figura 81 b), um exemplar com o dobro do diâmetro, $\approx 30\mu\text{m}$. Ao longo da análise em SEM desta amostra foram encontradas estas disparidades de diâmetros, no entanto, a proporção de presença era de um ou nenhum bastão de dimensões superiores em cada ponto de focagem feito.

Na Figura 81 c) e d) conseguidas com ampliações de 350x e 100x respectivamente, pode ver-se o efeito da deformação do ensaio de tracção realizado a 0,5mm/min. Na figura c) são visíveis os locais demarcados no PLA onde estavam alocadas fibras de PBG, retiradas pela força de tracção aquando da rotura do provete. Na fotografia d) é perceptível a morfologia superficial do provete, equivalente à já observada na mesma figura fotomicrografia a), e a microestrutura interna do provete de compósito após traccionado para uma ampliação superior.

Para além do referido, a Figura 81 d) apresenta uma limitação do método empregue para garantir a extracção total do solvente utilizado na manufactura das placas prensa de pratos quentes, uma vez que este procedimento provocou a presença de uma prega na superfície da placa. Como visível, a espessura deste provete específico não é uniforme ao longo da sua extensão e adicionalmente estamos perante um ponto frágil, preferencial à rotura quando o provete foi sujeito à tracção. Como analisável pela figura, a deformação do provete foi iniciada na zona do provete com espessura menor.

A Figura 81 e) mostra o pormenor de uma fibra de PBG envolta em PLA num provete sem degradação e sem qualquer tipo de deformação forçada, que pode ser comparada com a Figura 81 f) onde temos o mesmo provete após ensaio de tracção. Nesta última figura é visível um bastão de PBG envolto em PLA assim como a deformação provocada no PLA (na figura identificável por ser idêntico a um manto a ser esticado nos dois extremos) pelo ensaio de tracção a que foi sujeito o provete.

Aparentemente a fractura ocorre de dois modos distintos no material compósito: a matriz sofre fractura dúctil e fibrosa e o PBG apresenta uma fractura frágil e de forma transversal ao próprio. É de salientar que existe ainda um terceiro fenómeno de fractura; este é devido à aparente não-coesão do PBG com o PLA quando solicitado em tracção. Em última análise, poderá ser este o principal responsável pelo início de fractura do provete compósito, pois o entalhe causado por este tipo de planos bem delineados poderá aumentar o factor de concentração de tensões e provocar desta forma a falha prematura dos provetes. Assim

sendo, é possível dizer que existem problemas interfaciais entre o PLA e o PBG que necessitam de ser resolvidos para que estes funcionem de forma mais coesa.

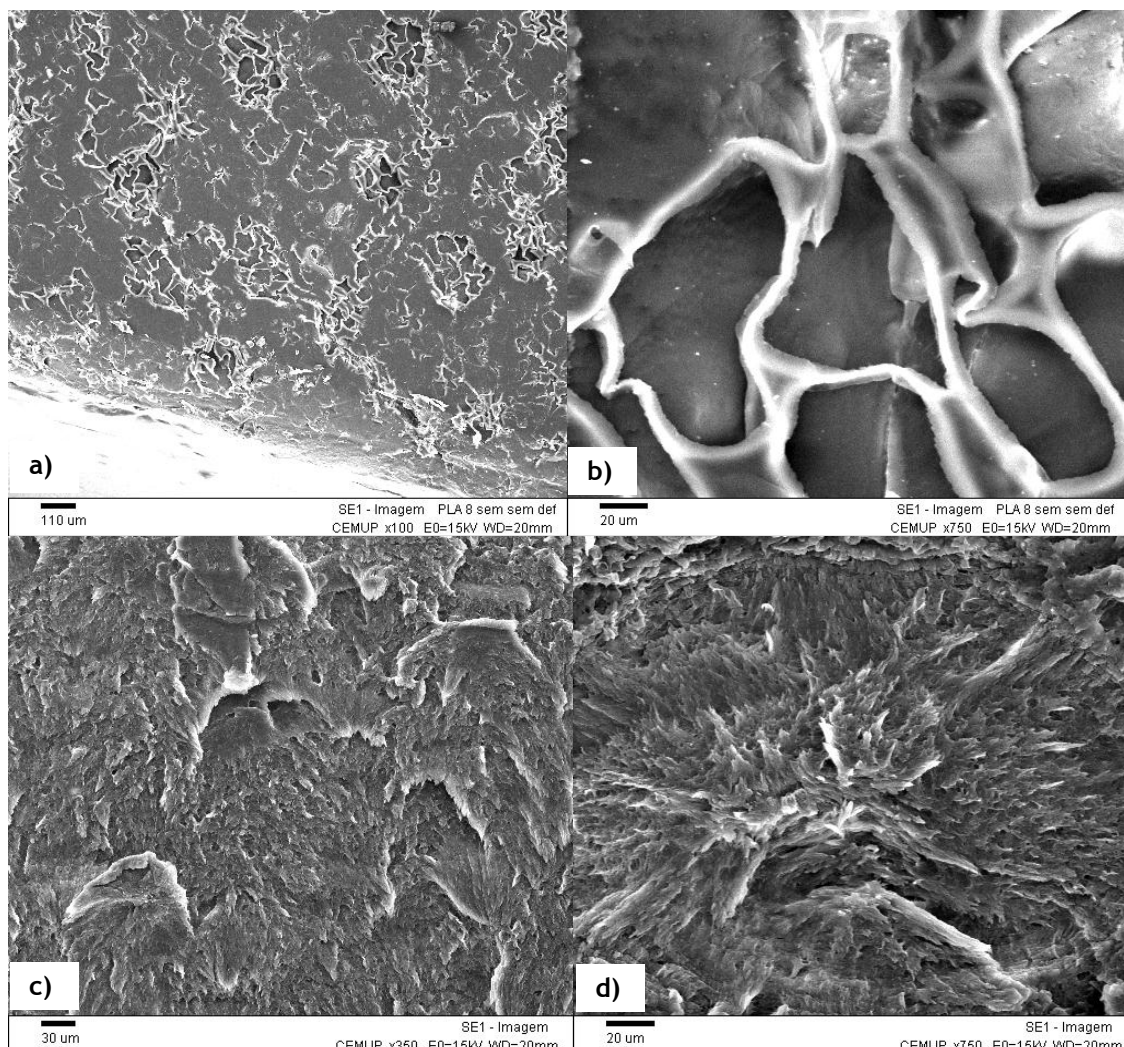


Figura 82 - Imagem SEM para amostras de PLA após 8 semanas de degradação em PBS a 37°C. (a) Morfologia superficial do provete de PLA no 9º estágio de degradação com uma ampliação de 100x; b) Microestrutura do PLA com 8 semanas de degradação e ampliação de 750x; c) Morfologia interna da zona de deformação do provete de PLA no 9º estágio de degradação com uma ampliação de 350x; d) Microestrutura da zona de deformação do PLA com 8 semanas de degradação e com uma ampliação de 750x)

Como referido, a degradação hidrolítica do PLA inicia com uma fase de absorção de água seguida da separação hidrolítica das ligações éster de modo aleatório segundo o princípio de *Flory* - que postula que todas as ligações têm a mesma reactividade ^[129]; no entanto, como é visível na Figura 82 a degradação do PLA após 8 semanas dá-se em zonas específicas e não de forma generalizada por todo o provete. A razão provável deste acontecimento é o facto de existirem regiões de bolhas nas amostras de PLA como as visíveis nas amostras de PLA com zero semanas de degradação (Figura 79). Provavelmente são estas as primeiras áreas a serem

degradadas uma vez que são locais mais susceptíveis a este ataque por serem possuidores de uma camada superficial protectora (do seu conteúdo) de pouca espessura.

Estas bolhas, agrupadas como colónias, foram causadas pelo método utilizado na manufactura das placas - *solvent casting*. Como referido para o caso do PLA sem degradação (Figura 79), este método é também utilizado para manufactura de estruturas porosas e a sua utilização para a manufactura de placas compactas, apesar de ter sofrido melhorias, necessitava de reajustes suplementares de adaptabilidade de método ao caso.

Na Figura 82 a) são visíveis ao longo da superfície e interior do provete, com uma ampliação de 100x, essas zonas referenciadas como sujeitas primeiramente à degradação; e a Figura 82 b) dá-nos um pormenor da microestrutura de um desses locais através de uma ampliação de 750x. Destas duas imagens conclui-se que a hidrólise dos polímeros não se resume somente à fragmentação molecular aleatória, pelo que também está sujeita e é susceptível de diversos factores como a história de processamento. Esta influencia não só a estrutura química, como a pureza do material ^[128] e grau inicial de cristalinidade ^[102]; de onde se conclui que sempre que há parte amorfa esta sofre hidrólise precedentemente à região cristalina influenciando a aleatoriedade de hidrólise polimérica ^[72].

Porém, independentemente do descrito, à medida que a degradação vai ocorrendo o polímero alifático torna-se mais hidrofílico pelo que aumenta a sua capacidade de absorção de água e acelera a sua própria degradação. ^[102] Uma vez que para um típico material poliláctico semi-cristalino ^[109] a perda de massa é observada após 30 semanas a 37°C num padrão fosfato ^[30], poderíamos confirmar este comportamento se estendêssemos o ensaio de degradação a 7,5 meses.

Para além das bolhas iniciais explicarem o aspecto da degradação, também o facto da erosão do PLA ser no seio do material ^[101], não estando por isso a degradação e erosão confinadas à superfície, pode ser uma explicação para o observável.

Para os casos de degradação no seio do material existe um efeito autocatalítico devido ao aumento da quantidade de compostos com grupos carboxílicos e estes componentes de baixa massa molar não conseguem permear para fora do revestimento. Deste modo os produtos de degradação na camada superficial do revestimento são, em contradição, dissolvidos na solução tampão envolvente. ^[101] Razão pela qual o tamanho do provete permanece constante, e só com o avançar da erosão é que a forma polimérica tende para uma estrutura mais porosa, com macro e microporos com diâmetros de 100 e 0,1µm ^[72], respectivamente. Poros estes que são visíveis na Figura 82 a) e b) e que dão crédito a esta exposição.

Uma conjugação das duas fundamentações, existência de bolhas e degradação no seio do material, poderá estar na base das figuras observadas.

Na Figura 82 c) e d) são visíveis as zonas de deformação numa amostra de PLA após 8 semanas de degradação em PBS a 37°C, para ampliações de 350x e 750x, respectivamente.

Na primeira fotomicrografia são visíveis diferentes locais de deformação ao longo da zona de rotura do provete. Aqui consegue-se observar a orientação dada à deformação provocada pela aplicação de carga do ensaio de tracção. Como referido anteriormente, a superfície de fractura denuncia a forma da propagação desta, cuja direcção é perpendicular às faces do perfil do provete.

A segunda fotomicrografia mostra um local onde foi necessário maior deslocamento para se alcançar rotura local total; ou seja, é notória uma zona circular com deformação direccionada para um centro radial perfeitamente definido. Aparentemente esta ainda seria uma zona de elevada ductilidade e pouco afectada pela degradação, formando uma espécie de micro-estricção.

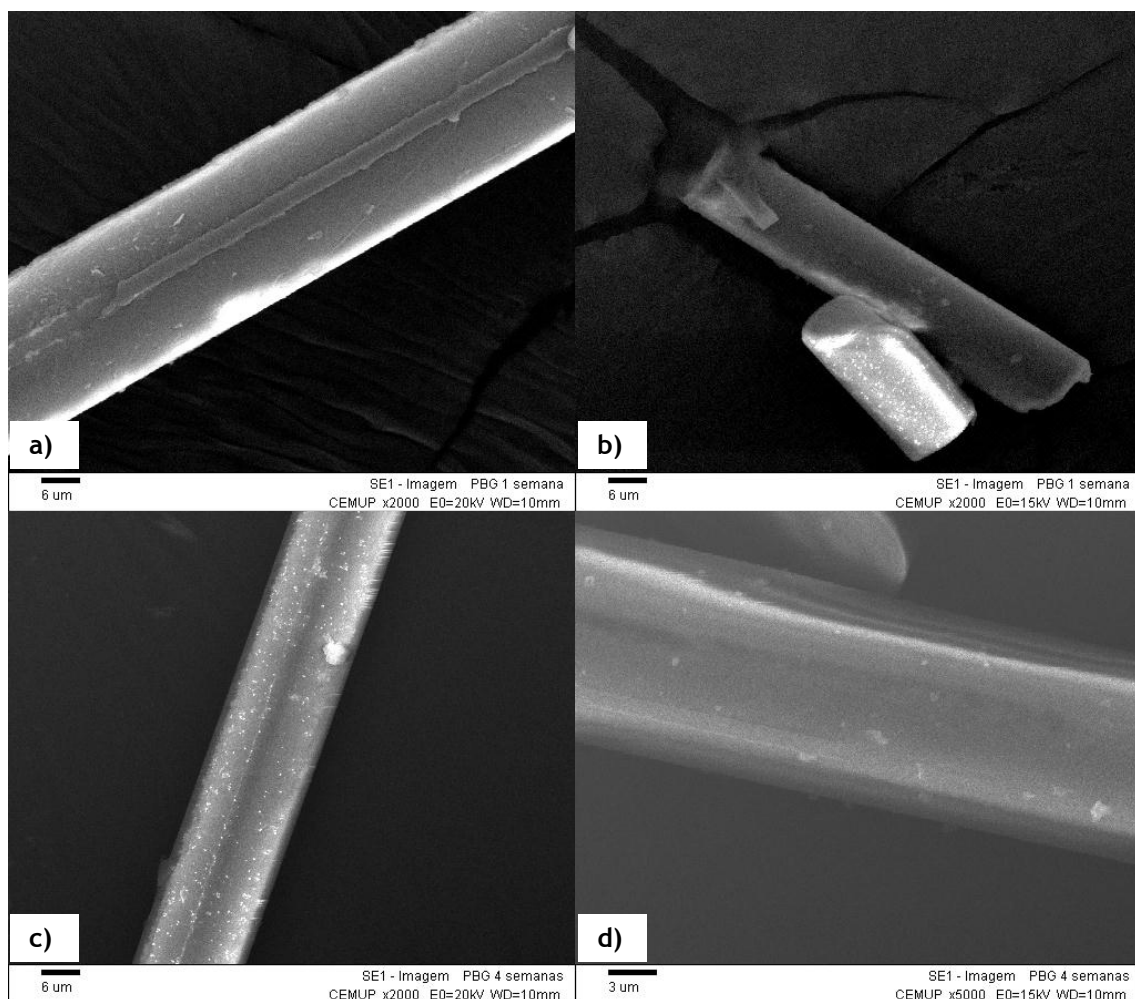


Figura 83 - Imagens SEM para amostras de PBG com 1, 4 e 8 semanas de degradação em PBS a 37°C. (a) Morfologia da fibra de PBG após 1 semana de degradação com uma ampliação de 2000x; b) Microestrutura da fibra de PBG após 1 semana de degradação para uma ampliação de 2000x; c) Morfologia interna da fibra de PBG após 4 semanas de degradação com uma ampliação de 2000x; d) Pormenor da morfologia de um exemplar de fibra de PBG no 5º estágio de degradação com uma ampliação de 5000x)

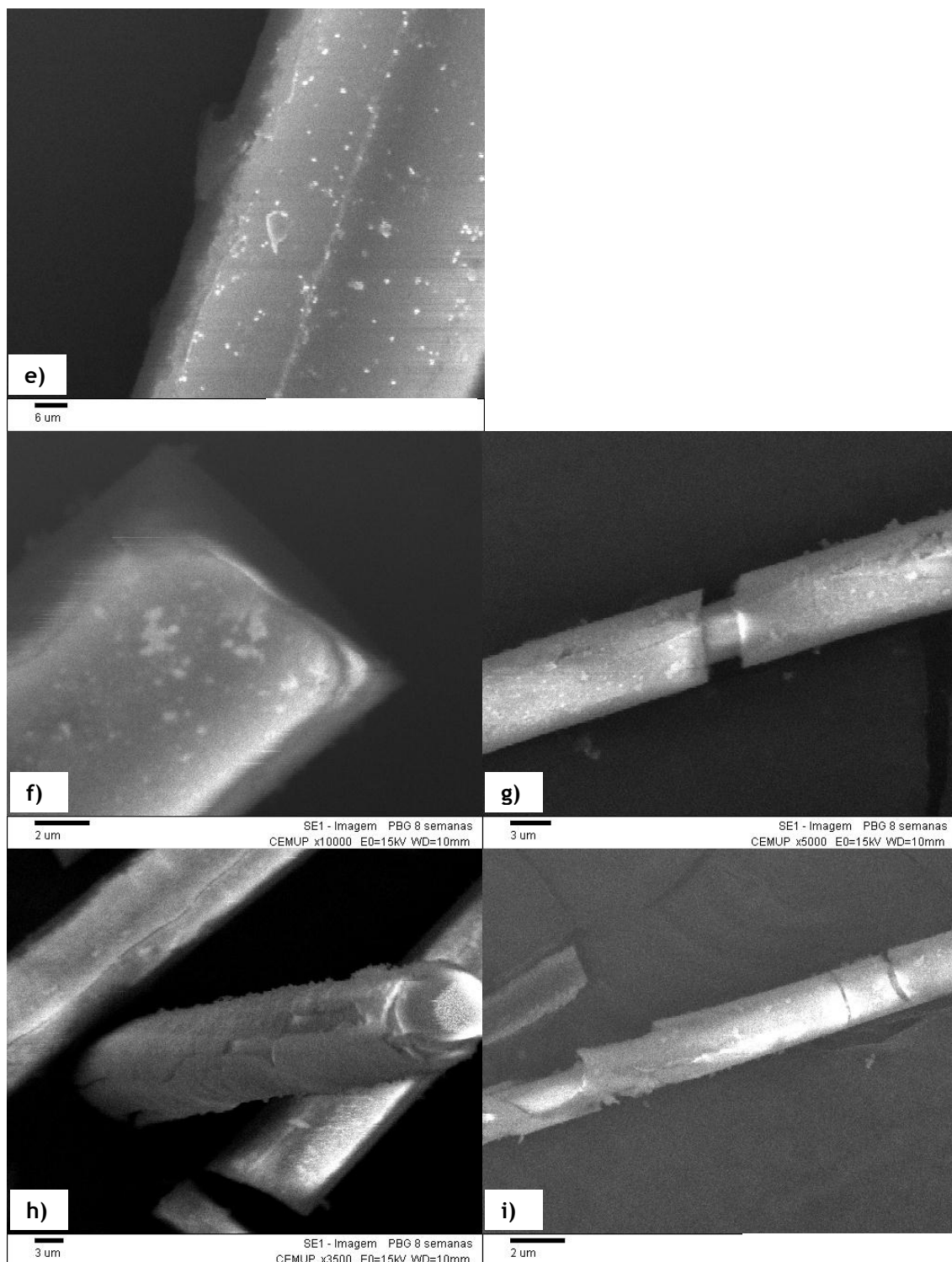


Figura 83 - Imagens SEM para amostras de PBG com 1, 4 e 8 semanas de degradação em PBS a 37°C (cont.). (e) Pormenor da morfologia interna da fibra de PBG com 4 semanas de degradação com uma ampliação de 7500x; f) Pormenor das consequências radiais de 8 semanas de degradação numa fibra de PBG visível com uma ampliação de 10000x; g) Pormenor das consequências longitudinais de 8 semanas de degradação numa fibra de PBG visível com uma ampliação de 5000x; h) Microestrutura da fibra de PBG após o último estágio de degradação com uma ampliação de 3500x; i) Pormenor da morfologia da fibra de PBG após 8 semanas de degradação com uma ampliação de 1000x)

Na Figura 83 a) é visível com uma ampliação de 2000x a morfologia de uma fibra de PBG após 1 semana de degradação em PBS a 37°C. É mostrado ao pormenor a zona de defeito inicial da manufactura das fibras de PBG e como é que a degradação foi influenciada pela existência da mesma. Ou seja, pode-se verificar na figura que este defeito ao longo da fibra está agora completamente preenchido, provavelmente com fragmentos de PBG degradados/dissolvidos. O mecanismo de dissolução dos vidros está relacionado com as reacções entre a água e o vidro. ^[46] Neste mecanismo de degradação há uma hidratação das ligações P-O-P que ocorre em 2 passos interdependentes conduzindo à dissolução do vidro ^[10]. Como já referido no ponto 1.2.2.1.3 Degradação hidrolítica - página 53, no primeiro passo deste mecanismo a água difunde-se no vidro formando uma camada hidratada ^[46] e dá-se a reacção de hidratação com a troca de iões sódio do vidro com iões hidrogénio da água ^[10]. No segundo tempo, tem lugar a reacção de hidrólise ^[46] que corresponde há quebra da rede matricial na camada hidratada pela quebra das ligações P-O-P ^[10], e onde a cadeia polimérica é hidrolisada pelas moléculas de água.

Esta camada hidratada, resultante do primeiro passo de dissolução do PBG está bem visível nesta figura. Trata-se da camada superficial transparente que recobre toda a fibra de vidro e que é perceptível em todas as fotomicrografias constituintes da Figura 83. No entanto, uma vez que na Figura 83 a) e b) esta camada já está presente, delas se pode inferir que o passo primeiro da dissolução do PBG já está bem patente desde o 1º estágio de degradação considerado neste ensaio (1 semana); seria interessante verificar o seu começo diminuindo o intervalo de estágios de degradação para dias ou mesmo horas (em vez de semanas), e ir controlando por visualização SEM o aparecimento desta camada hidratada.

Na Figura 83 c), d) e e) está representado o efeito da degradação nas fibras de PBG após 4 semanas com ampliações de 2000, 5000x e 7500x, respectivamente. Nestas também é visível a camada superficial hidratada, que se apresenta como um gel em torno de toda a superfície exposta da fibra. Na Figura 83 c) e e) é ainda visível que o cerne da fibra ostenta agora uma superfície irregular contrariamente à inicial - lisa, e também são visíveis por toda a extensão das fibras algumas partículas soltas, provavelmente contaminações do meio de degradação PBS ou partículas resultantes do segundo passo da dissolução do PBG, partes de cadeia polimérica quebrada e em processo de hidrolização pela água.

Adicionalmente, ao longo das fotomicrografias da Figura 83 consegue-se observar pontos mais claros/brilhantes; estes corroboram o aumento da interacção electrostática presente nas camadas hidratadas devido ao aumento da força iónica pelo decorrer da degradação do PBG ^[49]. Facto este já confirmado anteriormente pelo controlo da variação de massa/razão de dissolução das fibras de PBG ao longo dos estágios de degradação referido na Figura 77 - página 151.

Este decréscimo na razão de dissolução do PBG é atribuído ao aumento da interacção electrostática que tem lugar nas camadas hidratadas. Outra possível causa seria a deposição

de contaminantes desidratados provenientes da solução de PBS que teriam cristalizado na superfície das fibras. Tal análise só poderia ser feita com recurso a espectrometria *Auger* ou XPS, pois a microanálise em EDS não é suficientemente resolúvel para este tipo de materiais com baixas densidades. Com isto pretende-se dizer que o volume de excitação de RX seria substancialmente superior ao volume ocupado pelas próprias impurezas, interagindo desta forma com a própria fibra e conduzindo portanto, a análises erróneas.

O mecanismo de dissolução descrito para os PBG aplica-se tanto a vidros maciços como a fibras ^[10], no entanto, os efeitos de recozimento são mais significativos nas fibras devia à razão menor de área de superfície/volume ^[46]. Ou seja, na dissolução de fibras sem tratamento térmico há formação da camada hidratada e há delaminação ^[60, 62] e na dissolução de fibras com recozimento há esfoliação dessa camada hidratada. ^[66]

Pela Figura 83 f) a i), que expõe os efeitos de degradação nas fibras de PBG após 8 semanas em PBS a 37°C para ampliações desde as 1000x a 10000x, são visíveis não só a camada hidratada envolvente das fibras de PBG, resultante do primeiro passo do processo de dissolução do vidro com base fosfato, como também o efeito de esfoliação, resultante da existência de tratamento térmico na manufactura das fibras. Por medição directa na imagem g) é possível afirmar que pelo menos 37% da espessura das fibras de PBG estaria alterada para uma forma mais frágil. Este tipo de comportamento revela que o material, isotrópico, mudou para um estado altamente anisotrópico evidenciando zonas com comportamentos distintos à solicitação mecânica.

Especificamente na Figura 83 f), através de uma ampliação da amostra de 10000x, é possível identificar claramente a camada hidratada da fibra de PBG; na Figura 83 g), para uma ampliação de 5000x, está explícito um pormenor de fractura e deslizamento da camada hidratada; e na Figura 83 h) e i) estão expressos, para ampliações de 3500x e 1000 respectivamente, os efeitos de esfoliação transversal e longitudinalmente consequentes das 8 semanas de exposição à solução de PBS a 37°C. As fibras de PBG apresentam assim pelo menos outras duas consequências após degradação provavelmente com origem na preparação e manuseamento das amostras: a camada hidratada consegue deslizar sobre o núcleo da fibra ainda pouco alterado pela degradação e a camada hidratada pode ser destacada do núcleo sem deslizamento aparente.

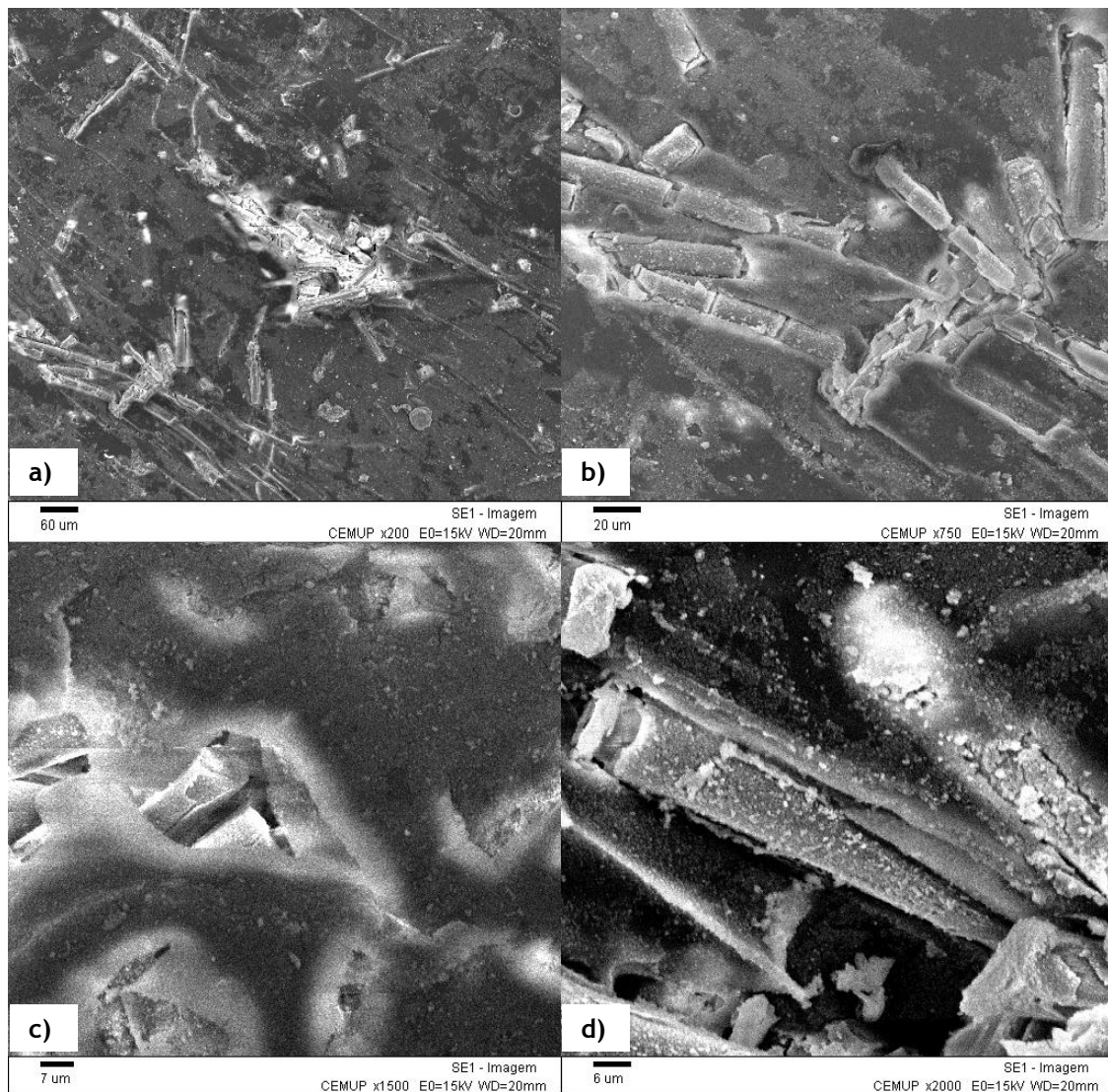


Figura 84 - Imagem de SEM para amostras de PLA/PBG após 8 semanas de degradação em PBS a 37°C. (a) Morfologia superficial do provete de PLA/PBG no 9º estágio de degradação com uma ampliação de 200x; b) Microestrutura do compósito PLA/PBG com 8 semanas de degradação e ampliação de 750x; c) Pormenor da morfologia superficial do PLA/PBG no 9º estágio de degradação com uma ampliação de 1500x; d) Pormenor da degradação das fibras de PBG no compósito após 8 semanas de degradação para uma ampliação de 2000x)

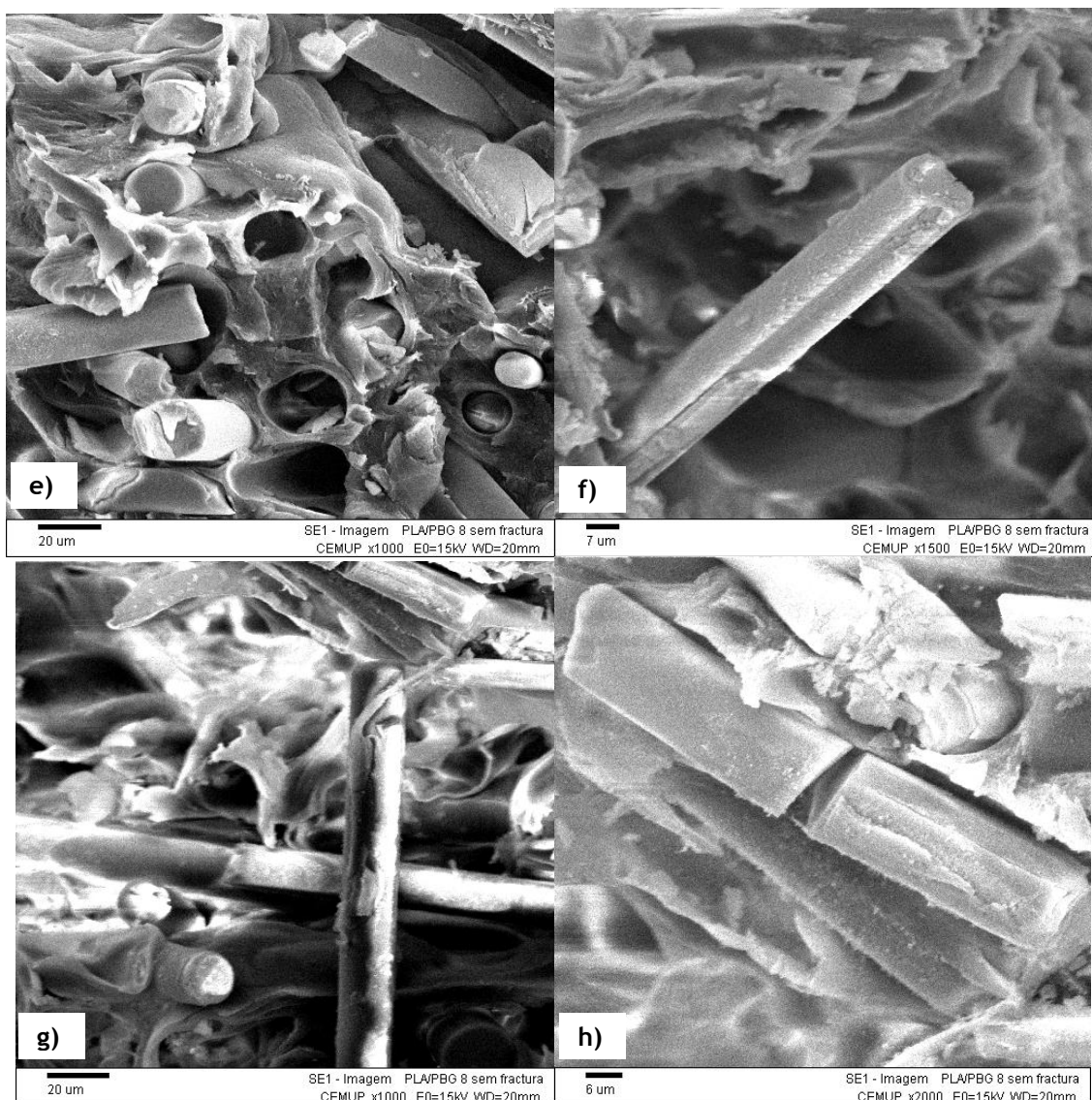


Figura 84 - Imagem de SEM para amostras de PLA/PBG após 8 semanas de degradação em PBS a 37°C (cont.) (e) Morfologia interna do provete de PLA/PBG no 9º estágio de degradação após deformação para uma ampliação de 1000x; f) Pormenor da degradação das fibras de PBG no provete de compósito traccionado - ampliação de 1500x; g) Microestrutura do PLA/PBG com 8 semanas de degradação, após deformação e ampliação de 1000x; h) Pormenor da degradação das fibras de PBG no provete de compósito traccionado - ampliação de 2000x)

Na figura anterior são apresentadas fotomicrografias de SEM tiradas a amostras do compósito de PLA/PBG após 8 semanas de degradação em solução salina de tampão fosfato a 37°C.

Na Figura 84 a) é visível a morfologia superficial do provete de PLA/PBG no 9º estágio de degradação com uma ampliação de 200x. São notórios alguns locais onde as fibras de PBG estão envoltas em PLA, sendo que este último encontra-se em maior percentagem - como esperado. Das fotomicrografias a) e b) também se pode depreender que adicionalmente à menor proporção, o PBG não se encontra igualmente distribuído pelo compósito, algo que não

era perceptível pelas anteriores fotomicrografias SEM do compósito (Figura 81 -página 157). Esta distribuição não homogénea dos componentes no compósito era apontada comum um *deficit* do método *solvent casting* utilizado na manufactura das placas de PLA/PBG e foi, neste ensaio, alvo de melhoria através da utilização de ultra-sons e agitação até dissolução completa do PLA e PBG no solvente. Pela observação mais criteriosa dos exemplares de compósito visualizados em SEM, conclui-se que este recurso não é suficiente e como melhoria contínua do método fica a proposta de uma extensão do tempo de ultra-sons a que a mistura dos componentes é sujeita ou até uma agitação magnética dessa mistura.

A Figura 84 c) demonstra um pormenor da morfologia superficial do compósito PLA/PBG no 9º estágio de degradação com uma ampliação de 1500x. Nesta posição é visível a dissolução por esfoliação da fibra de PBG envolta de PLA, também este com uma camada superficial mais fina e hidratada (mais clara na figura), consequência da sua degradação ^[66].

Visível na Figura 84 d) encontra-se um pormenor da degradação das fibras de PBG no compósito após 8 semanas de degradação para uma ampliação de 2000x. Este tipo de degradação por esfoliação deve-se ao tratamento térmico inicial das fibras de PBG aquando da sua manufactura.

A fotomicrografia e) da Figura 84 mostra a morfologia interna do provete de PLA/PBG no 9º estágio de degradação em PBS a 37°C, após deformação por tracção, para uma ampliação de 1000x. Nesta é evidente a zona de tracção do provete e as consequências da deformação provocada no mesmo. Podemos observar locais onde outrora existiram fibras de PBG e que foram forçadas a “descolar” da matriz de PLA pela força aplicada quando traccionadas. Este pormenor revela que, tal como para o PBG isolado, parte das suas fibras não sofre cisão por tracção e formam no provete o chamado efeito “chave-fechadura”.

Na mesma figura, a fotomicrografia f) expõe a microestrutura do PLA/PBG com 8 semanas de degradação em solução salina de tampão fosfato a 37°C, após deformação por tracção com uma velocidade de 0,4mm/min, e com uma ampliação de 1500x. Aqui é visível a existência da depressão inicial causada no processamento da fibra presente desde o seu estágio sem degradação (visto anteriormente na Figura 80 b) - página 156). Esta deformação para o PBG isolado era causadora de uma zona propícia para a degradação ter início, o que não acontece para o compósito. Por estar envolta em PLA, esta deformação não é desencadeadora de degradação local.

Na Figura 84 g) e h) é visível a degradação sofrida pelas fibras de PBG dentro do compósito PLA/PBG. Verifica-se que a degradação tanto se dá longitudinalmente como transversalmente ao longo das fibras de PBG, seguindo o processo de degradação por esfoliação tal como acontece na degradação nas mesmas condições do PBG isolado. Após 8 semanas de degradação hidrolítica, é de referir que com uma ampliação de 2000x é mais saliente a degradação nas fibras de PBG do que no PLA, resultado que confirma os previamente obtidos pela quantificação da variação da perda de massa/razão de dissolução do PLA, PBG e PLA/PBG; que a velocidade de degradação do compósito é limitada pela

velocidade de degradação do PLA uma vez que o PBG, amorfo é o primeiro a sofrer degradação ^[30].

É possível afirmar que o modo de fractura das fibras com degradação de 8 semanas é fortemente afectado ao longo da degradação, uma vez que passa de somente transversal à fibra para uma combinação de fractura radial e longitudinal sem direcção perfeitamente rectilínea.

3 - Propriedades mecânicas: Ensaio de tracção

A partir dos provetes sem e com degradação, pós deformação por tracção, foram analisados os resultados obtidos de tracção, traduzidos em valores de σ_c , σ_R e ϵ_f .

As figuras seguintes são referentes ao comportamento dos provetes de PLA e de compósito PLA/PBG em termos da sua tensão de cedência, resistência à tracção e alongamento após rotura ao longo do tempo que foram sujeitos à degradação em PBS a 37°C. Estes resultados são consequência dos ensaios de tracção realizados para velocidades de 3mm/min para provetes de PLA expostos 0 semanas de degradação e velocidades de 2mm/min para provetes de PLA mantidos 8 semanas em degradação. No que diz respeito aos provetes de compósito PLA/PBG, os resultados presentes nas mesmas figuras correspondem aos ensaios de tracção realizados a 0,5mm/min para tempos de degradação entre 0 e 5 semanas e 0,4mm/min para 6 a 8 semanas.

Relativamente ao PLA, as propriedades mecânicas reflectem os efeitos cumulativos do peso molecular, orientação da cadeia molecular, cristalinidade desenvolvida durante o processo de fabrico do polímero ^[102] e degradação a que foi sujeito; relativamente ao PBG, o parâmetro com maior relevância no seu comportamento mecânico é a sua composição ^[47] e modo de degradação (esfoliação ^[66] ou delaminação ^[60, 62]).

Ambos os provetes, de PLA e PLA/PBG, apresentaram respostas à tracção nos dois domínios, elástico e plástico, tendo alguns provetes apresentado estricção. Um exemplo deste resultado pode ser consultado no Anexo C (Figura C 6 - página 206).

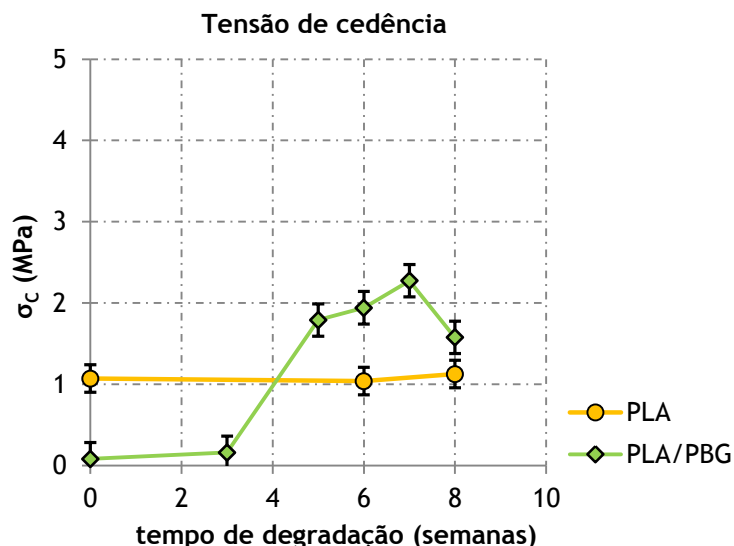


Figura 85 - Gráfico do comportamento da tensão de cedência, σ_c (MPa) dos provetes de PLA e PLA/PBG ao longo do tempo de degradação (semanas) em PBS a 37°C, com um desvio padrão de $\pm 0,17$ e $\pm 0,42$, respectivamente.

A tensão de cedência dá-nos o valor de tensão para o qual o material traccionado passa de regime elástico a plástico, o que em termos de aplicabilidade representa o valor de tensão para o qual o material em análise deixa de ter capacidade de recuperar a forma inicial e em segunda análise de recuperação de propriedades mecânicas.

Na figura anterior está transcrita para informação gráfica a evolução da tensão de cedência (MPa) do PLA e PLA/PBG em função do tempo de degradação (semanas). Verifica-se que para o PLA há uma banda horizontal no valor de ≈ 1 MPa e para o PLA/PBG há um aumento de tensão de cedência até às 7 semanas, começando a partir desse momento a decrescer.

No caso do PLA, uma vez que foi processado por *solvent casting* e tendo como base o valor conhecido de resistência à tracção deste, obtido pelo mesmo processamento, de 16,6 MPa ^[115], sabemos que o valor de tensão de cedência terá de ser necessariamente menor (ver ponto 1.5.1 Testes funcionais - página 106). Estando as suas propriedades mecânicas dependentes de factores microestruturais ^[30] como o grau de cristalinidade e orientação do PLA ^[109], da massa molar do polímero e sua distribuição que afectam a sua velocidade de degradação; da compacidade do provete ou o seu espaçamento livre para a permeabilidade da água, que têm consequências na sua perda de massa; assim como do seu processamento, para este valor de tensão de cedência praticamente constante para a banda referida impõe-se um balanceamento dos factores referidos.

Relativamente ao compósito PLA/PBG, o seu comportamento crescente da tensão de cedência é justificado pela sua perda de massa registada (Figura 78 - página 153); sendo que dos dois materiais que o constituem, o que revela maior perda de massa nos estágios de degradação contemplados neste estudo é o PBG. Deste modo decidiu-se estabelecer um

parâmetro de comparação entre o comportamento de perda de massa do PBG e o comportamento mecânico do compósito PLA/PBG.

Assim sendo, ao estabelecer-se uma relação entre as figuras da perda de massa do PBG (Figura 77 - página 151) e do gráfico do comportamento da tensão de cedência (Figura 85) percebe-se que variam inversamente; ou seja, para o mesmo tempo de degradação, sempre que há um decréscimo de massa perdida (%) há um aumento da tensão de cedência, e a partir das 7 semanas, onde inicia o aumento da perda de massa, há um abaixamento da tensão de cedência. Desta análise conclui-se que a tensão de cedência para o PLA/PBG varia na razão inversa da perda de massa do PBG; e a justificação para este comportamento do provete já foi descrita anteriormente (página 151) e está relacionada com o facto de a degradação do compósito ter início na sua fase amorfa - PBG.

Pode-se concluir que a capacidade de recuperação de forma para estes provetes é muito baixa uma vez que com pouca tensão entram imediatamente no domínio plástico. O que ostenta melhor comportamento, ainda que após 3 semanas, é o compósito PLA/PBG; no entanto, até esse momento não apresenta nenhuma tensão de cedência pelo que na prática a sua implementação num paciente implicaria uma total imobilização deste durante 3 semanas.

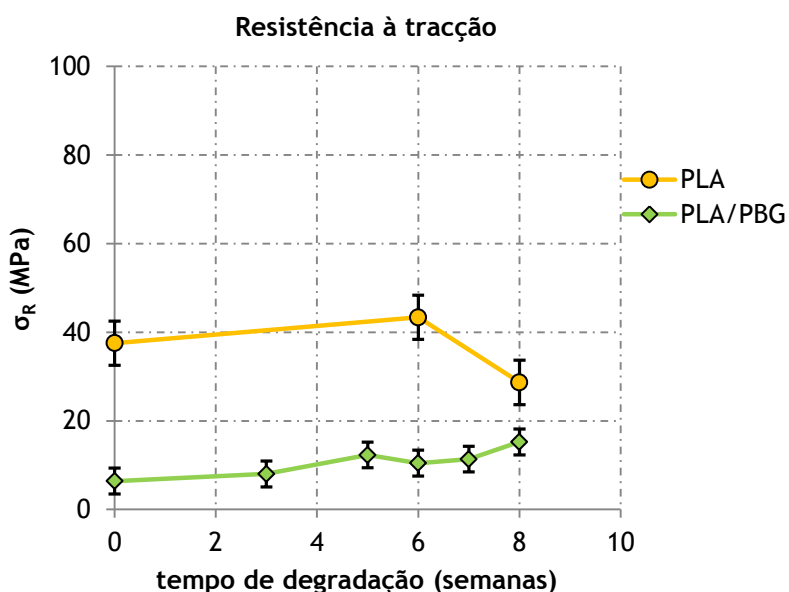


Figura 86 - Gráfico da resistência à tracção, σ_R (MPa) dos provetes de PLA e PLA/PBG ao longo do tempo de degradação (semanas) em PBS a 37°C, com um desvio padrão de $\pm 10,77$ e $\pm 2,9$, respectivamente.

Na Figura 86 está representada a variação da resistência à tracção dos provetes de PLA e compósito de PLA/PBG em função do tempo que estes foram sujeitos a degradação em PBS a 37°C.

Desta pode-se verificar que o valor da resistência à tracção do PLA tem um valor inicial de cerca de 40MPa, bastante superior ao tabelado para PLA processado por *solvent casting* (16,6MPa ^[115]), mas dentro da grandeza de valores referida para gama de PLA plásticos macios e elásticos a materiais duros e de elevada resistência. ^[101]. As razões para esta diferença encontram-se em factores que justificaram igualmente a perda de massa verificada; tais como factores microestruturais que incluem a pureza do polímero, massa molar e sua distribuição, cristalinidade, orientação e processamento ^[30]. Este último factor, processamento, poderá ser um potencial influenciador dos valores obtidos e na sua diferença relativamente aos esperados, uma vez que com a inclusão da prensa de pratos quentes na manufactura dos provetes, poder-se-á ter introduzido o processamento termo-compressivo referido em ^[102] e não estarmos somente perante o método simples de processamento *solvent casting*. Daí o valor obtido para a tensão máxima, 40MPa, ser aproximadamente o tabelado para o PLA processado por termo-compressão, cerca de 44MPa ^[115].

Embora aproximadamente constante, este valor é crescente ao longo dos estágios de degradação até às 6 semanas de degradação, o que é justificável uma vez que a erosão do PLA durante esta fase é no seio do material ^[101] e dá-se mais rapidamente na região amorfa do que na região cristalina do polímero o que conduz a um aumento da cristalinidade geral das amostras em observação ^[72]. Admitindo que o espaçamento deixado pela degradação do PLA amorfo existente não é relevante e que a deformação é dirigida preferencialmente para zonas cristalinas, justifica-se este aumento brando na resistência à tracção.

Após as 6 semanas de degradação, como já referido o PLA torna-se mais hidrofílico e, assemelhando-se ao comportamento de outros polímeros como por exemplo o Nylon, a sua resistência à tracção baixa com o aumento da hidrofiliidade.

O que é revelado no gráfico da resistência à tracção *versus* o tempo de degradação para o compósito PLA/PBG é comparável ao que acontece nos valores de resistência à tracção para as primeiras 6 semanas de degradação do PLA. Uma vez que a degradação do compósito está subjacente à perda de PBG, o comportamento mecânico, nomeadamente no que diz respeito à tensão máxima do provete de compósito pode ser comparável à tensão máxima do PLA. No entanto, a diferença de valores encontrados, aproximadamente 40MPa para o PLA e cerca de 10MPa para o PLA/PBG, manifestam as porosidades díspares dos materiais ao longo da degradação uma vez que o PLA é bastante mais poroso que o PLA/PBG.

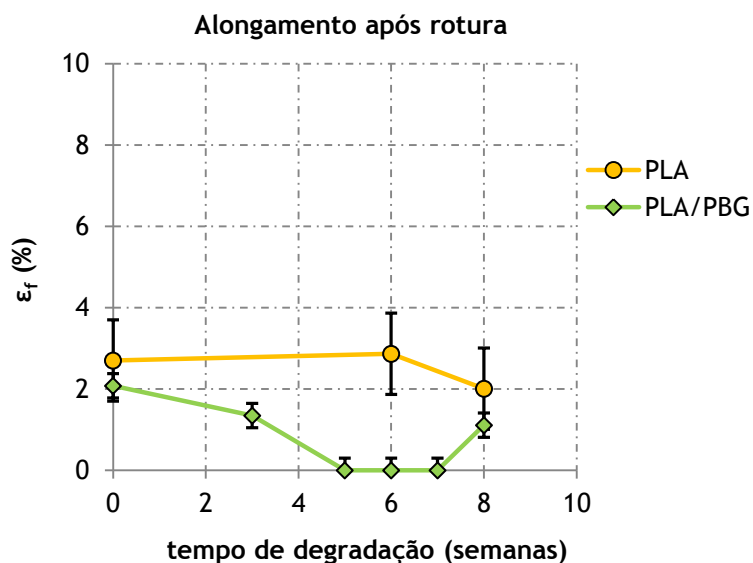


Figura 87 - Gráfico do alongamento após rotura, ϵ_f (%) dos provetes de PLA e PLA/PBG ao longo do tempo de degradação (semanas) em PBS a 37°C, com um desvio padrão de $\pm 2,1$ e $\pm 0,66$, respectivamente.

A Figura 87 representa graficamente a variação do alongamento após rotura dos provetes de PLA e PLA/PBG em função do seu tempo de degradação, e contabiliza deste modo a variação de ductilidade dos materiais ao longo dos diferentes estágios de degradação. A ductilidade do material, caracterizada pelo seu alongamento até rotura ou pela sua redução de área, tem interesse em diferentes aspectos de aplicabilidade dos materiais pois pode indicar o grau de deformabilidade de um material até à sua rotura.

Um material capaz de sofrer grandes deformações plásticas antes de atingir o seu ponto de rotura é considerado dúctil; em oposição, os materiais que atingem a rotura para pequenas deformações plásticas são frágeis.

De uma maneira geral, o PLA apresenta o mesmo alongamento após rotura para todos os estágios de degradação em estudo e revela somente para as 8 semanas de degradação um pequeno decréscimo no valor desse alongamento na rotura. Este comportamento evidencia o já constatado na análise de perda de massa e imagens SEM, ou seja, que para tempos maiores de degradação, inicia-se o processo de perda de massa pela degradação da sua parte amorfa, tornando o PLA localmente mais cristalino e logo mais frágil ^[72].

Para o compósito PLA/PBG, os valores de alongamento após rotura são afectados pela sua componente constituinte de 30% (w) de PBG. Uma vez que o PBG é maioritariamente amorfo (sem bem processado é completamente amorfo ^[31]), passa por ele o início da degradação que tem lugar no compósito quando exposto ao PBS a 37°C. Deste modo, no decorrer da sua degradação vemo-nos igualmente perante um aumento pontual de cristalinidade do compósito, o que provoca uma diminuição para valores do alongamento após rotura próximos de zero até às 7 semanas de degradação. O aumento deste valor para as 8 semanas de

degradação evidencia o começo da degradação da matriz de PLA provocando uma diminuição de cristalinidade relativamente à fase anterior de degradação.

Na Figura 88 está representado o módulo de elasticidade dos provetes de PLA e do compósito PLA/PBG ao longo do ensaio de degradação.

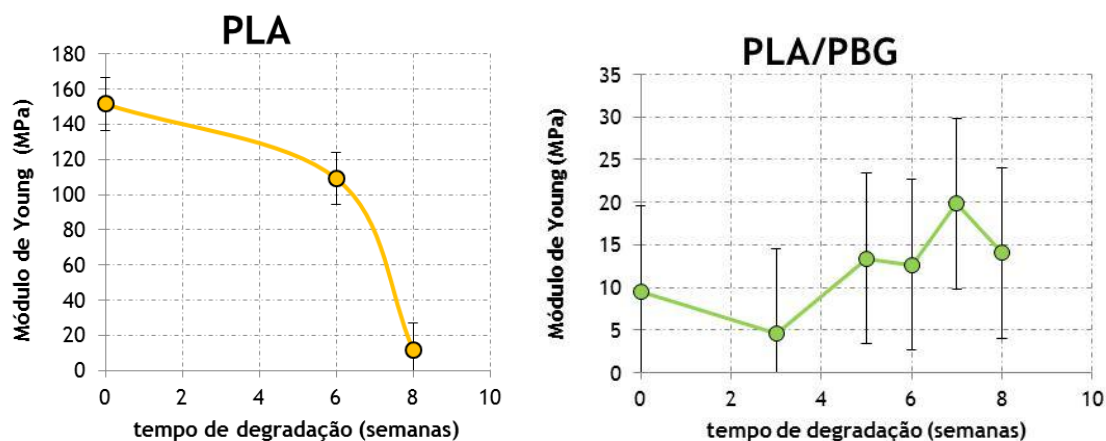


Figura 88 - Gráfico do módulo de *Young*, E (MPa) dos provetes de PLA e PLA/PBG ao longo do tempo de degradação (semanas) em PBS a 37°C, com um desvio padrão de ± 15 e ± 10 , respectivamente.

O módulo de *Young* dá-nos a noção da rigidez estrutural do material, correspondendo valores inferiores do módulo de *Young* a uma rigidez mais baixa.

Pela figura anterior é visível que o módulo de *Young* do PLA ao longo do ensaio de degradação tem um comportamento decrescente (cerca de 30%) até à 6ª semana de degradação, seguindo-se uma diminuição abrupta até à 8ª semana de degradação. Este comportamento revela que o PLA se torna um material menos rígido ao longo do ensaio a que foi sujeito. Porém, o módulo de elasticidade inicial deste material, $\approx 150\text{MPa}$ está longe do anunciado pela bibliografia ($927,1 \pm 59,1\text{MPa}$ ^[115]), o que é justificável por não estamos a comparar PLA de composições equivalentes (em termos de porosidade, cristalinidade, peso molecular, etc...) e processamento iguais.

No que concerne ao compósito PLA/PBG este tende a manter ao longo do tempo de degradação o seu módulo de *Young* mas com uma dispersão elevada, exibindo valores compreendidos entre os 5 a 30 MPa. Esta tendência já foi verificada anteriormente na Figura 85 - página 169, na sua tensão de cedência.

A ordem de grandeza do módulo de *Young* do compósito é idêntica ao menor valor exibido no PLA às 8 semanas de degradação. Seria expectável que o reforço de PBG na matriz de PLA se traduzisse num módulo de *Young* superior ao do PLA isolado uma vez que o reforço com um

cerâmico conduz a um material mais rígido. No entanto, estes resultados fazem-os querer que a actuação do PBG como reforço não foi a esperada.

Relativamente ao objectivo do trabalho, em termos de utilização deste compósito de PLA/PBG no que diz respeito a auxiliar na regeneração óssea e recuperação/regeneração de ligamentos, pode-se dizer que estes resultados obtidos são um bom ponto de partida.

Em termos de perda de massa obtivemos resultados de 28% de perda de massa total do compósito de PLA/PBG para 2 meses de degradação em PBS a 37°C. Estes valores são satisfatórios uma vez que estamos a trabalhar em áreas cujo tempo de recuperação ronda os poucos meses, dependendo da gravidade da questão/lesão do ligamento e mais um pouco (meses até anos) para regeneração óssea. Uma melhoria no processamento dos materiais traria benefícios no que diz respeito a esta questão uma vez que, como comprovado pelas imagens SEM, foram de defeitos de processamento do PBG e incorrecções no método de fabricação de compósito utilizado, que maior implicação tiveram nos resultados obtidos.

Em termos de imagens SEM, esta análise foi bem conseguida e determinante para esclarecimento do comportamento dos materiais ao longo do processo de degradação. Revelou-se uma técnica complementar de diagnóstico muito útil neste trabalho, ajudando a perceber campos dos quais não havia informação prévia e dando informação de interesse sobre, por exemplo, o comportamento dos materiais quando sujeito a deformação por tracção.

Para o comportamento mecânico, mais propriamente para o ensaio de tracção, no que diz respeito ao osso seriam de esperar valores entre 86 a 114MPa para estarmos perante um compósito com uma resistência à tracção semelhante ao osso cortical do fémur humano entre ao 70-80 e 10-20 anos, respectivamente ^[168]. E relativamente ao ACL, valores de tensão na rotura de 16,3 - 36,4MPa e 13,7 - 31,5MPa para o homem e mulher, respectivamente ^[178]. Para o caso dos ligamentos, é desejada resposta a curto prazo, no caso da regeneração óssea os resultados terão de ser a longo termo. No entanto, como esta combinação de materiais, PLA e PBG, é um desafio em ambas as áreas, o objectivo era perceber para qual delas este compósito de matriz de PLA reforçado com fibras de PBG do sistema quaternário 50%P₂O₅, 40%CaO, 5%NaPO₃ e 5%Fe₂O₃, seria mais adequado nesta fase inicial.

Os valores obtidos ao longo de todos os estágios de degradação contemplados no ensaio de degradação em PBS a 37°C estão dentro da gama esperada para a regeneração do ACL.

Das limitações encontradas ao longo deste ensaio de degradação destacam-se o facto de não ter sido conseguida uma distribuição homogénea dos constituintes no compósito de PLA/PBG e de ter sido implementada desde o início uma estrutura porosa nos provetes de PLA.

Embora esta não homogeneidade fosse apontada comum uma insuficiência do método *solvent casting* utilizado, este foi alvo de melhoria através da utilização de ultra-sons e agitação até dissolução completa do PLA e PBG no solvente. No entanto, pela observação das imagens em SEM, conclui-se que este recurso não é suficiente e como melhoria contínua do método fica a proposta de uma extensão do tempo de ultra-sons a que a mistura dos componentes é sujeita ou até uma agitação magnética dessa mistura.

Apesar das tentativas de melhoria da metodologia utilizada no sentido de fabricar placas/provetes compactos de PLA, uma possível opção para tentar diminuir/eliminar as bolhas formadas na sua manufactura, passaria eventualmente pela pressurização da 2ª etapa de evaporação de solvente ao invés de esta acontecer à P ambiente. E para colmatar a aparente não coesão do compósito que se revelou pelas imagens SEM como um 3º factor de fractura dos provetes após solicitação mecânica, a utilização de um ligante que unisse os dois componentes seria uma boa opção (são exemplo de ligantes utilizados na área o silane (APS $[H_2N(CH_2)_3-Si-(OC_2H_5)_3]$) ou o HEMA ($[CH_2=C(CH_3)COOCH_2CH_2OH]$)).

Para além das limitações referidas, que influenciaram os resultados de degradação obtidos quer em termos de perda de massa ou em termos de propriedades mecânicas, a utilização da prensa de pratos quentes provocou a presença de nervuras na superfície das placas tornando-as não uniformes no que diz respeito aos valores de espessura e adicionando um ponto frágil, preferencial à rotura quando o provete foi sujeito à tracção.

No sentido de dar uma continuidade aos resultados obtidos, num projecto futuro seria interessante otimizar o processo de manufactura das placas/provetes a degradar, estender o tempo de ensaio de degradação, diminuir a percentagem de PBG utilizada como reforço da matriz de PLA do compósito e incluir outros testes de caracterização para perceber e complementar a informação/resultados obtidos.

O controlo do pH do meio seria um ponto com interesse de analisar principalmente na degradação do PBG e compósito de PLA/PBG.

Uma análise aos iões sódio libertados durante a dissolução do vidro mostraria que quantidades e em que fase de degradação estes são libertados, o que nos possibilitaria estabelecer comparações com alguns estudos feitos neste campo para outros sistemas de PBG (Figura 16 - página 58) e inferir qual as melhores composições de PBG para as áreas em análise. Esta análise de iões através do pH seria estabelecida uma vez que à medida que os iões de Na^+ vão sendo libertados, os iões hidrogénio (H^+) migram para o vido com a finalidade

de estabelecerem um balanço de cargas e provocam um excesso de iões hidróxido (OH^-), o que se traduz num aumento do pH. Como o inverso também é válido, ou seja, à medida que vai diminuindo a quantidade de Na^+ em solução o pH diminui, esta análise também nos permitiria inferir a taxa de dissolução do PBG em questão.

Sendo um dos mais importantes factores considerados na selecção dos materiais de um biomaterial a aplicar no corpo, uma vez que tem um papel proeminente na sua degradação, o controlo da variação do peso molecular por GPC do compósito em estudo seria uma análise a implementar também num estudo futuro; assim como o acompanhamento por DSC da cristalinidade do compósito e provetes de PLA para compreensão dos seus comportamentos amorfo/cristalino ao longo da degradação. Também a densidade, importante ferramenta na exploração da compacidade estrutural, alterações de configurações geométricas, números de coordenação e densidade de *cross linking*, auxiliaria na percepção do grau de modificação da estrutura dos com a variação da sua composição.

Capítulo 4

Conclusão

A utilização de materiais biodegradáveis com função estrutural temporária para auxiliar na recuperação e regeneração de tecidos vivos lesados, em substituição de biomateriais bioestáveis, tornou-se uma área de pesquisa muito promissora nas últimas duas décadas.

Uma das grandes vantagens da ET é reduzir o número de operações cirúrgicas necessárias para a regeneração e/ou substituição de tecidos, resultando num período de tempo curto de recuperação do paciente. ^[12] E a sua estratégia mais usual convenciona a utilização de um biomaterial como estrutura de suporte temporária.

Os biomateriais mais atractivos para estas estruturas de suporte são os naturais ou sintéticos biorreabsorvíveis, e a matriz ou estrutura ideal deve ser não-imunogénica, não-tóxica, biocompatível, biodegradável e de fácil processamento ^[2]. De referenciar que a utilização de materiais sintéticos beneficia de algumas vantagens relativamente à utilização de polímeros naturais; como exemplo temos o facto de apresentarem grande flexibilidade de *design* em termos de composição do material, processamento, controlo da porosidade e das suas propriedades mecânicas, aliada à possibilidade de poderem ser biorreabsorvíveis, ou seja, totalmente degradáveis em metabolitos naturais do próprio corpo por simples hidrólise em condições fisiológicas. ^[6, 7, 19]

O desafio que se impõe à ET é conseguir imitar a natureza. E para isso esta tem de ser capaz de sintetizar polímeros capazes de realizar funções biológicas, tendo em conta que as propriedades químicas, físicas, mecânicas e biológicas de um material biodegradável inevitavelmente variam com o tempo. ^[17]

Uma vez que cada tecido ou órgão tem as suas próprias características de organização arquitectónica que estão fortemente associadas às suas funções fisiológicas ^[9]; e alguns tecidos específicos, como o osso, os tendões, os ligamentos, a espinal medula, os nervos periféricos, o uréter e o intestino, têm arquitecturas tubulares ou lamelares, cada caso tem de ser analisado pormenorizadamente.

Dependendo do estado da lesão óssea, os habituais implantes de substituição ou de fixação de fracturas ósseas, provocam respostas inflamatórias nos tecidos, conduzindo a uma necessária cirurgia de substituição. O que a ET pretende é conseguir mitigar esse problema e eliminar a necessidade de uma cirurgia secundária dramática e traumática para o paciente, com um material que resista o tempo de recuperação necessário à lesão em questão e que, após esse tempo, a sua reabsorção seja, idealmente, acompanhada pela remodelação óssea.

No caso do osso a estrutura de suporte 3D tem de imitar a MEC (matriz extra celular) num ambiente de regeneração óssea. Deste modo, esta não pode ser um simples apoio mecânico, tem que ser igualmente “informativa genéticamente” para as células. O biomaterial apropriado para desempenhar este suporte deve integrar-se facilmente e ter uma composição similar à do osso adjacente ^[31], ser estável por longos períodos de tempo ^[31], favorecer a adesão, proliferação e diferenciação celular ^[32] para garantir o crescimento do tecido ósseo ^[2, 33], ter uma arquitectura que permita que os vasos sanguíneos irriguem mesmo as estruturas de grandes dimensões ^[2, 33], deve ser compatível e reabsorvível de forma controlada ^[2, 32, 33], e sofrer corrosão mínima limitando as possibilidades de infecções e reacções inflamatórias ^[31].

Por outro lado, uma vez que na recuperação mais célere de uma rotura de ligamentos estão implícitos exercícios de reabilitação com mobilização activa (com acção muscular), recorre-se à aplicação de dispositivos de reforço dos ligamentos para que após um esforço ideal dos mesmos, o conjunto reparado apresente um comportamento mecânico semelhante ao tecido natural não danificado, durante todas as diferentes fases de recuperação do tecido.

Ou seja, no caso particular da reparação de ligamentos, a ET tem que desenvolver um sistema de substituição funcional do ACL, que permita que os pacientes estejam aptos para a sua actividade imediatamente após a lesão. Para isso, esse sistema de substituição deve possuir especificamente ^[3, 37]: células reparadoras capazes de promover a proliferação e síntese matricial com uma biodegradabilidade compatível com a velocidade de formação do novo ligamento; uma estrutura de suporte com porosidade adequada que facilite a adaptação e proliferação celular sem provocar resposta inflamatória; e um ambiente capaz de permitir o transporte de nutrientes, factores reguladores e com compatibilidade mecânica funcional.

Novos materiais foram desenvolvidos numa tentativa de responder a estas questões, mas levantam-se problemas de adequação das suas propriedades mecânicas e capacidade dos materiais degradáveis manterem essas propriedades, durante todo o período espectável, após a implantação no corpo humano.

Uma possível solução, que a curto e a longo termo fosse compatível funcional e biologicamente para ambas as situações, reparação da lesão óssea e de ligamentos, foi estudada neste trabalho. Através utilização de um compósito totalmente degradável, composto por uma matriz de ácido poliláctico (PLA - *polylactic acid*) reforçada com fibras de vidro com base fosfato (PBG - *Phosphate-based glasses*), este trabalho experimental teve como objectivo o estudo da evolução das propriedades mecânicas *versus* o tempo de degradação por hidrólise de fibras biodegradáveis e de compósitos feitos com estas fibras.

O PLA foi escolhido devido à sua possibilidade de degradabilidade em sistemas biológicos, comprovada biocompatibilidade, processamento termoplástico ^[102], não-toxicidade, e possibilidade de ser facilmente quebrado por hidrólise térmica ^[102]; em particular o PLLA, por ser um polímero de degradação lenta, que apresenta boa resistência à tracção, baixa extensão e elevado módulo de elasticidade. ^[17] A selecção do PBG como reforço da matriz de PLA surgiu pela capacidade que estes têm de manter vivas, fenotípica e morfológicamente, as células do osso e ligamentos humanos aderentes, provando deste modo serem materiais ideais de ET para as áreas específicas de ligamentos/tendões e defeitos de fixação óssea. ^[26] Do ponto de vista biomédico aliam ainda a capacidade de se dissolver em meio aquoso, podendo o seu comportamento de dissolução ser modificado em grandes ordens de magnitude por alteração da sua química constituinte, e o facto de poderem ser sintetizados de modo a que sejam incluídos iões usuais no corpo humano e desta feita serem perfeitamente adaptáveis em termos de composição à sua aplicação final. ^[8] Apresentam ainda a vantagem de serem inteiramente amorfos (se processados correctamente), o que influencia a sua rapidez de degradação previsível. ^[31]

Durante este projecto foi realizado o estudo da degradação por hidrólise de placas de PLA, fibras de PBG do sistema quaternário $(P_2O_5)_{50}-(CaO)_{40}-(Na_2O)_5-(Fe_2O_3)_5$, e dos compósitos de matriz PLA reforçados com fibras PBG, numa solução de PBS a 37°C durante vários estágios de degradação (1 a 8 semanas).

Dos testes de caracterização disponíveis para perceber e documentar a degradação dos materiais em estudo recorreu-se ao controlo da perda de massa, observação em SEM e ensaio de tracção.

Dos resultados obtidos, uma vez que não foram observadas consequências de degradação visíveis nos provetes de PLA ou diferenças de dimensões dos provetes, que permaneceram constante durante o ensaio de degradação realizado, tal como pressuposto na bibliografia consultada ^[87] ^[72], pode concluir-se que a erosão do mesmo é no seio do material. No entanto, sabendo de antemão que habitualmente este processo de degradação não acontece por longos períodos de tempo, pressupõe-se que a partir do último estágio considerado a erosão passe a ser espontânea ^[73].

Sabe-se também que a velocidade de hidrólise do PLA é influenciada pelos seus produtos de dissociação. Como o seu ácido de terminação possui um elevado grau de dissociação dá origem a um ambiente envolvente ácido, e com o avançar da degradação há uma aceleração

significativa da velocidade de hidrólise. ^[136] Acrescentando a este facto, a evidente hidrofiliidade adquirida pelo PLA à medida que a hidrólise ocorre, tudo indica que se fossem feitas mais observações SEM noutros estágios de degradação superiores, notar-se-ia um aumento da capacidade de absorção de água por parte do PLA, o que se traduziria na aceleração da própria degradação. ^[102]

Através das fotomicrografias tiradas em SEM, foi visível que a degradação hidrolítica do PLA foi influenciada pelo método seleccionado para manufactura dos provetes. Este introduziu algumas bolhas que desencadearam locais propícios à degradação ou zonas de início de fractura. As fotomicrografias após a deformação por tracção evidenciam a influência destas bolhas também no comportamento mecânico do PLA. Inicialmente são visíveis deformações orientadas perpendicularmente às faces do perfil do provete, com planos de clivagem em áreas bem definidas e em que a fronteira dessas áreas é composta por zonas fibrosas com histerese associado. Podem, com o avançar da erosão, após 8 semanas de degradação, a forma polimérica alterou-se para uma estrutura mais porosa - macro e microporosa e a direcção perpendicular da deformação relativamente às faces do provete manteve-se; no entanto, é notória uma zona de micro-estricção com deformação direccionada para um centro radial perfeitamente definido.

Relativamente aos resultados obtidos nos ensaios de tracção, confirmou-se que as propriedades mecânicas reflectem os efeitos cumulativos da perda de massa, cristalinidade e processo de fabrico do polímero e provetes. E, uma vez que a erosão é mais rápida na região amorfa do que na região cristalina do polímero ^[72], a cristalinidade geral das amostras em observação terá aumentado, e este aumento de cristalinidade conduziu a um aumento de fragilidade do material. O seu comportamento mecânico revela que estamos perante um material bastante dúctil e todas as combinações de metodologia utilizadas na manufactura dos provetes utilizados conduziram a valores de resistência à tracção próximos dos obtidos para PLA processados por termo-compressão. Adicionalmente, após as 6 semanas de degradação, o PLA torna-se mais hidrofílico e a sua resistência à tracção baixa; mas apresenta o mesmo alongamento após rotura para todos os estágios de degradação em estudo.

No que concerne ao PBG, verificou-se que o seu mecanismo de dissolução está efectivamente relacionado com as reacções entre a água e o vidro ^[46] e que neste há inicialmente uma hidratação das ligações P-O-P que ocorre em 2 passos interdependentes conduzindo à dissolução do vidro ^[10].

No primeiro passo, a água difunde-se no vidro formando uma camada hidratada ^[46] e dá-se a reacção de hidratação com a troca de iões sódio do vidro com iões hidrogénio da água ^[10]. No segundo estágio, tem lugar a reacção de hidrólise ^[46] que corresponde há quebra da rede matricial na camada hidratada pela quebra das ligações P-O-P ^[10] e onde tem lugar a hidrólise da cadeia polimérica pelas moléculas de água. Quer a camada hidratada, quer esta segunda

fase de mecanismo de dissolução do vidro foram visíveis pela análise feita em SEM e atestados pela perda de massa observada ao longo dos estágios de degradação.

De referir que a velocidade de dissolução dos PBG foi influenciada pelo método de processamento do vidro, uma vez que para além do recozimento a que foi sujeito o vidro apresentava deformações de estrutura superficiais. Deste tratamento térmico adveio o modo de dissolução do vidro uma vez que este ficou confinado a esfoliação da camada hidratada ^[66] no decorrer da degradação do mesmo; e das deformações de estrutura proveio o facto de estas acelerarem a degradação do vidro.

Durante a análise feita em SEM foi possível analisar alguns pontos claros que evidenciavam o aumento da interacção electrostática presente nas camadas hidratadas devido ao aumento da força iónica pelo decorrer da degradação do PBG ^[49]; e por medição directa de uma das fotomicrografias tiradas foi possível concluir que a degradação a que estes espécimes de PBG foram sujeitos afectou pelo menos 37% da espessura das fibras de PBG. Este tipo de comportamento revela que o material, isotrópico, alterou para um estado altamente anisotrópico evidenciando zonas com comportamentos distintos à solicitação mecânica: a camada hidratada consegue deslizar sobre o núcleo da fibra num estado prematuro de degradação e a camada hidratada pode ser destacada do núcleo sem deslizamento aparente.

Por análise em microscopia óptica foi possível caracterizar morfológicamente e apresentar uma distribuição relativa dos tamanhos das fibras de PBG utilizadas, estas estavam presentes em forma de bastões e tinham dimensões menores que 20µm.

No que respeita ao compósito de PLA/PBG, a sua degradação varia com a proporção dos seus constituintes e com a proporção de fase amorfa em relação à cristalina existente no mesmo em cada fase de degradação ^[89].

Pode-se afirmar que a perda de massa é quase constante ao longo dos diferentes estágios de degradação em estudo, tendo como extremos perdas de 2 e 4% $\pm$ 0,25. Este comportamento ao longo do ensaio de degradação em PBS a 37°C é resultado da conjugação da degradação individual dos seus componentes, PLA e PBG; e a ordem de grandeza dos valores para a sua perda de massa é a mesma que para o PLA.

Verifica-se que a degradação tanto se dá longitudinalmente como transversalmente ao longo das fibras de PBG, seguindo o processo de dissolução por esfoliação tal como acontece na degradação nas mesmas condições do PBG isolado. Após 8 semanas de degradação hidrolítica, pela visualização em SEM, de referir que é mais notória a degradação nas fibras de PBG do que no PLA e que a velocidade de degradação do compósito é limitada pela velocidade de degradação do PLA, uma vez que o PBG sendo amorfo é o primeiro a sofrer degradação ^[72].

Também através de SEM foi visível a dissolução por esfoliação da fibra de PBG envolta de PLA, e a observação da camada superficial mais fina e hidratada nas fibras de PBG consequência da sua degradação, equivalente ao verificado no PBG isolado. Relativamente às

dimensões dos bastões presentes no compósito de PLA/PBG, igualmente por visualização SEM verifica-se que na sua maioria os diâmetros são de aproximadamente 15µm.

Pelos resultados obtidos tudo indica que a fractura do compósito ocorre de dois modos distintos, sendo que a matriz sofre fractura dúctil e fibrosa e o PBG apresenta uma fractura frágil e transversal. De salientar a existência de um terceiro fenómeno de fractura aparentemente devido à não-coesão do PBG com o PLA quando solicitado em tracção, que em última análise pode ser este o principal responsável pelo início de fractura do provete compósito, pois o entalhe causado por planos bem delineados tende a aumentar o factor de concentração de tensões e provocar desta forma a falha prematura dos provetes. É ainda possível afirmar que o modo de fractura das fibras com degradação de 8 semanas é fortemente afectado pela degradação, uma vez que passa de somente transversal à fibra para uma combinação de fractura radial e longitudinal sem direcção perfeitamente rectilínea.

Em termos de comportamentos mecânicos, uma vez que a degradação do compósito está subjacente à perda de PBG, as suas propriedades mecânicas, nomeadamente no que diz respeito à tensão máxima do provete de compósito pode ser comparável à tensão máxima do PLA. Sendo que a diferença de valores encontrados são resultado das porosidades díspares dos dois materiais ao longo da degradação, superior no PLA relativamente ao PLA/PBG para o mesmo estágio de degradação.

Da análise do ensaio de tracção conclui-se que a tensão de cedência e o módulo de *Young* para o PLA/PBG variam na razão inversa da perda de massa do PBG; e a justificação para este comportamento do provete relaciona-se com o facto de a degradação do compósito ter início na sua fase amorfa - PBG, e com o facto de o seu comportamento mecânico não exhibir a relação linear crescente das misturas, ou seja não revela um comportamento proporcional à sua composição mássica, 70% de PLA e 30% de PBG.

Também o seu alongamento após rotura é dependente da componente PBG presente no compósito. Uma vez que o PBG é maioritariamente amorfo e que passa por ele o início da degradação que tem lugar no compósito, no decorrer da sua degradação vemos um aumento pontual de cristalinidade do compósito, o que provoca uma diminuição para valores do alongamento após rotura próximos de zero até às 7 semanas de degradação. O aumento deste valor para as 8 semanas de degradação evidencia o começo da degradação da matriz de PLA provocando uma diminuição de cristalinidade relativamente à fase anterior de degradação.

Concluindo, o desenvolvimento de estruturas de suporte manufacturadas com uma matriz de PLA e reforçada com fibras de PBG para aplicações em ET tem, neste momento, um interesse superior às alternativas existentes para regeneração e/ou substituição de tecidos ósseos e recuperação do ligamento cruzado anterior (ACL) do joelho. No entanto, ainda não foi conseguido o sistema ideal de recuperação óssea ou substituição do ACL com a arquitectura biológica e resistência mecânica apropriadas para a implantação *in vivo*; muito

devido ao facto das condições locais precisas que conduzem ao desenvolvimento e à reparação com sucesso ainda não estarem definidas. ^[4]

Pelo que, embora o seu comportamento na degradação, as propriedades mecânicas e a qualidade de porosidade das estruturas tenha sofrido muito ênfase neste trabalho, propriedades como a topografia superficial, hidrofiliidade e resposta biológicas são outras questões-chave que necessitam de ser verificadas para determinar o sucesso dessa estrutura de suporte. Desta feita, o objectivo final de qualquer investigação neste domínio deverá contemplar o controlo da “qualidade total” superficial da estrutura.

Referências

- [1] - Fini, M., [et al.]- Osteoporosis and biomaterial osteointegration. Biomedecine & Pharmacotherapy. ISSN 0753-3322. Vol. 58, n.º 9 (2004), p.487-493.
- [2] - Cancedda, Ranieri, [et al.]- Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. Matrix Biology. ISSN 0945-053X. Vol. 22, n.º 1 (2003), p.81-91.
- [3] - Robinson, Charles J.- Rehabilitation Engineering, Science, and Technology. In Bronzino, Ed. Joseph D.- The Biomedical Engineering Handbook. 2nd editionCRC Press LLC, 2000. Vol. I volume.
- [4] - Petrigliano, Frank A.; McAllister, David R.; Wu, Benjamin M.- Tissue Engineering for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Review of Current Strategies. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. ISSN 0749-8063. Vol. 22, n.º 4 (2006), p.441-451.
- [5] - LIU, SHU Q.- Cell and Tissue Regenerative Engineering. In WILEY-INTERSCIENCE- BIOREGENERATIVE ENGINEERING: PRINCIPLES AND APPLICATIONS. Hoboken, New Jersey: JOHN WILEY & SONS, INC., 2007. ISBN 978-0-471-70907-7.
- [6] - Lanza, R.P.; Langer, R. ; Vacanti, J.- Principles of tissue Engineering. 2nd edition. EUA: Academic Press, 2000.
- [7] - Ghosh, Satyabrata, [et al.]- Development of porous lamellar poly(l-lactic acid) scaffolds by conventional injection molding process. Acta Biomaterialia. ISSN 1742-7061. Vol. 4, n.º 4 (2008), p.887-896.
- [8] - Jonathan, C. Knowles; nbsp- Phosphate based glasses for biomedical applications. J. Mater. Chem. Vol. 10 (2003), p.2395-2401.
- [9] - Ramakrishna, S., [et al.]- Biomedical applications of polymer-composite materials: a review. Composites Science and Technology. ISSN 0266-3538. Vol. 61, n.º 9 (2001), p.1189-1224.
- [10] - Navarro, Melba, [et al.]- New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 25, n.º 18 (2004), p.4233-4241.
- [11] - François Berthiaume, Martin L. Yarmush- Tissue Engineering. In Bronzino, Ed. Joseph D.- The Biomedical Engineering Handbook. 2nd editionCRC Press LLC, 2000. Vol. I
- [12] - Langer, Robert- Selected advances in drug delivery and tissue engineering. Journal of Controlled Release. ISSN 0168-3659. Vol. 62, n.º 1-2 (1999), p.7-11.
- [13] - Mano, João F., [et al.]- Bioinert, biodegradable and injectable polymeric matrix composites for hard tissue replacement: state of the art and recent developments. Composites Science and Technology. ISSN 0266-3538. Vol. 64, n.º 6 (2004), p.789-817.
- [14] - LIU, SHU Q.- Extracellular Matrix. In WILEY-INTERSCIENCE- BIOREGENERATIVE ENGINEERING: PRINCIPLES AND APPLICATIONS. Hoboken, New Jersey: JOHN WILEY & SONS, INC., 2007. ISBN 978-0-471-70907-7.
- [15] - Portugal®, Médicos de- Médicos de Portugal: waynext, 2005 - 2008. [Consult. December]. Disponível em WWW: <<http://medicosdeportugal.saude.sapo.pt/>>.
- [16] - Kellomäki, Minna, [et al.]- Bioabsorbable scaffolds for guided bone regeneration and generation. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 21, n.º 24 (2000), p.2495-2505.
- [17] - Nair, Lakshmi S.; Laurencin, Cato T.- Biodegradable polymers as biomaterials. Progress in Polymer Science. ISSN 0079-6700. Vol. 32, n.º 8-9, p.762-798.
- [18] - Granja, Pedro L.- Biomateriais.pgranja@ineb.up.pt. Porto, 2009. PWP.
- [19] - Pego, Ana Paula- Biomateriais.apego@ineb.up.pt. Porto, 2009. PWP.

- [20] - Stanley L. Erlandsen, Jean E. Magney- Human Histology: Cells and tissues. In Press, U of Minnesota- Human Histology: A Microfiche Atlas, 1985. ISBN 0816613850, 9780816613854. Vol. 1.
- [21] - Bitar, Malak, [et al.]- Soluble phosphate glasses: in vitro studies using human cells of hard and soft tissue origin. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 25, n.º 12 (2004), p.2283-2292.
- [22] - Lucke, Andrea, [et al.]- Biodegradable poly(-lactic acid)-poly(ethylene glycol)-monomethyl ether diblock copolymers: structures and surface properties relevant to their use as biomaterials. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 21, n.º 23 (2000), p.2361-2370.
- [23] - Sigma-Aldrich, Inc.- Life Science - Cell Culture - Minimum Essential Medium Eagle. [Consult. 01.2010].
- [24] - America, Showa Denko- Ascorbyl Phosphate Magnesium / Ascorbyl Phosphate Sodium. New York, 2008. [Consult. 2010.Jan].
- [25] - Leonardi, E., [et al.]- Response of human bone marrow stromal cells to a resorbable P2O5-SiO2-CaO-MgO-Na2O-K2O phosphate glass ceramic for tissue engineering applications. Acta Biomaterialia. ISSN 1742-7061. Vol. In Press, Corrected Proof.
- [26] - Bitar, M., [et al.]- Biocompatible phosphate glass fibre scaffolds. Engineering of the hard/soft tissue interface. European Cells and Materials (Swiss Society for Biomaterials and the Tissue & Cell Engineering Society). ISSN 1473-2262. Vol. 7, n.º Suppl.1 (2004), p.26.
- [27] - Alptekin Aksan, Kyle D. Allen, C. Becker, Ayse B. Celil, B.L. Beckstead, Christina Chan, François Berthiaume, Jose F. Alvarez-Barreto et al- Tissue Engineering CRC Press, 2007.
- [28] - Águas, A.M.P.Neves- *Postura e Movimento do Corpo Humano*.aguas@icbas.up.pt. Porto, 2008. PWP.
- [29] - Marieb, Elaine Nicpon- Anatomy & physiology. Cornell: Benjamin Cummings, 2002. ISBN 0805364692, 9780805364699.
- [30] - LIU, SHU Q.- Biomaterial Aspects of Bioregenerative Engineering. In WILEY-INTERSCIENCE- BIOREGENERATIVE ENGINEERING: PRINCIPLES AND APPLICATIONS. Hoboken, New Jersey: JOHN WILEY & SONS, INC., 2007. ISBN 978-0-471-70907-7.
- [31] - Knowles, J. C.; Franks, K.; Abrahams, I.- Investigation of the solubility and ion release in the glass system K2O-Na2O-CaO-P2O5. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 22, n.º 23 (2001), p.3091-3096.
- [32] - Shah, R., [et al.]- Craniofacial muscle engineering using a 3-dimensional phosphate glass fibre construct. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 26, n.º 13 (2005), p.1497-1505.
- [33] - Neovius, Erik; Engstrand, Thomas- Craniofacial reconstruction with bone and biomaterials: review over the last 11 years. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. ISSN 1748-6815. Vol. In Press, Corrected Proof.
- [34] - Levine, J. P.- Bone morphogenetic protein promotes vascularization and osteoinduction in preformed hydroxyapatite in the rabbit. ANNALS OF PLASTIC SURGERY. ISSN 0148-7043. Vol. 39, n.º 2 (1997), p.158-168.
- [35] - Peter, S. J.- Polymer concepts in tissue engineering. Journal of Biomedical Materials Research. ISSN 00219304. Vol. 43, n.º 4 (1998), p.422-427.
- [36] - Burg, Karen J. L.; Porter, Scott; Kellam, James F.- Biomaterial developments for bone tissue engineering. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 21, n.º 23 (2000), p.2347-2359.
- [37] - Cooper, James A., [et al.]- Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 26, n.º 13 (2005), p.1523-1532.
- [38] - Monteiro, Fernando Jorge- Biomateriais.fjmont@fe.up.pt. Porto, 2009. PWP.
- [39] - Polymer Data Handbook, 2nd ed. Journal of the American Chemical Society. ISSN 00027863. Vol. 131, n.º 44 (2009), p.16330-16330.
- [40] - Vago, Razi, [et al.]- Hard tissue remodeling using biofabricated coralline biomaterials. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. ISSN 0165-022X. Vol. 50, n.º 2-3 (2002), p.253-259.
- [41] - Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering. Informa Healthcare USA, In., 2008. [Consult. Junho 2009]. Vol. 3-
- [42] - Kurkjian, C. R.- Mechanical properties of phosphate glasses. ISSN 00223093. (2000).
- [43] - Ahmed, I., [et al.]- Quantification of anion and cation release from a range of ternary phosphate-based glasses with fixed 45 mol% P 2 O 5. 1. ISSN 08853282. (2005).

- [44] - Aslan, S., [et al.]- Poly (D,L-lactic acid)/poly (Ε-caprolactone) blend membranes: preparation and morphological characterisation. 7. ISSN 00222461. (2000).
- [45] - Ahmed, I., [et al.]- Phosphate glasses for tissue engineering: Part 1. Processing and characterisation of a ternary-based P2O5-CaO-Na2O glass system. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 25, n.º 3 (2004), p.491-499.
- [46] - Cozien-Cazuc, S., [et al.]- Real-time dissolution of P40Na20Ca16Mg24 phosphate glass fibers. Journal of Non-Crystalline Solids. ISSN 0022-3093. Vol. 355, n.º 50-51 (2009), p.2514-2521.
- [47] - Ahmed, I., [et al.]- Phosphate glasses for tissue engineering: Part 2. Processing and characterisation of a ternary-based P2O5-CaO-Na2O glass fibre system. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 25, n.º 3 (2004), p.501-507.
- [48] - Franks, K., [et al.]- Investigation of thermal parameters and crystallisation in a ternary CaO-Na2O-P2O5-based glass system. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 22, n.º 5 (2001), p.497-501.
- [49] - Rajendran, V., [et al.]- Physicochemical studies of phosphate based P2O5-Na2O-CaO-TiO2 glasses for biomedical applications. Journal of Non-Crystalline Solids. ISSN 0022-3093. Vol. 353, n.º 1 (2007), p.77-84.
- [50] - Hampshire, Stuart- Oxynitride glasses. Journal of the European Ceramic Society. ISSN 0955-2219. Vol. 28, n.º 7 (2008), p.1475-1483.
- [51] - Salih, V., [et al.]- Development of soluble glasses for biomedical use part II: The biological response of human osteoblast cell lines to phosphate-based soluble glasses. 10. ISSN 09574530. (2000).
- [52] - Franks, K.; Abrahams, I.; Knowles, J. C.- Development of soluble glasses for biomedical use part I: In vitro solubility measurement. 10. ISSN 09574530. (2000).
- [53] - Ahmed, I., [et al.]- Weight loss, ion release and initial mechanical properties of a binary calcium phosphate glass fibre/PCL composite. 5. ISSN 1742-7061. (2008).
- [54] - Haines, P. J.- PRINCIPLES OF THERMAL ANALYSIS AND CALORIMETRY U K 2002. ISBN 0-85404-610-0.
- [55] - Barbieri, Luisa, [et al.]- Effect of TiO2 addition on the properties of complex aluminosilicate glasses and glass-ceramics. Materials Research Bulletin. ISSN 0025-5408. Vol. 32, n.º 6 (1997), p.637-648.
- [56] - Nocun, Marek- Structural studies of phosphate glasses with high ionic conductivity. Journal of Non-Crystalline Solids. ISSN 0022-3093. Vol. 333, n.º 1 (2004), p.90-94.
- [57] - Hoppe, Uwe- A structural model for phosphate glasses. Journal of Non-Crystalline Solids. ISSN 0022-3093. Vol. 195, n.º 1-2 (1996), p.138-147.
- [58] - Burling, Luke Donald- Novel Phosphate Glasses for Bone Regeneration Applications Nottingham: University of Nottingham, 2005. 219 p.
- [59] - Navarro, M., [et al.]- Development of a biodegradable composite scaffold for bone tissue engineering: Physicochemical, topographical, mechanical, degradation, and biological properties. ORDERED POLYMERIC NANOSTRUCTURES AT SURFACES. ISSN 0065-3195. Vol. CCCS (2006), p.209-231.
- [60] - Rinehart, J. D., [et al.]- Real-time dissolution measurement of sized and unsized calcium phosphate glass fibers. Journal of Biomedical Materials Research. ISSN 1552-4981. Vol. 48, n.º 6 (1999), p.833-840.
- [61] - Bunker, B. C.; Arnold, G. W.; Wilder, J. A.- Phosphate glass dissolution in aqueous solutions. Journal of Non-Crystalline Solids. ISSN 00223093. Vol. 64, n.º 3 (1984), p.291.
- [62] - Delahaye, Florence, [et al.]- Acid dissolution of sodium-calcium metaphosphate glasses. Journal of Non-Crystalline Solids. ISSN 0022-3093. Vol. 242, n.º 1 (1998), p.25-32.
- [63] - Kurkjian, C. R.- Mechanical properties of phosphate glasses. Journal of Non-Crystalline Solids. ISSN 0022-3093. Vol. 263-264 (2000), p.207-212.
- [64] - Karabulut, M., [et al.]- Mechanical and structural properties of phosphate glasses. Journal of Non-Crystalline Solids. ISSN 0022-3093. Vol. 288, n.º 1-3 (2001), p.8-17.
- [65] - Fang, Xiangyu, [et al.]- Properties of mixed Na2O and K2O iron phosphate glasses. Journal of Non-Crystalline Solids. ISSN 0022-3093. Vol. 263-264 (2000), p.293-298.
- [66] - Choueka, Jack, [et al.]- Effect of annealing temperature on the degradation of reinforcing fibers for absorbable implants. Journal of Biomedical Materials Research. ISSN 1097-4636. Vol. 29, n.º 11 (1995), p.1309-1315.
- [67] - Campbell, J. H.; Suratwala, T. I.- Nd-doped phosphate glasses for high-energy/high-peak-power lasers. Journal of Non-Crystalline Solids. ISSN 0022-3093. Vol. 263-264 (2000), p.318-341.

- [68] - Gomes, Manuela, [et al.]- Natural Polymers in tissue engineering applications. In Tissue Engineering. Burlington: Academic Press, 2008. ISBN 978-0-12-370869-4. p. 145-192.
- [69] - Chu, Chih-Chang- Biodegradable Polymeric Biomaterials: An Updated Overview. In Bronzino, Ed. Joseph D.- The Biomedical Engineering Handbook. 2nd editionCRC Press LLC, 2000. Vol. I volume.
- [70] - Lucas, Nathalie, [et al.]- Polymer biodegradation: Mechanisms and estimation techniques - A review. Chemosphere. ISSN 0045-6535. Vol. 73, n.º 4 (2008), p.429-442.
- [71] - Lucas, N., [et al.]- Polymer biodegradation: mechanisms and estimation techniques. Chemosphere. ISSN 0045-6535. Vol. 73, n.º 4 (2008), p.429-42.
- [72] - Göpferich, Achim- Mechanisms of polymer degradation and erosion. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 17, n.º 2 (1996), p.103-114.
- [73] - Burkersroda, Friederike Von; Schedl, Luise; Göpferich, Achim- Why degradable polymers undergo surface erosion or bulk erosion. 21. ISSN 01429612. (2002).
- [74] - Pitt, C. G., [et al.]- Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly(ϵ -caprolactone) ϵin vivo</math>. Journal of Applied Polymer Science. ISSN 1097-4628. Vol. 26, n.º 11 (1981), p.3779-3787.
- [75] - Li, Suming; Vert, Michel- Crystalline oligomeric stereocomplex as an intermediate compound in racemic poly(DL-lactic acid) degradation. 1. ISSN 09598103. (1994).
- [76] - Göpferich, A.; Langer, R.- THE INFLUENCE OF MICROSTRUCTURE AND MONOMER PROPERTIES ON THE EROSION MECHANISM OF A CLASS OF POLYANHYDRIDES. JOURNAL OF POLYMER SCIENCE PART A-POLYMER CHEMISTRY. ISSN 0887-624X. Vol. 31, n.º 10 (1993), p.2445-2458.
- [77] - Göpferich, Achim, [et al.]- Drug Delivery from Bioerodible Polymers. In Formulation and Delivery of Proteins and Peptides. Washington, DC: American Chemical Society, 1994. ISBN 0-8412-2959-7. p. 242-277.
- [78] - Kirby, A. J.; C.H. Bamford, M. A. Ph D. Sc D. F. R. I. C. F. R. S.; C.F.H. Tipper, Ph D. D. Sc- Chapter 2 Hydrolysis and Formation of Esters of Organic Acids. In Comprehensive Chemical KineticsElsevier, 1972. ISBN 0069-8040. Vol. Volume 10, p. 57-207.
- [79] - Richards, D. H.- POLYMER CHEMISTRY - THE BASIC CONCEPTS - HEIMENZ,PC. CHEMISTRY IN BRITAIN. ISSN 0009-3106. Vol. 20, n.º 11 (1984), p.1027-1027.
- [80] - Leong, K. W.; Brott, B. C.; Langer, R.- Bioerodible polyanhydrides as drug-carrier matrices. I: Characterization, degradation, and release characteristics. 8. ISSN 00219304. (1985).
- [81] - Ron, E., [et al.]- CONTROLLED-RELEASE OF POLYPEPTIDES FROM POLYANHYDRIDES. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. ISSN 0027-8424. Vol. 90, n.º 9 (1993), p.4176-4180.
- [82] - Kost, J.; Leong, K.; Langer, R.- ULTRASOUND-ENHANCED POLYMER DEGRADATION AND RELEASE OF INCORPORATED SUBSTANCES - (CONTROLLED RELEASE DRUG DELIVERY SYSTEMS). PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA. ISSN 0027-8424. Vol. 86, n.º 20 (1989), p.7663-7666.
- [83] - Dale, A. Chatfield; Irving, N. Einhorn- Stepwise thermal degradation of a polybenzimidazole foam. Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition. (1981), p.601-618.
- [84] - Conf- DEGRADABILITY OF POLYMERS AND PLASTICS, CONFERENCE, 1973. (1973).
- [85] - Seppala, Jukka; Linko, Yu-Yen; Su, Tao- Photo- and biodegradation of high volume thermoplastics. 198. ISSN 07812698. (1991).
- [86] - Göpferich, Achim; Langer, Robert- Modeling of polymer erosion. 16. ISSN 00249297. (1993).
- [87] - Göpferich, Achim- Polymer bulk erosion. 9. ISSN 00249297. (1997).
- [88] - Göpferich, A.; Karydas, D.; Langer, R.- PREDICTING DRUG-RELEASE FROM CYLINDRIC POLYANHYDRIDE MATRIX DISCS. EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICS AND BIOPHARMACEUTICS. ISSN 0939-6411. Vol. 41, n.º 2 (1995), p.81-87.
- [89] - Wang, Y., [et al.]- A phenomenological model for the degradation of biodegradable polymers. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 29, n.º 23 (2008), p.3393-3401.
- [90] - Grizzi, I., [et al.]- Hydrolytic degradation of devices based on poly(DL-lactic acid) size dependence. 4. ISSN 01429612. (1995).
- [91] - Bellenger, V., [et al.]- Lifetime prediction in the hydrolytic ageing of polyesters. 1. ISSN 01413910. (1995).

- [92] - Lee, Chi H.; Singla, Anuj; Lee, Yugyung- Biomedical applications of collagen. International Journal of Pharmaceutics. ISSN 0378-5173. Vol. 221, n.º 1-2 (2001), p.1-22.
- [93] - FCUP- Funcionamento dos músculos. 2003.
- [94] - Daamen, W. F., [et al.]- Elastin as a biomaterial for tissue engineering. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 28, n.º 30 (2007), p.4378-4398.
- [95] - Morris, Michael S., [et al.]- Fibrin sealant as tissue glue: Preliminary experience in complex genital reconstructive surgery. Urology. ISSN 0090-4295. Vol. 67, n.º 4 (2006), p.688-691.
- [96] - Valbonesi, Mauro- Fibrin glues of human origin. Best Practice & Research Clinical Haematology. ISSN 1521-6926. Vol. 19, n.º 1 (2006), p.191-203.
- [97] - Zhang, Ge; Suggs, Laura J.- Matrices and scaffolds for drug delivery in vascular tissue engineering. Advanced Drug Delivery Reviews. ISSN 0169-409X. Vol. 59, n.º 4-5 (2007), p.360-373.
- [98] - Dong, Zhanfeng; Wang, Qun; Du, Yumin- Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. Journal of Membrane Science. ISSN 0376-7388. Vol. 280, n.º 1-2 (2006), p.37-44.
- [99] - Grigolo, Brunella, [et al.]- Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (Hyaaff®-11) into cartilage defects in rabbits. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 22, n.º 17 (2001), p.2417-2424.
- [100] - Chen, Chien-Chung, [et al.]- Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 24, n.º 7 (2003), p.1167-1173.
- [101] - Södergård, Anders; Stolt, Mikael- Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. Progress in Polymer Science. ISSN 0079-6700. Vol. 27, n.º 6 (2002), p.1123-1163.
- [102] - Gupta, Bhuvanesh; Revagade, Nilesh; Hilborn, Jöns- Poly(lactic acid) fiber: An overview. Progress in Polymer Science. ISSN 0079-6700. Vol. 32, n.º 4 (2007), p.455-482.
- [103] - Auras, Rafael; Harte, Bruce; Selke, Susan- An Overview of Polylactides as Packaging Materials. Macromolecular Bioscience. ISSN 1616-5195. Vol. 4, n.º 9 (2004), p.835-864.
- [104] - Editora, Porto- In Infopédia Porto, 2003. [Consult. 2009.11.20]. Disponível em WWW: <[http://www.infopedia.pt/\\$actividade-optica](http://www.infopedia.pt/$actividade-optica)>.>.
- [105] - Lunt, James- Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. Polymer Degradation and Stability. ISSN 0141-3910. Vol. 59, n.º 1-3 (1998), p.145-152.
- [106] - Cicero, John A., [et al.]- Effects of molecular architecture on two-step, melt-spun poly(lactic acid) fibers. Journal of Applied Polymer Science. ISSN 1097-4628. Vol. 86, n.º 11 (2002), p.2839-2846.
- [107] - Huang, Jiang, [et al.]- Crystallization and Microstructure of Poly(l-lactide-co-meso-lactide) Copolymers. Macromolecules. ISSN 0024-9297. Vol. 31, n.º 8 (1998), p.2593-2599.
- [108] - Lim, L. T.; Auras, R.; Rubino, M.- Processing technologies for poly(lactic acid). Progress in Polymer Science. ISSN 0079-6700. Vol. 33, n.º 8 (2008), p.820-852.
- [109] - Cai, Hua, [et al.]- Effects of physical aging, crystallinity, and orientation on the enzymatic degradation of poly(lactic acid). Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics. ISSN 1099-0488. Vol. 34, n.º 16 (1996), p.2701-2708.
- [110] - CASIMIRO, MARIA HELENA, [et al.]- Análise Calorimétrica aplicada a Polímeros Biológicos Parte I: Fundamentos Teóricos. p.29-35. [Consult. 8 Janeiro 2010].
- [111] - T. HATAKEYAMA, ZHENHAI LIU - Handbook of Thermal Analysis JOHN WILEY & SONS, 1998. ISBN 0471983632.
- [112] - Cicero, John A., [et al.]- Supramolecular morphology of two-step, melt-spun poly(lactic acid) fibers. Journal of Applied Polymer Science. ISSN 1097-4628. Vol. 86, n.º 11 (2002), p.2828-2838.
- [113] - Celli, Annamaria; Scandola, Mariastella- Thermal properties and physical ageing of poly (l-lactic acid). Polymer. ISSN 0032-3861. Vol. 33, n.º 13 (1992), p.2699-2703.
- [114] - Branco, Carlos A. G. de Moura- Ensaio de materiais e análise elementar de tensões no domínio plástico. In Gulbenkian, Fundação Calouste- Mecânica dos materiais. 3ª. Lisboa. p. 18-25; 697-722.
- [115] - Rhim, J. W., [et al.]- Effect of the processing methods on the performance of polylactide films: Thermocompression versus solvent casting. Journal of Applied Polymer Science. ISSN 1097-4628. Vol. 101, n.º 6 (2006), p.3736-3742.

- [116] - Kulkarni, R. K., *[et al.]*- Biodegradable poly(lactic acid) polymers. Journal of Biomedical Materials Research. ISSN 1097-4636. Vol. 5, n.º 3 (1971), p.169-181.
- [117] - Eenink, M. J. D., *[et al.]*- Biodegradable hollow fibres for the controlled release of hormones. Journal of Controlled Release. ISSN 0168-3659. Vol. 6, n.º 1 (1987), p.225-247.
- [118] - Yang, F., *[et al.]*- Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. 10. ISSN 01429612. (2004).
- [119] - Hakkarainen, M.; Karlsson, S.; Albertsson, A. C.- Rapid (bio)degradation of polylactide by mixed culture of compost microorganisms - Low molecular weight products and matrix changes. 7. ISSN 00323861. (2000).
- [120] - Karjomaa, S., *[et al.]*- Microbial degradation of poly-(l-lactic acid) oligomers. Polymer Degradation and Stability. ISSN 0141-3910. Vol. 59, n.º 1-3 (1998), p.333-336.
- [121] - Tsuji, Hideto; Miyauchi, Shinya- Enzymatic Hydrolysis of Poly(lactide)s: Effects of Molecular Weight, l-Lactide Content, and Enantiomeric and Diastereoisomeric Polymer Blending. Biomacromolecules. ISSN 1525-7797. Vol. 2, n.º 2 (2001), p.597-604.
- [122] - Hakkarainen, Minna; Karlsson, Sigbritt; Albertsson, Ann-Christine- Influence of low molecular weight lactic acid derivatives on degradability of polylactide. Journal of Applied Polymer Science. ISSN 1097-4628. Vol. 76, n.º 2 (2000), p.228-239.
- [123] - Signori, Francesca; Coltelli, Maria-Beatrice; Bronco, Simona- Thermal degradation of poly(lactic acid) (PLA) and poly(butylene adipate-co-terephthalate) (PBAT) and their blends upon melt processing. Polymer Degradation and Stability. ISSN 0141-3910. Vol. 94, n.º 1 (2009), p.74-82.
- [124] - McNeill, I. C.; Leiper, H. A.- Degradation studies of some polyesters and polycarbonates--2. Polylactide: Degradation under isothermal conditions, thermal degradation mechanism and photolysis of the polymer. Polymer Degradation and Stability. ISSN 0141-3910. Vol. 11, n.º 4 (1985), p.309-326.
- [125] - Kopinke, F. D., *[et al.]*- Thermal decomposition of biodegradable polyesters--II. Poly(lactic acid). Polymer Degradation and Stability. ISSN 0141-3910. Vol. 53, n.º 3 (1996), p.329-342.
- [126] - McNeill, I. C.; Leiper, H. A.- Degradation studies of some polyesters and polycarbonates--1. Polylactide: General features of the degradation under programmed heating conditions. Polymer Degradation and Stability. ISSN 0141-3910. Vol. 11, n.º 3 (1985), p.267-285.
- [127] - Satyanarayana, D.; Chatterji, P. R.- BIODEGRADABLE POLYMERS - CHALLENGES AND STRATEGIES. JOURNAL OF MACROMOLECULAR SCIENCE-REVIEWS IN MACROMOLECULAR CHEMISTRY AND PHYSICS. ISSN 0736-6574. Vol. C33, n.º 3 (1993), p.349-368.
- [128] - Navarro, M., *[et al.]*- In vitro degradation behavior of a novel bioresorbable composite material based on PLA and a soluble CaP glass. Acta Biomaterialia. ISSN 1742-7061. Vol. 1, n.º 4 (2005), p.411-419.
- [129] - Shih, Chung- Chain-end scission in acid catalyzed hydrolysis of poly (-lactide) in solution. Journal of Controlled Release. ISSN 0168-3659. Vol. 34, n.º 1 (1995), p.9-15.
- [130] - LIU, SHU Q.- Principles and Applications of Bioregenerative Engineering to Organs Systems. In WILEY-INTERSCIENCE- Bioregenerative Engineering: Principles and Applications. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2006 ISBN 978-0-471-70907-7. p. 468-499.
- [131] - Joziassse, C. A. P., *[et al.]*- The influence of morphology on the (hydrolytic degradation of as polymerized and hot drawn poly(L-lactide)). Colloid and Polymer Science. n.º 11 (1998), p.968.
- [132] - John, M. Brady, *[et al.]*- Resorption rate, route of elimination, and ultrastructure of the implant site of polylactic acid in the abdominal wall of the rat. Journal of Biomedical Materials Research. (1973), p.155-166.
- [133] - Middleton, John C.; Tipton, Arthur J.- Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. 23. ISSN 01429612. (2000).
- [134] - Li, S. M.; Vert, Michel- Morphological Changes Resulting from the Hydrolytic Degradation of Stereocopolymers Derived from L- and DL-Lactides. Macromolecules. ISSN 0024-9297. Vol. 27, n.º 11 (1994), p.3107-3110.
- [135] - Park, Tae Gwan- Degradation of poly(d,l-lactic acid) microspheres: effect of molecular weight. Journal of Controlled Release. ISSN 0168-3659. Vol. 30, n.º 2 (1994), p.161-173.

- [136] - Siparsky, Georgette L.; Voorhees, Kent J.; Miao, Fudu- Hydrolysis of polylactic acid (PLA) and polycaprolactone (PCL) in aqueous acetonitrile solutions: Autocatalysis. 1. ISSN 10647546. (1998).
- [137] - Zong, Xin-Hua, [et al.]- Structure and morphology changes in absorbable poly(glycolide) and poly(glycolide-co-lactide) during in vitro degradation. 24. ISSN 00249297. (1999).
- [138] - Renouf-Glauser, Annette C., [et al.]- The effect of crystallinity on the deformation mechanism and bulk mechanical properties of PLLA. 29. ISSN 01429612. (2005).
- [139] - Tissue Engineering
CRC Press, 2007.
- [140] - Valappil, S. P., [et al.]- Controlled delivery of antimicrobial gallium ions from phosphate-based glasses. Acta Biomaterialia. ISSN 1742-7061. Vol. 5, n.º 4 (2009), p.1198-1210.
- [141] - Buttafoco, L., [et al.]- Electrospinning of collagen and elastin for tissue engineering applications. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 27, n.º 5 (2006), p.724-734.
- [142] - Mithieux, Suzanne M., [et al.]- Elastin. In Advances in Protein Chemistry Academic Press, 2005. ISBN 0065-3233. Vol. Volume 70, p. 437-461.
- [143] - Lu, Helen H., [et al.]- Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 26, n.º 23 (2005), p.4805-4816.
- [144] - Laitinen, Outi, [et al.]- Mechanical properties of biodegradable ligament augmentation device of poly(L-lactide) in vitro and in vivo. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 13, n.º 14 (1992), p.1012-1016.
- [145] - Wright, D. D.- Degradable polymer composites: Encyclopedia of biomaterials and biomedical engineering. Marcel Denker, 2004.
- [146] - Widmer, Markus S., [et al.]- Manufacture of porous biodegradable polymer conduits by an extrusion process for guided tissue regeneration. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 19, n.º 21 (1998), p.1945-1955.
- [147] - Harley, Brendan A., [et al.]- Fabricating tubular scaffolds with a radial pore size gradient by a spinning technique. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 27, n.º 6 (2006), p.866-874.
- [148] - Boccaccini, A. R., [et al.]- Preparation and characterisation of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and PLGA/Bioglass® composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications. Materials Science and Engineering: C. ISSN 0928-4931. Vol. 25, n.º 1 (2005), p.23-31.
- [149] - Mooney, D. J., [et al.]- Stabilized polyglycolic acid fibre-based tubes for tissue engineering. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 17, n.º 2 (1996), p.115-124.
- [150] - Stokols, Shula; Tuszynski, Mark H.- The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 25, n.º 27 (2004), p.5839-5846.
- [151] - Moore, Michael J., [et al.]- Multiple-channel scaffolds to promote spinal cord axon regeneration. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 27, n.º 3 (2006), p.419-429.
- [152] - Sundback, Cathryn, [et al.]- Manufacture of porous polymer nerve conduits by a novel low-pressure injection molding process. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 24, n.º 5 (2003), p.819-830.
- [153] - Patist, Carla M., [et al.]- Freeze-dried poly(L-lactic acid) macroporous guidance scaffolds impregnated with brain-derived neurotrophic factor in the transected adult rat thoracic spinal cord. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 25, n.º 9 (2004), p.1569-1582.
- [154] - Flynn, Lauren; Dalton, Paul D.; Shoichet, Molly S.- Fiber templating of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) for neural tissue engineering. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 24, n.º 23 (2003), p.4265-4272.
- [155] - Silva, M. M. C. G., [et al.]- The effect of anisotropic architecture on cell and tissue infiltration into tissue engineering scaffolds. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 27, n.º 35 (2006), p.5909-5917.
- [156] - Lin, Angela S. P., [et al.]- Microarchitectural and mechanical characterization of oriented porous polymer scaffolds. Biomaterials. ISSN 0142-9612. Vol. 24, n.º 3 (2003), p.481-489.
- [157] - Lu, H. H., [et al.]- Three-dimensional, bioactive, biodegradable, polymer-bioactive glass composite scaffolds with improved mechanical properties support collagen

- synthesis and mineralization of human osteoblast-like cells in vitro. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. ISSN 0021-9304. Vol. 64A, n.º 3 (2003), p.465-474.
- [158] - Taboas, J. M., [et al.]- Indirect solid free form fabrication of local and global porous, biomimetic and composite 3D polymer-ceramic scaffolds. *Biomaterials*. ISSN 0142-9612. Vol. 24, n.º 1 (2003), p.181-194.
- [159] - Gross, Karlis A.; Rodríguez-Lorenzo, L. M. Luis M.- Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering. *Biomaterials*. ISSN 0142-9612. Vol. 25, n.º 20 (2004), p.4955-4962.
- [160] - Xiong, Zhuo, [et al.]- Fabrication of porous scaffolds for bone tissue engineering via low-temperature deposition. *Scripta Materialia*. ISSN 1359-6462. Vol. 46, n.º 11 (2002), p.771-776.
- [161] - Monteiro, Nelson dos Santos- Caracterização de matrizes de Quitosano para a regeneração de tecidos produzidas pela técnica de TIPS Lisboa: Universidade Nova de Lisboa - Faculdade de Ciências e Tecnologia, 2008. 104 p.
- [162] - Department, Iowa State University Materials Science & Engineering- Welcome to the World os Scanning Electron Microscopy. Disponível em WWW: <<http://mse.iastate.edu/microscopy/home.html>>.
- [163] - Manfred R. Koller, Bernhard Ø. Palsson- Tissue Engineering of Bone Marrow. In Bronzino, Ed. Joseph D.- The Biomedical Engineering Handbook. 2nd editionCRC Press LLC, 2000. Vol. I volume.
- [164] - Doblaré, M.; García, J. M.; Gómez, M. J.- Modelling bone tissue fracture and healing: a review. *Engineering Fracture Mechanics*. ISSN 0013-7944. Vol. 71, n.º 13-14 (2004), p.1809-1840.
- [165] - Gray, Henry- Anatomy of the human body. 20. Harvard: Warren Harmon Lewis, Lea & Febiger,
- [166] - Dorothy S. Luciano, Arthur J. Vander, James H. Sherman- Human anatomy and physiology: structure and function. 2nd. Michigan: McGraw-Hill, ISBN 0070389624, 9780070389625.
- [167] - Seeley, Stephens e Tate- Articulações e Movimento. In Anatomia & Fisiologia. 6ª ediçãoLusociência. p. 178-197 e 249-274.
- [168] - K.U.Leuven, BMGO - Integration of clinical and biomechanical competencies into on-line course material for prosthetic dentistry and implant dentistry, 2003-2005. [Consult. Janeiro]. Disponível em WWW: <<http://www.fepdpd.org/ICB-Dent/index.htm>>.
- [169] - LIU, SHU Q.- Embryonic Organ Development. In WILEY-INTERSCIENCE- BIOREGENERATIVE ENGINEERING: PRINCIPLES AND APPLICATIONS. Hoboken, New Jersey: JOHN WILEY & SONS, INC., 2007. ISBN 978-0-471-70907-7.
- [170] - LIU, SHU Q.- Regeneration of Adult Cells, Tissues, and Organs. In WILEY-INTERSCIENCE- BIOREGENERATIVE ENGINEERING: PRINCIPLES AND APPLICATIONS. Hoboken, New Jersey: JOHN WILEY & SONS, INC., 2007. ISBN 978-0-471-70907-7.
- [171] - von Rechenberg, Brigitte; Auer, Jörg A.- Bone Grafts and Bone Replacements. In Equine Surgery (Third Edition). Saint Louis: W.B. Saunders, 2006. ISBN 978-1-41-600123-2. p. 1030-1036.
- [172] - Warren, Stephen M., [et al.]- Biomaterials for skin and bone replacement and repair in plastic surgery. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery*. ISSN 1071-0949. Vol. 9, n.º 1 (2003), p.10-15.
- [173] - LIU, SHU Q.- Bone and Cartilage Regenerative Engineering. In WILEY-INTERSCIENCE- BIOREGENERATIVE ENGINEERING: PRINCIPLES AND APPLICATIONS. Hoboken, New Jersey: JOHN WILEY & SONS, INC., 2007. ISBN 978-0-471-70907-7.
- [174] - Langstaff, S., [et al.]- Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates. Part I: rational design, sample preparation and material characterization. *Biomaterials*. ISSN 0142-9612. Vol. 20, n.º 18 (1999), p.1727-1741.
- [175] - Boyde, A., [et al.]- Osteoconduction in large macroporous hydroxyapatite ceramic implants: evidence for a complementary integration and disintegration mechanism. *Bone*. ISSN 8756-3282. Vol. 24, n.º 6 (1999), p.579-589.
- [176] - Azevedo, Ana Filipa Costa Pereira Reis de- A LUXAÇÃO TRAUMÁTICA DO JOELHO - REVISÃO. Covilhã: Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, 2008. 112 p.
- [177] - Karmani, S.; Ember, T.- The anterior cruciate ligament--1. *Current Orthopaedics*. ISSN 0268-0890. Vol. 17, n.º 5 (2003), p.369-377.

- [178] - Chandrashekar, Naveen, *[et al.]*- Sex-based differences in the tensile properties of the human anterior cruciate ligament. 2006.
- [179] - Technologies, CMG- Ligamentoplastia <http://www.ligamentoplastia.com/ligamentoplastia-lca.html>, 2007.
- [180] - Ratner, B.D.; Hoffman A.S.; Schoen F.J.; Lemons, J.E.- Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine. 2nd edition. Amsterdão, Holanda: Elsevier Academic Press, 2004.
- [181] - Technologies, CMG- Ruptura Parcial e Total do LCA: <http://www.ligamentoplastia.com/ligamentoplastia-lca.html>. 2007. [Consult. Maio 2009].
- [182] - Parsons, Andrew-. Andrew.Parsons@nottingham.ac.uk. Nottingham - UK, 2010.
- [183] - ASTM- Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics. ASTM International, 2004.
- [184] - ASTM- Standard Test Method for Tensile Properties of Glass Fiber Strands, Yarns, and Rovings Used in Reinforced Plastics. ASTM International, 2004.
- [185] - Navarro, M., *[et al.]*- Development of a Biodegradable Composite Scaffold for Bone Tissue Engineering: Physicochemical, Topographical, Mechanical, Degradation, and Biological Properties. In Vancso, G.- ORDERED POLYMERIC NANOSTRUCTURES AT SURFACESSpringer Berlin / Heidelberg, 2006. Vol. 200, p. 209-231.

Anexos

A - Exemplos de processamento do PLA

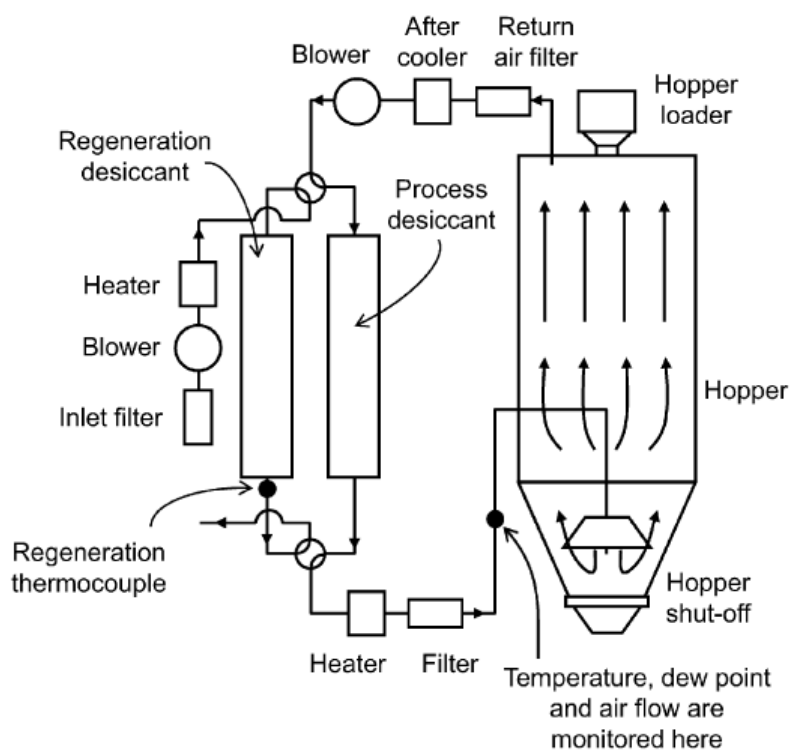


Figura A 1 - Circuito fechado típico de secagem antes da extrusão do PLA. ^[108]

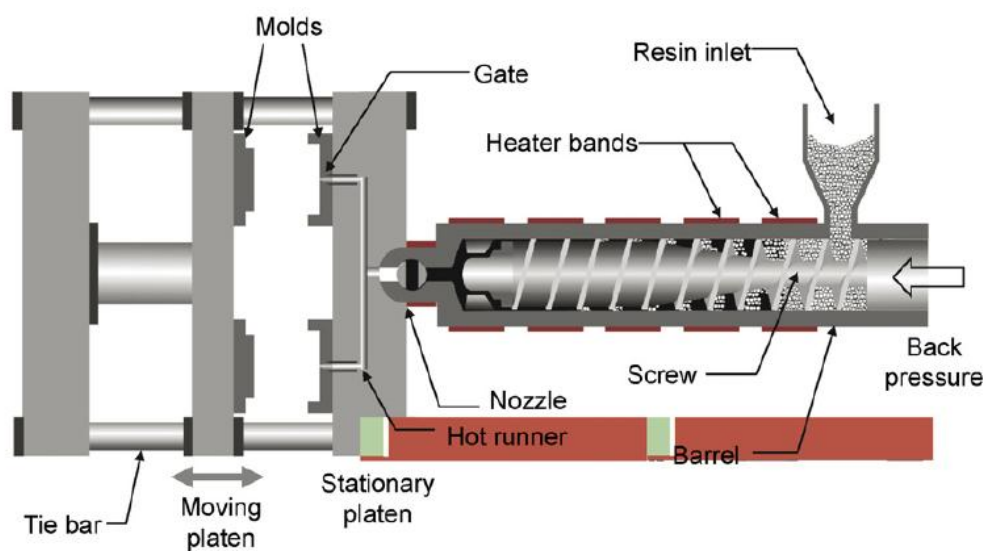


Figura A 2 - Esquema dos componentes mais relevantes de um equipamento de fundição injectada. ^[108]

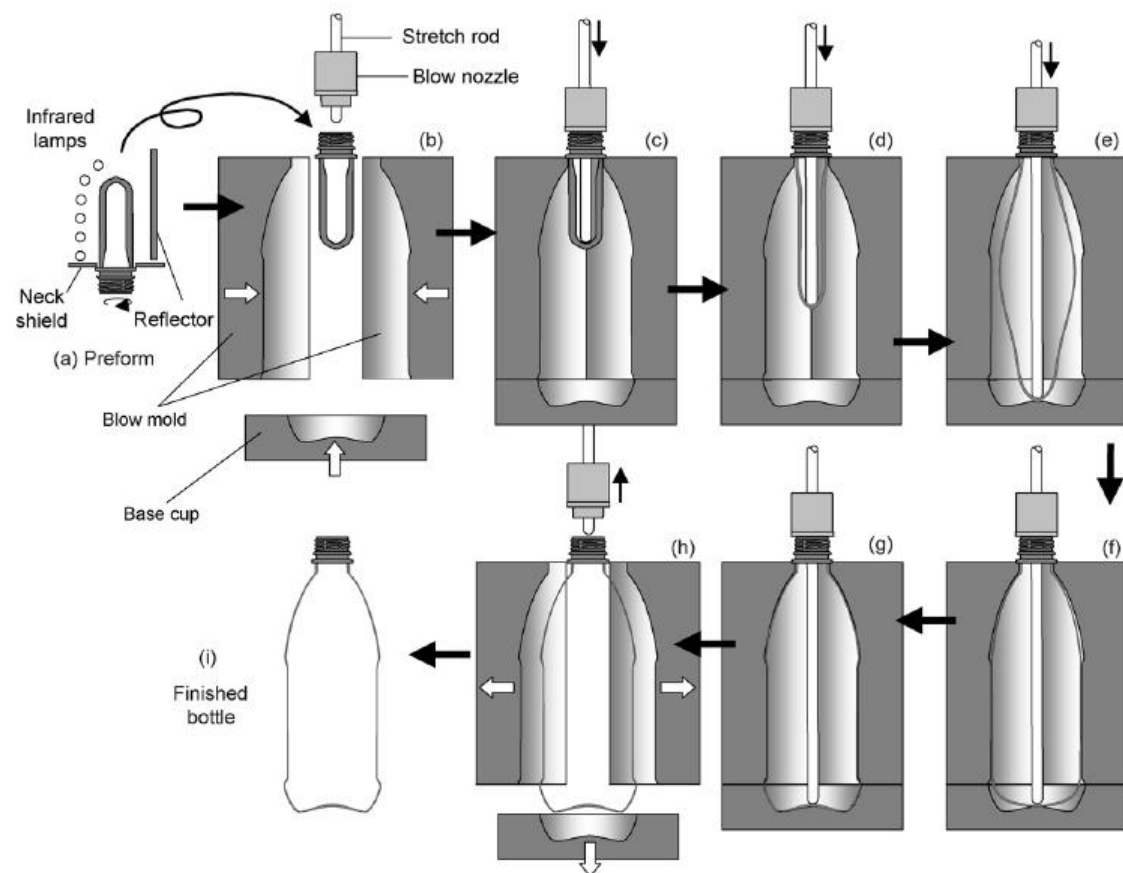


Figura A 3 - Ilustração da injeção de uma garrafa de PLA por conformação por sopragem (ISBM - *injection stretch blow molding*). ^[108]

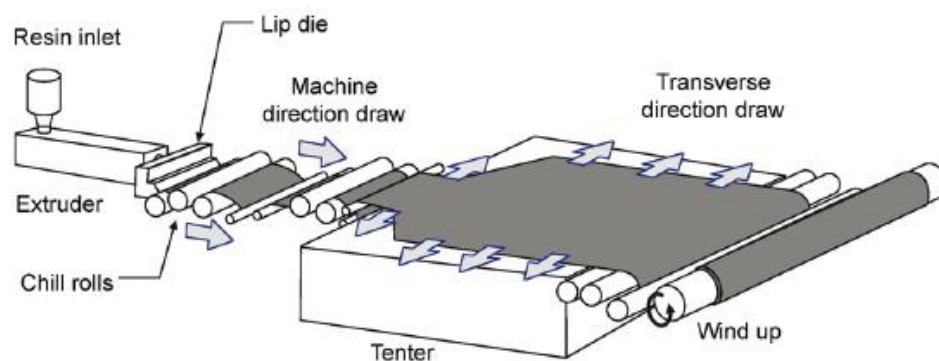


Figura A 4 - Linha típica de extrusão orientada biaxialmente e vazamento de filmes. ^[108]

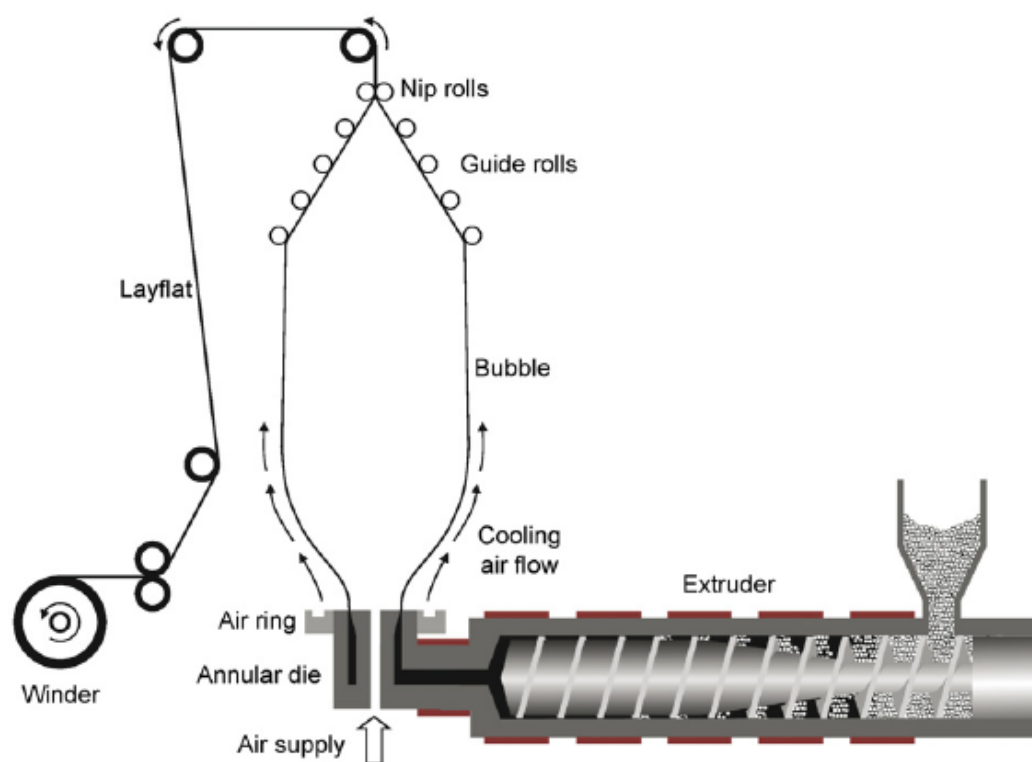


Figura A 5 - Extrusão seguido de espalmamento e sopragem. ^[108]

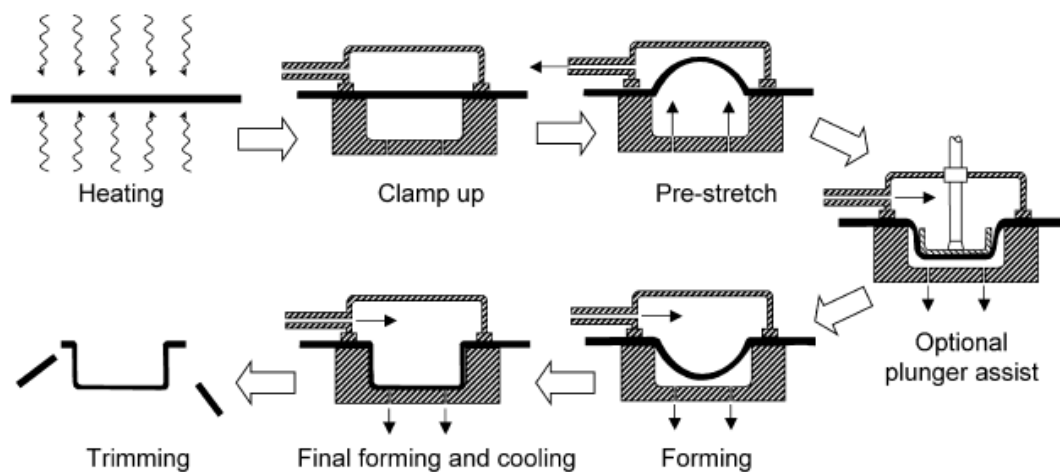


Figura A 6 - Passos principais do processo de conformação térmica. ^[108]

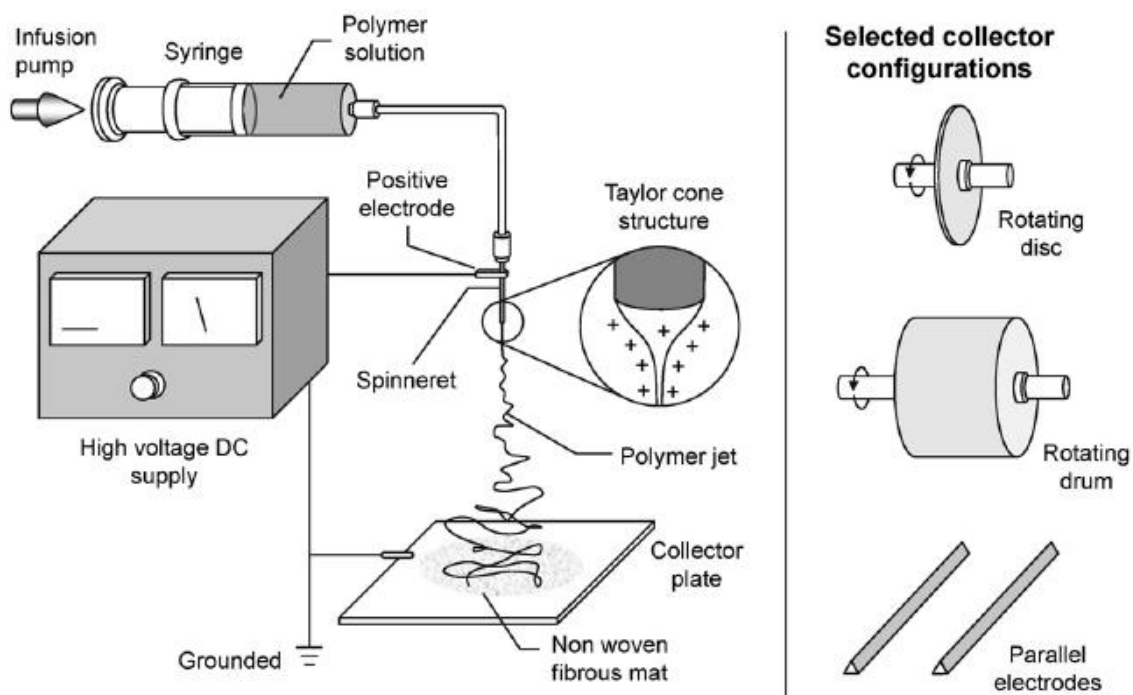


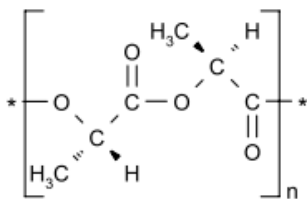
Figura A 7 - Instalação típica do processo *electrospinning*.^[108]

B - Ficha de especificações do PLA

Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG
 Fine Chemicals
 55216 Ingelheim am Rhein
 Germany



RESOMER[®] L 210

Chemical name:	Poly(L-lactide)
CAS number:	33135-50-1
Material number:	60640645
	
26 August 2005	

-(C₆H₈O₄)_n-

Specification

Description:	white to off-white granulate	
Odour:	nearly odourless	
Identity:	NMR-spectrum conforms to reference	
Inherent viscosity:	3.3 - 4.3 dl/g	0.1 % in chloroform, 25 °C
Residual monomer:	max. 0.1 %	
Residual solvent:	max. 890 ppm toluene	
Water:	max. 0.5 %	
Tin:	max. 100 ppm	
Heavy metals:	max. 10 ppm	
Sulphated ash:	max. 0.1 %	

C - Ensaaios de tracção a provetes de PLA, PLA/PBG e espécimes de PBG

Ensaio de tracção a espécimes de PBG com diferentes impregnantes

Nas figuras seguintes estão expostas as curvas da força aplicada (N) em função do tempo de ensaio de tracção (s) realizadas a provetes de PLA, PLA/PBG e espécimes de PBG para definição das suas velocidades adequadas de tracção.

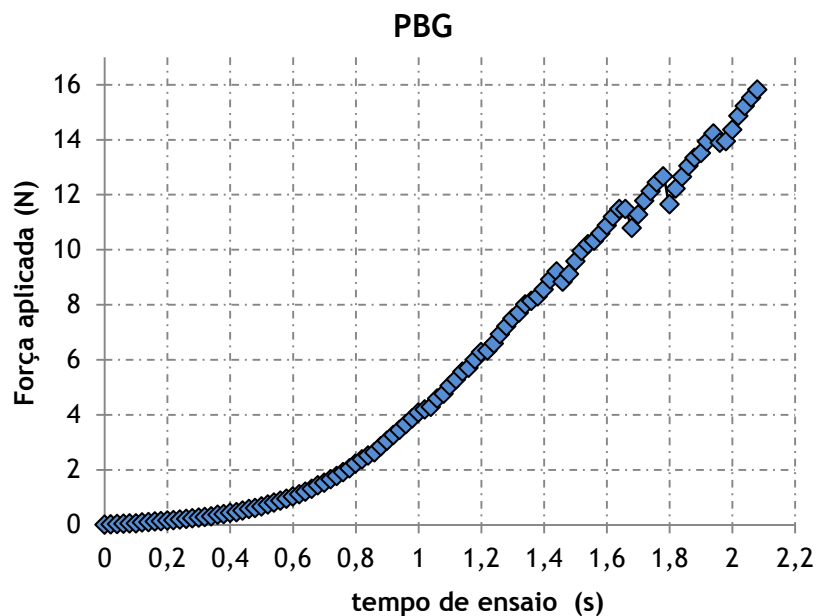


Figura C 1 - Curva da força aplicada (N) vs. o tempo de ensaio de tracção (s) resultante da tracção de uma amostra de fibras de PBG realizada a uma velocidade de 0,4mm/min.

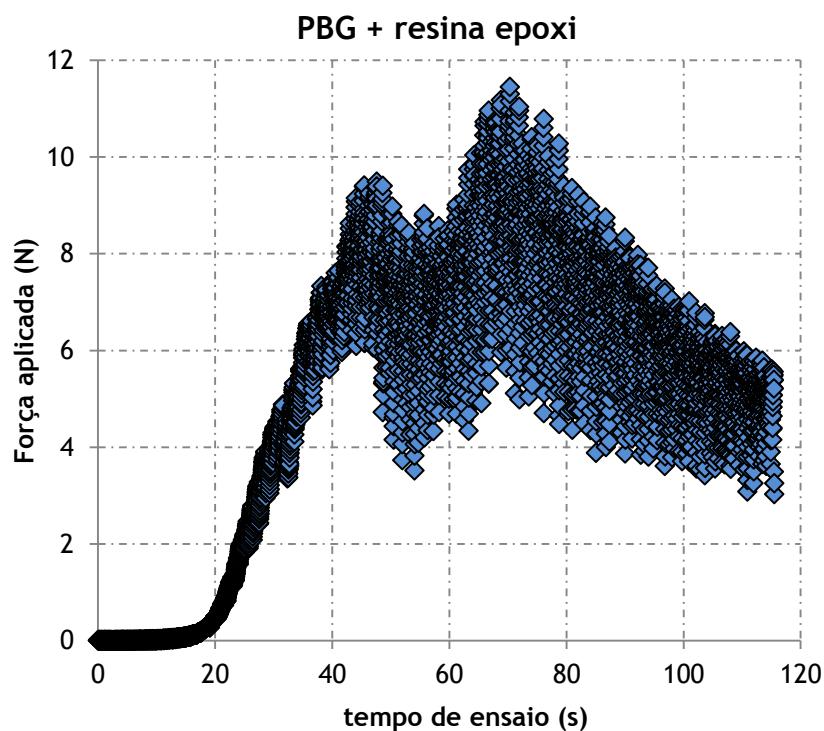


Figura C 2 - Curva da força aplicada (N) vs. o tempo de ensaio de tracção (s) resultante da tracção de uma amostra de fibras de PBG impregnada com resina epoxi, realizada a uma velocidade de 0,4mm/min.

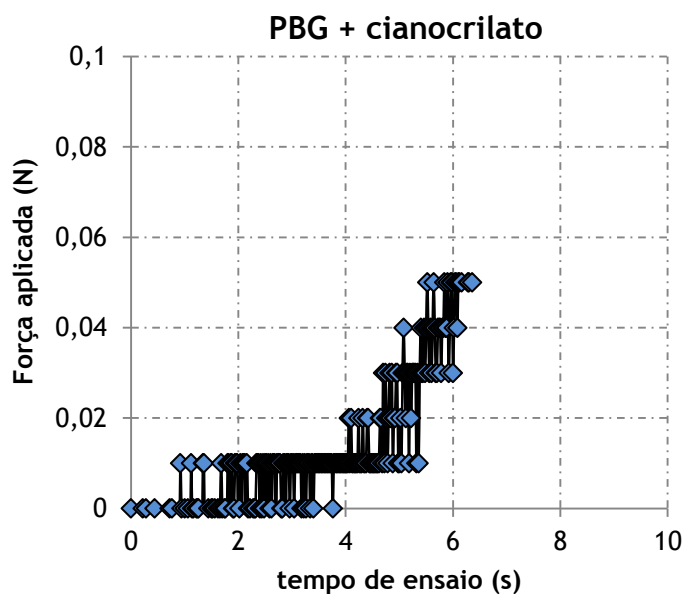


Figura C 3 - Curva da força aplicada (N) vs. o tempo de ensaio de tracção (s) da tracção de uma amostra de fibras de PBG impregnada com cianocrilato, realizada a uma velocidade de 0,4mm/min.

Na Figura C 1 é visível que o tempo de ensaio não preenche os requisitos mínimos de durabilidade de um ensaio de tracção para a norma ASTM D 2343 - 03 *Standard Test Method for Tensile Properties of Glass Fiber Strands, Yarns, and Rovings Used in Reinforced Plastics* ^[184], para traccionar os espécimes de PBG. Adicionalmente, aos 1,5s aproximadamente, já eram perceptíveis (graficamente) e audíveis roturas e deslizamentos de fibras o que indicava que as fibras da amostra a ser traccionada não estavam todas a sofrer a mesma tensão e ao mesmo tempo que a secção a ser traccionada alterava.

Deste modo, tentou-se seguir a metodologia de tracção da norma acima referida, submetendo as fibras de PBG a uma impregnação prévia ao ensaio de tracção.

A Figura C 2 expõe o resultado do ensaio de tracção das fibras de PBG sujeitas a uma impregnação com resina epoxi. Nesta verifica-se que há um deslizamento constante da amostra ao longo do ensaio de tracção e deste modo foi anulada esta hipótese para traccionar os provetes de PBG.

Noutra tentativa de adaptabilidade do método complexo referido na norma ASTM D 2343-03, alterou-se o meio de impregnação das fibras de PBG para cianocrilato, e a Figura C 3 revela o resultado obtido quando estas foram submetidas ao ensaio de tracção. Mais uma vez era prematuro e constante o deslizamento das fibras nas amarras, o que invalidou os ensaios de tracção efectuados.

Todos estes ensaios foram realizados diversas vezes e com diferentes tipos de amarras numa tentativa de minimizar os deslizamentos observados; no entanto, os resultados obtidos foram idênticos aos anunciados nas figuras anteriores, o que conduziu a uma desistência da realização dos ensaios de tracção às amostras de PBG.

Ensaio de tracção a provetes de PLA e compósitos de PLA/PBG para definição da velocidade de extensão

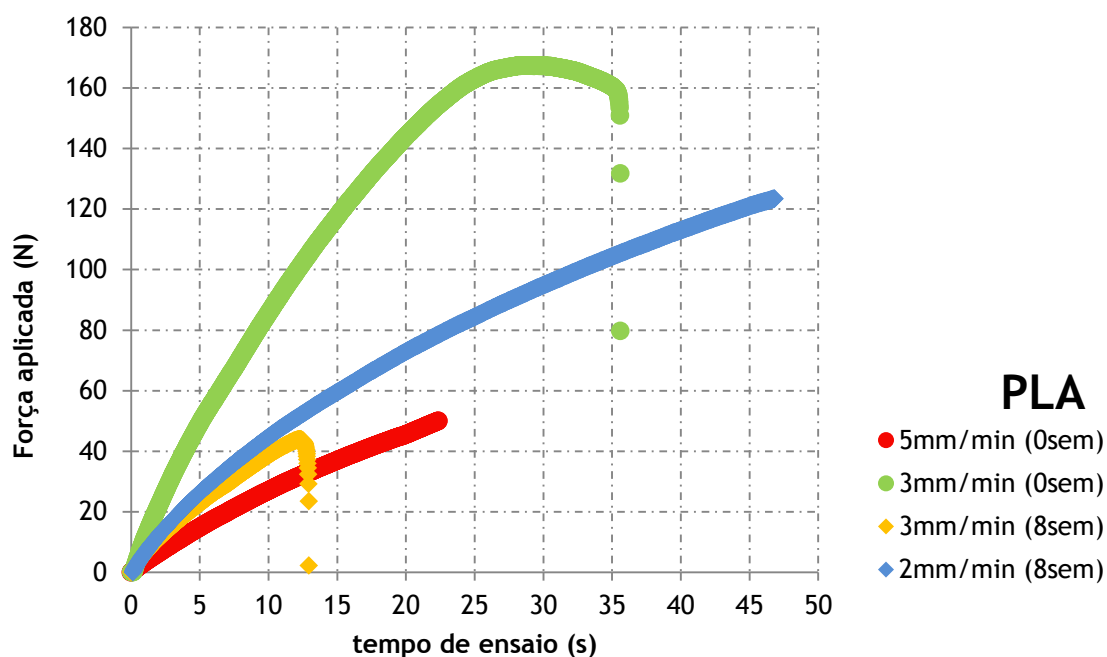


Figura C 4 - Curvas da força aplicada (N) vs. o tempo de ensaio de tracção (s) resultantes de ensaios de tracção a provetes de PLA realizados a diferentes velocidades.

No sentido de definir a velocidade de realização dos ensaios de tracção dos provetes de PLA fizeram-se alguns ensaios prévios com as curvas resultantes resumidas na Figura C 4.

Para os provetes de PLA sem degradação foram realizados ensaios a uma velocidade de 5mm/min. Este valor inicial teve como base a norma ASTM D 638 - 03 - *Standard Test Method for Tensile Properties of Plastics* e como referência as velocidades nela referida e transcritas para a Tabela 16 - página 146. No entanto, pela mesma norma, o ensaio de tracção para ser reprodutivo deverá ter, em detrimento da velocidade, uma duração entre 30s e 5min. Assim sendo, testou-se a velocidade de 3mm/min para os mesmos provetes de PLA sem degradação, e esta foi considerada como adequada para a realização dos ensaios de tracção aos provetes de PLA.

O dilema surgiu quando para os provetes de PLA referentes a um estágio de degradação de 8 semanas o tempo de ensaio não ultrapassou os 15s. Deste modo, para os ensaios dos tempos de degradação superiores considerou-se a velocidade de ensaio 2mm/min, uma vez que a tracção de provetes de PLA, onde outrora foram levantadas questões de tempo de ensaio, ultrapassava os 30s.

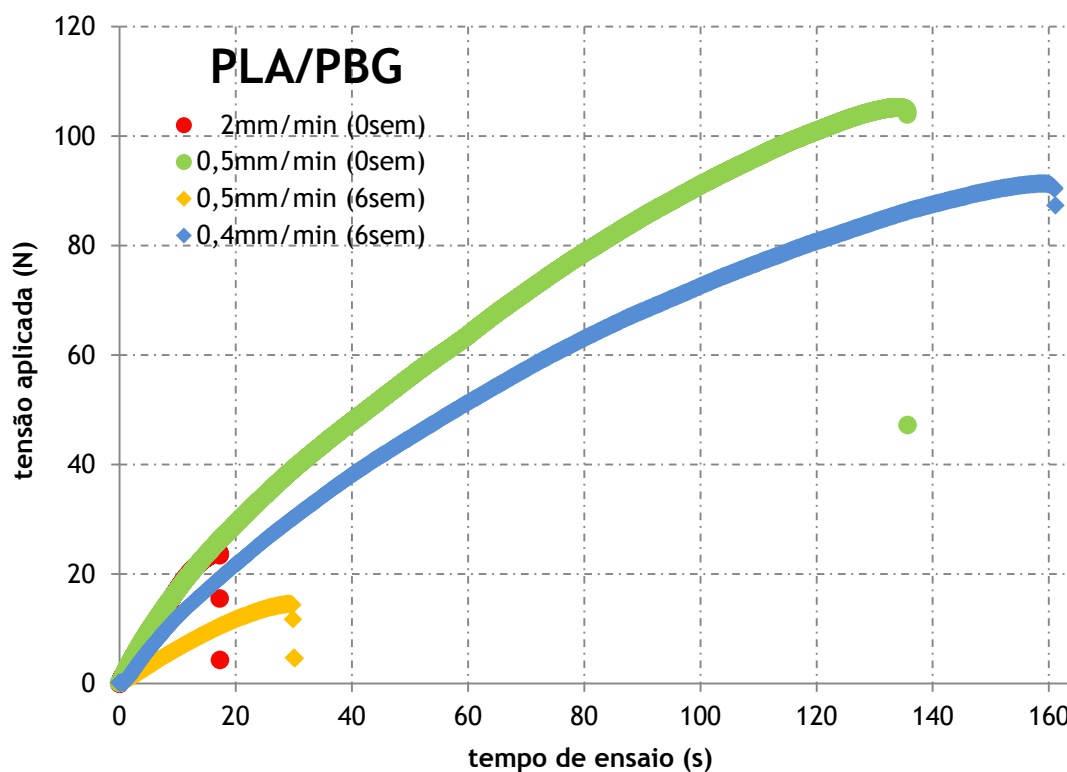


Figura C 5 - Curvas da tensão aplicada (N) vs. o tempo de ensaio de tracção (s) resultantes de ensaios de tracção a provetes de compósito PLA/PBG realizados a diferentes velocidades.

Equiparando ao realizado para os provetes de PLA (norma ASTM D 638 - 03), iniciou-se os ensaios teste de tracção do compósito com uma velocidade de 2mm/min e, pela durabilidade do ensaio resultante, esta teve que ser diminuída para 0,5mm/min.

Para estágios superiores de degradação, ou seja, a partir das 6 semanas, pela mesma razão que levou a alteração da velocidade de ensaio de tracção dos provetes de PLA, a durabilidade do ensaio, também se alterou a velocidade de tracção do compósito de PLA/PBG. Definindo-se deste modo a velocidade de 0,4mm/min a velocidade de ensaio de tracção para os provetes de compósito PLA/PBG.

Influência da velocidade de extensão nas propriedades mecânicas dos provetes de PLA/PBG com 6 semanas de degradação em PBS a 37°C

Em termos comparativos e como meio identificativo da influência que provocou a alteração da velocidade de tracção nos resultados obtidos, fez-se a avaliação das propriedades mecânicas traduzidas, em valores de σ_c , σ_R , ϵ_f e E, conseguidas nos ensaios de tracção a provetes de compósito PLA/PBG após 6 semanas de degradação para as duas velocidades apresentadas anteriormente, 0,5 e 0,4mm/min.

A tabela seguinte resume o valor das variáveis em estudo: tensão de cedência, resistência à tracção, alongamento pós rotura e módulo de *Young*.

Tabela C 1- Influência da velocidade do ensaio de tracção nas propriedades mecânicas do compósito PLA/PBG com 6 semanas de degradação em PBS a 37°C.

Velocidade de ensaio de tracção (mm/min)	σ_c (MPa)	σ_R (MPa)	ϵ_f (%)	E (MPa)
0,5	2,36	3,73	0,00	1,37
0,4	2,52	18,94	0,00	30,44

Como visível na figura anterior (Figura C 5), a Tabela C 1 apresentada revela que todos os valores das propriedades mecânicas em estudo, com excepção do alongamento pós rotura, sofrem um aumento com a diminuição da velocidade do ensaio de tracção para um valor que proporcionou o cumprimento da norma ASTM D 638 - 03 em termos de tempo de duração do ensaio.

No que diz respeito à tensão de cedência e à transição do comportamento elástico a plástico do compósito, este não apresenta grandes variações; no entanto, o valor da resistência à tracção e módulo de *Young* alteram inclusive a sua ordem de grandeza.

Estes valores revelam que o material é sensível à velocidade de extensão.

Exemplo de estrição num provete de PLA

A figura a seguir apresentada evidencia o comportamento mecânico do PLA após 6 semanas de degradação em PBS a 37°C. Está representada a variação da força aplicada em N em função do deslocamento que o provete sofre entre amarras, em mm, e onde é visível a estrição a que o provete é sujeito após ser atingido o ponto de rotura.

Esta estrição acontece pois durante o ensaio de tracção há redução local da área do provete resultando num abaixamento de tensão nominal. Este abaixamento aparente de tensão não é verdadeiro pois o cálculo da tensão apenas tem em consideração o valor da área inicial do provete e não o da área instantânea.

O facto de ocorrer estrição quer dizer que este material é bastante dúctil.

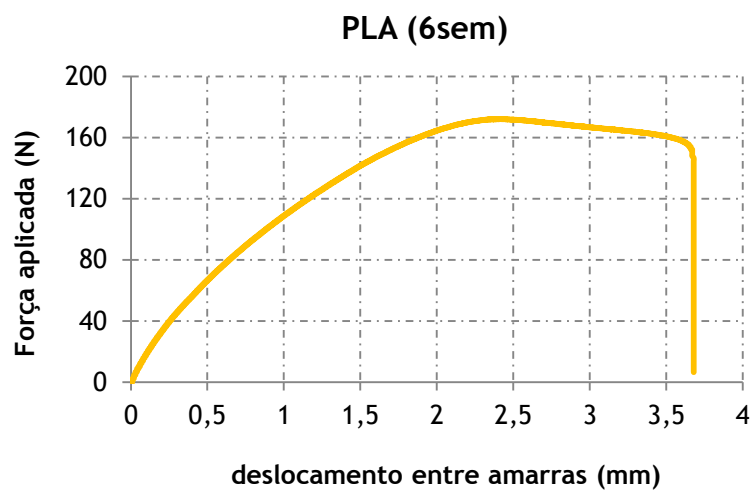


Figura C 6 - Gráfico do comportamento do provete de PLA com 6 semanas de degradação em PBS a 37°C traduzido em dados de força aplicada (N) versus deslocamento entre amarras sofrido pelo provete (mm).