

**DANIEL YUNG**

**Polímeros Biodegradáveis Derivados de  
Poli(lactídio-co-caprolactona) como  
Biomateriais**

Trabalho de Formatura  
Apresentado a Escola  
Politécnica da Universidade  
de São Paulo

São Paulo  
2005

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a minha família, por todo o apoio e paciência que tiveram comigo, em especial durante os primeiros anos de faculdade que foram difíceis para mim.

Em segundo lugar, agradeço a Professora Wang Shu Hui, por toda ajuda, permanente incentivo e paciência. Muito obrigado!

Agradeço também aos meus colegas de turma, que sempre estiveram ao meu lado me ajudando.

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

ÍNDICE DE TABELAS

ÍNDICE DE FIGURAS

1. OBJETIVO	1
2. RESUMO	2
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3.1 Introdução	3
3.2 Degradabilidade	4
Fotodegradáveis	4
Degradação Térmica	5
3.3 Materiais Biodegradáveis	5
Definições	5
Embalagem	7
Esterilização	7
Processamento	8
Biodegradação	8
3.4 Exemplos de Materiais Biodegradáveis	9
Poliglicolídio (PGA)	11
Policaprolactona (PCL)	11
Polilactídio (PLA)	12
Polidioxanona (PDS)	12
Poli(lactídio-co-glicolídio)	13
3.5 Aplicações	14
Aplicações médicas	14
4. Materiais e Métodos	18
4.1 Escolha do Material	18
Copolimerização	19
4.2 Síntese	20

4.3 Caracterização	22
4.4 Degradação	24
Tiroxina	24
Diacetato de Fluoreceína	24
Fabricação de Filmes	26
5. Resultados e Discussão	28
5.1 Síntese	28
Polimerização	29
5.2 Caracterização	30
5.3 Degradação	33
6. Conclusão	35
7. Bibliografia	36

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Propriedades de polímeros biodegradáveis comuns	10
Tabela 2: Composição e características dos copolímeros de l-lactídeo e $\epsilon$ -caprolactona	18
Tabela 3: Massas e Tempos dos Copolímeros	20
Tabela 4: Soluções Tampão	24
Tabela 5: Massa de Fluoreceína	25
Tabela 6: Componentes do filme fino	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Curva genérica de degradação mostrando a relação entre massa molecular, resistência e massa.	9
Figura 2. Síntese de Poliglicolídio	11
Figura 3: Síntese de Policaprotactona	12
Figura 4: Síntese do polidioxanona	13
Figura 5: Síntese do Poli(lactídio-co-glicolídio)	13
Figura 6: Tempo de meia vida do PLA-co-PGA implantado em tecido de rato	13
Figura 7: Protótipo de stent intravascular feito a partir de uma blenda de polilactídio e trimetileno carbonato	16
Figura 8. Módulo de armazenamento dinâmico ( $E''$ ) em função da temperatura dos copolímeros da Tabela 2.	19
Figura 9: Filmes Finos feitos no INCOR	21
Figura 10: Filme poroso com 80x de aumento	23
Figura 11: Filme poroso com 250 X de ganho	23
Figura 12: Ensaio 1 depois de 45 minutos	25
Figura 13: Ensaio 1 depois de 3 horas	26
Figura 14. Esquema das etapas da reação de polimerização	29
Figura 15: Face de fratura aumento 250X	30
Figura 16: Face de fratura aumento 800 X	31
Figura 17: Face de fratura aumento 1000X	31
Figura 18: Face de fratura aumento 2000X	32
Figura 19. Difratoograma típico do copolímero sintetizado	33
Figura 20: Máximos de Fluorescência por tempo	34

## **1. OBJETIVO**

O objetivo do trabalho foi estudar o copolímero poli(lactídeo-co-caprolactona), começando com a sua síntese, caracterização e chegando a um método de estudo de degradação. O estudo foi feito tendo em vista possíveis aplicações do copolímero, principalmente na área médica.

## 2. RESUMO

O objeto de estudo deste trabalho foram os polímeros biodegradáveis, em particular o copolímero poli(lactídeo-caprolactona). O poli(lactídeo) (PLA) chama atenção pela sua resistência mecânica e a poli(caprolactona) (PCL) pela sua flexibilidade. Com a intenção de unir estas duas características importantes, foi feito o estudo da síntese, caracterização e degradação do copolímero estatístico poli(lactídeo-caprolactona).

A primeira parte do trabalho consiste de uma revisão bibliográfica sobre polímeros biodegradáveis. Esta parte foi feita de uma maneira abrangente, incluindo descrições sobre outros polímeros biodegradáveis. Foi dada especial atenção às aplicações médicas, pois este trabalho foi feito em parceria com o Instituto do Coração do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (INCOR).

A segunda parte apresenta todas as atividades experimentais realizadas no Laboratório de Polímeros, no Departamento de Engenharia de Materiais. O capítulo de Materiais e Métodos está subdividido na descrição da síntese do polímero, que detalha como o copolímero foi polimerizado, na caracterização do polímero, que descreve ensaios feitos com o polímero, e por fim procedimentos para a quantificação da degradação, que apresenta ensaios realizados com a intenção de desenvolver um método novo de estudo da degradação do polímero.

A última parte, se chama Resultados e Discussão, o qual está subdividida em três partes: comentários sobre a síntese, discussão da caracterização e análise do método de degradação.

Neste trabalho, foi somente delineado um método de degradação. O desenvolvimento total do ensaio de degradação está em andamento no laboratório de polímeros, uma vez que o ensaio requer longos tempos para obtenção de resultados totais.



## **3. Revisão Bibliográfica**

### ***3.1 Introdução***

O desenvolvimento sustentável é aquele que atende às necessidades do presente sem comprometer a possibilidade das gerações futuras atenderem a suas próprias necessidades. Em seu sentido mais amplo, a estratégia de desenvolvimento sustentável visa promover a harmonia entre os seres humanos e entre a humanidade e a natureza. Uma peça fundamental desta estratégia é a resolução do problema do descarte de polímeros.

Atualmente tenta-se resolver o problema do descarte de polímeros com vários métodos combinados de degradação, como: a biodegradação (tratamento biológico), a fotodegradação (tratamento por meio de luz ultravioleta), a incineração (queima) e a reciclagem (reaproveitamento). A incineração não é muito bem aceita porque a queima de alguns polímeros produz gases tóxicos. A reciclagem a curto prazo parece resolver o problema, porém no Brasil essa metodologia ainda é muito pouco seguida pela população. As pessoas não têm o costume de separar o lixo em recipientes separados, além de existir muito poucas instalações que estão capacitadas a separar os produtos oriundos da coleta seletiva de lixo. A fotodegradação é um fenômeno complexo e mesmo sob condições experimentais semelhantes, diferentes amostras podem levar a diferentes resultados, devido a diferenças no modo de fabricação e conformação.

O método de degradação mais adequado para o futuro do nosso planeta é o da biodegradação, porém exige pesquisa. A indústria petrolífera já vem utilizando a biodegradação, usando bactérias para limpar manchas de petróleo da água do mar.

Muitos esforços foram realizados no passado visando tornar os plásticos mais estáveis e com uma vida útil potencialmente ilimitada. Porém, com a expansão do uso de polímeros e conseqüentemente o aumento no volume dos resíduos surgiu um

problema ecológico grave. Um problema que incentivou a pesquisa de polímeros com propriedades degradáveis. Com isso, materiais plásticos degradáveis pelos diversos mecanismos identificados estão sendo pesquisados e alguns já estão sendo comercializados para aplicações de curta duração. No Brasil, o tema ainda é incipiente e as empresas que primeiro se lançarem à pesquisa e produção desses plásticos poderão ter o aval e incentivo da população e do governo.

### ***3.2 Degradabilidade***

A degradabilidade de um material é a propriedade que mede a capacidade do material polimérico de quebrar as suas ligações primárias da cadeia principal. Em outras palavras a degradabilidade mede a velocidade da mudança da estrutura química e redução da massa molecular.

Um polímero pode ser considerado degradável quando possui na estrutura ou formulação componentes que aceleram sensivelmente as baixas taxas de degradação próprias da cadeia. A degradabilidade é profundamente afetada pelas condições do meio, pela presença de aditivos na formulação e pelo tipo de polímero. Essas variáveis determinam diversos mecanismos (reações) de degradação. De acordo com o mecanismo pode ser classificada em fotodegradação (fotólise e fotoxidação); degradação térmica e por fim biodegradação.

#### **Fotodegradáveis**

Os materiais fotodegradáveis quando sob a ação direta da luz solar ou outra fonte de UV (290 - 360 nm) sofrem reações de degradação. O peso molecular do material normalmente é reduzido e o material torna-se quebradiço e gradualmente o material desintegra-se a pó por ação físico-mecânica externa. Este pó então é assimilado por microrganismos.

## Degradação Térmica

Uma ligação química com energia de ligação abaixo da ligação simples C-C (83 kcal/mol) pode ser instabilizada termicamente e atacada por uma molécula de baixa massa molecular (água, oxigênio, etc.). Polímeros que possuem esta ligação em sua cadeia principal podem sofrer a chamada degradação térmica. Ataques a esta ligação normalmente causam a quebra (cisão) da cadeia principal. Um exemplo deste tipo de degradação é a hidrólise de poliamidas, onde se tem a ruptura da ligação amida CO-NH (70 kcal/mol) com a entrada de uma molécula de água, regenerando os grupos amina e ácido carboxílico originais e a conseqüente cisão da cadeia e redução da massa molecular.

Se além da temperatura também estiver presente cisalhamento, a degradação térmica será do tipo termo-mecânica, ocorrendo a mesma forma de cisão de cadeia, porém de forma preferencial. As cadeias mais longas se enroscam mais durante o cisalhamento, sendo, portanto mais tencionada, favorecendo sua quebra preferencialmente.

## 3.3 Materiais Biodegradáveis

### Definições

*ISO 472 (1988)*: Um plástico designado a sofrer uma mudança significativa em sua estrutura química sob condições ambientais específicas, resultando na alteração de suas propriedades que possam ser comprovadas através de testes padronizados e apropriados aos plásticos, e que seja aplicado por um período de tempo, determinam a sua classificação. A mudança da estrutura química é geralmente resultante da ação natural de microorganismos.

*ASTM Sub-Comitê D20-96*: Plásticos biodegradáveis são materiais plásticos que sofrem rupturas das suas ligações na estrutura polimérica, através de forças químicas, biológicas e/ou física do meio, a uma taxa que resulta na fragmentação ou desintegração dos plásticos.

*Sociedade Japonesa de Plásticos Biodegradáveis*: Plásticos biodegradáveis são materiais poliméricos que são transformados em componentes de menor peso molecular, e pelo menos um dos passos do processo de degradação se dá através da presença de microorganismos naturais.

*DIN 103.2*: Biodegradação de um material plástico é um processo de alteração da estrutura química causada por atividade biológica resultando em produtos finais que ocorrem naturalmente. Um material plástico é chamado de biodegradável se todos os componentes orgânicos sofrem biodegradação total. Condições do meio e taxas de biodegradação devem ser definidas em testes normatizados. Um material plástico é definido como o polímero, os aditivos e o processo.

Os polímeros biodegradáveis são possíveis graças à síntese de ligações instáveis na cadeia principal do polímero. Os grupos funcionais mais comuns com essa característica são os ésteres, aminas, anidridos e orto-ésteres. Estes grupos funcionais, nos casos dos materiais biodegradáveis, formam ligações facilmente quebradas por hidrólise.

As propriedades mecânicas e de biodegradação são determinadas pelo processo de fabricação dos mesmos. Os fatores mais importantes são, a escolha do monômero ou dos monômeros, a proporção dos monômeros, no caso de existir mais de um, a escolha do iniciador e sua quantidade, as condições do processamento e a presença de aditivos. Estes fatores por sua vez influenciam na cristalinidade, temperatura de amolecimento e de transição vítrea, peso molecular, distribuição da sequência (se é estatístico ou em bloco), presença de resíduos de monômero. Por fim, estas características determinam as propriedades mecânicas do polímero assim como sua degradabilidade.

## **Embalagem**

Como os polímeros biodegradáveis são sensíveis a umidade, as embalagens devem ser muito resistentes a permeabilidade da água. Um polímero recém sintetizado em massa, tem um teor de água muito baixo, pois quase toda água é consumida na reação de polimerização. Este polímero deve ser rapidamente embalado e colocado em um freezer. Como a baixa temperatura diminui a velocidade das reações, ela também ameniza os efeitos da umidade presente no polímero. Ao ser reaberto, o polímero deve estar à temperatura ambiente para evitar a condensação.

A embalagem de um produto final biodegradável, como por exemplo um fio de sutura, deve ser feita a vácuo. Dessecante pode ser adicionado para reduzir os efeitos da umidade. Depois de embalado, o produto também pode ser estocado a temperaturas baixas.

## **Esterilização**

Produtos com polímeros biodegradáveis não podem ser esterelizados por autoclave. Estes produtos devem ser esterelizados por radiação gama ou exposição a óxido de etileno (EtO) gasoso. Porém, estes processos também possuem suas desvantagens. Irradiação muito intensa (acima de 2 MRad ou  $2 \times 10^4$  Gy), pode gerar degradação da cadeia polimérica, causando queda no peso molecular, influenciando nas suas propriedades físicas e no seu tempo de degradação. O poliglicolídeo, o polilactídeo e o polidioxanona são muito sensíveis a radiação e normalmente são esterelizadas com EtO ou algum outro mecanismo. O gás EtO é muito tóxico e portanto deve ser verificada a total remoção do gás após a esterilização.

A temperatura e a umidade também devem ser observadas durante a esterilização. Se possível, sempre é melhor manter o polímero abaixo da sua

temperatura de transição vítrea durante a esterilização, para evitar mudança de geometria.

### **Processamento**

Todos os polímeros biodegradáveis conhecidos podem ser processados pelos métodos convencionais, como por exemplo: injeção, compressão e extrusão. Assim como na esterilização, devem ser observadas a temperatura e a umidade. Cuidados especiais devem ser tomados antes, durante e depois do processamento para evitar que o polímero entre em contato com a água.

Como a maioria dos polímeros biodegradáveis de lactídeos é sintetizada por abertura de anel, existe um equilíbrio termodinâmico entre a reação de formação de polímero e a reação de formação de monômero. Temperaturas excessivamente altas durante o processamento podem causar a formação de monômero. Este monômero pode agir como plastificante, mudando as propriedades mecânicas do material ou pode servir como catalizador, aumentando a velocidade de reação de hidrólise, fazendo o material degradar mais rapidamente. Portanto materiais biodegradáveis devem ser processados nas temperaturas mais baixas possíveis.

### **Biodegradação**

Uma vez implantado no corpo humano, o produto biodegradável deve manter as suas propriedades mecânicas por um determinado tempo e depois ser degradada em substâncias mais simples para que o corpo possa descartá-los. A degradação ocorre dentro do corpo humano através da reação de hidrólise. A hidrólise ocorre em duas etapas. Na primeira, água penetra dentro do polímero atacando preferencialmente partes amorfas do polímero. Como são atacadas preferencialmente as partes amorfas, nesta etapa, as propriedades mecânicas do material não são muito afetadas. Na segunda etapa da hidrólise, ocorre o ataque enzimático e metabólico do polímero. O polímero é convertido em fragmentos solúveis em água resultando na erosão do material.

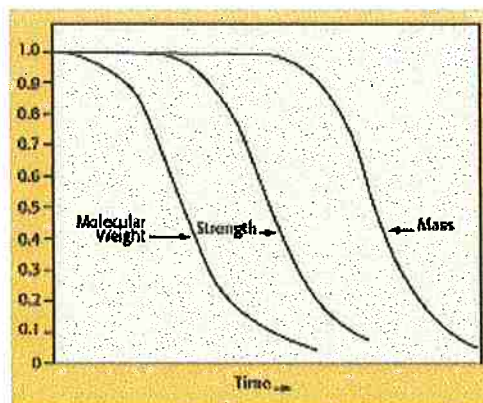


Figura 1: Curva genérica de degradação mostrando a relação entre massa molecular, resistência e massa.

Um outro tipo de biodegradação acontece quando a velocidade de penetração da água não é tão rápida quanto a conversão do polímero em substâncias solúveis em água. Este processo é conhecido como erosão superficial ou bioerosão. Na erosão superficial, o material fica cada vez mais fino, porém o material ainda mantém sua integridade física.

Fatores que influem na velocidade de degradação:

- hidrofiliidade da cadeia principal
- hidrofiliidade dos grupos terminais
- porosidade
- tamanho e geometria do produto final
- presença de aditivos ou impurezas

### ***3.4 Exemplos de Materiais Biodegradáveis***

Polímeros biodegradáveis podem ser naturais ou sintéticos. Geralmente, os sintéticos são mais interessantes do ponto de vista da engenharia, pois as suas propriedades físicas são mais previsíveis e reprodutíveis que as dos naturais.

Tabela 1: Propriedades de polímeros biodegradáveis comuns

Polímero	Ponto de fusão (°C)	Transição Vítrea (°C)	Resistência a Tração (Gpa)	Tempo de Degradação (meses)
PGA	225-230	35-40	7.0	6 a 12
LPLA	173-178	60-65	2.7	>24
DLPLA	Amorfo	55-60	1.9	12 a 16
PCL	58-63	(-65)- (-60)	0.4	>24
PDO	—	(-10)- 0	1.5	6 a 12
PGA-TMC	—	—	2.4	6 a 12
85/15 DLPLG	Amorfo	50-55	2.0	5 a 6
75/25 DLPLG	Amorfo	50-55	2.0	4 a 5
65/35 DLPLG	Amorfo	45-50	2.0	3 a 4
50/50 DLPLG	Amorfo	45-50	2.0	1 a 2

Critérios para a seleção de um material biodegradável para aplicações médicas:

- Possui propriedades mecânicas apropriadas para a aplicação
- Não causa reações inflamatórias ou tóxicas
- É metabolizado pelo corpo sem deixar restos
- É facilmente conformado para a sua forma final
- É facilmente esterilizado sem modificar o polímero
- Possui um tempo de estocagem aceitável

Segue uma lista dos principais polímeros biodegradáveis e uma descrição sucinta:



### *Poliglicolídio (PGA):*

O poliglicolídio é o polímero alifático mais simples. O PGA foi usado para desenvolver o primeiro fio de sutura reabsorvível totalmente sintético. Este produto foi lançado no mercado por volta de 1960 com o nome comercial Dexon. O monômero é sintetizado pelo processo de abertura de anel. O polímero resultante possui um peso molecular relativamente alto, é tem cristalinidade de aproximadamente 45%-55%, além de ter alto ponto de fusão (220°C-225°C) e transição vítrea (35°C-40°C). Devido a sua alta cristalinidade o PGA não é solúvel na maioria dos solventes orgânicos. Fibras de PGA possuem alta resistência e alto módulo de elasticidade, são muito rígidas permitindo o seu uso como fio de sutura e, por isso, os fios fabricados de PGA puro são todos trançados. Os fios de sutura de PGA perdem aproximadamente 50% de sua resistência depois de 2 semanas e 100% de sua resistência após 4 semanas, porém o fio só desaparece por completo após 4-6 meses.

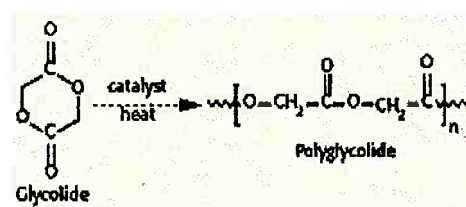


Figura 2. Síntese de Poliglicolídio

### *Policaprolactona (PCL):*

A policaprolactona é sintetizada através do processo de abertura de anel e é usado como um material compatível com tecidos vivos assim como os fios de sutura. O material possui estrutura semicristalina e uma temperatura de amolecimento de 59°-64°C e sua transição vítrea se dá a aproximadamente -60°C. Como o homopolímero tem um tempo de degradação da ordem de 2 anos, copolímeros têm sido criados na tentativa de acelerar a velocidade de biodegradação. Como por exemplo, o copolímero de caprolactona com l-lactídeo que será o objeto de estudo deste trabalho.

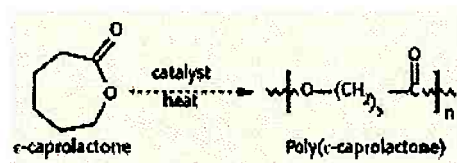


Figura 3: Síntese de Policaprotactona

#### *Polilactídeo (PLA):*

O Lactídeo é um dímero cíclico do ácido láctico que existe como dois isômeros ópticos o d-lactídeo e o l-lactídeo. O l-lactídeo é o isômero que é encontrado na natureza. O homopolímero do l-lactídeo (LPLA) é semicristalino (aproximadamente 37%) e exibe alta resistência a tração e baixa elongação antes da ruptura. O LPLA é mais adequado para aplicações que exigem resistência mecânica como, por exemplo, fios de sutura e implantes ortopédicos. O tempo de degradação do LPLA é relativamente alto, demorando mais de 2 anos para ser absorvido pelo corpo. Outro polímero que também é fabricado é o dl-lactídeo (DLPLA), que é um copolímero sintético do d-lactídeo e o l-lactídeo. O DLPLA é um polímero amorfo e possui menor resistência à tração, porém maior elongação antes da ruptura. Este material se degrada muito mais rápido que o LPLA, sendo assim mais apropriado para dispositivos de liberação controlada de drogas.

#### *Polidioxanona (PDS):*

A polimerização por abertura de anel da p-dioxanona resultou no primeiro fio de sutura sintético com monofilamento, conhecido como PDS. Este material é aproximadamente 55% cristalino, com uma temperatura de transição vítrea de  $-10$  a  $0^{\circ}\text{C}$ . O polímero deve ser processado nas temperaturas mais baixas possíveis para evitar que ele se despolimerize, ou seja volte ao estado de monômero. O polidioxanona não causa reações alérgicas ou tóxicas ao ser implantado. O filamento perde 50% da sua resistência depois de 3 semanas e é absorvido em 6 meses, sendo mais adequado para sutura de aberturas de cicatrização lenta.

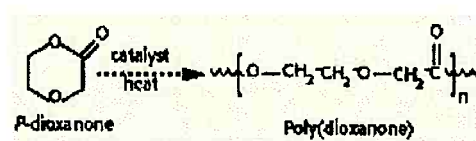


Figura 4: Síntese do polidioxanona

*Poli(lactídeo-co-glicolídeo):*

Para tentar mesclar as propriedades do poli(l-lactídeo) e o poliglicolídeo, foi desenvolvido um copolímero dos dois monômeros. Foi notado, porém, que o tempo de degradação dos copolímeros é menor que qualquer dos homopolímeros (vide figura 6). Isto se deve ao fato do material com 25-70% de glicolídeo ser amorfo, pois estas proporções de material fazem com que a regularidade da cadeia do polímero seja interrompida pelo outro monômero. Um fio de sutura com 90% glicolídeo e 10% l-lactídeo foi desenvolvido pela Ethicon com o nome comercial de Vicryl. Este fio é absorvido pelo corpo em 3-4 meses.

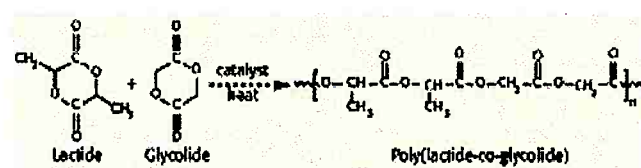


Figura 5: Síntese do Poli(lactídeo-co-glicolídeo)

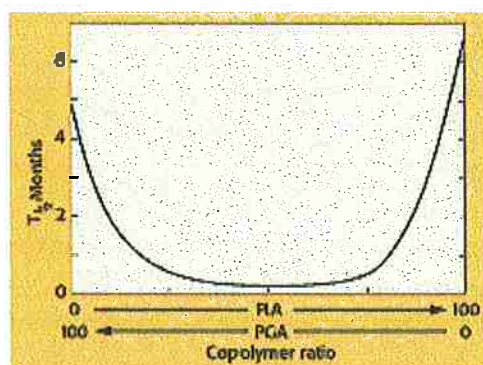


Figura 6: Tempo de meia vida do PLA-co-PGA implantado em tecido de rato

### 3.5 Aplicações

As aplicações de polímeros biodegradáveis podem ser reunidas em duas principais categorias: na medicina e para embalagens. Este trabalho se focará mais nas aplicações médicas, pois o copolímero em estudo tem características mais apropriadas para este tipo de aplicação.

#### Aplicações médicas

As aplicações médicas, pela sua natureza diferenciada, são os tipos de aplicações que mais se desenvolveram para polímeros biodegradáveis. Os plásticos biodegradáveis são usados como fios de sutura, dispositivos para fixação de ossos, dispositivos odontológicos, *stents* e matrizes implantáveis para liberação controlada de drogas. As aplicações médicas exigem que os polímeros sejam esterelizados e que possam ser completamente degradados por reações naturais dentro do corpo humano. Mais recentemente também está sendo estudado o crescimento de células em uma matriz polimérica biodegradável. Esse crescimento tem a intenção de formar tecidos e pode ser feita fora ou dentro do corpo humano.

#### *Fios de sutura:*

Quando um tecido vivo sofre algum dano, seja por acidente ou por cirurgia, ele pode ser capaz de se regenerar sozinho ou não. Para auxiliar no processo de regeneração do tecido, ele pode ser segurado na posição certa através de fios de sutura. Uma vez que a cura está completa, a presença da sutura não é mais necessária e pode implicar em limitações nos tecidos já curados. Por isso o fio deve ser retirado de alguma maneira. Quando as suturas são internas, feitas em tecidos dentro do corpo, isto pode se revelar como um problema adicional.

Historicamente, vêm sendo usado fios de sutura de materiais biodegradáveis naturais, como o fio de tripa bovina. Porém, na década de 60 foram desenvolvidas as suturas sintéticas absorvíveis que hoje em dia são amplamente usadas.

Os fios de sutura sintéticos podem ser divididos em trançados ou monofilamentosos. Os trançados são de mais fácil manuseio porém apresentam maior arraste contra o tecido. Por isso os monofilamentosos são usados para aplicações especiais como por exemplo cirurgias cardiovasculares ou neurológicas. O PGA e PLA são muito rígidos e inflexíveis para serem usados como suturas monofilamentosas. A polidioxanonas e os poligliconatos são mais flexíveis e podem ser usados como suturas de monofilamento.

#### *Dispositivos de fixação de ossos:*

Da mesma maneira que é feita a junção de tecidos por fios de sutura, os ossos, quando danificados, também precisam ser juntados de alguma maneira. Tradicionalmente, tem sido usada a fixação por metais para fixar ossos fraturados. Com a cura do osso, os dispositivos de fixação precisavam ser retirados, causando perigo de refratura.

Implantes biodegradáveis reproduzem o efeito dinâmico da cura transferindo a tensão lentamente do implante para o osso. Na medida em que o polímero se degrada, ele vai perdendo a sua resistência e a carga é passada para o osso. Enquanto o osso é regenerado, ele vai sendo cada vez mais solicitado até que o implante desapareça por completo. Outra vantagem do implante biodegradável é a eliminação da necessidade de uma segunda cirurgia para retirar o material.

#### *Sistemas de liberação de drogas:*

Materiais biodegradáveis podem acomodar quantidades relativamente altas de drogas e podem ser implantados dentro do corpo humano. Estes implantes, se projetados corretamente, podem liberar a droga de maneira controlada e constante.

Esta técnica é muito útil no caso de drogas instáveis, que tenham uma faixa terapêutica muito estreita, que possuam problemas de solubilidade ou que precisem ser administradas em locais específicos dentro do corpo.

A distribuição de drogas por implantes biodegradáveis segue modelos matemáticos que levam em conta vários fatores. A proporção de drogas, a quantidade de poros e a geometria do implante são alguns exemplos de fatores que afetam a velocidade de liberação da droga. O PLA-co-PCL, o PLA e o PGL são alguns dos polímeros biodegradáveis mais usados para este tipo de aplicação.

#### *Stents:*

Um *stent* é uma armação feita de fios, usado para deixar aberto uma artéria depois de feito uma angioplastia. O *stent* tem um diâmetro reduzido e é expandido quando chega na área bloqueada. O mecanismo ajuda a circulação de sangue e alivia problemas cardiovasculares. Os *stents* são feitos normalmente de fios de aço inox e permanecem no corpo permanentemente. Um problema normalmente encontrado é que a artéria muitas vezes volta a se fechar. Para evitar este tipo de problema, é comum pacientes tomarem medicamentos para que o sangue fique menos viscoso.

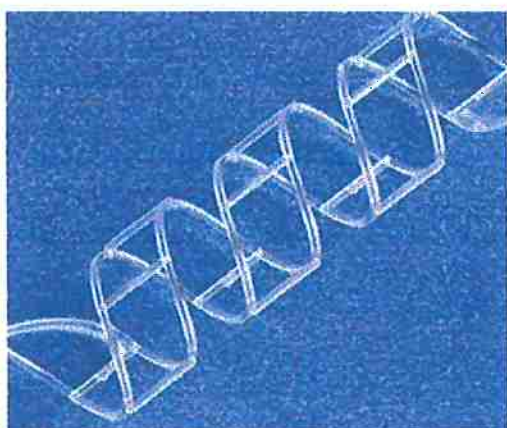


Figura 7: Protótipo de stent intravascular feito a partir de uma blenda de polilactídeo e poli(trimetileno carbonato). Foto: Cordis Corp. Protótipo moldado pela Tesco Associates, Inc.

*Stents* feitos de polímeros biodegradáveis estão sendo desenvolvidos para evitar problemas de fechamento ou inflamação. O *stent* deve permanecer na artéria

por dois anos antes de desaparecer. Drogas podem ser adicionadas para a liberação ao mesmo tempo em que o *stent* é degradado.

#### *Engenharia de Tecidos:*

Uma das aplicações mais recentes para polímeros biodegradáveis é no crescimento de células. Os polímeros biodegradáveis são usados como um suporte para o crescimento de células e regeneração de tecidos. Para este tipo de aplicação é muito importante o controle da porosidade e da afinidade da superfície com água. As propriedades mecânicas do material precisam ser compatíveis com a do tecido. O polímero pode ser usado como suporte para o crescimento de células *in vitro* ou também pode ser implantado no corpo. Aditivos podem ser adicionados no polímero para ajudar no crescimento do tecido. Um exemplo é a adição de fosfato de cálcio para implantes de osso.

Em um futuro próximo poderíamos ter o cultivo de órgão em laboratório para serem depois implantados. Retirando um pouco das células do próprio paciente, seriam implantadas em um suporte de polímero biodegradável. As células iriam crescer ao mesmo tempo em que o polímero iria desaparecer. Ao final do procedimento teríamos um órgão totalmente novo sem o risco de rejeição do paciente.

## 4. Materiais e Métodos

### 4.1 Escolha do Material

A síntese do copolímero foi feita pelo mecanismo de copolimerização. Foi utilizados os monômeros l-lactídeo e  $\epsilon$ -caprolactona, assim como catalisador octanoato de estanho Sn(II)Oct. Dependendo das proporções destes três componentes o polímero resultante tem propriedades muito diferentes. Em trabalho anterior realizado pela Doutoranda Maria Leonora de Castro (PMT/EPUSP) foram sintetizados e caracterizados copolímeros contendo proporções diferentes dos dois comonômeros. Foram sintetizados 10 amostras, variando a quantidade de l-lactídeo e  $\epsilon$ -caprolactona no reator, desde 10% LL até 90% com passo de 10%, assim como os dois homopolímeros, um de LL e outro de  $\epsilon$ -CL.

Tabela 2:

Composição e características dos copolímeros de l-lactídeo e  $\epsilon$ -caprolactona

Amostra	% em peso na Alimentação	% em peso de lactídeo	Massa molar Mw	MWD	Cristalinidade %	Tg °C
1	0	0	103000	1,49	39	-60
2	10	15,0	52400	1,54	33,3	-29,0
3	20	40,5	32000	1,51	24,9	-13,3
4	30	55,2	21800	1,43	13,2	-11,7
5	40	76,2	24700	1,39	15,3	2,3
6	50	83,0	25800	1,43	28,0	20,2
7	60	90,2	22100	1,49	33,3	62,3
8	70	95,8	19800	1,52	37,3	63,5
9	80	97,9	21400	1,51	37,3	65
10	90	100	23700	1,51	37,3	65
11	100	100	23700	1,51	37,3	65



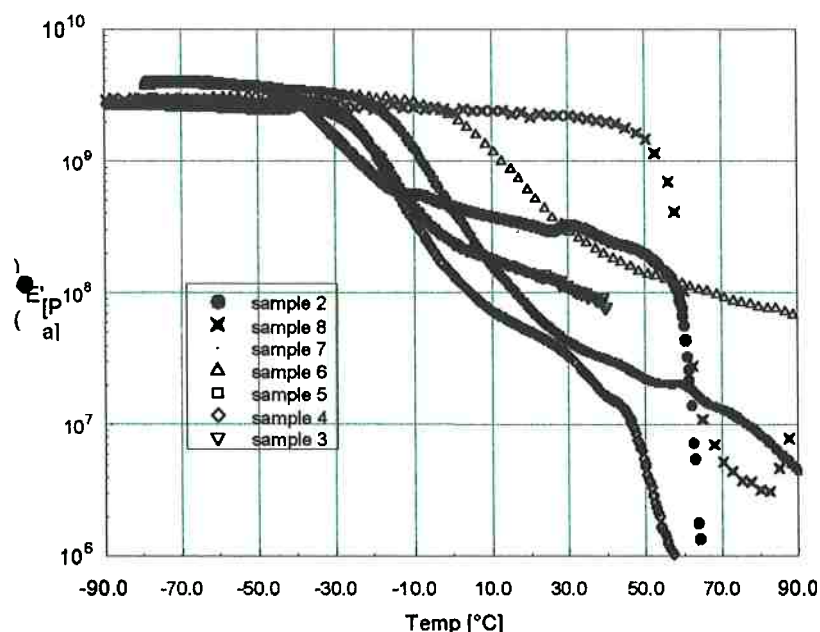


Figura 8. Módulo de armazenamento dinâmico ( $E'$ ) em função da temperatura dos copolímeros da Tabela 2.

Os estudos sistemáticos anteriores permitiram a escolha do sistema polimérico a ser estudado para a preparação de elastômeros biodegradáveis. Como pode ser verificado pela Tabela 2, os copolímeros com teores menores de cristalinidade são obtidos quando as composições dos meros são aproximadamente equivalentes, amostras 4 e 5, uma vez que sendo copolímeros estatísticos, a sua distribuição ao acaso interfere ao máximo na formação de estrutura cristalina na condição equimolar.

Vale ressaltar que a escolha da composição da amostra 5 para este estudo, baseou-se também nas propriedades mecânicas e térmicas verificadas (Figura 8), que mostra uma resistência mecânica superior em toda a faixa de temperatura estudada, comparada com a da amostra 4.

### Copolimerização

A copolimerização é a reação que envolve dois ou mais monômeros diferentes. Dependendo da reatividade entre eles pode-se gerar copolímeros diferentes, como o estatístico, alternados ou em bloco. No caso do PLA e PCL a copolimerização foi realizada na tentativa de mesclar suas propriedades. Para combinar a flexibilidade do PCL e a boa degradabilidade do PLA, foi sintetizado um copolímero estatístico.

Quanto a suas propriedades físicas, um grande problema encontrado nos biopolímeros biodegradáveis é a falta de elasticidade antes da ruptura, tornando o polímero inapropriado para algumas aplicações médicas. O processo de copolimerização deste trabalho visa resolver este problema, pois o PLA gera blocos rígidos enquanto que o PCL cria blocos flexíveis. Controlando a relação PLA/PCL que entra na cadeia do copolímero podemos também controlar as suas propriedades físicas.

## ***4.2 Síntese***

A síntese de copolimerização foi realizada 2 vezes pois da primeira vez o polímero resultante estava com uma aparência muito mole, borrachosa e um pouco pegajosa. Mesmo depois de seco ele estava com esta mesma aparência e escoando ao ser tracionado. Da segunda vez que foi realizada a reação, foi usado um monômero de  $\epsilon$ -caprolactona recém aberto e, portanto muito “seco”. Mesmo assim, para assegurar uma massa molecular alta foram usados metade da concentração inicial de iniciador e o dobro do tempo de reação inicial.

A preparação para a síntese do copolímero foi feita dentro de um “glove-box” com atmosfera de nitrogênio para evitar a entrada de umidade e oxigênio no meio reativo. Os monômeros foram pesados e misturados dentro de um balão, sempre tomando o devido cuidado de colocar a rolha de borracha antes de ser retirado do “glove-box”. À mistura de monômeros foi adicionado o iniciador octanoato de estanho. O iniciador foi medido em volume equivalente à massa necessária (sabendo

que a densidade é de 0,91 g/mL). O balão foi colocado em banho termostático de óleo de silicone sobre placa de aquecimento provido de um misturador magnético. A mistura foi então aquecida a aproximadamente 120°C por 3 horas. Na tabela 3 estão as massas e os tempos exatos tomadas para as reações de polimerização.

Tabela 3: Massas e Tempos dos Copolímeros

	l-lactídeo (g)	$\epsilon$ -caprolactona (g)	Sn (OcT) <sub>2</sub> (g)	Tempo (horas)
Amostra 1	16,98	24,06	0,2	3
Amostra 2	17,56	25,96	0,11	6

\*A temperatura de reação manteve-se entre 118°C e 125°C.

Após a reação, a mistura foi deixada a temperatura ambiente para resfriamento. Após o resfriamento a mistura foi dissolvida em clorofórmio até que atingisse a viscosidade apropriada para ser purificada. O processo de purificação foi feito pela precipitação do polímero dissolvido em um não-solvente.

A precipitação foi realizada duas vezes para cada amostra para assegurar que ela estivesse livre de monômero não reagido. Foi usado o hexano gelado como não-solvente; utilizado uma razão de aproximadamente 7 volumes de não-solvente para 1 de polímero dissolvido. A precipitação foi realizada gotejando-se a solução viscosa no não-solvente em agitação magnética. Observou-se que o precipitado ficou no fundo do recipiente e pequena parte dele ficou suspensa. A solução purificada foi colocada na geladeira por um dia, tempo após qual o produto estava todo precipitado.

Depois das duas precipitações o polímero foi submetido a um processo de secagem. Primeiro, ele foi deixado na capela para que o excesso de hexano evaporasse. Depois de dois dias ele foi colocado em uma estufa a vácuo a temperatura ambiente por um dia. Como ainda estava com a aparência muito “mole”, ele foi cortado em pedaços com uma tesoura e colocado de volta à estufa por três dias.

### 4.3 Caracterização

Uma amostra de aproximadamente 2 gramas do polímero foi doada para o INCOR para estudos. Com esta amostra foram feitos vários ensaios, incluindo dois filmes finos. Os dois filmes foram feitos por casting, porém um foi tratado para ficar poroso. Segue fotos dos dois filmes.



Figura 9: Filmes finos feitos no INCOR

O filme fino poroso foi examinado com um microscópio óptico. Percebeu-se que o filme possuía poros em diversas camadas do polímero. A seguir está uma das fotos tiradas no microscópio.

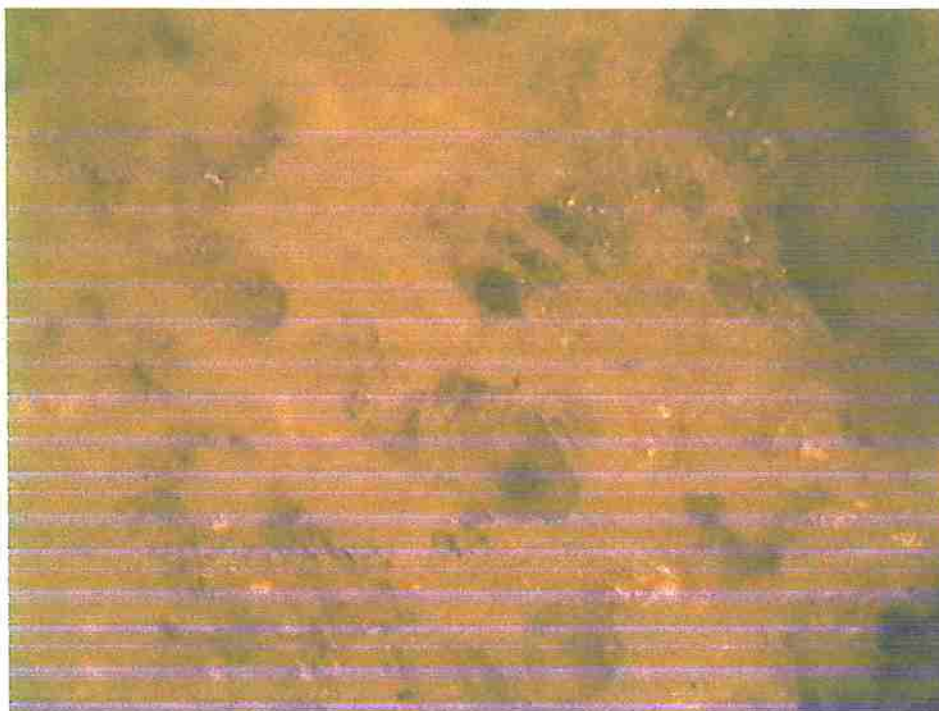


Figura 10: Filme poroso com 80x de aumento

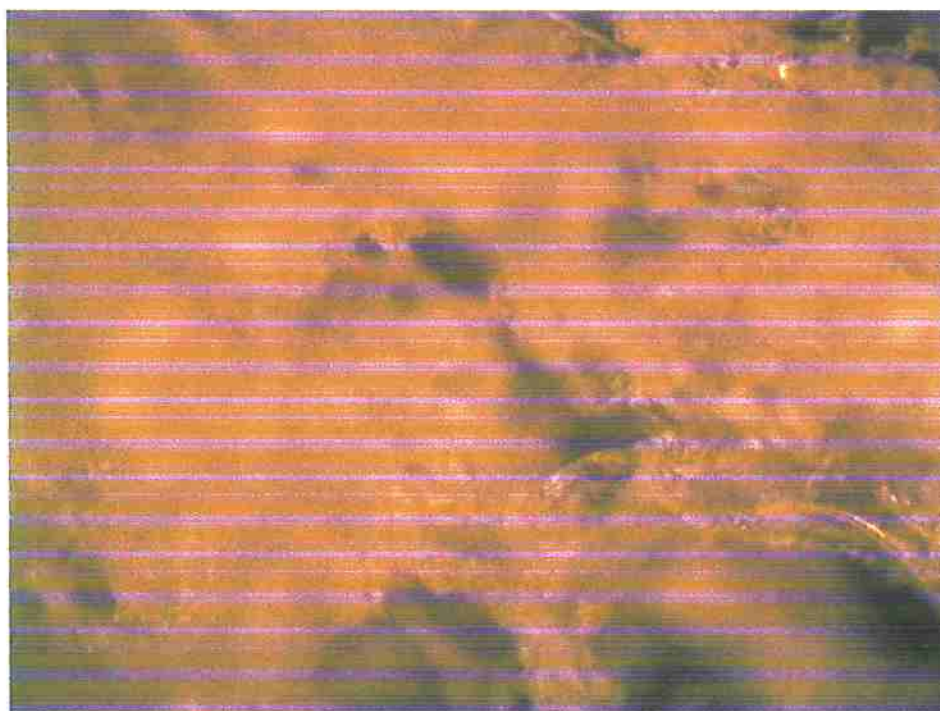


Figura 11: Filme poroso com 250x de aumento

## 4.4 Degradação

### Tiroxina

No início do trabalho tivemos a intenção de escolher um indicador que tivesse algum significado para a medicina. A tiroxina parecia ser uma substância adequada, pois ela poderia ser usada em implantes de liberação controlada. Foram realizados alguns testes para ver se a tiroxina serviria como indicador.

Porém a tiroxina se mostrou muito pouco solúvel em água, além de formar uma espécie de fase líquido-cristalina. Também foi testada a sua solubilidade em soro fisiológico e água destilada com o pH ligeiramente básico. No soro fisiológico (0,9% de NaCl em peso) a tiroxina também demonstrou baixa solubilidade, porém não houve formação da fase líquido-cristalina. Para a solução ligeiramente básica foi usado hidróxido de sódio (KOH), em que a tiroxina apresentou maior solubilidade, porém também não atingiu a solubilidade adequada.

### Diacetato de Fluoreceína

O diacetato de fluoreceína foi escolhido como indicador na degradação, pois a sua liberação produz forte coloração fluorescente, que inclusive pode ser observada a olho nu. Ao ser dissolvida em água ela é hidrolizada, formando uma solução verde fluorescente. Foram feitos dois ensaios para medir a sua solubilidade na solução tampão (pH 7,4). Foram preparadas duas soluções tampão de 500 mL, uma para cada ensaio. Foi colocado  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  e  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  em proporções adequadas em um balão volumétrico e depois completado com água destilada. As quantidades exatas usadas para cada solução estão na tabela a seguir.

Tabela 4: Soluções Tampão

	$\text{KH}_2\text{PO}_4$ (g)	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (g)	pH
Solução 1	0,893	3,801	7,65
Solução 2	0,898	3,790	7,46

Após prontas as soluções , foram medidos os pH's das soluções tampão e preparadas as soluções contendo aproximadamente  $10^{-5}$  M de diacetato de fluoreceína. As soluções de fluoreceína foram preparadas em balões de 200 mL. Na primeira solução a fluoreceína foi adicionada diretamente na solução, enquanto que na segunda solução, a fluoreceína foi dissolvida antes com algumas gotas de THF. Os valores exatos das soluções estão na tabela a seguir.

Tabela 5: Massa de Fluoreceína

	Fluoreceína (g)
Ensaio 1	0,0086
Ensaio 2	0,0085

\*A Fluoreceína foi dissolvida com THF no ensaio 2

Foram feitos análises por espectrometria de fluorescência no ultravioleta-visível para acompanhar a reação de hidrólise. Os resultados estão mostrados a seguir:

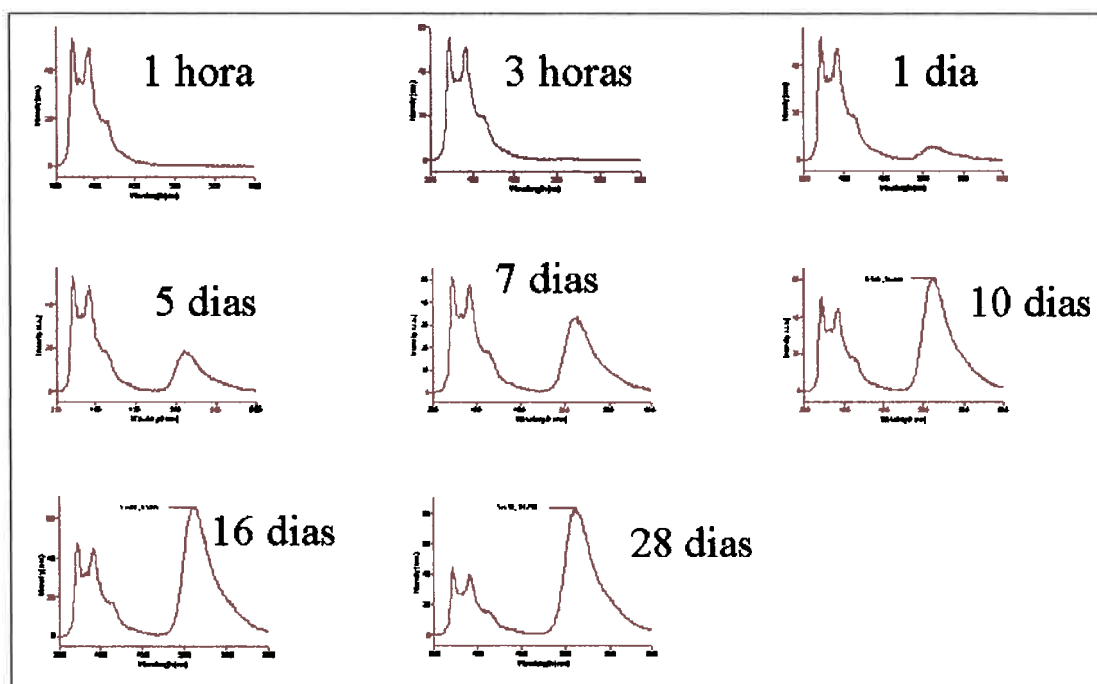


Figura 12: Fluorescências do Ensaio 1

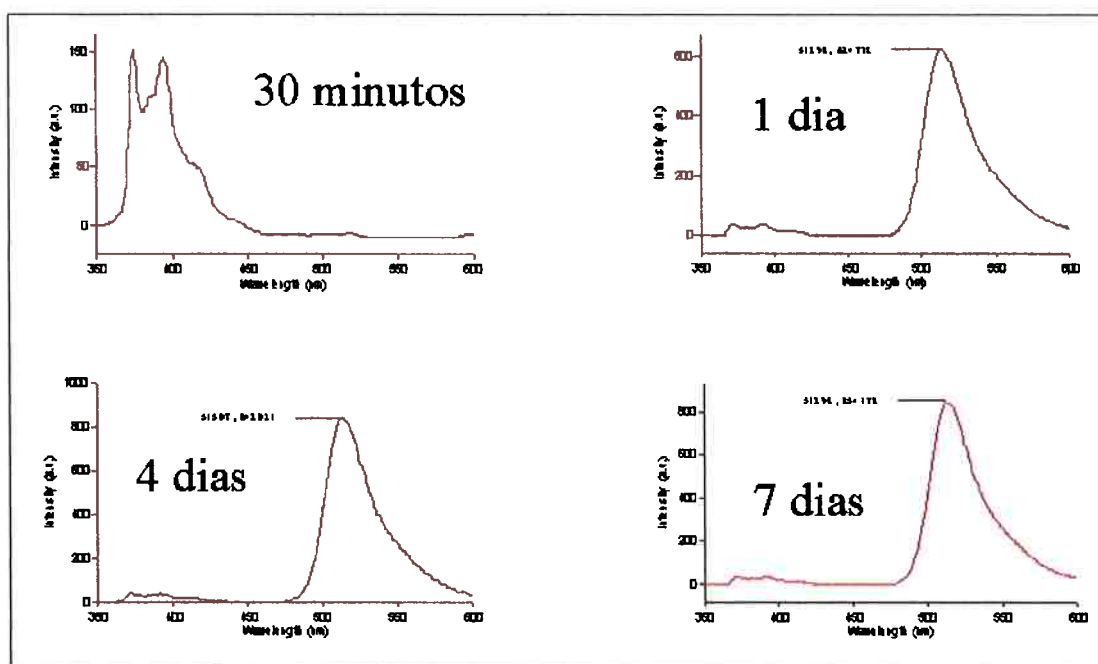


Figura 13: Fluorescências do Ensaio 2

### Fabricação de Filmes

Um filme fino foi fabricado com a intenção de estudar a sua degradação. O filme foi fabricado por casting a partir do polímero. Foi pesado uma certa quantidade de polímero e este foi dissolvido em THF até atingir uma viscosidade apropriada. Uma certa quantidade de diacetato de fluoreceína foi adicionada a mistura (aproximadamente 0,1% em peso). As quantidades exatas estão na tabela a seguir.

Tabela 6: Componentes do filme fino

Componente	Massa (g)
Polímero	4,0602
Diacetato de Fluoreceína	0,0041

A mistura foi então vasada em uma placa de petri e tampada com a outra placa. A placa de tampa tem a intenção de evitar que o THF se evapore muito rapidamente, formando bolhas no polímero. O conjunto de placas foi colocado em cima de uma superfície plana nivelada em uma atmosfera seca e esperou-se que o



THF evaporasse lentamente. Depois de quase todo o THF evaporar (4 dias), o polímero ficou com a aparência de um filme rígido e transparente. O filme foi então colocado em uma estufa a vácuo a temperatura de 40°C por um dia para ter certeza que o polímero estava livre de THF.

## 5 Resultados e Discussão

### 5.1 Síntese

Como foi dito anteriormente, a primeira amostra estava muito mole e borrachoso, com propriedades mecânicas impróprias para uso na medicina. O polímero provavelmente estava com aquela aparência porque estava com uma massa molecular muito baixa. Uma hipótese da razão disso é de que o lactídeo estava muito úmido e muitos anéis estavam abertos. Anéis abertos começam a reação juntamente com o iniciador pois os anéis tem terminação de álcool (OH) (vide Figura 24). Portanto como foram iniciadas muitas cadeias poliméricas, a massa molecular ficou muito baixa.

Com a intenção de aumentar a massa molecular do copolímero foi utilizado o dobro do tempo de reação e metade de iniciador na segunda amostra. O polímero resultante ficou muito mais duro, com propriedades elastoméricas. O tempo de 6 horas de reação provavelmente foi exageradamente longo pois depois de aproximadamente 3 horas não houve nenhuma mudança visível quanto à cor e a viscosidade do polímero. Portanto a elevação da massa molar provavelmente foi devido ao uso de um monômero mais seco, ou seja com menos anéis abertos, e também a menor quantidade de iniciador.

A precipitação foi realizada com hexano gelado, porém como a precipitação durava mais de uma hora o hexano já estava a temperatura ambiente no final. Portanto a estratégia não foi completamente efetiva, uma vez que a baixa temperatura não foi mantida durante todo o processo de precipitação. Também foi experimentado metanol como não-solvente, mas percebeu-se que o metanol ficava com a aparência leitosa provavelmente devido a formação de partículas finas.

## Polimerização

A polimerização foi feita em massa pelo processo de abertura de anel. A polimerização em massa é aquela onde aos monômeros é adicionado somente o iniciador. A grande vantagem deste tipo de polimerização é a qualidade do produto final, que é livre de qualquer impureza. Por outro lado, sua desvantagem é a dificuldade de controlar a temperatura, pois sendo a reação de polimerização exotérmica, podem ser gerados pontos quentes dentro do reator. Uma temperatura muito elevada pode levar a instabilidade no crescimento da cadeia aumentando a velocidade de término. A morte prematura das cadeias leva à formação de um polímero com uma distribuição larga de massa molecular. Neste trabalho, a presença de pontos quentes não foi controlada pois a temperatura de reação foi medida no banho de silicone e não no meio reativo.

A polimerização por abertura de anel consiste na ativação do éster-carbonila do monômero cíclico com um catalisador. Estes catalisadores são normalmente compostos orgânicos de metais tais como o estanho, alumínio, ítrio, ferro ou zinco. Estes metais ativos são preferencialmente utilizados devido a sua baixa toxidez. O iniciador (ou catalisador) di(2-etil-hexanoato) de estanho (II) ( $\text{Sn}(\text{Oct})_2$ ) escolhido neste trabalho devido à sua aceitação em biomateriais.

Um esquema da polimerização por abertura de anel está mostrada a seguir:

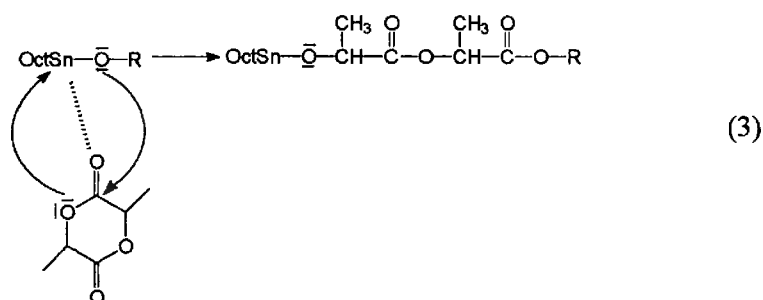
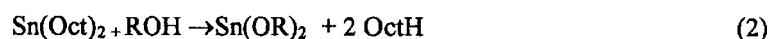
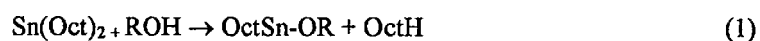


Figura 14. Esquema das etapas da reação de polimerização

## 5.2 Caracterização

Foi preparada uma amostra do polímero da segunda polimerização (de maior massa molecular) por prensa a vácuo em uma temperatura de 60°C. Esta amostra foi então imersa em nitrogênio líquido e fraturada. A face da fratura foi fotografada em um microscópio eletrônico de varredura. Não foi possível realizar este ensaio com o polímero da primeira polimerização, pois ele estava muito mole. As fotos estão mostradas a seguir.

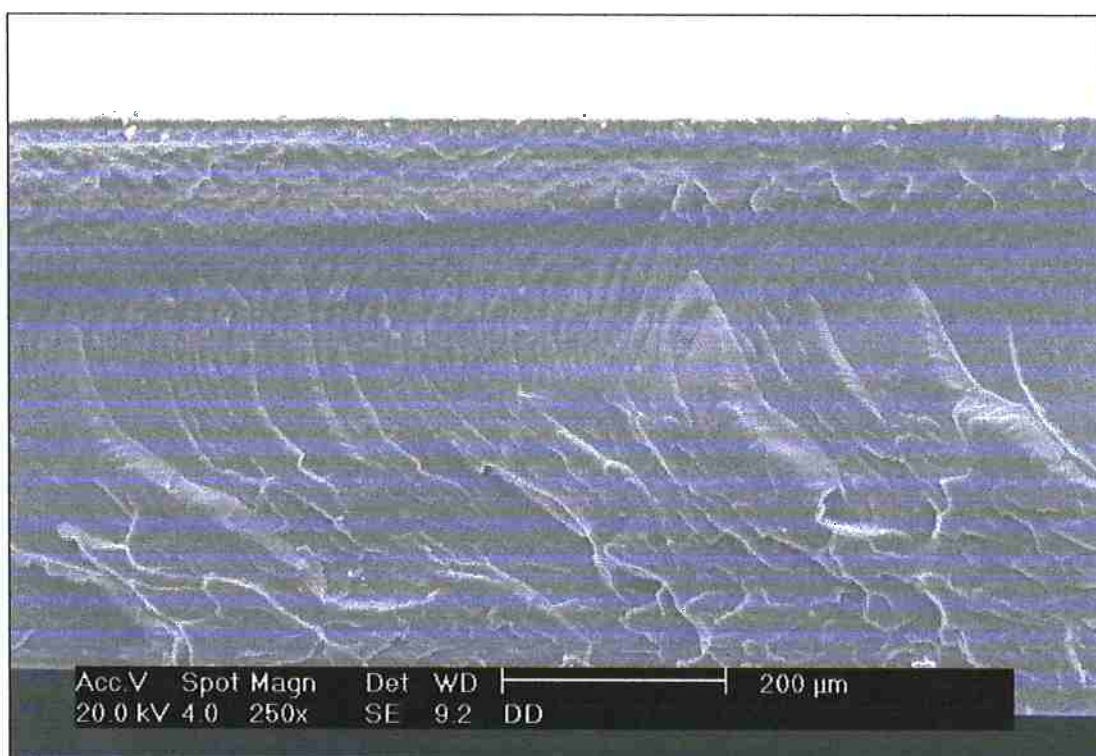


Figura 15: Face de fratura aumento 250x

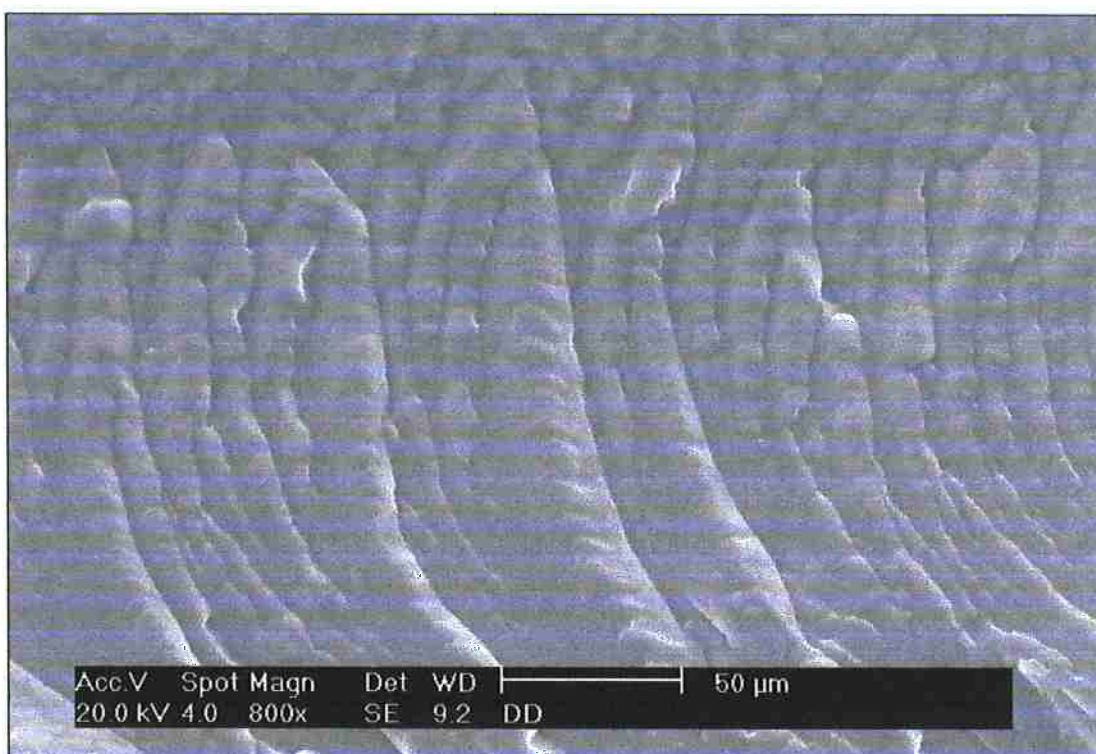


Figura 16: Face de fratura aumento 800 x

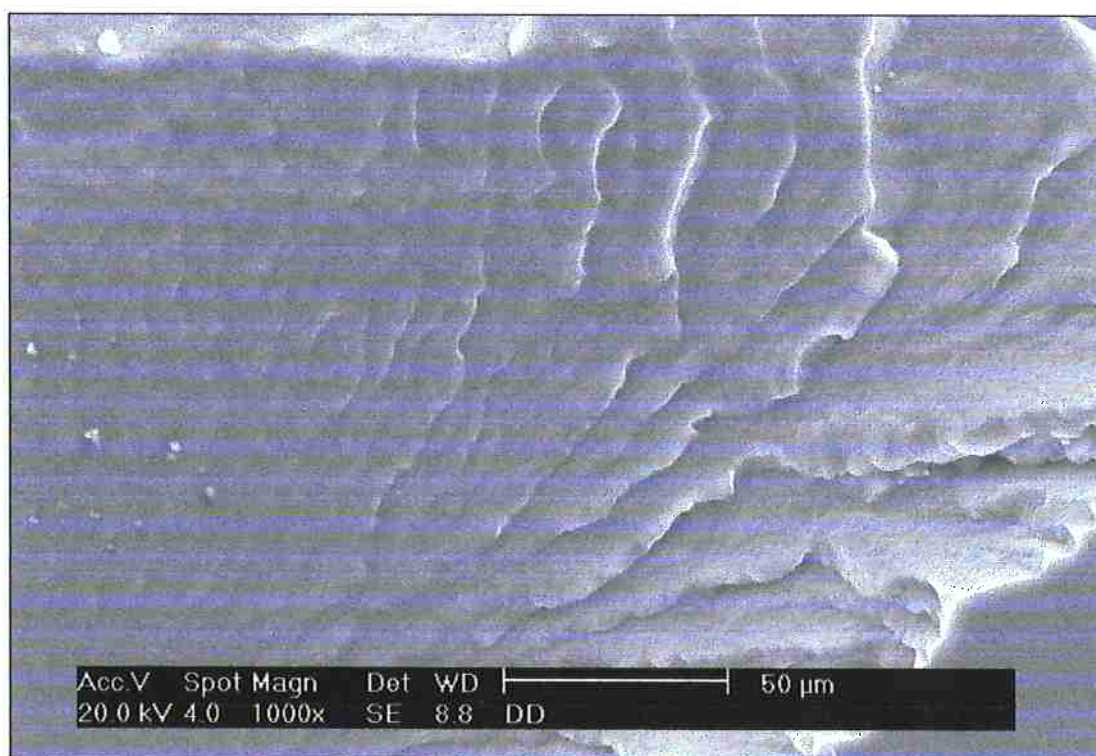


Figura 17: Face de fratura aumento 1000X



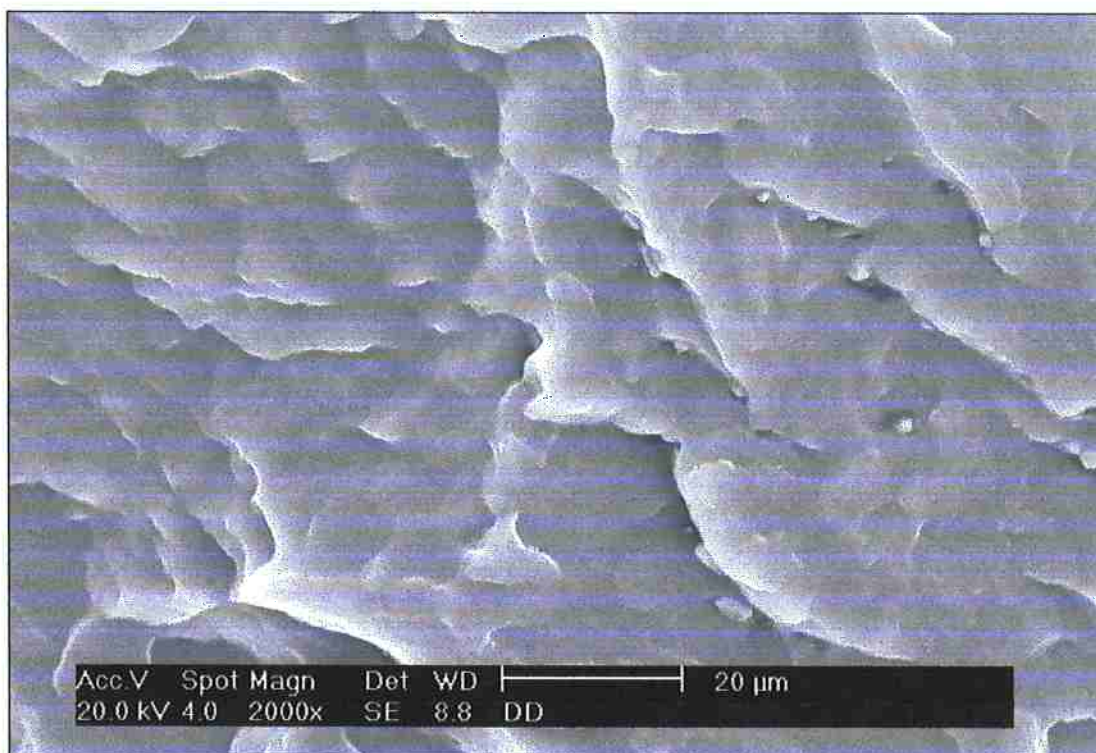


Figura 18: Face de fratura aumento 2000X

É possível ver através das análises MEV que o polímero apresenta homogêneo e não existe descontinuidade na fratura e também pode-se observar que não houve alongamento do material na face da fratura. Portanto, concluímos das fotos de MEV que o polímero é homogêneo e que a fratura foi frágil. Entretanto em aumentos maiores (1000 e 2000x) observa-se uma fase dispersa granulada, que pode ser atribuída a cristalitas observáveis anteriormente por difratometria de raio-X (Tabela 2 e Figura 19).

Os picos de difração observados na Figura 19 são devidos a (a) estrutura cristalina do PCL, assinalados para uma célula unitária ortorrômbica, com os picos principais de difração localizados a  $2\theta$  em  $21,35^\circ$ ,  $21,90^\circ$ , and  $23,75^\circ$  correspondentes aos planos (1 1 0), (2 0 0) e (0 2 0), respectivamente, assim como a (b) estrutura cristalina do PLA, assinalado como uma estrutura pseudoortorrômbica  $\alpha$ , com uma conformação helicoidal das cadeias  $10_3$ , observando-se os principais picos de difração a  $2\theta$  localizados em  $16,5^\circ$  e  $18,9^\circ$ , os quais correspondem aos planos (0 0

10) e (1 0 10), respectivamente. Nesta composição a estrutura cristalina do PLA predomina sobre a do PCL.

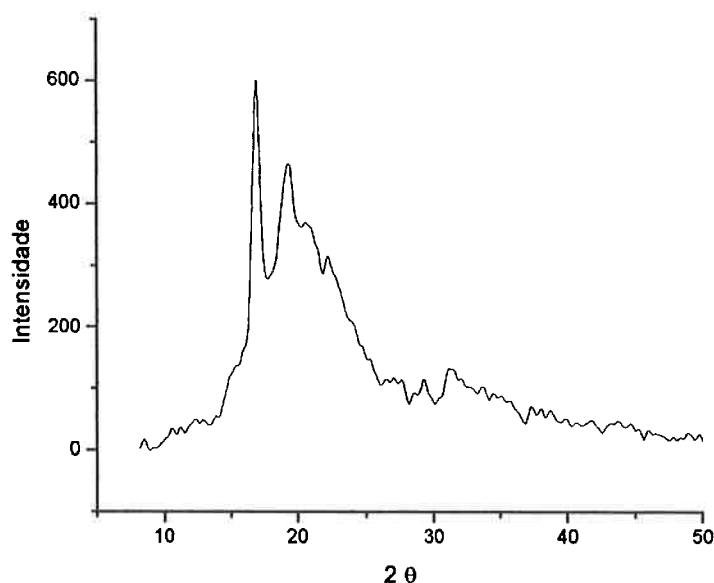


Figura 19. Difratograma típico do copolímero sintetizado

### 5.3 Degradação

A degradação do polímero será estudada através da liberação de um indicador neste caso a fluoreceína. Primeiro foi levantado uma curva de emissão por concentração do indicador. Durante o processo de fabricação do filme, o indicador foi misturado ao material a fluoreceína. O polímero imerso em uma solução tampão de pH 7,4, sofrerá degradação gradativa por hidrólise e a concentração de fluoreceína liberada gradualmente será monitorada por medidas de fluorescência no ultravioleta-visível. Ao longo do tempo serão feitas medidas da solução quanto a sua fluorescência, possibilitando assim sabermos a quantidade de indicador liberado pelo material.

Dos dois ensaios feitos com o diacetato de fluoreceína, somente o segundo foi bem sucedido. No primeiro ensaio, a solução ficou com muita fluoreceína não dissolvida no fundo do balão. Muito pouco do indicador foi dissolvido e hidrolizado.

Isso explica porque foram observados valores tão baixos de fluorescência. Como estava demorando muito tempo para a solução atingir um máximo de fluorescência, foi decidido fazer outro ensaio. A seguir está apresentado os gráficos de fluorescência por tempo.

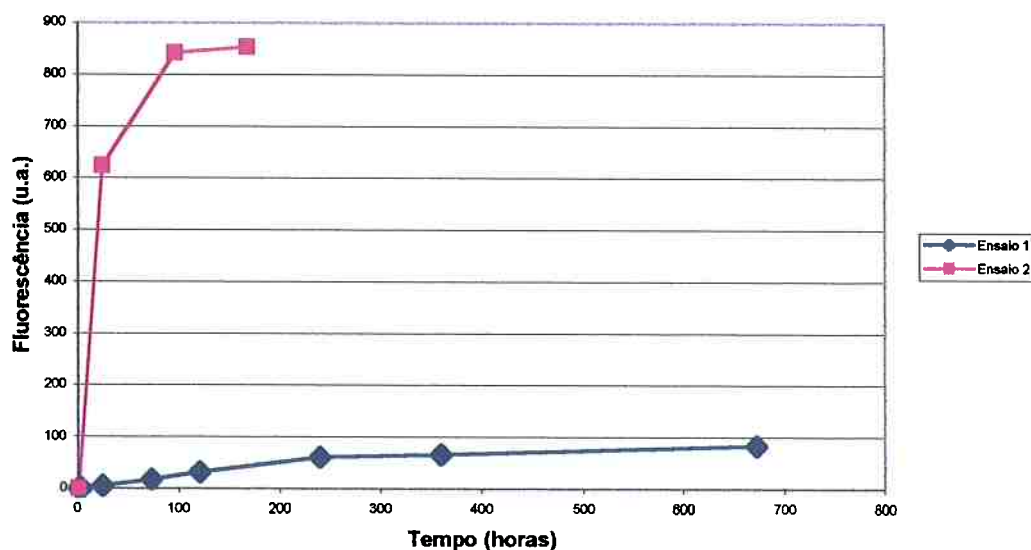


Figura 20: Máximos de Fluorescência por tempo

Neste segundo ensaio, o diacetato de fluoresceína foi primeiro dissolvido em THF antes de ser colocado na solução tampão. O diacetato foi totalmente dissolvido na solução resultante. Esta atingiu um máximo de fluorescência muito mais rapidamente. Em aproximadamente 4 dias, todo o diacetato foi hidrolizado, atingindo um máximo no pico de 515 nm. Com este resultado já seria possível começar os ensaios de degradação do polímero.



## 6 Conclusão

Depois de fazer a pesquisa bibliográfica, ficou claro que os polímeros biodegradáveis são materiais muito recentes e muitas novas aplicações haverão de surgir. Dentre todas as aplicações, as médicas parecem ser as mais promissoras.

Em especial, o poli(l-lactídeo-co- $\epsilon$ -caprolactona) tem apresentado boas propriedades mecânicas para a aplicação médica. Este copolímero, sintetizado em diversas proporções de monômero, resulta em polímeros com propriedades muito variadas. Baseado em trabalhos anteriores conseguiu-se sintetizar um polímero com alta massa molecular e que apresentava comportamento elastomérico e cristalinidade compatível com biomateriais usados na medicina.

Quanto à degradação, foi determinado um procedimento a ser seguido para o seu estudo. Foras escolhidos os materiais adequados e levantadas curvas de calibração para o início do ensaio de degradação. Amostras do polímero já começaram a ser degradadas porém ainda não temos os resultados.

Como resultado geral, concluo que este relatório final do trabalho de formatura possui uma pesquisa bibliográfica bastante abrangente. A parte experimental está com uma descrição muito boa da síntese, análises no MEV e fotos bastante descritivas, um método de estudo de degradação bastante objetivo.

## 7. Bibliografia

1. Shalaby W. S.; *Biomedical Polymers*; Munich, Hansen, 1994.
2. Breitenbach A.; Pistel K.F.; Kissel T.; *Biodegradable comb polyesters. Part II. Erosion and release properties of poly(vinyl alcohol)-g-poly(lactic-co-glycolic acid)*;
3. Qian, Haitao; Bei Jianzhong; Wang, Shenguo; *Synthesis, characterization and degradation of ABA block copolymer of L-lactide and  $\epsilon$ -caprolactone*
4. Canevarolo Jr., Sebastião V. ; *Ciência dos Polímeros*; Artliber Editora
5. [http://www.economiabr.net/economia/3\\_desenvolvimento\\_sustentavel\\_conceito.html](http://www.economiabr.net/economia/3_desenvolvimento_sustentavel_conceito.html)
6. Castro, Maria Leonora; *Relatório de Acompanhamento Capes –2002*.
7. Rosoff, Morton; *Controlled Release of Drugs: Polymer and Aggregate Systems*; V. 1; 1989.
8. Chiellini, Emo; Solaro, Roberto; *Biodegradable Polymers and Plastics*; New York; 2002.
9. [www.cdpoly.com](http://www.cdpoly.com)
10. Merck; *Tablas para el Laboratorio*.
11. Marlin, M.; Hiljanen-Vainio, M.; Karjalainen, T.; Seppälä; *Biodegradable Lactone Copolymers. II. Hydrolytic Study of  $\epsilon$ -Caprolactone and Lactic Copolymers*; Journal of Applied Polymer Science; Vol. 59, 1996.

12. Drumond, Walker S.; Wang, Shu Hui; *Síntese e Caracterização do Copolímero Poli(Ácido Lático-B-Glicol Etilênico)*; Polímeros: Ciência e Tecnologia; Vol. 14; nº 2; p. 74-79; 2004.
13. Ahola, N.; Rich, J; Karjalainen, T.; Seppälä; *Release of Ibuprofen from Poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-d,l-lactide) and Simulation of the Release*; Journal of Applied Polymer Science; Vol. 88, 2003.
14. <http://www.luizmello.eng.br/5.htm>
15. <http://www.probes.com/handbook/sections/0001.html>
16. Li, Shuming; *Hydrolytic Degradation Characteristics of Aliphatic Polyesters Derived from Lactic and Glycolic Acids*; Centre de Recherche sur les Biopolymères Artificiels; Faculté de Pharmacie; France; 1998.
17. <http://www.devicelink.com/mpb/archive/98/03/002.html>
18. <http://www.americanheart.org/presenter.jhtml?identifier=4721>
19. <http://www.howstuffworks.com/news-item118.htm>