

EVALUACIÓN DE LA HEMOCOMPATIBILIDAD DEL ÓXIDO DE TITANIO Y DEL CARBÓN PIROLÍTICO

HEMOCOMPATIBILITY EVALUATION OF TITANIUM OXIDE AND PYROLYTIC CARBON

J. M. Schuster*, C. E. Schvezov, M. R. Rosenberger

Instituto de Materiales de Misiones (IMAM) (UNaM-CONICET), Posadas, Misiones, Argentina.
e-mail: jschuster@fceqyn.unam.edu.ar

Recibido: 13/12/12 – Aprobado: 29/07/13

En este trabajo se evalúa la hemocompatibilidad del carbón pirolítico y del óxido de titanio natural a través del análisis de la tensión interfacial de los mismos con distintas proteínas plasmáticas y con la sangre para poder predecir que proteína tendrá adsorción preferencial sobre el material implantado. Se sabe que el tipo de proteína adsorbida por el material inmediatamente después de su implantación determina si se producirá la adhesión y activación plaquetaria desencadenando la formación de coágulos. Se encontró que el óxido de titanio y el carbón pirolítico adsorben preferencialmente albúmina (que pasiva la superficie) y fibrinógeno (que activa las plaquetas y desencadena la coagulación), respectivamente. La tensión interfacial sangre-material es mayor en el carbón pirolítico, lo cual produce un mayor cambio conformacional de las proteínas adsorbidas. Estos resultados predicen una mejor hemocompatibilidad del óxido de titanio natural frente al carbón pirolítico. El óxido de titanio tiene un alto potencial para ser usado como recubrimiento de prótesis en contacto con la sangre ya que este óxido puede ser modificado y mejorado por diversas técnicas.

Palabras Claves: óxido de titanio, carbón pirolítico, hemocompatibilidad, prótesis cardíacas.

The hemocompatibility of pyrolytic carbon and natural titanium oxide is evaluated through the analysis of the interfacial tension between the material and three plasma proteins and whole blood. This comparison could be used to predict preferential adsorption of the biological tissues on the implanted material. It is known, that platelet adhesion and platelet activation will occur when some types of protein are adsorbed on the material, and the platelets initiate the clotting. It was found that the titanium oxide preferentially adsorbs albumin (which become the surface passive) and the pyrolytic carbon preferentially adsorbs fibrinogen (which activates platelets and initiate the coagulation). The blood-material interface tension is higher in the pyrolytic carbon, which leads to higher conformational change of the adsorbed protein. These results predict a better hemocompatibility of the natural titanium oxide compared to the pyrolytic carbon. For that reason, the titanium oxide has a high potential for being used as coating of the prosthesis in contact with blood and added to the fact that this oxide can be modified and improved by various processing techniques.

Key Word: titaniumoxide, pyrolytic carbon, hemocompatibility, cardiacprosthesis.

I. INTRODUCCIÓN

El carbón pirolítico es un material biomédico bioinerte. Tiene una resistencia a la fractura relativamente alta y un módulo elástico relativamente bajo, así como una alta resistencia al desgaste y a la fatiga. Además, la hemocompatibilidad del carbón pirolítico es mejor que la de muchos los metales y aleaciones. Por estas razones, se ha convertido en el material de elección para la fabricación de válvulas cardíacas mecánicas⁽¹⁾.

Sin embargo, la hemocompatibilidad del carbón pirolítico aún no es satisfactoria. Los pacientes necesitan terapia anticoagulante durante toda la vida, con el riesgo potencial de hemorragias para ellos, especialmente para las mujeres embarazadas⁽²⁾⁽³⁾. En una investigación sobre 8599 pacientes españoles que recibieron terapia de anticoagulante después de la implantación de una válvula cardíaca mecánica monodisco de carbón pirolítico se encontró que alrededor del 14,8% de los primeros pacientes fallecidos murió de hemorragia causado por anticoagulantes⁽⁴⁾.

Este problema ha llevado a los investigadores a desarrollar nuevos materiales. Estudios recientes sugieren que las películas de óxido de titanio son adecuadas como recubrimientos de aplicaciones biomédicas en contacto con la sangre debido a su buena hemocompatibilidad⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾. Sin embargo, su uso clínico requiere una comprensión más completa del porqué de esta propiedad.

La aleación de Ti-6Al-4V ha recibido una atención particular por su alta resistencia mecánica y resistencia a la fatiga en comparación con titanio comercialmente puro⁽⁸⁾. El titanio forma natural y espontáneamente una película de óxido de titanio cuando es expuesto al aire; esta capa de óxido de origen natural es por lo general sólo 2-10 nm de espesor y contiene muchos defectos, sin embargo varios estudios han demostrado que mejorando la calidad y aumentando el espesor del óxido, es posible incrementar significativamente la hemocompatibilidad superficial, independientemente de la composición de la aleación⁽⁸⁾. Por estas razones la aleación Ti-6Al-4V recubierta con óxido de titanio surge como una buena alternativa al carbón pirolítico para la construcción de prótesis cardíacas que se encontrarán en contacto directo con la sangre.

Un material hemocompatible puede considerarse aquel que induce escasa o nula formación de coágulos. En consecuencia, tanto, las plaquetas de la sangre así como la cascada de coagulación de la sangre deben ser mínimamente activadas por la superficie del material⁽⁹⁾. Como la hemocompatibilidad es una propiedad clave en los biomateriales que entran en contacto con la sangre, se ha hecho un gran esfuerzo para mejorar esta propiedad en las prótesis de válvulas cardíacas.

Inmediatamente después de la implantación de la prótesis se produce la interacción de las proteínas plasmáticas con la superficie del material. En cuestión de segundos a minutos, una monocapa de proteína se adsorbe en la superficie. El evento de adsorción de proteínas se produce antes que las células lleguen a la superficie del material, por lo tanto, las células

interactúan principalmente con una capa de proteínas, en lugar de la superficie real del material⁽¹⁰⁾. Por ello, la adsorción inicial de proteínas de la sangre sobre la superficie de material ejerce una gran influencia sobre la adhesión de plaquetas y la posterior activación de las mismas⁽¹¹⁾. El análisis de la interacción entre proteína y material se puede abordar mediante el estudio de la tensión interfacial entre el material en cuestión y las diferentes proteínas plasmáticas, parámetro que nos permite predecir la adsorción preferencial de una u otra proteínas presentes en el plasma sanguíneo⁽¹²⁾⁽⁵⁾.

La albúmina humana (Alb), fibrinógeno humano (Fib) y la γ -globulina (Glo) son proteínas presentes en el plasma sanguíneo⁽¹¹⁾. Se conoce que la adsorción preferencial de la albúmina pasiva la superficie del material y la adsorción preferencial de γ -globulina o fibrinógeno favorece la activación de plaquetas y la coagulación de la sangre. Por lo tanto un parámetro importante para predecir la adhesión de plaquetas y la tendencia a la formación de trombos en un material será la razón de la tensión interfacial albúmina-material entre la tensión interfacial fibrinógeno-material ($\gamma_{Mat.Alb}/\gamma_{Mat.Fib}$), un valor alto de esta razón hace al material más hemocompatible comparado con otro con un valor más bajo⁽¹³⁾.

Por otra parte, una alta tensión interfacial sangre-material ($\gamma_{Mat.Sng}$) da como resultado que las proteínas del plasma adsorbidas se anclen y se adhieran fuertemente a la superficie sólida a fin de reducir la tensión interfacial sólido-líquido, estas proteínas así adsorbidas sufren un cambio conformacional considerable; por el contrario, la tensión superficial interfacial de sangre-material más baja, hace que las proteínas adsorbidas se sometan a una menor distorsión de su configuración nativa⁽¹⁴⁾. El cambio conformacional de las proteínas juega un importante rol en la adhesión y activación de plaquetas (y la subsiguiente formación de trombos), debido a que el cambio conformacional induce la exposición de nuevos sitios de unión para las plaquetas en la molécula de fibrinógeno⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾.

Otro criterio de hemocompatibilidad para un material es el de la estabilidad mecánica de la interface material-sangre. Debido a que los elementos celulares son altamente compatibles con la sangre y su interfase con el medio también es mecánicamente estable, se considera que una tensión interfacial sangre-material de aproximadamente la misma magnitud que la tensión interfacial célula-plasma sanguíneo ($\gamma_{SL} \approx 1-3$ mN/m) proporcionará una superficie con compatibilidad a largo plazo, así como una interfase mecánicamente estable con sangre⁽¹⁷⁾⁽¹²⁾.

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales

Se utilizó la aleación de titanio Ti6Al4V. Se cortaron placas de la aleación de 1 x 2 cm de lado. Luego se dio a cada cara plana una terminación superficial de baja rugosidad, tal superficie se obtuvo por pulido mecánico con lijas de SiC desde #220 a #1500 continuando con pasta de diamante de 1

Tabla I – Valores de la componente polar (γ_{LV}^p) y dispersiva (γ_{LV}^d) de la tensión superficial de los cuatro líquidos usados en este estudio			
Líquido	Componente Dispersiva (γ_{LV}^d en mN/m)	Componente Polar (γ_{LV}^p en mN/m)	Tensión superficial (γ_{LV} en mN/m)
Agua Desionizada	21,8	51	72,8
Etilenglicol	29	19	48
Glicerol	37	26,4	63,4
Dimetilsulfóxido	34,9	8,6	43,5

micrómetro lubricada con etilenglicol, para el pulido final se utilizó un método químico-mecánico utilizando suspensión de sílica de 0,02 micrómetros y H_2O_2 . El material procesado en estas condiciones finaliza con una capa de óxido de Ti de las mismas características que el óxido formado en condiciones naturales.

El carbón pirolítico se obtuvo de una valva de prótesis de válvula cardiaca comercial.

Observación de la superficie

La observación superficial de las probetas se realizó mediante microscopía óptica (microscopio metalográfico de platina invertida).

Rugosidad superficial

Se utilizó un perfilómetro con una resolución de 10 nm usando un filtro RC de contraste de fases utilizando un cut-off de 0,8 mm sobre una longitud (L) de 4 mm. Los valores de la rugosidad (Ra) se calculan de acuerdo a la norma ISO 4287. El valor informado es el promedio de 5 lecturas en diferentes direcciones y sectores de la superficie de la probeta.

Ángulo de contacto y mojabilidad

El ángulo de contacto se define como aquel comprendido entre la superficie del sólido y la tangente a la interfaz líquido-gas en el punto de contacto de las tres fases (líquido-gas-sólido) medido del lado de la fase líquida. El mismo se midió utilizando la técnica de la gota sésil con un goniómetro fabricado en el laboratorio con el que se adquirieron imágenes de las gotas, las cuales se procesaron con el software ImageJ⁽¹⁸⁾. Se midieron los ángulos de contacto de 4 líquidos (agua desionizada, etilenglicol, dimetilsulfóxido y glicerol) en cada material. El ángulo de contacto final es el promedio de los ángulos izquierdo y derecho de cada gota. Antes de cada medición la probeta es lavada con detergente, enjuagada con agua desionizada, alcohol etílico y secada en aire caliente. Se midieron 5 gotas por cada líquido en cada probeta. Durante los ensayos temperatura ambiente fue 25 ± 3 °C.

Cálculo de la energía libre superficial

La energía libre superficial se calculó utilizando el modelo teórico de Owens-Wendt (OW) según la ecuación⁽¹⁹⁾:

$$\gamma_{LV}(1 + \cos \theta) = 2 \sqrt{\gamma_{SV}^d \cdot \gamma_{LV}^d} + 2 \sqrt{\gamma_{SV}^p \cdot \gamma_{LV}^p} \quad (1)$$

linearizando la ecuación 1, y determinando el ángulo de contacto de al menos dos líquidos, podemos obtener las componentes polar (γ_{SV}^p) y dispersiva (γ_{SV}^d) de la energía libre superficial del sólido como la pendiente y la ordenada al origen de la ecuación 2 respectivamente:

$$\frac{0,5 \gamma_{LV} (1 + \cos \theta)}{\sqrt{\gamma_{LV}^d}} = \sqrt{\gamma_{SV}^p} \left(\frac{\gamma_{LV}^p}{\gamma_{LV}^d} \right)^{1/2} + \sqrt{\gamma_{SV}^d} \quad (2)$$

El modelo OW expresa la energía libre superficial del líquido (γ_{LV}) y del sólido (γ_{SV}) como la suma de sus componentes dispersiva y polar:

$$\gamma_{LV} = \gamma_{LV}^d + \gamma_{LV}^p \quad (3) \quad \gamma_{SV} = \gamma_{SV}^d + \gamma_{SV}^p \quad (4)$$

donde la componente dispersiva es debida a las fuerzas de Lifshitz-Van der Waals y la componente polar es debida a los puentes de hidrógeno.

Los valores de las componentes polar y dispersiva de la tensión superficial de los líquidos utilizados se muestran en la tabla I⁽²⁰⁾⁽²⁾.

Cálculo de la tensión interfacial

La tensión interfacial (γ_{ij}) entre las fases condensadas i y j puede ser evaluada por la siguiente ecuación(21):

$$\gamma_{ij} = (\alpha_i - \alpha_j)^2 + (\beta_i - \beta_j)^2 + \Delta_{ij} \quad (5)$$

Se define a α_s y β_s como la componente dispersiva ($\alpha_s = \sqrt{\gamma_s^d}$) y polar ($\beta_s = \sqrt{\gamma_s^p}$) de la superficie respectivamente.

El término Δ_{ij} describe las interacciones de tipo ion-covalente, en este trabajo la interfase esta dominada por interacciones de Van der Waals por lo tanto el término ion covalente puede considerarse insignificante.

Los valores de α_i y β_i para la sangre y proteínas plasmáticas se tomaron de la bibliografía⁽²²⁾⁽²³⁾.

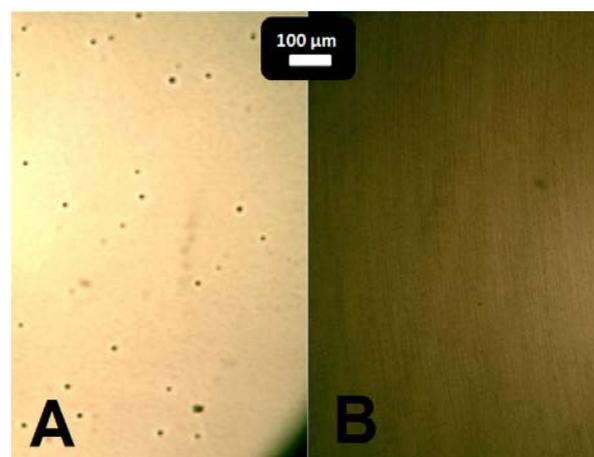


Figura 1. Fotografías de microscopía óptica. A- Titanio recubierto de óxido de titanio natural. B- Carbón pirolítico

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Observación de la superficie

Las imágenes del microscopio óptico de las probetas de titanio y de carbón pirolítico usadas en las determinaciones se muestran en la Figura 1. La probeta de titanio fue pulida hasta obtener una superficie especular de baja rugosidad, sin embargo se observan, en la Figura 1, puntos negros dispersos aisladamente sobre su superficie los cuales pertenecen a porciones de material depositado y fijado a la superficie durante el proceso de pulido mecánico, este material es llamado comúnmente “empaste”. Los puntos negros observados son remanentes del empaste y tienen dimensiones del orden de 10 micrómetros y menores. En el carbón pirolítico se observan líneas de muy poco relieve producto del proceso de fabricación del mismo.

Rugosidad superficial

Se midió la rugosidad en las probetas de ambos materiales y se encontró una menor rugosidad (Ra) en el recubrimiento de óxido de titanio que en el carbón pirolítico. Los resultados se muestran en la Tabla II.

Material	Rugosidad (Ra en nm)
Titanio	39 ±10
Carbón Pirolítico	60 ±10

Ángulos de contacto y mojabilidad

Los ángulos de contacto (mojabilidad) entre el agua y las probetas fueron de 65,7° y 51,4° para las probetas del carbón pirolítico y de óxido de titanio, respectivamente. Por ello, el carbón pirolítico es más hidrofóbico que el óxido de titanio.

Los valores de ángulo de contacto de los distintos líquidos sobre el óxido de titanio y el carbón pirolítico se detallan en la Tabla III.

Líquido	Óxido de Titanio		Carbón Pirolítico		Nro. de gotas
	\bar{X}	DS	\bar{X}	DS	
Agua	51,4°	1,1°	65,7°	1,3°	5
Etilenglicol	36,3°	0,5°	26,0°	1,5°	5
Glicerol	48,5°	1,0°	69,0°	2,1°	5
DMSO	15,5°	0,9°	17,9°	0,9°	5

\bar{X} = media aritmética DS = desvío estándar

Material	Energía Superficial (mN/m)		
	γ_{SV}^d	γ_{SV}^p	γ_{SV}
Óxido de Titanio	16.9	29.9	46.8
Carbón Pirolítico	23.8	14.9	38.7

Energía libre superficial

La Figura 2 muestra la relación entre $\frac{0.5 \gamma_{LV} (1 + \cos \theta)}{\sqrt{\gamma_{LV}^d}}$ y $\left(\frac{\gamma_{LV}^p}{\gamma_{LV}^d}\right)^{1/2}$ para cada material. Del ajuste lineal de esta relación se obtuvo la componente polar (γ_{SV}^p) y dispersiva (γ_{SV}^d) para cada material. La energía libre superficial y sus componentes polar y dispersiva del óxido de titanio y el carbón pirolítico se muestran en la Tabla IV.

Tensión Interfacial

La tensión interfacial de los diferentes materiales y las proteínas plasmáticas se detallan en la Tabla V.

El óxido de titanio tiene una mayor tensión interfacial con la albúmina (2,3 mN/m), seguido de la γ -globulina (2,0 mN/m) y por el fibrinógeno (1,5 mN/m). Esto indica que en esta superficie la albúmina será

Sustancia Biológica	(mN/m) ^{1/2}		Óxido de Titanio ^a		Carbón Pirolítico ^b	
	α_i	β_i	γ_{ij} (mN/m)	$\frac{(\beta_i - \beta_j)^2}{(\alpha_i - \alpha_j)^2}$	γ_{ij} (mN/m)	$\frac{(\beta_i - \beta_j)^2}{(\alpha_i - \alpha_j)^2}$
Fibrinógeno	4,972	6,346	1,5	1,0	6,2	707,3
γ -Globulina	5,428	5,961	2,0	0,1	4,7	14,6
Albúmina	5,602	5,798	2,3	0,1	4,3	7,2
Sangre entera	3,3	6,0	0,9	0,4	7,1	1,8

^a para valores de $\alpha_i = 4,11$ (mN/m)^{1/2} y $\beta_i = 5,46$ (mN/m)^{1/2}
^b para valores de $\alpha_i = 4,87$ (mN/m)^{1/2} y $\beta_i = 3,86$ (mN/m)^{1/2}
 $\frac{(\beta_i - \beta_j)^2}{(\alpha_i - \alpha_j)^2}$ Esta relación indica la proporción de la contribución de la componente polar $(\beta_i - \beta_j)^2$ y dispersiva $(\alpha_i - \alpha_j)^2$ hacia la energía interfacial.

adsorbida preferencialmente.

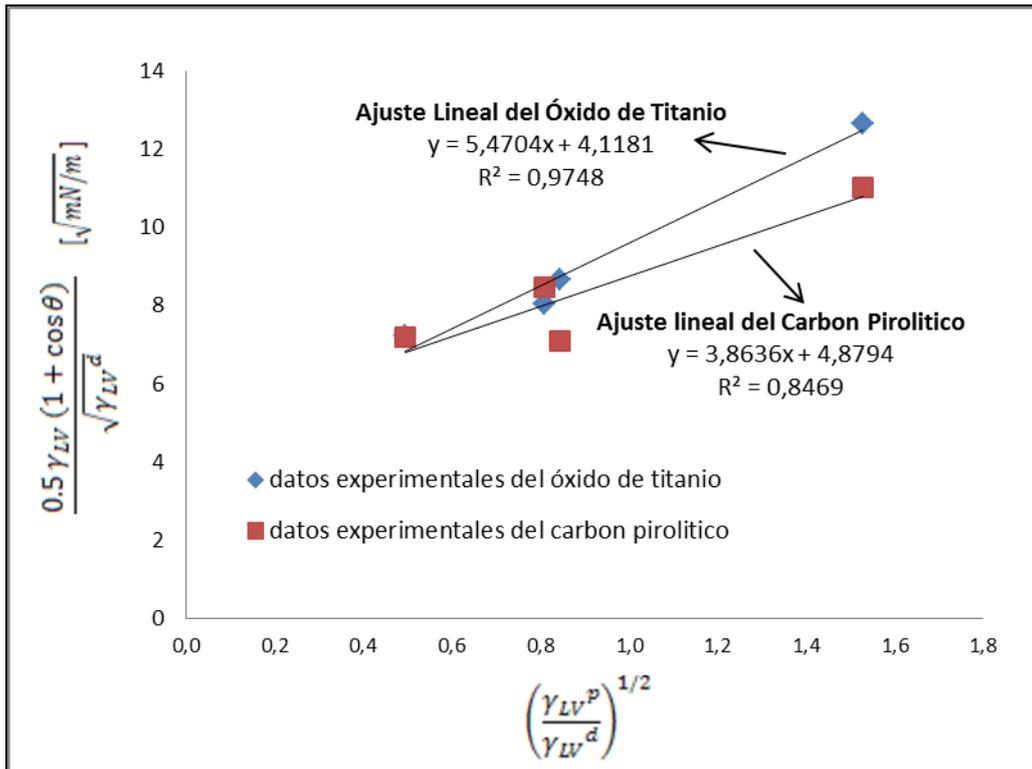


Figura 2. Relación entre $\frac{0.5 \gamma_{LV} (1 + \cos \theta)}{\sqrt{\gamma_{LV}^d}}$ y $\left(\frac{\gamma_{LV}^p}{\gamma_{LV}^d}\right)^{1/2}$ para el óxido de titanio y el carbón pirolítico.

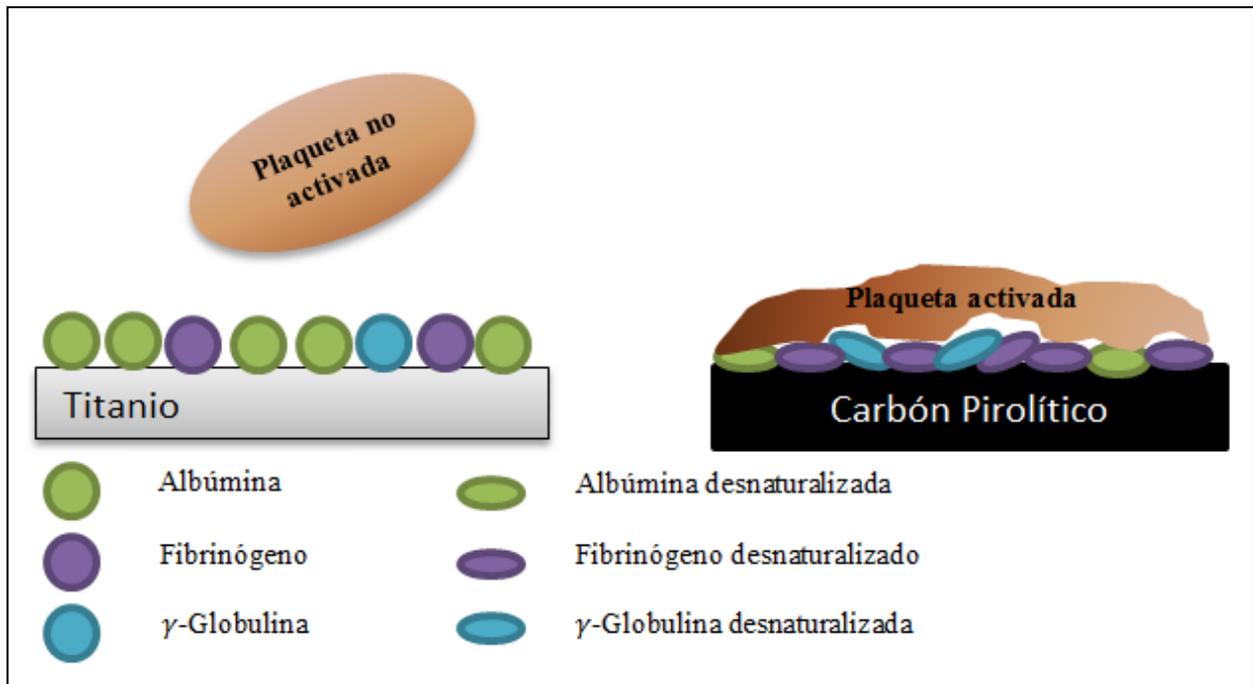


Figura 3. Representación esquemática del supuesto estado adsorción de proteínas plasmáticas y de la adhesión y activación de plaquetas para las superficies analizadas.

El carbón pirolítico tiene una mayor tensión interfacial con el fibrinógeno (6,2 mN/m), seguido de la γ -globulina (4,7 mN/m) y por la albúmina (4,3 mN/m). Esto indica que en esta superficie el fibrinógeno será adsorbido preferencialmente.

Los valores de la razón $\gamma_{Mat.Alb} / \gamma_{Mat.Fib}$ para el óxido de titanio y el carbón pirolítico son 1,542 y 0,691

respectivamente, mostrando el óxido de titanio una mejor hemocompatibilidad que el carbón pirolítico.

La tensión interfacial sangre-material ($\gamma_{Mat.Sng}$) para el óxido de titanio y el carbón pirolítico fue de 0,9 mN/m y 7,1 mN/m respectivamente, lo que predice que el óxido de titanio tendrá una mayor hemocompatibilidad debido a una mayor estabilidad

mecánica de la interface material-sangre que el carbón pirolítico.

En el Figura 3 se hace una representación esquemática del supuesto estado de adsorción de proteínas plasmáticas y de la adhesión y activación de plaquetas para las superficies analizadas. En el caso del recubrimiento de óxido de titanio se espera una adsorción preferencial de proteínas plasmáticas en el orden: albúmina > γ -globulina > fibrinógeno, además de una baja desnaturalización de las proteínas adsorbidas, esto impide la adhesión y activación de plaquetas y la formación de trombos. En el caso del carbón pirolítico se espera una adsorción preferencial de proteínas plasmáticas en el orden: fibrinógeno > γ -globulina > albúmina, además de una alta desnaturalización de las proteínas adsorbidas, esto lleva a la adhesión y activación de plaquetas y la formación de coágulos.

IV. CONCLUSION

Los recubrimientos de óxido de titanio natural tienen una mejor hemocompatibilidad según los análisis de energía interfacial realizados. Las interacciones con las proteínas plasmáticas están minimizadas, y el cambio conformacional de las mismas es muy bajo, además adsorbe preferencialmente a la albúmina que pasiva la superficie del material. En contraste el carbón pirolítico adsorbe preferencialmente el fibrinógeno y γ -globulina que activan las plaquetas y la coagulación de la sangre; además de esto adhiere fuertemente a las proteínas adsorbidas provocando cambios conformacionales en las mismas.

El potencial del óxido de titanio como recubrimiento hemocompatible es alentador ya que este (el natural) se puede mejorar (espesor, estructura cristalina, etc.) a través de diferentes métodos como por ejemplo la oxidación anódica, oxidación térmica y sol-gel.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Laura Vera por las sugerencias sobre el proceso de pulido de titanio y por las discusiones sobre hemocompatibilidad de materiales.

REFERENCIAS

1. Wang, X.; Yu, L.; Li, C.; Zhang, F.; Zheng, Z.; Liu, X. *Colloids and Surface B: Biointerfaces*, 30, 111-121 (2003).
2. Huang, N.; Yang, P.; Leng, Y.X.; Chen, J.Y.; Sun, H.; Wang, J.; G.J. Wang, P.D. Ding; T.F. Xi, Y. Leng. *Biomaterials*, 24, 2177-2187 (2003).
3. Wang, X.; Zhang, F.; Li, C.; Zheng, Z.; Wang, X.; Liu, X.; Chen, A.; Jiang, Z. *Surface and Coatings Technology*, 128, 36-42 (2000).
4. Aris, A.; Igual, A.; Padr, J. M.; Burgos, R.; Vallejo, J. L.; Rabasa, J. M.; Llorens, R.; Casares, J. *The Annals of Thoracic Surgery*, 62, 40-47 (1996).
5. Zhang, L.; Chen, D.; Wang, K.; Yu, F.; Huang, Z.; Pan, S. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 20, 2019-2023 (2009).
6. Yanga, P.; Huanga, H.; Lenga, Y.X.; Chena, J.Y.; Suna, H.; Wanga, J.; Chenb, F.; Chuc, P.K. *Surface and Coatings Technology*, 156, 284-288 (2002).

7. Zhang, F.; Zheng, Z.; Chen, Y.; Liu, X.; Chen, A.; Jiang, Z. *Journal of Biomedical Materials Research*, 42, 128-133 (1998).
8. Bakir, Mohammed. *Journal of Biomaterials Applications*, 27, 3-15 (2012).
9. Maitz, M.F.; Pham, M.; Wieser, E.; Tsyganov, I. *Journal of Biomaterials Applications*, 17, 303-319 (2008).
10. Horbett, T.A.; Ratner, B.D.; Schakenraad, J.M.; Schoen, F.J. Some background concepts, in *Biomaterials Sciences - An Introduction to Materials in Medicine*. B.D. Ratner Ed. Academic Press, 133-199 (1996).
11. Paul, L.; Sharma, C. P. *Journal of Colloid and Interface Science*, 84, 546-549 (1981).
12. Kwok, S.; Wang, J.; Chu, P. *Diamond & Related Materials*, 14, 78-85 (2005).
13. Huang, Y.; Lü, X.; Jingwua, M.; Huang, N. *Applied Surface Science*, 255, 257-259 (2008).
14. Shao, H.; Yu, C.; Xu, X.; Wang, J.; Zhai, R.; Wang, X. *Applied Surface Science*, 257, 1649-1654 (2010).
15. Tomikawa, M.; Iwamoto, M.; Olsson, P.; Sfiderman, S.; Blomblck, B. *Thrombosis Research*, 19, 869-876 (1980).
16. Tanaka, M.; Motomura, T.; Kawada, M.; Anzai, T.; Kasori, Y.; Shiroya, T.; Shimura, K.; Onishi, M.; Mochizuki, A. *Biomaterials*, 21, 1471-1481 (2000).
17. Ruckenstein, E.; Gourisankar, S. V. *Journal of Colloid and Interface Science*, 101 (1984).
18. *Image Processing and Analysis in Java*. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>. [En línea]
19. Owens, D. K.; Wendt, R. C. *Journal of applied polymer science*, 13, 1741-1747 (1969).
20. Hallab, N.J.; Bundy, K.J.; O'Connor, K.; Moses, R.L.; Jacobs, J.J. *Tissue Engineering*, 7, 55-71 (2001).
21. Kaelble, D. H.; Moacanin, Jovan. *Polymer*, 18, 475-482 (1979).
22. Sharma, C. P. *Journal of Colloid and Interface Science*, 97, 585-586 (1984).
23. Agathopoulos, S.; Nikolopoulos, P. *Journal of Biomedical Materials Research*, 29, 421-429 (1995).