

PROPIEDADES BIOLÓGICAS IN VITRO DE POLÍMERO EPOXÍDICO

F. González García^{1*}, María E. Leyva¹, Alvaro A. A. de Queiroz¹, Olga H. Zazuco²

¹ Universidade Federal de Itajubá, Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Física e Química, Laboratório de Biomateriais. Ave. BPS n° 1303. Bairro Pinheirinho, CEP 37500-903, Itajubá, Minas Gerais, MG, Brasil. Correo electrónico: fili@unifei.edu.br

² Centro de Biología Molecular do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

Recibido: Julio 2011; aceptado: Septiembre 2011

RESUMEN

Las interacciones biológicas entre cuatro polímeros epoxídicos formulados usando el monómero del éter diglicidílico del bisfenol A (DGEBA) con cuatro poliaminas alifáticas como comonómeros; dietilenetriamina (DETA), trietilenetetramina (TETA), 1-(2-aminoethyl)piperazina (AEP) e isoforondiamina (IPD) y la sangre fueron estudiadas utilizando cuatro ensayos biológicos "in vitro". El objetivo fue evaluar los daños celulares no específicos (citotoxicidad) y la hemocompatibilidad de la superficie de estos materiales. Los resultados de adsorción de proteínas, adhesión de plaquetas, formación de trombos y citotoxicidad son presentados y discutidos en detalles. Los ensayos de adsorción de proteínas indicaron que la superficie de los cuatro polímeros adsorben más albúmina que fibrinógeno. Los ensayos de adhesión de plaquetas y formación de trombos mostraron que los polímeros formulados con los comonómeros AEP e IPD, que corresponden a poliaminas cicloalifáticas, cumplen mejor con los criterios de hemocompatibilidad y de citotoxicidad exigidos de un biomaterial para implante. Los cuatro polímeros no revelaron toxicidad con las células de ovario de hámster chinés, mostrando una satisfactoria citotoxicidad. De esta manera, consideramos que los polímeros estudiados son materiales biocompatibles.

Palabras claves: polímeros epoxídicos; adsorción proteica; adhesión de plaquetas; citotoxicidad; biocompatibilidad.

ABSTRACT

The biological interactions between four polymers using epoxy monomer diglycidyl ether of bisphenol A (DGEBA) with four aliphatic polyamines as co-monomers, diethylenetriamine (DETA), triethylenetetramine (TETA), 1-(2-aminoethyl)piperazine (AEP) and isophorondiamine (IPD) and blood were studied using four biological assays "in vitro". The objective was to evaluate non-specific cell damage (cytotoxicity) and the hemocompatibility of the surface of these polymers. The results of protein adsorption, platelet adhesion, thrombus formation and cytotoxicity are presented and discussed in details. Studies of proteins adsorption onto polymeric surfaces showed that four epoxy materials adsorbed more albumin than fibrinogen. Studied about platelet adhesion and thrombus formation showed that polymers formulated with co-monomers AEP and IPD, corresponding to cycloaliphatic polyamines, best met the criteria required of hemocompatibility and cytotoxicity of a biomaterial for implantation. The four polymers showed no signs of cytotoxicity to Chinese hamster ovary cells, showing a satisfactory cytocompatibility. This way, we consider that the studied polymers are biocompatible materials.

Keywords: epoxy polymers, protein adsorption, platelet adhesion, cytotoxicity, biocompatibility.

1. INTRODUCCIÓN

A poco más de medio siglo el ser humano viene utilizado, de modo sistemático polímeros sintéticos para la fabricación de biomateriales. La utilización de estos materiales está dirigida a la sustitución de un tejido o de un órgano biológico con la finalidad de aumentar la vida. Los polímeros sintéticos como materiales de la era contemporánea, afectaron profundamente no sólo a las áreas de ingenierías, pues también tuvieron su efecto en la medicina, la biotecnología y en el área farmacéutica. En este sentido, la síntesis de nuevos materiales poliméricos que manifiestan

interacciones favorables con el organismo biológico ha hecho posible la sustitución de órganos dañados irreversiblemente promoviendo, de esta manera, la calidad de vida del paciente. Hoy los poliméricos representan uno de los más importantes tipos de materiales utilizados para biomateriales, los que son utilizados para diferentes aplicaciones médicas [1].

En particular los polímeros epoxídicos constituyen uno de los más importantes tipos de polímeros termoestables utilizados para múltiples aplicaciones de ingeniería. Esto es consecuencia de su elevada resistencia y rigidez, buen comportamiento dieléctrico, resistencia a productos químicos, a la corrosión y a organismos microbiológicos. Además presentan baja contracción durante el proceso de curado, manifiestan buenas características térmicas, así como exhiben excelente adhesión.

Los polímeros epoxídicos presentan amplia diversidad de propiedades en virtud de la existencia de múltiples monómeros epoxídicos y comonómeros los que presentan diferentes grupos funcionales tales como; ácido, anhídrido, amidoamina, amina, tiol etc. Cada sistema particular requiere de un adecuado programa de curado. El programa de curado transforma la mezcla de monómeros en su estado inicial líquido, en un material sólido altamente reticulado con estructura tridimensional e/o de rede. Esta rede está constituida por los segmentos de los monómeros que fueron utilizados para preparar el polímero. Estos materiales presentan grandes potencialidades para ser utilizados en algunas aplicaciones médicas si manifiestan buenas propiedades biológicas y propiedades mecánicas adecuadas.

En relación a las reacciones biológicas de los monómeros usados en las formulaciones epoxídicas está bien establecido en la literatura que presentan reacciones citotóxicas, genotóxicas, carcinogenicas e mutagenicas. Esto está soportado por múltiples estudios usando diferentes ensayos biológicos [2-6]. Por otro lado, estudios anteriores encuentran que algunos monómeros epoxídicos presentan interacciones biológicas favorables. Por ejemplo, un estudio que utiliza ensayos biológicos “*in vitro*” con células humanas diferenciadas demuestra que un compuesto poliepoxídico producido por una compañía francesa (*Elf Aquitaine*) presenta moderada citocompatibilidad [7]. En otro estudio se encuentra que dos éteres epoxídicos (Decanol EX-313 y EX-810, compuestos di y triepoxídico de la glicerina, y compuesto diepoxídico del etilenglicol, respectivamente) son biocompatibles lo que fue demostrado por ensayos biológicos “*in vitro*” e “*in vivo*” [8]. Por otro lado, algunos compuestos diepoxídicos curados los que son utilizados para la modificación de biomateriales exhiben baja citotoxicidad, lo que está apoyado por ensayos biológicos “*in vitro*” y confirmado por ensayos biológicos “*in vivo*” [9].

Polímeros formulados con el oligómero del éter diglicidílico do bisfenol A (DGEBA) han

sido utilizados para preparar materiales compuestos reforzados para aplicaciones en odontología y en ortopedia [10-12]. También polímeros epoxídicos han sido utilizados para la fabricación de válvulas cardiovasculares ventriculares [13], y para prevenir la calcinación de válvulas cardiovasculares bioprotéticas [14]. Sin embargo, en la literatura no existen estudios relacionados con polímeros epoxídicos formulados con el éter diglicidílico del bisfenol A usando comonómeros del tipo poliaminas alifáticas y su interacción con la sangre.

Está bien establecido en la literatura que el desempeño de una prótesis polimérica es perjudicada por la coagulación sanguínea, provocada por el contacto de la sangre con la superficie del material implantado. En este caso, el control de la coagulación sanguínea y de las inflamaciones inducidas por la superficie del polímero puede ser controlado en la interface polímero/tejido biológico [15,16].

El objetivo de este trabajo fue evaluar la citotoxicidad y la hemocompatibilidad de cuatro polímeros epoxídicos usando el monómero del tipo éter diglicidílico del bisfenol A con cuatro comonómeros del tipo poliaminas alifáticas de manera independiente: dietilentriamina, trietilentetramina, 1-(2-aminoethyl)piperazina e isoforondiamina. Para esto fueron realizados ensayos biológicos “*in vitro*” usando culturas de células de mamíferos (ovario de hámster chinés – CHO), y tres bioensayos “*in vitro*” de hemocompatibilidad, respectivamente.

El trabajo está dirigido a la posible utilización de estos materiales para algunas aplicaciones médicas como por ejemplo; para el revestimiento de “*stents*” coronarios de acero inoxidable, los que son utilizados en la intervención coronaria percutánea en el área cardiovascular, y para el revestimiento e/o encapsulado de nano-partículas ferromagnéticas para o tratamiento terapéutico de magneto-hipertermia utilizado para el tratamiento del cáncer.

2. PARTE EXPERIMENTAL

Los polímeros epoxídicos fueron preparados usando el prepolímero del éter diglicidílico del bisfenol A (DGEBA), con cuatro comonómeros del tipo poliaminas alifáticas. Los comonómeros utilizados fueron, dietilentriamina (DETA), trietilentetramina (TETA), 1-(2-aminoethyl) piperazina (AEP) e isoforondiamina (IPD). La Figura 1 muestra la estructura química, procedencia y algunas propiedades de los monómeros utilizados. El monómero epoxídico fue deshidratado cuidadosamente por tratamiento a vacío a 80 °C antes de su utilización. Los comonómeros fueron utilizados como recibidos.

Monómeros	Estructura Química	Fabricante	M g mol ⁻¹	F
Éter diglicidílico del bisfenol A (DGEBA)		Sigma-Aldrich DER 332	340.41	2
Dietilentriamina (DETA)		ACROS Organics (98+%)	103.17	5
Trielentetramina (TETA)		ACROS Organics (60%)	146.24	6
1-(2-Aminoethyl)piperazina (AEP)		ACROS Organics (99+%)	129.21	3
Isoforondiamina (IPD)		ACROS Organics (99+%)	170.30	4

M: masa molecular, F: funcionalidad.

Figura 1. Estructura química y propiedades de los monómeros utilizados.

2.1. Preparación de los polímeros. Todas las formulaciones fueron preparadas utilizando cantidades estequiométricas (razón equivalentes de grupos epoxi/equivalentes de hidrógenos amina, e/a = 1) [17,18]. La formulación recién preparada fue agitada mecánicamente a temperatura ambiente durante 2 minutos para asegurar la homogenización de los monómeros. La mezcla resultante fue tratada a vacío durante 10 min, e introducida en moldes de silicona con dimensiones de (70x14x4) mm, y en moldes cilíndricos de polipropileno con dimensiones de (40 x 12) mm. El programa de curado fue en dos etapas. La primera etapa, 24 horas a temperatura ambiente (25 °C), y la segunda, en condiciones isotérmicas que permiten alcanzar la conversión máxima, lo que fue publicado en trabajos anteriores [19,20]. Posteriormente las piezas; cilindros y placas, fueron retiradas de los moldes, maquinadas a seco para garantizar superficies con caras paralelas, con dimensiones de (10x3) mm, y de (12x12x3) mm, respectivamente. Para los ensayos biológicos la superficie de una de las caras de las placas, y dos caras de los cilindros, (12x12) mm, y 10 mm (diámetro), respectivamente fueron pulidas cuidadosamente, lavadas con solución fisiológica salina (0,1 M, NaCl) y esterilizadas por radiación de rayos gama en una dosis de 25 kGy.

2.2. Ensayos biológicos. Ensayos “*in vitro*” de compatibilidad entre los polímeros totalmente curados y la sangre fueron realizados usando cuatro bioensayos: adsorción proteica, adhesión de plaquetas, formación de trombos y citotoxicidad. Estos ensayos son sensibles, reproducibles y cuantitativos, los que pueden ser utilizados para verificar la compatibilidad con la sangre y la citotoxicidad de los materiales preparados. Este tipo de ensayos presentan como ventaja que es obtenida información del comportamiento biológico en relativamente corto período de tiempo, sin el sacrificio de animales de experimentación. Los ensayos biológicos realizados en este trabajo fueron realizados por triplicado para cada material.

Los ensayos de adsorción proteica, adhesión de plaquetas y formación de trombos fueron realizados de acuerdo con la metodología publicada en un trabajo anterior [21]. El ensayo de citotoxicidad fue realizado de acuerdo con la norma ISO 10993 [22].

2.2.1. Adsorción proteica. En este trabajo fueron seleccionadas dos proteínas séricas, albúmina humana (HSA) y fibrinógeno humano (HFb). La albúmina humana resulta una proteína predominante en la sangre, excediendo en abundancia con el resto de las proteínas del plasma [23]. Soluciones de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de HSA (*Aldrich* 99% de pureza) y $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de HFb (*Aldrich* 99% de pureza) fueron preparadas separadamente en solución acuosa a pH 7,2 y fuerza iónica de 0,01 M (PBS). Las muestras de polímeros tratadas fueron colocadas en tubos de *Teflon*® con un volumen de la solución (PBS) de 6 mL durante dos horas, a 37 °C. La cantidad de proteína adsorbida fue determinada por espectroscopía UV/VIS usando un espectrofotómetro (*Cary 50, Varian*) por la diferencia entre la concentración de HSA y HFb antes y después del contacto con la superficie de los polímeros (cilindros con dos caras pulidas). La concentración proteica fue evaluada de acuerdo con el método de *Bradford* [24].

2.2.2. Adhesión de plaquetas. En la superficie tratada de los polímeros fueron depositados 2 mL de sangre fresca. Después de un tiempo de contacto de 180 s, la superficie fue lavada cuidadosamente con solución salina (0,1 M, NaCl), hasta remover todo el componente sanguíneo que no fue adherido en la superficie del polímero. El valor medio de la concentración de plaquetas adheridas fue obtenido a partir de cinco micrografías (Microscopía electrónica de barrido, SEM, *Phillips XL 30*) considerando una superficie de 1 cm^2 para cada material. Para este ensayo fueron utilizadas placas de (12x12x3) mm. En este ensayo fueron utilizados como control positivo y negativo, el vidrio y la silicona grado médico, respectivamente.

2.2.3. Formación de trombos. La sangre humana fresca fue adicionada a una parte de ácido-citrato-dextrosa (ACD) para nueve partes de sangre. El resultante ACD - sangre fue colocado en una lámina de vidrio y en la superficie del material polimérico tratado (placas). La coagulación fue

iniciada por adición de solución acuosa de cloruro de calcio (CaCl_2), y el trombo formado fue monitoreado durante 40 min. Las masas relativas de formación de trombos en las diferentes muestras fueron determinadas considerando como referencia el 100% de trombos formados en la lámina de vidrio.

2.2.4. Medidas de citotoxicidad. La citotoxicidad de las muestras fue evaluada usando células de ovario de hámster chinés (CHO), ATCC CHO k1 (Tipo *American Culture Collection*, ATCC), de acuerdo con la norma ISO 10993-5 [22]. Un monocultivo de CHO fue preparado, y debidamente tratado, y a partir de este una suspensión celular fue obtenida. La suspensión celular fresca es colocada en contacto con la superficie de las muestras tratadas (cilindros) en placas de *Petri* ($15 \times 60 \text{ mm}^2$) usando diferentes concentraciones de suspensión y control positivo y negativo de solución 0,02 %vol de fenol y polietileno de ultra-alta masa molecular (UHMWPE), respectivamente. El potencial de toxicidad fue expresado por un índice de citotoxicidad, IC50 (%), que representa la concentración que elimina la formación de colonias de células por 50% en comparación con el control positivo.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Adsorción proteica. La importancia atribuida a la interacción entre las proteínas y las superficies de los materiales es generalmente considerada como un paso fundamental para el comportamiento exitoso de cualquier biomaterial. Después del contacto con fluidos fisiológicos, la adsorción de albúmina (HSA) tiene una profunda influencia sobre los acontecimientos subsecuentes de cascada de coagulación de la sangre y una reducción de la adhesión de plaquetas ha sido publicado para polímeros que absorben cantidades relativamente altas de HSA [25].

La adsorción superficial de albúmina humana (HSA) y fibrinógeno (HFB) en los materiales preparados fueron estudiadas con el objetivo de obtener informaciones de la extensión de la interacción de estas proteínas con la superficie de los polímeros en el fluido fisiológico.

En relación a la adsorción proteica de los materiales epoxídicos fue verificada una mayor adsorción de albúmina (HSA), cuando comparada a la adsorción de fibrinógeno (HFb) (véase la Figura 2).

A pesar de la extensa literatura en el área, las bases biológicas de las interacciones biomaterial-sangre aún no están bien establecidas, pues los eventos adversos que son iniciados cuando el material está expuesto al fluido sanguíneo son numerosos y complejos [26,27]. Lo más aceptado, es que cuando un material sintético es expuesto al fluido sanguíneo, el primer evento que ocurre es la adsorción de proteínas en la superficie, seguido por la agregación de plaquetas y la

activación.

En este sentido, la adsorción de fibrinógeno es conocida por acelerar la adhesión de plaquetas y la activación. Sin embargo, la adsorción de albúmina en las superficies de materiales pueden inhibir la activación de las plaquetas, y por tanto, no promueven la formación de coágulos. De esta forma, una mayor adsorción de albúmina (HSA) en relación a la adsorción de fibrinógeno (HFb) en la superficie de los polímeros estudiados puede ser un indicativo de baja adhesión de plaquetas y activación. Este resultado sugiere que la superficie de los polímeros presentan un comportamiento no trombogénico.

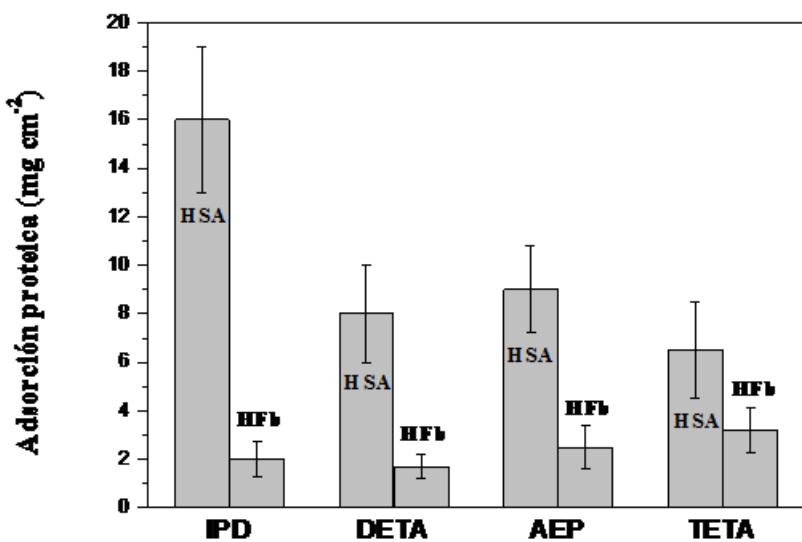


Figura 2. Adsorción de proteínas sobre la superficie de los materiales. Albúmina (HSA) y fibrinógeno (HFb).

3.2. Activación y adhesión de plaquetas. Las micrografías electrónicas (SEM) de las superficies de los polímeros después del contacto con la sangre son mostradas en la Figura 3. En la Figura, se observa que la superficie del polímero que utiliza el comonómero TETA presenta una actividad trombogénica más significativa (Figura 3a), cuando comparada a la superficie de los otros tres polímeros (Figuras 3b, 3c e 3d). Además para la superficie del polímero que utiliza TETA en interacción con la sangre mostró una acentuada activación y adhesión de plaquetas, formando pequeñas áreas de agregados de plaquetas y fibrina. La activación y adhesión de plaquetas no fue observada en las superficies de los otros tres polímeros, pues la superficie de estos polímeros quedó sin plaquetas y sin la formación de trombos.

La mayor activación y adhesión de plaquetas para el polímero con TETA puede ser explicada debido a la polimerización de la fibrina por la adsorción de fibrinógeno en la superficie de este polímero. Este resultado muestra que la afinidad por la albúmina (HSA) en la superficie de este polímero no fue suficiente para inhibir la adhesión de plaquetas. Esta activación y adhesión de

plaquetas están relacionadas a la primera etapa del proceso de formación de trombos. Por tanto, esto es un indicativo de que este polímero no puede ser utilizado para aplicaciones cardiovasculares sin la realización de alguna modificación superficial debido a la alta activación y formación de plaquetas en la superficie de este material.

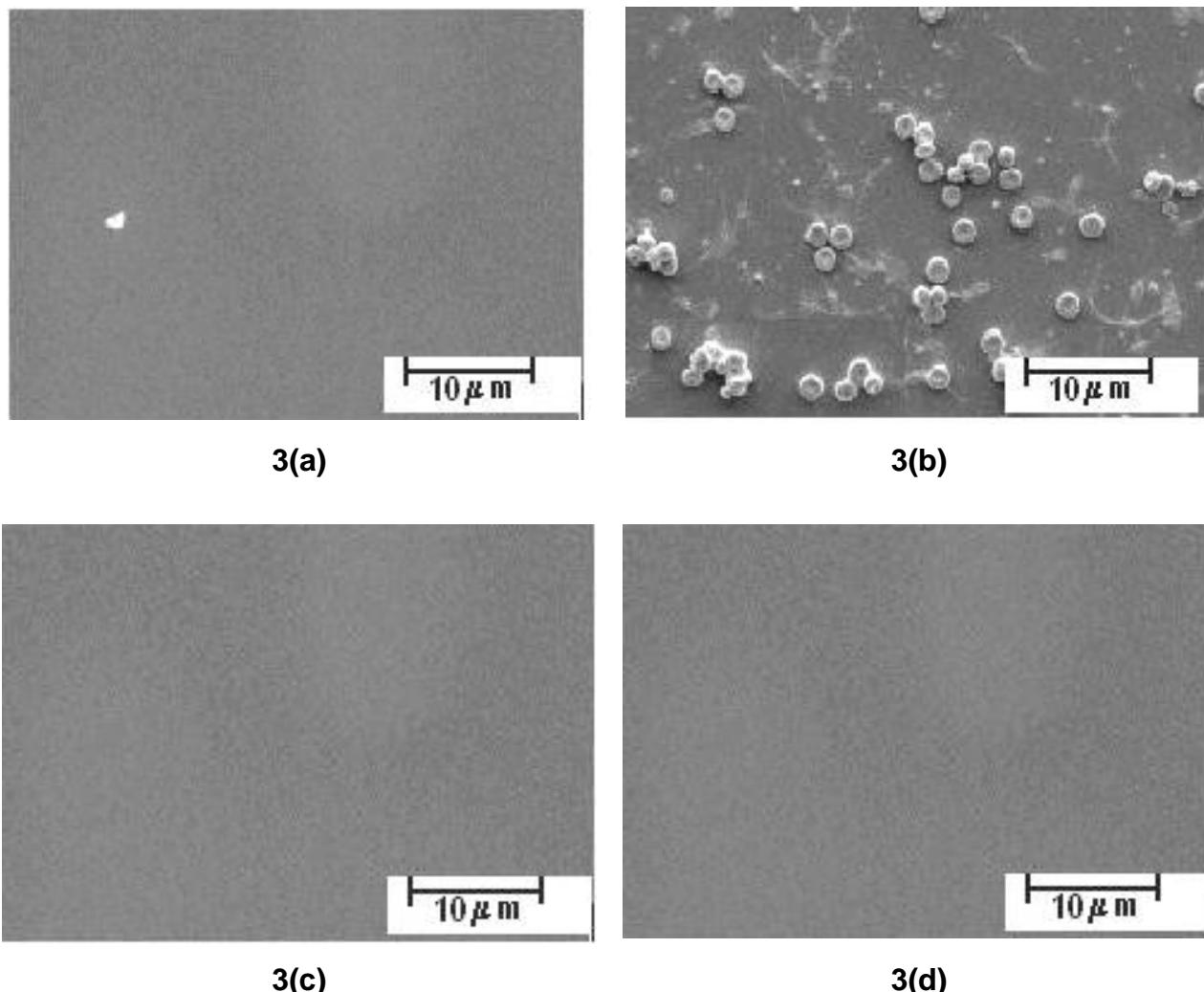


Figura 3. Micrografías electrónicas (SEM) de la superficie de los polímeros DGEBA-DETA (a), DGEBA-TETA (b) e DGEBA-AEP (c) y DGEBA-IPD (d) después de la incubación en sangre humana a 37°C durante 180 s.

La relación de plaquetas adheridas por unidad de área después de la incubación en sangre humana, a 37 °C, durante 180 s se muestra en la Figura 4. La proporción de plaquetas adheridas en la superficie por unidad de área para el polímero que utiliza TETA fue significativamente más alta que para los otros tres polímeros, y para la silicona de grado médico (usado como control de negativo). Esto puede ser atribuido a la relativa alta adsorción de albúmina humana (HSA) por la superficie de estos tres polímeros.

3.3. Formación de trombos. La Figura 5 muestra la formación de trombos después de la

exposición de la sangre humana en la superficie de los polímeros.

La formación de trombos disminuye drásticamente en la superficie de los polímeros formulados con poliaminas cicloalifáticas (AEP e IPD) cuando comparada a los polímeros con los comonómeros del tipo poliaminas alifáticas lineales (TETA y DETA). Este resultado era esperado y está de acuerdo con los resultados de adsorción superficial de albúmina (HSA) por estos polímeros. Estos resultados sugieren que una baja adsorción de fibrinógeno (HFb) parece inhibir la activación de la coagulación en los polímeros con AEP e IPD. Estos resultados confirman que el polímero que utiliza TETA no puede ser utilizado para aplicaciones cardiovasculares sin la realización de alguna modificación superficial debido a la alta formación de trombos en la superficie de este material.

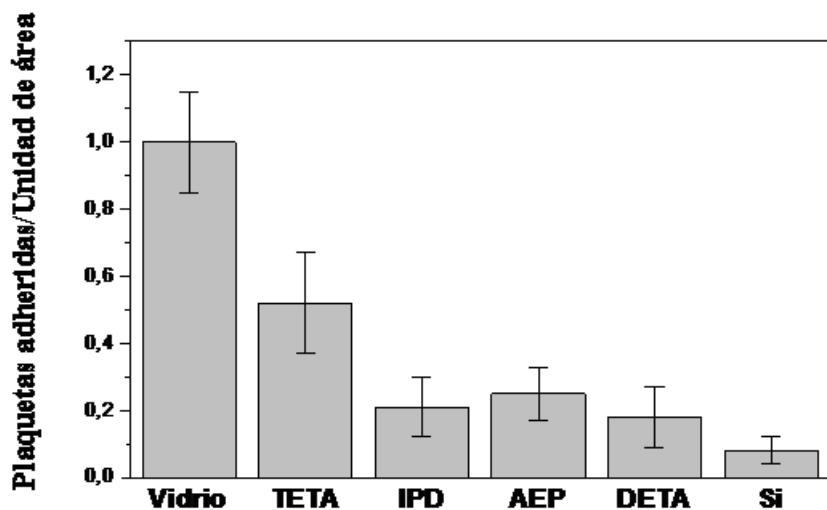


Figura 4. Relación de plaquetas adheridas por unidad de área ($100,000 \mu\text{m}^2$) en la superficie de los polímeros después de la exposición con la sangre humana. Vidrio y silicona de uso medicinal fueron usados como control positivo y negativo, respectivamente.

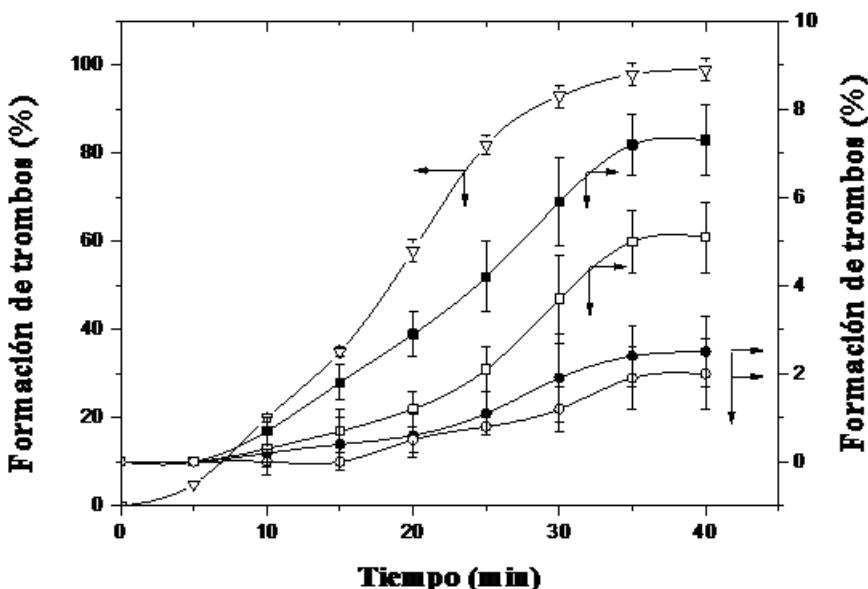


Figura 5. Formación de trombos en la superficie de los polímeros con DETA (□), TETA (■), AEP (●) e IPD (○).

3.4. Medidas de citotoxicidad. El ensayo de citotoxicidad “*in vitro*” representa la etapa inicial del ensayo de biocompatibilidad de un material con potencialidades para aplicaciones médicas. Este es el primer análisis utilizado para evaluar si un material presenta características biocompatibles. Posteriormente, el segundo análisis es evaluar la interacción del material con el tejido biológico “*in vivo*”. Por tanto, este ensayo es importante para la realización de ensayos “*in vivo*”, con la finalidad de evaluar el comportamiento del material dentro del medio biológico y verificar si material puede ser utilizado como biomaterial.

Para los polímeros epoxídicos el nivel de citotoxicidad encontrado fue relativamente bajo en relación a los controles positivo y negativo utilizados como puede ser observado en la Figura 6. El material utilizado como control positivo (solución de fenol), mostró una actividad citotóxica extremamente alta, pues prácticamente no restaron colonias sobrevivientes sobre la placa de control. Para los polímeros, el porcentaje de colonias sobrevivientes fue bien elevado, indicando que presentan baja toxicidad a las células de ovario de hámster chinés.

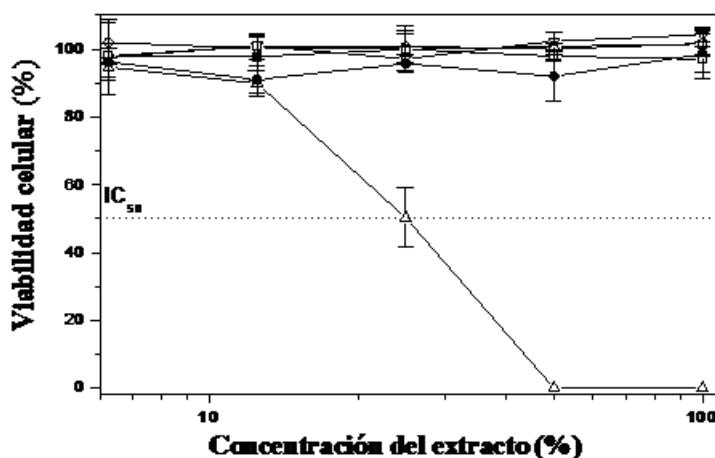


Figura 6. Citotoxicidad de los polímeros con DETA (□), TETA (■), AEP (●) e IPD (○), control negativo (UHMWPE) (▽), y control positivo (fenol) (Δ), en contacto con células de ovario de hámster chinés.

El bajo nivel de citotoxicidad encontrado en los polímeros con las células de ovario de hámster chinés puede ser consecuencia de la rigurosa preparación de los polímeros en relación a la utilización de cantidades estequiométricas y el empleo de un programa de curado optimizado. Estos factores permiten alcanzar la conversión máxima y de esta forma los polímeros presentan concentraciones mínimas de monómeros en los materiales lo que posibilita obtener mejores propiedades biológicas.

Los resultados demuestran que los polímeros preparados con los comonómeros del tipo poliaminas cicloalifáticas (AEP e IPD) cumplen mejor los criterios de hemocompatibilidad y citotoxicidad exigidos de un biomaterial para implante.

Basado en estos resultados y buscando algunas potencialidades para este tipo de polímeros, ensayos biológicos “*in vivo*” utilizando animales modelos, están en ejecución en nuestros laboratorios. Así como también están siendo realizado el revestimiento de “*stents*” coronarios de acero inoxidable para el área cardiovascular, y el revestimiento e/o encapsulado de nano-partículas de cerámicas ferromagnéticas para el tratamiento del cáncer a través de la técnica de magneto-hipertermia [28]. Los resultados de estos estudios serán posteriormente publicados en la literatura científica pertinente a cada área de aplicación.

CONCLUSIONES

Las propiedades biológicas de los cuatro materiales epoxídicos usando el monómero del éter diglicidílico del bisfenol A con cuatro comonómeros del tipo poliaminas alifáticas de manera independiente fueron evaluadas usando cuatro ensayos biológicos “*in vitro*”.

Alta adsorción de albúmina y baja adsorción de fibrinógeno, así como también la supresión de la activación de plaquetas y buena hemocompatibilidad de los polímeros formulados con poliaminas cicloalifáticas fue verificada. Estos polímeros cumplen mejor con los criterios de hemocompatibilidad y citotoxicidad exigidos de un biomaterial para implante.

Los resultados de citotoxicidad indicaron que los polímeros estudiados son biocompatibles con las células de ovario de hámster chinés. De esta manera, podemos considerar que estos polímeros son biocompatibles.

Agradecimientos. Los autores agradecen el aporte financiero de las instituciones brasileñas de apoyo a las investigaciones científicas; FINEP, CAPES, CNPq, FAPEMIG y a la Secretaría de Ciencia y Tecnología del *Estado de Minas Gerais*.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Dumitriu S. *Polymeric Biomaterials*. 2nd ed.; Marcel Dekker: New York, 2001
- [2] Ramilo G, Valverde I, Lago J, Vieites JM, Cabado A.G, *Archives of Toxicology*, **80**, 748 (2006)
- [3] Poole A, van Herwijnen P, Weideli H, Thomas MC, Ransbotyn G, Vance C, *Food Additives and Contaminants*, **21**, 905 (2004)
- [4] Tsui HH, Jaw JY, Huei L, Chia TK, *Biomaterials*, **23**, 77 (2002)
- [5] Suárez S, Sueiro RA, Garrido J, *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental*

- Mutagenesis*, **470**, 221 (2000)
- [6] Nishioka H, Ohtani H, *Mutation Research*, **54**, 247 (1978)
- [7] Harmand MF, Bordenave L, Bareille R, Naji A, Jeandot R, Rouais F, Ducassou D, *J Biomat Sci, Polym Ed*, **2**, 67 (1991)
- [8] Lohre JM, Baclig L, Sagartz J, Guida S, Thyagarajan K, Tu R, *Artificial Organs*, **16**, 630 (1992).
- [9] Nishi C, Nakajima N, Ikada Y, *J Biomed Mat Res*, **29**, 829 (1995)
- [10] Zhao JL, Xu KW, Mat Lett, **58**, 163 (2004)
- [11] Tilbrook, DA, Clarke RL, Howle NE, Braden M, *Biomaterials*, **21**, 1743 (2000)
- [12] Millich F, Jeang L, Eick JD, Chappelow CC, Pinzino CS, *J Dent Res*, **77**, 603 (1998).
- [13] Peng T, Gibula P, Yao K, Goosen MFA, *Biomaterials*, **17**, 685 (1996)
- [14] Tingfei X, Jiazen M, Wenhua T, Xuehui L, Shuhui L, Baoshu X, *J Biomed Mat Res*, **26**, 1241 (1992)
- [15] Abraham GA, De Queiroz AAA, Roman JS, *Biomaterials*, **23**, 1625 (2002)
- [16] De Queiroz AAA, Barrak ER, Gil HAC, Higa OZ, *J Biomat Sci, Polym Ed*, **8**, 667 (1997)
- [17] González Garcia F, Da Silva PM, Soares BG, Rieumont J, *Polym Test*, **26**, 95 (2007).
- [18] Norma ASTM D 1652. Standard test methods for epoxy content of epoxy resins, American Society for Testing and Materials, 1997.
- [19] González Garcia F, Soares BG, Pita VJRR, Sánchez R, Rieumont J, *J Appl Polym Sci*, **107**, 2047 (2007).
- [20] González Garcia F, Miguez E, Soares BG, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, **15**, 261 (2005).
- [21] De Queiroz AAA, Gallardo A, Román SJ, Higa OZ, *J Biomat Sci, Polym Ed*, **7**, 523 1996
- [22] Norma ISO 10993-5, Biological evaluation of medical devices tests for citotoxicity: in vitro methods, International Standard Organization, 1999
- [23] Intaglietta M, Winslow RM, Biomedical Engineering Handbook. En Bronzino J.D., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, 1995
- [24] Bradford MM, *Anal Biochem*, **72**, 248 (1976)
- [25] Goodman SL, Cooper SL, Albrecht RM, *J Biomat Sci, Polym Ed*, **2**, 147 (1991)
- [26] Ratner BD, *J Biomat Sci, Polym Ed*, **11**, 1107 (2000)
- [27] Brash JL, *J Biomat Sci, Polym Ed*, **11**, 1135 (2000)
- [28] Castro VC, Celestino J, De Queiroz AAA, González Garcia F, *Revista Brasileira de Física Médica*, **4**, 79 (2010)