

## Resum.

El desenvolupament de l'enginyeria tissular, s'origina amb la necessitat de donar solució a la quantitat de malalties que es donen per deteriorament dels teixits, per tant, la funció fonamental d'aquesta disciplina és la regeneració tissular, podent arribar a ser una alternativa al trasplantaments d'òrgans. Davant aquest context, l'estratagema seria utilitzar cèl·lules vives per a la regeneració del teixit. El procediment bàsic seria aquest; l'eliminació del teixit danyat o malalt, posteriorment, les cèl·lules necessàries per reparar-lo són introduïdes en condicions òptimes perquè es produisca la regeneració del teixit. Les cèl·lules poden agafar-se d'un teixit sa o de cèl·lules mares i després aïllar-les, donant-li totes les condicions necessàries per a regenerar el teixit danyat. Aquesta metodologia de regeneració tissular, necessita una matriu o suport porós que guie el teixit a mesura que es desenvolupa. Per exemple, cèl·lules de condrocits són sembrades i cultivades en un suport i posteriorment són implantades en la zona danyada.

Els materials porosos han de complir una sèrie de requisits per ser emprats en aplicacions d'enginyeria tissular; han de ser biocompatibles, fàcilment esterilitzables, els porus del material 3-D han d'estar interconnectats, depenent de l'aplicació una porositat i un diàmetre de porus determinat pot ser més favorables. El material ha de tenir unes especificacions mecàniques i unes composicions poden ser més adequades que altres. Per tant, l'objectiu principal d'aquesta tesi és sintetitzar materials porosos, amb la finalitat d'emprar-los en aplicacions d'enginyeria tissular; tan en regeneració de teixits, com en cultius *in vitro*, en definitiva, d'una manera o altra, han d'ajudar a resoldre malalties o problemes de salut de la nostra societat.

Les composicions utilitzades en aquesta investigació pertanyen a la família dels acrilats; com a monòmer base es va emprar l'acrilat d'etil (EA), un monòmer hidròfob, que polimeritzat és un material bioestable que ja ha estat utilitzat en aplicacions biomèdiques, amb bons resultats. L'EA es va copolimeritzar amb el metacrilat d'hidroxiètil (HEMA), per fer un estudi d'hidrofilicitat variable del material en bloc i definir la microestructura del copolímer, és a dir, conèixer la distribució de dominis hidròfils.

A l'estudi es van realitzar mesures dinàmic-mecàniques i calorimètriques convencionals, per a posteriorment, realitzar experiments de relaxació estructural aprofundint en el sistema de moviments conformationals que es donen a diferents temperatures. El següent pas, era conèixer la influència de l'esterilització sobre aquesta sèrie de copolímers d'hidrofilicitat variable. És per això, que es van irradiar els materials amb diferents dosis de raigs gamma, per tal d'entendre l'efecte de la dosi de raigs gamma en les propietats físico-químiques i mecàniques dels materials irradiats, si es produïen escissions i/o entrecreuaments, o canvis en grups funcionals. La manera d'interpretar la influència de la dosi de radiació  $\gamma$  en els copolímers, va estar mitjançant la realització d'assajos dinàmic-mecànics i infrarojos per a tota la sèrie de copolímers.

El tercer pas, va estar la recerca d'un mètode per sintetitzar suports porosos, amb una arquitectura definida (estructura interconnectada i porus esfèric), amb independència de la composició EA/HEMA. La caracterització d'aquests materials 3-D es van realitzar bàsicament mitjançant; micrografies del microscòpic electrònic d'escombrada (SEM), assajos mecànics i caracterització de la porositat. El següent plantejament era determinar perquè en certes condicions l'estructura porosa un cop seca estava col·lapsada. Per entendre aquest problema, es van sintetitzar una sèrie de materials porosos amb diferents percentatges d'entrecreuerador, i amb l'ajuda de micrografies del microscòpic electrònic, càlculs de porositat, mesures d'espessors del suports porosos abans i després de secar i càlculs de temperatures de transició vítria dels materials en blocs que s'havien utilitzat en la síntesi de les estructures 3-D, es va arribar a entendre aquest fenomen.

Finalment, es va realitzar un estudi de les propietats mecàniques de materials porosos amb una composició fixa (EA amb un 30% d'entrecreuerador), per ser aquesta la composició òptima, és a dir, on el suport porós resta totalment interconnectat.

Les bastides poroses han d'exhibir unes adequades propietats mecàniques que proporcionen la correcta tensió en l'entorn per guiar el nou teixit. Les propietats mecàniques del suport porós depenen de la naturalesa del material del qual s'ha fet aquest, la seua densitat relativa o porositat i les característiques microestructurals.

En primer terme, es van sintetitzar una sèrie d'estructures poroses de composició òptima, a les quals es van realitzar assajos experimentals de compressió, obtenint una primera visió de la influència dels paràmetres geomètrics (tamany de porus, porositat i tamany de les goles d'interconnexió) sobre les propietats mecàniques. Aquestes dades experimentals, van ser utilitzades per trobar un model mitjançant elements finits (FEM) que reproduguera el comportament elàstic linear dels materials

porosos. El model es basa en la col·locació del porus seguint la geometria d'empaquetament cúbica centrada en les cares. Al model es van aplicar les directrius de l'assaig experimental de compressió per materials porosos i es va fer un estudi de com influeixen els paràmetres que afecten a l'arquitectura de l'estructura porosa (porositat, diàmetre de porus, tamany de goles d'interconnexió) en la zona elàstica lineal. Per tant, amb l'estudi experimental i mitjançant FEM s'obté una visió més detallada de la influència dels paràmetres geomètrics sobre el mòdul de Young.

Per concloure; coneguem quina és la microestructura o conformació de cadenes quan es polimeritza per radicals lliures el comonòmers EA/HEMA, com li afecta aquest copolímer en bloc el procés d'esterilització mitjançant raigs gamma. Per altra banda, hem obtingut un mètode de síntesis per fabricar suports porosos amb una arquitectura determinada (porus esfèrics i interconnectats), amb la possibilitat de produir un ampli interval de composicions, porositats i tamany de porus, sent cadascuna d'aquestes tres variables independents, és a dir, si canvia la composició això no influeix en la porositat i el diàmetre de porus. A més, entenem en quines condicions el material 3-D estarà col·lapsat. I finalment, hem trobat un model mitjançant elements finits, que reproduïx el comportament mecànic dels suports porosos en la zona elàstica lineal i ens permet entendre la influència que tenen els paràmetres geomètrics de l'estructura porosa (porositat, diàmetre de porus i goles d'interconnexió) sobre el mòdul de Young.

Les aplicacions d'aquests materials són diverses; s'han fet assajos *in vitro* de condrocits, podent utilitzar aquestes bastides en regeneració del cartílag, i ós, com disc intervertebral i en un futur es podrien utilitzar per regeneració de nervis. Per altra banda, el model d'elements finits pot ser utilitzat per fabricar suports porosos a la carta. Per exemple, per a una aplicació de regeneració tissular es necessita una estructura porosa amb l'arquitectura del model, un determinat mòdul de Young, una determinada porositat i un tamany específic de goles d'interconnexió, i es pot escollir entre un interval de composicions, el model donarà la composició més convenient per eixa aplicació. Per tant, amb aquest model desenvolupat es poden trobar els paràmetres de disseny òptims dels suports porosos, sense necessitat de sintetitzar-los prèviament.



## Resumen.

El desarrollo de la ingeniería tisular, nace por la necesidad de dar solución a la gran cantidad de enfermedades que se dan por el deterioro de los tejidos, por lo tanto, la función fundamental de esta disciplina es la regeneración tisular, pudiendo llegar a ser una alternativa al trasplante de órganos. En este contexto, la estrategia sería utilizar células vivas para la regeneración del tejido dañado. El procedimiento básico sería el siguiente; la eliminación del tejido dañado o enfermo, posteriormente, las células necesarias para repararlo son introducidas en condiciones óptimas para que se produzca la regeneración del tejido. Las células pueden cogerse de un tejido sano o de células madres y después aislarlas, dándole todas las condiciones necesarias para regenerar el tejido. Esta metodología de regeneración tisular, necesita una matriz o soporte poroso que guíe el tejido a medida que se desarrolla. Por ejemplo, las células del cartílago son sembradas y cultivada en un andamio poroso para posteriormente ser implantadas en la zona dañada.

Los materiales porosos deben cumplir una serie de requisitos para poder ser utilizados en aplicaciones de ingeniería tisular; han de ser biocompatibles, fácilmente esterilizables, los poros del material 3-D deben estar interconectados y dependiendo de la aplicación; una porosidad y un diámetro de poro determinado pueden ser más adecuados. El material debe tener unas especificaciones mecánicas y unas composiciones pueden ser más favorables que otras. Por tanto, el objetivo principal de esta tesis es sintetizar materiales porosos, con la finalidad de utilizarlos en aplicaciones de ingeniería tisular; tanto en regeneración de tejidos, como en cultivos *in vitro*, en definitiva, de una manera u otra han de ayudar a resolver enfermedades o problemas de salud de nuestra sociedad.

Las composiciones utilizadas en esta investigación pertenecen a la familia de los acrilatos. Como monómero base se tomó el acrilato de etilo (EA), un monómero hidrófobo, que polimerizado es un material bioestable que ya ha estado utilizado en algunas aplicaciones biomédicas con buenos resultados.

El EA se copolimerizó con el metacrilato de hidroxietilo (HEMA), con la finalidad de estudiar la variación de la hidrofiliidad del material en bloque y definir la microestructura del material, es decir, conocer la distribución de dominios hidrófilos. Para este estudio se realizaron medidas dinámico-mecánicas y calorimetría convencional, para posteriormente, efectuar experimentos de relajación estructural y obtener una visión más detallada de los sistemas de movimientos conformacionales que se dan a diferentes temperaturas. El siguiente paso, era conocer la influencia de la esterilización sobre la serie de copolímeros de hidrofiliidad variable. Para ello, se irradiaron los materiales con diferentes dosis de radiación gamma, con la finalidad de entender el efecto de la dosis de rayos gamma en las propiedades físico-químicas y mecánicas de los materiales irradiados, si se producían escisiones y/o entrecruzamientos, o cambios en grupos funcionales. Para ello, se realizaron ensayos dinámicos-mecánicos e infrarrojos en toda la serie de copolímeros.

El tercer paso, era la búsqueda de un método de síntesis de soportes porosos, con una arquitectura definida (estructura interconectada y poros esféricos), con independencia de la composición EA/HEMA. La caracterización de estos materiales 3-D se realizó, básicamente, mediante micrografías en el microscopio electrónico de barrido (SEM), ensayos mecánicos y cálculos de porosidad. El siguiente planteamiento era determinar por qué en ciertas condiciones la estructura porosa una vez secada se encontraba colapsada. Para entender este problema, se sintetizaron una serie de materiales porosos con diferentes porcentajes de entrecruzador. Con la ayuda de las micrografías obtenidas en el microscopio electrónico, el cálculo de porosidad, medidas del espesor de las estructuras porosas antes y después de secar y los valores de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) de las composiciones que constituían las estructuras 3-D, se llegó a entender este fenómeno.

Finalmente, se realizó un estudio de las propiedades mecánicas de los materiales porosos a una composición fija (EA con un 30% de entrecruzador). Ésta es la composición óptima, donde el soporte poroso queda totalmente interconectado después del proceso de secado.

Los andamios porosos han de exhibir unas adecuadas propiedades mecánicas que proporcionen la correcta tensión en el entorno para poder guiar al nuevo tejido. Las propiedades mecánicas del soporte poroso dependen de la naturaleza del material del cual está hecho, su densidad relativa o porosidad y las características microestructurales.

En primer lugar, se sintetizaron una serie de estructuras porosas de composición óptima a las cuales se les realizó ensayos experimentales de compresión, obteniendo una primera visión de la influencia de los

parámetros geométricos (tamaño de poro, porosidad y tamaño de gargantas de interconexión) sobre las propiedades mecánicas. Estos datos experimentales se utilizaron para encontrar un modelo mediante elementos finitos (FEM) que reprodujera el comportamiento elástico lineal de los materiales porosos. El modelo se basa en la colocación de los poros siguiendo la geometría empaquetada cúbica centrada en las caras. En el modelo se aplicaron las directrices del ensayo experimental de compresión para materiales porosos y se hizo un estudio de la influencia de los parámetros que afectan a la arquitectura de la estructura porosa (diámetro de poro, porosidad, tamaño de gargantas de interconexión) sobre el régimen elástico-lineal. Por tanto, con el estudio experimental y mediante FEM se obtiene una visión más detallada de la influencia de los parámetros geométricos con el módulo de Young.

Para concluir; conocemos cual es la microestructura o conformación de las cadenas cuando se polimerizan por radicales libres los comonomeros EA/HEMA, y como le afecta a este copolímero en bloque el proceso de esterilización mediante rayos gamma. Por otra parte, hemos obtenido un método de síntesis de soportes porosos con una arquitectura determinada (poros esféricos e interconectados), con la posibilidad de producir un gran abanico de composiciones, porosidades y tamaños de poros, siendo cada una de estas variables independientes, es decir, un cambio en la composición no influye en la porosidad y el tamaño de poro. Finalmente, se ha encontrado un modelo mediante elementos finitos, que reproduce el comportamiento mecánico de los andamios porosos en la zona elástico-lineal y permite conocer la influencia que tienen los parámetros geométricos de la estructura porosa (diámetro de poro, porosidad y tamaño de gargantas de interconexión) sobre el modulo de Young.

Las aplicaciones de estos materiales son diversas; se han realizado ensayos *in vitro* de condrocitos, pudiendo utilizar estos andamios en regeneración del cartílago, regeneración del hueso, como disco intervertebral y en un futuro se podían utilizar para regeneración de nervios. Por otra parte, el modelo de elementos finitos puede ser utilizado para fabricar soportes porosos a la carta. Por ejemplo, si para una aplicación de regeneración tisular se necesita una estructura porosa con la arquitectura del modelo, un módulo de Young determinado, una determinada porosidad y un tamaño específico de gargantas de interconexión, y se puede elegir entre un rango de composiciones, el modelo dará la composición más conveniente para cada aplicación. Por tanto, con el modelo desarrollado se puede encontrar los parámetros de diseño óptimos para soportes porosos, sin necesidad de sintetizarlos previamente.





## Summary.

The development of tissue engineering was born at of the necessity to give a solution to the great number of diseases that resulted in tissue damage. For that reason, the focus of this thesis is tissue regeneration, which can be an alternative to organ transplants. With this goal, the procedure to follow will be the use of live cells to repair the damaged tissue. The method is the following: first, to eliminate the damaged or sick tissue and, second, to introduce the necessary tissue-repairing cells in conditions that are optimal to enhance tissue regeneration. This method requires the use of a matrix or scaffold that guides the tissue while it is growing. For example, the chondrocyte cells are cultured and their growth is produced inside the scaffolds. Once the cells are developed, they are implanted into the damaged area.

In order to use the scaffolds in tissue engineering applications, these scaffolds must follow several requirements: The material must be compatible and easily sterilizable; the pores of the scaffolds must be interconnected and, depending on each particular application a specific porosity and pores diameter might be more favorable. The material must have appropriate mechanical characteristics and thus, some compositions are more suitable than others. Therefore, the main aim of this thesis is to synthesize scaffolds, with the intention to use them in tissue engineering applications that is, in tissue regeneration processes, or in vitro cells cultures.

In conclusion, in any of these cases, the use of scaffolds in tissue engineering operations will contribute to fight tissue diseases and improve general health problems in our society.

The composition used in this research belongs to the acrylate family and the main monomer used is ethyl acrylate (EA). This acrylate is a hydrophobic monomer that, when polymerization takes place, results in a biocompatible material. It has already been utilized in biomedicine applications with great success. The EA is copolymerized with hydroxyethyl methacrylate (HEMA), with the purpose of studying, on the one hand, the variation of hydrophilicity of the bulk polymer and to characterize the microstructure of these copolymers; i. e. to understand the distribution of hydrophilic domains.

In this research, we took standard dynamic-mechanical and thermal measurement in order to perform experiments of structural relaxation, aiming at obtaining a deeper view of conformational movement that take place at several temperatures.

The next step is to understand the influence of sterilization on one series of variable hydrophilicity copolymers. In this study, the different copolymers undergo irradiation with several doses of gamma radiation. In order to understand the effect of the gamma radiation dose over the physical-chemical and mechanical properties of irradiation materials. We need to find out whether the block material undergoes scissions and/or crosslinking, and also the possible changes in the functional groups by performing dynamic-mechanical tests and infrared measurement in every copolymer.

The third step consists in finding a method to synthesize scaffolds with a defined architecture: an interconnected structure with spherical pores independent of the EA/HEMA composition. The characterization of these 3-D materials is performed by scanning electron microscopy (SEM), dynamic-mechanical spectroscopy and porosity measurements. The following objective is to determine why the porous structure collapses in its dry state. In order to study this problem, a series of porous materials were synthesized with different crosslinking rates. This phenomenon can be understood with the help of the SEM micrographs, the calculation of the porosity, its thickness before and after drying and the glass transition temperatures ( $T_g$ ) of the bulk polymers used in the porous structures.

Finally, we carried out a study of the mechanical properties of the porous materials with a determined composition (EA with 30% of crosslinker). This is the optimal composition where the porous material is maintained as a totally interconnected structure.

Scaffolds must show suitable mechanical properties to allow cell growing. The mechanical properties of the porous scaffold depend on its material nature, its relative density or porosity and its microstructural characteristics.

In order to comprehend the mechanical properties of the porous structures, we first carried out compression experiments to series of 3-D material with the optimal composition thus obtaining a first impression of the influence of the geometric parameter (pore size, porosity and interconnection throat size) over the mechanical properties. This experimental data results is used to find a model through finite element modeling (FEM), which predicted the linear elastic behavior of the porous materials. The model is based on the positioning of the pores following an

ideal structure based on the crystalline Face Centered Cubic (FCC) system. We applied the guidelines of mechanical experimental testing of compression of porous materials to this model, in order to study the influence of the parameters which affect the porous architecture (pore diameter, porosity, interconnection throat size) over the lineal elastic regime. Therefore, by means of FEM and through the experimental study we gain a more detailed perspective of the influence of the geometric parameters on the *Young* modulus.

In conclusion, this study illuminates the microstructure or conformation of the chains when free radical polymerization of the monomers EA/HEMA takes place and what is the effect of sterilization processes by gamma radiation in these copolymers. Furthermore, we developed a method of synthesis to obtain porous scaffolds with a determined architecture (spherical and interconnected pores), with the possibility of producing a broad range of compositions, porosities and pore sizes. These three variables are independent, namely, a change in the composition does not modify the porosity nor the pore size.

Finally, a model was determined through a finite element method, which reproduces the mechanical behavior of the scaffolds in the elastic zone and allows us to understand the influence of the geometric parameters of the porous structure (pore diameter, porosity and interconnection throat size) on the *Young* modulus.

There are several potential applications for these materials. Our laboratory is performing *in vitro* assays of chondrocyte cells, and it is possible to use these scaffolds for regenerating tissue cartilage or bone. Another option is to apply these scaffolds as intervertebral disks and, in the future, they might be used in the regeneration of nerves.

On the other hand, the finite elements model can be used to fabricate scaffolds that suit particular needs. For example, a tissue regeneration application needs a porous structure with the architecture of the model, a determinate *Young* modulus, a determined porosity and a specific interconnection throat size, with this model we can choose among a wide range of composition. The model will thus provide us with the more convenient composition for each application. Therefore, this developed model will allow us to obtain the parameters of optimal design for porous scaffolds without the need to synthesize them previously.



## **CAPÍTOL 1.- Introducció.**

### ***1.1.- Objectiu.***

Aquesta investigació es desenvolupa amb el propòsit de sintetitzar materials porosos, amb la finalitat d'emprar-los en aplicacions d'enginyeria tissular; regeneració de teixits o cultius in vitro, en definitiva, d'una manera o altra, han d'ajudar a resoldre malalties o problemes de salut de la nostra societat.

Aquests materials hauran de complir una sèrie de requisits per poder ser emprats en enginyeria tissular; hauran de ser biocompatibles, fàcilment esterilitzables, en molts casos serà convenient que els porus del material 3-D estiguen interconnectats, depenent de l'aplicació serà convenient una porositat, o diàmetre de porus, unes certes especificacions mecàniques i una composició potser més favorable que un altra. Es per això, que l'objectiu principal d'aquesta tesi, serà obtenir un mètode de síntesi de material 3-D, amb una arquitectura determinada; porus esfèrics i interconnectats, però haurà de permetre variar la composició, porositat i el diàmetre de porus, sent cadascuna d'aquestes tres variables independents, és a dir, si canvia la composició, això no haurà d'influir en la porositat i el diàmetre de porus.

Altres objectius estarien trobar composicions biocompatibles, i conèixer tant la microestructura del material, com la variació de propietats davant d'un procés d'esterilització.

L'últim objectiu, seria trobar un model mitjançant elements finits, que reproduisca el comportament mecànic del suport tridimensional. Per una banda, ens permetria entendre la influència dels paràmetres que defineixen l'arquitectura de l'estructura porosa. I per altra banda, coneixent el mòdul de Young del material en bloc constitutiu de l'estructura porosa, es pot determinar mitjançant el model FEM quines seran les propietats mecàniques de l'estructura porosa en la zona elàstic-linear per una porositat i diàmetre de porus donat.

## 1.2.- Enginyeria tissular.

L'increment d'estudis en enginyeria tissular té justificació; per una banda, per la quantitat de demanda que hi ha per a transplants, i la problemàtica que això implica; manca de donants i l'inconvenient que té el rebuig de l'òrgan per part del sistema immunològic. I per altra banda, les grans possibilitats que obri en aplicacions de regeneració tissular [87][127].

Davant aquest context, es pensà com una alternativa per resoldre aquest problema, la creació de nous teixits, a partir de cèl·lules vives. El procediment bàsicament seria el següent (Figura 1.1); l'eliminació del teixit danyat, posteriorment, les cèl·lules necessàries per reparar-lo són introduïdes en condicions òptimes per a la regeneració del teixit. Les cèl·lules poden agafar-se d'un teixit sà o de cèl·lules mares i després aïllar-les, donant-li totes les condicions perquè creen el nou teixit. Aquesta metodologia de regeneració tissular necessita una matriu o suport que guie el teixit a mesura que es desenvolupa [87]. Per exemple, cèl·lules de condrocits són sembrades i cultivades en un suport i més tard són implantades en la zona danyada [39][47][48][73][95][149].

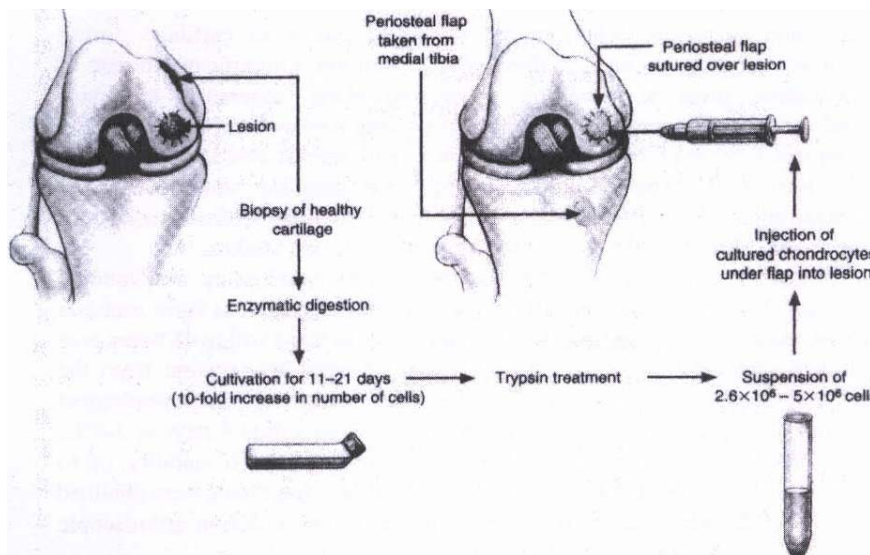


Figura 1.1. Esquema de regeneració d'un cartílag danyat mitjançant implantació de condrocits autòlegs [17][40].

Per entendre aquesta tècnica, s'ha de dir que els teixits biològics consisteixen en cèl·lules, matriu extracel·lular (construïda amb un complex de secrecions cel·lulars immobilitzades en espais continus amb cèl·lules) i un sistema de senyals, les quals estan dins jugant un paper d'activacions de gens o cascades de gens els quals segreguen o transcriuen productes que són responsables del nou teixit generat i diferenciat [4][87][95].

Moltes vegades els suports porosos són sembrats amb cèl·lules adultes que tenen la capacitat de sofrir diferenciació si se li dona totes les condicions necessàries, aquest material 3-D forma part de la matriu extracel·lular. En aquesta categoria estan les cèl·lules de la pell, cartílag, múscul, tendó, lligament, os, teixit adipós, endoteli i moltes més (Figura 1.2). A més, cal incloure a les cèl·lules mares que es troben en embrions o en la medul·la òssia i que en condicions adequades tenen la capacitat de diferenciar-se en qualsevol tipus de teixit [4][87][95].

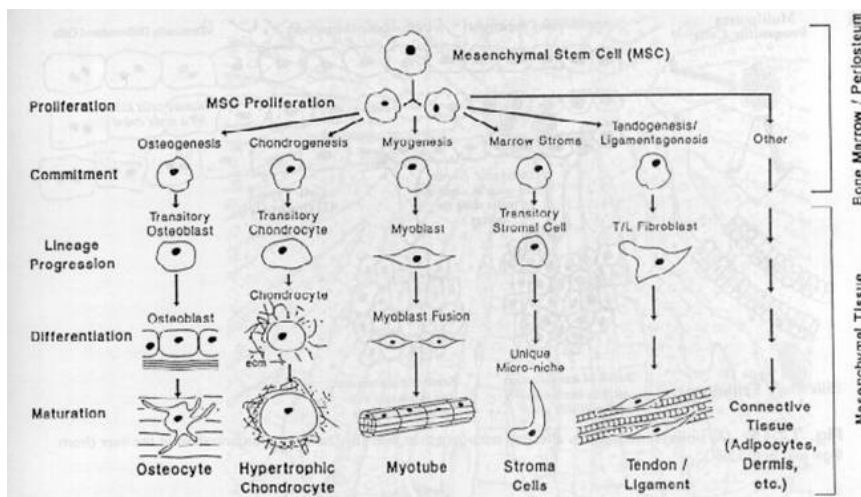


Figura 1.2. Diferenciació de cèl·lules mares mesenquimals en els diferents tipus de teixits mesenquimals [18][40].

Per tant, amb aquesta xicoteta introducció es pot veure que l'enginyeria tissular és un camp multidisciplinari, on biòlegs, bioquímics, metges, cirurgians i enginyers de materials interaccionen per progressar, és per això, que tots han d'avançar al mateix ritme, perquè uns depenen dels altres [87][127].

La configuració òptima física i química de nous biomaterials, com interaccionen amb les cèl·lules vives a través dels materials 3-D estan sent

investigats per molts grups científics. Aquests materials poden ser permanents, biodegradables, poden ser trets de la natura, sintètics i híbrids. Necessiten estar desenvolupats per ser compatibles amb sistemes vius o amb cèl·lules vives *in vitro* i *in vivo*. El contacte amb les cèl·lules i el lloc de l'implant, ha d'estar clarament entès per ser optimitzat, ja que l'interrelació estructura, funció de cèl·lules i teixits, ha de ser l'apropiada. Per això, l'arquitectura del material 3-D juga un paper decisiu. Disseny de biomaterials poden també incorporar senyals biològiques. Com exemples, factors de creixement i diferenciació que poden ser alliberats, disseny de receptors específics i llocs d'ancoratge [4][73][87][95][127].

Els materials utilitzats en aplicacions d'enginyeria tissular se'ls anomena biomaterials, per tant podem definir biomaterial; com un material utilitzat com a dispositiu que ha d'interaccionar amb sistemes biològics. Amb aquesta definició s'hauria d'afegir que els biomaterials han de ser obligatòriament biocompatibles, ja que en el cas que l'implant siga immunement acceptable, sinó és biocompatible es pot donar una resposta inflamatòria [4][127].

Biocompatibilitat, és l'habilitat que té un material per desenvolupar una resposta adequada com a empelt en una aplicació específica. Una resposta apropiada com empelt, inclou, resistència a la coagulació de sang, resistència a la colonització bacteriana o una normal cicatrització [4][95][87][127].

La forma d'entendre biocompatibilitat i la seua mesura és única en ciència de biomaterials. No hi ha definicions precises o exactes de mesures de biocompatibilitat. És molt freqüent, que biocompatibilitat estiga definida en termes de realització o èxit d'una tasca específica [4][95][87][127].

Actualment, la majoria d'aplicacions en enginyeria tissular depenen de l'utilització de materials porosos amb la capacitat de dirigir la regeneració de teixits en aquest processos. La bastida o estructura tridimensional juga un paper important com a suport per a la proliferització i diferenciació cel·lular en l'atac cel·lular, guiant al nou teixit format [4][73][147]. La interacció entre les cèl·lules i la matriu extracel·lular contribueix a la migració, adhesió cel·lular, proliferació, diferenciació, i la mort cel·lular programada, paràmetres molt importants per regeneració tissular.

Diferents classes de polímers han estat utilitzats en aplicacions biomèdiques, inclòs, situacions en les quals els polímers romanen un llarg període de temps amb cèl·lules i teixits. Seleccionar el polímer apropiat per a aplicacions de enginyeria tissular és clau, per això s'ha d'entendre la influència del polímer en la viabilitat cel·lular, creixement i funció. Les interaccions de polímers amb cèl·lules són estudiades *in vitro*, proporcionant un nivell d'informació que no es pot obtenir fàcilment en cultius *in vivo*.



Com per exemple, la influència del substrat en la viabilitat, funció i mobilitat. L'atacament cel·lular al sòlid depèn de la superfície d'aquest. En enginyeria tissular l'adhesió cel·lular és clau perquè aquest pas precedeix a la migració i diferenciació cel·lular. Alguns estudis han trobat que l'adhesió cel·lular és màxima en superfícies amb una barreja de components hidrofílics/hidrofòbics al 50%, el que equival a una mullabilitat intermitja [87][127].

Per tant, el material ha de proporcionar a les cèl·lules una adequada superfície per l'atac cel·lular [69][131]. El balanç hidrofílic/hidrofòbic del material influeix en l'adherència de les cèl·lules a les parets del material 3-D. Quan les cèl·lules són cultivades *in vitro*, un adequat entorn químic permetrà mantenir la diferenciació de la funció cel·lular i això depèn també de les propietats de la superfície del suport porós. Superfícies amb energies lliures, càrregues elèctriques i morfologies rugoses poden afectar l'atacament cel·lular i el seu comportament indirecte. Per exemple, per control de l'absorció de proteïnes presents en el medi de cultiu, o directament, guiant les cèl·lules sembrades amb una adequada superfície topogràfica [19][31][93][135][144]. En aquest sentit, s'ha trobat, que l'adsorció cel·lular és relativament major en superfícies hidròfobes i menor en superfícies hidròfiles [19][31][93][135][144], tanmateix, cultius cel·lular s'han donat també en materials hidrofílics. Una millora de la citocompatibilitat en termes d'adhesió cel·lular és descrita quan la hidrofobicitat de la superfície del material augmenta [121], o inclús quan la hidrofilitat del material és mecànicament reforçada amb una fase inorgànica [134].

Per a concloure, veiem que per a la majoria d'aplicacions d'enginyeria tissular, és necessari un suport porós que faci el paper de matriu extracel·lular dirigint l'organització cel·lular al seu interior i donant els estímuls mecànics convenients, els quals influeixen en el creixement i formació del neo-teixit [47][73][87][169]. Aquests materials 3-D, també s'utilitzaran per cultius *in vitro*, on el material haurà de proporcionar un entorn permanent per a desenvolupar l'adequat fenotip i, més tard, les cèl·lules cultivades seran recollides i trasplantades.

El suport porós ha d'estar dissenyat per complir una sèrie de requisits biològics; biocompatibilitat, esterilitzable, adequada geometria, això significa una interconnexió i porositat alta del material (normalment major del 70%), a més d'un diàmetre de porus variable, generalment es treballa amb un interval de tamany [50–500]  $\mu\text{m}$ , per permetre el creixement cel·lular, la vascularització i la regeneració del teixit [34][150][154]. És interessant utilitzar materials porosos amb diferents composicions, diàmetre de porus i porositat, perquè per a cada aplicació (nervi, còrnia, ós, cartílag...) les condicions canvien [34][73][80][150].

Les característiques geomètriques del material 3-D han d'assegurar l'espai apropiat per al creixement cel·lular, l'accés als nutrients, transport de gasos i evacuació de productes de desfeta. La forma del porus i el tipus de superfície ha de ser escollida per obtenir una bona adhesió cel·lular homogèniament repartida, important per l'atac cel·lular i la proliferació [51][69][86][154][171]. La interconnectivitat, es a dir, el tamany de la gola que hi ha entre porus, ha de ser adequada per permetre que el teixit passe a través del suport porós. Finalment, el disseny del biomaterial ha d'exhibir unes adequades propietats mecàniques que proporcionen la correcta tensió en l'entorn per guiar el nou teixit [171]. Les propietats mecàniques del suport depenen de la naturalesa del material del qual s'ha fet aquest, la seua densitat relativa i les característiques microestructurals [54][129].

### **1.3.- Acrilats com a Biomaterials.**

Un biomaterial és un artefacte que ha d'estar en contacte amb el sistema fisiològic, per reemplaçar una funció del cos. Per tant, ha d'interaccionar amb diferents teixits i òrgans de manera no tòxica i no destruir els constituents del cos amb els quals està en contacte [87][127]. Algunes possibles respostes inclouen; l'acceptació, la baixa digestió de l'implant o la ràpida expulsió acompanyada d'efectes secundaris indesitjables com inflamació [8][122].

Els polímers acrílics han estat àmpliament utilitzats per a aplicacions biomèdiques (adhesius, lents de contacte...), per ser biocompatibles, tenir una naturalesa adhesiva i la possibilitat de poder obtenir un ampli ventall de formulacions/proprietats [73][87][127]. Els més utilitzats han estat el Polimetacrilat de Metil (PMMA) [48][149] i el Polimetacrilat d'Hidroxietil (PHEMA) [146], però, hi ha altres composicions d'acrilats, podent trobar tot un interval de temperatures de transició vítria, baixes, mitges i altes [73][87][127]. Els acrilats s'han emprat també combinats amb altres elastòmers utilitzats com a biomaterials (poliuretans, silicones...), per produir polímers a l'atzar, en bloc o empelts.

En aquesta tesi s'ha utilitzat com a monòmer principal; l'acrilat d'etil (EA), formant copolímers amb el metacrilat d'hidroxietil (HEMA) per una banda. I per altra banda, entrecreuat amb un d'aquests entrecreuadors; dimetacrilat d'etilenglicol (EGDMA) i trimetacrilat d'etilenglicol (TEGDMA). Però també s'han sintetitzat xarxes amb altres dos monòmers; metacrilat d'etil (EMA) i acrilat de butil (BA). Copolímers d'EA/HEMA ja han estat testats per a cultius cel·lulars amb molt bons resultats [122].

#### **1.3.1.- Estructura de les cadenes dels copolímers.**

Quan es polimeritza un copolímer, l'estructura resultant depèn de la forma de polimerització utilitzada. Com en aquesta tesi sols s'ha realitzat polimerització per radicals lliures, la conformació de les cadenes dependrà de factors com; la temperatura, el percentatge d'iniciador, la reactivitat dels monòmers i la relació de monòmers en la barreja inicial. Degut a que en les copolimeritzacions sempre s'ha utilitzat el mateix iniciador (benzoïna), amb

un percentatge constant del 0.2% en pes, i la polimerització sempre ha estat a temperatura ambient, els factors que influiran en l'estructura del copolímer seran, la reactivitat dels monòmers i la proporció d'aquests en la barreja inicial [89]. El copolímer resultant d'una polimerització d'aquets tipus pot no ser a l'atzar, ja que el material ha de guardar un cert ordre en l'associació de constituents monomèrics de la cadena.

Per tant, depenent de les condicions de polimerització podem parlar que les estructures dels copolímers tenen una ordenació a l'atzar, en bloc, alternatius o d'empelt (Figura 1.3) [127].

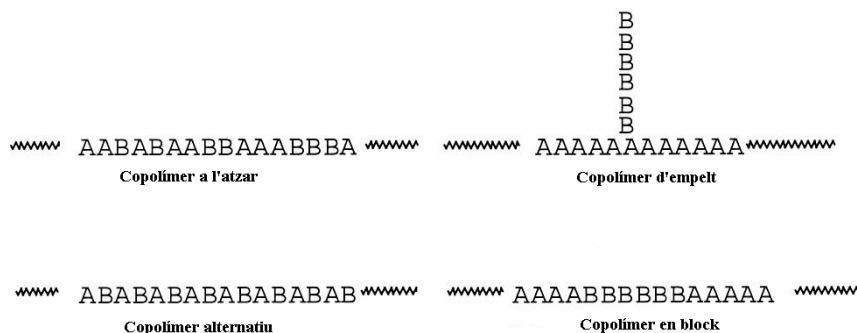


Figura 1.3. Possibles estructures de cadenes de copolímers.

### 1.3.2.- Arquitectura molecular mitjançant DSC.

Una tècnica utilitzada per a caracteritzar l'heterogeneïtat de sistemes polimèrics multicomponents a escala nanomètrica és la Calorimetria Diferencial d'Escombrada (DSC) [56], ja que la relació de la mobilitat conformacional i la temperatura de transició vítria (Tg) reflexa la distribució de la composició, es a dir, l'estructura del polímer.

Els reagrupaments conformacionals de les cadenes del polímer al voltant de la temperatura de transició vítria és un procés cooperatiu que implica segments de polímers pertanyents a diferents cadenes, les quals es mouen simultàniament o seqüencialment. Una regió del material en la qual reagrupaments cooperatius tenen lloc, sense pertorbar la resta del material és anomenada regió de reagrupaments conformacionals (CRR) [1]. El tamany d'aquesta regió és relativa a la longitud de la cooperativitat i està al voltant de pocs nanòmetres en la temperatura de transició vítria [36]. Aquest ordre de magnitud caracteritza la sensibilitat del DSC, tècnica per detectar separació

de fases en sistemes polimèrics multicomponents, en el sentit que si el domini d'un component és més gran que el tamany de la CRR la seua temperatura de transició vítria pot ser detectada per DSC. D'aquesta manera l'estudi de la mobilitat conformacional cooperativa és una ferramenta utilitzada per caracteritzar la miscibilitat de barreges en polímers. Com a exemple, l'eixamplament de l'interval de transició vítria en barreges de metacrilat d'hidroxietil (HEMA) i acrilat d'etil (EA) [29][133] han estat explicats per fluctuacions de composicions en regions amb tamany al voltant del CRR [56][81][83][130][139][162]. Aquest efecte ha estat també trobat en copolímers estudiats en aquesta investigació i pot ser analitzat amb detall amb l'ajuda d'experiments de relaxació estructural.

La relaxació estructural és un procés d'apropament de l'estat d'equilibri, mitjançant un temps d'espera a una temperatura constant per baix de  $T_g$  a pressió constant després de la seua historia tèrmica. Durant aquest procés diferents paràmetres físics, com el volum específic, entalpia o entropia decreixen amb el temps.

El procés pot ser estudiat per DSC, sotmetent la mostra a una història tèrmica començant a temperatura  $T_{inicial}$  major que la seua temperatura de transició vítria; després la mostra és refredada a una velocitat controlada fins a una temperatura  $T_a$  per baix o en la regió de la transició vítria, on la mostra és mantinguda isoterma durant un període de temps  $t_a$ . La mostra és de nou refredada a una velocitat fixa fins a un temperatura  $T_1$  per baix de  $T_g$  i subsegüent és realitza una escombrada de calfament fins arribar de nou a la temperatura inicial que pot estar entre [70-150] °C, depenent de la composició del material (Figura 1.4).

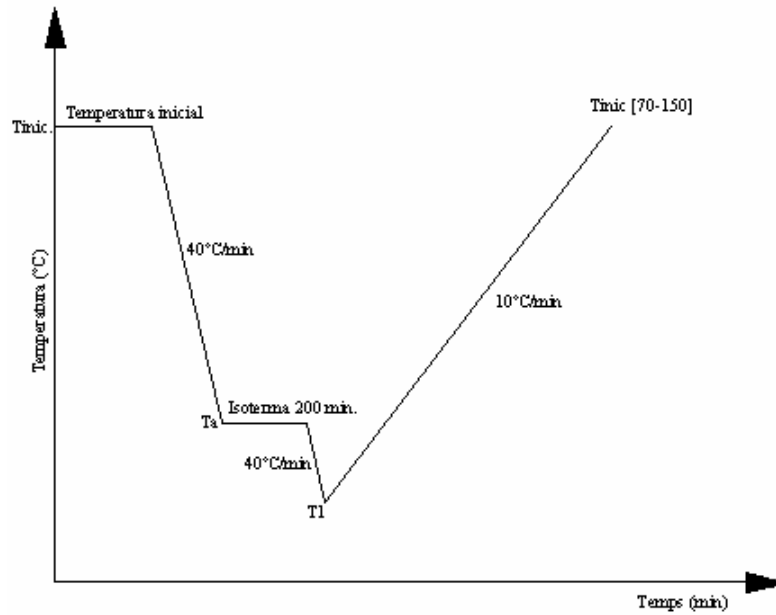


Figura 1.4. Programa de temperatures per obtenir les relaxacions estructurals d'un copolímer.

Aquest termograma de calfament mostra un pic característic de la capacitat de calor específic que depèn molt sensiblement de la història tèrmica prèvia: és a dir, de la temperatura isoterma escollida  $T_a$  i del temps  $t_a$  (Figura 1.5). La pèrdua d'entalpia soferta per la mostra durant l'etapa isoterma a  $T_a$  és igual a l'àrea (de  $T_1$  fins a  $T_{inicial}$ ) entre el termograma d'escalfament mesurat després d'aquesta isoterma i el determinat a la mateixa temperatura en una escombrada sense temperatura isoterma [58]. La figura 1.5, mostra dos fragments dels termogrames del DSC (amb i sense isoterma) i la corba obtesa després de sostraure ambdós termogrames. La relaxació estructural; pics del DSC, són la conseqüència de la mobilitat molecular en el material. La temperatura i l'altura del pics en sistemes heterogenis depenen de la fluctuació en les composicions [30] i pot ser utilitzada en cas de sistemes polimèrics per investigar l'estructura del material.

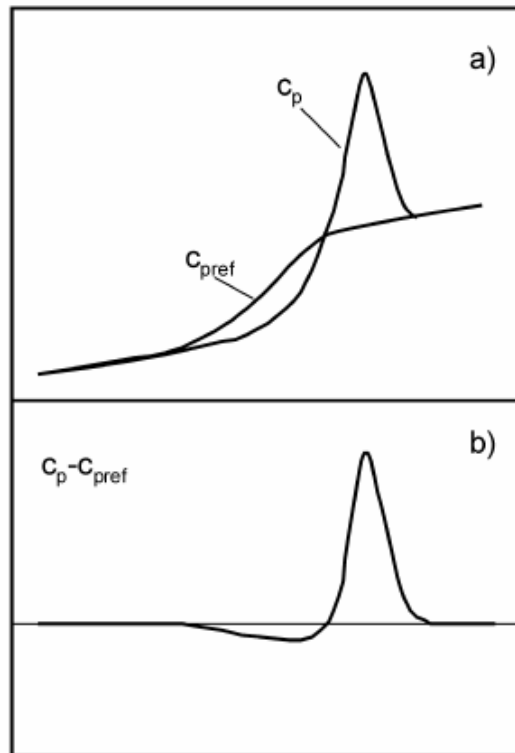


Figura 1.5. a) Fragment de la temperatura que depèn de la capacitat calorífica del material  $c_p$  sotmès a un procés isoterm a temperatura  $T_a$  per davall de  $T_g$ . La referència sense una escombrada isoterma  $c_{ref}$  és també inclosa. (b) Fragment de  $c_p - c_{pref}$ , aquest pic s'obté sostraint la corba isoterma i la referència o no isoterma.

Per entendre l'heterogeneïtat d'un copolímer polimeritzat per radicals lliures amb components hidrofílics i hidrofòbics, primerament es fan mesures mecànic-dinàmiques i DSC convencional, obtenint una profunda visió del sistema de moviments conformacionals que tenen lloc a diferents temperatures. Amb experiments de relaxació estructural s'obté una visió més detallada del moviments conformacionals a diferents temperatures. Aquestos resultats físics són correlacionats amb la composició dels copolímers que prediu el model terminal [3][97], el primer i més simple model que és capaç de descriure almenys el 90% de tots els sistemes copolimèrics coneguts [89], els quals relacionen la composició del copolímer amb la proporció de barreja inicial i la relació de reactivitats dels monòmers.

## **1.4.- Esterilització.**

### **1.4.1.- Introducció.**

Els polímers utilitzats com a biomaterials són introduïts *in vivo* en organismes o emprats per experiments *in vitro*. Els biomaterials per tant han d'estar esterilitzats per evitar qualsevol infecció que pugui arribar a donar seriosos problemes (infermetats o mort *in vivo*, fallida d'experiments *in vitro*). Però l'esterilització o mètode utilitzat no ha de degradar les propietats del biomaterial, ja que es donen casos on la superfície química dels biomaterials i les seues propietats en bloc són alterades, canviant les propietats de l'implant que és pretenia realitzar [125][127]. En aquesta tesi, per esterilitzar el material s'ha utilitzat radiació ionitzant (raig gamma). Aquest mètode d'esterilització és molt comú en enginyeria tissular [77], encara que és convenient fer un estudi de com aquest tipus de radiació pot afectar a les propietats físiques i químiques del material. Per això, una volta esterilitzat es fa un estudi de caracterització del material amb diferents tècniques; com microscòpic electrònic, assajos mecànics, calorimètrics, espectrofotometria infraroja [7]. Pot haver materials que no sofreixen cap canvi [96], que milloren les propietats [153], que a banda de canviar les propietats químiques i mecàniques canvien també la resposta tissular al material [128]. En resum, la resposta de un biomaterial davant radiació ionitzant dependrà tant de les condicions de l'entorn (dosi, presència d'oxigen) com de la naturalesa del material [113].

### **1.4.2.- Definició d'esterilització.**

Esterilització significa absència de qualsevol organisme viu o millor definit, absència de microorganismes com bacteris, llevats, fongs i virus. L'esterilització es determina per immersió de cadascuna de les mostres o biomaterials en una proveta amb un medi líquid estèril de cultiu microbiològic i incubant totes les mostres en unes condicions adequades. De manera que si al biomaterial no hi ha creixement de microorganismes, aquest està esterilitzat, i pel contrari, si hi ha creixement, el medi de cultiu estarà tèrbol i el mètode d'esterilització no serà l'adequat [127].



Processos d'esterilització desenvolupats i estudis validats són utilitzats per determinar un nivell de seguretat d'esterilitat (SAL). El SAL és la probabilitat que un producte estiga no estèril després de l'exposició a un procés d'esterilització específic. Generalment el màxim acceptat per implants és  $10^{-6}$ , que és la probabilitat de trobar en un milió de mostres una no estèril [125][127].

### 1.4.3.- Mètodes d'esterilització.

Hi ha diversos mètodes d'esterilització; el mètode escollit dependrà del tipus de material a esterilitzar i dels mètodes d'esterilització amb els quals es compta.

El més bàsic és esterilització amb calor humida, que necessita elevades temperatures (120-125°C) i humitat. És un mètode ràpid (al voltant de 15-30 minuts dura el procés) eficaç, simple, i amb absència de residus tòxics. L'alta temperatura i el rang de pressions fa incompatible certs materials i l'empaquetament [125][127].

Un altre mètode molt utilitzat és esterilització amb òxid d'etilè (EO). L'EO és líquid per baix de 11°C. Per tant, a temperatura ambient les mostres estan en contacte amb aquest gas per ser esterilitzades. És un potent carcinogen i ha de ser manipulat amb molta cura. És compatible amb un ampli rang de productes i amb materials empaquetats. El temps d'esterilització sol estar entre 2 i 16 hores de durada. A més, als materials un cop esterilitzats, se'ls haurà d'aplicar un altre gas inòcua per un elevat temps per tal d'eliminar l'EO residual. És un mètode molt eficaç, al ser altament penetrant i compatible amb molts materials. Les principals inconvenients són la toxicitat de l'EO i l'alta durada de tot el procés [125][127].

Altres mètodes que estan sent desenvolupats són; plasma, gas, ozó, diòxid de clor gas, peròxid de hidrogen vapor i equips de generació de raig X [125][127].

Un altre grup de mètodes d'esterilització són els que utilitzen radiacions altament ionitzants; com raigs gamma, raigs-X acceleració d'electrons. Aquests mètodes d'esterilització utilitzen radiació ionitzant que proporciona una font de cobalt 60 o un equip d'acceleració d'electrons. Amb aquests mètodes la radiació que s'allibera és suficient per esterilitzar les mostres. La radiació ionitzant és un mètode capaç de desenvolupar una efectivitat alta a un relatiu baix cost. La dosi estàndard es 2.5 Mrad (25 kGy) [125][127].

Dels mètodes d'esterilització per radiació, els raigs gamma són els més àmpliament utilitzats, per ser altament penetrants i estar regulada la dosi necessària per esterilitzar (25 kGy). Un ample ventall de materials són compatibles amb aquest tipus de radiació i es pot esterilitzar amb el material empaquetat. L'inconvenient és que pot afectar a l'estructura del material, sobre tot si és de naturalesa polimèrica on es poden produir escissions i/o entrecreuaments de les cadenes. Per tant, és un procés simple, ràpid i efectiu amb el desavantatge que és necessita un centre especial i que alguns materials són incompatibles [125][127].

#### 1.4.4.- Esterilització amb raig gamma.

Alguns materials mostren ser més sensibles a la contaminació de microorganismes per la composició, el tipus de microestructura, grau de porositat i superfície química [125]. Dels mètodes d'esterilització anomenats en el paràgraf anterior, l'exposició a raigs gamma ha estat un dels més utilitzats, per ser altament penetrants i per tant, representa una avantatge respecte a altres tècniques quan es va treballar amb materials porosos [87][125].

La mínima dosi requerida per esterilitzar les mostres segons les autoritats oficials és 25 kGy [43]. Encara que molts polímers sofreixen canvis en les propietats mecàniques i estructurals quan són irradiades, un ample ventall de materials són compatibles amb esterilització per radiació, incloent polietilè, polièsters i metacrilats [2][68][87][112].

El pes molecular del polímer i la seua distribució, poden ser dràsticament alterats per exposició a radiacions ionitzants [60][68][125]. Aquest tractament d'alta energia dona lloc a la generació de radicals lliures, escissions o entrecreuaments de la cadena principal i subseqüentment canvis en la distribució del tamany de la cadena en el polímer en bloc. A més, l'acció combinada de radiació ionitzant i oxigen en polímers pot ràpidament dirigir diferents deterioracions de les propietats del polímer. Com per exemple, canvis químics en l'estructura del polímer per la creació de nous grups funcionals; com carbonils, carboxils, esters, hidroxils, insaturacions, a més, de escissions i entrecreuaments que són molt sovint induïdes [20][87][125].

Amb aquests antecedents, és important entendre les reaccions que es produeixen als polímers quan s'utilitza radiació gamma, perquè molts polímers utilitzats com a biomaterials han de romandre un llarg període de temps a l'interior del cos humà i per tant s'ha d'avaluar els canvis que es produeixen en el procés d'esterilització abans de procedir al seu implant.

L'esquema bàsic d'alteració de polímers és: Absorció de raigs gamma per part de les cadenes polimèriques per donar lloc a radicals lliures: la combinació dels radicals lliures pot donar lloc a entrecreuaments, escissions o creació de noves instauracions en les cadenes i depenent de l'ambient, la creació de nous grups funcionals [21][22][35][120][142].

#### **L'efecte de l'entorn.**

El tractament amb raig gamma pot donar lloc a escissions o entrecreuaments de cadenes depenent de l'entorn en el qual s'està realitzant. Per exemple, **en absència d'oxigen** l'estructura del polímer determina la seua resposta i canvis químics baix radiació ionitzant. Es conegut que en polímers amb altes concentracions de carbonis quaternaris al llarg de la cadena principal, predominen els mecanismes d'escissions. Per altra banda, polímers que no tenen aquesta característica tenen com a mecanisme predominant els entrecreuaments [125]. **Amb presència d'oxigen**, l'entorn afecta la resposta del polímer quan està exposat a radiació. Molts polímers, inclòs els més estable en absència d'oxigen pot sofrir escissió de cadenes quan la radiació és fa en presència d'oxigen [27][161].

#### **Efecte de la temperatura.**

La temperatura durant la radiació pot tindre influència en els canvis químics que es produeixen. Si la temperatura a la qual es realitza l'esterilització està per sota de la temperatura de transició vítria ( $T_g$ ) del polímer, aleshores, el polímer roman estable, pel contrari, si la temperatura a la qual es realitza la irradiació està per dalt de ( $T_g$ ), el polímer té una major tendència a canvis químics [168]. L'efecte de la temperatura pot ser accelerat en presència de tensions mecàniques en el material [28].

#### **Efecte de la cristal·linitat.**

En general, quan major grau de radiació suporta un polímer cristal·lí, major degradació sofreix l'estructura cristal·lina [85]. Encara que hi ha casos, on un augment de la radiació duu associat un augment de l'estructura cristal·lina. Això, es dona en polímers amb alt pes molecular, on la cristal·linitat es situa al voltant del 50%. Per tant, quant major és la dosi de radiació major nombre d'escissions es produeixen i per tant, aquestes xicotetes cadenes poden empaquetar-se millor augmentat la cristal·linitat del polímer [10][98].

### Influència en acrilats.

La família dels acrilats són bastant similars en la seua estructura química. Encara que podem trobar un subtil diferència. Els poliacrilats sofreixen entrecreuaments quan s'exposen a radiacions ionitzants, pel contrari, polimetacrilats es degraden ràpidament mitjançant mecanismes d'escissions [33][61][120].

### Oxidació del polímer.

Si es produeix oxidació del material, hi ha un pic característic en espectrofotometria infraroja [84]. Com s'observa en la figura 1.6, on es comparen dos espectres infrarojos d'un polietilè d'alta densitat, un sense esterilitzar i l'altre esterilitzat en presència d'oxigen. Aquesta última mostra es troba altament oxidada, ja que s'observa un pic gran d'absorbància en l'interval de nombre d'ones  $[1680-1800] \text{ cm}^{-1}$ , el qual és conegut i es deu al contingut de grups carbonils, acils i carboxils com; cetones, esters, aldehids i àcids [45].

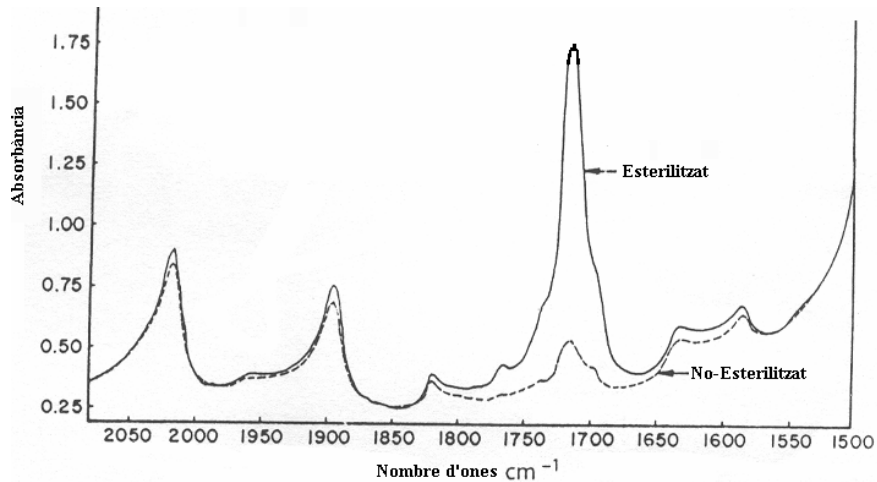


Figura 1.6. Compara dos espectres infrarojos d'un polietilè d'alta densitat; un sense esterilitzar i l'altre esterilitzat. En aquest últim espectre, s'observa un pic intens d'absorció en nombre d'ones  $[1680-1800] \text{ cm}^{-1}$ , aquest interval de nombre d'ones pertany tan a grups carbonils; aldehids, cetones com a grups acils i carboxils; esters, àcids [125].

Per tant, per a concloure es pot dir que quan un polímer és sotmès a un procés de radiació  $\gamma$ , si el mecanisme predominant d'alteració de les cadenes del polímer és l'entrecruament, això fa que el mòdul de goma augmente. Mentre que si el mecanisme predominant d'alteració de les cadenes del polímer és l'escissió, ocorre el cas contrari, que el mòdul de goma disminueix. Per una altra banda, si en el material es produeix oxidació davant un procés d'irradiació amb raigs gamma, no sols canvien les propietats mecàniques, si no també les propietats físiques i químiques que és reflexa en una major hidrofilitat, canvi en la tensió superficial, etc.

## ***1.5.- Síntesi de suports polimèrics porosos.***

### **1.5.1.- Introducció.**

Els suports polimèrics porosos han de posseir unes propietats úniques i específiques per a cada aplicació de regeneració tissular, a banda d'alguns requeriments bàsics per poder ser utilitzat com a bastida. Un criteri bàsic és que el material ha de ser biocompatible, no haurà de provocar reaccions adverses o una resposta immune una volta implantat [8]. La biocompatibilitat pot estar afectada pel mètode de síntesis (permanència de subproductes secundaris) i pel procés d'esterilització.

El principal paper d'un suport és proporcionar un substrat temporal al qual s'han d'adherir les cèl·lules trasplantades, ja que el substrat influeix en la proliferació, migració i diferenciació. La morfologia cel·lular està correlacionada amb l'activitat cel·lular i la seua funció; una forta adhesió cel·lular i una bona dispersió, solen afavorir la proliferació, mentre porus amb forma redona són necessàries per alguna funció específica. Per exemple; s'ha demostrat que la utilització de substrats dissenyats amb morfologies superficials diferents o vàries matrius extracel·lulars (ECM) poden modular la forma cel·lular i la seua funció [23][106][143].

La polaritat del material és essencial per a la funció de certes cèl·lules (cèl·lules epitelials). La polaritat és referida a la distinta col·locació, composició i funció de la superfície de les cèl·lules i els dominis intracel·lulars i per tant, la bastida polimèrica ha d'estar dissenyada perquè prolifere aquest tipus de cèl·lules [91].

A més de la morfologia de les cèl·lules, la funció del molts òrgans és dependent de la relació espacial de les cèl·lules amb la matriu extracel·lular (ECM) [6]. Un suport porós, haurà de ser fàcilment processable i reproduïble. Haurà d'actuar com a plantilla on es produeix el creixement i la formació de l'ECM, facilitant el desenvolupament de l'estructura 3-D. La porositat, el tamany de porus i l'estructura porosa són importants factors que han de ser considerats respecte a la provisió de nutrients per a les cèl·lules sembrades. Per regenerar òrgans vascularitzats com el fetge, materials 3-D amb gran volum de buits (interconnexió dels porus), i una alta relació àrea superficial-volum són desitjables per maximitzar el sembrat de cèl·lules, atacament, creixement, producció d'ECM i vascularització. Porus amb xicotets diàmetres són preferibles per crear una alta àrea superficial per volum, però el tamany de porus ha de ser més gran que les cèl·lules en suspensió (típicament 10  $\mu\text{m}$ ). Tanmateix, restriccions topològiques poden

requerir major diàmetre de porus per al creixement cel·lular. Experiments previs han demostrat que l'òptim tamany de porus és de 20 µm per creixement de fibroblasts, 20-125 µm per regeneració de pell de mamífers adults, i 200-400 µm per creixement d'os [11][163]. La relació d'invasió de teixit dins del suport porós també depèn del diàmetre de porus i la cristallinitat del polímer [100][119][159]. Una estructura interconnectada augmenta la difusió i facilita la vascularització, millorant el suplement d'oxigen, nutrients i l'eliminació de productes de desfeita. La vascularització d'un implant es un prerrequisit per regeneració de la majoria de teixits en 3D excepte per al cartílag que és avascular. Les propietats mecàniques del suport porós han de ser similars al teixit o òrgan que s'intenta regenerar [25][102].

Els requisits de disseny d'un suport porós per regeneració tissular són específics de l'estructura i funció del teixit que va a ser regenerat. El material 3-D creat ha de mimetitzar la matriu extracel·lular (ECM) natural del cos cel·lular. Les proteïnes de l'ECM juguen un paper clau en el control, creixement i funció cel·lular [64][71]. Tanmateix, la majoria de suports polimèrics sintètics no contenen senyals específiques que puguin ser reconegudes pels receptors cel·lulars. Així és preferible que les cadenes del polímers tinguin grups funcionals químics modificables perquè els sucres, proteïnes o pèptids puguin ser atacats [137][141].

### **1.5.2.- Mètodes de síntesi d'estructures polimèriques porosos.**

Les tècniques utilitzades per crear suports polimèrics porosos per regeneració tissular depenen de l'aplicació i la naturalesa del polímer. Els mètodes més emprats actualment, impliquen calfament de polímers per dalt de la seua temperatura de transició vítria o a la temperatura de fusió. Barreja dels polímers amb dissolvents orgànics i incorporació de porògens com microesferes de parafina, cristalls de sal, per posteriorment eliminar-los [87][127].

### **Entrellaçament de fibres.**

En aquest mètode les fibres del polímer s'alineen de manera convinguda, després, s'afegeix un segon polímer barrejat amb un dissolvent afí als dos polímers. Per obtenir l'estructura porosa s'ha d'evaporar el dissolvent i eliminar el segon polímer obtenim les fibres físicament unides [74][87][127][154].

Les fibres proporcionen una gran àrea superficial per volum i per tant, són bastant utilitzades com a suports porosos. Un exemple d'aquest tipus de bastides és el que s'utilitza amb l'àcid poliglicòlic (PGA) [104]. El mètode consisteix en alinear les fibres en la forma que es desitja que tinga el material 3-D, aleshores són embegudes en una solució d'àcid polilàctic (PLA)/clorur de metilè. Després de l'evaporació del dissolvent, la composició PLA-PGA, és calfa per dalt de la temperatura de fusió de ambdós polímers. Després de refredar, s'elimina el PLA amb un dissolvent selectiu, deixant les fibres de PGA físicament unides. Per aplicar aquesta tècnica a altres polímers hi ha certes restriccions, l'elecció del dissolvent, immiscibilitat i la temperatura de fusió dels dos polímers. S'han sintetitzat bastides polimèriques utilitzant variants d'aquest mètode [107][108].

### **Formació de matrius amb porògens.**

La metodologia bàsicament consisteix en fondre un porogen amb un polímer formant una matriu, després el porogen és eliminat mitjançant un dissolvent afí aquest però que no dissol el polímer [73][87][127].

Aquesta tècnica ha estat desenvolupada per sintetitzar suports porosos amb control de la porositat, la relació d'àrea superficial-volum, el tamany de porus i la cristal·linitat per diverses aplicacions [101][172]. Aquest mètode ha estat modificat per a construir suports tubulars [87][105].

### **Congelació-Dessecació.**

Les escumes polimèriques de baixa densitat relativa han estat produïdes utilitzant tècniques de congelació-dessecació [72][163]. El polímer és primerament dissolt en un dissolvent com àcid acètic glacial o benzè per formar una solució de concentració desitjada. La solució és aleshores bruscament congelada i el dissolvent és eliminat per liofilització a baixa pressió, donant lloc al suport porós.



**Separació de fases.**

Aquesta metodologia consisteix en utilitzar polímers i dissolvents que donen lloc a fenòmens de separació de fases. Així, a l'eliminar el dissolvent es produeix l'estructura porosa [51].

Amb la utilització d'aquest mètode, suports porosos carregats amb molècules bioactives hidròfiles i/o hidròfobes han estat sintetitzats [90]. El polímer és dissolt en un solvent com fenol o naftalè fos, seguit de la dispersió de les molècules bioactives en una solució homogènia. Una separació de fases líquid-líquid és induïda per disminució de la temperatura. La solució es congela bruscament creant dos fases sòlides. Posteriorment, s'elimina el dissolvent solidificat per sublimació a baixes pressions i s'obté el material 3-D amb molècules bioactives.

**Utilització de gasos.**

Aquest mètode utilitza gas que procedeix e l'efervescència de algunes sals o de CO<sub>2</sub> a alta pressió i que al disminuir aquesta, dona lloc a la nucleació de porus [62][73]. Un exemple, és l'àcid polilàtic exposat a alta pressió de CO<sub>2</sub>, saturant el polímer i al reduir la pressió fins a la pressió ambient resulta una nucleació i una expansió del CO<sub>2</sub> dissolt, creant un polímer porós que pot arribar fins a 93% de porositat [87][127].

**Fabricació de formes lliures.**

La fabricació de formes lliures està referit a tots els mètodes que dissenyen els suports porosos amb l'ajuda d'ordinadors. Principalment s'ha desenvolupat per a la indústria en forma de prototipat ràpid. Però per enginyeria tissular ofereix la possibilitat de crear bastides polimèriques amb una arquitectura ben definida, permetent la formació d'estructures amb un ample interval de composicions, geometries i diàmetres de porus, sols seleccionant la forma de deposició que es realitzarà a cada capa [26][73][109].

**Motlles en compressió.**

En aquest mètode, es posa en un motlle una barreja del polímer i el porogen (exemple àcid polilàctic amb microesferes de parafina), es duu a terme la compressió a una temperatura més alta de la temperatura de transició vítria del polímer [154]. Després, s'elimina la parafina amb un dissolvent afí aquesta i obtenim un suport amb una geometria idèntica al motlle inicial.

**Altres mètodes de síntesis de bastides polimèriques.**

En aquest apartat hem nomenat els mètodes més comuns de sintetitzar suports porosos polimèrics, però a la bibliografia es pot trobar variants d'aquests mètodes [92][138][145], o l'utilització de l'extrusió [164] per crear estructures 3-D.

**Síntesi de suports polimèrics porosos en aquesta investigació.**

El mètode utilitzat en aquesta tesi per a crear materials porosos està basat en l'ús de plantilles amb porogens, i la polimerització posterior d'una solució monomèrica entre els buits de la plantilla. Una cop extret el porogen es genera l'estructura porosa. Aquest procés de fabricació permet sintetitzar un ampli ventall de bastides polimèriques, amb un control sobre l'arquitectura, l'interconnectivitat entre els porus i el tamany de porus. Amb aquesta tècnica, al nostre laboratori s'ha realitzat un estudi on es sintetitaven suports polimèrics porosos amb control de la hidrofilitat [13], a més de sintetitzar estructures hidròfobes poroses amb excel·lents resultats en cultius de condrocits [122]. Finalment, S'ha assolit la síntesi d'un ventall de suports polimèrics hidròfobs amb un interval de porositats de 70-95% i diferents diàmetres de porus [15]. Per tant, es tracta d'un mètode de síntesi versàtil sense la necessitat d'un equipament especial.

## ***1.6.- Propietats mecàniques dels materials porosos.***

### **1.6.1.- Introducció.**

La majoria d'aplicacions d'enginyeria tissular, necessiten un suport porós que faça el paper de matriu extracel·lular dirigint l'organització cel·lular al seu interior i donant els estímuls mecànics convenients, els quals influeixen en el creixement i formació del neo-teixit [47][73][87][169].

Les propietats mecàniques del material porós per regeneració tissular han de ser similars al teixit o òrgan que s'intenta regenerar [25][102]. I més encara si són teixits que han de suportar càrregues com l'os, cartílag o teixits vasculars. Aleshores, l'interacció mecànica del material implantat amb l'entorn juga un paper clau. Els teixits es remodelen baix l'acció de les càrregues. Per exemple, els ossos adapten la seua geometria, densitat i/o arquitectura interna (cas de l'os trabecular) en resposta als canvis en les condicions de càrregues [59][155]. Per tant, és molt important per a que la regeneració tinga lloc, que l'implant complisca les funcions biomecàniques del teixit nadiu i que s'integre amb els teixits del voltants. En el cas de regeneració o reparació del teixit de l'os, l'implant hauria d'aguantar les càrregues inclús en la fase postoperatòria. Òbviament, seria ideal si el suport porós minimitzara les propietats mecàniques del teixit nadiu [74][157].

Les propietats mecàniques dels materials porosos o sòlids cel·lulars depenen del material del qual estan fabricats, la densitat relativa que és equivalent a la fracció del volum del sòlid (relació entre la densitat del material porós i la del material sòlid del qual està fet) i l'estructura geomètrica interna [54][55][129]. Aleshores, és important enllaçar les propietats físiques dels sòlids cel·lulars amb la seua densitat relativa (la relació de les densitats aparents del suport i del material del qual està fet) i la seua microestructura, per entendre, com poden ser optimitzats per a cada aplicació.

Experimentalment es coneix que a baixes densitats relatives, el mòdul de Young del sòlid cel·lular ( $E$ ) està relacionat amb la seua densitat relativa a través de l'expressió següent:

$$\frac{E}{E_s} = C \left( \frac{\rho}{\rho_s} \right)^n = C \cdot P^n \quad (1.1)$$

On,  $E$  i  $\rho$ , són el mòdul de Young i la densitat del material 3-D,  $E_s$  i  $\rho_s$  són el mòdul de Young i la densitat de l'estructura sòlida del qual està fabricat el material porós.  $C$  i  $n$  són dos constants que depenen de les característiques microestructurals del sòlid cel·lular. El valor de  $n$  generalment està en un interval [ $1 < n < 4$ ], donant un ample ventall de propietats microestructurals per a una densitat donada. A escala cel·lular importants variables influeixen en la microestructura; el tipus de cel·la; oberta (Figura 1.7a), tancada (Figura 1.7b), l'ordre de les cel·les al llarg de tot el material (si es periòdic o desordenat), la geometria dels elements de les cel·les (exemple; l'angle d'intersecció) i la forma de les bigues/pilars de les cel·les (exemple; la curvatura). Per escumes amb cel·les obertes i tancades estudis experimentals indiquen que  $n$  està en l'interval [ $1 < n < 2$ ]. La complexa dependència de  $C$  i  $n$  en la microestructura no està massa ben entesa i resulta un problema a l'hora de predir les propietats elàstic linear de sòlids cel·lulars [54][55][129].

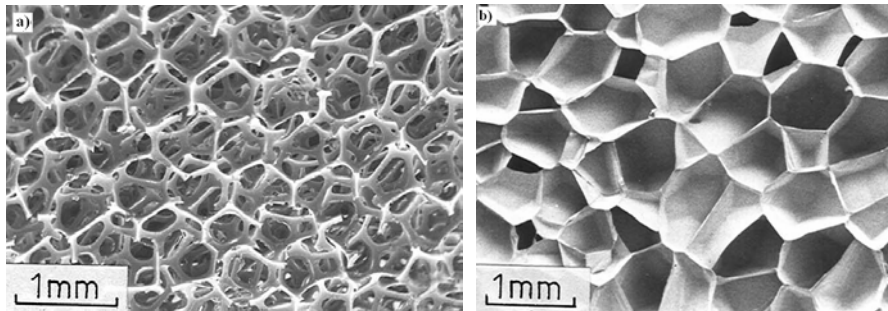


Figura 1.7. a) Estructura de cel·les obertes. Solament hi ha material en el contorn de la cel·la. b) Estructura de cel·les tancades. Hi ha membranes de material en totes les cares de la cel·la [54].

Així, si els mòduls de Young dels diversos sòlids cel·lulars calculats experimentalment s'ajusten a una equació tipus (1.1), significa que els factors geomètrics que influeixen en la microestructura tenen el mateix valor i per tant, l'arquitectura de l'estructura porosa serà la mateixa per a totes els materials 3-D. Per tant, aquesta equació ens permet predir les propietats mecàniques de materials 3-D amb una mateixa arquitectura, a qualsevol composició i amb una ample interval de densitats relatives. Pel contrari, si la resposta mecànica d'un material porós ha estat modelada, aquest model es pot utilitzar per interpretar dades experimentals.

### 1.6.2.- Corba tensió-deformació per materials 3-D.

La corba tensió-deformació en l'assaig de compressió per sòlids cel·lulars generalment, es caracteritza per tres règims clarament diferenciats (Figura 1.8). La primera zona anomenada elàstica lineal, correspon al doblament elàstic lineal (*bending*) dels suports que formen part de l'estructura porosa (bigues/pilars) o a l'estirament elàstic lineal (*stretching*) de les cares de les cel·les (per estructures amb cel·les tancades). La segona zona correspon al progressiu col·lapsament dels porus i es produeix a baixes tensions i grans deformacions (*plateau*), per un mecanisme de pandeig elàstic (*buckling*) (Figura 1.8a), deformació plàstica (Figura 1.8b) o trencament fràgil dels suports de l'estructura. El mecanisme predominant de deformació en aquest règim dependrà del tipus del material del qual està sintetitzat el material 3-D. Finalment, la tercera zona característica és quan es produeix la densificació de l'estructura, on la tensió augmenta bruscament degut al col·lapsament dels porus en tot el sòlid cel·lular. El seu comportament doncs, és assimilable al del material en bloc del qual està fabricada l'estructura porosa [54][73].

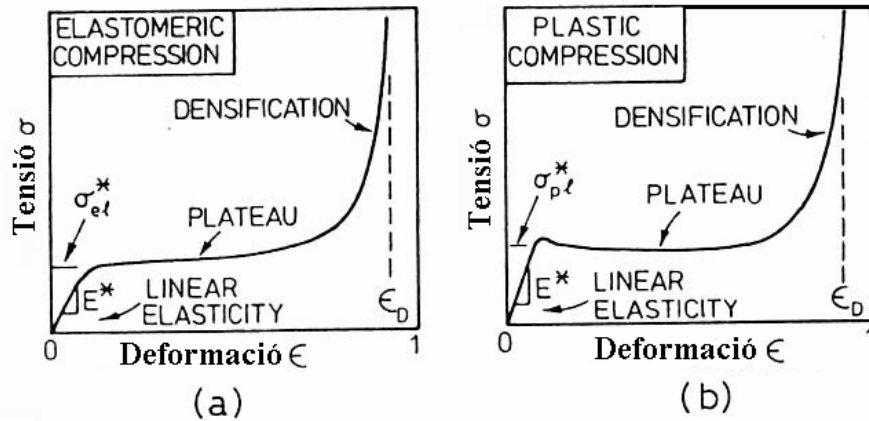


Figura 1.8. Mostra la corba tensió-deformació en compressió per a escumes; a) elastomèriques on el *plateau* es dona pel mecanisme de pandeig elàstica (*Buckling*) b) plàstic-elàstiques on el *plateau* es dona per deformació plàstica [55].

La majoria de suports polimèrics utilitzats en aplicacions d'enginyeria tissular tenen baixes densitats relatives (10-20%), així que en un assaig tensió-deformació en compressió poden assolir altes deformacions (70-80%), abans que la densificació es produísca.

Per altra banda, quan l'assaig es realitza a tracció, la resposta elàstica lineal és la mateixa que en compressió amb una menor deformació final (figura 1.9). Quan la deformació incrementa, les cel·les comencen a estar més orientades amb la direcció de la càrrega, augmenten la rigidesa del material fins que la tensió de trencament ocorre [54].

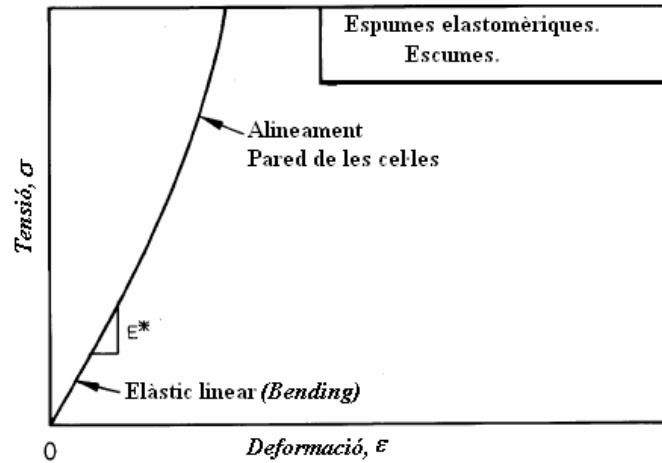


Figura 1.9. Mostra la corba tensió-deformació en tracció per una escuma elastomèrica [54].

### 1.6.3.- Models que representen les propietats mecàniques dels materials 3-D.

La resposta mecànica d'un material porós ha estat modelada per representació d'estructures cel·lulars de diferents maneres. Els models inicials feien un anàlisi d'una cel·la unitat com per exemple un dodecaedre [173][174]. Aquest tipus d'anàlisi estructural dóna un anàlisi tractable però pot no donar una representació exacta del material real (exemple escumes de poliuretà). El model més simple és l'ús d'anàlisi dimensional per modelar els mecanismes de deformació i fallada sense donar una especificació exacta de la geometria cel·lular [55]. Aquesta aproximació assumeix que la geometria cel·lular és similar en escumes de diferents densitats relatives, donant una dependència de les propietats mecàniques amb la densitat relativa i les propietats del sòlid del qual està sintetitzat. Però necessita experiments per determinar les constants relatives a la geometria cel·lular. Una tercera aproximació és l'utilització d'anàlisi d'elements finits amb estructures cel·lulars a l'atzar o regulars [66][74].

### 1.6.3.1.- Anàlisi dimensional per escumes amb cel·les obertes.

Arguments dimensionals assumeixen que les cel·les en escumes de diferent densitat relativa són geomètricament similars. Per obtenir una equació que relacione el mòdul de Young amb la densitat relativa, es considera que la geometria de la cel·la és un cub, però el mateix resultat s'obté per a qualsevol geometria de cel·la, sempre i quan el mode de deformació i fallida siguin el mateix. En règim elàstic-lineal, sota una tensió uniaxial, les cel·les obertes de les escumes deformen primerament per doblament elàstic lineal (*bending*) dels pilars/bigues. El mòdul de Young pot ser estimat com es mostra en la figura (1.10 a, b)).

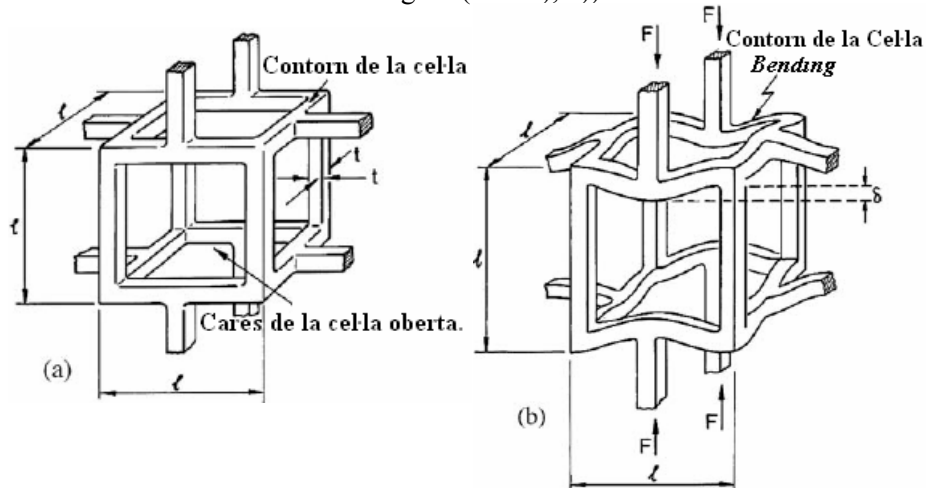


Figura 1.10. a) Anàlisi dimensional per a escumes amb cel·les obertes. (a) no deformació de la cel·la, (b) flexió elàstica-lineal de les bigues [54].

Quan s'aplica una càrrega transversal;  $F$ ; la flexió elàstica-lineal,  $\delta$ , d'una biga de longitud,  $l$ , d'àrea proporcional  $t^2$ , és donada per:

$$\delta \propto \frac{F \cdot l^3}{E_s \cdot t^4} \quad (1.2)$$

On  $E_s$  és el mòdul de Young del material en bloc.



Per altra banda, la tensió ( $\sigma$ ) actuant en la cel·la és proporcional a  $F/l^2$  i la deformació ( $\epsilon$ ) és proporcional a  $\delta/l$ , substituint valors en l'equació que dóna la relació tensió deformació en la zona elàstic-linear (lleï d'Hooke);  $\sigma = E^* \cdot \epsilon$ , obtenint la següent relació:

$$\frac{E}{E_s} \propto \left(\frac{t}{l}\right)^4 \quad (1.3)$$

On E es el mòdul de Young del material 3-D.

Finalment, la densitat relativa ( $\rho/\rho_s$ ) de qualsevol escuma amb geometria de cel·la oberta és proporcional al quadrat de la relació del espessor-longitud de biga. Per tant, finalment s'ha obtés una equació que relaciona el mòdul de Young del sòlid cel·lular i del material del qual està fabricat amb la densitat relativa al quadrat (equació 1.4):

$$\frac{E}{E_s} = C \cdot \left(\frac{\rho}{\rho_s}\right)^2 \quad (1.4)$$

A més, l'equació 1.4 combina totes les constants de proporcionalitat relacionades amb la geometria cel·lular en una única constant, C.

## ***1.7.- Mètode d'elements finits en materials porosos.***

### **1.7.1.- Introducció.**

Quan es dissenya un suport porós per a una aplicació d'enginyeria tissular, seria ideal per reduir les possibles complicacions de l'implant, que el material 3-D mimitzara les propietats mecàniques del teixit que es vol sanar o regenerar. Per exemple, l'os trabecular adopta la geometria, densitat i arquitectura interna en resposta al canvi que es produeix en les condicions de càrregues [59][155]. És per això, que es busquen models que reproduïsquen el comportament mecànic d'algunes d'aquesta aplicacions i puguin explicar l'influència dels paràmetres com; el tamany de porus, la porositat o el tamany de les goles d'interconnexió en les propietats mecàniques dels suports porosos. Les solucions analítiques són normalment limitades a problemes linears i senzilles geometries governades per simples condicions de contorn. En la pràctica, problemes enginyerils impliquen combinacions de materials, no linealitat geomètrica, geometries complexes, i una barreja de condicions de contorn. Mitjançant mètodes analítics s'han de fer molts supostos i simplificacions, arribant a un resultat final no massa exacte. Aleshores, és normal recórrer a mètodes numèrics, dels quals el més utilitzat en mecànica continua és el mètode d'elements finits (FEM). FEM és una ferramenta computacional amplament utilitzada en biomecànica, en la qual un estructura complexa es divideix en xicotetes parts o elements de geometria més senzilla, interconnectats per nodes. Els elements són enllaçats i s'apliquen les condicions de contorn, obtenim un sistema de equacions que és resolen conjuntament mitjançant iteració.

### **Generalitats de FEM.**

Les etapes que es duen a terme per resoldre un problema en FEM, són:

L'estructura o la regió d'interès (continua) es discretitzada i es subdivideix en regions més xicotetes, anomenades elements, aquests són interconnectats per nodes, a més, els nodes també es poden insertar en l'interior dels elements. En una dimensió, els elements són línees, en dos

dimensions; triangles o quadrilàters, en tres dimensions; hexaedres o tetraedres com s'observa a la figura 1.11.

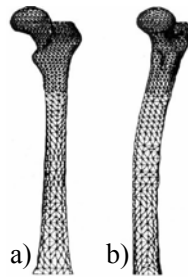


Figura 1.11. Representació en 3-D del fèmur humà mitjançant FEM. a) com a elements tetraedres, b) com a elements hexaedres [59].

Les variables desconegudes dins de l'estructura continua (tensió, desplaçament...) són definides en cada element amb adequades funcions d'interpolació. L'etapa final consisteix en resoldre el sistema d'equacions.

Per tant, FEM, és un mètode per a l'obtenció de solucions aproximades de sistemes diferencials en derivades parcials com són, per exemple; les de mecànica del sòlid deformable.

Consisteix bàsicament en establir una aproximació de la solució en funció d'una sèrie de funcions locals (funcions aproximants), ben definides i un conjunt a determinar mitjançant el compliment de les equacions del sistema. Aquestes equacions es plantegen en forma feble (integral) i no fort (puntual o diferencial).

Els elements són la porció de l'espai que és intersectada per les funcions d'aproximació associades a diferents nodes.

### **FEM en enginyeria tissular.**

El mètode d'elements finits s'ha utilitzat en moltes aplicacions com: en dislocacions de pròtesis de malucs [111][122], estudi de la variació en la resposta biomecànica dels components vertebrals (part baixa de l'espina cervical) [7], optimització de vàlvules artificials per al cor [140]. I per a optimitzar els implants d'os [66][74][157]. En molts d'aquests estudis s'ha aplicat la teoria de l'homogeneïtzació per obtenir resultats més aproximats amb un menor esforç de càlcul [66][67][126].

### 1.7.2.- Teoria de l'homogeneïtzació.

L'enfocament de l'homogeneïtzació depèn de l'assumpció d'una microestructura periòdica local, on la microestructura pot tenir diferents morfologies corresponents a diferents punts macroscòpics. De manera que, repetint una unitat bàsica d'estructura cel·lular es pot crear una regió de microestructura local en el suport porós [53][67][136]. Els principis d'homogeneïtzació es basen en:

- Definició d'una microestructura de la qual es coneix el seu comportament i s'assigna com "Element de Volum Representatiu" (RVE).
- Formulació de les condicions de contorn a escala microscòpica a partir de les variables d'entrada macroscòpiques i la seua aplicació en RVE.
- Càlcul de les variables d'eixida macroscòpiques a partir de l'anàlisi microestructural del RVE.
- Obtenció de la relació entre les variables d'entrada i eixida macroscòpiques.

La primera definició de RVE es que ha de ser estadísticament representatiu de la microestructura de la mostra. La definició més emprada de RVE és; el volum microestructural més xicotet que representa suficientment exacte les propietats macroscòpiques d'interès. En la pràctica en volta d'utilitzar un element de volum representatiu, s'empra una cel·la unitat com a model estructural per necessitar menys esforços de càlcul [53][67][136].

### 1.7.3.- Assaig de compressió en materials porosos.

Per al cas dels materials porosos sintetitzats en aquesta tesi, es consideren i es modelen com isotròpics, de manera, que la resposta mecànica dels materials 3-D poden ser determinats amb dos constants, el mòdul elàstic que depèn de la porositat i el coeficient de Poisson que és independent de la porositat com habitualment és acceptat [75].

El model dissenyat per representar l'estructura de les bastides poroses, va consistir en un cub de dimensions  $d \times d \times d$  com es veu en la (Figura 1.12a), en el qual s'insertaven esferes seguint la geometria cúbica centrada en les cares (CCC), per a posteriorment sostraure-les i obtenir un model similar als materials porosos sintetitzats (figura 1.12 b)).

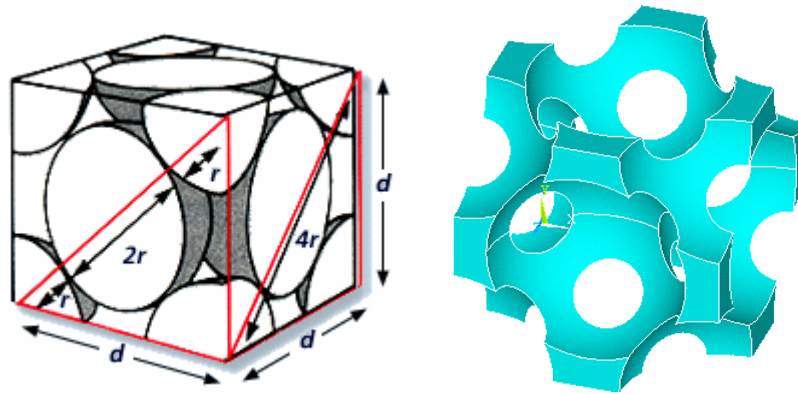


Figura 1.12. a) Model de geometria cúbica centrada en les cares (CCC).  
b) Model resultant una volta s'han sostret les esferes, que definim com a cel·la unitat.

Per tant, la figura 1.12b seria la cel·la unitat que es repeteix per formar la microestructura representativa del suport porós. L'estructura porosa final (Figura 1.13) està formada per dos cel·les unitats als eixos  $x$ ,  $z$  i una a l'eix  $y$ . Finalment, per modelar el comportament mecànic del materials 3-D, es va reproduir l'assaig tensió de compressió deformació experimental en l'estructura resultant representativa; un hexaedre on l'ample era el doble que l'altura (Figura 1.13). Com a variable d'entrada es van imposar xicotetes deformacions (aproximadament d'un 10%), que és la zona elàstic lineal. Com a variable d'eixida es va obtindre una distribució de tensions en el sistema. El mòdul elàstic es va calcular per la teoria de l'homogeneïtzació, obtenint un mòdul de Young promig de l'estructura porosa (Figura 1.13) [15].

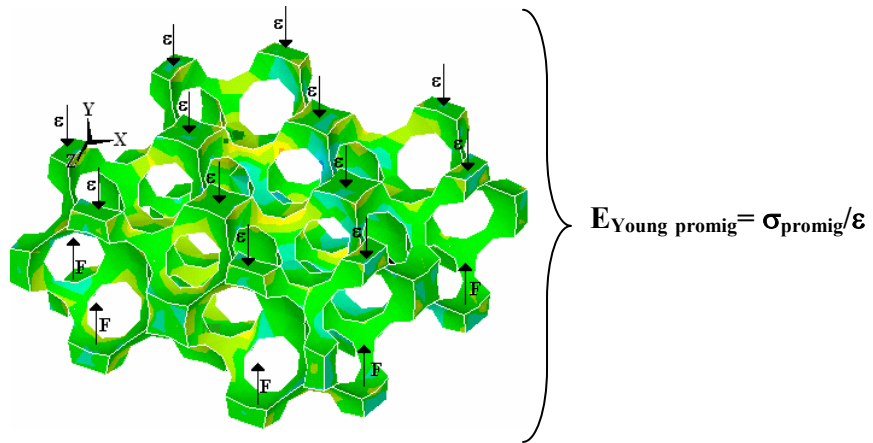


Figura 1.13. Estructura representativa dels suports porosos. Càlcul del mòdul de Young mitjançant la teoria de l'homogeneïtzació.

## **Capítol 2.- Experimental.**

### ***2.1.- Introducció.***

En aquest capítol, es fa un repàs general de tots els materials, monòmers, procediments experimentals i equips que han estat utilitzats en les diverses investigacions. Els monòmers utilitzats han estat de la família dels acrilats, ja que els acrilats són materials biocompatibles que s'han utilitzat amb èxit en aplicacions biomèdiques. El tipus de polimerització ha estat per radicals lliures i sempre mitjançant fotoiniciadors. Les tècniques experimentals utilitzades han estat; polimerització per radicals lliures, per suspensió, sinterització de matrius, obtenció de materials porosos, càlcul de densitats i porositats. Els equips utilitzats per caracteritzar els materials han estat; microscopi òptic i electrònic, infraroig, assajos mecànics dinàmics, assajos a compressió, assajos calorimètrics, font de raigs gamma. Finalment, s'ha utilitzat un maquinari d'elements finits (ANSYS) per modelar el comportament mecànic dels materials porosos.

## 2.2.- Materials i mètodes experimentals.

### 2.2.1.- Materials.

#### 2.2.1.1.- Monòmers.

Dels diferents estudis que integren aquesta tesi, els materials obtesos tan en blocs, com en materials porosos, han estat sintetitzats mitjançant polimerització per radicals lliures, i els monòmers de partida han estat acrilats (*Aldrich* amb una puresa major del 99%). Els monòmers utilitzats han estat; acrilat d'etil (EA) i metacrilat d'hidroxietil (HEMA) (Figures 2.1, 2.2), que s'han utilitzat tant per a polimerització en bloc com per síntesis de materials porosos.

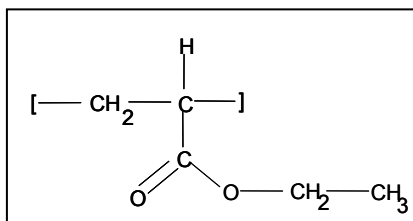


Figura 2.1. Acrilat d'etil.

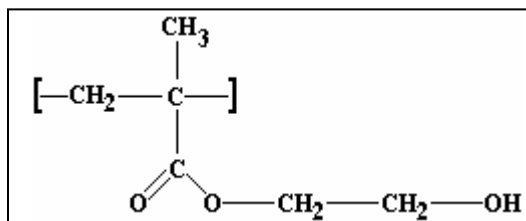


Figura 2.2. Metacrilat d'hidroxietil.

Altres dos monòmers utilitzats en menor mesura són; el metacrilat d'etil (EMA) i l'acrilat de butil (BA), figures (2.3, 2.4).

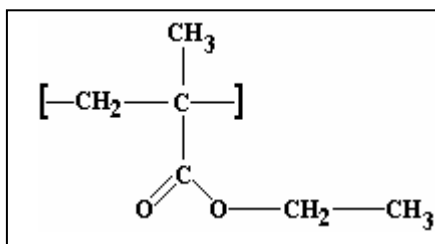


Figura 2.3. Metacrilat d'etil.

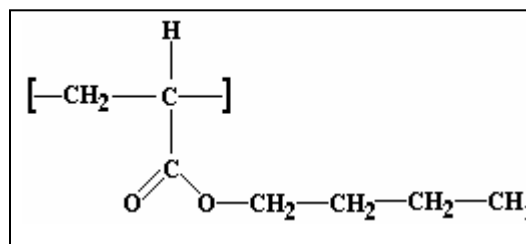


Figura 2.4. Acrilat de butil.



### 2.2.1.2.- Entrecreadors i iniciador.

Les polimeritzacions s'han dut a terme sempre amb l'incorporació d'un entrecreador per donar lloc a xarxes polimèriques (Figura 2.5). S'han emprat dos entrecreadors (*Aldrich* amb una puresa major del 99%); el dimetacrilat d'etilenglicol (EGDMA) i el dimetacrilat de trietilenglicol (TEGDMA), figures (2.6. i 2.7).

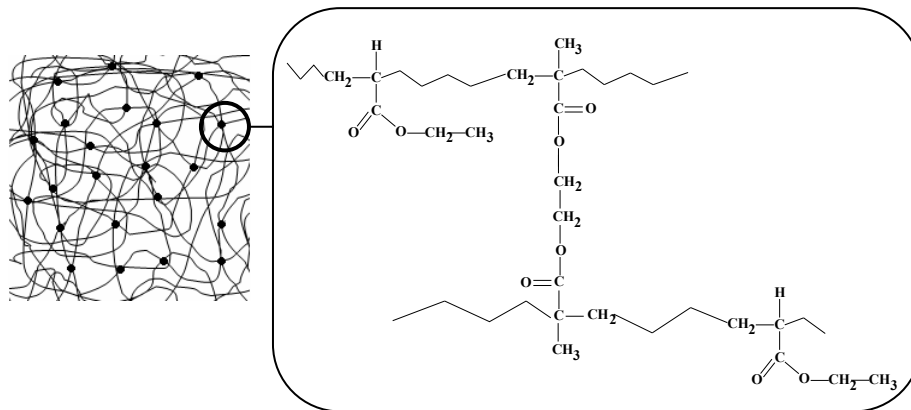


Figura 2.5. Xarxa polimèrica d'EA entrecreuada amb EGDMA

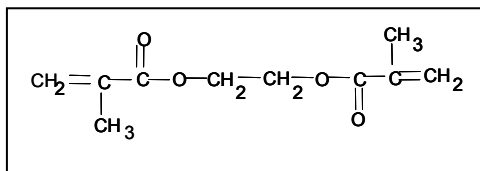


Figura 2.6. Dimetacrilat d'etilenglicol (EGDMA).

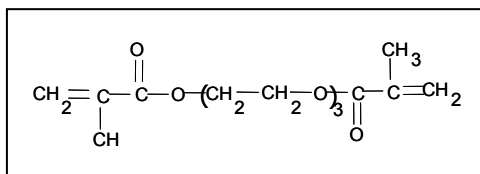


Figura 2.7. Dimetacrilat de trietilenglicol (TEGDMA).

Com a iniciador s'ha utilitzat un fotoiniciador com la benzoïna (*Scharlau* amb una puresa major del 98%), figura 2.8, que es descomposa en radicals lliures en presència de llum ultraviolada.

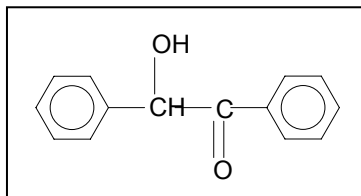


Figura 2.8. Fotoiniciador, Benzoïna.

### 2.2.1.3.- Dissolvents i Polimetacrilat de Metil (PMMA).

Per al procés de síntesis o per netejar el material s'han utilitzat diversos dissolvents; com diclorometà, acetat d'etil, etanol i aigua destil·lada, tots de *Scharlau* de grau de puresa síntesis. Per obtenir els materials porosos s'han utilitzats dos tipus de Polimetacrilat de metil (PMMA) comercial; Colcaryl DP 300, esferes de PMMA d'alta densitat, diàmetre  $90 \pm 10 \mu\text{m}$  i Colacryl TS1881 densitat mitja, diàmetre  $35 \pm 10 \mu\text{m}$ . Un tercer tipus de PMMA de baix pes molecular que s'ha sintetitzat al laboratori mitjançant polimerització per suspensió.

### 2.2.2.- Procediments experimentals.

#### 2.2.2.1.- Polimerització per radicals lliures.

La polimerització per radicals lliures es duu a terme de la següent manera: en primer lloc es fa la barreja en solució del/s monòmer/s i entrecreuador, els percentatges sempre van referits al pes total de la barreja. Després s'ha afegit el fotoiniciador, un 0.2% en pes, se injecta tota la solució en un motlle i es col·loca a la càmera ultraviolada fins al límit de conversió.

### 2.2.2.2- Polimerització en bloc.

Els polímers en bloc es sintetitzen mitjançant polimerització per radicals lliures, com s'explica en el punt anterior. Una volta obtingut el polímer, es fa un tractament a 90°C durant 2 h i posteriorment es neteja amb etanol en soxhlet durant 24 h per eliminar les molècules de baix pes molecular. Finalment es seca a buit fins a pesada constant.

### 2.2.2.3.- Sinterització de matrius.

Per a sintetitzar materials porosos es necessita prèviament fabricar una matriu amb esferes de PMMA. Aquest procediment anomenat sinterització consisteix en introduir dins d'un motlle que es troba entre dos plats, microesferes de PMMA, amb la possibilitat d'aplicar una pressió constant (entre plats) mitjançant un caragol. Una volta introduït el PMMA es compacta i se li aplica una pressió inicial entre plats, es duu al forn per un període de 30 minuts, a la temperatura de sinterització  $T_{\text{sint}}$  del PMMA (depenent del PMMA utilitzat la temperatura pot estar en l'interval de temperatura [140-180] °C). En finalitzar aquest temps, s'aplica una pressió final entre plats i es torna a introduir al forn a la temperatura  $T_{\text{sint}}$  per un període d'una hora. Amb aquest tractament, obtenim una matriu amb una porositat desitjada, que estarà dins de l'interval de treball [35-5] %, depenent de la pressió final aplicada.

### 2.2.2.4.- Polimerització per suspensió.

Un tipus de PMMA (de baixa densitat) es fabrica mitjançant polimerització en suspensió. En un reactor amb aigua a 80°C, s'ha afegit el monòmer, metacrilat de metil (MMA), més el termoiniciador (peròxid de benzoil), una volta polimeritzat es filtra amb aigua i àcid sulfúric, i les esferes obteses es tamisen per classificar-les per diàmetres.

### 2.2.2.5.- Obtenció de materials porosos.

Es prepara la barreja monomèrica desitjada i s'injecta sobre els buits d'una matriu de PMMA prèviament sinteritzada, es duu a la càmera ultraviolada on polimeritza mitjançant radicals lliures fins a límit de conversió. Després, la matriu i el material format s'introdueixen en un soxhlet amb diclorometà durant 48 h, per eliminar el PMMA. El següent pas, és canviar el diclorometà per alcohol 24 h en soxhlet per tal d'eliminar les

molècules de baix pes molecular. Finalment, s'intercanvia l'alcohol per aigua i les mostres són secades fins a pesada constant.

#### 2.2.2.6.- Càlcul de densitats.

La densitat del material en bloc es determinada per pesada de cada mostra en aire i posterior pesada de la mostra en immersió en n-octà a 25 °C. S'utilitzà una balança *Mettler AE240* amb una sensibilitat de 0.01 mg i que duu un accessori per a densitat *Mettler ME3360*. Mesures de densitat es van fer amb un mínim de tres mostres i el valor final de cada densitat té un error menor del 3%.

#### 2.2.2.7.- Càlcul de porositats.

La fracció de volum de porus en el material 3-D; la porositat, es determina gravimètricament per pesada de la mostra en sec i unflada en aigua, utilitzant un accessori de buit. La porositat es defineix com:

$$P = \frac{V_{\text{porus}}}{V_{3-D}} \quad (2.1)$$

On,  $V_{\text{porus}}$  és el volum ocupat pels porus i  $V_{3-D}$  és el volum ocupat pel suport porós, que és la suma del  $V_{\text{porus}}$  i el  $V_{\text{polímer}}$  (és el volum que ocupa el polímer del qual està fabricat el material 3-D). Per tant:

$$V_{3-D} = V_{\text{porus}} + V_{\text{polímer}} \quad (2.2)$$

Aleshores, amb l'equació (2.3) tenim una relació entre  $V_{\text{porus}}$  del material 3-D, la massa del material 3-D eixugat ( $m_{3-D}^e$ ) i unflada amb aigua ( $m_{3-D}^u$ ).

$$V_{\text{porus}} = \frac{m_{3-D}^u - m_{3-D}^e (w^* + 1)}{\rho_{\text{aigua}}} \quad (2.3)$$

On;  $w^*$  és l'aigua absorbida en equilibri dividida per la massa del polímer eixugat. Assumint que l'aigua que conté el polímer en equilibri és la mateixa en el material en bloc que en el material 3-D, per una composició donada.

Finalment, el volum del material 3-D que ocupa el polímer ( $V_{\text{polímer}}$ ), s'obté dividint la massa del material 3-D eixugat ( $m_{3-D}^e$ ) per la densitat del material en bloc ( $\rho_b$ ) del qual esta fabricat.

$$V_{\text{polímer}} = \frac{m_{3-D}^s}{\rho_b} \quad (2.4)$$

El càlcul de porositat és referit per a un mínim de tres mostres i l'error es menor d'un 3%.

## 2.3.- Equips.

### 2.3.1.- Microscòpic òptic i electrònic.

En aquesta tesi, s'ha emprat el microscòpic òptic [NIKON Eclipse E600] per estudiar qualitativament la morfologia dels materials porosos. Per aprofundir en l'estudi de les morfologies del material, s'ha utilitzat el microscòpic electrònic "Hitachi S-3200N", realitzant talls transversals i longitudinals a les mostres i donant-li una capa d'or a 15 kV abans de captar les imatges.

### 2.3.2.- Font de raig gamma.

L'aparell utilitzat per irradiar les mostres va ser un font primària de raigs gamma de Cobalt 60, de l'empresa ARAGOGAMMA, S.A. Les dosis a les quals es van treballar van ser (7, 15, 25 i 50) kGy. Les mostres estaven empaquetades a buit i la forma era rectangular amb unes dimensions  $30 \times 15 \times 1 \text{ mm}^3$ .

### 2.3.3.- Espectroscòpia infraroja de transformada de Fourier (FTIR).

Els espectres dels polímers en bloc, es van fer mitjançant Espectroscòpia Infraroja Transformada de Fourier (FTIR) en la regió de nombre d'ona entre  $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$  a temperatura ambient, en un aparell espectròmetre Nicolet Nexus en mode Reflectància Total Atenuada (ATR). L'espessor de les mostres en promig va ser 1 mm. Cada espectre realitzat a una mostra és el resultat de vint agranades a la velocitat d'una agranada per segon. La resolució de l'espectròmetre va ser  $4 \text{ cm}^{-1}$ .

### 2.3.4.- Espectroscòpia dinàmica mecànica (DMS).

Espectroscòpies dinàmica-mecàniques (DMS) es van realitzar en un aparell *Seiko DMS210* a una velocitat de calfament de 1°C/min des de -150 a 200 °C, a la freqüència de 1 Hz. El tipus d'assaig va ser a tracció i les mostres tenien forma rectangular amb unes dimensions aproximades de 10X2.5X0.8 mm<sup>3</sup> i estaven totalment eixugades.

### 2.3.5.- Assajos de compressió per suports porosos.

Els assajos de compressió es van realitzar en un equip *Microtest TPF-1D* amb una cèl·lula de càrrega de 15 N. Les condicions dels assajos es van fixar seguint la norma "ASTM D1621-00, *Standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Cellular Solids*", on la velocitat de deformació es 0.06 mm/s, i l'assaig es realitza a temperatura ambient. La compressió es dugué fins a col·lapsament dels suports porosos. Les dimensions de les mostres foren, cilindres de 5 mm de radio i 3 mm de alt.

### 2.3.6.- Calorímetre (DSC).

Els experiments calorimètrics es van fer mitjançant un calorímetre diferencial d'escombrada *DSC, Perkin-Elmer (Pyris)*. El calibrat de l'aparell es va fer mitjançant indi, benzè i zinc. La fusió de l'indi es va utilitzar per calibrar el flux de calor. El benzè i el zinc es van utilitzar per calibrar la temperatura en l'interval [5-419] °C. Mentre es realitzen les mesures es fa passar un fluxe de nitrogen sec de 20 ml/min a través de la cel·la on es troba la mostra, per evitar la condensació del vapor d'aigua.

Per calcular temperatures de transició vítria ( $T_g$ ), el programa que es realitza és el següent (Figura 2.9); a) Escombrada de calfament fins arribar a temperatures entre [70-150] °C depenent de la composició de la mostra, per eliminar la història tèrmica. b) Rampa de refredament fins a -40°C a una velocitat de 40°C/min. c) Rampa de calfament a 10 °C/min fins a [70-150] °C depenent la composició. e) Immediatament després de fer l'assaig calorimètric de la mostra, es fa una línia base amb dos càpsules de referència i el mateix programa de temperatura. L'escombrada del calfament de la mostra i la línia base es resten per eliminar les possibles interferències.

De la corba resultant s'obté la temperatura de transició vítria, que es calcula a partir del punt d'inflexió d'aquesta corba.

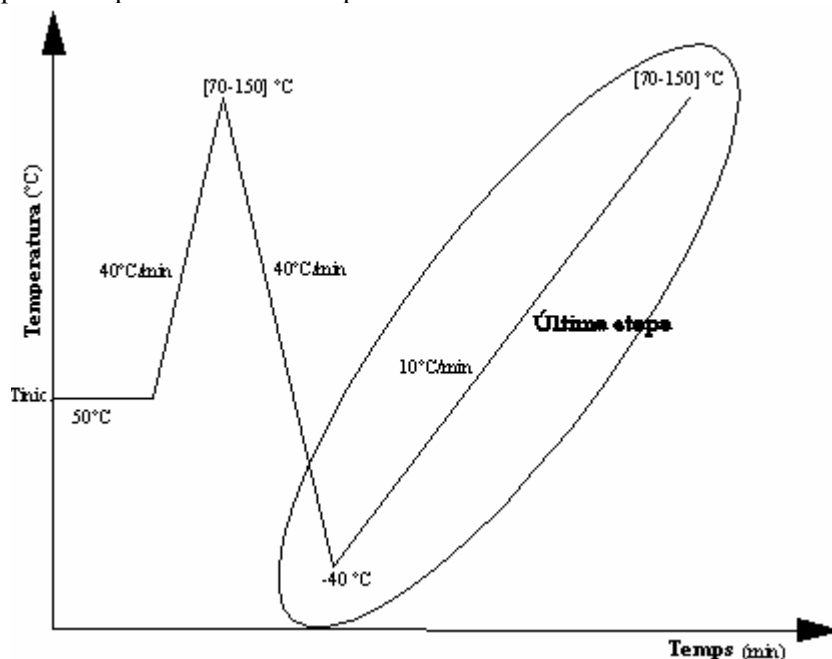


Figura 2.9. Programa de temperatures per calcular  $T_g$ . L'última etapa s'aplica per obtenir la línia base. No hi ha escales, per ser un gràfica indicativa del programa que es realitza per obtenir les dades necessàries per calcular la  $T_g$  dels diferents materials.

Per conèixer amb detall l'heterogeneïtat d'un copolímer es realitzen en el calorímetre assajos de relaxació estructural. El programa que es segueix és el següent (Figura 2.10): Una volta eliminada la història tèrmica, la mostra es refredada a una velocitat de 40 °C/min, fins a una temperatura  $T_a$  (prop de la  $T_g$ ), on es fa una isoterma durant un període de 200 min, i es de nou refredada a 40 °C/min fins a -40°C. La subsegüent escombrada de calfament té una velocitat de 10 °C/min i arriba fins a la temperatura inicial que pot estar entre [70-150] °C, depenent de la composició del material. Immediatament de cada experiment, una agranada de referència que consisteix en refredar la mostra de la temperatura més alta a la temperatura més baixa a una velocitat de 40 °C. D'aquesta manera la línia base del DSC corresponent a la isoterma i la referència són prou idèntiques. La posició de la mostra en el forn del DSC es col·loca de la mateixa forma. La diferència



entre ambdues escombrades es zero amb gran exactitud al principi i al final del termograma. El fluxe de calor normalitzat, el qual té unitats de capacitat calorífica s'obté dividint el fluxe de calor que dóna l'aparell per la massa i la velocitat de l'escombrada de calfament. Aquest fluxe de calor normalitzat és utilitzat en volta del valor absolut del calor específic.

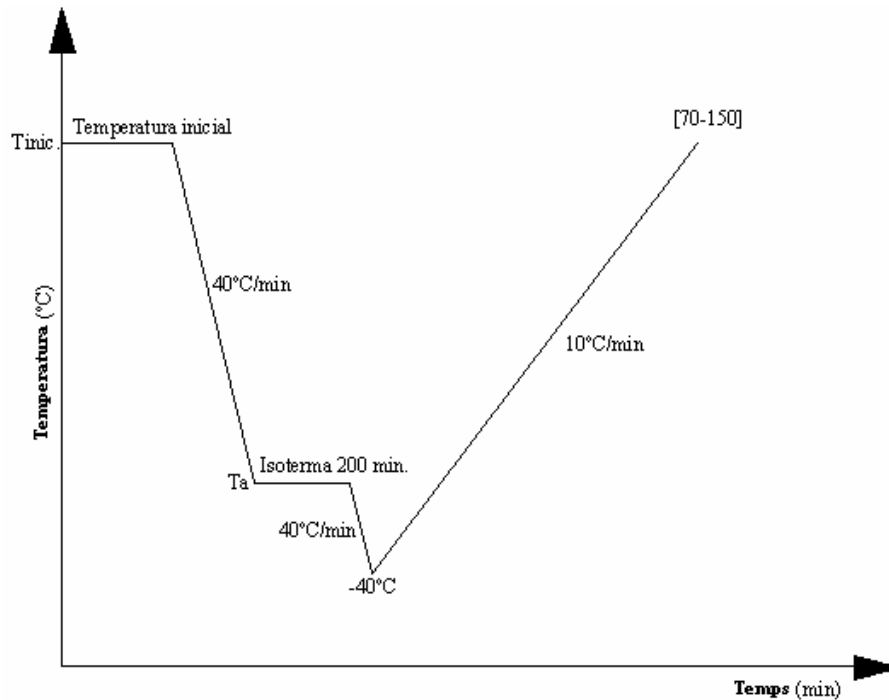


Figura 2.10 Programa de temperatures per obtenir les relaxacions estructurals d'un copolímer. No hi ha escales, per ser un gràfica indicativa del programa que s'utilitza per als diferents materials.

## 2.4.- Model d'elements finits.

Es va decidir treballar amb un maquinari d'elements finits, per buscar un model que simulara el comportament mecànic dels materials porosos. El maquinari utilitzat va ser *Ansys Package (Versió 10.0)*. El model va consistir en un cub de dimensions  $d \times d \times d$  (Figura 2.11 a)), en el qual s'insertaven esferes seguint la geometria cúbica centrada en les cares, per a posteriorment sostraure-les i obtenir un model similar als materials porosos sintetitzats (Figura 2.11 b)). Per mallar s'utilitzà elements tetraèdrics (sòlid 92), un element de 10 nodes amb funcions d'interpolació quadràtica en el desplaçament, que es adient per estructures complexes.

L'estudi es va realitzar per una banda, per suports porosos amb porositat constant i variant el diàmetre de porus. Tres diàmetres de porus van ser testats; 35, 90 i 250 micres. Per altra banda, es van estudiar estructures amb diferents porositats i diàmetre de porus constant de 90 micres (Figura 2.11). Per crear les diverses estructures, primer cas; porositat constant i variació del diàmetre de porus, és fixa la relació diàmetre del porus ( $\phi$ )/costat del cub ( $d$ ) en el model cúbic centrat en les cares. De manera que, quan varia el diàmetre del porus ( $\phi$ ) també ho fa el costat del cub ( $d$ ) mantenint la relació  $\phi/d$  constant com s'ha fixat prèviament. Pel contrari, quan es pretén dissenyar estructures amb porositat variable però amb diàmetre de porus constant, es va variant la relació diàmetre del porus ( $\phi$ )/costat del cub ( $d$ ) en el model cúbic centrat en les cares, per a un diàmetre fixe.

Finalment, les estructures creades eren hexaedres on l'ample era el doble que l'altura (Figures 2.11, 2.12). Es va prendre com a límit de nodes 32000, per dos motius; perquè les estructures resultants eren representatives de les mostres reals i perquè augmentant les dimensions de les estructures significava augmentar el nombre de nodes, el que equival a un major temps de resolució.

Com es va assumir una microestructura del material porós localment periòdica, significa, que repetint una unitat bàsica es pot crear la microestructura del material porós. La composició del material constituït de l'estructura 3-D, va estar el Poliacrilat d'etil, que s'aproxima a un comportament elàstic lineal i isòtrop, amb un mòdul de Young mesurat experimentalment de 31 Mpa i coeficient de Poisson 0.3.

Per simular el comportament mecànic de les estructures, es va seguir una metodologia que reproduguera l'assaig tensió de compressió deformació

del materials porosos "ASTM D1621-00, *standard Test Method for Compressive Properties of Rigid Cellular Solids*". Com l'estudi tractava de veure el comportament dels materials porosos en la zona elàstica lineal i el material tenia propietats isotropes, el tipus d'anàlisi va ser estàtic en teoria de xicotetes deformacions. Les condicions de recolzament es van aplicar en l'eix X i Z, i en l'altura superior dels materials es van aplicar desplaçaments, reproduint l'assaig real de compressió (Figura 2.13).

El mòdul elàstic va ser calculat mitjançant la teoria de l'homogeneïtzació, obtenint el sumatori de les forces de reacció en Y, en la part inferior on es van imposar les condicions de recolzament, i després dividint el sumatori de forces per la superfície de l'estructura calculant així un tensió promig. Finalment, al conèixer la deformació aplicada per ser una variable d'entrada, es va calcular el mòdul de Young promig de l'estructura.

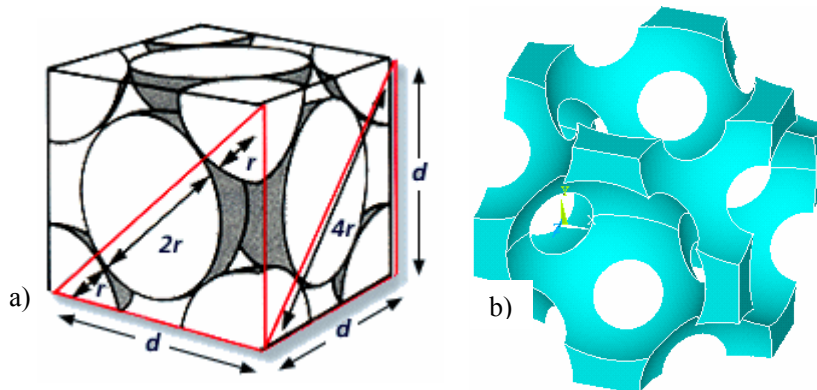


Figura 2.11 a) Model de geometria cúbica centrada en les cares. b) Model resultant una volta s'han sostret les esferes.

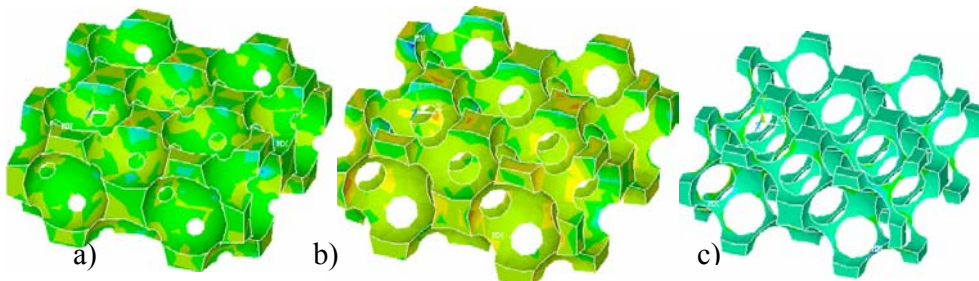


Figura 2.12. Estructures poroses amb diàmetre de porus constant 90 micres. a) 78% de porositat, b) 86% de porositat i c) 94% porositat.

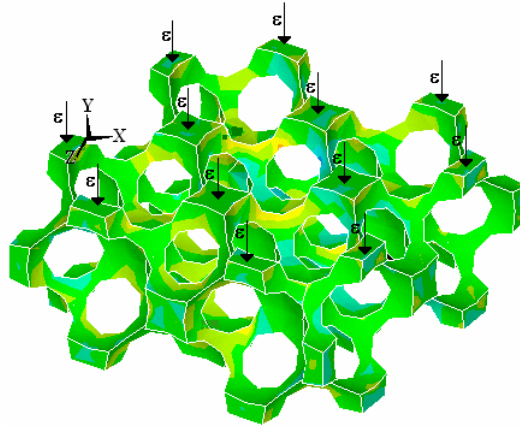


Figura 2.13. Simulació assaig tensió de compressió deformació. La deformació s'aplica en l'eix Y en la direcció de les fletxes. Les condicions de recolzament s'apliquen sobre X i Z.

## **Capítol 3.- Resultats i Discussió.**

### ***3.1.- Introducció.***

En aquest capítol s'assoleixen bàsicament cinc investigacions per arribar a l'objectiu principal d'aquesta tesi; l'obtenció d'un mètode de síntesi de suports polimèrics porosos amb una arquitectura determinada; porus esfèrics i interconnectats, però amb la flexibilitat de poder variar la composició, porositat i el diàmetre de porus amb independència. Amb la finalitat d'utilitzar aquests materials en aplicacions de enginyeria tissular. Però abans d'arribar a la síntesi de materials polimèrics porosos cal conèixer prèviament tan la microestructura del copolímer que forma la bastida 3-D, com la variació de les propietats mecàniques, físiques i químiques davant d'un procés d'esterilització amb raig  $\gamma$ .

En l'estudi d'aquest tipus d'estructures aprofundirem en el comportament d'aquestes bastides polimèriques quan és varia la hidrofilitat del material base del qual està sintetitzat i com afecta aquest paràmetre l'arquitectura del suports porosos. També s'investigarà quines són les causes que fan que l'estructura porosa és col·lapse i perquè amb altres tipus de condicions el material 3-D resulta perfectament interconnectat. Finalment, s'estudiarà com influeixen els paràmetres que defineixen l'arquitectura dels suports porosos; tamany de porus, porositat i tamany de goles d'interconnexió en les propietats mecàniques d'aquests materials. Per això, es realitzaran assajos a compressió de diverses estructures poroses variant la porositat i el diàmetre de porus, contrastant aquestes dades experimentals amb les obteses amb un model d'elements finits (FEM) on es reproduceix el comportament elàstic lineal dels materials 3-D, i es realitza un estudi més detallat de la influència dels paràmetres geomètrics de l'estructura porosa en les propietats mecàniques.

### **3.2.- Arquitectura molecular del copolímer EA/HEMA.**

#### **3.2.1.- Introducció.**

L'objectiu principal d'aquesta tesi és clar, sintetitzar materials porosos per aplicacions en enginyeria tissular. Però abans d'arribar a la síntesi de materials porosos cal fer uns estudis previs; el primer estaria entendre l'heterogeneïtat d'un copolímer polimeritzat per radicals lliures amb components hidrofílics i hidrofòbics, que serà el material base de l'estructura porosa. Hem de tenir en compte que la distribució espacial de dominis hidrofòbics en el substrat d'un polímer pot estar clau per a l'adhesió cel·lular, viabilitat i proliferació de cèl·lules cultivades in vitro. És per això que el primer estudi que es realitza en aquesta tesi és; **“L'estructura de xarxes de copolímers de Poli(acrilat d'etil-co-metacrilat d'hidroxiètil) mitjançant estudis de dinàmica de segments basats en experiments de relaxació estructural”**. Es va pensar en EA com a monòmer hidròfob i HEMA com a monòmer hidròfil, perquè ambdós han estat utilitzats en aplicacions d'enginyeria tissular sent biocompatibles.

#### **3.2.2.- Discussió i resultats.**

Primerament, es va sintetitzar mitjançant polimerització per radicals lliures una sèrie de cinc copolímers, a partir d'una solució d'acrilat d'etil (EA) i de metacrilat d'hidroxiètil (HEMA) amb un 0.2% en pes de fotoiniciador (benzoïna) i 2% en pes de dimetacrilat d'etilenglicol (EGDMA) com entrecreuador. Els components purs anomenats PEA i PHEMA, més tres copolímers amb fracció màssica d'HEMA en la barreja inicial de 0.7, 0.5 i 0.3 anomenats respectivament CH70, CH50 i CH30.

Per caracteritzar tota la sèrie de copolímers, en primer lloc, es van fer mesures mecàniques-dinàmiques i DSC convencional, per obtenir un visió general del sistema de moviments conformacionals que tenen lloc a diferents temperatures. En segon lloc, es van fer experiments de relaxació estructural obtenint un major detall dels moviments conformacionals a diferents temperatures. I finalment, els resultats obtesos és correlacionen amb la composició del copolímer que prediu el model terminal, el qual relaciona la composició del copolímer amb la proporció de barreja inicial i la relació de reactivitats dels monòmers.

Els espectres de relaxació dinàmica-mecànica de les xarxes de poliàcrilat d'etil (PEA) i del Polimetacrilat d'hidroxietil (HEMA) mostren un pic màxim que correspon a una relaxació principal o un procés  $\alpha$  (Figura 3.1).

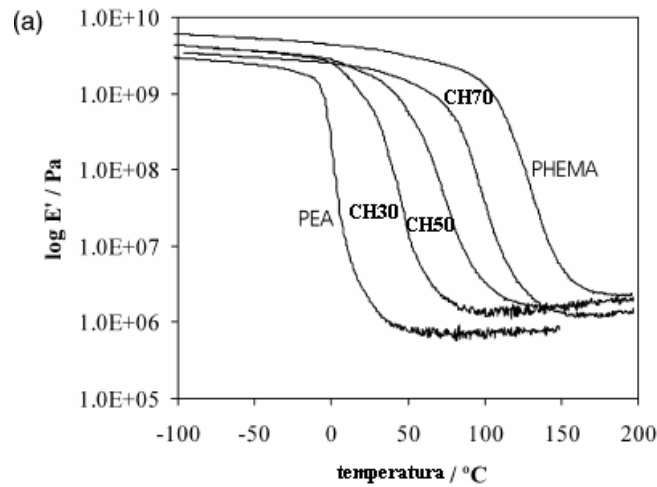


Figura 3.1 (a). Mesura del  $\log E'$  a 1 Hz, per al PEA i PHEMA a més dels copolímers de composició intermèdia CH30, CH50 i CH70.

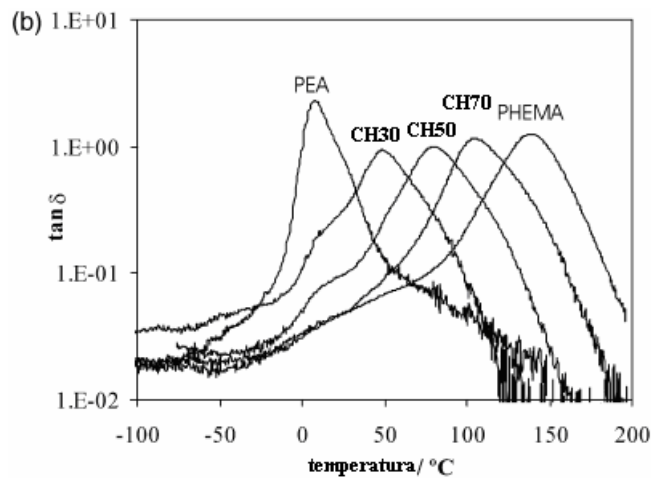


Figura 3.1 (b). Mesura de la pèrdua de tangent mecànica a 1 Hz, per al PEA i PHEMA a més dels copolímers de composició intermèdia CH30, CH50 i CH70.

Les temperatures del màxim de la pèrdua de  $\tan \delta$  (Figura 3.1 b)) són 9 i 140 °C respectivament, que corresponen a la relaxació principal o procés  $\alpha$ . Un pic ample a temperatures baixes en la corba del PHEMA potser atribuït a una relaxació secundària  $\beta$  [88] associada al moviment locals de les cadenes laterals del polímer com més avant es discutirà. Espectroscòpia dinàmica mecànica (DMS) en els copolímers CH30, CH50 i CH70 mostra dos processos de relaxació de diferent intensitat localitzada entre les temperatures de les relaxacions principals dels polímers purs (PEA, PHEMA). El major pic es troba a temperatures altes i la seua intensitat és similar a la relaxació principal de la xarxa PHEMA, independentment de la composició del copolímer. Pel contrari, el segon pic és molt més xicotet i ocorre a baixes temperatures, prop de la relaxació de la xarxa de PEA, en aquest cas, l'intensitat sí que depèn de la composició. Quan el percentatge d'HEMA és major en el copolímer el procés de relaxació té una menor intensitat (Figura 3.1 b). La figura 3.2 mostra els termogrames de calfament de tots els polímers en un calorímetre diferencial d'escombrada (DSC). En el PEA i el PHEMA una única transició vítria  $T_g$  es reflexa en les gràfiques, amb valors  $T_g = -12$  °C i  $T_g = 90$ °C, respectivament. Pel contrari, als copolímers la situació és diferent; CH30 i CH70 mostren un únic pic i un ampla transició vítria entre els dos components purs, i en CH50, encara que s'observa també un únic pic i ampla transició, dos etapes diferents poden deduir-se del termograma.

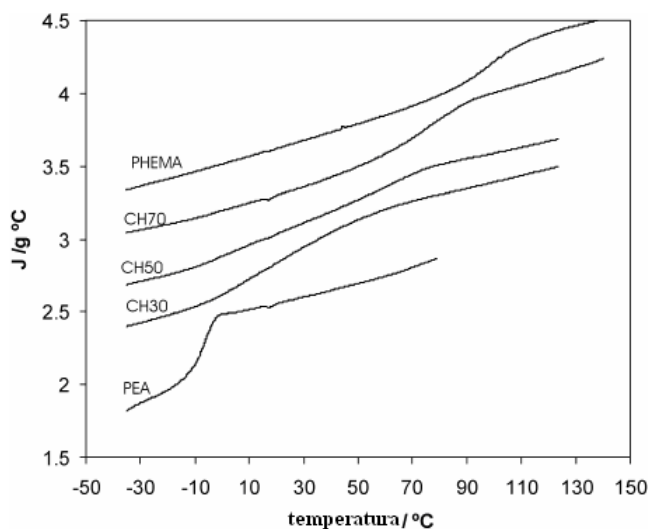
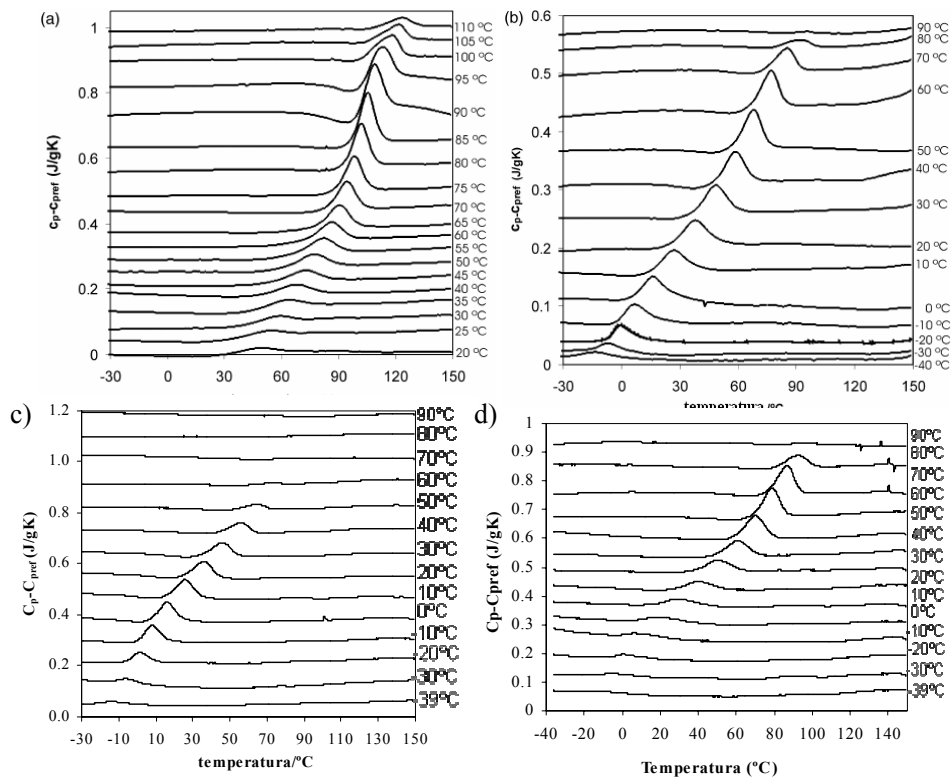


Figura 3.2. Termogrames DSC dels components purs PEA, PHEMA i els copolímers intermedis obtesos a una velocitat de calfament de 10 °C/min.



Per obtenir un anàlisi més detallat d'aquest sistema, totes les mostres van ser sotmeses a experiments de relaxació estructural que inclou una isoterma per un temps de 200 min a diferents temperatures (cada 5°C en les xarxes pures i cada 10°C en els copolímers). Després de cada història tèrmica es va realitzar un termograma de calfament seguit d'una escombrada de referència sense canvi en la posició de la mostra i la càpsula de referència en el forn del DSC. Aquests dos termogrames es van utilitzar per calcular la diferència entre el flux de calor normalitzat per les dos escombrades (com és descriu en la introducció punt 1.3). Degut al procediment experimental aquesta magnitud és igual a la diferència entre la capacitat calorífica en l'escombrada de l'isoterma i la referència ( $c_p - c_{ref}$ ). Com exemple representatiu la figura 3.3, mostra ( $c_p - c_{ref}$ ) obtesa de les xarxes pures de PHEMA i PEA, i dels tres copolímers 30%HEMA CH30, 50%HEMA CH50 i 70%HEMA CH70. Les magnituds dels pics depenen de la temperatura a la qual es realitza la isoterma i tendeix a desaparèixer a temperatures suficientment més alta i més baixa que la  $T_g$ .



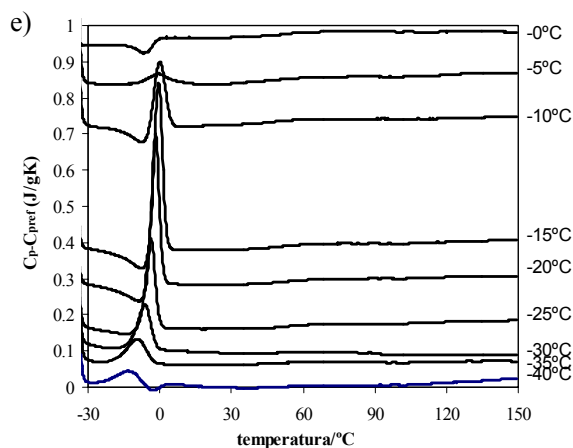


Figura 3.3. Dependència de la temperatura de  $c_p-c_{ref}$  calculada per al PHEMA a), copolímer CH50 (b), copolímer CH30 (c), copolímer CH70 (d) i la xarxa pura de PEA (d) dels termogrames mesurats després de la isoterma per un període de 200 min a la temperatura mostrada en la gràfica. Les corbes han estat col·locades verticalment per major claredat visual.

La teoria de la copolimerització permet estimar, mitjançant el model terminal la composició del copolímer [3][97] una volta el procés de polimerització ha finalitzat. La fracció molar dels monòmers  $F_i$  en el copolímer en termes de fracció molar dels monòmers en la barreja inicial de reacció  $f_i$  i la constant de reactivitat del monòmers  $r_i$  apareix en la següent equació:

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{f_1(f_1 \cdot r_1 + f_2)}{f_2(f_2 \cdot r_2 + f_1)} \quad (3.1)$$

Les constants de reactivitat [12] són 0.189 i 11.21 per EA i HEMA respectivament. Aquesta enorme diferència té una conseqüència immediata. Els radicals d'HEMA tenen una major tendència a reaccionar amb els monòmers d'HEMA que amb els d'EA. Per altra banda, la baixa constant de reactivitat d'EA significa que els monòmers tenen una major afinitat cap als monòmers d'HEMA que cap als d'EA. La composició que prediu el model terminal (equació 3.1) es mostra en la figura 3.4.

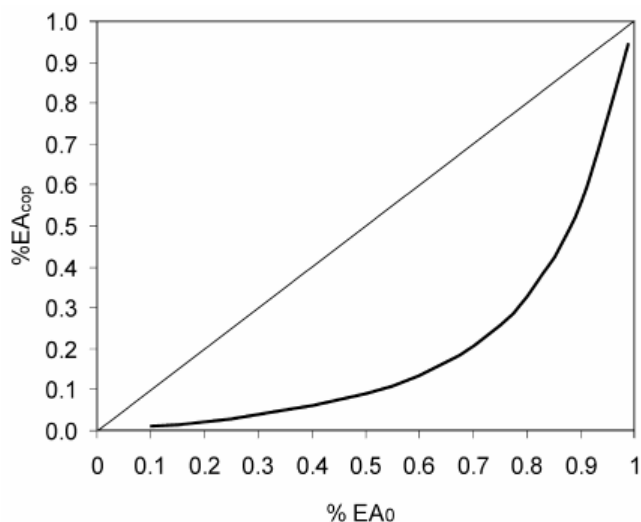


Figura 3.4. La corba representa la fracció molar d'EA en el copolímer com prediu el model terminal ( $\%EA_{cop}$ ), com una fracció molar de monòmers d'EA en la barreja de reacció ( $\%EA_0$ ). La línia recta dona la composició d'un copolímer a l'atzar on la fracció de monòmers de la barreja inicial es manté també en el material polimeritzat.

La línia recta que s'observa en la figura 3.4 dona la composició d'un copolímer a l'atzar on la fracció de monòmers de la barreja inicial és manté també en el material polimeritzat. La predicció teòrica és la corba que es troba per baix d'aquesta línia recta i s'observa com la quantitat d'EA en les cadenes del copolímer és sempre menor que en la barreja monomèrica inicial, suggerint un sistema format per cadenes de d' EA i HEMA amb un cert ordre, ja que blocs d'HEMA estaran preferencialment presents. L'idea és; que primerament els monòmers d'HEMA són completament consumits de la barreja inicial, la resta d'EA no reaccionant dona lloc a un homopolímer dels seus monòmers. Tanmateix, la manera en la qual les cadenes són espacialment distribuïdes en copolímer sintetitzat no pots ser obtesa sols de la teoria de la copolimerització. En aquest sentit, si la copolimerització es va dur a terme amb una fracció molar d'HEMA de 0.7 en la barreja inicial, el copolímer resultant hauria de tenir al voltant d'un 30% de cadenes de PEA. Per tant, caldria pensar que hi haurà dos fases ben definides en el material; per una banda, cadenes d'un copolímer format pels dos monòmers i per altra, cadenes d'EA pur, que haurà de reflexar-se en dos transicions vítries ben definides i per tant, serà observable en una escombrada de DSC convencional. Però aquest no és el cas (Figura 3.2), per

tant, una major investigació és necessària si es vol clarificar la configuració de les cadenes en el copolímer. Els resultats obtinguts amb DMS i els experiments de relaxació estructural suggereixen l'existència d'un sistema de composició heterogènia per a la copolimerització dels comonòmers EA i HEMA per radicals lliures. Espectres dinàmico-mecànics mostren dos processos de relaxacions estructurals que es poden veure clarament en la pèrdua de  $\tan \delta$  (Figura 3.1 b). El major pic pot ser atribuït a la relaxació principal de les cadenes i la seua posició depèn de la composició del copolímer, el que té un major percentatge d'HEMA, la relaxació principal es dona a major temperatura. Per altra banda, l'espectre mecànic mostra un pic de relaxació a més baixa temperatura l'origen del qual crea una certa controvèrsia. En aquest sentit, si es pensa que el copolímer és un sistema a l'atzar, on hi ha una distribució estadística d'ambdós monòmers a través de les cadenes, el pic potser ser atribuït a una relaxació secundària o un procés  $\beta$ . Tanmateix, si hi havia alguna classe de separació de fases en el sistema inclòs a escala nanomètrica, aquest pic a baixa temperatura pot ser degut a una relaxació principal en el material. Encara que és complicat de quantificar l'intensitat d'aquesta relaxació a baixa temperatura degut a la superposició del pic principal, el que si es pot apreciar és, l'augment de la seua intensitat quan el contingut d'EA al copolímer és major. Com la relaxació secundària ha de ser deguda a les unitats d'HEMA, hi ha un mínim d'argument qualitatiu per atribuir la relaxació a baixa temperatura a la presència de regions riques d'EA en el material al tenir un menor  $T_g$  que la mitja. Amb el propòsit de discernir si la relaxació en l'espectre mecànic és la conseqüència d'un procés  $\alpha$  o  $\beta$ , el DSC va ser emprat, ja que aquesta tècnica no és sensible als moviments associats amb relaxacions secundàries perquè aquestes no contribueixen a la capacitat de calor específic dels materials. A la figura 3.2, s'observen termogrames de totes les composicions, però, un termograma no conté prou informació per decidir si hi ha o no dominis en el material que poden ser atribuïts a distintes fases, és a dir, si hi ha algun grau de separació de fases.

Nous desenvolupaments del DSC convencional, tècnica anomenada mostreig de calorimetria tèrmica "*calorimetric thermal sampling*" el qual proporciona informació detallada de la heterogeneïtat en materials multifases [56][57]. La metodologia està basada en experiments de relaxació estructural on es fixa una isoterma durant un temps en una ample interval de temperatures al voltant de la transició vítria. L'existència d'un pic en el termograma de calfament després de l'isoterma per a un temps donant a una temperatura fixada és una conseqüència d'un apropament entàlpic cap a l'estat d'equilibri durant l'etapa isoterma, així, també és una indicació que els moviments conformacionals tenen lloc en el material a la temperatura a la

qual es fa l'isoterma  $T_a$ . La figura 3.3, mostra la magnitud dels pics els quals relacionen la relaxació entàlpica isoterma i la tendència és a minvar quan la temperatura s'allunya de la  $T_g$ . Això significa, que al ser el temps isotherm constant, moviments dels segments són més ràpids en la regió de la transició vítria. A temperatures més altes, però encara en la regió de la transició vítria, la dinàmica del procés és encara més ràpida però la magnitud del pic es redueix dràsticament, perquè la distància a l'equilibri s'acurta. L'àrea definida pels pics ( $c_p-c_{ref}$ ) (Figura 3.3) permet identificar l'interval de temperatures on tenen lloc els moviments conformacionals en el material. Tanmateix, la determinació exacta de la pèrdua d'entalpia és complicada, especialment quan aquesta magnitud és xicoteta. Per aquesta raó, l'altura del pic en la corba ( $c_p-c_{ref}$ ), és a dir,  $(c_p-c_{ref})_{màxim}$ , potser calculada molt més exactament i per tant, és preferible per caracteritzar l'interval de temperatura dels moviments dels segments a l'escala de temps que tenen lloc al DSC [56]. És interessant remarcar la forma dels pics mostrats pel PHEMA després de l'isoterma a les temperatures més altes 100 o 105 °C (Figura 3.3), ja que sembla el resultat de la superposició de dos pics. Aquesta característica potser entesa com una conseqüència de l'heterogeneïtat en la temperatura de transició vítria del PHEMA. Es podria pensar, que poden hi haver regions amb una major densitat d'entrecruament o de ponts d'hidrogen que la mitjana, però, en ambdós casos, aquestes regions haurien de presentar un temperatura de transició vítria més elevada i el procés de relaxació estructural hauria de produir pics dobles en el termograma [14][104].

Per tal d'entendre millor el tipus d'estructura del material, dibuixem la figura 3.5, que mostra  $(c_p-c_{ref})_{max}$  com una funció de la temperatura isoterma per tota la sèrie de copolímers. Per al cas de la xarxa de PEA, es veu que l'interval on el moviments conformacionals tenen lloc és estret. Un màxim ben definit és dona quan la temperatura isoterma està al voltant de -20°C, que són aproximadament 8°C per baix de la  $T_g$  entàlpica i els moviments conformacionals continuen fins a -40°C, 28°C per baix de la  $T_g$ . La fenomenologia de la relaxació estructural en cas del PHEMA és diferent, com s'observa en la corba  $(c_p-c_{ref})_{max}$  (Figura 3.5). El màxim per la temperatura isoterma està localitzat en 85°C, 15°C per baix de la  $T_g$ , però moviments conformacionals són detectables inclòs fins a temperatures 70°C per baix de la  $T_g$ , com mostra la llarga cua de la corba de PHEMA (Figura 3.5). A més, l'altura del màxim de la corba és aproximadament el 50% que per a la xarxa de PEA. El valor de  $(c_p-c_{ref})_{max}$  mesurat després d'una isoterma a una temperatura donada ( $T_a$ ), és proporcional al nombre de unitats monomèriques que participen en el procés de relaxació a la temperatura  $T_a$ . Per tant, l'altura i l'amplària de la corba  $(c_p-c_{ref})_{max}$  tenen el seu significat

físic. Per una banda, si el interval de temperatura en el qual la temperatura de transició vítria té lloc és estret, com el cas del PEA, significa que la majoria de massa del material relaxa a la mateixa velocitat a cada temperatura isoterma. Per una altra banda, un ample interval de transició vítria reflexa la presència de fluctuacions en la  $T_g$  en el material i com a conseqüència, sols una part dels segments del polímer participa en el procés de relaxació estructural, per cada temperatura isoterma.

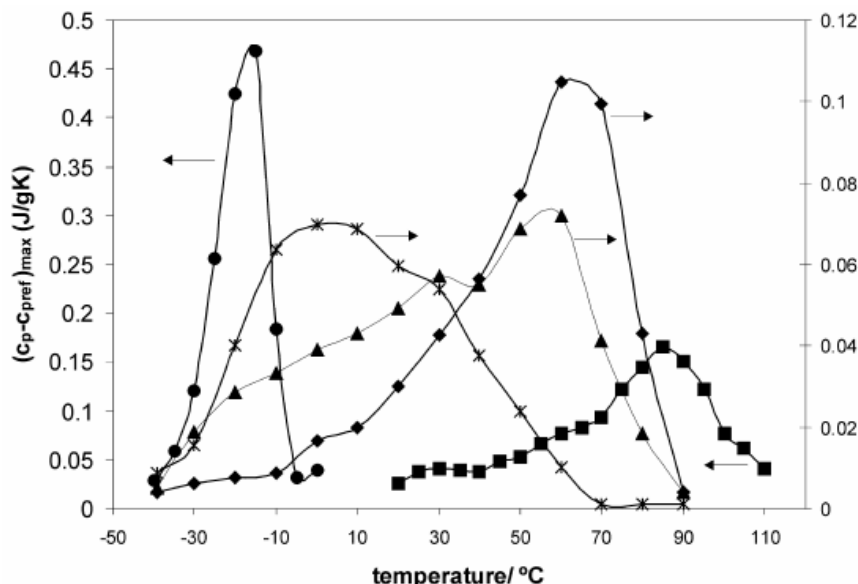


Figura 3.5. Màxims dels pics  $(c_p - c_{ref})_{max}$  front la temperatura per PEA (●), PHEMA (■), i copolímers CH03 (\*), CH05(◆) i CH07 (▲). Les línies entre punts serveixen de referència.

Els sistemes heterogenis mostren una corba  $(c_p - c_{ref})_{max}$  més ampla. Per al cas dels tres copolímers s'observa que reagrupaments conformationals són possibles en un ampli interval de temperatura. El màxim de la corba no segueix una evolució monotònica amb la composició de les mostres. Quan la quantitat de HEMA en el material és major del 50% la posició del màxim està prop del PHEMA, aproximadament 60°C. Tanmateix, en el copolímer CH30, el màxim es troba situat a 0°C i la forma de la distribució és significativament diferent. Per altra banda, el copolímer CH70 mostra una llarga cua que arriba fins a temperatures de -40°C i la major part del moviments conformationals tenen lloc a temperatures on també són presents moviments de la xarxa de PHEMA. En certa manera, la distribució d'aquest copolímer és com la del PHEMA però desplaçada a baixes temperatures. Per

tant, hi ha un interval de temperatura entre  $-10$  i  $20$  °C, on la pèrdua d'entalpia no és nul·la per als copolímers però no es mostra activitat conformacional en les xarxes pures. Com s'ha enunciat a l'introducció, una regió del material en la qual reagrupaments cooperatius tenen lloc, sense pertorbar la resta del material és anomenada regió de reagrupaments conformacionals (CRR) [1]. El tamany d'aquesta regió és relativa a la longitud de la cooperativitat i està al voltant de pocs nanòmetres en la temperatura de transició vítria, a temperatures majors que la  $T_g$  la longitud de la regió cooperativa augmentarà [36]. Per tant, al copolímer CH70 suggereix que una proporció significant d'ambdós components (EA i HEMA) són presents en la regió de reagrupaments cooperatius. A més, com la corba  $(c_p - c_{ref})_{max}$  del CH70 és ampla indica que hi ha un gran interval de distribució de ambdues composicions, és a dir, existeixen cadenes de composició heterogènia (barreges de EA i HEMA) en les regions de reagrupaments cooperatius del copolímer. Per una altra banda, el copolímer CH30 exhibeix un comportament un poc diferent. La corba  $(c_p - c_{ref})_{max}$  és també asimètrica però ara la corba s'allarga cap a temperatures per dalt del màxim. Tres intervals de temperatures poden ser distingits. El primer, a temperatures altes, on els moviments conformacionals tenen lloc tant en els copolímers com en la xarxa de PHEMA pur. El segon que estaria ubicat entre  $-10$  °C i  $20$  °C on l'activitat conformacional té lloc en els copolímers però no en les xarxes dels components purs. I finalment, el tercer interval estaria comprès per les temperatures on tenen lloc els moviments de reagrupaments cooperatius de la xarxa de PEA. De nou, un ample interval de temperatures suggereix la composició heterogènia dels dominis del material, però ara és important adonar-se que el procés de relaxació a temperatures més baixes ha de ser degut a l'existència de regions de reagrupaments cooperatius de cadenes de PEA. Això ens pot indicar que la mostra CH30 té una distribució de cadenes amb diferents proporcions de segments d'EA i en el qual els dominis d'HEMA predominen com es mostra en la part dreta de la corba  $(c_p - c_{ref})_{max}$  per aquest copolímer. Per al cas de la corba  $(c_p - c_{ref})_{max}$  del copolímer CH50 s'observa que no és asimètrica com els altres dos copolímers, però sembla estar composta per dos distribucions superposades. La primera, a temperatures més altes, donant un pic màxim a uns  $65$ °C i finalitza a uns  $90$  °C aproximadament, que és la temperatura isoterma on apareix el màxim per a la xarxa de PHEMA, poden ser atribuïts a dominis rics de PHEMA pur. Tanmateix, no pot hi haver dominis d'HEMA pur en el material, perquè en aquest cas, moviments conformacionals tindrien lloc també a temperatures més altes com ocorreix en el la xarxa de PHEMA. Per altra banda, la distribució de composició del material a temperatures més baixes és deguda a dominis rics d'EA, comença

a  $-40^{\circ}\text{C}$ , la mateixa temperatura on els moviments conformacionals comencen per a la xarxa de PEA i finalitza aproximadament a  $30\text{-}40^{\circ}\text{C}$ . Aquest interval de temperatura cobreix tota la distribució de la xarxa d'EA i es prolonga fins a temperatures on les xarxes pures no mostren mobilitat de cadenes ( $-10$  a  $20^{\circ}\text{C}$ ). Per tant, a l'haver en les corbes dels copolímers pics a temperatures isoterms en tot l'interval de temperatures de la xarxa de PEA, indica de nou l'existència de dominis de PEA pur, on els moviments conformacionals de PEA tenen lloc sense pertorbar la resta del material. Aleshores, al copolímer CH50 es pot veure com a mesura que augmenta la quantitat d'HEMA en la CRR, la posició dels pics de la corba  $(c_p - c_{ref})_{\text{màx}}$  es mouen a temperatures més altes. Finalment, hi ha un canvi qualitatiu similar a l'inversió de fases en barreges de polímers, on els dominis rics d'HEMA són plastificats per molècules d'EA, seguint una tendència de  $(c_p - c_{ref})_{\text{màx}}$  similar al copolímer CH70.

Aquesta fenomenologia suggereix que hi ha una distribució de les regions de reagrupaments cooperatius (CRR), en la qual el tamany està al voltant de uns pocs nanòmetres, amb un ample interval de composicions. Per dir-ho qualitativament; hi ha dos classes de dominis; els que contenen segments amb els dos monòmers, però les unitats d'HEMA són predominants, i els que contenen cadenes de PEA pur. D'aquesta manera, CH50 i CH70 mostren una corba de  $(c_p - c_{ref})_{\text{màx}}$  asimètrica desplaçant-se cap a altes temperatures, on la distribució de la corba de la xarxa de PHEMA es troba ubicada. Per altra banda, la corba  $(c_p - c_{ref})_{\text{màx}}$  del copolímer CH30 es troba prop de la de la xarxa d'EA, però mostra una llarga prolongació cap altes temperatures, el que indica el predomini d'unitats de HEMA en el copolímer. Aquest comportament també pot ser explicat en termes de la dependència de la composició i la temperatura amb el tamany de la regió de reagrupaments cooperatius. Que està en concordança amb l'equació proposada per Donth [37], on el volum de un CRR és:

$$V_a(\phi) \approx \left[ \frac{T_g(\phi) - c_2}{T - (T_g(\phi) - c_2)} \right]^2 \quad (3.2)$$

On  $\phi$  dona la composició i  $c_2$  és el paràmetre de Williams–Landel–Ferry [46]. La temperatura de transició vítria d'una barreja binària depèn de la seua composició (aquest desenvolupament es pot fer a partir de la  $T_g$  d'un component de la barreja o de l'altre), i així, pot ser assumit que la transició vítria calorimètrica té lloc quan el volum del CRR arriba a un valor crític (diferents nanòmetres). Per tant, quan major és la quantitat d'HEMA en un domini, major és la seua transició vítria. Aleshores, un domini amb una



composició més rica en HEMA tindrà una major temperatura a la qual el volum crític és obtingut, la qual cosa induïx a una distribució de  $T_g$  com a conseqüència de la fluctuació de la composició.



### 3.3.- Efectes de la radiació $\gamma$ en el copolímer EA/HEMA.

#### 3.3.1.- Introducció.

Els materials utilitzats com a biomaterials han d'interaccionar amb sistemes biològics; tan quant s'utilitzen com implants com per experiments de cultiu cel·lular *in vitro*.

Per tant, prèviament a la seua utilització el material ha d'estar esterilitzat, per evitar qualsevol infecció que pugui fer fracassar l'implant o experiment. Però depenent del mètode utilitzat per esterilitzar, l'entorn i la composició del material, es poden produir canvis en les propietats mecàniques i químiques del biomaterial. En aquest treball s'ha emprat radiació gamma per esterilitzar els materials, degut a que, els materials porosos es mostren més sensibles a la contaminació dels microorganismes i la radiació gamma ha estat un mètode que ha donat bons resultats en aplicacions d'enginyeria tissular, per ser altament penetrant, el que representa un avantatge respecte als altres mètodes si es va a treballar en estructures poroses o es vol que el material estiga empaquetat.

Per contra, alguns polímers sofreixen canvis en les propietats mecàniques i estructurals quan són irradiats; donant lloc a la generació de radicals lliures, escissions o entrecreuaments de la cadena principal i subseqüentment canvi en la distribució del tamany de la cadena en el polímer en bloc. A més, l'acció combinada de radiació ionitzant i oxigen pot implicar diferents canvis en l'estructura del polímer per la creació de nous grups funcionals com; carbonils, carboxils, esters, hidroxils, insaturacions, a més, d'escissions i entrecreuaments són molt sovint induïts.

Per tant, el segon estudi que s'assoleix és entendre; **“L'Efecte de la radiació- $\gamma$  en l'estructura de les xarxes de copolímers de Poli(acrilat d'etil-co-metacrilat d'hidroxietil) per aplicacions d'enginyeria tissular”**. On s'estudia la influència de la radiació- $\gamma$  sobre les propietats mecàniques i estructurals de la sèrie de copolímers sintetitzats en l'apartat anterior (punt 3.2). Per tal d'esbrinar els possibles canvis en les propietats mecàniques totes les mostres són caracteritzades mitjançant espectroscòpia dinàmica-mecànica. Per comprovar els possibles canvis estructurals o de generació de nous grups funcionals, la tècnica utilitzada serà espectroscòpia Infraroja de Transformada de Fourier (FTIR) en mode de Reflectància Total Atenuada (ATR).

### 3.3.2.- Discussió i resultats.

Primerament, es va sintetitzar mitjançant radicals lliures la sèrie de cinc copolímers; les xarxes pures de PEA i PHEMA, i els tres copolímers CH70, CH50 i CH30, amb una fracció massica en la barreja inicial de 0.7, 0.5 i 0.3, respectivament. En tots els casos, hi havia un 0.2% en pes de benzoïna i 2% en pes de dimetacrilat d'etilenglicol (EGDMA) com entrecruador. Es va estudiar l'efecte de la radiació- $\gamma$  en l'estructura dels cinc copolímers, per Espectroscopia Dinàmica-Mecànica (DMS) i Infraroig de Transformada de Fourier (FTIR) en un interval de dosis de radiacions que girava al voltant de la dosi estàndard per esterilització, 25 kGy. Les mostres de dimensions aproximades;  $30 \times 15 \times 1 \text{ mm}^3$ , van ser empaquetades amb aire i van estar irradiades amb una font primària de Cobalt 60 (empresa ARAGOGAMMA, S.A.), les dosis utilitzades van ser 7, 15, 25 i 50 kGy.

Primerament, es va comparar les diferents propietats mecàniques de les mostres abans i després de ser irradiades. Per al cas de la sèrie de copolímers sense irradiar, és coneixia prèviament l'heterogeneïtat de cada sistema per l'estudi realitzat amb anterioritat [132]. Els experiments de relaxació estructurals realitzats mitjançant DSC, indiquen que els copolímers P(EA-co-HEMA) no són a l'atzar, però les seues cadenes estan formades per gran quantitat de monòmers d'HEMA i un menor percentatge d'EA, i degut a la l'alta diferència de reactivitat dels dos comonòmers, algunes cadenes de PEA pur són també presents en el sistema final.

Per al cas de la sèrie de cinc copolímers en bloc, una volta irradiats amb les diferents dosis de radiació- $\gamma$ , es realitzen assajos dinàmics-mecànics (DMS), per conèixer els possible canvis en les propietats mecàniques respecte a les mostres amb mateixa composició sense irradiar. A la figura 3.6, es mostra els espectres DMS dels homopolímers PHEMA, PEA i copolímers CH30; CH70. Les corbes contenen les diferents dosis de radiació inclosa la mostra sense irradiar (Figura 3.6). Observant les gràfiques, a primer cop d'ull sembla que no hi hagut cap canvi en les propietats mecàniques, ja que les corbes en tots els casos es veuen sobreposades. Però, amb un tractament de les dades es pot obtenir una visió més detallada de la variació del mòdul de goma amb la les dosi de radiació- $\gamma$ .

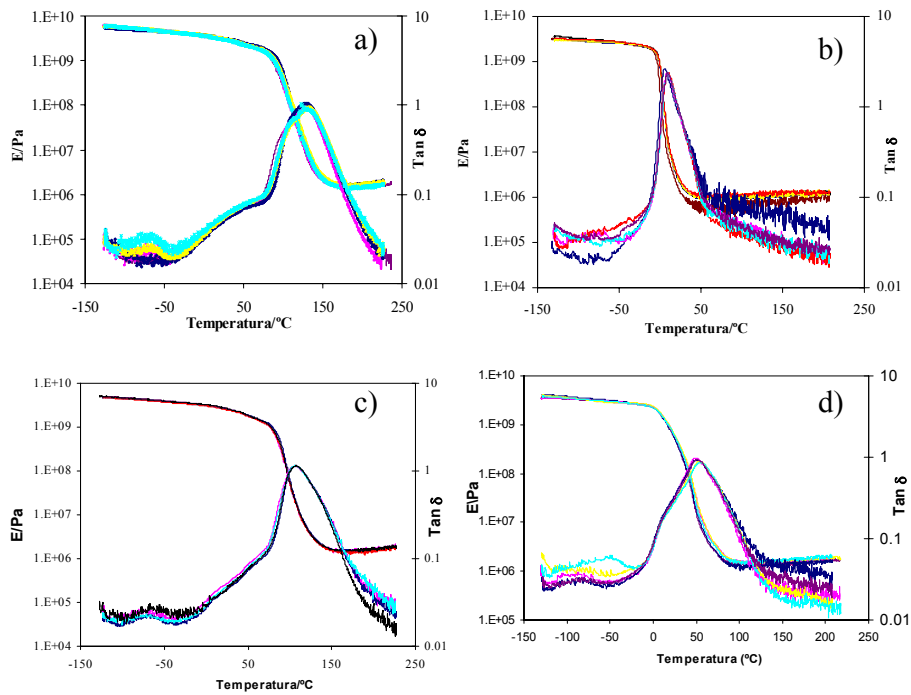


Figura 3.6. Espectres de relaxació dinàmic-mecànic dels homopolímers a les diferents dosis, inclosa la mostra no irradiada. a) PHEMA homopolímer, b) PEA homopolímer i les xarxes dels copolímers c) CH70 i d) CH30.

És per això, que representem una gràfica on es mostra la variació relativa del mòdul de goma dels homopolímers en funció de la dosi de radiació gamma utilitzada en el procés d'esterilització (Figura 3.7).

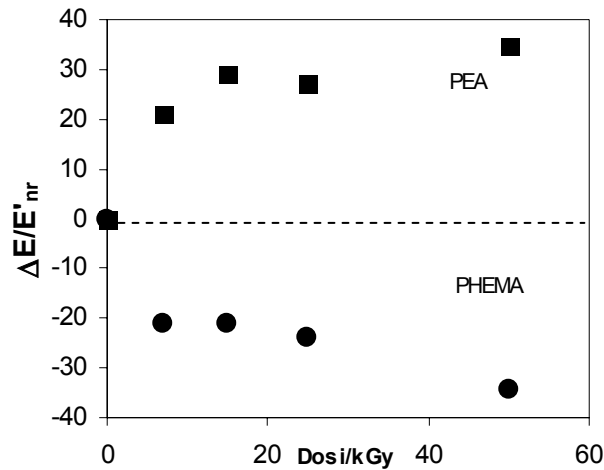


Figura 3.7. Variació relativa (respecte a les mostres no irradiades) del mòdul de goma a diferents dosis de radiació per als homopolímers PEA i PHEMA.

A la figura 3.7, si que es pot observar clarament com a mesura que la dosi de radiació  $\gamma$  augmenta, el mòdul de goma és major per al cas del PEA i menor per al cas del PHEMA, comparats amb les mostres sense irradiar. El valor del mòdul de goma està relacionat amb els paràmetres de l'estructura de la xarxa d'un polímer per la teoria d'elasticitat del cautxú [44], mitjançant l'equació (3.3).

$$E' = \frac{3 \cdot n_c \cdot R \cdot T}{V} \quad (3.3)$$

On  $T$  és la temperatura a la qual el mòdul de goma  $E'$  és mesurat,  $R$  és la constant dels gasos,  $V$  és el volum de la mostra i  $n_c$  el nombre de mols de cadenes elàsticament actives. L'efecte de la radiació- $\gamma$  en  $E'$  (Figura 3.7), potser interpretat com un canvi en la densitat de cadenes elàsticament actives ( $n_c/V$ ) com es relaciona en l'equació 3.3. La tendència de  $n_c/V$  és a disminuir quan la dosi de radiació augmenta per a l'homopolímer de PHEMA, i ha de ser degut a que es produeix escissions de les cadenes. Però per al cas de l'homopolímer de PEA l'increment de les cadenes elàsticament actives ha de ser degut a que la radiació- $\gamma$  indueix nous entrecreuaments. A banda, es pot calcular el pes molecular promig entre punts d'entrecreuaments amb l'equació (3.4);

$$\bar{M}_c = \frac{\rho}{n_c / V} \quad (3.4)$$

On,  $n_c/V$  és conegut i la densitat  $\rho$  va estar calculada mitjançant pesada de cada una de les mostres en aire i posteriorment submergides en n-octà a 25°C. Les mesures de densitats de les mostres irradiades no mostren canvis respecte a les mostres no irradiades. Aquestos paràmetres s'han calculat per als dos homopolímers purs i es mostren en la taula 1.

Mostres	DOSIS (kGy)									
	0		7		15		25		50	
	$\frac{n_c(mol)}{V(cm^3)}$	$\bar{M}_c$ (g/mol)	$\frac{n_c(mol)}{V(cm^3)}$	$\bar{M}_c$ (g/mol)	$\frac{n_c(mol)}{V(cm^3)}$	$\bar{M}_c$ (g/mol)	$\frac{n_c(mol)}{V(cm^3)}$	$\bar{M}_c$ (g/mol)	$\frac{n_c(mol)}{V(cm^3)}$	$\bar{M}_c$ (g/mol)
<b>PHEMA</b>	0.0027	4457	0.0022	5650	0.0022	5636	0.0021	5863	0.0018	6801
<b>PEA</b>	0.0014	9993	0.0014	8243	0.0015	7747	0.0015	7848	0.0015	7425

Taula 3.1. Mostra l'efecte de les dosis de radiació en els paràmetres estructurals de les xarxes d'homopolímers.

Com era d'esperar, el pes molecular promig entre punts d'entrecruament disminueix en l'homopolímer de PHEMA i incrementa en el de PEA.

L'existència d'un procés d'oxidació en el material és característic quan s'utilitza radiació- $\gamma$  com a mètode d'esterilització [43], es per això, que s'ha caracteritzat les diferents mostres mitjançant espectroscòpia Infraroja (FTIR), mode Reflectància total atenuada (ATR). A la figura 3.8, es mostren els espectres de dos xarxes; a) el PEA pur i b) el copolímer CH50 sense irradiar i amb les diferents dosis de radiació on no s'aprecien canvis qualitatius.

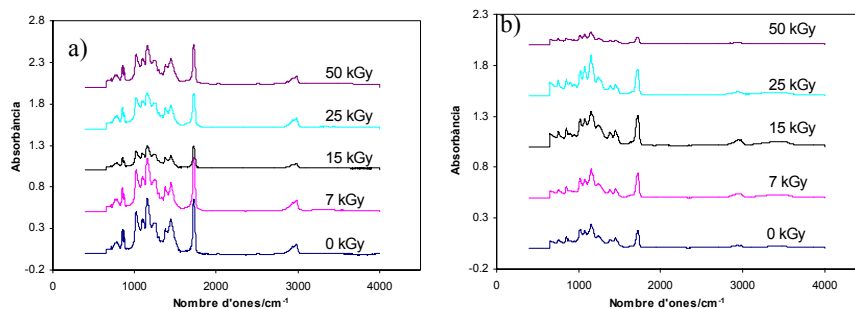


Figura 3.8. Espectres (FTIR) de les mostres sense irradiar i amb les diferents dosis de radiació. a) Xarxa de PEA pur, b) copolímer CH50.

L'existència de processos d'oxidació en el material quan és irradiat, és característic per la presència de noves bandes d'absorbància en l'interval de nombre d'ona  $[1680-1800\text{ cm}^{-1}]$ , el qual conté els grups carbonils, acils i carboxils com; cetones, aldehids, esters, i àcids [45]. Açò no és la situació que es dona als diferents copolímers com s'observa a la figura 3.8, on no apareixen nous grups funcionals pel procés d'irradiació. Per tant, el procés d'esterilització no induïx a la formació de nous grups funcionals per un procés oxidatiu, ja que als altres tres copolímers de la sèrie, els espectres FTIR són iguals com s'observa a la figura 3.8.

Els resultats obtesos són concordants amb els diferents estudis que hi ha a la bibliografia [125]. Polímers de tipus  $(\text{CH}_2\text{-CR}'\text{R}'')$ , amb carbonis quaternaris com el PHEMA, sofreixen predominantment escissions, mentre que polímers de tipus  $(\text{CH}_2\text{-CHR})$ , amb carbonis terciaris com el PEA, són més susceptibles de produir entrecreuaments. En general, polímers amb altes concentracions de carbonis quaternaris al llarg de les cadenes tendeixen a sofrir escissions, mentre que polímers que no compten amb aquesta característica, tenen com a principal efecte de la radiació  $\gamma$  la producció d'entrecreuaments. A més, es conegut que la presència d'insaturacions en la cadena del polímer promou els entrecreuaments (com en el cautxú natural) [125]. Com hem vist, encara que el PEA i PHEMA semblen tenir una estructura química bastant similar, hi ha una diferència subtil que fa que tinguin diferents tipus mecanismes de reacció davant radiació ionitzant. Per una banda, PEA sofreix entrecreuaments quan és exposat a radiacions ionitzants, mentre PHEMA degrada ràpidament a través d'esquemes d'escissions. A més, el nombre d'escissions i entrecreuaments en la cadena principal és proporcional a la dosi de radiació (Figura 3.7, taula 3.1).



Per conèixer l'evolució del mòdul de goma dels copolímers quan són irradiats, es realitza el següent tractament de les dades; es representa en una gràfica la variació del mòdul de goma de les mostres irradiades respecte a la mostra no irradiada, per als cinc copolímers de la sèrie (Figura 3.9). Els mòduls han estat calculats a partir dels espectres dinàmic-mecànics (DMS), a una dosi fixa, en aquest s'ha escollit 15 kGy.

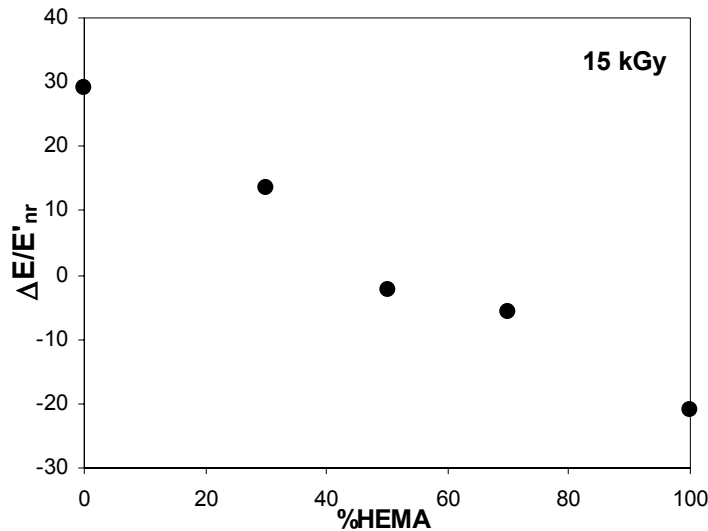


Figura 3.9. Variació relativa del mòdul de goma per a la sèrie de copolímers EA/HEMA, a una dosi de radiació fixa.

La variació relativa del mòdul de goma obtés per als diferents copolímers a una dosi de radiació fixa (Figura 3.9), mostra una tendència quasi lineal entre els dos homopolímers. El PEA pur augmenta el seu mòdul aproximadament un 30%, com a conseqüència dels nous entrecreuaments induïts per al radiació- $\gamma$ . Al cas contrari, es troba el PHEMA pur, on el seu mòdul disminueix al voltant d'un 20% degut a que l'escissió és el mecanisme predominant enfront la radiació ionitzant. A mesura que la quantitat d'HEMA als copolímers augmenta la variació relativa en  $E'$  disminueix quasi de forma lineal. Per al copolímer CH50 que conte un 50% de HEMA, la variació relativa del mòdul tendeix a zero. És a dir, que per aquest copolímer no hi ha un mecanisme predominant, es produeixen les mateixes escissions que entrecreuaments, i per tant, la densitat de cadenes activament elàstiques és aproximadament la mateixa que per al copolímer CH50 sense irradiar. Per a majors continguts d'HEMA en el copolímer, la

variació relativa del mòdul es torna negativa, la qual cosa significa que hi ha un predomini en els mecanismes d'escissió. Per altra banda, la variació relativa de  $E'$ , coincideix amb l'arquitectura molecular del copolímer [132], ja que encara que la copolimerització es duu a terme a partir d'una solució a l'atzar d'ambdós monòmers, les cadenes del copolímer obteses guarden un cert ordre. Per una banda, les unitats d'HEMA es troben preferentment juntes amb algunes molècules d'EA integrades, per l'altra, la resta de molècules d'EA que no han reaccionat formen dominis de PEA pur. Per tant, es tracta d'un material heterogeni a escala nanomolecular i l'efecte de l'esterilització es pot entendre com una superposició lineal dels efectes relatius a la composició del copolímer.

A més de l'existència d'escissions en l'homopolímer de PHEMA, també es pot apreciar diferències en les corbes de  $\tan \delta$  per a tot el ventall de radiacions gamma. A la figura 3.10a, es mostra una ampliació de la pèrdua de tangent de la xarxa pura de PHEMA a les diferents dosis de radiació  $\gamma$ , en l'interval de temperatures més baixes. On s'aprecia que la relaxació gamma en el PHEMA augmenta a mesura que la dosi de radiació ionitzant és major. La relaxació  $\gamma$  en la xarxa de PHEMA està associada a la rotació del grup hidroxietil unit en l'enllaç ester de la cadena (Figura 3.10b) [52][76]. Que es produïska un major nombre de rotacions al voltant del grup  $-OH$  en el PHEMA, és el resultat d'una major velocitat de deformació viscoelàstica en l'aplicació de les càrregues mecàniques. Encara que la relaxació gamma ha estat explicada per espectroscòpia dielèctrica en l'interval de temperatures de  $-147^{\circ}\text{C}$  a  $-60^{\circ}\text{C}$  (0.1 Hz – 100 KHz) [32][103], algunes dades bibliogràfiques prèvies per l'espectroscòpia mecànica del PHEMA, donen un absència de relaxació gamma per baix de  $-160^{\circ}\text{C}$  [167].

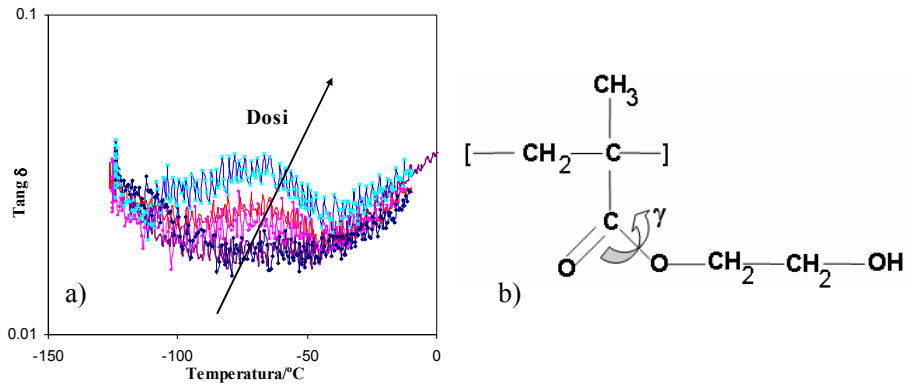


Figura 3.10. a) Pèrdua de la tangent mecànica per l'homopolímer PHEMA a diferents dosis de radiació. Sols es mostra el interval de temperatura on es dona la relaxació  $\gamma$ . b) Relaxació gamma en la molècula de HEMA.

Un increment de l'intensitat de la  $\tan \delta$  en el procés de relaxació  $\gamma$ , quan la dosi de radiació ionitzant incrementa, fa pensar que hi ha més cadenes amb capacitat per superar els ponts d'hidrogen. Per tant, hi ha un major nombre de rotacions del grup hidroxietil  $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ , a mesura que la dosi de radiació  $\gamma$  és major, al produir-se una disminució del nombre de ponts d'hidrogen. Aquest efecte, també es pot observar a l'infraroig (FTIR), en la banda de nombre d'ones característic dels  $-\text{OH}$  amb ponts d'hidrogen a l'infraroig  $[3200\text{-}3600] \text{ cm}^{-1}$  [110], com es veu en la figura 3.11, on el PHEMA és irradiat fins una dosi de 50 kGy [14].

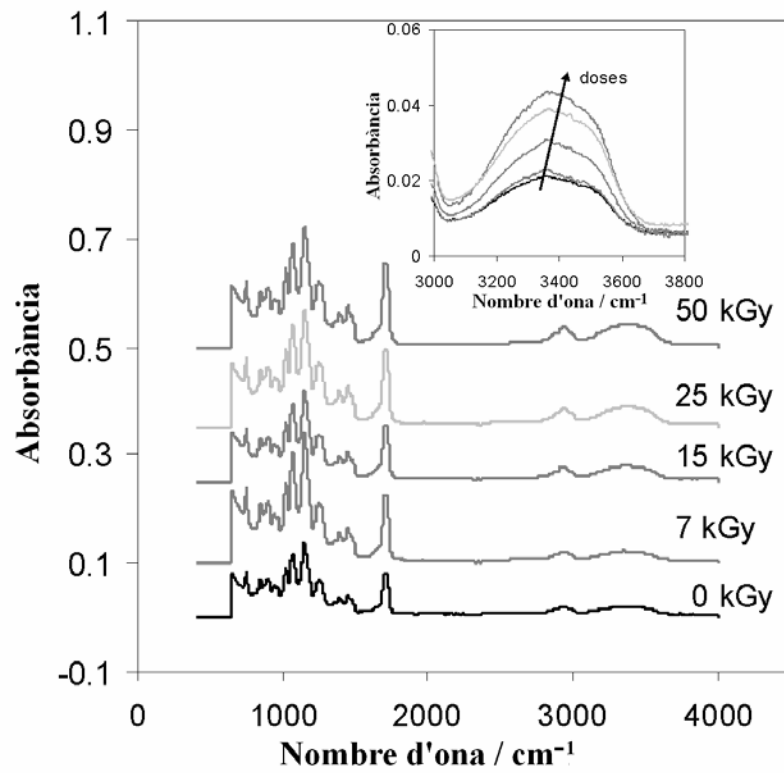


Figura 3.11. FTIR del PHEMA pur. S'observa com a mesura que augmenta la dosi de raigs gamma ho fa també l'intensitat d'absorbància en l'interval de nombre d'ona  $[3200-3600] \text{ cm}^{-1}$ , característic del grup hidroxí associat als ponts d'hidrogens.

### **3.4.- Suports polimèrics porosos amb hidrofilitat variable.**

#### **3.4.1.- Introducció.**

Actualment, la majoria d'aplicacions en enginyeria tissular depenen de l'utilització de materials porosos amb la capacitat de dirigir la regeneració de teixits en aquest processos. Les característiques geomètriques del material 3-D han d'assegurar l'espai apropiat per al creixement cel·lular, l'accés als nutrients, transport de gasos i evacuació de productes de desfeta. Interconnectivitat, es a dir, el tamany de la gola que hi ha entre porus, ha de ser adequada per permetre que el teixit passe a través del suport porós.

El material ha de proporcionar a les cèl·lules una adequada superfície per l'adhesió cel·lular, un pas clau, perquè precedeix la migració i diferenciació cel·lular. El balanç hidrofílic/hidrofòbic del material així com la forma del porus influeixen en l'adherència de les cèl·lules a les parets del material 3-D.

Amb aquests antecedents, el següent estudi tracta de sintetitzar **“suports porosos acrílics amb porus esfèrics i hidrofilitat controlada per aplicacions d'enginyeria tissular”**. El mètode utilitzat per a la síntesi d'estructures poroses, es basa en l'ús de plantilles per generar l'estructura porosa. En primer lloc, esferes de PMMA s'introdueixen en un motlle, donat-li les condicions adequades (pressió i temperatura) per a sinteritzar-les. A l'interior dels buits d'aquesta plantilla s'introdueix la solució polimèrica desitjada que polimeritza per radicals lliures. Finalment s'elimina el PMMA amb un dissolvent afí i s'obté l'estructura porosa. La porositat, morfologia i propietats mecàniques dels suports porosos són caracteritzades per a les diverses composicions.

Aquesta tècnica permet controlar l'interconnectivitat entre porus i el diàmetre, encara que en aquest treball sols es mostren porositats al voltant del 80% i diàmetre de porus de 90 micres.

### 3.4.2- Discussió i resultats.

Primerament, es van preparar cinc solucions monomèriques a partir d'EA (hidròfob) i HEMA (hidròfil). Els dos component purs i tres copolímers CH70, CH50 i CH30 amb una fracció màssica en la barreja inicial de 0.7, 0.5 i 0.3, respectivament. Com a fotoiniciador (benzoïna) amb un 0.2% en pes i com entrecreudador EGDMA amb un 2% en pes. Aquestes, solucions van ser injectades entre els buits de les plantilles de PMMA, prèviament sinteritzades amb esferes de 90 micres. La plantilla i la solució monomèrica es va col·locar dins de la càmera ultraviolada, fins a límit de reacció. Finalment, es va eliminar la plantilla de PMMA amb acetat d'etil, es va netejar amb alcohol, aigua i va ser secat, per obtenir el suport porós enllestit per la seua caracterització.

Per tant, en aquest estudi s'han sintetitzat cinc estructures poroses; les xarxes de PEA, PHEMA i els copolímers CH70, CH50, CH30. D'aquests materials en bloc es coneix quina és la distribució de les cadenes als copolímers [132], com varien les seues propietats davant un procés d'esterilització mitjançant radiació- $\gamma$  [14], i s'han testat en cultiu monocapa de condrocits amb bona resposta biològica [123][122].

La metodologia utilitzada en la síntesi de materials porosos permet obtenir una estructura interconnectada de porus esfèrics en un ample interval de composicions des d'hidròfil pur, com el PHEMA fins a hidrofòbic pur com el PEA. PHEMA és un material biocompatible que ha estat utilitzat en aplicacions biomèdiques, com pròtesis oftalmològiques, pròtesis vasculars, en sistemes de alliberació controlada de fàrmacs i com a substitut de teixits febles [104]. Quan absorbeix aigua es converteix en una elastòmer flexible i blanet. La copolimerització amb un component hidrofòbic juga un doble paper. Per una banda, s'obté un reforçament mecànic quan el material es troba unflat d'aigua i per altra banda, la copolimerització permet optimitzar la hidrofobicitat desitjada en el material per una aplicació determinada. L'estructura molecular del sistema obtés després de la copolimerització d'EA and HEMA ha estat prèviament estudiat [132], conclouent que el material copolimeritzat en bloc a partir d'una barreja de monòmers, consisteix en una distribució de nano-agregats alternant dominis rics d'HEMA amb dominis hidrofòbics purs. Aquest tipus d'estructura pot afavorir en principi l'adhesió cel·lular i difusió de nutrients [38].

El càlcul de la fracció de volum de porus, porositat, es determina mitjançant una metodologia gravimètrica, mesurant el pes de les mostres en sec i unflades amb aigua (punt 2.2.2.7), utilitzant un accessori de buit. Per al càlcul la porositat, és necessari conèixer les densitats de les diferents composicions en bloc, que es determina per pesada de cada composició en bloc en aire i submergida en n-octà a 25°C (punt 2.2.2.6). A la taula 3.2 es mostra la porositat i la densitat de les cinc composicions, a més, de mostrar altres dos paràmetres;  $\omega^*$ , que és la massa d'aigua que absorbeix en equilibri el polímer en bloc dividit per la massa del polímer sec i  $\omega_s^*$ , que és la mateixa mesura però referida al suport porós. Les mesures dels quatre paràmetres tenen un error menor del 3%.

Composició del copolímer.	Densitat del bloc (g/cm <sup>3</sup> )	$\omega^*$	$\omega_s^*$	Porositat (%)
PEA	1.13	0.007	2.25	78±2
30% HEMA	1.17	0.06	2.50	83±2
50% HEMA	1.18	0.13	2.80	81±1
70% HEMA	1.19	0.19	3.30	76±3
PHEMA	1.21	0.35	4.50	75±2

Taula 3.2. Mostra l'aigua que absorbeix en equilibri les diferents composicions en bloc  $\omega^*$  i com suport porós  $\omega_s^*$ . A més, mostra la porositat de la sèrie de copolímers i les densitats dels materials en bloc.

La caracterització de la microestructura dels suports porosos es fa mitjançant microscòpia electrònica d'escombrada (SEM), obtenint imatges de talls longitudinal i transversals, com es pot observar a les figures (3.12-3.14). En aquestes micrografies s'aprecia com s'obté el mateix tipus d'arquitectura, independentment de la composició; des d'una composició totalment hidròfoba pura (PEA) (Figura 3.12) o totalment hidròfila (PHEMA) (Figura 3.14), fins a qualsevol barreja hidròfoba-hidròfila (figura 3.13). L'estructura resultant es caracteritza per estar completament interconnectada i amb una geometria de porus esfèrica. El diàmetre de porus està en l'interval [65-85] nm, però no depèn de la composició química del material, sols depèn del tamany de les esferes de PMMA utilitzades com a plantilla. Aquesta és la raó per la qual la connectivitat i el diàmetre de porus pot ser fàcilment modificat, ja que sols depenen del diàmetre de les esferes de PMMA i del procés de sinterització. Canviant la temperatura i pressió entre les esferes, es pot regular el procés de sinterització de la plantilla, i per tant, la porositat de l'estructura porosa. Al copolímer (Figura 3.13), on s'ha fixat una porositat major que als components purs (Figura 3.12, 3.14), es pot

observar com el diàmetre de gola entre les esferes és major i per tant, el contorn del porus (pilars/bigues), tenen un menor espessor. Aquest tipus de síntesi ha estat ja provat amb esferes de parafina [94].

Figura 3.12. Micrografies SEM d'una bastida sintetitzada amb composició totalment hidròfoba (PEA).

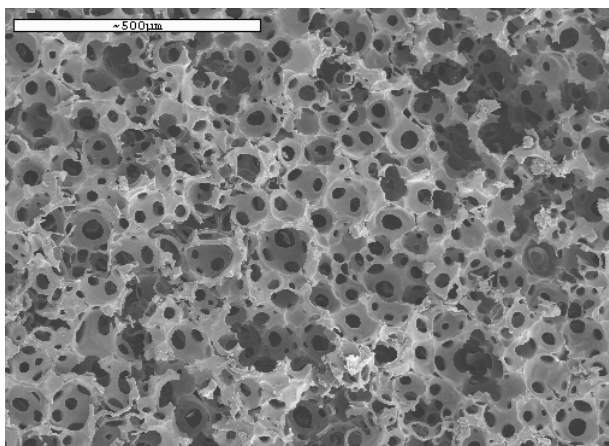


Figura 3.12 a) Micrografia d'un suport porós de PEA.

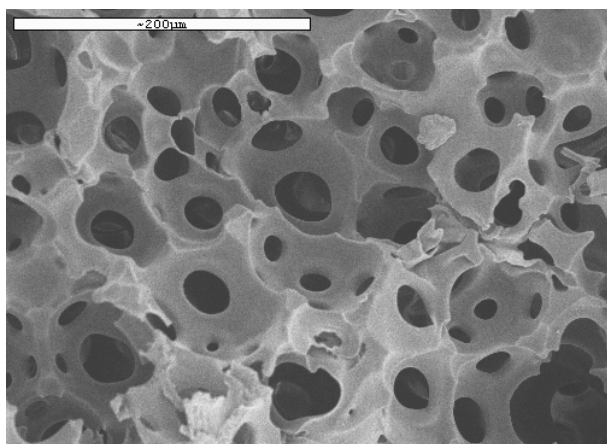


Figura 3.12 b) Detall de micrografia d'un suport porós de PEA.

En definitiva, com es mostra a la taula 3.2, la fracció de volum està al voltant del 80%, independentment de la composició química del material, podent treballar amb un ample interval de composicions hidròfobes/hidròfiles.



Figura 3.13. Micrografies SEM d'una bastida sintetitzada amb composició 70%EA-30%HEMA.

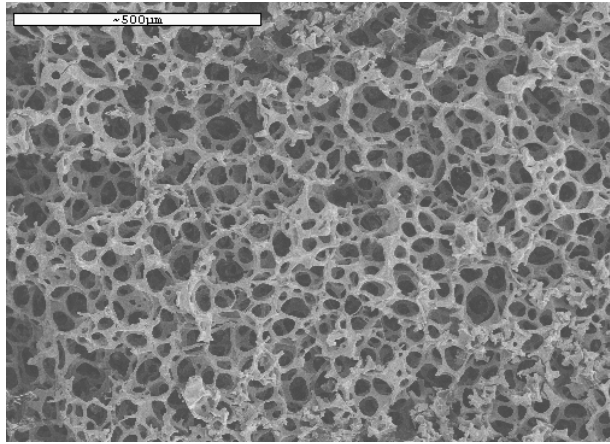


Figura 3.13 a) Micrografia d'un suport porós copolímer amb un 30%HEMA.

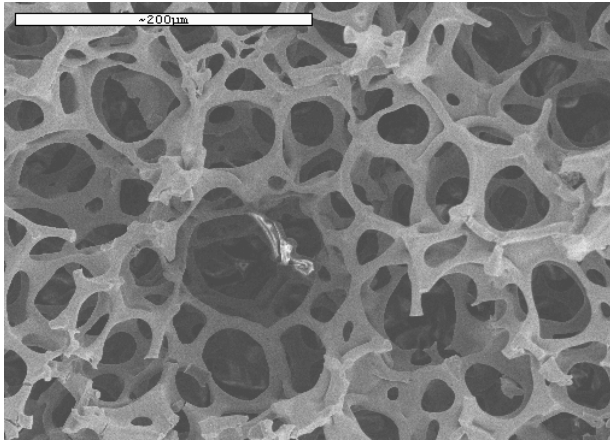


Figura 3.13 b) Detall de micrografia d'un suport porós copolímer amb un 30%HEMA.

Figura 3.14. Micrografies SEM d'una bastida sintetitzada amb composició totalment hidròfila (PEMA).

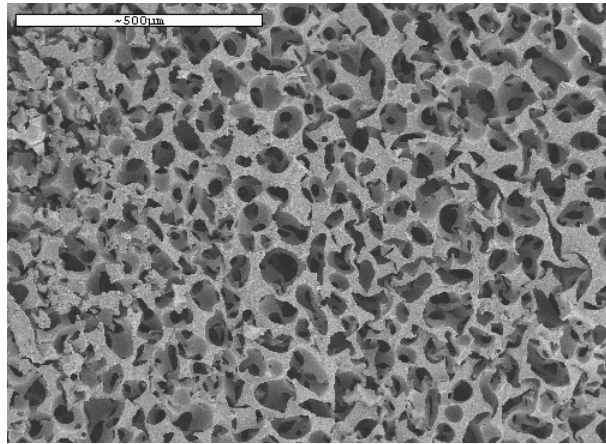


Figura 3.14 a) Micrografia d'un suport porós de PEA.

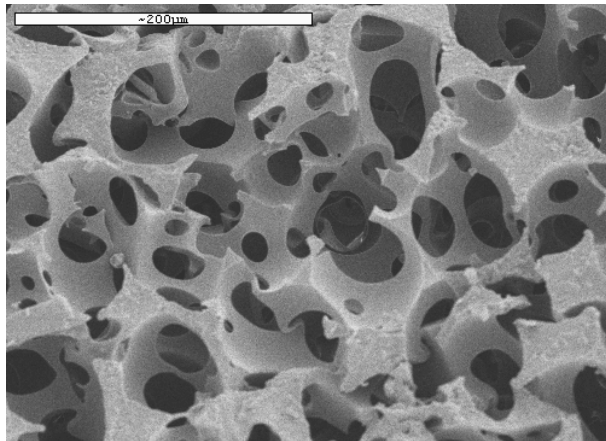


Figura 3.14 b) Detall de micrografia d'un suport porós de PEA.

Com la porositat té una gran influència en les propietats mecàniques, es van realitzar assajos dinàmics-mecànics a tracció (DMS) dels materials porosos i en bloc. Les mostres eren rectangulars amb unes mesures de 15x3x1 mm. Es tractava de comparar el comportament mecànic-dinàmic d'un material en bloc i un de porós amb la mateixa composició. A la figura 3.15 es mostren els assajos realitzats en dos composicions; la xarxa de PEA pur i el sistema copolimeritzat CH50, amb un 50% de monòmer hidròfil e

hidròfob. En la figura 3.15a, es pot comparar el mòdul dels materials en bloc i els porosos, i en el cas dels suports porosos el mòdul de goma és molt menor que per al material en bloc de la mateixa composició.

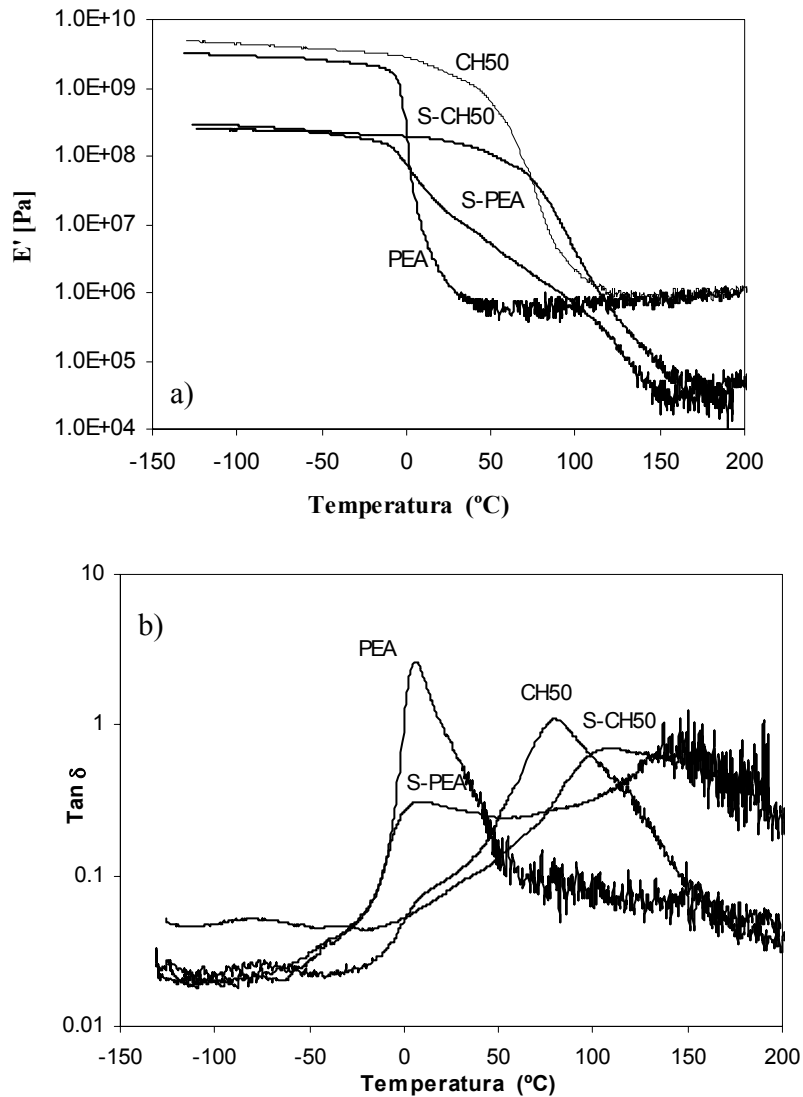


Figura 3.15. Espectres de relaxació dinàmica-mecànica de la xarxa de PEA pur; en bloc (PEA), suport porós (S-PEA) i el sistema copolimeritzat amb un 50% d'HEMA; en bloc (CH50), suport porós (S-CH50), mesurats a 1 Hz. (a)  $E'$  b) Pèrdua de tangent mecànica.

A més, com el mòdul de goma és depenent del tipus d'arquitectura de l'estructura [55], el fet que s'obtinga la mateixa reducció del polímer que forma l'estructura en totes les composicions de la bastida porosa contribueix a la hipòtesi que la mateixa distribució de porus i interconnectivitat és obtesa per als diferents composicions del suports porosos.

Cal destacar que la relaxació principal dels materials porosos presenta una relaxació més ampla que la corresponent composició en bloc (Figura 3.15b). L'efecte és independent de la composició i té lloc en ambdós sistemes (PEA pur i el copolímer CH50). Aquest amplament de la relaxació, suggereix una arquitectura molecular diferent dels materials porosos front al polímer en bloc, i ha d'estar relacionat amb la major relació superfície per volum que disposa la solució monomèrica al polimeritzar entre els espais buits de la plantilla. En general, la contribució de l'energia lliure superficial no és insignificant en materials amb alta porositat. Aquest argument podria explicar la diferència entre les relaxacions dels materials en blocs i suports porosos de la mateixa composició. Però altre argument, que s'ha de tenir en compte, és que la solució monomèrica abans de polimeritzar penetra en la superfície de les esferes de PMMA, amb la possibilitat de que la superfície porosa estiga reforçada amb PMMA i per tant, tinga una composició diferent a la resta del suport porós. Aquest factor podria ampliar la dinàmica del sistema, ja que, la regió del material amb capacitat de sofrir moviments cooperatius presentarà una major distribució de composicions amb la qual cosa donaria un procés de relaxació més ample.

Finalment, es va decidir realitzar uns termogrames a un suports porosos de PEA i material en bloc amb la mateixa composició, per comprovar la presència d'una transició vítria del PMMA (que està al voltant dels 120°C). Com s'observa a la figura 3.16, on s'observa una xicoteta transició vítria dels suports porosos a una temperatura al voltant de 120°C, cap la possibilitat de que queden traces de PMMA a l'interior del suport polimèric porós, la qual cosa, podria explicar en part l'efecte d'una relaxació principal més ampla en les estructures poroses.

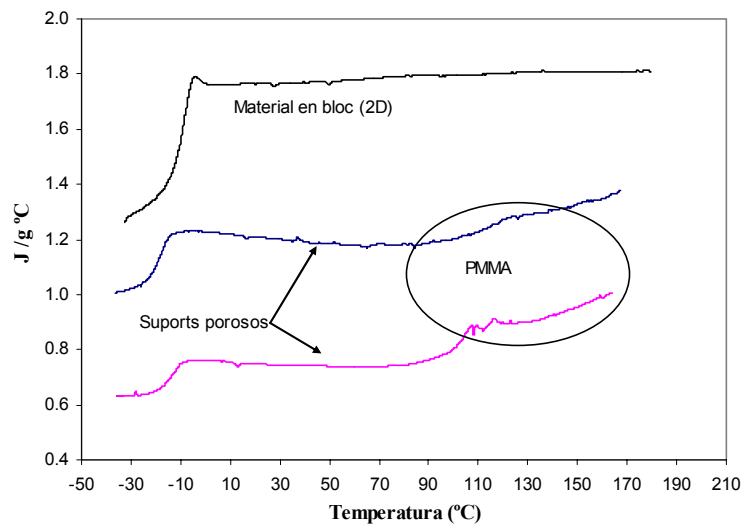


Figura 3.16. Termogrames DSC de material en bloc i suports porosos de composició PEA pur. La velocitat de calfament ha estat  $10^{\circ}C/min$ .



### 3.5.- Col·lapsament de porus en l'estructura porosa.

#### 3.5.1.- Introducció.

Al llarg d'aquesta tesi, s'ha parlat de la necessitat de l'ús d'un suport porós en aplicacions d'enginyeria tissular, que faça el paper de substrat temporal al qual s'adhereixen les cèl·lules trasplantades, influint en la proliferació, migració i diferenciació cel·lular.

La bastida ha d'estar dissenyada per complir una sèrie de requisits; biocompatibilitat, esterilitzable, estructura interconnectada, alta porositat, a més dependent de l'aplicació un diàmetre de porus serà més convenient que un altre, normalment, el diàmetre de treball està dins de l'interval [20–500]  $\mu$ , per permetre el creixement cel·lular, la vascularització i la regeneració del teixit.

El mètode de síntesi de materials 3-D que es fa servir als diversos estudis, es basa en l'utilització de plantilles on es produeix la polimerització de la solució monomèrica. Però, a l'última etapa del procés de fabricació, s'ha de dissoldre la plantilla per obtenir l'estructura porosa. Dependent del tipus de dissolvent i la composició del material, l'estructura és estirada tan fortament que quan el dissolvent és eliminat, és a dir, quan la mostra és secada, el suport no recupera la seua forma original obtenint una estructura col·lapsada. Per tant, el següent estudi tracta d'entendre el procés de col·lapse de diverses estructures poroses interconnectades durant el procés de fabricació; **“Col·lapse de porus durant el procés de fabricació del suport polimèric porós”** Per aquest propòsit, s'han preparat una sèrie de bastides polimèriques amb diferents composicions. Concretament, s'han utilitzat acrilats hidròfobs que han estat testat amb èxit en cultius cel·lulars [19][123], sempre utilitzat el mateix mètode de fabricació, és a dir, una plantilla d'esferes PMMA que posterior s'extrau amb un mateix dissolvent.

### 3.5.2.- Discussió i Resultats.

La preparació dels materials porosos es va realitzar seguint les indicacions del punt 2.2.2.5 i que també es descriu als articles [13][15]. Breument, esferes de PMMA són introduïdes en un motlle, i calfades durant 30 minuts a una temperatura al voltant de la seua  $T_g$ , aplicant una pressió concreta per obtenir una plantilla de PMMA de porositat desitjada. Sobre els espais buits de la plantilla de PMMA s'injecta la solució monomèrica que polimeritza en la càmera ultraviolada. La matriu de PMMA s'elimina amb diclorometà per ser millor solvent d'aquest polímer que l'acetat d'etil, després es neteja amb alcohol per eliminar les substàncies de baix pes molecular i finalment les mostres són secades per a la seua caracterització.

La porositat de totes les estructures poroses es fixa en 75% i es determina gravimètricament (punt 2.2.2.7). La densitat (punt 2.2.2.6) i la temperatura de transició vítria (punt 2.3.6) de totes les composicions en bloc es calculada. També es realitzen assajos d'absorcions dels polímers en bloc per immersió en diclorometà durant 3 dies a la temperatura de 25°C. Per acabar de caracteritzar els materials en bloc, es realitzen assajos dinàmics-mecànics a la freqüència d'1 Hz, en mode tracció.

Finalment, per estudiar la microestructura del materials 3-D, es van s'obtenen micrografies de talls longitudinals i transversals de les mostres, mitjançant microscòpia electrònica d'escombrada (SEM).

Primerament, es van preparar 4 plantilles de PMMA aplicant la mateixa pressió, però amb 4 diferents diàmetres d'esferes; 35, 90, 250 i 500 micres. Aquestes plantilles se'ls va injectar un solució monomèrica d'acrilat d'etil (EA) amb un 2% de metacrilat d'etilenglicol (EGDMA) com entrecreuador i un 0.2% de benzoïna com a fotoiniciador, per obtenir unes estructures amb diferent diàmetre de porus però amb una porositat constant del 75%. En la figura 3.17, es mostren les micrografies (SEM) de les diverses mostres, on és pot apreciar que les quatre estructures amb diferents diàmetres de porus es troben col·lapsades.



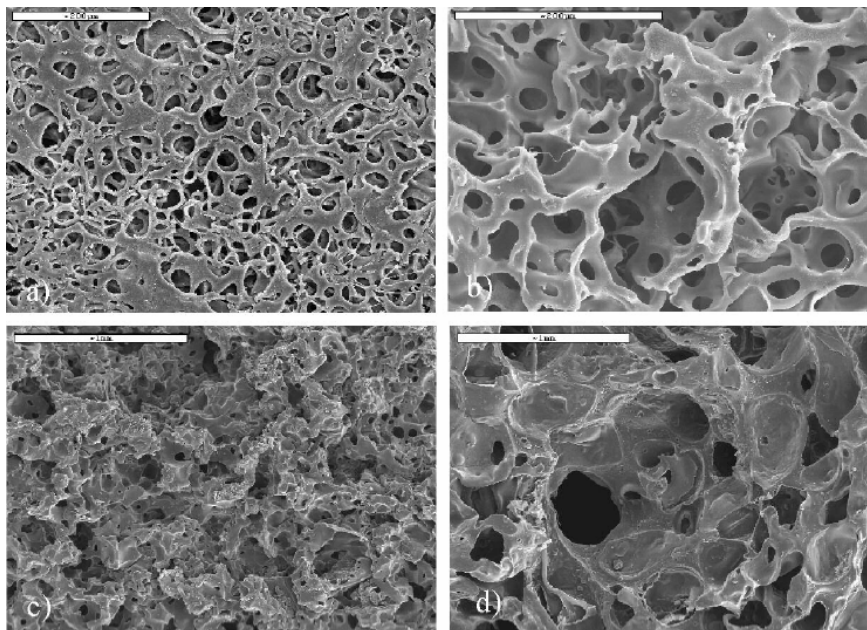


Figura 3.17. Micrografies (SEM) d'estructures poroses de composició PEA/EGDMA (98%/2%). Porositat constat del 75% i quatre tamanys de porus: a) 35  $\mu$  b) 90  $\mu$  c) 250  $\mu$  d) 500-600  $\mu$ . Les estructures s'observen col·lapsades després del procés de fabricació.

El col·lapsament de les estructures pot estar degut a que el diclorometà és un bon solvent del PMMA, però també del material constitutiu de l'estructura porosa, per la qual cosa, en el procés de dissolució de la plantilla de PMMA, la xarxa polimèrica s'ha d'estirar moltíssim i quan es canvia de diclorometà a etanol, la xarxa és comprimeix bruscament, sent incapaç de recuperar la forma inicial. La diferència que es dona en l'estat unflat de dissolvent i l'estat sec per estructures poroses ha estat mostrada en la literatura [42][63] per sistemes amb porus més xicotets. A més, l'influència del tipus de dissolvent utilitzat ha estat també estudiada [9][24][48][50][65][79][114][118][124][148][165][166].

Estructures polimèriques poroses secades amb dissolvent roïns o que quasi no augmenten el volum de la xarxa quan són absorbits, mostren un porositat màxima, és a dir, molt propera a la porositat en estat d'absorció del dissolvent en la xarxa [118]. El procés de secat de polímers unflats en bons dissolvents pot dirigir a una parcial o total col·lapsament del porus [115][116]. Els experiments realitzats en aquest estudi indiquen que la

porositat que s'assoleix en l'estat d'absorció del dissolvent pot ser preservada en estat sec si l'interacció entre el polímer i el dissolvent decreixen abans del procés de secat. Per un altra banda, com l'absorció d'un dissolvent en la xarxa polimèrica, depèn també dels paràmetres de la xarxa, és a dir, del nombre de cadenes elàsticament actives, és va decidir incrementar el grau d'entrecruament en la xarxa per reduir el grau d'unflament i consegüentment, previndre el col·lapse de l'estructura després de dissoldre la plantilla de PMMA i secar l'estructura porosa.

Aleshores, es van sintetitzar cinc suports porosos seguint el mateix procés de fabricació utilitzat anteriorment; una porositat constant de 75% i diàmetre de porus de 90  $\mu$ . El monòmer principal va estar l'EA entrecruat amb diferents percentatges d'entrecruador (TEGDMA); 2%, 5%, 10%, 20% i 30%. Les temperatures vítries de les cinc composicions estan per baix de la temperatura ambient (taula 3.3).

7

Composició Polimèrica.	Densitat del bloc (g/cm <sup>3</sup> )	T <sub>g</sub> (°C)
EA/EGDMA (98/2)	1.130	-12.0
EA/TEGDMA (98/2)	1.126	-14.4
EA/TEGDMA (95/5)	1.132	-12.9
EA/TEGDMA (90/10)	1.140	-11.1
EA/TEGDMA (80/20)	1.154	-5.1
EA/TEGDMA (70/30)	1.160	4.3
(EMA/BA)/EGDMA ((79/19)/2)	1.125	48.5

Taula 3.3. Densitat dels polímers en bloc i temperatures de transició vítria de totes les composicions utilitzades.

Es va utilitzar aquest entrecruador en volta de l'EGDMA, perquè el TEGDMA és un monòmer més flexible que l'EGDMA i això permet una major densitat d'entrecruament sense la presència de tensions internes en la xarxa del polímer que pot dirigir a la formació de microrotures durant el procés de polimerització. L'eliminació del PMMA es va realitzar mitjançant diclorometà. En la figura 3.18, es mostra les microscòpies (SEM) de les quatre estructures poroses; es pot apreciar com a mesura que el percentatge de TEGDMA augmenta les estructures estan més interconnectades i amb un percentatge de 30% de TEGDMA l'estructura es troba totalment interconnectada (Figura 3.18d).

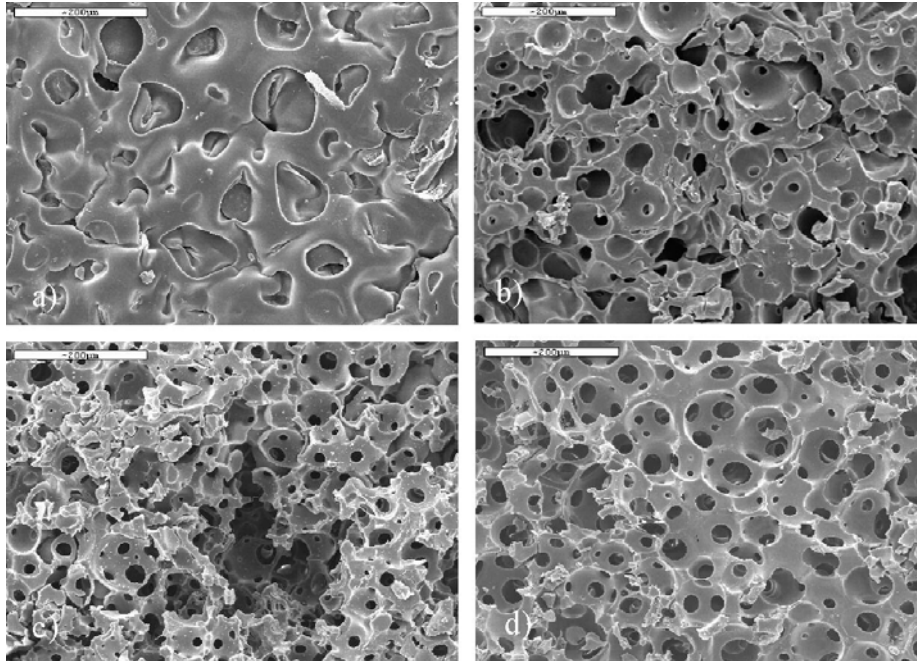


Figura 3.18. Micrografies SEM d'estructures poroses de PEA amb variació de la densitat d'entrecreuament, per una porositat constant del 75% i un tamany de porus de 90 micres; a) 2%TEGDMA, b) 5%TEGDMA, c) 20%TEGDMA i d) 30% TEGDMA.

El col·lapse de porus pot ser també quantificat mitjançant mesures d'espessors de les mostres abans i després de l'extracció de la plantilla de PMMA. A la taula 3.4, es mostra la diferència d'espessors abans i després del procés de neteja del PMMA i el percentatge de reducció. Es pot apreciar en la figura 3.18b, que fins a un 10% de TEGDMA, l'estructura es troba completament col·lapsada, el que suposa un reducció de l'espessor de la mostra del 30% aproximadament. En canvi, per a un percentatge d'entrecreuador del 30% (Figura 3.18d), la mostra es troba completament interconnectada, i la reducció de l'espessor es tan sol del 10%. Aleshores, la composició de 70/30 EA/TEGDMA permet mantenir una estructura oberta i interconnectada després de l'eliminació de la plantilla de PMMA amb diclorometà i el posterior procés de secat del suport porós.

En un estudi posterior, diferents bastides d'aquesta composició han estat sintetitzades amb aquest procés de fabricació, però per a un ample interval diàmetres de porus i porositats [15].

Xarxa Polímer	Epessor inicial (mm)	Epessor final (mm)	Reducció (%)
EA/TEGDMA (98/2)	2.5	1.1	54
EA/TEGDMA (95/5)	2.7	1.3	52
EA/TEGDMA (90/10)	2.7	1.8	33
EA/TEGDMA (80/20)	2.6	2.1	19
EA/TEGDMA (70/30)	2.6	2.4	10

Taula 3.4. Gruix de les bastides polimèriques amb diferents percentatges de TEGDMA, abans i després de l'extracció de PMMA. La reducció de l'epessor quantifica el col·lapse de l'estructura.

Per un altra banda, com l'absorció d'un dissolvent en la xarxa polimèrica, depèn també dels paràmetres de la xarxa, és a dir, del nombre de cadenes elàsticament actives, volem conèixer com afecta l'augment del grau d'entrecruament aquest paràmetre:

Segons la teoria d'elasticitat del cautxú, la concentració molar de cadenes elàsticament actives o efectives,  $n_c/V_2$ , està relacionada amb el mòdul de goma mitjançant la següent expressió [44]:

$$E' = \frac{n_c}{V_2} 3RT = \frac{d_2}{\bar{M}_c} 3RT \quad (3.5)$$

On  $R$  és la constant universal dels gasos,  $T$  és la temperatura absoluta,  $E'$  és el mòdul en la regió elastomèrica a la temperatura  $T$ ,  $\bar{M}_c$  és el pes molecular promig entre punts d'entrecruaments i  $d_2$  és la densitat de la xarxa. A la taula 3.3, s'han calculat les densitat de les diverses xarxes a temperatura ambient (298 K, aprox.), aleshores,  $\bar{M}_c$  pot ser calculat a partir de valors experimentals del mòdul de goma ( $E'$ ), valors que es poden obtenir dels assajos dinàmics-mecànics (DMS) que es mostren a la figura 3.19. En aquesta figura s'observa com el mòdul de goma augmenta a mesura que ho fa la densitat d'entrecruament i a més, la relaxació mecànica principal és mou cap temperatures més altes (Figura 3.20).

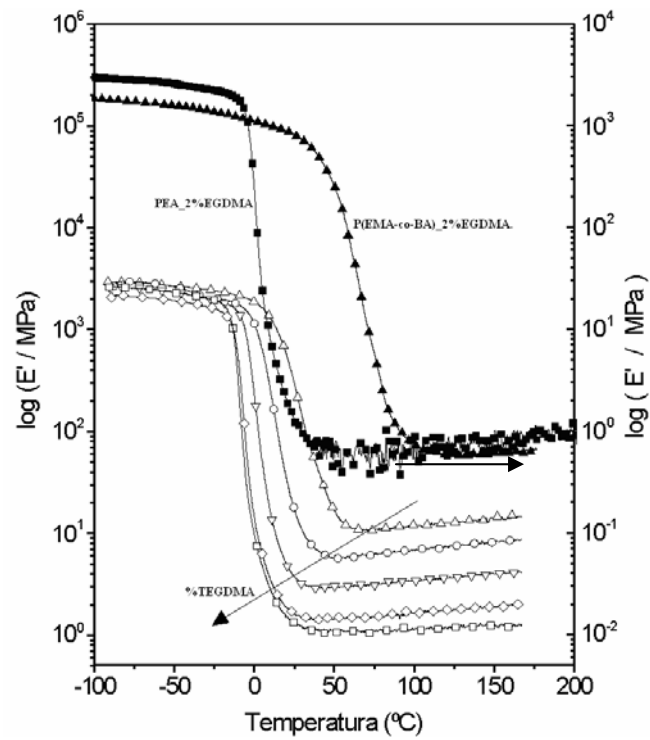


Figura 3.19. Mòdul acumulat dinàmic-mecànic. ( $\Delta$ ,  $\circ$ ,  $\nabla$ ,  $\diamond$ ,  $\square$ ). Copolímers PEA-TEGDMA, la fletxa indica cap on augmenta el %TEGDMA. ( $\blacksquare$ ) PEA\_2%EGDMA ( $\blacktriangle$ ) P(EMA-co-BA)\_2%EGDMA.

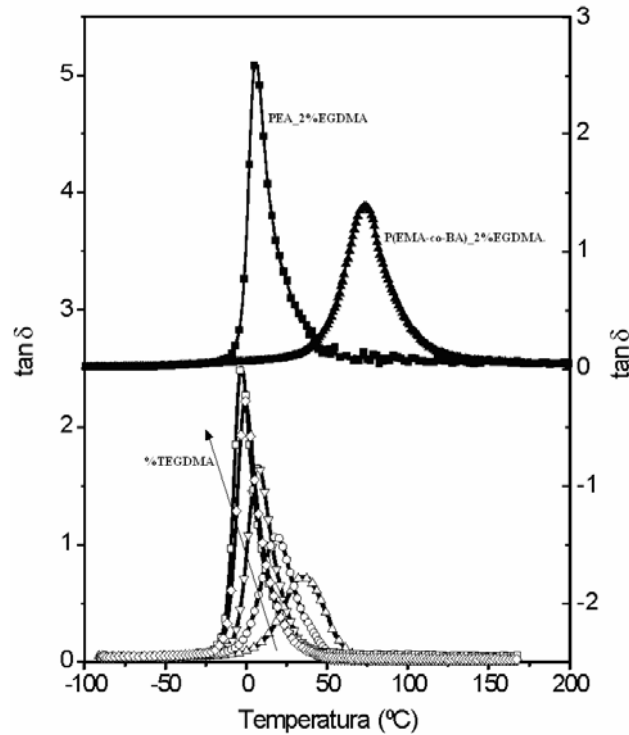


Figura 3.20. Pèrdua de tangent mecànica. ( $\Delta$ ,  $\circ$ ,  $\nabla$ ,  $\diamond$ ,  $\square$ ). Copolímers PEA-TEGDMA, la fletxa indica cap on augmenta el %TEGDMA. ( $\blacksquare$ ) PEA\_2%EGDMA ( $\blacktriangle$ ) P(EMA-co-BA)\_2%EGDMA.

Les dades utilitzades i els càlculs realitzats per conèixer els paràmetres de la xarxa del polímer es troben en la taula 3.5. On es pot observar com  $n_c/V_2$  incrementa a mesura que el percentatge de TEGDMA al sistema ho fa també, consegüentment, el pes molecular promig,  $\bar{M}_c$  decreix entre punts d'entrecreuaments.

Composició Polímer	E' (MPa)	$n_c/V_2$ (mol/cm <sup>3</sup> )	$M_c$ (g/mol)	$w$	$\phi_1$	$\bar{\chi}_{12}$
EA/EGDMA (98/2)	0.857	1.135E-10	9992.7	8.88	0.91	0.13
EA/TEGDMA (98/2)	1.074	1.423E-10	7914.5	6.97	0.89	0.27
EA/TEGDMA (95/5)	1.601	2.120E-10	5340.4	4.74	0.85	0.25
EA/TEGDMA (90/10)	3.342	4.426E-10	2575.6	2.90	0.77	0.26
EA/TEGDMA (80/20)	6.745	8.933E-10	1291.8	1.67	0.66	0.32
EA/TEGDMA (70/30)	11.527	1.527E-09	759.9	1.23	0.58	0.28
(EMA/BA)/EGDMA ((79/19)/2)	0.551	7.299E-11	5928.9	4.79	0.85	0.27

Taula 3.5. Propietats de la xarxa polimèrica. E' = Mòdul acumulat a 100 °C;  $n_c/V_2$  = Densitat de cadenes elàsticament actives,  $M_c$  = Massa molecular entre punts d'entrecruaments  $w$  = capacitat dels materials per absorbir diclorometà (massa de dissolvent absorbit per la massa del polímer sec);  $\phi_1$  = Fracció de volum en equilibri del dissolvent en la xarxa;  $\bar{\chi}_{12}$  és el paràmetre d'interacció aparent de Flory-Rehner.

L'equació de Flory-Rehner [44] relaciona el grau d'unflament amb l'interacció polímer –dissolvent i els paràmetres topològics de la xarxa,

$$0 = \ln \phi_1 + 1 - \phi_1 + \bar{\chi}_{12} (1 - \phi_1)^2 + v_1 \frac{n_c}{V_2} (1 - \phi_1)^3 \quad (3.6)$$

En aquesta equació,  $\phi_1$  és la fracció de volum en equilibri del dissolvent en el polímer,  $v_1$  és el volum molar del solvent (64.26 cm<sup>3</sup>/mol per al diclorometà),  $\bar{\chi}_{12}$  és el paràmetre d'interacció aparent i  $n_c/V_2$  és la densitat de volum de cadenes elàsticament actives a la xarxa. Es va decidir incrementar  $n_c/V_2$ , mitjançant un canvi en la relació entrecruador/monòmer durant el procés de polimerització que duu a la formació de la xarxa.  $\phi_1$ , va ser calculat mitjançant mesures gravimètriques, a partir de  $w$ , que és la relació de la massa de diclorometà absorbida per la massa de polímer sec, i la densitat del polímer  $d_2$ .

$$\phi_1 = \frac{w}{w + \frac{d_1}{d_2}} \quad (3.7)$$

$\phi_1$ , disminueix a mesura que la densitat d'entrecreuament augmenta, mentre  $\chi_{12}$ , que s'ha calculat de l'equació (3.6), roman constant (taula 3.5). Un valor baix del paràmetre d'interacció (per baix de 0.5) indica que el diclorometà és un bon dissolvent. Per tant, veient els valors del paràmetre d'interacció als diferents copolímers es pot afirmar que el diclorometà és bon dissolvent tan del PEA com el TEGDMA. L'efecte d'incrementar el contingut de TEGDMA en el sistema no influeix en la naturalesa de l'interacció polímer-dissolvent i, consegüentment, es produeix una disminució constant en el contingut de dissolvent en equilibri, que pot ser explicat per l'increment de la densitat de cadenes elàsticament actives en el sistema  $n_c/V_2$ ; és a dir, la disminució del pes molecular promig  $M_c$  entre punts d'entrecreuaments.

Finalment, és mostra els experiments d'unflament amb diclorometà a temperatura ambient, per a totes les composicions utilitzades al llarg d'aquest estudi (Figura 3.21). A l'eix d'ordenades es troba com a paràmetre, l'increment de volum en la xarxa unflada de dissolvent per el volum de la xarxa eixugada, com s'ha calculat a la taula 3.5, que ve donada per l'equació 3.8:

$$\frac{\Delta V}{V_2} = \frac{d_2}{d_1} w . \quad (3.8)$$

A l'eix d'abcises es representa el percentatge d'entrecreuador. Per tant, a la figura 3.21, també es pot observar com a major densitat d'entrecreuament, l'augment de volum dels copolímers en el procés d'unflament amb diclorometà es menor. Com a resultat d'aquest menor volum, s'evita el col·lapsament de porus en l'estructura després d'eliminar la plantilla de PMMA.



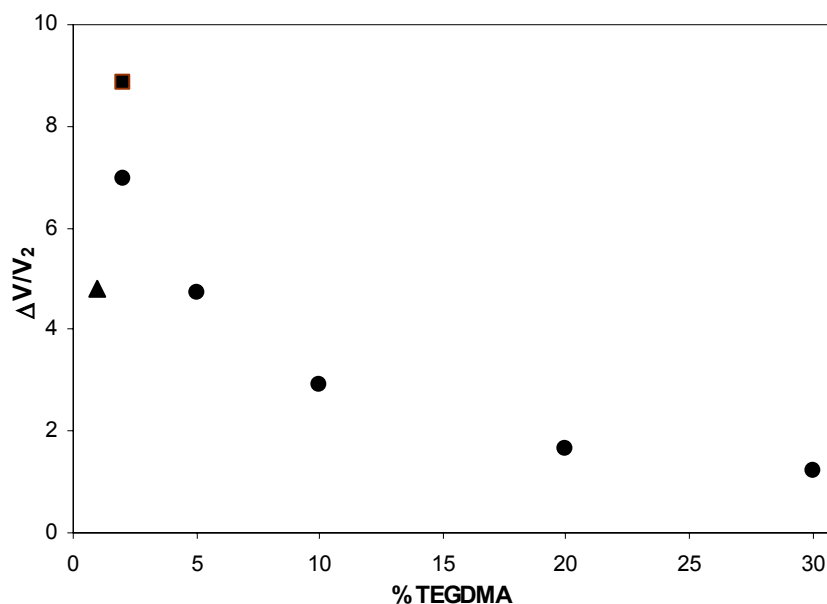


Figura 3.21. Increment de volum del material en el procés d'unflament amb diclorometà en funció del % d'entrecruador. Els cercles estan referits a la composició EA amb diferents percentatges de TEGDMA. El triangle està referit al copolímer (EMA/BA) amb 1%EGDMA i el quadrat a la composició EA/EGDMA (98/2).

Finalment, per tal de conèixer la influència de la temperatura de transició vítria del material base del qual està fabricat el suport porós. Es va sintetitzar estructures poroses amb una composició de Metacrilat d'etil (EMA)/acrilat d'etil (BA) i EGDMA com entrecruador amb un percentatge en pes dels monòmers de; 80, 20 i 1 %, respectivament. Per realitzar la síntesi de les suports porosos es va seguir el mateix procés de fabricació utilitzat fins ara, com a plantilla de PMMA es van prendre microesferes de 90 micres i la porositat final de l'estructura es va fixar en 75%. La temperatura de transició vítria del material en bloc de composició 80%EMA/20%BA/1%EGDMA es va mesurar amb el DSC, obtenint un valor de  $T_g = 48^\circ\text{C}$  (taula 3.3).

L'últim pas, va ser realitzar micrografies en el microscòpic electrònic d'escombrada (SEM) de les estructures poroses, observant tan talls longitudinals com transversals (Figura 3.22). Com es pot apreciar a les micrografies, l'estructura resta totalment interconnectada, per el que es pot afirmar que el col·lapse de porus no resulta un problema crític quan la matriu

polimèrica de la qual està fabricat el suport porós, es troba en estat vítri després del procés de secat.

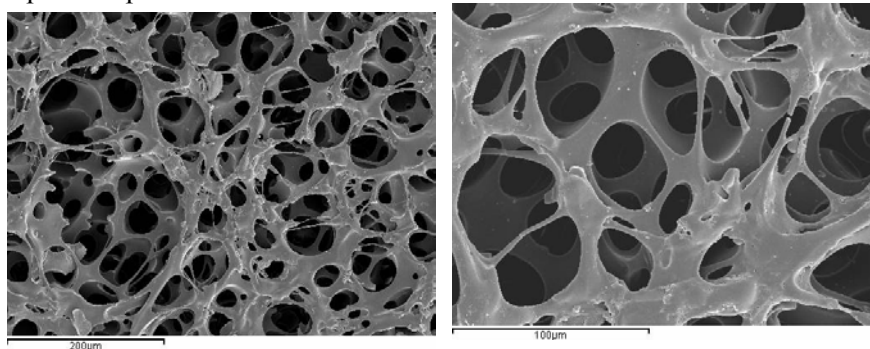


Figura 3.22. a) Vista general de Micrografia SEM del suport porós del copolímer; Metacrilat d'etil 80%(EMA), Acrilat d'etil 20%(BA) i 1%EGDMA. Porositat constant del 75% i un tamany de porus de 90 micres. b) Vista detallada de l'estructura porosa del copolímer.

Per una altra banda, la fracció en volum del dissolvent en la xarxa és 0.85, per tant, s'assoleix un alt contingut de dissolvent degut a que hi ha una bona interacció polímer-dissolvent ( $\chi_{12} = 0.27$ ) i una baixa densitat de cadenes elàsticament actives ( $n_c/V_2 = 7.299 \cdot 10^{-11} \text{ mol/cm}^3$ ), valors que es troben tabulats a la taula 3.5. A la figura 3.21, s'observa com aquesta xarxa copolimèrica augmenta el seu volum quasi 6 voltes en el procés d'extracció del PMMA amb el diclorometà, per l'absorció del dissolvent en el copolímer.

Tanmateix, quan el copolímer és secat, la temperatura de transició vítria es situa per dalt de la temperatura ambient i al passar a l'estat vítri es preven el col·lapse de porus que podia haver tingut lloc si la matriu de l'estructura haguera estat fabricada d'un copolímer amb el mateix grau d'entrecruament, però amb una  $T_g$  per baix de la temperatura ambient.

L'objectiu d'aquest treball ha estat estudiar el col·lapse de porus en estructures poroses amb diferents composicions polimèriques, durant el procés d'extracció del porogen. Finalment, s'ha vist que per a composicions que es troben en estat vítri no s'hi produeix col·lapse de l'estructura porosa, mentre que, les composicions que es troben en estat de goma, el control del grau d'unflament de la xarxa polimèrica en el procés d'extracció del PMMA, és clau per obtenir estructures totalment interconectades.

### **3.6.- Propietats mecàniques dels suports polimèrics porosos.**

#### **3.6.1.- Introducció.**

El disseny del biomaterial ha d'exhibir unes adequades propietats mecàniques que proporcionen la correcta tensió en l'entorn per guiar el nou teixit. Les propietats mecàniques del suport depenen de la naturalesa del material del qual s'ha fet aquest, la seua densitat relativa i les característiques microestructurals.

Les propietats mecàniques del material porós per regeneració tissular han de ser similar al teixit o òrgan que s'intenta regenerar. Més encara, si són teixits que han de suportar càrregues com l'os, cartílag o teixits vasculars. Aleshores, l'interacció mecànica del material implantat amb l'entorn juga un paper clau. Els teixits es remodelen baix l'acció de les càrregues. Per exemple, els ossos adapten la seua geometria, densitat i/o arquitectura interna (cas de l'os trabecular) en resposta als canvis en les condicions de càrregues. Per tant, és molt important per a que la regeneració tinga lloc, que l'implant complisca les funcions biomecàniques del teixit natiu i que s'integre amb els teixits del voltants. En el cas de regeneració o reparació del teixit de l'os, l'implant hauria d'aguantar les càrregues inclòs en la fase postoperatòria. Òbviament, seria ideal si el suport porós minimitzara les propietats mecàniques del teixit natiu.

La resposta mecànica d'un material porós ha estat modelada per representació d'estructures cel·lulars de diferents maneres. El model més simple, és l'ús d'anàlisi dimensional per modelar els mecanismes de deformació i fallada sense donar una especificació exacta de la geometria cel·lular. Aquesta aproximació assumeix que la geometria cel·lular és similar en escumes de diferents densitats relatives, donant una dependència de les propietats mecàniques amb la densitat relativa i les propietats del sòlid del qual està sintetitzat. Però necessita experiments per determinar les constants relatives a la geometria cel·lular. Un altre tipus d'aproximació és l'utilització d'anàlisi d'elements finits amb estructures cel·lulars a l'atzar o regulars.

En aquest estudi; “**Suports porosos polimèrics amb arquitectura controlada de porus esfèrics interconnectats. Fabricació, propietats mecàniques i model d’elements finits**”, es sintetitzen un ample interval d’estructures poroses, amb diferents porositats i diàmetres de porus, per fer un estudi de les seues propietats mecàniques. Per això, es realitzant assajos experimentals a compressió i a banda, es realitza un estudi amb un model d’elements finits (FEM) que imita els suports porosos, aplicant càrregues i variant diversos paràmetres que poden influir en les propietats mecàniques. Amb aquest tractament, es poden treure conclusions de la influència que tenen els paràmetres geomètriques (porositat, interconexió i diàmetre de porus) sobre les propietats mecàniques de les estructures poroses.

### 3.6.2.- Discussió i Resultats.

En aquest treball s’ha utilitzat un procés de fabricació de suports polimèrics porosos ja utilitzat en anteriors estudis d’aquesta tesi [13][15], que es basa en injectar una solució monomèrica de composició desitjada entre els buits d’una plantilla de PMMA, per a que posteriorment polimeritze mitjançant mecanisme de radicals lliures i finalment, extraure el PMMA amb diclorometà i obtindre l’estructura porosa. Per aquest estudi, s’han obtés mitjançant aquest procediment de síntesi estructures interconnectades amb porus esfèrics amb un interval de porositats des de 70 fins al 95%. A més, a per cada porositat s’han sintetitzat bastides amb tres tamanys de porus diferents, escollits arbitràriament; 35, 90 i 250 micres. Aquest tipus d’arquitectura és especialment adequada per aplicacions d’enginyeria tissular òssia, ja que es requereixen materials 3-D que mimetizen l’estructura de l’os, amb un control de la porositat i diàmetre de porus. A hores d’ara, encara resulta ambigu decidir un tamany de porus òptim per a situacions de càrrega i no càrrega en regeneració d’os. En els diversos estudis s’han testat un ample interval de tamanys de porus [20-300]  $\mu\text{m}$  [80].

En aquest estudi la composició escollida per a totes les estructures poroses ha estat la mateixa; Poliacrilat d’etil (PEA) entrecreuat amb un 30% en pes de metacrilat de trietilenglicol (TEGDMA). Amb aquesta composició hidròfoba s’han obtés suport porosos completament interconnectats [16] i el PEA ha estat ja testat en cultius cel·lulars amb bons resultats [122].

La porositat de totes les estructures poroses ha estat determinada gravimètricament (punt 2.2.2.7). La densitat de la composició

70PEA/30TEGDMA en bloc s'ha obtingut seguint les instruccions del punt 2.2.2.6. Per estudiar la microestructura dels materials 3-D, es van realitzar micrografies de talls longitudinals i transversals de les mostres, mitjançant microscòpia electrònica d'escombrada (SEM). Per caracteritzar les propietats mecàniques dels suports porosos, es van realitzar assaigs de tensió de compressió de deformació seguint la norma "ASTM D1621-00, *Test Method for Compressive Properties of Rigid Cellular Solids*" (punt 2.3.5). Les propietats mecàniques són estudiades fent ús d'un model d'elements finits (FEM), en el qual l'assaig de tensió de compressió de deformació és simulat en una estructura ideal basada en el sistema cristal·lí cúbic centrat en les cares (CCC). Les propietats mecàniques en la zona lineal elàstica i la influència dels paràmetres geomètrics (porositat, diàmetre de porus i tamany de goles d'interconnexió) de les estructures poroses són explicades amb el model d'elements finits.

A la figura 3.23, es mostren les micrografies de les estructures poroses a diferents porositats per a un diàmetre de porus de 35  $\mu\text{m}$ .

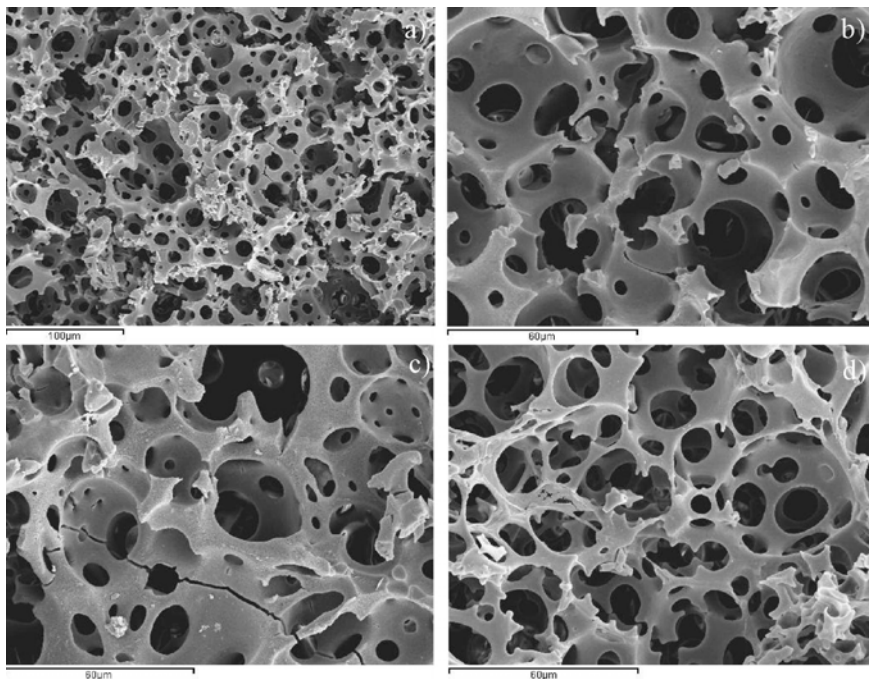


Figura 3.23. Micrografies SEM de suports porosos 70PEA/30TEGDMA amb el mateix tamany de porus (35  $\mu\text{m}$ ) i diferents porositats. a-b) 70 %, c) 75%, d) 85%

A la figura 3.24, es mostren les micrografies dels suports porosos a diferents porositats per a un diàmetre de porus de 90  $\mu\text{m}$ . Es veu a primer cop, com l'escala que està a peu de foto augmenta respecte a les estructures de 35 micres, el que equival lògicament a un major diàmetre de porus i un major tamany de goles d'interconnexió.

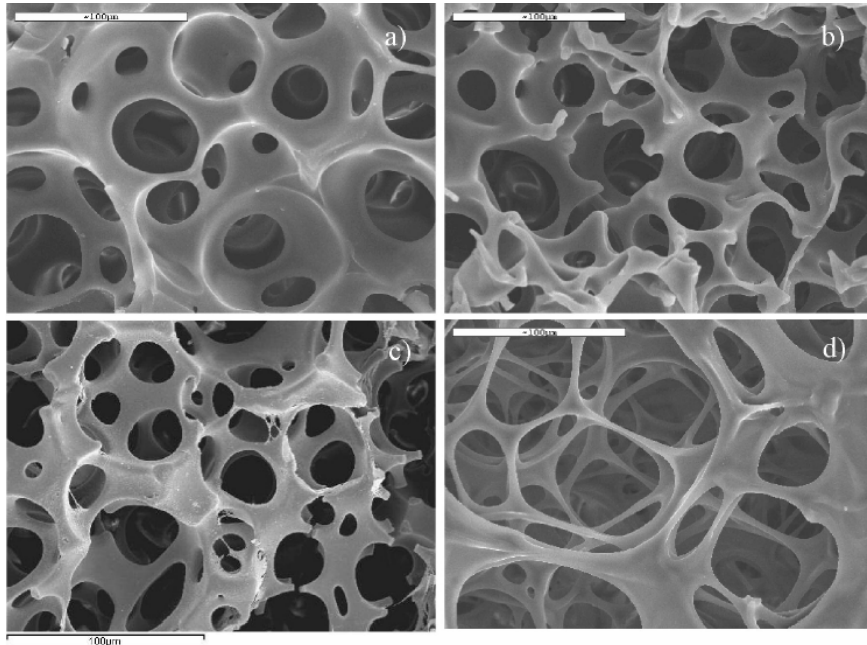


Figura 3.24. Micrografies SEM de suports porosos 70PEA/30TEGDMA amb el mateix tamany de porus (90  $\mu\text{m}$ ) i diferents porositats. a) 70 %, b) 75%, c) 85% i d) 95%.

A la figura 3.25, es mostren les micrografies de les bastides poroses a diferents porositats per a un tamany de porus de 250  $\mu\text{m}$ . Veient els suports porosos per als tres diàmetres de porus, es pot afirmar que en els tres casos el tipus d'arquitectura és la mateixa, porus de geometria esfèrica interconnectats. Els tamany de porus ve determinat per el diàmetre de les esferes que formen la plantilla de PMMA i la porositat per les condicions de sinterització que s'aplica al PMMA; pressió i temperatura. Com s'espera el tamany de les goles d'interconnexió augmenta a mesura que ho fa la porositat (per a un tamany de porus fixe), perquè aquest és el mecanisme real de control de la porositat. Per al cas dels suports porosos de la figura 3.23, estan realitzats amb un porogen de diàmetre  $35\pm 10$   $\mu\text{m}$ . L'interval de

porositat va des de 70% (Figura 3.23a) fins al 85% (Figura 3.23d) on les goles d'interconnexió quasi es dupliquen. Tanmateix, les estructures realitzades amb porogen de diàmetre  $90\pm 10\ \mu\text{m}$  mostren un major interval de porositats que van des de 70% (Figura 3.24a) fins al 95% (Figura 3.24d), on es pot observar l'increment del tamany de les goles d'interconnexió a mesura que ho fa la porositat, i per la porositat més alta (Figura 3.24d), les interconnexions són tan grans que el material que forma part de l'estructura porosa, queda reduït a bigues i pilars de xicotet espessor que literalment formen una bastida. Finalment, les estructures que es mostren a la Figura 3.25, estan realitzades amb un porogen de diàmetre  $250\pm 100\ \mu\text{m}$ .

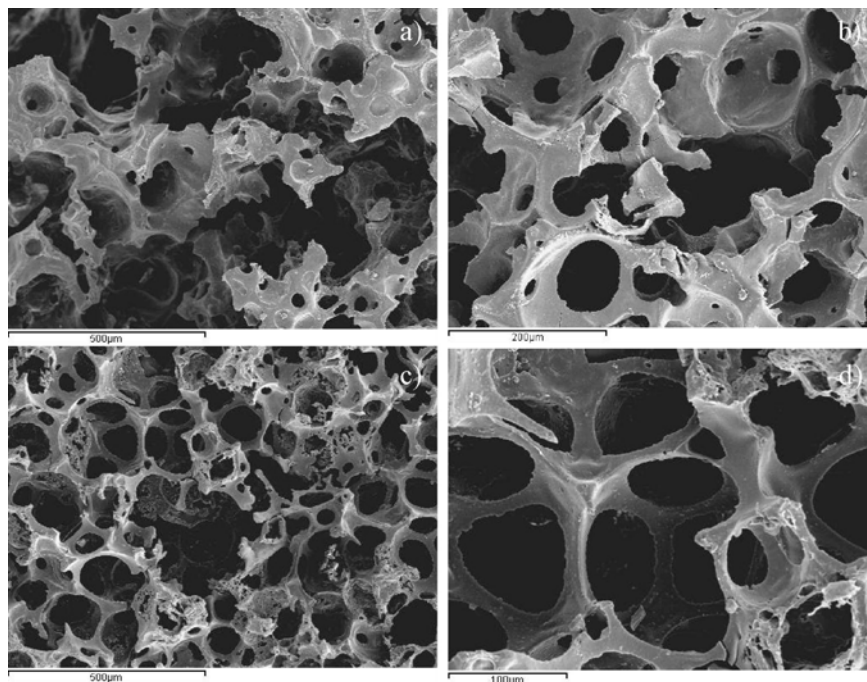


Figura 3.25. Micrografies SEM de suports porosos 70PEA/30TEGDMA amb el mateix tamany de porus ( $250\ \mu\text{m}$ ) i diferents porositats. a) 70 %, b) 75%, c)-d) 85%.

Per tant, aquestes últimes estructures poroses són les de major tamany de porus i de goles d'interconnexió, com es pot veure a l'escala al peu de les imatges. La Figura 3.25d és una ampliació de l'estructura de porositat 85% (Figura 3.25c), en ambdues figures es pot observar clarament com a l'augmentar el diàmetre de porus la microestructura dels suports porosos és similar a l'obtesa en els diàmetres d'inferiors.

Per tant, les micrografies del SEM de les figures 3.23-3.25 demostren que el procés de fabricació de suports porosos permet obtenir la porositat i el tamany de porus desitjat (i consegüentment, el tamany de porus a través de les goles d'interconnexió) d'una forma senzilla. A més, la composició química pot ser modificada sense modificació de l'estructura tridimensional, com s'ha realitzat en treballs anteriors copolimeritzant amb un monòmer hidrofílic [13].

El comportament mecànic típic que té un sòlid cel·lular o material 3-D, davant un assaig de compressió és pot observar a la següent corba tensió a compressió front deformació per un suport porós de composició 70%PEA/30%TEGDMA, amb una porositat 65% i un diàmetre de porus 90 micres. La temperatura de transició vítria del material en bloc ( $T_g \approx 4.3^\circ\text{C}$ ), del qual està fabricat l'estructura porosa, està per baix de la temperatura ambient i per tant es tracta d'una estructura porosa elastomèrica.

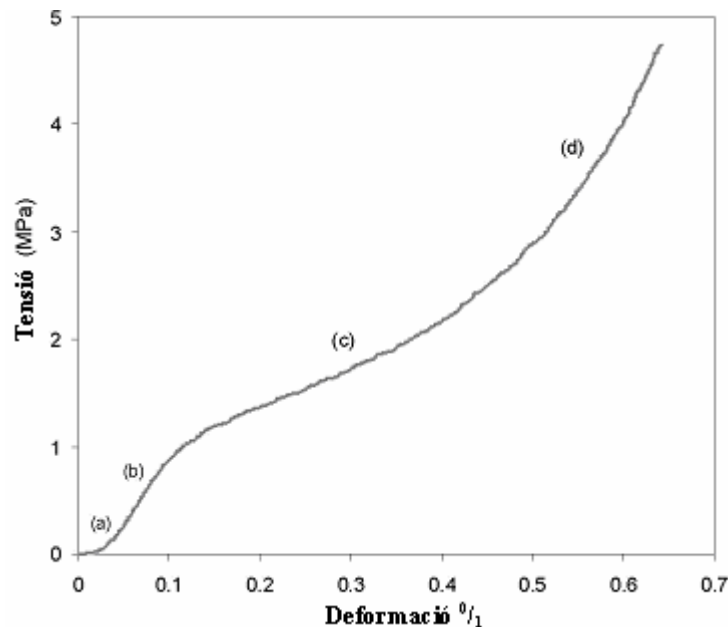


Figura 3.26. Corba experimental de l'assaig tensió a compressió deformació per un suport porós de composició 70%EA/30%TEGDMA amb una porositat del 65%. Les lletres al llarg de la corba indiquen els diferents règims que es van succeint.



La corba tensió a compressió deformació experimental d'un suport polimèric porós es caracteritza per 4 zones com es pot observar a la figura 3.26. Primerament, una regió inicial de contacte de la mostra amb les mordasses (a), seguida d'una zona amb comportament elàstic lineal (b) per passar a una regió on es donen baixes tensions amb grans deformacions (*plateau*) (c) i finalment, l'últim règim on la tensió augmenta bruscament degut al col·lapsament o densificació de l'estructura porosa (d) [54]. El mecanisme associat a cada regió de les corbes en sòlids cel·lulars ha estat ja descrit en l'introducció (punt 1.6.2), però anem a explicar breument els mecanismes que ocorren als suports porosos en cada zona de la corba tensió de compressió deformació. La regió elàstica lineal és produïda per flexió elàstica (*bending*) de les parets de les cel·les en l'estructura porosa. El mòdul de Young experimental (E) es calcula a partir de la pendent inicial d'aquesta regió. La zona de *plateau* associada al progressiu col·lapsament dels porus pot estar produïda per diversos mecanismes, però si el material del qual estan construïdes les estructures poroses és una goma ( $T_g \approx 4.3^\circ\text{C}$ ), com ocorre en els materials 3-D sintetitzats en aquest estudi, el mecanisme predominant és doblament o pandeig elàstic (*buckling*) [158]. En la última etapa (d), l'estructura està completament col·lapsada, i es produeix un augment bruscat de la tensió de compressió per la pressió que realitzen les parets de l'estructura al tocar-se entre elles.

A les properes gràfiques es mostren els assajos mecànics dels diferents suports polimèrics porosos, on la composició es manté invariable (70%PEA/30%TEGDMA) i es va canviant tant la porositat com el diàmetre de porus. Per tant, a la figura 3.27, s'observa les corbes tensió a compressió deformació a mesura que augmenta la porositat per un tamany de porus constant (250  $\mu\text{m}$ ). A primer cop, es pot observar que les corbes no tenen les quatre zones característiques de l'assaig tensió de compressió deformació per materials 3-D (Figures 1.8 i 3.26). Això és degut, a que altes porositats (a partir del 75%) i amb aquesta composició (una goma), la zona on es produeix la flexió elàstica (*bending*) i la zona on comença el col·lapsament dels porus per pandeig elàstic (*buckling*), és solapen no podent-se distingir amb claredat les dues zones.

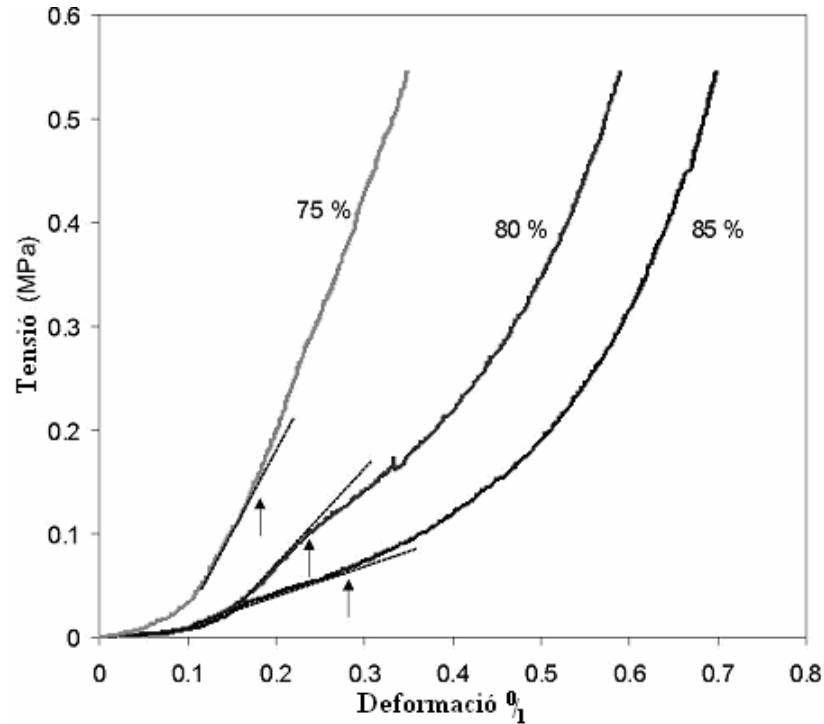


Figura 3.27. Corbes tensió de compressió deformació per materials 3-D amb diferents porositats i el mateix tamany de porus (aprox. 250  $\mu\text{m}$ ). Les fletxes indiquen l'aparició del començament del col·lapse (*plateau*).

Com es veu a les corbes de la figura 3.27, el pendent inicial de la zona elàstica lineal disminueix a mesura que la porositat augmenta. Eixa mateixa tendència es pot observar en la deformació total que té un valor major en les corbes de major porositat, degut lògicament a que hi ha menys contingut de material.

Per tant, a partir de la figura 3.27, es pot calcular el mòdul de Young a distintes porositats, que té una tendència a disminuir amb la porositat; amb un valor de 2.18 MPa per a 75% de porositat fins a 0.47 MPa per al 85% de porositat. També s'observa, com el començament del col·lapsament (*Plateau*), es mou cap a major deformacions i és més definit a mesura que la porositat incrementa. A més, la pendent final de les corbes tensió-deformació quan s'ha produït el col·lapsament de porus és la mateixa per totes les corbes (independent de la porositat i el tamany de porus) i és equivalent al mòdul elàstic del material en bloc del qual està fabricat l'estructura porosa. Per una altra banda, a mesura que la porositat augmenta

l'espessor dels suports de l'estructura disminueix, encara que la longitud de les bigues i columnes es manté aproximadament constant (degut al procés de fabricació). Per tant, quan la porositat augmenta la relació diàmetre dels suports longitud, disminueix, i amb una tensió menor es produeix el pandeig elàstic (*buckling*), com s'observa a la figura 3.27.

Per altra banda, a la figura 3.28, es mostren els experiments de tensió a compressió deformació per als tres tamanys de porus, fixant la porositat (aprox. 85%).

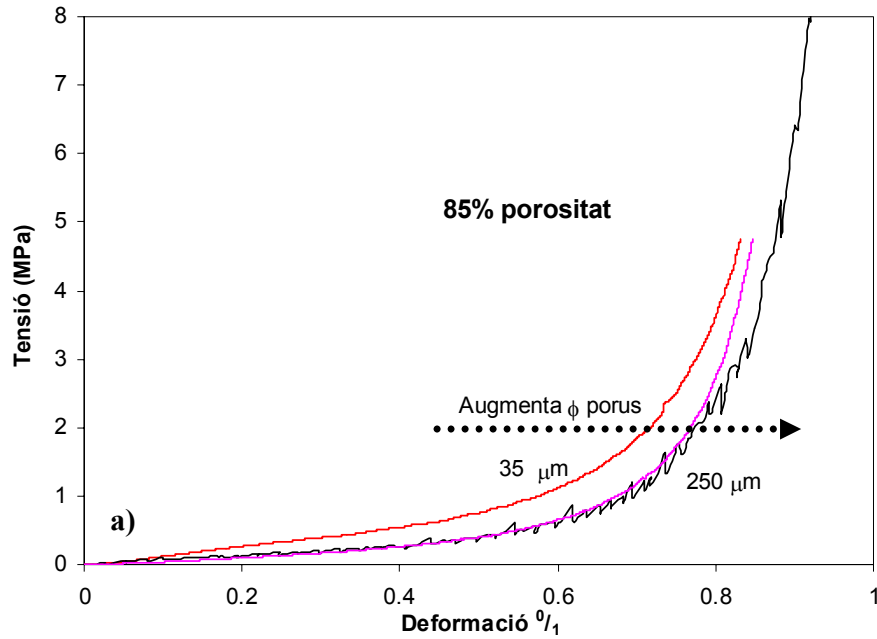


Figura 3.28. a) Mostra les corbes tensió de compressió deformació per als tres tamanys de porus a una porositat fixa del 85%.

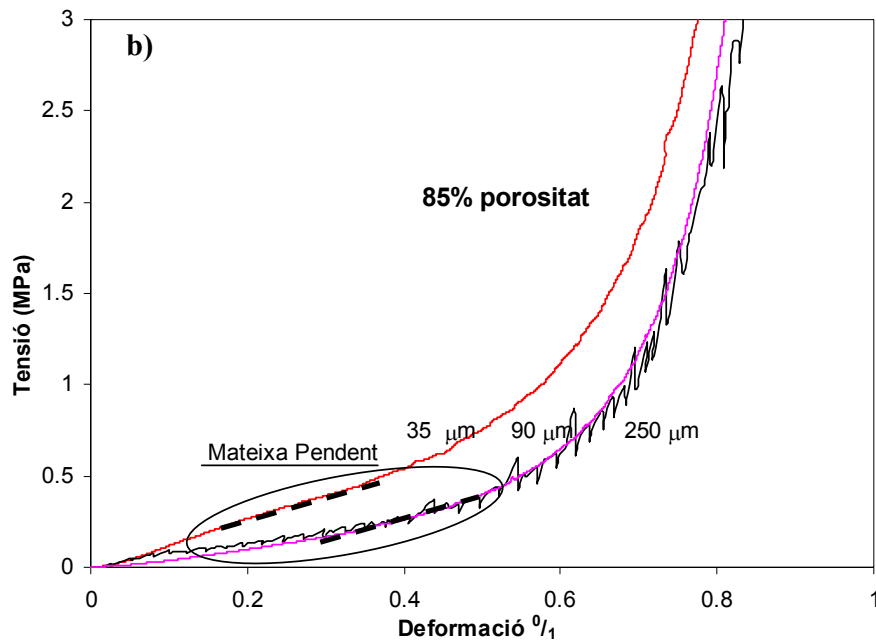


Figura 3.28. b) Ampliació de la zona elàstica lineal, de les corbes tensió a compressió deformació per als tres tamanyes de porus a una porositat fixa del 85%.

A la figura 3.28a, no es pot apreciar amb claredat la zona elàstica lineal ni el començament del *plateau*. Però si s'observa com a menor porositat la deformació total que s'assoleix és menor, degut a que amb porus xicotets l'empaquetament del material quan es comprimeix resulta més complicat. Per obtenir una visió més detallada de la zona elàstica lineal, s'ha realitzat una ampliació d'aquesta zona a la figura 3.28b. On s'ha calculat el mòdul de Young per les estructures poroses amb una porositat constant del 85% i amb tres diàmetres de porus; 35, 90 i 250 micres. Com s'aprecia a les tres corbes el pendent de la zona elàstica lineal és pràcticament la mateixa, amb un valor del mòdul de Young de  $0.6 \pm 0.15$  MPa. A banda, se observa que el començament del col·lapse de porus no té lloc al mateix valor de deformació per a les diferents corbes, a més, quan el diàmetre de porus és més xicotet la tensió en la zona *plateau* és major. Per tant, el tamany de porus té una influència directa amb les propietats mecàniques dels materials 3-D, encara que sembla que les propietats elàstiques mecàniques sols depenen de la porositat total.

Aquest resultat es contradictori amb un altre estudi que es va realitzar amb escumes d'alumini, arribant a la conclusió de que el tamany de

porus influïa en el mòdul de Young [151], però es concordant amb un altre estudi on es tracta un cas d'homogeneïtzació computacional, per aplicació d'una flexió lineal elàstica (*bending*) d'una peça rectangular plana baix unes condicions de deformació. En aquest exemple, es prenen 11 cel·les unitats diferents amb una distribució de porus totalment a l'atzar (però totes amb una fracció en volum constant del 12%) com s'observa a la figura 3.29. El comportament promig d'aquestes 11 cel·les unitat s'espera estiguen representatives de l'estructura reial. Finalment, es compara els resultats mecànics per a tres tipus de matrius, arribant a la conclusió que per a xicotetes deformacions no s'observa pràcticament diferències en la resposta del material. Per grans a deformacions encara que s'observa una major diferència, les desviacions no són massa significatives.

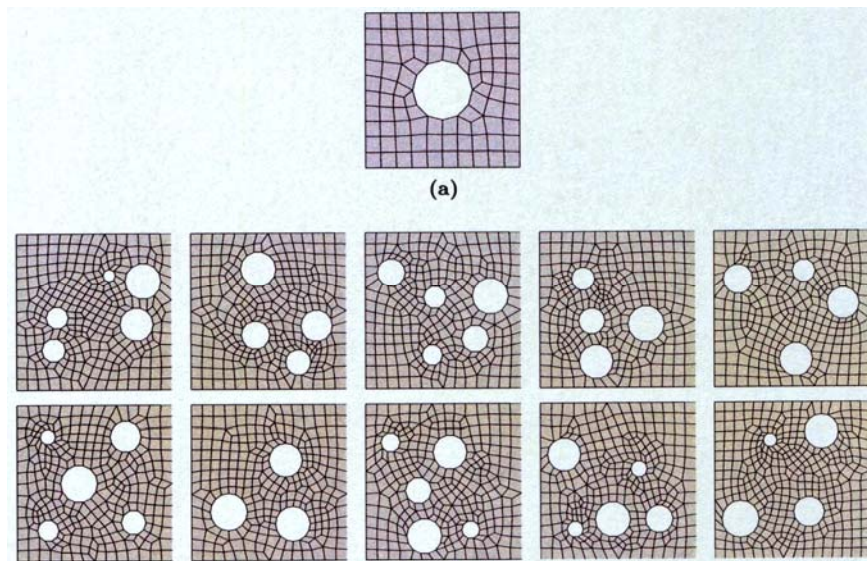


Figura. 3.29 Matrius rectangulars planes amb un 12% de fracció en volum amb distribució de porus a l'atzar [53].

Les propietats mecàniques experimentals dels suports porosos van ser contrastades mitjançant un estudi amb model d'elements finits (FEM). Primerament, es va dissenyar una estructura tridimensional similar al suports porosos sintetitzats i és va simular el test tensió a compressió deformació aplicat als assajos experimentals; “ASTM D1621-00, *Test Method for Compressive Properties of Rigid Cellular Solids*”, però sols fins la zona elàstic lineal. En virtut de la linearitat del problema i per evitar els efectes de la distribució de tamanys de porus, la microestructura geomètrica es modelada idealment com una estructura cúbica centrada en les cares (CCC)

[44], considerant que els porus esfèrics són situats d'acord amb l'estructura (CCC). Aquesta estructura conté el màxim empaquetament de les esferes en l'espai i es sembla a la estructura geomètrica del suport porós sintetitzat com es mostra a la figura 3.30. Com la microestructura es considerada i modelada com isotròpica, la resposta mecànica del material 3-D, estarà determinada per dos constants; el mòdul elàstic, que depèn de la porositat i el coeficient de *Poisson* que és independent de la porositat [75].

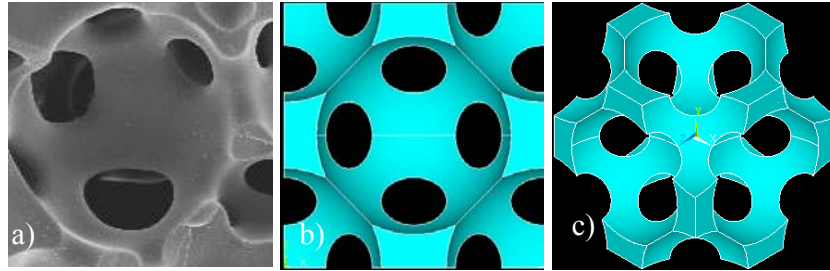


Figura 3.30. Comparació de les imatges de les estructures poroses obteses mitjançant a) Microscòpic electrònic (SEM) i les obteses amb b)-c) el model FEM basat en una estructura CCC.

Per tant, per tal d'entendre les propietats mecàniques del material, especialment la dependència del mòdul de Young amb els factors geomètricament característics de l'estructura (porositat total i diàmetre de porus), el model d'elements finits es va plantejar amb diferents porositats i tres diàmetres de porus; 35, 90 i 250  $\mu\text{m}$ . A la figura 3.31, es mostren els resultats de les simulacions del FEM, que es van obtenir seguint la teoria de l'homogeneïtzació [53][67][136], en la qual s'assumeix que la microestructura de l'estructura porosa és localment periòdica. Això significa que repetint una estructura unitària bàsica es crea la microestructura de la bastida porosa. Per tant, el mòdul de Young calculat és un valor promig de dels mòduls elàstic de tota l'estructura porosa.

A la figura 3.31, es representa el mòdul de Young front a la porositat. L'interval de porositats en el qual s'ha treballat ha estat des de 77% fins al 94%, per als tres diàmetres de porus. Per tant, a la figura 3.31 s'ha representat els tres diàmetres de porus; 35 ( $\blacktriangle$ ), 90 ( $\bullet$ ) i 250 ( $\blacksquare$ ) micres, a diferents porositats. Els resultats experimentals ( $\circ$ ) també han estat inclosos. Com s'observa a la línia de punts de la figura 3.31, el model prediu una disminució del mòdul elàstic amb la porositat seguint una tendència parabòlica. A més, els resultats del model estan en concordança amb els resultats experimentals. Per una banda, suggereixen que el mòdul de Young sols depèn de la porositat total i no del tamany de porus, en contra d'altres

investigacions que es poden trobar a literatura [23][70][151]. Per altra banda, les dades experimentals tenen una bona concordància amb la corba mestra que dona la dependència de la porositat amb les propietats elàstiques (Figura 3.31).

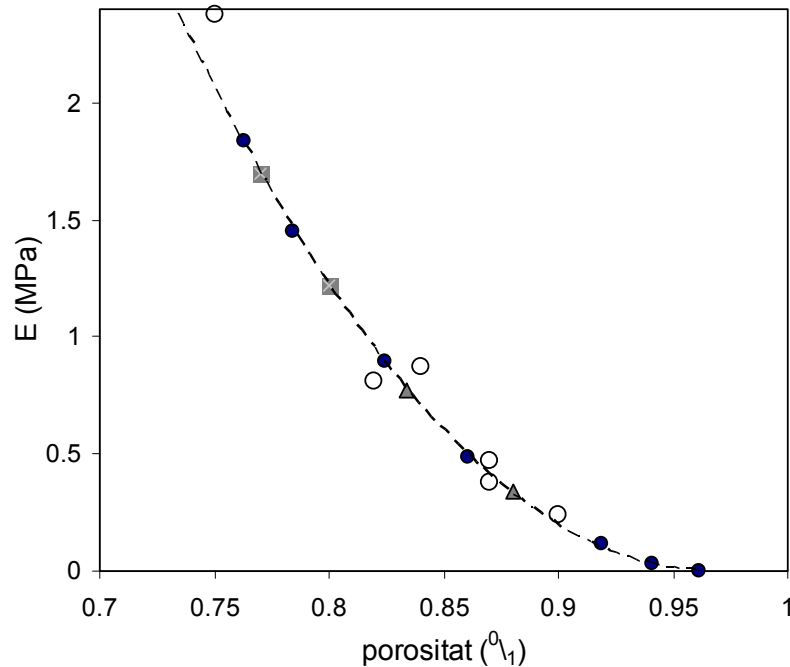


Figura 3.31. Mòdul de Young de dades Experimentals (○) i predicció mitjançant FEM en funció de la porositat per diàmetres de porus: 35 μm (▲), (●) 90 μm i (■) 250 μm.

La dependència exponencial que té el mòdul elàstic del material 3-D amb la densitat relativa [54][78] es descriu per la següent equació (3.9)

$$\frac{E}{E_b} = C \left( \frac{\rho}{\rho_b} \right)^2 \quad (3.9)$$

On  $\rho$  i  $\rho_b$  són la densitat aparent del suport porós i del material en bloc constitutiu del suport, respectivament. La densitat relativa ( $\rho/\rho_b$ ) és pot relacionar amb la porositat  $P$ , amb la següent equació:

$$\frac{\rho}{\rho_b} = 1 - P \quad (3.10)$$

Per tant, amb l'equació 3.11 relacionem el mòdul de Young de l'estructura porosa amb la porositat.

$$\frac{E}{E_b} = C(1 - P)^2 \quad (3.11)$$

La representació del mòdul com una funció del quadrat de la porositat es representa en la figura 3.32, on es mostren les dades experimentals i les obteses mitjançant simulació del model FEM, per a diferents porositats i els tres tamanys de porus. Els valors del mòdul de Young i la densitat del material en bloc del qual ha estat fabricat els suports porosos (composició 70EA/30TEGDMA) són:  $E_b=31$  MPa i  $\rho_b=1.160$ g/cm<sup>3</sup>. L'ajust de l'equació (3.11) (línea discontinua) s'ha realitzat amb les dades obteses mitjançant simulació del model FEM, obtenint un valor de  $C=1.002$ , encara que amb un ajust amb les dades experimentals s'haguera obtés un valor semblant de  $C$ , com es pot veure a la figura 3.32.



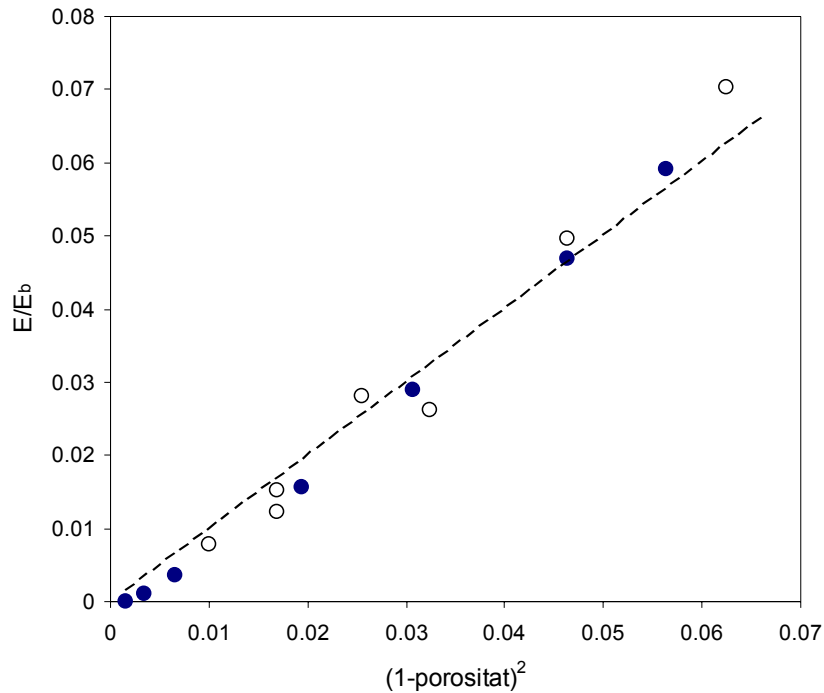


Figura 3.32. Dades del mòdul experimental (○) dels assajos a compressió i ajust de l'equació 3.11 (línia discontinua) amb els valors obtinguts amb el model d'elements finits (●).

Aquesta correlació de dades ens dóna idea de quin són els paràmetres que influeixen en el mòdul de Young del material 3-D i de quina manera ho fan. L'equació 3.11 està basada en arguments dimensionals i la constant  $C$  sols depèn de la geometria de l'estructura porosa. Per tant, queda clar que el diàmetre de porus i la porositat no fa que canvien els paràmetres geomètrics de les estructures poroses i per es manté la mateixa arquitectura als suports porosos independentment de la porositat o el diàmetre de porus. Per exemple, per a escumes polimèriques amb diferents densitats relatives, s'ha trobat un valor de  $C \sim 1$  fent un estudi d'anàlisi dimensional [54], amb un anàlisi estructural s'ha obtingut un valor de  $C = 0.98$  [160], i per mètode d'elements finits  $C = 0.8$  [156].

Diferents valors de  $C$  han estat reportats per escumes amb diferents geometries de la cel·la unitat. Per aquest treball, una única constant és

encontrada independent del tamany de porus i la porositat del material 3-D, confirmant la dependència del mòdul de Young amb la porositat total, però sense influir el diàmetres de porus o el tamany de goles d'interconnexió.

## Capítol 4.- Conclusions.

1. S'ha obtés una metodologia per a fabricar suports porosos polimèrics, amb una arquitectura definida; porus esfèrics d'un tamany definit, i interconnectats regularment al llarg de l'estructura. Es tracta d'un mètode senzill i versàtil, on es pot variar; la porositat, el tamany de goles d'interconnexió, el tamany de porus i la hidrofilitat del material, mantenint-se la mateixa arquitectura de l'estructura porosa, independentment del canvi de variable que es realitzi. El comportament mecànic de les mostres poroses és significativament diferent comparat amb el material en bloc de la mateixa de composició, no sols el mòdul és menor sinó que hi ha indicis de que la relaxació té un comportament distint degut a l'efecte de les capes superficials.

2. Es coneixen les propietats mecàniques experimentals dels suports porosos en la zona elàstic linear i com els afecta els paràmetres geomètrics com el tamany de porus, porositat i tamany de goles d'interconnexió. Suggestint les dades que l'únic paràmetre que influeix en el mòdul de Young és la porositat.

3. Es coneixen les propietats mecàniques experimentals dels suports porosos en la zona no linear i com els afecta els paràmetres geomètrics com el tamany de porus, porositat i tamany de goles d'interconnexió. Arribant a la conclusió que quan augmenta la porositat, s'assoleix una major deformació, i la zona de *plateau* on es produeix el col·lapse de porus és més definida. A més, en aquesta zona no linear el tamany de porus afecta el comportament mecànic del material. Per una banda, s'observa que el començament del col·lapse de porus no té lloc al mateix valor de deformació als diferents tamanyes de porus, i quan el diàmetre de porus és més xicotet la tensió en la zona *plateau* és major. Per tant, el tamany de porus té una influència directa amb les propietats mecàniques dels materials 3-D, encara que les propietats elàstiques mecàniques solament depenen de la porositat total. Per altra banda, la representació del mòdul de Young front al quadrat de la porositat de les estructures poroses, deixa clar que el diàmetre de porus, porositat i tamany de goles d'interconnexió, no fa que canviï la microestructura dels materials 3-D, i agrupa tots els paràmetres geomètrics

en una única constant. Finalment, s'observa que quan el tamany de porus és menor la corba tensió de compressió deforma arriba fins a menors deformacions (per una porositat constant), degut a que a l'haver un nombre major de porus l'empaquetament del suport porós és pitjor.

4. S'ha simulat el comportament elàstic lineal dels materials 3-D mitjançant un model d'elements finits (FEM) basat en l'empaquetament dels porus seguint la geometria cúbica centrada en les cares (CCC), degut que l'estructura resultant imita les característiques geomètriques dels materials 3-D sintetitzats. S'ha entès l'influència dels paràmetres geomètrics (porositat, tamany de goles d'interconnexió i tamany de porus) sobre les propietats elàstiques lineals dels suports porosos. Les conclusions que s'han obtingut mitjançant simulació amb FEM són concordants amb les propietats observades en la zona lineal elàstica dels assajos de compressió realitzats a les estructures poroses. El mòdul de Young no depèn de les característiques geomètriques del porus (tamany de porus i tamany de goles d'interconnexió), sempre que aquests dos factors no canvien l'arquitectura de l'estructura porosa. El mòdul de Young sols depèn de la porositat.

5. El col·lapse de porus durant la fabricació de l'estructura porosa polimèrica ha estat estudiat sistemàticament. El gran increment del volum de la xarxa com a conseqüència del procés d'unflament en l'extracció de la plantilla de PMMA, produeix un encolliment de l'estructura porosa quan és secada i com a conseqüència s'obté l'estructura col·lapsada. S'ha demostrat que quan s'augmenta la densitat d'entrecruador en la xarxa polimèrica que forma la bastida porosa (mantenint constant el paràmetre d'interacció polímer-dissolvent) s'assoleix una estructura porosa regularment interconnectada, prevenint així el col·lapse de porus. El col·lapse de porus no té lloc si el polímer del qual està fabricat la bastida està en estat vitri, encara que la xarxa polimèrica arribi fins a alts percentatges d'unflament del dissolvent i l'estructura porosa disminueix bruscament el seu espessor en el procés de secat. L'increment de  $T_g$ , amb valors per damunt de la temperatura ambient, explica aquest comportament de les xarxes polimèriques quan són secades.

6. L'efecte de la radiació  $\gamma$  en la xarxa del copolímer P(EA-co-HEMA) s'ha estudiat per caracterització del material amb assajos dinàmico-mecànics (DMS) i infraroig (FTIR) una volta s'ha exposat el copolímer a radiació  $\gamma$ , en un interval de radiacions que girava al voltant de la dosi estàndard d'esterilització 25 kGy. El mòdul de goma del PEA homopolímer augmenta com a conseqüència dels nous entrecruaments que són induïts per

la radiació. Pel contrari, en el PHEMA el mecanisme predominant a mesura que la dosi de radiació augmenta és l'escissió, que es reflexa en una disminució del mòdul de goma. L'efecte de la radiació en els copolímers pot ser obtesa com una superposició linear dels homopolímers corresponents, que coincideix amb la nanoheterogeneïtat del sistema que formen els copolímers EA/HEMA.

7. La radiació té també un efecte en l'intensitat del mecanisme de relaxació associat al moviment del grup  $-OH$ . El nombre de ponts d'hidrogen disminueix quan la dosi de radiació  $\gamma$  augmenta. Això, es confirma a l'espectre infraroig del PHEMA, on s'observa com quan la dosi augment hi ha una major intensitat en la banda d'absorció dels  $-OH$  associats als ponts d'hidrogen. Finalment, FTIR ha confirmat la absència de qualsevol procés d'oxidació en les mostres esterilitzades a qualsevol dosi.

8. El material que s'ha obtés per copolimerització mitjançant radicals lliures del EA i l'HEMA no és un copolímer a l'atzar però sí un sistema heterogeni com l'aplicació de la teoria de la copolimerització suggereix i els experiments de relaxació estructural confirmen. La tècnica del DSC proporciona un major detall en l'estructura del sistema i té la capacitat de mostrar si hi ha associació o no de les unitats monomèriques en regions amb un mínim tamany de l'ordre dels CRR (uns pocs nanòmetres). Les cadenes de copolímers estan formades per llargs blocs d'HEMA i algunes unitats d'EA, degut a l'alta diferència entre les constants de reactivitat dels dos comonòmers, i això dona lloc a que algunes cadenes de PEA pur estiguen també presents en el sistema final.



## Glossari.

BA	Acrilat de butil
<i>bending</i>	Mecanisme de doblament elàstic linear dels suports que mantenen la cel·la (bigues/pilars) en l'estructura porosa.
<i>buckling</i>	Pandeig elàstic dels suports que mantenen la cel·la (bigues/pilars) en l'estructura porosa
C i n	Constants que depenen de les característiques microestructurals d'un sòlid cel·lular
$c_2$	Paràmetre de Williams–Landel– Ferry
CCC	Geometria cúbica centrada en les cares
CH03	Copolímer amb 30% de PHEMA i 70% PEA, en pes
CH05	Copolímer amb 50% de PHEMA i 50% PEA, en pes
CH07	Copolímer amb 70% de PHEMA i 30% PEA, en pes
CRR	Regió de reagrupaments cooperatius d'un material
$c_p$	Capacitat calorífica de la mostra (J/gK)
$c_{pref}$	Capacitat calorífica de referència (J/gK)
$c_p - c_{pref}$	Diferència de capacitats calorífiques de la mostra i la referència (J/gK)
$(c_p - c_{ref})_{màxim}$	Màxim d'altura del pic en la corba ( $c_p - c_{ref}$ )
$d_2$	És la densitat d'entrecruament d'una xarxa polimèrica
$E'$	Mòdul de goma
E	Mòdul de Young del sòlid cel·lular
$E_s$	Mòdul de Young material en bloc o no porós
EA	Acrilat d'etil
%EA <sub>cop</sub>	Percentatge molar d'EA en el copolímer
%EA <sub>0</sub>	Fracció molar de monòmers d'EA en la barreja de reacció
ECM	Matriu extracel·lular
EGDMA	Dimetacrilat d'etilenglicol
EMA	Metacrilat d'etil
EO	Òxid d'etilè
F	Càrrega transversal
$F_i$	Fracció molar dels monòmers en el copolímer
$f_i$	Fracció molar dels monòmers en la barreja inicial de reacció
FEM	Mètode d'elements finits

HEMA	Metacrilat d'hidroxieti
Homopolímer	Polímer format amb un sols monòmer
l	Longitud de biga en una cel·la
$m_{3-D}^e$	Massa eixugada en l'estructura porosa
$m_{3-D}^u$	Massa unflada d'aigua en l'estructura porosa
Material 3-D	Material amb una estructura porosa
Material en bloc	Material sense porus
$\bar{M}_c$	Pes molecular promig entre punts d'entrecreuaments
$n_c$	Nombre de mols de cadenes elàsticament actives
$n_c/V, n_c/V_2$	Densitat de cadenes elàsticament actives
PEA	Poliacrilat d'etil
<i>plateau</i>	Zona corresponent al progressiu col·lapsament dels porus i es dóna a baixes tensions amb llargues deformacions
PMMA	Polimetacrilat de metil
PHEMA	Polimetacrilat d'hidroxietil
TEGDMA	Trimetacrilat d'etilenglicol
$r_i$	Constant de reactivitat del monòmers
R	Constant universal dels gasos perfectes
RVE	Element de volum representatiu d'una microestructura
SAL	Nivell seguretat d'esterilitat
<i>stretching</i>	Mecanisme de doblament elàstic linear de les cares per estructura porosa amb cel·les tancades
t	Espessor de biga en una cel·la
$t_a$	Període de temps que es deixa una mostra en el DSC a una temperatura isoterma.
$T_a$	Temperatura propera a la $T_g$ a la qual es realitza una isoterma per un període determinat
$T_g$	Temperatura de transició vítria
$T_{inicial}$	Temperatura inicial on comença la mesura de la mostra
$T_1$	Temperatura més baixa a la que es refreda la mostra quan es realitzen assajos de relaxació estructural en el DSC.
$V, V_2$	Volum de la mostra
$v_1$	Volum molar del solvent (64.26 cm <sup>3</sup> /mol per al diclorometà)
$V_a(\phi)$	Volum de un CRR d'un material multifase
$V_{3-D}$	Volum ocupat per l'estructura porosa
$V_{porus}$	Volum ocupat pels porus a l'estructura porosa
$V_{polímer}$	Volum ocupat pel polímer a l'estructura porosa



w	Capacitat dels materials en bloc per absorbir diclorometà (massa de dissolvent absorbit per la massa del polímer sec)
$\omega^*$	Massa d'aigua que absorbeix en equilibri el polímer en bloc dividit per la massa del polímer sec
$\omega_s^*$	La mateixa mesura però referida a una estructura porosa.
Xarxa	Xarxa polímer entrecreuat químicament
Xarxa	Polímer entrecreuat químicament
$\bar{\chi}_{12}$	Paràmetre d'interacció aparent de Flory-Rehner
$\delta$	Flexió elàstic linear d'una biga de longitud en una cel·la
$\phi$	Composició d'un material multifase
$\phi_1$	Fracció de volum en equilibri del dissolvent en la xarxa
$\rho$	Densitat d'una estructura porosa
$\rho_{\text{aigua}}$	Densitat de l'aigua
$\rho_b$	Densitat del polímer en bloc
$\rho/\rho_s$	Densitat relativa de l'estructura porosa respecte al material en bloc
$\rho_s$	Densitat material en bloc o no porós
ATR	Reflectància Total Atenuada
DSC	Calorimetria Diferencial d'Escombrada
DMS	Espectroscopia Dinàmica-Mecànica
FTIR	Infraroig de Transformada de Fourier
SEM	Microscòpia electrònica d'escombrada



## Referències.

- [1] Adam, G. i Gibbs, J.H. J Chem Phys (1965) 43:139.
- [2] Akhavan, J., Kronfli E. i Waring S.C. Polymer (2003) 44:7617.
- [3] Alfrey, T. i Goldfinger F. J Chem Phys (1944) 12:205.
- [4] Atala, A. i Lanza, R.P. Methods of Tissue Engineering. Academic press (2002).
- [5] Ashcroft N.W. i Mermin N.D. Solid state physics. (1976). Philadelphia: Saunders College.
- [6] Aulthouse, A.L., Beck, M., Griffey, E., Sanford, J., Arden, K., Machado, M.A. i Horton, W.A. In vitro cell Dev. Biol (1989) 25:659.
- [7] Aymes-Chodur, C., Betz, N., Legendre, B. i Yagoubi, N. Polymer Degradation and Stability (2006) 91:649.
- [8] Babésee, J.E., Anderson, J.M., McIntire, L.V. i Mikos, A.G. Adv Drug Deliv Rev (1998) 33:111.
- [9] Baldrian, J., Kolarz, B.N. i Galina, H. Coll Czech Chem Commun (1981) 46:1675.
- [10] Bhateja, S.K., Andrews, E.H., Young, R.J. J Polym Sci Polym Phys Ed (1983) 21:523.
- [11] Boyan, B.D., Hummert, T.W., Dean, D.D. i Schwartz, Z. (1996). Biomaterials 17:137.
- [12] Brandrup, J. i Immergut, E.H. Polymer handbook, 3rd ed. (Chapter II) New York. Wiley; (1989).
- [13] Brígido Diego, R., Pérez Olmedilla, M., Serrano Aroca, A., Gómez Ribelles, J.L., Monleón Pradas, M., Gallego Ferrer, G. i Salmerón Sánchez M. J Mater Sci Mater Med (2005) 16:693.
- [14] Brígido Diego, R., Gómez Ribelles, J.L., Monleón Pradas, M. i Salmerón Sánchez, M. *Effect of  $\gamma$ -radiation on the structure of poly(ethyl acrylate-cohydroxyethyl methacrylate) copolymer networks for biomedical applications.* Journal of Materials Science: Materials in Medicine. Accepted, December 2005.
- [15] Brígido Diego, R., Más Estellés, J., Sanz, J.A., García-Aznar, J.M. i Salmerón Sánchez, M. *Polymer scaffolds with interconnected spherical pores and controlled architecture for tissue engineering. Fabrication, mechanical properties and finite element modelling.* Journal of Biomedical Materials Research: Part B—Applied Biomaterials. Acceptat en Juliol del 2006.

- [16] Brígido Diego, R., Gómez Ribelles, J.L. i Salmerón Sánchez, M. *On the pore collapse during the fabrication process of rubber-like polymer scaffolds*. Journal of Applied Polymer Science. Acceptat en Juliol del 2006.
- [17] Brittberg, M., Lindahl, A., Nilsson, A., Ohlsson, C., Isaksson, O i Peterson L. New England Journal of Medicine (1994) 331:889.
- [18] Bruder, S.P., Fink, D.J. i Caplan A. Cell Biochem (1994) 56:283.
- [19] Bruinsma, G.M., Van Der Mei, H.C. i Busscher, H.J. Biomaterials, (2001) 22:3217.
- [20] Buttafava, A., Consolati, G., Di Landro, L. i Mariani, M. Polymer (2002) 43:7477.
- [21] Chapiro, A. Radiation chemistry of polymeric systems (1962). Interscience, New Cork.
- [22] Charlesby, A. Atomic radiation and polymers (1960). Pergamon Press, London.
- [23] Chen, C.S., Mrksich, M., Huang, S., Whitesides, G.M. i Ingber D.E. Biotechnol Prog (1998)14:356.
- [24] Cheng, C.M., Vanderhoff, J.W. i El-Aasser, M.S. J Polym Sci Pol Chem Ed (1992) 30:245.
- [25] Chicurel, M.E., Chen, C.S. i Ingber, D.E. Curr Opin Cell Biol (1998) 10:232.
- [26] Cook, A.D., Hrkach, J.S., Gao, N.N., Johnson, I.M., Pajvani, U.B., Cannizzaro, S.M. i Langer R. J Biomed Mater Res (1997) 35:513.
- [27] Clough, R.L. J Am Chem Soc (1980) 102:5242.
- [28] Clough, R.L., Gillen, K.T., Campan, J.L., Gaussens, G., Schonbacher, H., Seguchi, T., Wilski, H. i Machi, S. Nucl Safety (1984) 25:198.
- [29] Cowie, J.M.G. i Ferguson, R. Macromolecules (1989) 22:2312.
- [30] Cowie, J.M.G., Harris, S., Gómez Ribelles, J.L., Meseguer Dueñas, J.M. i Romero, F.J. iTorregrosa, C. Macromolecules (1999) 32:4430.
- [31] de Bartolo, L., Morelli, S., Bader, A. I Drioli, E. Biomaterials (2002) 23:2485.
- [32] Diaz Calleja, R. J Polym Sci, Part B: Polym Phys (1979) 17:1395.
- [33] Dickens, B., Martin, J.W. i Waksman, D. Polymer (1984) 25:107.
- [34] Dimitri, S. Polymeric Biomaterials. Second Edition (2002), Marcel Dekker.
- [35] Dole, M. Radiation chemistry of macromolecul (1972), vol I, II. Academia Press, New York.
- [36] Donth, E. J Non-Cryst Solids (1982) 53:325.
- [37] Donth, E. Relaxation and thermodynamics in polymers, glass transition. Berlin: Akademie Verlag; 1992.
- [38] Drury, J.L. I Money, D. J. Biomaterials (2003) 24:4337.

- [39] Dunkelman, N.S., Zimber M.P., Lebaron, R.G., Pavelec, R., Kwan, M. i Purchio, A.F. *Biotechnol Bioeng* (1995) 46:299.
- [40] Enderle, J.D., Blanchard, S.M. i Bronzino, J.D. *Introduction to biomedical engineering*. 2000. Academyc Press.
- [41] Ellis, T.S. *Macromolecules* (1990) 23:1494.
- [42] Erbay, E. i Oka, O. *J Appl Polym Sci* (1999) 71:1055.
- [43] *European Pharmacopeia*, 3rd ed., Conseil de l'Europe, Strasbourg, (1998).
- [44] Flory, P.J. *Principles of polymer Chemistry* (1953), Cornell University Press, Ithaca, NY.
- [45] Frank, M.R., Smith, J.J. i Bacon, R.C. *J Polym Sci* (1954) 13:535.
- [46] Ferry, J.D. *Viscoelastic properties of polymers* (1980), 3rd ed. New York: Wiley.
- [47] Freed, L.E., Hollander, A.P., Martin, I., Barry, L.R. i Vunjak-Novakovic, G. *Exp Cell Res* (1998) 240:58.
- [48] Freeman, T.M., Yanks, I.V. i Gibson, L.J. *Prig. Mater. Sci.* 46 (2001) 273.
- [49] Galina, H. i Kolarz, B.N. *Polym Bull* (1980) 2:235.
- [50] Galina, H., Kolarz, B.N., Wieczorek, P.P. i Wojczynska, M. *Br Polym J* (1985), 17, 215.
- [51] Gao, C.Y, Wang, D.Y. i Shen, J.C. *Polym Adv Technol* (2003) 14:373-379.
- [52] Gates, G, Harmon, J.P., Ors, J. i Benz, P. *Polymer* (2003) 44:207.
- [53] Geers, M.G.D. *Int J Multiscale Comp Eng* (2004) 2:507.
- [54] Gibson, L.J. *J Biomechanics* (2005) 38:377.
- [55] Gibson, L.J. i Ashby M. "Cellular solids. Structure and properties". 2nd edition (Cambridge University Press, Cambridge, 2001).
- [56] Gómez Ribelles, J.L., Meseguer Dueñas, J.M., Torregrosa Cabanilles, C. i Monleón Pradas, M. *J Phys Condens Matter* (2003) 15:1149.
- [57] Gómez Ribelles, J.L., Monleón Pradas, M., Meseguer Dueñas, J.M. i Torregrosa Cabanilles, C. *J Non-Cryst Solids* (2002) 307–310:731.
- [58] Gómez Ribelles, J.L, Ribes Greus, A. i Díaz Calleja, R. *Polymer* (1990) 31:223.
- [59] Goodship, A.E. i Cunningham, J.L. *Pathophysiology of functional adaptation of bone in remodeling and repair in vivo*. In: Cojín SC, editor. *Bone mechanics handbook*, 2nd ed. Boca Raton, FL: CRC Press; 2001.
- [60] Gorna, K. i Gogolewski, S. *Deg Stab* (2003) 79:465.
- [61] Harada, K., Kogure, O. i Murase, K. *IEEE Trans Electrón Dev* (1982) 29:518.

- [62] Harris, L.D., Kim, B.S. i Mooney, D.J. *J Biomed Mater Res* (1998) 42:396.
- [63] Haeupke, H. i Pientka, V. *J Chromatogr* (1974) 102.
- [64] Hay, E.D. *Curr.Opin Cell Biol* (1993) 5:1029.
- [65] Hilgen, H., DeJong, G.J. i Sederel, W.L. *J Appl Polym Sci* (1975) 19:2647.
- [66] Hollister, S.J., Maddox, R.D. i Taboas, J.M. *Biomaterials* (2002) 23:4095.
- [67] Hollister, S.J. i Kikuchi, N. *Biotechnol Bioeng* (1994) 43:586.
- [68] Hooper, K.A., Cox, J.D. i Kohn, J.J. *Appl Polym Sci* (1997) 63:1499.
- [69] Horbett, T.A., Schway, M.B. i Ratner, B.D. *J Colloid Interf Sci* (1985) 104:28.
- [70] Hou, Q., Grijpma, D.W. i Feijen, J. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* (2003) 67B:732.
- [71] Howe, A., Aplin, A.E., Alahari, S.K. i Juliano, R.L. *Curr Opin Cell Biol* (1998) 10:220.
- [72] Hsu, Y.Y., Gresser, J.D., Trantolo, D.J., Lyons, C.M., Gangadharam, P.R.J. i Wise, D.L. *J Biomed Mater Res* (1997) 35:107.
- [73] Hutmacher, D.W. *Biomaterials* (2000) 21:2529.
- [74] Jaecques, S.V.N., Van Oosterwyck, H., Muraru, L., Van Cleynenbreugel, T., De Smet, E., Wevers, M., Naert, I. i Vander Sloten, J. *Biomaterials* 25 (2004) 1683.
- [75] Jacobs, C.R., Davis, B.R., Rieger, C.J., Francis, J.J., Saad, M. i Fyhrie, D.P. *Journal of Biomechanics* (1999) 32:1159.
- [76] Janacek, J. *J Macromol Sci-Rev M* (1973) 9:1.
- [77] James, A.B., Mike, C., Helen, E.W. i Damien, M.M. *Journal of Controlled Release* 110 (2005) 49– 57.
- [78] Salimon, A., Brèchet, Y., Ashby, M.F. i Greer, A.L. *Journal of materials science* 40 (2005) 5793.
- [79] Jun Y., Rongnan, X. i Juntan, Y. *J Appl Polym Sci* (1989) 38.
- [80] Karageorgiou, V. i Kaplan, D. *Biomaterials* (2005). 26:5474.
- [81] Katana, G., Fischer, E.W., Hack, T.H., Abets, V. i Kremer, F. *Macromolecules* (1995) 11:158.
- [82] Kolarz, B.N., Wiczorek, P.P. i Wojczynska, M. *Angew Makromol Chem* (1981) 96:193.
- [83] Kumar, S.K., Colby, R.H., Anastasiadis, S.H. i Fytas, G. *J Chem Phys* (1996) 105:3777.
- [84] Kurtz, S.M., Muratoglu, O.K., Evans, M. i Edidin, A.A. *Biomaterials* (1999) 20:1659.
- [85] Kusy, R.P. i Turner, D.T. *Macromolecules* (1971) 4:337.
- [86] Langer, R. *J Controlled Release* (1999) 62:7.

- [87] Lanza, R.P., Langer, R. i Vacanti, J., Principles of tissue engineering. Academic Press (second edition) (2000).
- [88] Lendnický, F. i Janáček, J. *J Macromol Sci Phys* (1971) B5:335.
- [89] López Madruga, L. *Prog Polym Sci* (2002) 27:1879.
- [90] Lo, H., Ponticello, M.S. i Leong, K.W. *Tissue Eng* (1995) 1:15.
- [91] Lu, L., Carcja, C.A. i Mikos, A.G. *J Biomater Sci Polymer* (1998) 9:1187.
- [92] Lu, L. i Mikos, A.G. *MRS Bull* (1996) 11:28.
- [93] Lydon, M.J., Minett, T.W. i Tighe, B.J. *Biomaterials* (1985) 6:396.
- [94] Ma, Z., Gao, C.Y., Gong, Y.H. I Shen, J.C. *J Biomed Mater Res* (2003) 67B:610.
- [95] Manfred, R.K., Bernhard, O.P. i John, R.W. *Human Cell Culture Vol. V. Primary Mesenchymal Cells. Masters* (Eds.) 2001.
- [96] Martínez-Sancho, C., Herrero-Vanrell, R. i Negro, S. *Journal of Controlled Release* (2004) 99:41.
- [97] Mayo, F.R. i Lewis, F.M. *J Am Chem Soc* (1944) 66:1595.
- [98] Medel, F.J., García-Álvarez, F. Gómez-Barrena, E. i Puértolas, J.A. *Polymer Degradation and Stability* (2005) 88:435.
- [99] Middleton, J., Jones, M.L. i Pande, G.N. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering* (1996). Gordon and Breach, Amsterdam.
- [100] Mikos, A.G., Bao, Y., Cima, L.G., Ingber, D.E., Vacanti, J.P. i Langer R. *J Biomed Mater Res* (1993) 27:183.
- [101] Mikos, A.G., Sarakinos, G., Leite, S.M., Vacanti, J.P. i Langer, R. *Biomaterials* (1993) 14:323.
- [102] Moghe, P.V. *Mater Res Soc Bull* (1996) 21:52.
- [103] Mohamed, K., Gerasimov, T.G, Moussy, F. i Harmon, J.P. *Polymer* (2005) 46 3847.
- [104] Montéard, J.P., Chatzopoulos, M. i Chappards, D.J. *Macromol Sci Macromol Rev* (1992) 32:1.
- [105] Mooney, D.J., Breuer, C., McNamara, K., Vacanti, J.P. i Langer R. *Tissue Eng.* (1995) 1:107.
- [106] Mooney, D.J., Hansen, L., Vacanti, J., Langer, R., Farmer, S. i Ingber, D. *J Cell Physiol* (1992) 151:497.
- [107] Mooney, D.J., Mazzoni, C.L., Breuer, C., McNamara, K., Hern, D., Vacanti, J.P. i Langer R. *Biomaterials* (1996) 17:115.
- [108] Mooney, D.J., Orga, G., Vacanti, J.P. i Langer, R. *Cell Transplant.* (1994) 3:203.
- [109] Moroni, L., de Wijn, J.R. i Blitterswijk, C.A. *Biomaterial* (2006) 27:974.

- [110] Morrison, R.T. i Boyd, I.R.N. Química orgànica (1990). Addison-Wesley Iberoamericana.
- [111] Nadzadi, M.E., Pedersen, D.R., Yack, H.J., Callghan, J.J. i Brown, T.D.J. Biomech (2003). 36:577.
- [112] Nair, P.D., Sreenivasan, K. i Jayabalan, M. Biomaterials (1988) 9:335.
- [113] Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B (2002) 191:752.
- [114] Okay, O. Angew Makromol Chem (1986) 143:209.
- [115] Okay, O. Angew Makromol Chem (1987) 153:125.
- [116] Okay, O. Angew Makromol Chem 1988 157:15.
- [117] Okay, O. i Balkas, T.I. J Appl Polym Sci (1986) 31:1785.
- [118] Okay, O. J Appl Polym Sci (1986) 32:5533.
- [119] Park, A. i Cima, L.G. J Biomed Mater Res (1996) 31:117.
- [120] Parkinson, W.W. Radiation resistant polymers in EPST (1987). Oak Ridge Nacional Lab, Oak Ridge.
- [121] Peluso, G., Petillo, O., Anderson, M.J., Ambrosio, M., Nicolais, L., Melone, M.A.B., Eschbach, F.O. i Huang, S.J. J. Biomed Mater Res (1997) 142:83.
- [122] Pérez, M.A., García-Aznar, J.M., Doblaré, M., Seral, B. i Seral, F. Med Eng Phys (2006) 6:525.
- [123] Pérez Olmedilla, M., García-Giralt, N., Monleón Pradas, M., Benito Ruiz, P., Gómez Ribelles, J.L., Cáceres Palou, E. i Monllau García, J.C. Biomaterials (2006) 27:1003.
- [124] Poinescu, I., Vlad, C., Carpov, A. i Ionid, A. Angew Makromol Chem (1988) 156:105.
- [125] Pruit, A. Adv Polym Sci (2003) 162:63.
- [126] Qing-Hua, Qin i Michael, V. Swain. Biomaterials (2004) 25:5081.
- [127] Ratner, B.D., Hoffman, A.L., Schoen, F.J. i Lemons, J.E. Biomaterials Science. Elsevier Academic Press (2002).
- [128] Renò, F., Bracco, P., Costa, L. i Cannas, M. Biomaterials (2002) 23:3645.
- [129] Roberts, A.P. i Garbozi, E.J. Acta Materialia (2001) 49:189.
- [130] Roland, C.M. i Ngai, K.L. Macromolecules (1991) 24:2261.
- [131] Rosen, J.J. i Schway, M.B. Polym Sci Technol (1980) 12B:667.
- [132] Salmerón Sánchez, M., Brígido Diego, R., Iannazzo, S.A.M., Gómez Ribelles, J.L. i Monleón Pradas, M. Polymer (2004) 45:2349.
- [133] Sartor, G., Mayer, E. i Johari, G. J Polym Sci Polym Phys Edn (1994) 32:683.
- [134] Schiraldi, A., D'Agostino, A., Oliva, A., Flamma, F., de Rosa, A., Apicella, A., Aversa, R. i de Rosa, M. Biomaterials (2004) 25:3645.



- [135] Schneider, G.B., English, A., Abraham, M., Zaharias, R., Stanford, C. i Keller, J. *Biomaterials* (2004) 25:3023.
- [136] Serkan, D., Wilfried, B. i Jörg, H. *Journal of Materials Science* (2005) 40:5839.
- [137] Shakesheff, K.M., Cannizzaro, S.M. i Langer, R. (1998). *J Biomater Sci Polymer* 9:507.
- [138] Shapiro, L. i Cohen, S. *Biomaterials* (1997) 18:583.
- [139] Shears, M.S. i Williams, G. *J Chem Soc Faraday Trans II* (1973) 69:608.
- [140] Shim, E.B. i Chang, K.S. *J Biomech Eng* (1997). 119: 45.
- [141] Shin, H., Ruhe, P.Q. i Mikos, A.G. *Biomaterials* (2003) 24:3201.
- [142] Singh, A. i Silverman, J. *Radiation processing of polymers* (1992). Hanser Munich.
- [143] Singhvi, R., Kumar, A., Lopez, G., Stephanopoulos, G.N., Wang, D.I.C., Whitesides, G.M. i Ingber, D.E. *Science* (1994) 264:696.
- [144] Singhvi, R., Stephanopoulos, G. i Wang, D.I.C. *Biotechnol Bioeng* (1994) 43:764.
- [145] Song, S.W. i Torkelson, J. *Macromolecules* (1994) 27:6389.
- [146] Stoy, V. i Kliment, C. *Hydrogels: speciality plastics for biomedical and pharmaceutical applications*. Basel: Technomic Publications; (1996).
- [147] Sun, W., Darling, A., Starly, B. i Nam, J. *J Biotechnol Appl Biochem* (2004) 39:29.
- [148] Takeda, K., Akiyama, M., Yamamizu, T. *Angew Makromol Chem* (1988), 157:123.
- [149] Temenoff, J. S. i Mikos, A.G. *Biomaterials*, (2000) 21:431.
- [150] Tejas Karande, S., Joo Ong, L. i Mauli Agrawal, C. *Annals of Biomedical Engineering*, (2004) 32:1728.
- [151] Tekoglu, C. i Onck, P.R. *Journal of materials science* (2005) 40:5911.
- [152] ten Brinke, G. i Grooten, R. *Colloid Polym Sci* (1989) 267:992.
- [153] Timmer, M.D., Carter, C., Ambrose, C.G. i Mikos, A.G. *Biomaterials* (2003) 24:4707.
- [154] Thomson, R.C., Wake, M.C., Yaszemski, M.J. i Mikos A.G. *Adv Polym Sci* (1995) 122:245.
- [155] Turner, C.H. *Bone* (1998) 23:399.
- [156] Vajjhala, S., Kraynik, A.M. i Gibson, L.J. *Journal of Biomechanical Engineering* (2000) 122:511.
- [157] Van Cleynenbreugel, T., Van Oosterwyck, H. i Vander Sloten, J. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* (2002) 13:1245.
- [158] Viot, P.F. i Beani, J.L. *Journal of Materials Science* (2005) 40:5829.

- [159] Wake, M.C., Gupta, P.K. i Mikos, A.G. *Cell Transplant.* (1996) 5:465.
- [160] Warren, W.E. i Kraynik, A.M. *Journal of Applied Mechanics.* (1997) 64:787.
- [161] Wasserman, H. i Murria, R. *Singlet oxigen.* Academia Press (1979), NY.
- [162] Wetton, R.E., MacKnight, W.J., Fried, J.R. i Karasz, F.E. *Macromolecules* (1978) 11:158.
- [163] Whang, K., Thomas, C.H., Healy, K.E. i Nuber, G. *Polymer* (1995) 36:837.
- [164] Widmer, M.S., Gupta, P.K., Lu, L., Meszlenyi, R.K., Evans, G.R.D., Brandt, K., Savel, T., Gurlek, A., Patrick, C.W.Jr. i Mikos A.G. *Biomaterials* (1998) 19:1945.
- [165] Wieczorek, P.P., Ilavsky, M., Kolarz, B.N. i Dusek, K. *J Appl Polym Sci* (1982) 27:277.
- [166] Wieczorek, P.P., Kolarz, B.N. i Galina, H. *Angew Makromol Chem* (1984) 126:39.
- [167] Wilson, T.W i Turner, D.T. *Macromol* (1988) 21:1184.
- [168] Wundrich, K. *J Polym Sci Polym Phys* (1973) 11:1293.
- [169] Yang, S., Leong, K.F., Du, Z. i Chua, C.K. *Tissue Eng* (2001) 7:679.
- [170] Yoganandan, N., Kumaresan, S., Voo, L. i Pintar, F.A. *J Biomech Eng* (1997) 119:87.
- [171] Zhang, R. i Ma, P.X. *J Biomed Mater Res* (1999) 4:446.
- [172] Zhou, Q.L., Gong, Y.H. i Gao, C.Y. *J Appl Polym Sci* (2005) 98:1373.
- [173] Zhu, H.X., Knott, J.F. i Mills, N.J. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* (1997) 45:319.
- [174] Zhu, H.X., Mills, N.J. i Knott, J.F. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids* (1997) 45:1875.