



Universitat de Girona

# PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES DE BAJA TOXICIDAD MODIFICADAS CON POLÍMEROS BIODEGRADABLES PARA CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y MÍNIMAMENTE INVASIVA

**Elena FRANCO MARQUÈS**

**Dipòsit legal: GI. 1367-2012**

<http://hdl.handle.net/10803/84038>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.



Universitat de Girona

TESIS DOCTORAL

**PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE FORMULACIONES ACRÍLICAS  
AUTOCURABLES DE BAJA TOXICIDAD MODIFICADAS CON  
POLÍMEROS BIODEGRADABLES PARA CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y  
MÍNIMAMENTE INVASIVA**

ELENA FRANCO MARQUÈS

2012

PROGRAMA DE DOCTORADO EN TECNOLOGÍA

DIRIGIDA POR: DR. JOSÉ ALBERTO MÉNDEZ GONZÁLEZ

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTORA POR LA  
UNIVERSITAT DE GIRONA



*Dedicat a la meva família i  
molt especialment a la Júlia*



**Las publicaciones indexadas que se han derivado de esta Tesis Doctoral son:**

Franco-Marquès E, Méndez JA, Gironès J, Ginebra MP, Pèlach MA.

***Evaluation of the influence of the addition of biodegradable polymer matrices in the formulation of self-curing polymer systems for biomedical purposes.***

Acta Biomaterialia 5 (2009) 2953–2962

Franco-Marquès E, Méndez JA, Gironès J, Pèlach MA.

***Thermal and dynamic mechanical characterisation of acrylic bone cements modified with biodegradable polymers.***

Journal Applied Polymers Science. En revisión desde febrero de 2012.

**Las participaciones a congresos que se han derivado de esta Tesis Doctoral son:**

Franco-Marquès E, Méndez JA, Peña L, Pèlach MA, Gironès J, Ginebra MP.

***Partially bioresorbable PMMA-starch composites for bisphosphonate drug delivery.***

VIII congreso nacional de materiales compuestos 09. V International conference on science and technology of composite materials (2009), p. 525-528. (Capítulo de libro, ISBN: 978-84-692-5483-7)

Franco-Marquès E, Méndez JA, Gironès J, Pèlach MA.

***Estudio térmico y mecanodinámico de cementos óseos acrílicos modificados con polímeros biodegradables.***

V Congreso de Jóvenes Investigadores en Polímeros, JIP 2010. CD del congreso, comunicación GIV-23.

Franco-Marquès E, Méndez JA, Martín C, Gironès J, Pèlach MA.

***Microencapsulated acrylic composites based on collagen for tissue engineering.***

IX Congreso nacional de materiales compuestos 11 (2011), p.487-492. (Capítulo de libro, ISBN: 978-84-8458-352-3)

Méndez JA, Franco-Marquès E, Gironès J, Pèlach MA.

***Acrylic Bone Cements used as drug carriers.***

BIOFUTURE 2011 (Young European Biomaterial scientists designing a view for the future). Libro de resúmenes, pág. 116.

Franco-Marquès E, Méndez JA, Gironès J, Pèlach MA.

***Cementos óseos acrílicos hidrofílicos.***

VI Congreso de Jóvenes Investigadores en Polímeros, JIP 2012. CD del congreso, comunicación GIV-10.



El sotasignat Dr. **José Alberto Méndez González**, Professor Agregat de la Universitat de Girona, del Departament d'Enginyeria Química Agrària i Tecnologia Agroalimentària de la Universitat de Girona, CERTIFICA que:

La memòria que porta títol:

“PREPARACIÓN Y EVALUACIÓN DE FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES DE BAJA TOXICIDAD MODIFICADAS CON POLÍMEROS BIODEGRADABLES PARA CIRUGÍA ORTOPÉDICA Y MÍNIMAMENTE INVASIVA”.

recull el treball realitzat sota la seva direcció per l'**Elena Franco Marquès**, Llicenciada en Química per la Universitat de Girona, i que constitueix la seva memòria de Tesi Doctoral per aspirar al grau de Doctora per la Universitat de Girona.

I perquè així consti, signa aquest certificat a Girona, el 16 d'abril de 2012.

Dr. José Alberto Méndez González



## CONTENIDO

<b>Contenido</b> .....	<b>I</b>
<b>Agraïments</b> .....	<b>VII</b>
<b>Glosario</b> .....	<b>XI</b>
<b>Resumen</b> .....	<b>XIII</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>XV</b>
 <b>CAPÍTULO I</b>	
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>1</b>
<b>I.1. BIOMATERIALES</b> .....	<b>3</b>
<b>I.2. BIOMATERIALES POLIMÉRICOS</b> .....	<b>5</b>
<b>I.3. FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES</b> .....	<b>6</b>
I.3.1. Obtención de la formulación acrílica autocurable .....	7
I.3.2. Reacción de curado .....	8
I.3.3. Caracterización de las formulaciones acrílicas .....	11
I.3.4. Modificación de las formulaciones acrílicas autocurables.....	12
<b>I.4. TEJIDO ÓSEO</b> .....	<b>18</b>
I.4.1. Osteoporosis .....	21
<b>I.5. APLICACIÓN DE LOS CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS EN     MEDICINA</b> .....	<b>22</b>
I.5.1. Fijación ortopédica .....	23
I.5.2. Cementos dentales .....	24
I.5.3. Vertebroplastia .....	25
I.5.4. Cifoplastia con balón .....	27

I.5.5. Cemento oseo inyectable .....	28
<b>I.6. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>29</b>

## **CAPÍTULO II**

<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
-----------------------	-----------

## **CAPÍTULO III**

<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
----------------------------------	-----------

<b>III.1. FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES .....</b>	<b>40</b>
--	-----------

<b>III.2. FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES MODIFICADAS .....</b>	<b>41</b>
--	-----------

III.2.1. Formulaciones acrílicas autorables modificadas con polímeros biodegradables.....	42
---	----

III.2.2. Formulaciones acrílicas autocurables modificadas con biopolímeros de origen vegetal.....	43
---	----

III.2.3. Formulaciones acrílicas autocurables modificadas con biopolímeros de origen animal.....	44
--	----

<i>III.2.3.1. Preparación de las microesferas de poli(ácido metacrílico) PMAA.....</i>	<i>45</i>
--	-----------

<i>III.2.3.2. Preparación de las microcápsulas PMAA/HC .....</i>	<i>47</i>
--	-----------

<i>III.2.3.3. Caracterización de las microesferas y microcápsulas .....</i>	<i>48</i>
---	-----------

III.2.3.3.1. Morfología y distribución de los tamaños de las microesferas.....	48
--	----

III.2.3.3.2. Estructura química .....	49
---------------------------------------	----

III.2.3.3.3. Propiedades térmicas .....	50
---	----

<i>III.2.3.4. Preparación de las formulaciones acrílicas autocurables modificadas con colágeno.....</i>	<i>51</i>
---	-----------

<b>III.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES.....</b>	<b>53</b>
--	-----------

III.3.1. Parámetros de curado .....	53
-------------------------------------	----

III.3.2. Determinación del monómero residual .....	55
--	----

III.3.3. Propiedades mecánicas .....	57
--------------------------------------	----

III.3.4. Comportamiento in vitro .....	60
--	----

III.3.5. Análisi termogravimétrico (TGA).....	60
III.3.6. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	61
III.3.7. Análisis térmico dinamomecánico (DMTA) .....	62
III.3.8. Liberación controlada de especies activas .....	63
<i>III.3.8.1. Liberación de ibandronato .....</i>	<i>64</i>
<i>III.3.8.2. Liberación de colágeno hidrolizado.....</i>	<i>65</i>
<b>III.4. CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS MATERIALES .....</b>	<b>66</b>
<b>III.5. SOLUCIÓN TAMPÓN FOSFATO .....</b>	<b>66</b>
<b>III.6. ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD IN VITRO DE LAS FORMULACIONES ACRÍLICAS MODIFICADAS CON COLÁGENO.....</b>	<b>67</b>
III.6.1. Liberación de COMPONENTES, ensayo MTT .....	69
<b>III.7. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>72</b>

## **CAPÍTULO IV.**

### **INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DEL POLÍMERO**

#### **BIODEGRADABLE AÑADIDO .....**

<b>IV.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>76</b>
IV.1.1. Almidón .....	76
IV.1.2. Poli(ácido L-láctico), PLLA .....	78
IV.1.3. Poli( $\beta$ -hidroxibutirato), PHB .....	79
IV.1.4. Poli( $\epsilon$ -caprolactona), PCL.....	80
<b>IV.2. RESULTADOS.....</b>	<b>82</b>
IV.2.1. Caracterización superficial .....	82
IV.2.2. Propiedades mecánicas .....	84
IV.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA).....	84
IV.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	86
IV.2.5. Análisis térmico mecanodinámico (DMTA) .....	87
IV.2.6. Monómero residual.....	88
IV.2.7. Parámetros de curado.....	89
IV.2.8. Comportamiento in vitro .....	90
IV.2.9. Microscopia electrónica de barrido (SEM) .....	91

<b>IV.3. DISCUSIÓN.....</b>	<b>92</b>
<b>IV.4. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>103</b>

## **CAPÍTULO V.**

### **DISEÑO DE SISTEMAS AUTOCURABLES DE LIBERACIÓN**

#### **CONTROLADA DE BISFOSFONATOS DE TERCERA**

<b>GENERACIÓN.....</b>	<b>111</b>
------------------------	------------

<b>V.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>112</b>
V.1.1. Bisfosfonatos.....	112
<b>V.2. RESULTADOS.....</b>	<b>116</b>
V.2.1. Caracterización superficial.....	116
V.2.2. Propiedades mecánicas .....	118
V.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA).....	121
V.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	122
V.2.5. Análisis térmico mecanodinámico (DMTA) .....	124
V.2.6. Monómero residual.....	126
V.2.7. Parámetros de curado .....	127
V.2.8. Comportamiento in vitro .....	127
V.2.9. Liberación ibandronato .....	128
<b>V.3. DISCUSIÓN.....</b>	<b>129</b>
<b>V.4. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>137</b>

## **CAPÍTULO VI**

### **FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES**

<b>MODIFICADAS CON PROTEÍNAS .....</b>	<b>141</b>
--	------------

<b>VI.1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>142</b>
VI.1.1. Proteínas morfogénicas óseas .....	142
VI.1.2. Sistemas de liberación controlada de especies hidrosolubles .....	143
VI.1.3. Metodologías de síntesis de polímeros acrílicos hidrofílicos.....	144
<b>VI.2. RESULTADOS.....</b>	<b>145</b>
VI.2.1. Síntesis y caracterización de las microesferas y microcápsulas .....	146

---

VI.2.2. Caracterización de las formulaciones acrílicas autocurables.....	152
VI.2.3. Evaluación de la biocompatibilidad in vitro de sistemas poliméricos .....	158
<b>VI.3. DISCUSIÓN.....</b>	<b>159</b>
VI.3.1. Caracterización de las perlas .....	159
VI.3.2. Caracterización de las formulaciones acrílicas .....	166
<b>VI.4. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>170</b>
<b>CAPÍTULO VII</b>	
<b>CONCLUSIONES GENERALES.....</b>	<b>175</b>



## **AGRAÏMENTS**

Doncs res, ja ha arribat el final. Per fi! Ja tà! La veritat és que seré molt breu. Simplement vull agrair a totes les persones que m'han donat suport i ajudat no tan sols en la realització d'aquesta sinó també a aquelles que m'han ajudat a passar les estones i distreure'm quan em convenia. He pensat molt en com escriure aquests agraiments i, paradoxes de la vida. Abans de començar només voldria dir que sí em deixo algú, que pensí que està dins el meu cor! Bé doncs, apa nem-hí!!

Voldria començar per la universitat de Girona donant-li les gràcies, per concedir-me la beca de personal investigador en formació per dur a terme aquesta Tesis dins del grup de recerca LEPAMAP. A més, voldria agrair als diferents Ministeris que han col·laborat en el suport econòmic d'aquest projecte. Finalment també voldria expressar el meu agraiment al Prof. Dr. Julio San Román pel finançament rebut per participar al curs *INVENTS: practical course on polymers and drug delivery*.

Voldria agrair a l'empresa Proteín SA amb seu a Celrà (Girona), la cessió dels seus compostos per desenvolupar aquest

treball de recerca i als Drs. Domènech i Marquès (ABS-vallès Oriental) pel subministrament del fàrmac ibandronat.

Primer de tot voldria començar pel grup LEPAMAP i molt especialment al Prof. Dr. Pere Mutjé i la Dra. Maria Àngels Pèlach per la seva confiança i suport econòmic durant aquest període. També m'agradaria fer arribar el meu agraïment més sincer al director de la Tesis, el Dr. José Alberto Méndez, ja que no cal dir que sense ell res de tot això hagués estat possible. Moltes gràcies per permetre'm fer realitat un somni. "Que ja la tenim!!!!"

Moltes gràcies a tots els companys del grup LEPAMAP que he conegut durant aquest període de la meua vida que heu fet que la feina sigui molt més agradable (Dra. Fabiola Vilaseca, Dr. Pere Sarquella, Dra. Farners, Dr. Jordi Gironès, Dr. Miquel Llop, Elena Recas, Dr. Josep Puig, Jirle, Isra,... i tots els projectistes).

Tampoc em vull oblidar dels membres del Departament d'EQATA y molt especialment de la gent del menjador. Moltes gràcies a les persones de PV (Prof. Dr. Emili Montesinos, Dra. Anna Bonaterra, Dr. Isidre Llorente, Dra. Concepció Moragrega, Dr. Jesús Francés, Dra. Lúdia Ruz, Gemma Rosselló, Mireia Puig,...) per tot el suport instrumental per dur a terme aquest treball (liofilitzador, màquina de gel,...). També vull agrair a la

gent de TA (Prof. Dra. Carme Carretero, Dra. Dolors Parès, Mònica Toldrà, Elena Saguer,...) per acollir-me en un lloc tranquil per escriure totes i cadascuna de les línies d'aquesta tesi. I com no, la gent del PAS (l'Anna Maria, la Nuri i la Gemma).

També voldria agrair el suport tècnic del Departament de Ciència del Materials i Enginyeria Metal·lúrgica de la UPC (Prof. Dra. Maria Pau Ginebra, la Meritxell i en Pablo, per ajudar-me i deixar-me fer servir la "Bionix"), també als Serveis Tècnics de Recerca de la Universitat de Girona, en especial al Dr. Joan Pere López per tantes i tantes hores a calorimetria, a la Lluïsa Matas i a la Carme Carulla i "finalment al Dr. Juan Parra de la Unidad de Investigación Clínica y Biopatología del Hospital Provincial de Ávila, associada al CSIC.

Com no! Un agraïment molt gran als meus pares, perquè sempre heu lluitat per mí i heu sacrificat molt en aquesta vida. Gràcies de veritat!!! I com no al meu germanet Rubèn que ja t'has fet gran i espero que tinguis molta sort!!!

Bé doncs, només em queda agrair a la persona amb la que comparteixo aquest camí de la vida (els bons i mals moments). Gràcies José Alberto per tot el suport emocional i afecte, però sobretot per ser al meu costat. I de qui no em puc oblidar és de la

princesa de la casa, la Júlia ,que ets la llum de la meva vida i l'alegria de la casa que tots els mals espanta.

Gràcies a tots per formar part de la meva vida, un petó!!

Elena.

## GLOSARIO

- $^1\text{H}$ -RMN: resonancia magnética nuclear de protón
- ANOVA: análisis estadístico de la varianza
- BPO: peróxido de benzoilo
- BZN: 4-4'-bis-(dimetilamino)difenil carbinol
- CMR: contenido en monómero residual
- DMTA: análisis térmico dinamomecánico
- DSC: calorimetría diferencial de barrido
- E': módulo de almacenamiento
- E'': módulo de pérdida
- E<sub>c</sub>: módulo elástico a compresión
- E<sub>T</sub>: módulo de Young
- FT-IR: espectroscopia infrarroja por Transformada de Fourier
- GC: cromatografía de gases
- HC: colágeno hidrolizado bovino
- H<sub>hid</sub>: grado de hidratación
- ISO: Organización Internacional de Normalización
- MAA: ácido metacrílico
- MBA: N,N'-metilen-bis-acrilamida
- M<sub>f</sub>: peso final después de ser ensayado/a
- M<sub>i</sub>: peso inicial
- MMA: metacrilato de metilo
- Mn: peso molecular
- M<sub>s</sub>: peso constante
- M<sub>t</sub>: peso en un tiempo determinado
- PES: poliéster alifático
- PHB: poli(β-hidroxibutirato)
- PLLA: poli(ácido L-láctico)
- PMAA: poli(ácido metacrílico)
- PMMA/HC: microcápsulas de poli(ácido metacrílico) con colágeno hidrolizado en su interior
- PMMA: poli(metacrilato de metilo)
- P<sub>p</sub>: pérdida de peso

SEM: microscopía electrónica de barrido

$T_{d,i}$ : temperatura inicial de degradación

$T_{d,máx}$  : temperatura máxima de degradación

$t_f$ : tiempo de fraguado

$T_f$ : temperatura de fusión

$t_f$ : tiempo final

$T_g$ : temperatura de transición vítrea

TGA: análisis termogravimétrico

$T_g^{DMTA}$ : temperatura de transición vítrea en DMTA

$T_g^{DMTA'}$ : temperatura de transición vítrea en DMTA del primer barrido

$T_g^{DMTA''}$ : temperatura de transición vítrea en DMTA del segundo barrido

$T_g^{DSC}$ : temperatura de transición vítrea en DSC

$t_i$  : tiempo inicial

$T_{máx}$  : temperatura máxima

$t_p$  : tiempo de máxima energía

TPS: almidón termoplástico

$\Delta H_c$  : entalpía de curado

$\Delta H_f$ : entalpía de fusión

$\Delta t$ : incremento de tiempo

$\Delta T_g^{DSC}$ : incremento de la temperatura de transición vítrea en DSC

$\epsilon_c$ : deformación en fluencia

$\epsilon_t$  : deformación a la tracción

$\epsilon_Y$  : deformación a la rotura en tracción

$\sigma_c$ : resistencia en fluencia a compresión

$\sigma_t$  : resistencia a la tracción

$\sigma_Y$  : resistencia a la rotura en tracción

## **RESUMEN**

En este trabajo se ha llevado a cabo el estudio de nuevas formulaciones de cementos óseos acrílicos para su posterior evaluación como sistema de liberación controlada de medicamentos útiles en el tratamiento terapéutico de la osteoporosis. La línea de investigación principal se ha fundamentado en la modificación parcial de la fase sólida de los cementos óseos, es decir, la sustitución parcial de las microesferas de PMMA, por diferentes micropartículas de polímeros biodegradables, tanto de naturaleza sintética como natural. Así se han incorporado de forma efectiva poliésteres alifáticos comerciales como el poli(ácido L-láctico) (PLLA), el poli( $\beta$ -hidroxibutirato) (PHB) o un poliéster alifático (PES) con una estructura próxima a la de la poli( $\epsilon$ -caprolactona). Los polímeros biodegradables utilizados han sido diferentes composiciones de almidones termoplásticos (TPS) y colágeno hidrolizado (HC). La incorporación de estos polímeros a la formulación del cemento óseo convencional, cuya única estructura polimérica es el PMMA, ha sido enfocada desde dos puntos de vista bien diferenciados: o como un componente estructural, que aporta resistencia mecánica al material, caso de los poliésteres alifáticos o los almidones termoplásticos, o como un componente que nos permita determinar la capacidad de su liberación de la estructura del cemento (caso particular del colágeno).

En una primera fase del trabajo, desarrollada en el capítulo IV, se ha determinado la influencia de la incorporación de los poliésteres alifáticos y uno de los almidones termoplásticos para definir cuál era el material más idóneo para dotar a la formulación acrílica autocurable de la capacidad de liberación controlada de fármacos. El trabajo se ha ejecutado a través de la síntesis de los cementos y posterior caracterización de los materiales hasta encontrar el material que cumpla con los dos requerimientos planteados: capacidad de interactuar con medios acuosos y menor pérdida de propiedades mecánicas, entre otros.

Una vez obtenida la formulación más optimizada para su uso como sistema de liberación, a través del cumplimiento de los criterios prefijados, se ha desarrollado un estudio más profundo incorporando nuevos parámetros para su mejor formulación (capítulo V). Así se han introducido parámetros tales como: medida de partícula del polímero biodegradable incorporado, relación sólido:líquido o composición del polímero biodegradable comercial adicionado. Los materiales se han caracterizado siguiendo técnicas ampliamente utilizadas en el ámbito de los materiales poliméricos y finalmente se ha determinado la capacidad de liberación de bisfosfonatos de tercera generación.

La fase final del trabajo se ha centrado en la modificación de la formulación convencional del cemento para obtener un sistema de liberación controlada de proteínas y que a su vez no tenga una elevada pérdida de propiedades mecánicas. La proteína utilizada ha sido el colágeno hidrolizado, usado como sistema modelo de liberación controlada de factores de crecimiento. A causa de la elevada solubilidad del colágeno hidrolizado y de la baja permeabilidad a medios acuosos del PMMA, se ha sintetizado un tercer componente polimérico, capaz de compatibilizar con el PMMA y con elevada capacidad hidrofílica para retener la proteína. Así se ha sintetizado un sistema microparticulado de poli(ácido metacrílico) (PMAA) neutralizado en la forma de poli(metacrilato sódico), obtenido a través de un sistema de polimerización en suspensión en fase inversa. Una vez obtenidas las microesferas de PMAA, éstas se han cargado con una disolución de colágeno hidrolizado y posteriormente se han liofilizado, quedando la proteína retenida en las microesferas. Éstas últimas se han incorporado a la fase sólida de la formulación convencional del cemento óseo y las distintas composiciones han sido caracterizadas atendiendo a criterios tanto físicos como químicos, para finalizar estudiando los perfiles de liberación controlada de colágeno hidrolizado así como su biocompatibilidad.

## **ABSTRACT**

In the present work, a study of the preparation of new formulations of acrylic bone cements has been carried out, to obtain materials with enhanced capacity for controlled drug delivery useful in the therapeutic treatment of osteoporosis. The main research line has been focused on the partial modification of the solid phase of the conventional formulation of acrylic bone cements, by substituting part of PMMA-beads content for different microparticles of synthetic as well as natural biodegradable polymers. Thus, synthetic polyesters such as poly(lactic acid) (PLLA), poly( $\beta$ -hydroxybutyrate) (PHB) and an aliphatic polyester with a closer structure to poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) have been effectively included in the formulation. On the other hand, different compositions of thermoplastic starches (TPS) and hydrolyzed collagen (HC) have been used as natural biodegradable polymers. The incorporation of these polymers to the conventional formulation of acrylic bone cements, with a structure based only on PMMA, has been focused from two well defined points of view. First, as a structural component, by using aliphatic polyesters and thermoplastic starches, and second, as a model component to study its delivery from the material to the external medium, to determine the capacity of the formulation for drug delivery (particular case of hydrolyzed collagen).

The first approach in the work, developed in chapter IV, has been based on the determination of the influence of the incorporation of the aliphatic polyesters and thermoplastic starch in the structure of the cement to evaluate the optimized structure, for being used as a controlled drug delivery system. Finally the evaluation has been performed from different points of view: synthesis of the cements and their characterization until obtaining the formulation that fulfilled specific requirements: capacity to interact with aqueous media and lowest loss of mechanical properties, and others.

Once the optimized formulation was obtained, to be used as drug delivery system, by fulfilling the above mentioned criteria, a study, executed more in depth, was carried out. Different parameters were included in the work to improve its formulation (chapter V): particle size distribution, solid:liquid ratio as well as composition of the commercial biodegradable polymer. The family of the materials obtained was characterized by means of characterization techniques often used in polymer science and the formulations were submitted to a study of controlled drug delivery of third generation bisphosphonates.

The last part of the work (chapter VI) was driven through the modification of the conventional formulation of acrylic bone cements to develop a controlled drug delivery system of proteins, with a lower loss of mechanical properties than obtained in the previous chapter. The protein used was hydrolyzed collagen, as model system for growth factor drug delivery. Due to high solubility of hydrolyzed collagen in water and the lower water permeability of PMMA, a third polymeric component has been included to be compatible with both PMMA and hydrolyzed collagen. Thus, a microparticulate system based on poly(methacrylic acid) in its sodium structure, it means poly(sodium methacrylate), was obtained by means of inverse suspension polymerization. Once obtained, the microspheres of PMAA were loaded with an aqueous solution of hydrolyzed collagen and later on lyophilized, resulting in an acrylic system encapsulating the protein. The PMAA-HC microcapsules were characterized and incorporated to the solid phase of the conventional formulation of acrylic bone cements and the different obtained compositions were characterized, paying attention on physic and chemical criteria. Finally, the evaluation of the capacity of controlled release of proteins and the determination of biocompatibility, are presented and discussed.

---

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

---

## I.1. BIOMATERIALES

Desde la antigüedad el hombre ha utilizado y aplicado distintos materiales para el tratamiento de heridas y enfermedades. No es hasta el siglo XX cuando se empieza a desarrollar la ciencia de los biomateriales como consecuencia de la necesidad de ofrecer a la población tratamientos paliativos a un gran número de afecciones, accidentes traumatológicos, o desastres asociados a las grandes guerras mundiales. Hoy día los biomateriales ofrecen unas garantías y calidades de vida que difícilmente se podrían haber superado hace 30 años<sup>1</sup>.

Los biomateriales son productos destinados a aplicaciones médicas que están en contacto con los sistemas biológicos, los cuales pueden ser metales, cerámicas, polímeros o materiales compuestos<sup>2,3</sup>. Actualmente, desde un punto de vista conceptual, un biomaterial se define como: una sustancia diseñada para tomar una forma en la que, sola o como parte de un sistema complejo, se emplea para dirigir, mediante el control de las interacciones con los componentes de sistemas vivos, el curso de un procedimiento terapéutico o de diagnóstico, en medicina humana o veterinaria<sup>4</sup>.

Para que un biomaterial desarrolle satisfactoriamente la función para la cual ha sido diseñado debe cumplir dos requisitos fundamentales: biofuncionalidad y biocompatibilidad. La biofuncionalidad se entiende como la capacidad que debe tener para realizar la función específica en los tejidos y órganos, mientras que la biocompatibilidad está relacionada con la aceptabilidad biológica<sup>5</sup>. Según estos requisitos los biomateriales se clasifican en cuatro grupos<sup>6</sup>:

*Inerte*: El material provoca escasa o nula respuesta reactiva.

*Interactivo*: El material está diseñado para inducir en el huésped una respuesta específicamente beneficiosa (adherencia, crecimiento en superficie,...).

*Viable:* El material incorpora células vivas en el momento de su implantación, y el huésped lo trata como si fuera la matriz de un tejido normal.

*Replante:* El material consiste en un cultivo *in vitro* de células específicas previamente obtenidas del sujeto a implantar.

Dentro de la ciencia de los biomateriales son muchas las aplicaciones en las cuales estos materiales pueden ser aplicados, siendo algunas de ellas: suturas bioreabsorbibles<sup>7</sup>, dispositivos de fijación articular (tornillos, clavos)<sup>8</sup>, conducciones y “stents” cardiovasculares, hidrogeles para el crecimiento celular<sup>9</sup>, vehículo de liberación controlada<sup>10,11</sup>,... Muchas de estas aplicaciones requieren de la eliminación del material una vez que ha desarrollado su labor terapéutica. En esta línea, el uso de sistemas biodegradables permite el desarrollo de estas aplicaciones.

Tabla I.1. Clasificación de los materiales utilizados en el cuerpo humano.

Material	Ventajas	Inconvenientes	Ejemplos
<b>Polimérico</b> (nylon, silicona, poliéster,...)	Elástico, Fácil de fabricar	Blando Deformable Puede degradar	Suturas, tejidos blandos.
<b>Metales</b> (Ti y sus aleaciones, Au,...)	Fuerte, Resistente, Dúctil	Se puede corroer Denso Difícil de fabricar	Clavos, tornillos, prótesis.
<b>Cerámicos</b> (alúmina, hidroxiapatita, )	Muy biocompatible	Quebradizo No elástico Frágil	Implantes dentales y ortopédicos
<b>Composites</b> (carbón-carbón, fibras reforzando cementos óseos)	Fuerte, Hecho a medida	Difícil de fabricar	Cementos óseos, resinas dentales

Los biomateriales también pueden clasificarse en función de su naturaleza química, así pues en este caso se pueden distinguir cuatro tipos: cerámicos, metálicos, poliméricos y *composites*<sup>12</sup>. En la Tabla I.1 se muestran las ventajas,

inconvenientes junto con algún ejemplo de aplicación de los distintos tipos de biomateriales.

## I.2. BIOMATERIALES POLIMÉRICOS

Los biomateriales poliméricos debido a su gran versatilidad presentan un gran abanico de propiedades. A partir de ellos se pueden preparar y diseñar una gran variedad de dispositivos biológicamente inertes o totalmente biodegradables.

*Tabla I.2. Ejemplos de aplicaciones de los polímeros.*

<b>Material</b>	<b>Aplicación</b>
Polímeros acrílicos	Lentes de contacto, cementos óseos y dentales, adhesivos tisulares.
Poliuretanos	Tubos endotraqueales, diafragmas, corazón artificial, membranas dializadoras.
Siliconas	Prótesis mamarias, recubrimientos anticoagulantes.
Fluoropolímeros	Conductos biliares, prótesis de: uréter, tráquea y laringe, válvulas coronarias.
Poliiolefinas	Jeringuillas de un solo uso, guantes de exploración, copa acetabular (prótesis de cadera).
Polímeros vinílicos	Conductos de drenaje
Poliésteres	Dispositivos de liberación controlada de fármacos.
Colágeno	Piel, tendones, cartílagos, huesos, tendones y ligamentos.
Fibrinas	Sellador, adhesivo en cirugía.
Celulosa	Recubrimiento de fármacos

Los polímeros en función de su aplicación médica se pueden clasificar en<sup>13</sup>: polímeros naturales (celulosa, proteínas,...), sintéticos (poliésteres alifáticos, poliuretanos,...), bioactivos (polímeros enlazados covalentemente a fármacos) y biodegradables (poliácido láctico,...). En general, los polímeros sintéticos ofrecen

mayores ventajas porque pueden ser diseñados según las necesidades requeridas para su aplicación, y además, éstas pueden ser estimadas o predichas teóricamente. En la Tabla I.2 podemos encontrar algunos ejemplos de materiales poliméricos y su aplicación como biomateriales.

### **I.3. FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES**

Las formulaciones acrílicas autocurables también llamadas cementos óseos acrílicos, son un material polimérico cuya finalidad es la fijación de la prótesis ósea.

Los primeros estudios sobre polímeros acrílicos fueron hechos en Alemania, en 1901, por el Dr. Otto Rohm (1876-1939). Estos materiales fueron comercializados por primera vez en 1931 como recubrimientos y formando parte de vidrios de seguridad. El más conocido de los plásticos acrílicos es el poli (metilmetacrilato) (PMMA). El PMMA es un polímero termoplástico que se obtiene a partir de la polimerización del metacrilato de metilo (MMA) con la ayuda de catalizadores. Se comercializa en forma de gránulos o láminas y las principales marcas comerciales que podemos encontrar en el mercado son: Plexiglas<sup>®</sup>, Vitroflex<sup>®</sup> o Lucite<sup>®</sup>. Su temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) es de 100-105°C.

Tiene muchas aplicaciones gracias a su transparencia y resistencia al impacto, rayado y al exterior. Entre ellas podemos destacar: decoración, señalización, cartelería, expositores,...y también como biomaterial en cementos óseos.

A partir de los años 60, gracias a la contribución de Sir John Charnley<sup>14,15</sup> (1911-1982) (Figura I.1) se introdujo la utilización de las formulaciones acrílicas autocurables en la reparación y sustitución de implantes de cadera para asentar la prótesis en el interior del hueso, así como en la cirugía bucodental<sup>16</sup>. A día de hoy aún se utilizan las formulaciones acrílicas convencionales, aunque presentan algunas desventajas biológicas que se atribuyen principalmente a la alta

temperatura alcanzada durante la reacción de polimerización *in situ* y al bajo peso molecular de los residuos de reacción<sup>17</sup>. Esto se debe principalmente al monómero residual y activadores que pueden comprometer la interfaz hueso-cemento<sup>18,19</sup>, y de alguna manera impedir los procesos osteoformativos<sup>20</sup>. Dado que el metabolismo óseo y la mineralización del hueso pueden verse obstaculizados por cualquier sustancia que interfiera con la diferenciación y replicación de las células óseas se evalúa la biocompatibilidad del material con el medio que lo recibe. No existe un procedimiento patrón para el ensayo de la biocompatibilidad del cemento óseo, únicamente existen unas líneas de actuación establecidas por diferentes instituciones<sup>21,22,23</sup>.



*Figura I.1. Sir John Charnley.*

### **I.3.1. OBTENCIÓN DE LA FORMULACIÓN ACRÍLICA AUTOCURABLE**

Las formulaciones acrílicas autocurables son un material bifásico (sólido-líquido) que se prepara en el momento de la aplicación.

La **fase sólida** está compuesta mayoritariamente por partículas de PMMA, en una proporción del 87-90% p/p de la masa total de esta fase, en forma de micropartículas preparadas mediante polimerización radical en suspensión del monómero. La distribución de tamaños de partícula y diámetro de éstas influye en la homogeneidad del material final, siendo mayor cuanto menos es su tamaño. En algunos casos se introducen copolímeros en porcentajes cercanos al 5% con el fin de mejorar algunas de las propiedades físicas del material final. Otro componente de la fase sólida es el iniciador que se añade en un 2-3% p/p del total

de la fase sólida. Éste da lugar al inicio de la reacción de polimerización siendo el más frecuentemente utilizado el peróxido de benzoilo (BPO). El 10% p/p restante de la fase sólida está constituido por un compuesto de naturaleza inorgánica que actúa como agente radiopaco para permitir el posterior seguimiento radiológico del cemento y su evolución tras la intervención quirúrgica. Este componente es frecuentemente una sal u óxido metálico, como el sulfato de bario o el óxido de zirconio<sup>24</sup>.

La **fase líquida** contiene el monómero polimerizable que, en la mayoría de las formulaciones es el MMA, constituyendo el 97-99% p/p de la masa líquida total. Para evitar el proceso de autopolimerización durante el almacenamiento se le añade 75-100 ppm de éter metílico de hidroquinona (EMHQ), que actúa como inhibidor. Como último componente de la fase líquida, necesario para la formulación de los cementos óseos acrílicos, está el activador de la iniciación radical, que se añade en un 1-3% p/p de la fase líquida, siendo el más frecuentemente usado la N,N-dimetil-4-toluidina (DMT)<sup>25</sup>. Su función consiste en inducir la descomposición del iniciador a baja temperatura para dar lugar a radicales libres encargados de iniciar la reacción de polimerización del monómero.

### **I.3.2. REACCIÓN DE CURADO**

En el momento que se mezclan la fase sólida y la fase líquida tiene lugar la reacción de curado. Durante la reacción de curado o de polimerización se desarrollan diferentes fenómenos tanto físicos como químicos:

**Fenómenos físicos.** La masa polimerizante sufre una serie de etapas llamadas: arenosa, fibrosa, pastosa y de fraguado o curado. Durante el desarrollo de estas etapas tienen lugar fenómenos de solvatación de los componentes de la fase sólida, difusión del monómero hacia las perlas del polímero, difusión del polímero en el seno de la propia matriz polimérica y evaporación del monómero de la mezcla. Debido al progresivo aumento de la viscosidad de la mezcla, el desplazamiento del monómero hacia las perlas está controlado por difusión, llegando a un punto donde queda atrapado dentro del polímero sin poder

reaccionar, permaneciendo como monómero residual aún después de finalizada la reacción.

**Fenómenos químicos.** La reacción de curado es la reacción de polimerización del monómero propiamente dicha, que implica una reacción de poliadición de tipo radicalario, cuyo mecanismo consta de tres etapas<sup>26</sup> (iniciación, propagación y terminación), que tiene lugar simultáneamente a lo largo de todo el proceso reactivo.

Durante la iniciación se produce la ruptura homolítica del iniciador en radicales libres o radicales primarios (Reacción I.1) que reaccionan con el monómero para iniciar la cadena polimérica (Reacción I.2).



En la etapa de propagación se produce el crecimiento del macroradical a través de la adición sucesiva de unidades monoméricas (Reacción I.3).



La última etapa, la terminación, se puede producir mediante dos mecanismos, desproporción (Reacción I.4) y combinación (Reacción I.5).



Estas formulaciones presentan algunas desventajas como: la alta exotermia de polimerización, su fragilidad, la necrosis química que se origina debido a la alta temperatura y a la liberación de especies de bajo peso molecular que quedan sin reaccionar<sup>27</sup>.

La iniciación de la polimerización se lleva a cabo a baja temperatura mediante un sistema redox formado por una amina terciaria aromática y un

peróxido, siendo el par que se utiliza comercialmente peróxido de benzoilo/N,N-dimetil-4-toluidina (BPO)/(DMT). El mecanismo de activación con formación de radicales libres se presenta en la Figura I.2. Aunque este mecanismo no está totalmente esclarecido, se admite de forma general la formación de un complejo cíclico de amina terciaria aromática y las moléculas del iniciador, que posteriormente se descompone para dar lugar a la formación de radicales benzoato. Así mismo, por espectroscopía ultravioleta del polímero formado se ha detectado la formación de radicales metil-amino que tiene lugar por transferencia de un protón del grupo N-metilo.

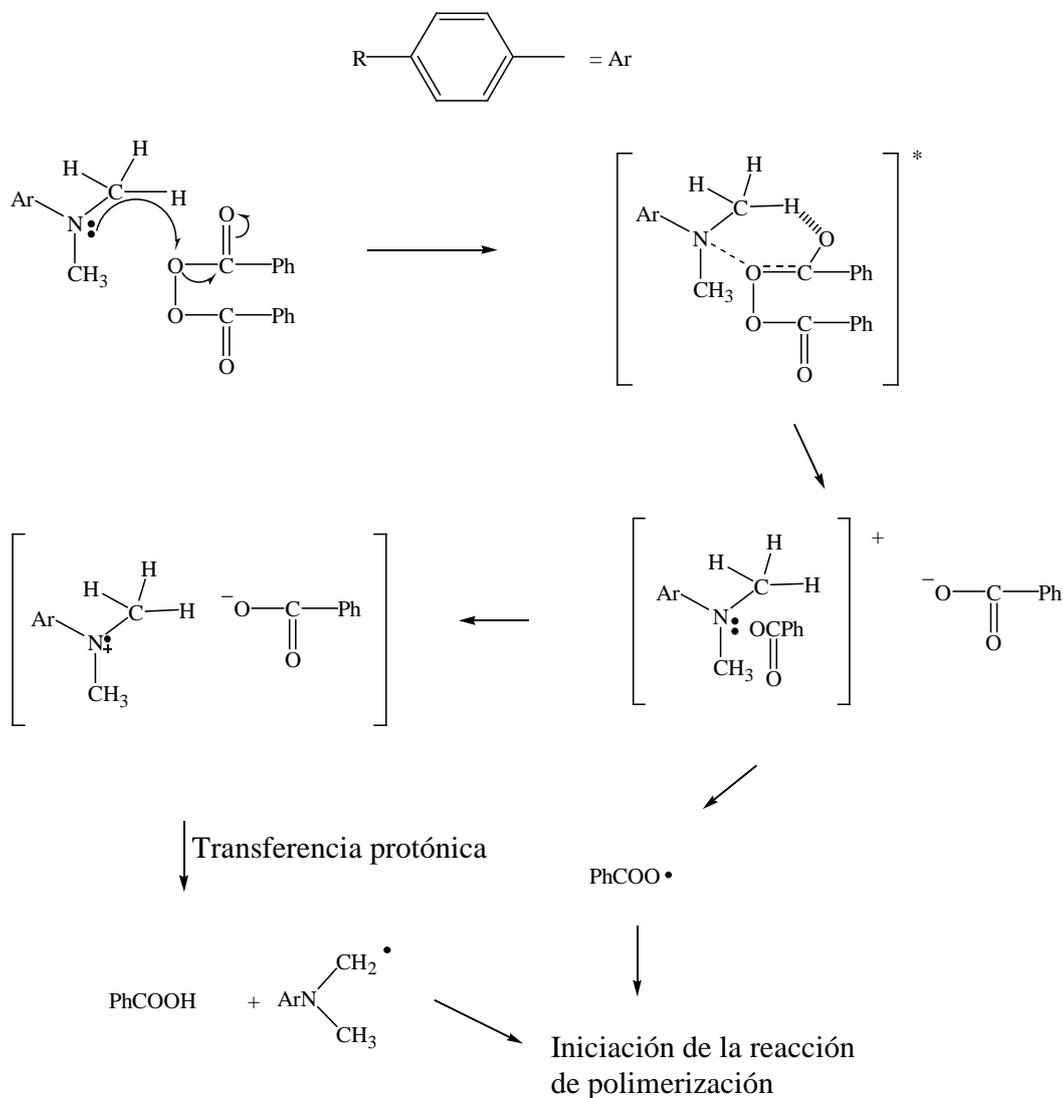


Figura I.2. Mecanismo de formación de radicales primarios en la iniciación de la reacción de polimerización de formulaciones acrílicas.

### I.3.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES ACRÍLICAS

Las formulaciones acrílicas deben cumplir una serie de condiciones para que sean aptas para su uso en cirugía ortopédica. En la Tabla I.3 se detallan las diferentes propiedades de los cementos óseos junto con su parámetro y el método que se utiliza para evaluarlo en Estados Unidos según la FDA (Food and Drug Administration)<sup>28</sup>.

*Tabla I.3. Criterios para evaluar las propiedades de los cementos óseos.*

<b>Propiedad</b>	<b>Parámetro</b>	<b>Método de análisis</b>
Composición química	Materiales Aditivos Pureza	RMN, FT-IR, HPLC/MS Cenizas ICP/MS, GC/FT-IR/MS, valoración
Peso molecular	Viscosidad relativa	Viscosímetro GPC (patrón PS)
Físicas	Morfología Porosidad Envejecimiento debido a la absorción de agua	Microscopio óptico, SEM SAM, Rayos X ISO 5833 (flexión a rotura)
Manipulado	Tiempo pastoso y fraguado. intrusión/viscosidad	ISO 5833, ASTM F451 ISO 5833, ASTM F451
Polimerización	Temperatura máxima Contracción	ISO 5833, ASTM F451 Picnómetro (ASTM D2566)
Grado de polimerización	Contenido y liberación de monómero residual	GC, HPLC/GPC, FT-IR
Estabilidad	Monómero Proporción de BPO Pastoso/tiempo fraguado	ISO 5833, ASTM F451 Valoración, FT-IR ISO 5833, ASTM F451
Módulo elástico	Flexión a cuatro puntos	ISO 5833
Módulo a compresión	Compresión	ISO 5833

Tabla I.3. Criterios para evaluar las propiedades de los cementos óseos.(Continuación).

Propiedad	Parámetro	Método de análisis
Módulo a flexión	Resistencia a la flexión	ASTM D638
Fatiga	Flexión/compresión a fatiga flexión/flexión a fatiga	ASTM D638
	Flexión a cuatro puntos	ASTM E 399, método Dr. Soltesz
Tenacidad a la fractura	Flexión con entalla	ASTM E647
Resistencia a:	Flexión	ISO 5833
	Compresión	ISO 5833, ASTM F451
	Tensión	ASTM D638
	Tensión a rotura	ASTM D732
Viscoelasticidad	DMTA	ASTM D 2990
Tiempo de vida útil		Propiedades mecánicas

#### I.3.4. MODIFICACIÓN DE LAS FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES

Son muchas las necesidades de la sociedad para optimizar las formulaciones acrílicas así como también sus características, como la biocompatibilidad, aumentar las propiedades mecánicas, modificar la porosidad y viscosidad,... Para ello, se ha estudiado la modificación y adición de nuevos componentes, orgánicos e inorgánicos, tanto en la fase sólida como en la líquida, como alternativa para dotar a las formulaciones acrílicas de distintas funcionalidades.

Dentro del ámbito de la mejora de las propiedades físicas, se obtienen buenos resultados mediante la reducción de la presión durante la preparación. Este hecho se consigue aplicando un ligero vacío a la masa polimerizante,

reduciendo la inclusión de aire y evitando de este modo la aparición de burbujas y poros, que dan lugar a la una pérdida de propiedades mecánicas<sup>29</sup>.

Con el fin de obtener temperaturas de curado más bajas se aumenta la relación sólido:líquido, pero este hecho da lugar a una menor penetración en los intersticios de la cavidad ósea<sup>30</sup>.

La preparación de formulaciones acrílicas modificadas con componentes biodegradables, como carbohidratos, celulosa,... ayuda a la degradación de éstas en medio fisiológico para dar paso al crecimiento de tejido óseo vivo<sup>31</sup>. Los polímeros biodegradables también se utilizan desde hace varias décadas para la preparación de diferentes dispositivos biodegradables dentro del campo biomédico<sup>32,33</sup>. Estos materiales han sido objeto de estudio para sistemas de liberación controlada de fármacos tales como antibióticos<sup>34</sup>, antiinflamatorios<sup>35</sup>, suturas en cirugía<sup>7</sup> y ingeniería de tejidos<sup>36,37</sup>.

La adición de perlas de vidrio de diferentes tamaños de partículas provoca aumentos del módulo elástico y provocan una disminución en la temperatura máxima de curado y un aumento en la resistencia a compresión<sup>38</sup>. La modificación de un 25% p/p con hidroxiapatita, también da lugar a una disminución de la temperatura máxima de curado en un 10-15%, obteniéndose una resistencia en flexión de 68 MPa y una reducción significativa de la fluencia. También se ha observado que la incorporación de hidroxiapatita estimula el crecimiento de osteoblastos y su proliferación<sup>39</sup>.

La fase líquida del cemento también es objeto de modificaciones con el fin de mejorar las propiedades finales del producto. El cambio de activador de iniciación, la DMT, por otros de menor toxicidad es otra vía de modificación y mejora de la biocompatibilidad del cemento. Aunque no se ha demostrado del todo que es cancerígena se ha observado que la DMT causa alteraciones en los cromosomas<sup>40,41</sup> y es un claro inhibidor de la síntesis de proteínas, interfiriendo en los procesos de mineralización<sup>42</sup>. La obtención de nuevas aminas activadoras que disminuyan dicha citotoxicidad se presenta como un campo de investigación muy amplio. Compuestos tales como 4-(dimetilamino)fenetanol<sup>43</sup>, incluida en las

formulaciones comerciales (Sulfix 60), N,N-dihidroxipropil-4-toluidina (Boneloc)<sup>44</sup>, N,N-dimetilaminobencil alcohol, metacrilato de N,N-dimetilaminobencilo<sup>45,46</sup> y arilaminas, disminuyen la actividad citotóxica, con respecto a la DMT.

Por otra parte la adición de nuevos monómeros a la fase líquida, sustituyendo total o parcialmente el MMA por otros de mayor peso molecular o de propiedades diferentes, o la adición de agentes de entrecruzamiento se encuentra documentada en la literatura con resultados muy destacables en la mejora de las propiedades mecánicas, aumento de niveles de biocompatibilidad, etc. Un ejemplo de ello es la adición de eugenol<sup>47</sup> o vitaminas como el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E)<sup>48</sup> que han sido químicamente ancladas en la estructura de los monómeros de metacrilato para inducir carácter antiinflamatorio y antioxidante, respectivamente.

La sustitución de los agentes radiopacos orgánicos comunes que se utilizan, tales como el sulfato de bario o el dióxido de circonio, han sido otro foco de investigación debido a su mala compatibilidad con el PMMA, dando lugar a materiales con una baja resistencia a la tracción y dureza<sup>49</sup>. En este sentido, la incorporación del monómero con carácter opacificante ha llevado al mantenimiento de la resistencia mecánica. Monómeros tales como: 2,5-diiodo-8-quinolilo de metacrilato<sup>50</sup>, 2-[4-yodobenzoilo]-oxo-metacrilato<sup>51</sup> y [2',3', 5'-triyodobenzoilo] metacrilato oxoetil<sup>52</sup> han sido efectivamente sintetizados e incorporados al proceso de curado por medio de la copolimerización con MMA. En la Tabla I.4 se recogen los monómeros sintetizados más significativos para su incorporación a formulaciones de cementos óseos acrílicos. El material resultante permite la evaluación postoperatoria por medio de rayos X, la conservación de las propiedades mecánicas y la citotoxicidad celular.

Tabla I.4. Monómeros sintetizados derivados del MMA.

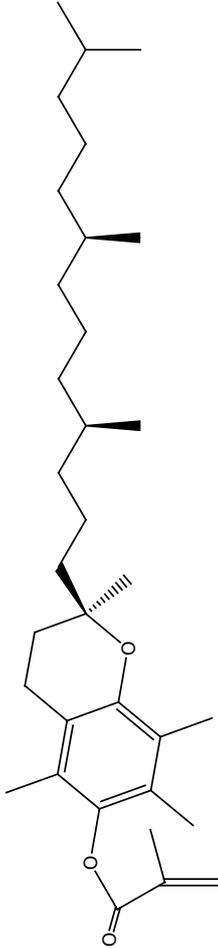
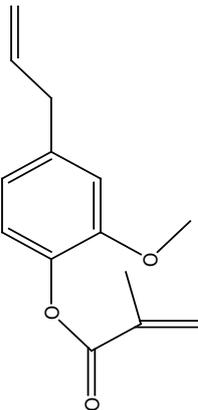
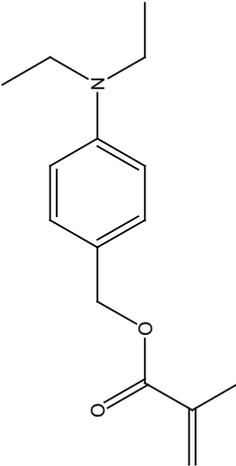
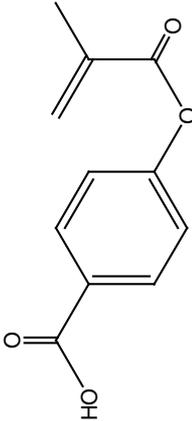
Monómero	Estructura química	Propiedades
$\alpha$ -tocoferil metacrilato (MVE) <sup>48</sup>		Capacidad antioxidante. Mejora de la biocompatibilidad
Eugenil metacrilato <sup>53</sup>		Antiinflamatorio
4-dietilaminobenzil metacrilato (DEABM) <sup>54</sup>		Mejora de las propiedades mecánicas
4-metacrililoiloxibenzoico acido (MBA) <sup>54</sup>		Mejora de las propiedades mecánicas

Tabla I.4. Monómeros sintetizados derivados del MMA.(Continuación)

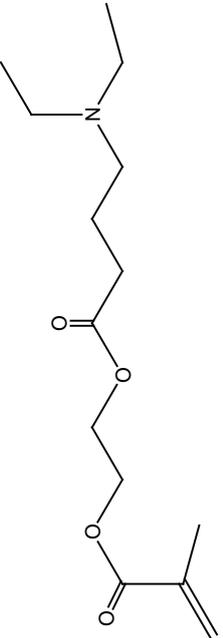
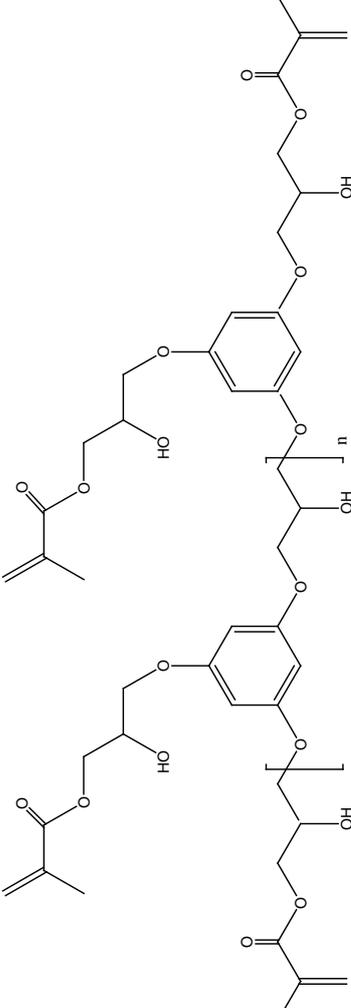
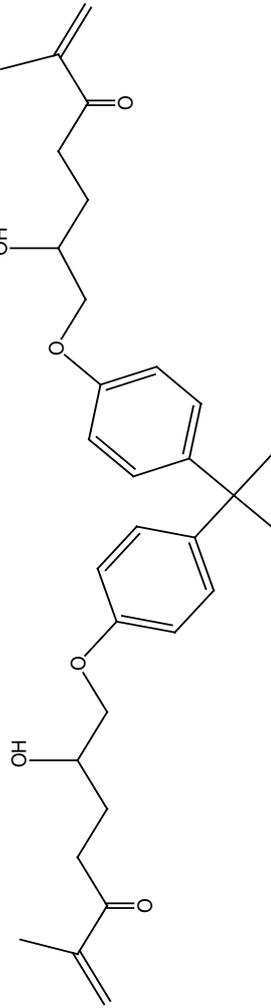
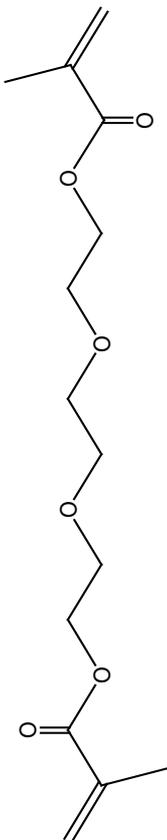
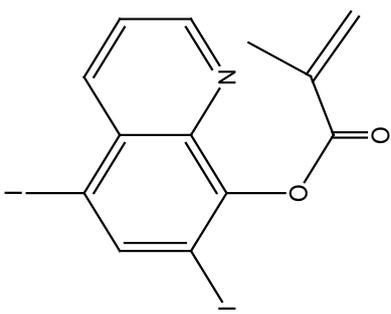
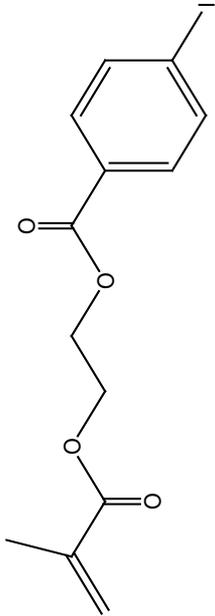
Monómero	Estructura química	Propiedades
Etilene glicol 3-dietilamino-propionato metacrilato <sup>55</sup>		Amina terciaria coincidiadora del metacrilato
Floroglucinol triglicidil metacrilato <sup>56</sup>		Entrecruzante parcialmente degradable
2,2-bis[4(2-hidroxi-3-metacriloxipropoxi) fenil] propano (Bis-GMA) <sup>57</sup>		Entrecruzante que reduce la contracción

Tabla I.4. Monómeros sintetizados derivados del MMA.

Monómero	Estructura química	Propiedades
Trietileneglicol dimetacrilato (TEGDMA) <sup>58</sup>		Entrecruzante que reduce la contracción
2,5-diodo-8-quinolil metacrilato (HQM) <sup>59</sup>		Opacificante
2-(metacrililoxi)etil 4-iodobenzoato <sup>60</sup>		Opacificante

## I.4. TEJIDO ÓSEO

La matriz ósea está formada aproximadamente por un 25% de agua, un 50% de una mezcla química de sales inorgánicas, y un 25% de varias sustancias orgánicas, composición que dota al hueso de dureza y elasticidad. Su dureza procede de sus componentes inorgánicos, siendo los principales el fosfato de calcio cristalino (hidroxiapatita) y el carbonato de calcio, junto a pequeñas cantidades de fluoruros, sulfatos y cloruros. Su elasticidad deriva de sustancias orgánicas como el colágeno y pequeñas cantidades de elastina, material celular y grasas. Dichas propiedades aportan al tejido óseo sus tres funciones principales: la sostenibilidad del cuerpo, la protección de algunos órganos y la posibilidad de movimiento<sup>61</sup>.

El tejido óseo según su composición también se puede clasificar en: tejido óseo compacto (tiene un aspecto macizo) y tejido óseo esponjoso (se caracteriza por poseer espacios abiertos parcialmente rellenos). La zona externa o cortical de los huesos es aquella que está formada por el tejido óseo más compacto y duro, cubierto por una membrana fibrosa vascular que recibe el nombre de periostio, la cual protege el hueso y alberga los nervios y los vasos sanguíneos responsables de detectar el dolor y proporcionar nutrientes al hueso.

El tejido óseo compacto aparece como una masa sólida dispuesta en láminas que contiene cavidades dispersas que albergan, cada una, un osteocito o célula ósea. Los osteocitos se comunican entre sí a través de canales finos que parten de la cavidad y que además podrían desempeñar un papel importante en la nutrición de dichas células. Las láminas del tejido óseo compacto se disponen de forma concéntrica alrededor de unos conductos paralelos al eje longitudinal del hueso llamados conductos o canales de Havers que contienen tejido nervioso y vasos sanguíneos los cuales proporcionan a los huesos de nutrientes orgánicos. Los canales de Havers están conectados entre sí, con las cavidades medulares y con el exterior por los denominados canales de Volkman.

El tejido óseo esponjoso no contiene canales de Havers. Consiste en un entramado de trabéculas o laminillas óseas que se disponen de forma tridimensional, creando cavidades comunicadas, ocupadas por una red de tejido conjuntivo que recibe el nombre de tejido medular o mieloide. La médula ósea supone de un 2 a un 5% del peso corporal de una persona y está formada por dos tipos de tejidos: la médula ósea amarilla está constituida principalmente por tejido adiposo y la médula ósea roja es un tejido generador de células sanguíneas: glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas. En la Figura I.3 se detalla los componentes del tejido anteriormente citados.

Así pues, el hueso está compuesto de una intrincada estructura en capas que le proporcionan la fuerza del acero y un peso semejante al del aluminio.

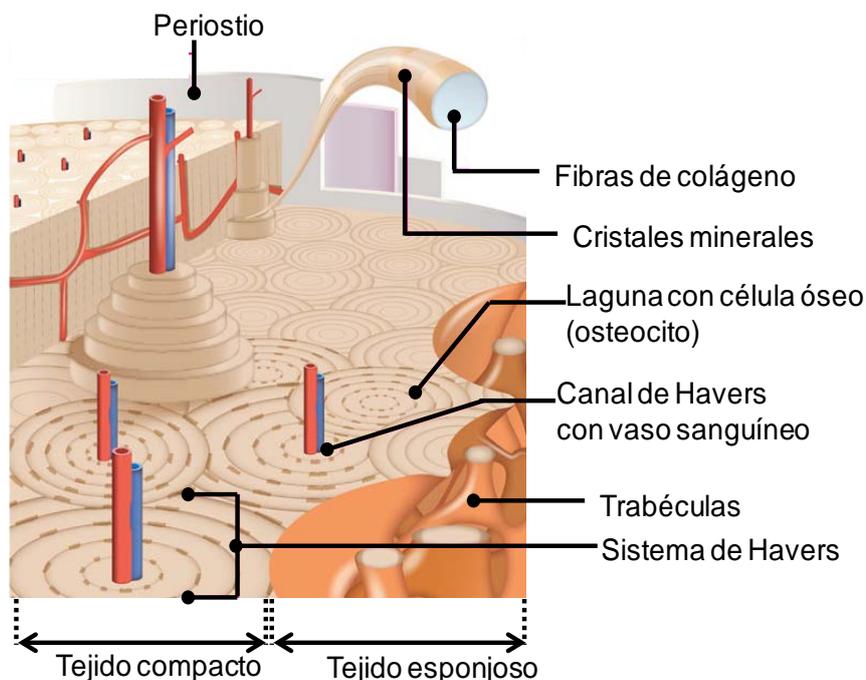
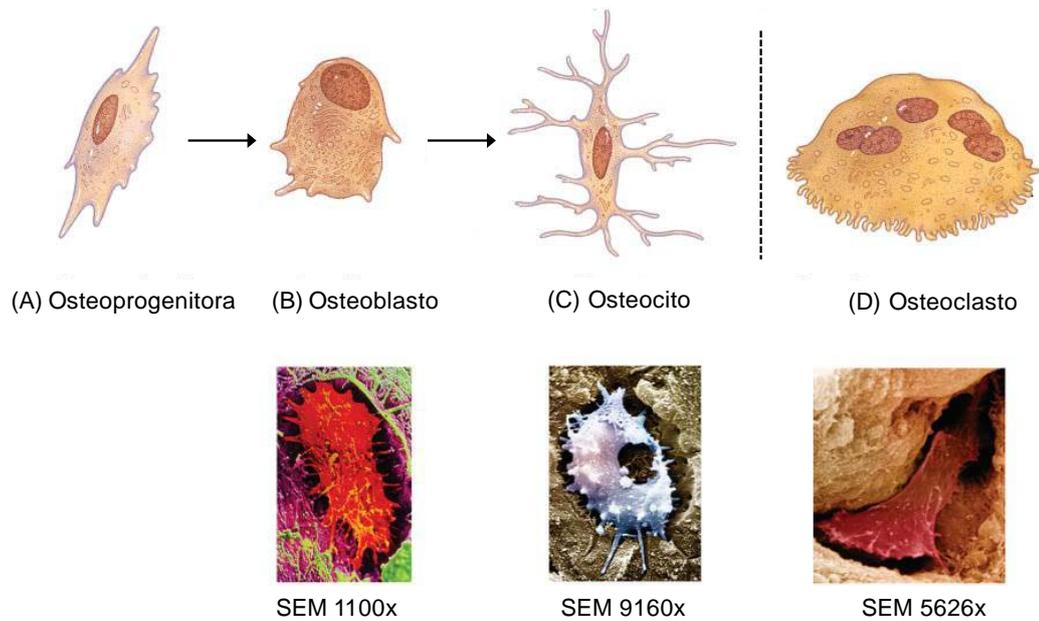


Figura I.3. Composición del tejido óseo.

En el tejido óseo maduro, que se encuentra en desarrollo, se hallan cuatro tipos de células: las osteoprogenitoras o preoblastos, los osteoblastos, los osteocitos y los osteoclastos<sup>62</sup>. En la Figura I.4 se pueden observar la morfología de estas células.



*Figura 1.4. Forma de las células óseas. (A) Osteoprogenitora, (B) Osteoblasto (C) Osteocito y (D) Osteoclasto.*

Los preosteoblastos son células no especializadas derivadas del mesénquima en el embrión, el tejido del que derivan todos los tejidos conjuntivos. Éstas se hallan en la capa interna del periostio y en los canales del Havers que contienen los vasos sanguíneos. A partir de ellas se generan los osteoblastos y los osteocitos.

Los osteoblastos son células de forma ovalada que forman el tejido óseo pero que han perdido la capacidad de dividirse por mitosis. Se encuentran en las superficies óseas formando grupos compactos de una sola capa de espesor, además también, son los encargados de sintetizar el componente orgánico de la matriz ósea (colágeno tipo I,...) y controlar el depósito de las sales minerales. A medida que segregan los materiales de la matriz ósea, ésta los va envolviendo, aplanando y los convierte en células de revestimiento, los osteocitos.

Los osteocitos, así pues, son células óseas maduras, de forma estrellada, derivadas de los osteoblastos que también han perdido la capacidad de dividirse. Constituyen la mayor parte del tejido óseo por ello residen en el interior (las lagunas) de la matriz ósea mineralizada. Estos canales les permiten el paso directo de iones inorgánicos y pequeñas moléculas hidrosolubles de una a otra

célula. Sin embargo, no segregan materiales de la matriz ósea y su función es la de mantener las actividades celulares del tejido óseo como el intercambio de nutrientes y productos de desecho.

Finalmente, los osteoclastos son células multinucleares, de 4 a 20 núcleos, derivadas de monocitos circulantes que se asientan sobre la superficie del hueso y proceden a la destrucción de la matriz ósea dando lugar a la resorción ósea. Su actividad viene estimulada por la hormona paratiroidea. El resultado de su actuación es la constante modelación de la forma de los huesos durante el periodo de crecimiento. Estas células tienen un tamaño de 20 a 100  $\mu\text{m}$ .

#### **I.4.1. OSTEOPOROSIS**

La osteoporosis es una afección caracterizada por el adelgazamiento de las trabéculas y de la membrana cortical de los huesos con un ensanchamiento de los espacios medulares (Figura I.5). Consiste en un desequilibrio de los procesos de formación-reabsorción de la sustancia fundamental del hueso (baja formación o excesiva reabsorción). Radiológicamente, se manifiesta en una disminución de la densidad ósea y, clínicamente, en deformidades, propensión a las fracturas y dolores, que muchas veces no presenta ninguna sintomatología<sup>63</sup>. Se pueden distinguir dos tipos de osteoporosis. La osteoporosis tipo I y la tipo II<sup>64</sup>.

La osteoporosis de tipo I principalmente está causada por la menopausia, pero que también puede presentarse en personas del sexo masculino. Este tipo de osteoporosis se manifiesta antes de los 65 años de edad, y se caracteriza por la afectación del hueso trabecular y, por consiguiente la aparición de fracturas vertebrales, del extremo distal del radio o del tobillo<sup>65</sup>.

La osteoporosis de tipo II es una osteoporosis involutiva que se manifiesta predominantemente a partir de los 70 años de edad y que afecta en la misma proporción tanto al hueso esponjoso como el hueso compacto<sup>66</sup>. Las fracturas se producen en las vértebras, en el cuello del fémur, el cuello del húmero, la tibia y la pelvis. La pérdida de masa ósea se origina por una disminución funcional de los

osteoblastos, por una disminución de la absorción del calcio y de la vitamina D y por un aumento de la actividad paratiroidea.



*Figura 1.5. Representación de la diferencia morfológica de un hueso normal y un hueso osteoporótico.*

## **I.5. APLICACIÓN DE LOS CEMENTOS ÓSEOS ACRÍLICOS EN MEDICINA**

Las aplicaciones de los cementos óseos acrílicos se centran principalmente en la sustitución total o parcial de prótesis articulares, tales como cadera y rodilla. Adicionalmente se han utilizado y se utilizan como relleno de defectos óseos, tanto en la zona dental como en otras estructuras óseas que hayan padecido algún tipo de traumatismo tanto físico como biológico (osteoporótico). Además existen referencias del uso de cementos óseos acrílicos en tratamientos antitumorales utilizando su elevada exotermia<sup>67</sup>.

Hoy en día, el aumento de la expectativa de vida y el avance en la terapia oncológica provoca que nos enfrentamos a una población que presenta una mayor frecuencia de dolor vertebral originado en fracturas osteoporóticas o

lesiones vertebrales neoplásicas. Es por este motivo que con el desarrollo de las terapias mínimamente invasivas aparece la vertebroplastia y la cifoplastia percutánea, demostrando ser metodologías quirúrgicas ambulatorias efectivas para el tratamiento del dolor vertebral. Cronológicamente la vertebroplastia ha sido aplicada en primer lugar, aunque a causa de sus limitaciones se ha necesitado el avance hacia técnicas más seguras, como es el caso de la cifoplastia con balón, que permiten un mayor control del proceso de reparación vertebral o del defecto óseo desarrollado por el paciente.

A continuación se muestran de forma más detallada algunos ejemplos del uso de los cementos óseos acrílicos en el campo biomédico.

### I.5.1. FIJACIÓN ORTOPÉDICA

La cadera en el cuerpo humano tiene un papel muy importante ya que está diseñada tanto para dar tanto movilidad como estabilidad. A grandes rasgos se puede percibir que la estructura ósea (Figura I.6) que da articulación es el acetábulo y la cabeza femoral. El acetábulo está forrado por el cartílago articular (*labrum*), el cual lubrica y amortigua los huesos durante el movimiento con una mínima fricción.

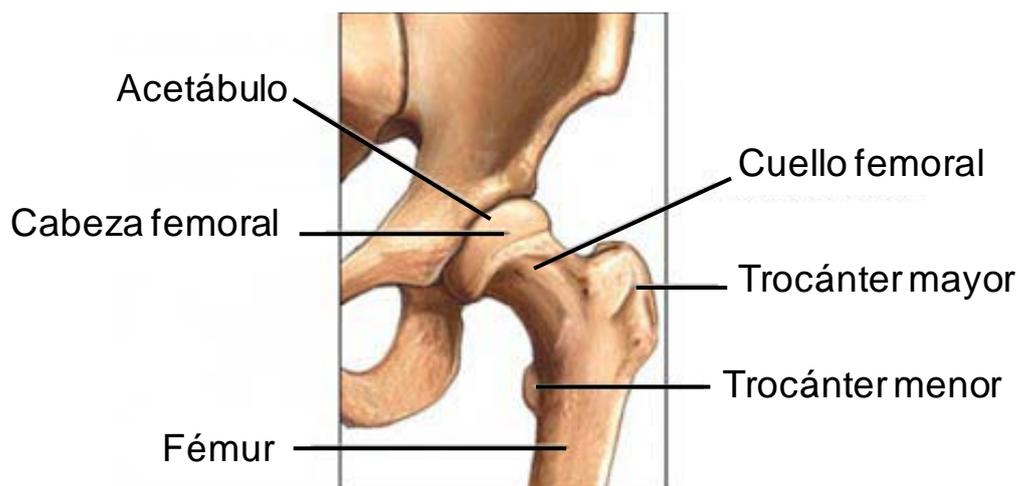
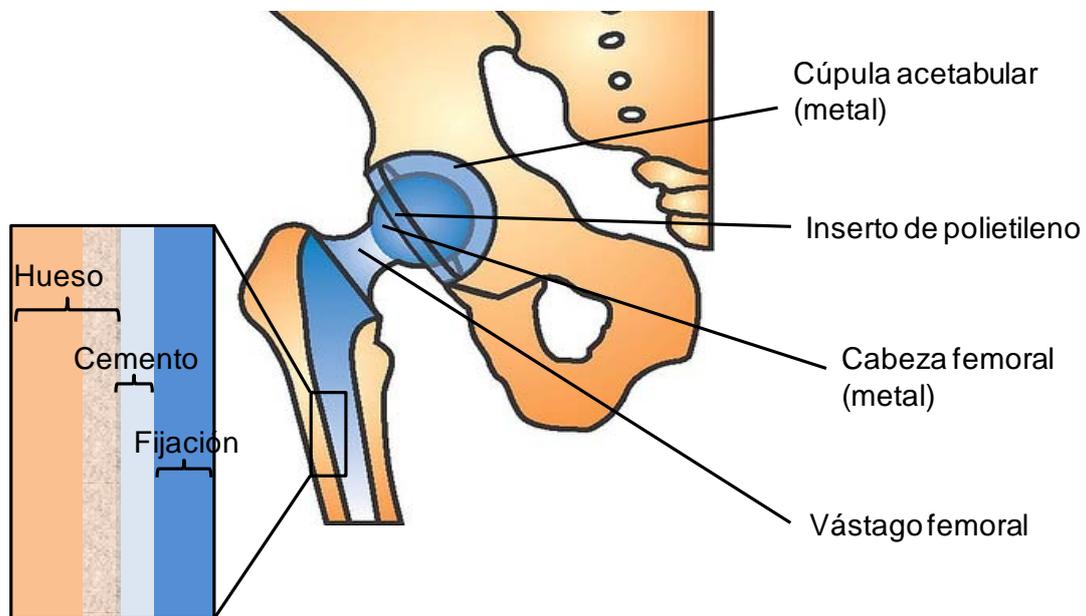


Figura I.6. Composición de la estructura ósea de la cadera.

La artritis u osteoartritis de cadera es una enfermedad que desgasta el cartílago entre la cabeza femoral y el acetábulo. Como consecuencia los dos huesos se erosionan uno al otro, dando lugar a la pérdida de hueso. Cuando esto pasa, la articulación o coyuntura se vuelve picada, desgastada e irregular. El resultado es dolor, endurecimiento e inestabilidad. En algunos casos, el movimiento de la pierna puede verse limitado. Este hecho, junto con otros como la rotura de la cabeza del fémur, requiere de una intervención quirúrgica para proceder a la sustitución total o parcial de la articulación. En la Figura I.7 se expone la composición de la sustitución de la fijación articular cadera-hueso junto con su prótesis articular de fijación cementada.



*Figura I.7. Componentes de un prótesis de fijación articular junto con su implante en cadera.*

## **I.5.2. CEMENTOS DENTALES**

Los polímeros acrílicos también se usan ampliamente como materiales de reparación de defectos dentales. Las dentaduras postizas así como también los dientes artificiales son las dos grandes áreas en las que se emplean estos materiales. Además también se encuentran otras aplicaciones de estos materiales

como por ejemplo: rellenos de endodoncia, implante, coronas cementadas, puentes<sup>68</sup>,...

El cemento debe tener las características de proveer un buen sellado, soportar las fuerza oclusales amortiguando el impacto, tener una adecuada fluidez inicial,...Un ejemplo de aplicación de estos materiales es el implante de corona cementada con pilar atornillado directamente. Este hecho facilitará el poder lograr los tres objetivos básicos de una oclusión: axialidad, estabilidad y la no interferencia. En la Figura I.8 se puede ver comparativamente como se fija un diente al hueso de forma natural frente a la manera como se fija un implante al hueso.

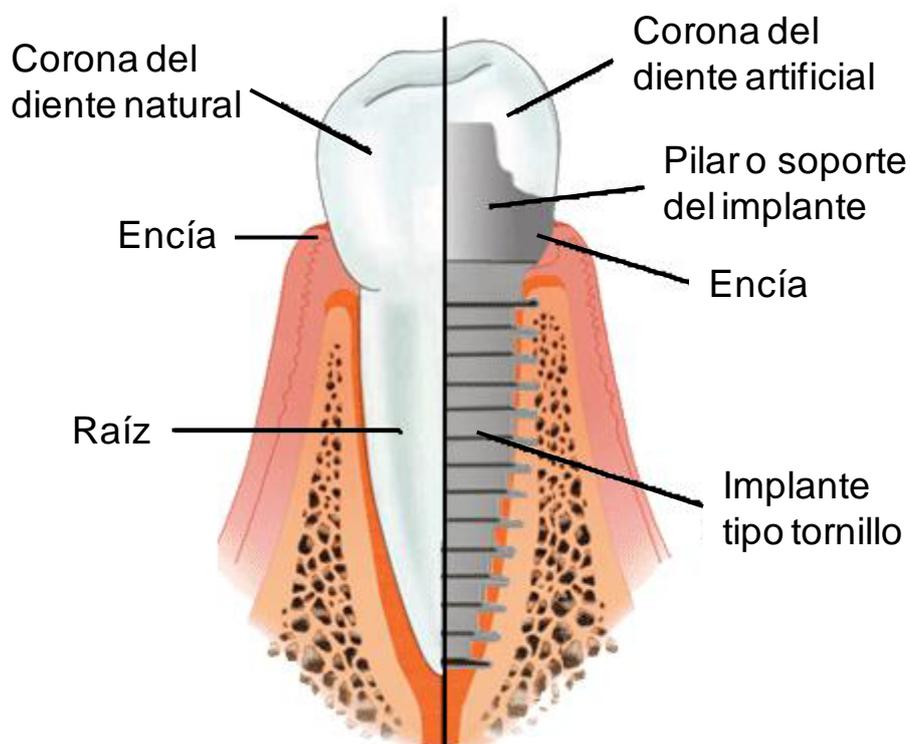
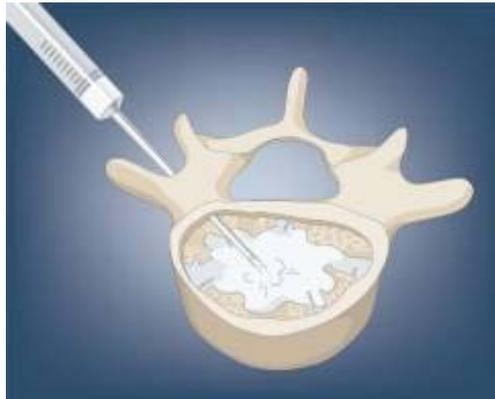


Figura I.8. Implante dental tipo tornillo con corona cementada.

### I.5.3. VERTEBROPLASTIA

La vertebroplastia<sup>69</sup> es un tratamiento no quirúrgico mínimamente invasivo, guiado por imagen y, que se realiza con el fin de reforzar una vértebra fracturada,

de forma patológica, por osteoporosis, generalmente, y menos frecuente por neoplasia. Esta técnica quirúrgica fue descrita por primera vez por Deramond y Galibert (Amiens France, 1986). Permite mejorar la capacidad funcional y prevenir el colapso del cuerpo vertebral y sirve además para paliar el dolor debido a la fractura compresiva. Se basa en inyectar un cemento óseo acrílico con una aguja en el hueso fracturado tal y como se muestra en la Figura I.9.



*Figura I.9. Inyección del cemento óseo en la vértebra.*

Tras la menopausia, las mujeres son muy susceptibles a la osteopenia y más de una cuarta parte de éstas mayores de 65 años, desarrollan una fractura osteoporótica. Esta situación les produce dolor y limitación funcional y esto último, además incrementa la osteopenia. Los tratamientos, especialmente los narcóticos, aumentan la limitación funcional. La vertebroplastia se lleva a cabo sobre todo en ancianos que sufren una limitación funcional y una osteoporosis tan severas que les impiden ser candidatos a la cirugía espinal. También son candidatos a la vertebroplastia los pacientes que presentan afectación vertebral por tumor y en mucha menor proporción jóvenes con osteopenia por tratamientos prolongados esteroideos o por desórdenes metabólicos.

La utilización de esta terapia permite al paciente disminuir la dosis de analgesia para afrontar el dolor. Dos tercios de los pacientes disminuyen la dosis de analgésicos en pocas semanas. Muchos quedan asintomáticos. El 75% recuperan gran parte de la movilidad y aumento de la fuerza muscular, con disminución de riesgos relacionados con el encamamiento prolongado.

Pero además de grandes beneficios, la vertebroplastia también lleva asociado algún tipo de riesgo asociado a la pequeña cantidad de cemento que puede salir fuera del cuerpo vertebral. Esto no supone un serio problema, a menos que se encuentre en el canal espinal. En este caso sí que supondría un gran problema debido al rápido endurecimiento del cemento óseo que podría provocar la inmovilización de la médula espinal o incluso su sección.

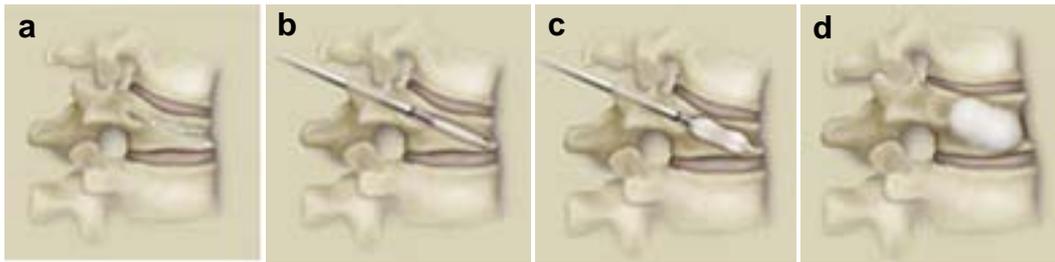
Es por ello que se han ideado nuevas técnicas mínimamente invasivas que permiten afrontar el proceso de reparación vertebral de una forma más segura. Este es el caso de la cifoplastia con balón.

#### **I.5.4. CIFOPLASTIA CON BALÓN**

La cifoplastia con balón<sup>69</sup> es una técnica quirúrgica mínimamente invasiva que se realiza de manera ambulatoria o con una estancia hospitalaria de un día, bajo anestesia local y sedación, o general (dependiendo del número de niveles y del estado general del paciente), de manera percutánea y que se acompaña de una mínima pérdida de sangre (menor que una toma de muestra para análisis). La técnica fue introducida por el Dr. Mark Reiley, Berkeley, California, en 1998.

Esta técnica se realiza bajo control de rayos X en visión constante en dos planos lo que permite identificar el lugar exacto por el cual se va a introducir en el interior del cuerpo vertebral y con el paciente acostado boca abajo (*decúbito prono*).

Utilizando una aguja de unos 2 mm de diámetro se coloca una guía fina en el interior del cuerpo de la vértebra y con su ayuda se pasan unos trócares más gruesos que nos permiten introducir dos balones inflables de 20 mm de longitud, uno por el lado derecho y otro por el izquierdo



*Figura 1.10. Cifoplastia con balón. a) Incisión vertebral, b) introducción del balón e inflado, c) relleno de la cavidad ósea con cemento óseo acrílico, d) extracción de aguja y curado del cemento óseo.*

El cirujano realizará con un bisturí una pequeña incisión dentro de la vértebra fracturada, donde introducirá de una manera guiada el pequeño balón ortopédico (Figura 1.10.a). La incisión en la piel es aproximadamente de 1 cm de longitud. Posteriormente, el balón es inflado con mucho cuidado con el fin de restaurar el aplastamiento vertebral y que la vértebra vuelva a su posición normal (Figura 1.10.b). El balón podrá ser desinflado e inflado varias veces hasta que la vértebra alcance su posición correcta. Este procedimiento crea una cavidad dentro del cuerpo vertebral. La cavidad se rellena con cemento óseo de tal manera que la vértebra pueda soportar a las vértebras adyacentes y prevenir futuros aplastamientos (Figura 1.10.c). El cemento forma en la vértebra un molde interno (Figura 1.10.d) que la sostiene en su lugar. Generalmente, este proceso se hace en ambos lados del cuerpo vertebral. La intervención finaliza con la extracción de la aguja.

### **1.5.5. CEMENTO OSEO INYECTABLE**

En la vertebroplastia, el cemento óseo debía ser muy fluido. Ello es debido a que el cemento debe difundir a través de los poros óseos, que aunque son más grandes que en un tejido sano, debido a la afectación por la osteoporosis, igualmente ofrecen resistencia a su paso. Esto implica la aplicación de elevada presión para forzar el paso del cemento a su través. En cambio, con el desarrollo de la cifoplastia con balón, dado que antes de introducir el cemento ya se ha generado una cavidad intraósea no se precisa ejercer presión para rellenar el

hueco, ni que el cemento sea tan fluido, hecho que minimiza el riesgo de fugas de cemento hacia el canal espinal.

El cemento está basado en la estructura química del MMA y la filosofía de su uso en cifoplastia es análoga a la practicada en la cirugía de sustitución total o parcial de prótesis de cadera y rodilla, es decir, la fijación y estabilización de prótesis y fracturas.

## **I.6. BIBLIOGRAFÍA**

1. Monteiro FJ, San Román J. Introducción y Desarrollo Histórico. En: Sastre R., de Aza S, San Román J. Biomateriales. Italia: Faenza Editrice Iberica s.l.; 2004. pág. 17-26.
2. Williams DF. Advanced applications for materials implanted within the human body. Mater Sci Technol. 1987; 3: 797-806.
3. Williams DF. Definitions in Biomedicals. Progress in Biomedical Engineering, vol 4, New York, Elsevier. 1987.
4. Williams D.F. On the nature of biomaterials. Biomaterials. 2009; 30(30): 5897–909.
5. Williams DF. Biocompatibility of implant materials. London: Sector Publishing Limited; 1976.
6. Black J. Biological performance of materials. Fundamentals of biocompatibility. New York: Dekker; 1992.
7. Vainionpaa S, Rokkanen P, Tormala P. Surgical applications of biodegradable polymers in human tissues. Polym Sci. 1989; 14: 679-716.

8. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone Tissue Engineering: State of the Art and Future Trends. *Macromol Biosci.* 2004; 4(8): 743-65.
9. Slaughter BV, Khurshid SS, Fisher OZ, Khademhosseini A, Peppas NA. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv Mater.* 2009; 21(32-33): 3307-29.
10. Dash TK, Konkimalla VB. Poly- $\epsilon$ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review. *J Control Release.* 2012; 158(1): 15-33.
11. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59(4-5): 207-33.
12. Park J, Lakes RS. Introduction. En: Park J, Lakes RS, editores. *Biomaterials. An Introduction (3ª edición)*. New York: Springer Science+Business Media, LLC; 2007. pág 1-17.
13. Srichana T, Domb AJ. Polymeric Biomaterials. En: Narayan R, editor. *Biomedical Materials*. New York: Springer Science+Business Media, LLC; 2009. pág. 83-119.
14. Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Jt Surg.* 1964; 42 (B): 28-30.
15. Charnley J. Fracture of femoral prosthesis in total hip replacement. *Clin Orthop Rel Res.* 1975; 111: 105-20.
16. Sweeny WT. Acrylic resins in prosthetic dentistry. *Dent Clin North Am.* 1958; 2: 593-601.
17. Kusy RP. Caracterización of self-curing acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res.* 1978; 12: 271-6.

18. Jensen LN, Sturup J. Histological evaluation of cortical bone cement to PMMA cementation. *Acta Orthop Belgica*. 1991; 57: 254-9.
19. Sturup J, Madson J. Decreased blood perfusion in canine tibial diaphysis after filling acrylic bone cement compared with inert bone mass. *Acta Orthop. Scan*. 1990; 61: 143-7.
20. De Wall Malefijt J, Slooft J. The actual status of acrylic bone cement in total hip replacement. *Acta Orthop Belg*. 1987; 53: 52-8.
21. American National Standard Institution. American Dental Association document nº41 for recommended standard practises for biological evaluation of dental materials. *J Am Dent Assoc*. 1979; 99: 697-698.
22. British Standard Institution. Methods of biological assessment of dental materials. BS5828. Londres. 1980.
23. International Standard ISO 10993-6. Biological evaluation of medical devices. Part6. Tests for local effects after implantation. Suiza: International Organization for Standardization. 1994.
24. De Wijn JR, Slooff TJJM, Driessens FCM. Characterisation of bones cements. *Acta Orthop Scand*. 1975; 46: 38-51.
25. Brauer GM, Devenport RM, Hansen WG. Autoaccelerating effects of amines in polymerization of methylmethacrylate. *Modern Plastics Nov*. 1956; 153-6.
26. G. Odian. Principales of polymerization (3ª edición). Canada: Wiley Interscience, 1991. pág. 198-333.
27. Trap B, Wolf P, Jensen JS. Acrylic bone cements. Residuals and extractability of methyl methacrylate monomers and aromatics amines. *J Appl Biomater*. 1992; 2: 51-57.

28. McDernott B. Preclinical testing of PMMA bone cement. Borrador de las nuevas directrices de la FDA. 1997
29. Wixson RL, Lautenschlager EP, Novak MA. Vacuum mixing of acrylic bone cements. *J Arthroplast.* 1987; 2: 141-9.
30. Hadjari M, Reindel ES, Hollis JM, Covery FR. Proceedings of the 16th Annual Meeting of the Society for Biomaterials. Society for Biomaterials 1990; 105.
31. Pereira CS, Cunha AM, Reis RL, Vázquez B, San Román J. New starch-based thermoplastic hydrogels for use as bone cements or drug-delivery carriers. *J Mater Sci: Mater Med.* 1998; 9: 825-33.
32. Barrows TH. Degradable implant materials. A review of synthetic absorbable polymers and their applications. *Clin Mater.* 1986; 1: 233-57.
33. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* 2000; 21: 2335-46.
34. Fernández M, Méndez JA, Vázquez B, San Román J, Ginebra MP, Gil FJ, Manero J, Planell JA. Acrylic-phosphate glasses composites as self-curing controlled delivery Systems of antibiotics. *J Mater Sci Mater Med.* 2002; 13: 1251-7.
35. Méndez JA, Fernández M, González-Corchón A, Salvado M, Collía F, de Pedro JA, Levenfeld BL, López-Bravo A, Vázquez B, San Román J. Injectable self-curing bioactive acrylic-glass composites charged with specific anti-inflammatory/analgesic agent. *Biomaterials.* 2004; 25: 2381-92.
36. Lewis DH. Controlled Release of Bioactive Agents from Lactide/Glycolide Polymers. En: Chasin M y Langer R, editores. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery System.* New York: Marcel Dekker; 1990. pág 1-41.

37. Ikada Y. Tissue Adhesives. En: Chu CC, von Fraunhofer LA, Greisler HP, editores. *Wound Close Biomaterials and Devices*. New York: CRC Press; 1996. pág. 317–346.
38. Henning W, Blencke BA, Bromer H, Dutscher KK, Gross A, Ege W. Investigations with bioactive polymethylmethacrylates. *J Biomed Mater Res*. 1979; 13: 89-99.
39. Moursi AM, Winnard AV, Winnard PL, Lannutti JJ, Seghi RR. Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate–hydroxyapatite composite. *Biomaterials*. 2002; 23: 133-44.
40. Stea S, Granchi D, Zolezzi C, Ciapetti G, Visentin M, Cavedagua D, Pizzoferrati A. High-performance liquid chromatography assay of N,N-dimethyl-p-toluidine release from bone cements: evidence of toxicity. *Biomaterials*. 1997; 18: 243-6.
41. Taningher M, Pasquini R, Bonatti S. Genotoxicity analysis of N,N-dimethylaniline and N,N-dimethyl-p-toluidine. *Environ Mol Mutagen*. 1993; 21: 349-56.
42. Bigatti MP, Lamberti L, Rizzi FP, Cannas M, Allasia G. In vitro micronucleus induction by polymethyl methacrylate bone cement in cultured human lymphocytes. *Mutat Res*. 1994; 321: 133-7.
43. Fritsch EW. Static and fatigue properties of two new low-viscosity PMMA bone cements improved by vacuum mixing. *J Biomed Mater Res*. 1996; 31: 451-6.
44. Trap B, Wolf P, Jensen JS. Acrylic bone cements: Residual and extractability of methacrylate monomers and aromatic amines. *J Appl Biomed*. 1992; 3: 51-7.
45. Vázquez B, Elvira C, Levenfeld B, Pascual B, Goñi I, Gurruchaga M, Ginebra MP, Gil FX, Planell JA, Liso PA, Rebuella M, San Román J. Application of

- tertiary amines with reduced toxicity to the curing process of acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res.* 1997; 34: 129-36.
46. Liso PA, Vázquez B, Rebuelta M, Hernaez ML, Rotger R, San Román J. Analysis of the leaching and toxicity of new amine activators for the curing of acrylic bone cements and composites. *Biomaterials.* 1997; 18: 15-20.
47. Rojo L, Vázquez B, Deb S, San Roman J. Eugenol derivatives immobilized in auto-polymerizing formulations as an approach to avoid inhibition interferences and improve biofunctionality in dental and orthopedic cements, *Acta Biomaterialia.* 2009; 5:1616–25
48. Méndez JA, Aguilar MR, Abraham GA, Vázquez B, Dalby M, Di Silvio L, San Román J. New acrylic bone cements conjugated to vitamin E: Curing parameters, properties and biocompatibility. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62: 299-307.
49. Lewis G. Properties of acrylic bone cement: state of the art review. *J Biomed Mater Res.* 1997; 38: 155–82.
50. Vázquez B, Ginebra MP, Gil FJ, Planell JA, López Bravo A., San Román J. Radiopaque acrylic cements prepared with a new acrylic derivative of iodoquinoline. *Biomaterials.* 1999; 20: 2047-53.
51. van Hooy-Corstjens CSJ, Govaert LE, Spoelstra AB, Bulstra SK, Wetzels GMR, Koole LH. Mechanical behaviour of a new acrylic radiopaque iodine-containing bone cement. *Biomaterials.* 2004; 25: 2657–67.
52. Zaharia C, Zecheru T, Moreau MF, Pascaretti-Grizon F, Mabilleanu G, Marculescu B. Filmon R, Cincu C, Staikos G, Chappard D. Chemical structure of methylmethacrylate-2-[2',3',5'-triiodobenzoyl] oxoethyl methacrylate copolymer, radio-opacity, in vitro and in vivo biocompatibility. *Acta Biomaterialia.* 2008; 4: 1762-9.

53. Rojo L, Vázquez B, Parra J, López Bravo A, Deb S, San Roman J. From Natural Products to Polymeric Derivatives of Eugenol. A New Approach for Preparation of Dental Composites and Orthopedic Bone Cements. *Biomacromolecules*. 2006; 7(10): 2751-61.
54. Cervantes JM, Vázquez-Torres H, Cauich-Rodríguez JV, Vázquez-Lasa B, San Román del Barrio J. Comparative study on the properties of acrylic bone cements prepared with either aliphatic or aromatic functionalized methacrylates. *Biomaterials*. 2005; 26(19): 4063-72.
55. Wu G, Nie J. Synthesis and evaluation of ethylene glycol 3-diethylamino-propionate methacrylate as a polymerizable amine coiniciator for dental application. *Dental Materials*. 2007; 23(5): 623-9.
56. Jayabalan M, Thomas V, Rajesh PN. Polypropylene fumarate/phloroglucinol triglycidyl methacrylate blend for use as partially biodegradable orthopaedic cement. *Biomaterials*. 2001; 22(20): 2749-57.
57. Claudia I, V, Walter FS. Properties of acrylic bone cements formulated with Bis-GMA. *SO: J Biomed Mater Res B: Appl Biomater*. 2005; 74B(2): 676-85.
58. Deb S, Vazquez B. The effect of cross-linking agents on acrylic bone cements containing radiopacifiers. *Biomaterials*. 2001; 22(15): 2177-81.
59. Vázquez B, Ginebra MP, Gil FJ, Planell JA, López Bravo A, San Román J. Radiopaque acrylic cements prepared with a new acrylic derivative of iodoquinoline. *Biomaterials*. 1999; 20(21): 2047-53.
60. van Hooy-Corstjens CSJ, Govaert LE, Spoelstra AB, Bulstra SK, Wetzels GMR, Koole LH. Mechanical behaviour of a new acrylic radiopaque iodine-containing bone cement. *Biomaterials*. 2004; 25(13): 2657-67.
61. Enciclopèdia.cat. Catalunya: Grup Enciclopèdia Catalana, SAU. [2ª edición; citada 6 febrero 2012]. Disponible en: <http://www.enciclopedia.cat/>

62. Algunos aspectos del sistema locomotor. Xile: Universidad Católica de Valparaíso; 2011 [actualizada 2011; citada enero 2012]. Disponible en: <http://www.anatomiahumana.ucv.cl/morfo1/osteomorfo.html>
63. Mora S, Gilsanz V. Establishment of peak bone mass. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2003; 32: 39–63.
64. Diccionari Enciclopèdic de medicina. Catalunya: Enciclopèdia Catalana, S.A. 1997-2011. [actualizada enero 2011; citada diciembre 2012]. Disponible en: <http://www.grec.net/cgibin/medicx.pgm>
65. Orimo H, Hayashi Y, Fukunaga M, Sone T, Fujiwara S, Shiraki M, et al. Diagnostic criteria for primary osteoporosis. *J Bone Miner Metab.* 2001; 19: 331–337
66. Reginster JY, Burlet N. Osteoporosis: a still increasing prevalence. *Bone.* 2006; 38: S4–S9
67. Zwolak P, Manivel JC, Jasinski P, Kirstein MN, Dudek AZ, Fisher J, et al. Cytotoxic effect of zoledronic acid-loaded bone cement on giant cell tumor, multiple myeloma, and renal cell carcinoma cell lines. *J Bone Joint Surg Am.* 2010; 92: 162-8.
68. Davis JR. *Handbook of Materials for Medical Devices* En: Davis JR and Associates, editores. Ohio: Materials Park, ASM International; 2003.
69. Becker S. The technique of balloon kyphoplasty. Becker S, Ogon M, editores. *Balloon Kyphoplasty*. New York: Springer; 2008. pág. 49-72.



---

# **CAPÍTULO II**

## **OBJETIVOS**

---

El objetivo principal de este trabajo para acceder al grado de doctor por la Universitat de Girona se focaliza en la obtención de formulaciones acrílicas autocurables, también denominadas cementos óseos acrílicos, para desarrollar funcionalidades específicas. Este enfoque está marcado por la necesidad de dotar a los mencionados materiales de capacidad de liberación controlada de especies activas y particularmente destinadas al tratamiento paliativo de los efectos adversos provocados por la osteoporosis en el tejido óseo. El diseño de estos biomateriales se dirige hacia la modificación química de la fase sólida, por incorporación de componentes hidrofílicos que fomenten el atrapamiento de las especies farmacológicas y posteriormente permitan su liberación al medio externo de forma controlada. Con este fin se plantean los siguientes objetivos:

- Evaluar la influencia que ejerce la estructura química de diferentes polímeros biodegradables, de naturaleza tanto sintética como biológica, en el comportamiento de formulaciones acrílicas autocurables.

- Determinar el efecto de la modificación de diferentes parámetros físicos característicos de las formulaciones acrílicas autocurables (tamaño de partícula del polímero biodegradable añadido, relación sólido:líquido, polaridad del polímero añadido) en la liberación controlada de bisfosfonatos de tercera generación.

- Desarrollar un sistema de liberación controlada de proteínas que permita modelizar la liberación de factores de crecimiento influyentes en el crecimiento de nuevo tejido óseo en el tratamiento paliativo de la osteoporosis.

- Optimizar las formulaciones anteriormente mencionadas para lograr perfiles de liberación controlados perjudicando lo menos posible las propiedades mecánicas del material, las cuales condicionan su viabilidad técnica.

---

# **CAPÍTULO III**

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

---

### III.1. FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES

Las formulaciones acrílicas autocurables también llamadas cementos óseos acrílicos, preparadas en este trabajo están constituidas por una base polimérica de poli(metacrilato de metilo) (PMMA). Estas formulaciones son materiales bifásicos que se preparan, *in situ*, mezclando una fase líquida monomérica con una fase sólida polimérica hasta obtener la consistencia adecuada para ser aplicada.

**Fase sólida.** La fase sólida está compuesta por el PMMA (Figura III.1), en forma de microesferas, suministrado por Degussa (España) con el nombre comercial Degacryl MW 332, cuyas características físico-químicas se muestran en la Tabla III.1. A dicha fase se le añade el iniciador radicalario, peróxido de benzoilo (BPO) (Figura III.1), en una proporción en peso de 1,5% p/p respecto de la misma fase. El BPO, adquirido a Scharlau, presenta un contenido en agua del 25% en peso, por lo que para su uso se purifica previamente mediante disolución en metanol a 38°C y posterior recristalización a 0°C.

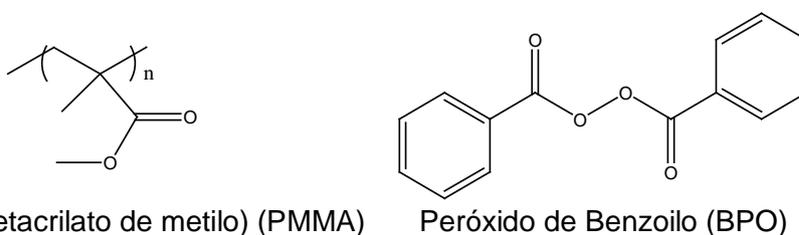


Figura III.1 Componentes de la fase sólida de cementos óseos acrílicos convencionales.

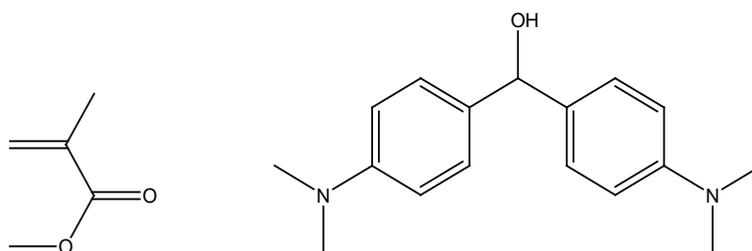
Tabla III.1. Características físico-químicas de las microesferas de PMMA.

Peso molecular (Mn)	Viscosidad (ml/g)	Contenido en agua (%)	Peróxido residual (%)
200.000	80-100	0.5-1.5	0.2-0.5

**Fase líquida.** La fase líquida contiene el monómero metacrilato de metilo (MMA) (Figura III.2) y el activador de baja toxicidad 4-4'-bis-(dimetilamino)difenil

carbinol (BZN) (Figura III.2), que provocará la descomposición del iniciador a baja temperatura para dar lugar a radicales libres encargados de iniciar la reacción de polimerización del monómero en presencia de las microesferas de PMMA.

El MMA (Acros Organics) estabilizado con 100 ppm de monometiléter de hidroquinona, se utiliza tal y como se recibe del proveedor. El BZN (Fluka) se añade al monómero en una cantidad de 1,0% p/p respecto del total de la fase líquida, en todas las formulaciones preparadas en este trabajo.



*Figura III.2. Componentes de la fase líquida de cementos óseos acrílicos convencionales: metacrilato de metilo (MMA) (izda) y 4-4'-bis-(dimetilamino)difenil carbinol (BZN) (dcha).*

### III.2. FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES MODIFICADAS

La preparación de formulaciones acrílicas autocurables modificadas con componentes biodegradables, como carbohidratos,... ayudan a la degradación de éstas en medio fisiológico para dar paso al crecimiento de tejido óseo vivo<sup>1</sup>. Los polímeros biodegradables también se utilizan desde hace varias décadas para la preparación de diferentes dispositivos biodegradables dentro del campo biomédico<sup>2,3</sup>. Estos materiales han sido objeto de estudio para sistemas de liberación controlada de fármacos tales como antibióticos<sup>4</sup>, antiinflamatorios<sup>5</sup>, suturas en cirugía<sup>6</sup>, ingeniería de tejidos<sup>7,8</sup>, entre otros.

En este trabajo se ha modificado parte de la fase sólida con distintos polímeros biodegradables y biopolímeros obtenidos de fuentes renovables,

vegetal y animal. Para ello se ha sustituido parte del PMMA por cada uno de los distintos polímeros anteriormente mencionados. La relación sólido:líquido de las distintas formulaciones acrílicas autocurables modificadas no ha sido constante en todas ellas, ya que se ha necesitado un correcto mezclado de todos los componentes, así como la consecución de un estado pastoso necesario para su óptimo manejo en el procesado del mismo.

Con las distintas formulaciones acrílicas se han preparado los diferentes tipos de probetas necesarios para cada ensayo de caracterización (comportamiento *in vitro*, resistencia a la compresión y a la tracción) y el estudio de su morfología superficial. También se han evaluado las propiedades de curado de la masa reactante, así como otras propiedades térmicas, espectroscópicas,... que han ayudado a su perfecta caracterización.

Finalmente se ha llevado a cabo el estudio de liberación controlada de especies activas de las formulaciones más optimizadas, el cuál es uno de los objetivos de este trabajo.

### **III.2.1. FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTORABLES MODIFICADAS CON POLÍMEROS BIODEGRADABLES**

Para este estudio se utilizan cuatro tipos de polímeros biodegradables termoplásticos para sustituir parte del PMMA de la fase sólida y conseguir así la parcial biodegradabilidad de la formulación autocurable. Los polímeros biodegradables utilizados son: poli(ácido L-láctico) (PLLA) (BIOMER<sup>®</sup> L9000 (Biomer, Alemania)), poli( $\beta$ -hidroxibutirato) (PHB) (BIOMER<sup>®</sup> P226 (Biomer, Alemania)), almidón termoplástico (TPS) (Mater-Bi Y1014U/C (Novamont, Italia)) y poliéster alifático (PES) (Mater-Bi TF01U/095R (Novamont, Italia)). La adición de dichos polímeros biodegradables a la formulación acrílica debe ser en formato de polvo microparticulado. Para ello, la granza de los distintos polímeros, congelada previamente con nitrógeno líquido, se tritura en un molinillo provisto de guillotinas de acero para obtener un tamaño de partícula inferior a 300  $\mu\text{m}$  de diámetro.

La formulación acrílica está formada por dos fases, una sólida y otra líquida. La fase sólida está constituida por: el PMMA, el polímero biodegradable, y el iniciador BPO. El polímero biodegradable y el PMMA se encuentran en proporción 1:1, y el BPO representa el 1,5% del peso total de la fase sólida. La fase líquida está formada por el monómero MMA, sin purificar, y el activador BZN. La fase líquida se adiciona sobre la fase sólida y la mezcla resultante se mezcla con una espátula a baja velocidad para evitar la inclusión de burbujas de aire.

La relación sólido:líquido utilizada en las formulaciones acrílicas es 2:1, excepto para la formulación de PLLA que es 1:1, ya que una mayor relación sólido:líquido no permite un correcto mezclado.

Para facilitar el seguimiento de las formulaciones acrílicas autocurables modificadas con los diferentes polímeros biodegradables termoplásticos que se preparan en este trabajo se sigue la siguiente terminología: **A-Y**, siendo **A** el correspondiente polímero: PMMA, TPS, PHB, PLLA y PES; **Y** es la relación sólido:líquido, siempre con respecto a 1. Por ejemplo, la formulación **PES-2** corresponde a la formulación modificada con el poliéster alifático, aplicando la relación sólido:líquido 2:1, respectivamente.

### **III.2.2. FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES MODIFICADAS CON BIOPOLÍMEROS DE ORIGEN VEGETAL**

El biopolímero de origen vegetal elegido para el estudio es el almidón termoplástico (TPS). Para ello se toman dos tipos de almidones termoplásticos en forma de granza de diferentes procedencias: (1) Mater-Bi YI014U/C (Novamont, Italia) y (2) Biopar (Avebe, España). La principal diferencia entre ambos materiales es su capacidad de absorción de agua atribuida a su diferente formulación y propósito. La metodología de preparación de las formulaciones acrílicas requiere la adición de sus componentes en formato de polvo. Para ello la granza de los distintos polímeros, previamente inmersa en nitrógeno líquido, se tritura con un molinillo provisto de guillotinas para obtener diferentes tamaños de partícula. Para separar los distintos tamaños de partículas se utilizan tamices con

diferentes tamaños de poro (300, 150 y 75  $\mu\text{m}$ ). El polvo que tenía un tamaño de partícula inferior a 300  $\mu\text{m}$  y superior a 150  $\mu\text{m}$  se denomina 300, mientras que las que tienen un tamaño de partícula superior a 75  $\mu\text{m}$  e inferior a 150  $\mu\text{m}$  se denominan 150. Finalmente las que tienen un tamaño inferior a 75  $\mu\text{m}$  se nombran como 75.

Con la adición de los distintos tamaños de partículas no ha sido posible mantener una misma relación sólido:líquido ya que al adicionar la fase líquida a la sólida ésta es rápidamente adsorbida por la fase sólida y no permite obtener un estado pastoso idóneo para un correcto mezclado. Así pues, las relaciones sólido:líquido elegidas para cada uno de los diferentes tamaños de partícula es distinta. Para un tamaño de 300  $\mu\text{m}$  se utiliza una relación sólido:líquido 2:1, mientras que para 150  $\mu\text{m}$  es 1,5:1 y finalmente para 75  $\mu\text{m}$  es 1:1.

La terminología utilizada en este caso es: **Ax'-X-Y**, siendo **A** el correspondiente polímero biodegradable TPS (almidón termoplástico), **x'** para diferenciar los dos tipos de TPS, 1 haría referencia al almidón Mater-Bi de Novamont y 2 a Biopar de Avebe. **X** corresponde al tamaño de partícula del biopolímero pudiendo ser 75, 150 o 300  $\mu\text{m}$ , e **Y** es la relación sólido:líquido, siempre referida a 1. Así por ejemplo, la formulación **TPS1-75-1** corresponde al cemento modificado con el almidón termoplástico Mater-Bi, cuyo tamaño de partícula es inferior a 75  $\mu\text{m}$ , aplicando la relación sólido:líquido de 1:1, respectivamente.

### **III.2.3. FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES MODIFICADAS CON BIOPOLÍMEROS DE ORIGEN ANIMAL**

Para este estudio se utiliza el colágeno hidrolizado bovino (HC) (COLNATUR®) gentilmente suministrado por Protein (Celrà, España). El formato que se utiliza es el producto comercial sin ningún tipo de tratamiento previo.

El colágeno, debido a la presencia de enlaces de hidrógeno y grupos polares en su estructura, es un material hidrofílico. Las formulaciones acrílicas están

compuestas mayoritariamente por PMMA, un material hidrofóbico. El hecho de querer encapsular el colágeno en una matriz polimérica, de tipo acrilato, para ser liberado posteriormente al medio, nos lleva a la utilización del poli(ácido metacrílico) (PMAA), ya que es un material hidrofílico y de origen acrilato. Primeramente se procede a la preparación, obtención y caracterización de las microesferas de PMAA y posteriormente a las microcápsulas de poli(ácido metacrílico) cargadas con colágeno hidrolizado en su interior (PMAA/HC).

### III.2.3.1. Preparación de las microesferas de poli(ácido metacrílico) PMAA

Las microesferas de poli(ácido metacrílico) (PMAA) se obtienen a través de polimerización en suspensión en fase inversa<sup>9</sup> del monómero de ácido metacrílico (MAA). Dicha polimerización se caracteriza por tener dos fases, la acuosa y la orgánica, siendo la fase dispersante la fase orgánica.

## REACTIVOS

**Fase acuosa.** Para la fase acuosa se utiliza el ácido metacrílico (MAA) (Aldrich) (Figura III.3) como monómero, purificado previamente por destilación a presión reducida, para eliminar el inhibidor monoetil éter de hidroquinona que evita la autopolimerización del MAA. El agente entrecruzante acrílico N,N'-metilen-bis-acrilamida (MBA) (Aldrich) (Figura III.3), el hidróxido sódico (NaOH) (Aldrich) para neutralizar el monómero y el peroxodisulfato potásico ( $K_2S_2O_8$ ) (Aldrich) como iniciador de polimerización, se emplean tal cual se reciben del proveedor.



Figura III.3. Componentes de la fase acuosa:  
ácido Metacrílico (MAA) (izda) y N,N'-metilen-bis-acrilamida (MBA) (dcha).

**Fase orgánica.** Como medio de dispersión o fase continua durante la reacción de polimerización se emplea tolueno (Scharlau). Como agente estabilizante de la dispersión se usa el SPAN<sup>TM</sup> 80 (Scharlau) (Figura III.4) (monooleato de sorbitán).

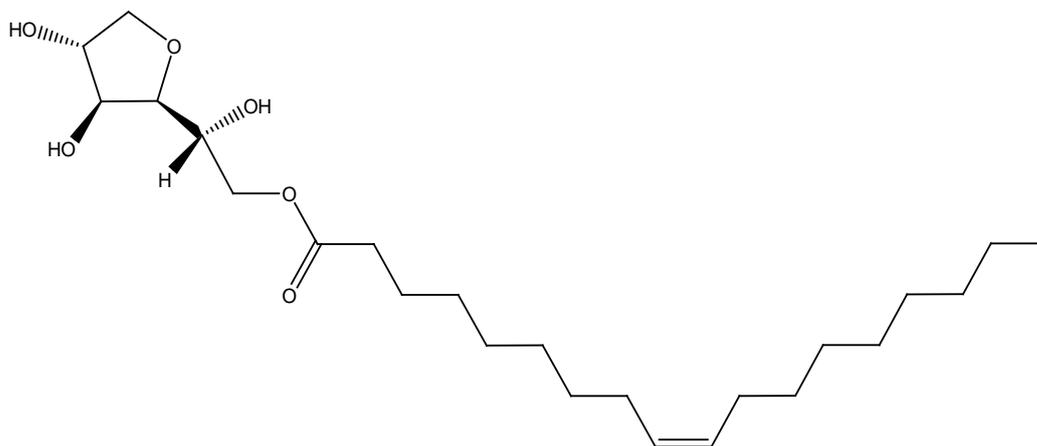


Figura III.4. Fórmula del SPAN<sup>TM</sup> 80.

## REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN EN SUSPENSIÓN EN FASE INVERSA

Para preparar la fase acuosa primeramente se neutralizan 0,2 moles del monómero MAA con una solución acuosa de hidróxido sódico (0,2 moles en 20 mL de agua destilada), la cual se añade gota a gota. Dicha neutralización se realiza en un baño de agua/hielo para contrarrestar la exotermia de la reacción que daría lugar a la autopolimerización del MAA durante la neutralización. La neutralización ofrece al monómero una mayor solubilidad en la fase acuosa para evitar el reparto líquido-líquido con la fase orgánica. Seguidamente, se añaden diferentes cantidades de MBA (10 y 15% p/p respecto la fase acuosa) junto con el iniciador de la reacción de polimerización el  $K_2S_2O_8$  (1% p/p respecto la fase acuosa). Finalmente, la solución obtenida se burbujea con nitrógeno, aproximadamente durante 15 minutos, antes de ser añadida a la fase orgánica.

La reacción de polimerización se lleva a cabo en un reactor encamisado, de 250 mL de capacidad, provisto de 3 bocas para realizar la adición de los reactivos. La reacción se estabiliza a cabo a 70 °C, bajo agitación mecánica (600

r.p.m) y condensando el disolvente evaporado. Primeramente, se añade la fase orgánica compuesta por el tolueno (150 mL) y el SPAN™ 80 (5,5%, p/v respecto dicha fase). Seguidamente, se burbujea con nitrógeno durante 20 minutos y después se adiciona, gota a gota, la fase acuosa preparada anteriormente. Se mantiene en agitación y a 70°C durante 4 horas. Una vez transcurrido este tiempo se prolonga la agitación 2 horas más a 80°C con la misma velocidad de agitación, para ayudar a consumir el monómero restante.

Finalmente, una vez acabado el proceso de polimerización, se obtiene una mezcla bifásica segregada tolueno-agua donde las microesferas se encuentran hinchadas y dispersas en el segregado acuoso. Seguidamente se procede al aislamiento de las microesferas de PMAA. Para ello se deja decantar la fase acuosa de la fase orgánica. Con la ayuda de una pipeta pasteur se elimina la fase orgánica (fase superior).

Para la extracción del agua del interior de las microesferas se añaden 200 mL de acetona, se agita durante 20 minutos, se deja reposar para decantar el sólido y se separa por filtración a presión reducida. Dicho proceso se repite 4 veces. Posteriormente, el sólido resultante se seca en una estufa a 100 °C (Selecta modelo S-205, España) hasta pesada constante.

### **III.2.3.2. Preparación de las microcápsulas PMAA/HC**

Las microcápsulas de poli(ácido metacrílico)/colágeno hidrolizado (PMAA/HC) se obtienen por hidratación de las microesferas de PMAA en una disolución acuosa de colágeno hidrolizado (HC).

Se preparan microcápsulas de PMAA/HC con un 10 y 25% p/p de colágeno hidrolizado respecto al peso de las microesferas de PMAA. Para ello se disuelven 2 y 5 g de colágeno hidrolizado en 200 mL de agua destilada y se añaden 20 g de microesferas de PMAA. Gracias al carácter hidrofílico y entrecruzado del PMAA éstas se hinchan rápidamente en la solución de colágeno hidrolizado, absorbiendo así dicha solución. Seguidamente las microcápsulas cargadas con

colágeno hidrolizado se liofilizan en un liofilizador de laboratorio (Virtis, New York) para eliminar su contenido en agua. Primeramente las muestras se depositan en bandejas y se congelan a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Seguidamente se procede a la liofilización de las muestras. Durante el proceso, de liofilización, se lleva a cabo una desecación primaria sometiendo las muestras a 300 mT de vacío, a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 48 horas. A continuación se procede a la desecación secundaria sometiendo las muestras a 300 mT de vacío y  $+15^{\circ}\text{C}$  durante 8h.

### **III.2.3.3. Caracterización de las microesferas y microcápsulas**

Una vez obtenidas las distintas tipologías de microesferas se procede a su caracterización. Para facilitar el seguimiento de las distintas microesferas y microcápsulas que se preparan, la nomenclatura que se utiliza es la siguiente:

Las microesferas de PMAA obtenidas con un 10 y un 15% de agente entrecruzante MBA se denominan M10 y M15, respectivamente. Posteriormente, se preparan las microcápsulas de PMAA/HC. Para ello se preparan dos disoluciones acuosas al 10 y al 25% p/p de colágeno hidrolizado respecto al peso de las microesferas M10 y M15. De este modo se obtienen las microcápsulas M10-10, M10-25, M15-10 y M15-25. Los dos primeros dígitos (10 y 15) hacen referencia al contenido en agente entrecruzante, y los dos siguientes dígitos (10 y 25) al contenido en colágeno hidrolizado.

#### **III.2.3.3.1. *Morfología y distribución de los tamaños de las microesferas***

La morfología superficial de las microesferas de PMAA y PMMA/HC se caracteriza por microscopía electrónica de barrido (SEM). Las microesferas se metalizan con oro y se observan a distintos grados de magnificación a través de un microscopio electrónico de barrido ZEISS modelo DMS 960.

Mediante la técnica de dispersión de luz láser se evalúa la distribución de tamaños de partícula. Esta caracterización se realiza en un equipo Beckman Coulter LS320 el cual detecta las partículas dispersas en un fluido de densidad

conocida y cuantifica su diámetro medio<sup>10</sup>. La determinación del tamaño de partícula se basa en la medida de la difracción de un haz de luz láser con longitud de onda de 750 nm. El equipo consta de 126 detectores de fotiododo que le permiten medir partículas con un diámetro entre 50 y 2000  $\mu\text{m}$ . Un sistema detector adicional basado en la tecnología multifrecuencia PIDS (Polarization Intensity Differential Scattering) permite bajar el límite de detección a 0,04  $\mu\text{m}$ . De este modo el rango completo de detección del equipo es de 0,04 a 2000  $\mu\text{m}$ .

Existen numerosos modelos ópticos para tratar los datos de difracción. El modelo de Fraunhofer es el más adecuado para materiales opacos, que producen poca difracción de luz o con un modelo inespecífico<sup>11</sup>. Sin embargo es posible aplicar un método más específico basado en teorías de difracción de Mie que tenga en cuenta todas las propiedades específicas de cada material<sup>12</sup> (índice de refracción, etc). Las diferencias encontradas en la determinación del tamaño medio de partícula, según ambos métodos se hacen significativas para aquellas partículas con diámetros inferiores a 10  $\mu\text{m}$ <sup>13</sup>.

Para la medida del diámetro medio se dispersan 10 mg de las microesferas, M10 y M15, en acetona agitando durante 10 min. La medida se realiza por triplicado. El valor estadístico del tamaño de partícula (%volumen) viene determinado por la ecuación Ec. III.1,

$$\overline{D_{vol}} = \sum_i \frac{n_i D_i^3}{\sum_j n_j D_j^3} D_i \quad \text{Ec. III.1}$$

donde  $\overline{D_{vol}}$  indica el diámetro medio en volumen i  $n_i$  es el número de partículas de diámetro  $D_i$ .

### **III.2.3.3.2. Estructura química**

El colágeno hidrolizado, las microesferas de PMAA y las microcápsulas PMAA-HC, se caracterizan por espectroscopia infrarrojo de Transformada de Fourier (FT-IR) con el fin de determinar las bandas características de vibración de

los distintos enlaces. Para ello se preparan pastillas de bromuro potásico (KBr) cargadas con un 2-3% de la muestra a analizar. Para este fin, se ha utilizado el espectrofotómetro (FT-IR) Matson modelo Satellite, el cual ha permitido observar las bandas de vibración características de los distintos materiales desde 500 hasta 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

### **III.2.3.3.3. Propiedades térmicas**

#### **Análisis termogravimétrico (TGA)**

Se evalúa la estabilidad térmica de las distintas microesferas mediante análisis termogravimétrico (TGA) en un TGA/DTA 851e de Mettler-Toledo (Suiza) conectado a un sistema de análisis de datos térmicos (Star-e). En una cápsula de alúmina, previamente tarada, se pesan 8-10 mg de muestra y se someten a una rampa de calentamiento desde 50 hasta 650°C, a una velocidad constante de 10°C·min<sup>-1</sup>, en una atmósfera inerte de nitrógeno con un caudal de 40 mL·min<sup>-1</sup>. La temperatura de degradación térmica se toma como el punto máximo de la primera derivada correspondiente a la pérdida de peso ( $T_{d,máx}$ ).

#### **Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

El efecto del agente entrecruzante se evalúa por calorimetría diferencial de barrido (DSC) con un equipo de Mettler-Toledo (Suiza) modelo 822<sup>e</sup>, conectado a un ordenador provisto de un software, Star-e, que permite el análisis de los datos térmicos obtenidos. En una cápsula de aluminio se pesan 10 mg de muestra y se someten a una rampa de calentamiento constante de 10°C·min<sup>-1</sup> desde 25 hasta 200°C, con un caudal constante de nitrógeno de 40 mL·min<sup>-1</sup>, para proporcionar una atmósfera inerte. La temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) se toma como el punto medio de la transición de la capacidad calorífica observada en el termograma correspondiente al segundo barrido.

#### **III.2.3.4. Preparación de las formulaciones acrílicas autocurables modificadas con colágeno**

Nuevamente se modifica la fase sólida de la formulaciones acrílicas autocurables. Primeramente, se sustituye parte del PMMA por las distintas microesferas o microcápsulas en una proporción 1/1. En el primer caso se obtienen las formulaciones FM10, FM15, que corresponden a los cementos modificados con microesferas de PMAA formuladas con un 10 y un 15% de agente entrecruzante MBA. En el segundo caso se obtienen las formulaciones FM10-10, FM10-25, FM15-10 y FM15-25 que corresponden a las formulaciones obtenidas con las microcápsulas cargadas con colágeno, ya descritas en el apartado III.2.3.3.

En las formulaciones descritas existen cuatro formulaciones que contienen colágeno en su composición, hecho que da lugar a la necesidad de formular los correspondientes controles para poder evaluar mejor sus propiedades. En este caso, se preparan dos formulaciones en las que únicamente se sustituye parte de la fase sólida por colágeno hidrolizado, sin añadir ni microesferas de PMAA ni microcápsulas de PMAA/HC. Se añaden las cantidades de 5 y 12,5% p/p de la fase sólida de colágeno hidrolizado, respecto a la fase sólida, siendo estas las mismas cantidades de colágeno que presentan las fases sólidas de las formulaciones FM10-10 y, FM10-25, respectivamente. Estas nuevas formulaciones control se denominan FC10 y FC25, donde sus fases sólidas están modificadas con un 5 y un 12,5% de colágeno hidrolizado, respectivamente. En las figuras, Figura III.5 y Figura III.6, se presenta a modo de resumen las cantidades utilizadas para preparar las distintas formulaciones, así como el contenido de cada uno de sus componentes respecto la fase sólida.

La relación sólido:líquido utilizada en este caso ha sido 1:1, ya que una mayor relación sólido:líquido no permitía un correcto mezclado de las fases. Con las distintas formulaciones acrílicas se prepararon los diferentes tipos de probetas necesarios para su posterior caracterización.

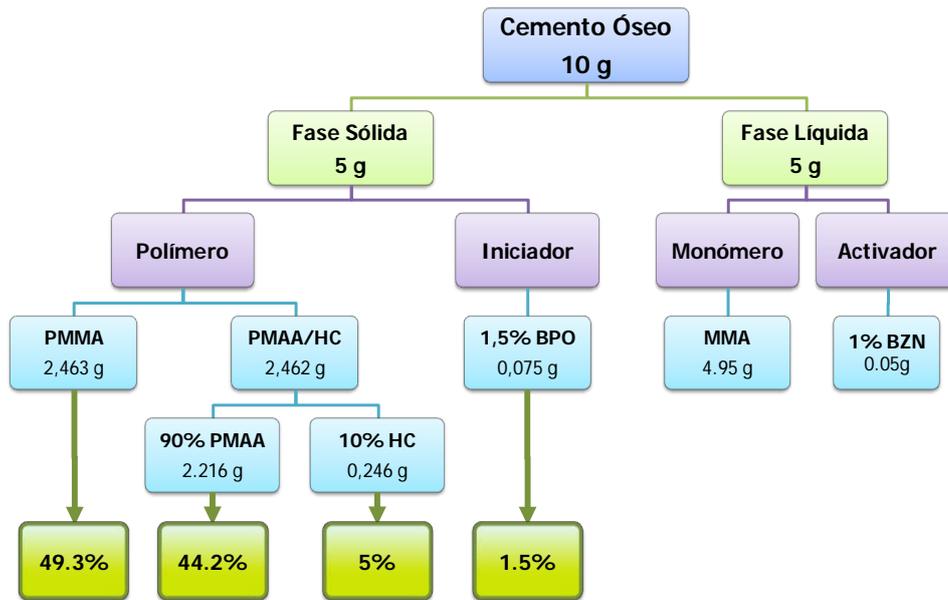


Figura III.5. Representación del contenido de un cemento óseo modificado con un 5% de colágeno hidrolizado en la fase sólida.

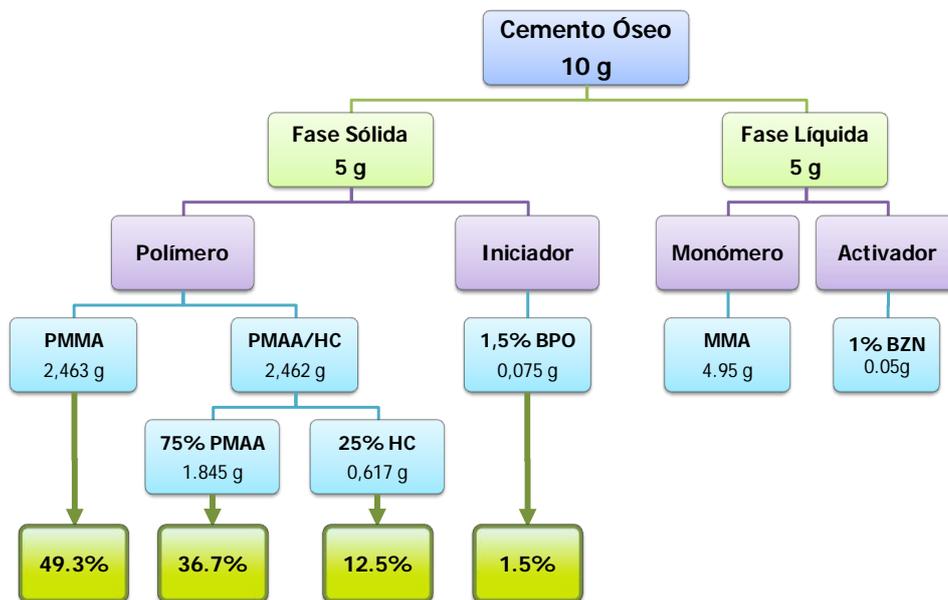


Figura III.6. Representación del contenido de un cemento óseo modificado con un 12,5% de colágeno hidrolizado en la fase sólida.

### **III.3. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES**

Las distintas formulaciones acrílicas autocurables preparadas con los distintos polímeros biodegradables y los distintos biopolímeros, vegetales y animales, se han caracterizado con el fin de evaluar sus propiedades y características.

#### **III.3.1. PARÁMETROS DE CURADO**

Para la evaluación de los parámetros de curado se utiliza un equipo Testo Datalogger 175-177, conectado a un ordenador provisto del software Testocomfort que registra la variación de la temperatura durante el tiempo de reacción de polimerización de la formulación acrílica. Una vez que la masa adquiere una consistencia pastosa, caracterizada por su no adherencia al guante de látex, se introduce en un molde cilíndrico, termostatzado a 25°C, de 10 mm de diámetro y 15 mm de altura, como el que se muestra en la Figura III.7.

Las dimensiones de este molde difieren de las del molde descrito en la norma ISO-5833<sup>14</sup>, recomendado para la medición de los parámetros de curado. Las ventajas de este molde son que la cantidad de muestra necesaria para obtener los datos requeridos es mucho menor y que el molde está dotado de una camisa que se puede termostatzar a la temperatura de interés. Además, el tamaño y la forma del molde como el descrito en la citada norma se analizaron a través de experimentos paralelos y la desviación de la temperatura por ambos métodos fue menor a 2°C.

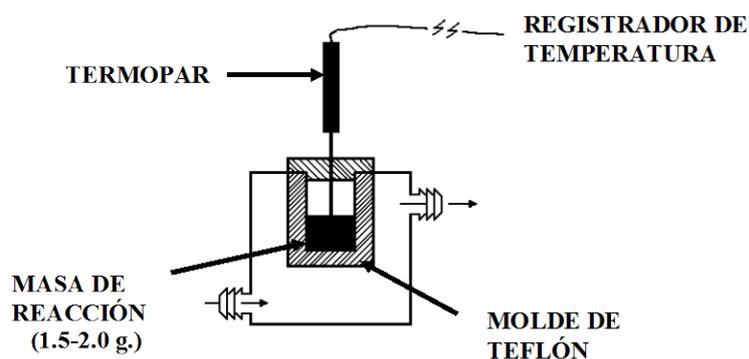


Figura III.7. Molde de teflón para el estudio de los parámetros de curado.

La evolución de la temperatura de curado se registra a través de un termopar, introducido en el centro del molde, a una altura de 3 mm del fondo del mismo y conectado al *datalogger* desde el inicio del mezclado de las fases. Se efectúa la adquisición de datos de temperatura con el tiempo, hasta que nuevamente se alcanza la temperatura ambiente, después de registrarse la temperatura máxima de curado.

Con los datos de la variación de la temperatura con el tiempo se representan los perfiles temperatura-tiempo de curado como los que se muestran en la Figura III.8 y con los que se determinan el tiempo de fraguado ( $t_{\text{fraguado}}$ ) y la temperatura máxima ( $T_{\text{máx}}$ ) alcanzada en el curado de los distintos cementos.

Los parámetros que controlan la reacción de curado son:

- Tiempo máximo para la obtención del estado pastoso (min).
- Intervalo de tiempo de fraguado (min).
- Temperatura máxima (°C).

Los valores de estos parámetros se recogen en la norma ISO-5833<sup>14</sup>. El valor del tiempo máximo para el estado pastoso admitido por la norma es de 5 min, el intervalo de tiempo de fraguado permitido se encuentra entre 5 y 10 min, y el valor máximo de temperatura admitido es 90°C.

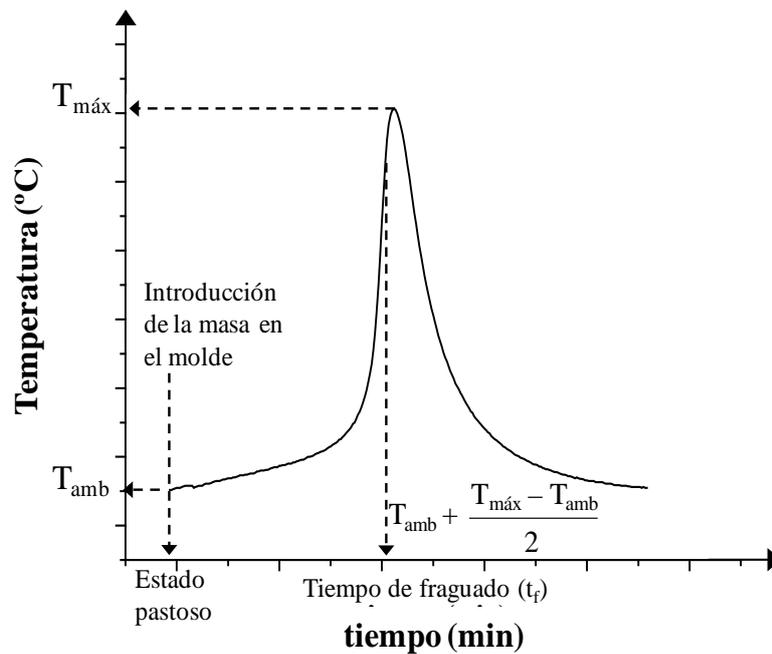


Figura III.8. Variación de la temperatura durante el fraguado de los cementos óseos acrílicos.

### III.3.2. DETERMINACIÓN DEL MONÓMERO RESIDUAL

El monómero residual es aquel que queda sin reaccionar después del proceso de polimerización (curado). El contenido en monómero residual (CMR) se evalúa utilizando dos metodologías, resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y cromatografía de gases (GC). Para su estudio se toman muestras de las distintas formulaciones acrílicas autocurables modificadas con polímeros biodegradables.

**$^1\text{H}$ -RMN.** Primeramente las muestras de las distintas formulaciones se dejan en contacto con la atmósfera, a temperatura ambiente, durante una semana. Transcurrido ése tiempo se pesan unos 10 mg de muestra, se disuelven en 1 mL de cloroformo deuterado y se filtran para poder evaluar la disolución resultante a través de  $^1\text{H}$ -RMN. El equipo utilizado para este fin es un espectrómetro Ultrashield DPX300 de Bruker (Alemania). El espectro genérico que se obtiene se muestra en la Figura III.9.

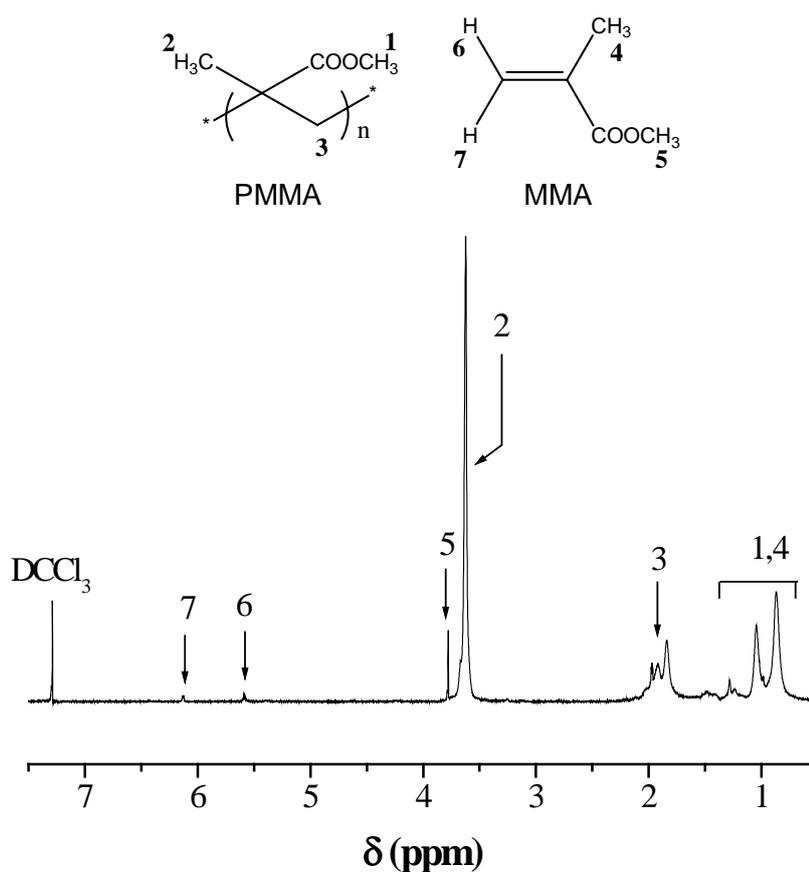


Figura III.9. Espectro  $^1H$ -RMN de la fracción soluble en cloroformo de la formulación acrílica.

Una vez obtenido el espectro de  $^1H$ -RMN se integran las señales correspondientes a las áreas de los protones de los grupos metoxilo del PMMA (A1) y del MMA (A2) que aparecen a valores de desplazamiento químico ( $\delta$ ) entre 3,40-3,60 y 3,70-3,80, respectivamente. El CMR se calcula según la siguiente Ec. III.2.

$$CMR = \frac{A2}{A1 + A2} \cdot 100 \quad \text{Ec. III.2}$$

**GC.** La determinación del CMR, de cada formulación, se ha realizado en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 Series II con detector de ionización en llama. Para ello se ha tomado 0,5 g de muestra y se han disuelto en 25 mL de acetona. Se han dejado 24 h refrigeradas entre 5-6°C y se les ha añadido 25 mL

de agua, produciéndose la precipitación del PMMA. Se ha inyectado una alícuota de 4  $\mu\text{l}$  del sobrenadante. Se evalúa el CMR a partir de una recta de calibrado. Cada formulación se ha realizado por triplicado.

### III.3.3. PROPIEDADES MECÁNICAS

Para obtener las propiedades mecánicas bajo esfuerzos a compresión y tracción se ensayan las correspondientes probetas mostradas en la Figura III.10 y Figura III.11, respectivamente. Éstas se obtienen en un molde de teflón diseñado para que pueda cumplir con las especificaciones de la norma ISO-5833<sup>14</sup> e ISO-527-1<sup>15</sup>, respectivamente. De cada formulación se ensayan un mínimo de cinco probetas para obtener un valor promedio y su correspondiente desviación estándar.

**Ensayo de compresión.** Se utilizan probetas cilíndricas, con un diámetro de 6 mm y altura 12 mm, obtenidas en un molde de teflón, tal y como se muestra en la Figura III.10, según las especificaciones de la norma ISO-5833<sup>14</sup>. Para ello se mezclan las dos fases y cuando la mezcla alcanza el estado pastoso se llena el molde, se presiona por ambas caras con dos superficies lisas de teflón y se introduce en una estufa a 37°C durante una hora. Transcurrido este tiempo se desmoldan, se desechan las probetas que contengan burbujas de aire y se rectifican las bases de las probetas con papel abrasivo del número 2, ya que para poder ser ensayadas las bases de las probetas deben ser planas y paralelas entre sí y a su vez formar un ángulo recto con su eje longitudinal.

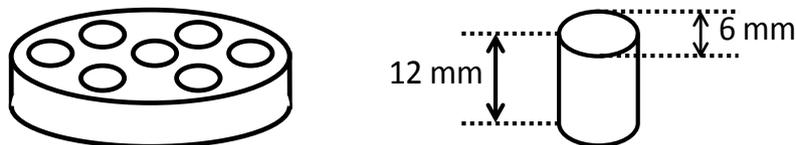


Figura III.10. Molde y probeta de ensayo mecánico de compresión.

Las probetas obtenidas con los materiales termoplásticos descritas en los apartados III.2.1 y III.2.2 se han ensayado en una máquina universal de ensayos MTS Bionix 858 (MTS, USA), diseñada para trabajar con biomateriales.

Por otro lado, las probetas obtenidas con los materiales de PMAA descritas en el apartado III.2.3 se han ensayado en una máquina universal de ensayos IDM-test DTC-10 de doble columna (IDM, Guipúzcoa, España).

**MTS Bionix 858.** Las probetas se ensayan en el equipo con una célula de carga de 25 kN con una deformación máxima aplicada de un 30% de la longitud total de la probeta a un velocidad de ensayo de  $20 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$  y a temperatura ambiente ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ). El equipo se controla por medio de la conexión a un ordenador equipado con un paquete de software TestStar-II.

**IDM DTC-10.** Las probetas se ensayan en el equipo con las siguientes condiciones: célula de carga 5 kN, deformación máxima aplicada de un 30% de la longitud total de la probeta y con un velocidad de ensayo de  $20 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$  y a temperatura ambiente ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ). El equipo se controla por medio de la conexión a un ordenador equipado con un paquete de software Registra-III.

Las formulaciones, según cada caso, se experimentan en seco, pasados 15 días y/o 4 meses, en ensayos independientes, de tiempo de inmersión en condiciones fisiológicas. ( $37^\circ\text{C}$  de temperatura y pH 7.4).

La resistencia a compresión ( $\sigma_c$ ) expresada en unidades de MPa, se calcula según la siguiente ecuación (Ec. III.3) donde  $F$  es la fuerza máxima aplicada, en Newtons y  $d$  es el diámetro de la muestra, en milímetros.

$$\sigma_c = \frac{4 F}{\pi d^2} \quad \text{Ec. III.3}$$

**Ensayo de tracción.** Para este ensayo solo se analizan las probetas que contienen polímeros biodegradables en su formulación acrílica (III.2.1 y III.2.2). Para ello se adiciona la fase líquida a la sólida y se mezclan ambas fases hasta el

estado pastoso, seguidamente se introduce la mezcla resultante dentro del molde, se presiona con unas tapas de teflón y se deja curar dentro de una estufa de aire a 37°C durante una hora. Transcurrido este tiempo se desmoldan las probetas, se desechan las que contiene huecos de aire o irregularidades y el resto se pulen con papel abrasivo del número 2.

Las probetas preparadas para este ensayo son con forma de alterio según las especificaciones de la norma ISO-527-1<sup>15</sup>, tal y como se muestra en la Figura III.11.

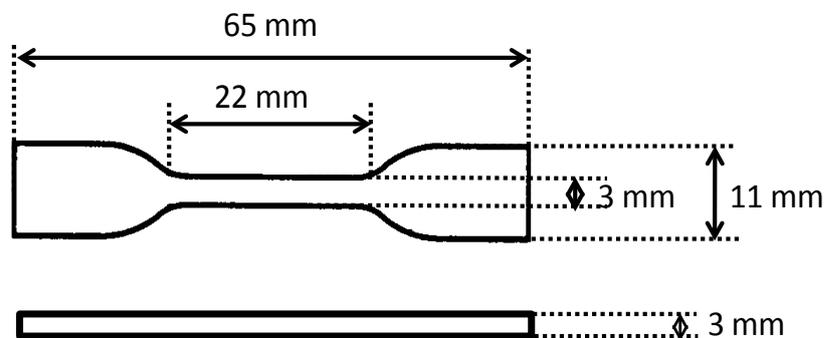


Figura III.11. Probeta para ensayo mecánico de tracción.

Las probetas se ensayan en la máquina de ensayos Universales Instron 1122 (Instron, España) con las siguientes condiciones: célula de carga 5 kN, velocidad de ensayo 1 mm·min<sup>-1</sup>, aplicación del esfuerzo de tracción hasta rotura y a temperatura ambiente (23±1°C). Se ensayan un mínimo de cinco probetas en seco.

La resistencia a la tracción ( $\sigma_t$ ) en MPa, se calcula a partir de la ecuación siguiente:

$$\sigma_t = \frac{F}{b h} \quad \text{Ec. III.4}$$

donde  $F$  es la fuerza máxima en Newtons ejercida sobre la muestra;  $b$  y  $h$  son el ancho y la altura de la muestra, en milímetros, medidos antes del ensayo en el cuello de la probeta.

**Test estadístico de significancia ANOVA:** El análisis estadístico de los resultados de propiedades mecánicas se lleva a cabo por análisis estadístico de la varianza (ANOVA). En todos los análisis estadísticos se considera  $p > 0,05$  como estadísticamente significativo.

### III.3.4. COMPORTAMIENTO *IN VITRO*

Se evalúa el comportamiento *in vitro* de los materiales sumergiendo las probetas con forma de disco (15 mm de diámetro y 1 mm de espesor) en la solución tampón fosfato, PBS, a pH 7,4 y 0,1M de fuerza iónica.

Con el fin de determinar el grado de hidratación ( $H_{hid}$ ) (Ec. III.5) se sumergen, previamente secados a 50°C hasta peso constante ( $M_i$ ) los discos en el medio tamponado a 7,4 y se incuban a 37°C durante un periodo determinado. Transcurrido el determinado tiempo de inmersión se seca la superficie de cada uno de los discos, cuidadosamente con un papel de filtro, y se pesa ( $M_t$ ). Seguidamente se coloca el disco en una estufa a 50°C hasta pesada constante ( $M_f$ ) calculando del mismo modo la posible pérdida de peso ( $P_p$ ) según la ecuación Ec. III.6.

$$H_{hid} = \frac{M_t - M_f}{M_f} \cdot 100 \quad \text{Ec. III.5}$$

$$P_p = \frac{M_i - M_f}{M_f} \cdot 100 \quad \text{Ec. III.6}$$

### III.3.5. ANÁLISI TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

Se evalúa la estabilidad térmica de las distintas formulaciones acrílicas modificadas con polímeros biodegradables mediante TGA en un equipo TGA/DTA 851e (Metler-Toledo, España). Para ello se pesan 8 mg de muestra, se introducen dentro de una cápsula de alúmina y se calientan desde 50 hasta 650°C con una velocidad de  $10^{\circ} \cdot \text{min}^{-1}$ , en una atmosfera inerte de nitrógeno con un caudal de 40

mL·min<sup>-1</sup>. A partir de la normalización del termograma obtenido y el correspondiente cálculo de su derivada se determinan la temperatura inicial de degradación ( $T_{d,i}$ ) y la temperatura máxima de degradación ( $T_{máx}$ ).

### III.3.6. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Mediante DSC se realizan dos tipos de ensayos: DSC-dinámico y DSC-isotérmico.

**DSC-Dinámico.** El experimento de DSC-dinámico permite la determinación de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), temperatura de fusión ( $T_f$ ) y entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ) de las distintas formulaciones, así como también de los distintos polímeros biodegradables vírgenes. Los distintos parámetros se evalúan en un DSC-30 de Mettler-Toledo (España). Se pesan 10 mg de muestra y se colocan en una cápsula de aluminio. Se realizan dos calentamientos de las muestras. Primeramente se calienta la muestra de 50 hasta 150°C a una velocidad de calentamiento de 10°·min<sup>-1</sup>, para borrar la historia térmica del material. Seguidamente se enfría la muestra y finalmente se vuelve a calentar la muestra hasta 135°C a la misma velocidad. En todos los ensayos el calentamiento se efectúa en atmosfera inerte de nitrógeno (40 mL·min<sup>-1</sup>).

**DSC-Isotermo.** La técnica de DSC-Isotérmico permite evaluar el calor intercambiado durante los procesos de curado. Se prepara una masa de 5 g de cemento óseo mediante el mezclado de la fase sólida y la fase líquida y una vez obtenida una mezcla homogénea se introduce una alícuota de 10 mg de muestra en una cápsula de aluminio en un equipo DSC-822<sup>e</sup> de Mettler-Toledo (España). Se realiza el barrido isotérmico a 25°C y se registra el correspondiente termograma. A partir del termograma se calculan los siguientes parámetros: la entalpía de curado ( $\Delta H_c$ ), como el área que queda debajo de la curva, el tiempo inicial ( $t_i$ ), el tiempo de máximo flujo de calor ( $t_p$ ) y el tiempo final de curado ( $t_f$ ), registrados como el punto en el que hay un cambio de flujo de calor vs tiempo. La Figura III.12 muestra el termograma genérico en el que se pueden observar los distintos parámetros.

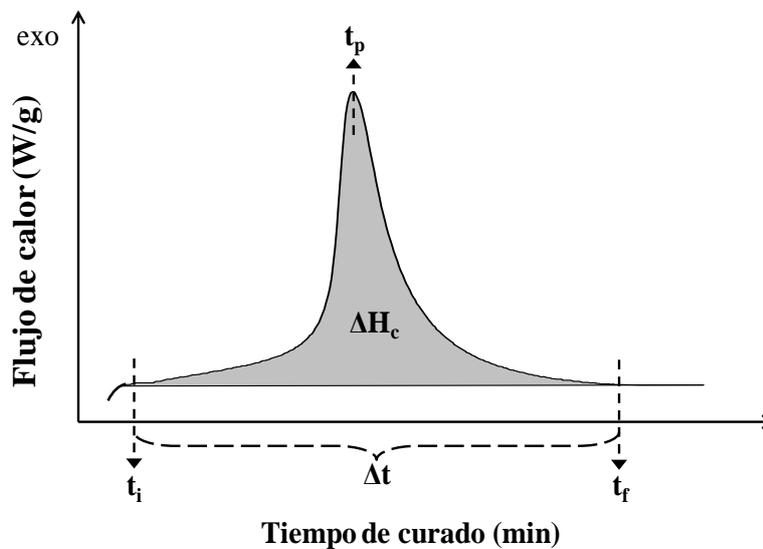


Figura III.12. Termograma DSC-isotérmico a 25°C.

### III.3.7. ANÁLISIS TÉRMICO DINAMOMECÁNICO (DMTA)

A partir del análisis térmico dinamomecánico (DMTA) se evalúa la temperatura de transición vítrea en DMTA ( $T_g^{DMTA}$ ), y el módulo de almacenamiento ( $E'$ ) en un DMA/SDTA 861<sup>e</sup> (Mettler-Toledo, España). Las probetas, con las dimensiones 44 x 13 x 3 mm se ensayan en el modo *Dual Cantilever* (Figura III.13) con una fuerza de  $\pm 1$  N, un desplazamiento vertical de 30  $\mu\text{m}$ , una frecuencia constante de 1 Hz y una distancia constante entre mordazas de 42 mm. Primeramente, las muestras de cemento se calientan desde 25 a 140°C a una velocidad de 3<sup>o</sup>.min<sup>-1</sup> bajo atmosfera de nitrógeno a 80 mL.min<sup>-1</sup>, se enfrían hasta temperatura ambiente y se vuelven a calentar hasta 140°C a la misma velocidad de calentamiento.

El DMTA es una técnica de caracterización de materiales poliméricos o con cierto carácter viscoelástico. Generalmente, el DMTA es más sensible que el DSC para determinar la  $T_g$ , sobre todo en materiales donde la capacidad calorífica es pequeña.

El método de DMTA consiste en medir la respuesta del material ante la imposición de una pequeña deformación cíclica a una frecuencia determinada en

un rango de temperaturas. Debido al comportamiento viscoelástico de los polímeros, la tensión sinusoidal de respuesta presenta un desfase  $\delta$  respecto de la deformación sinusoidal aplicada. Los valores límites de  $\delta$  son  $0^\circ$  (comportamiento puramente elástico) y  $90^\circ$  (comportamiento puramente viscoso). A partir de éste desfase se puede definir un comportamiento elástico mediante el módulo de almacenamiento ( $E'$ ) y un comportamiento viscoso mediante el módulo de pérdida ( $E''$ ), relacionados mediante el desfase  $\tan\delta$  que es el cociente entre  $E''$  y  $E'$ .

El DMTA permite detectar de manera precisa e inequívoca relajaciones estructurales de materiales poliméricos tales como la transición vítrea (también llamada relajación  $\alpha$ ), que aparece como un máximo en la representación de  $\tan\delta$  en función de la temperatura. También pueden determinarse relajaciones de los materiales a temperaturas inferiores a  $T_g$ , llamadas relajaciones  $\beta$ , y/o  $\gamma$ .

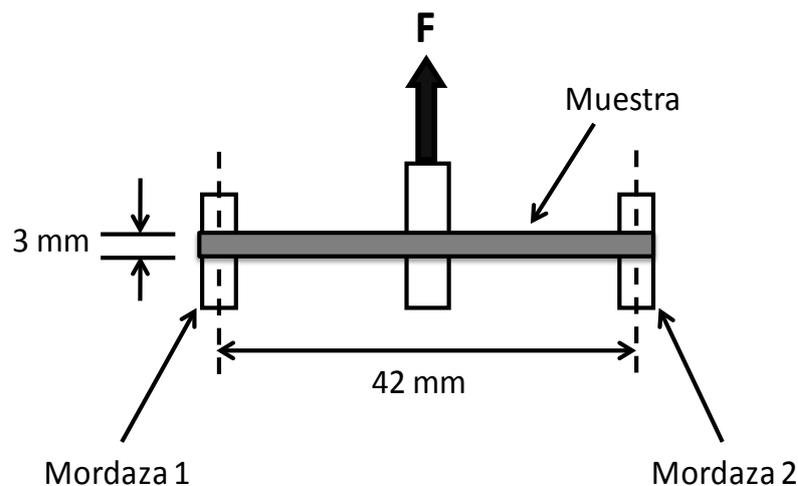


Figura III.13. Medidas de la probeta ensayada en DMTA.

### III.3.8. LIBERACIÓN CONTROLADA DE ESPECIES ACTIVAS

Para el ensayo de liberación controlada de especies activas se preparan muestras rectangulares de 30 x 10 x 1 mm como la que se observa en la Figura III.14.

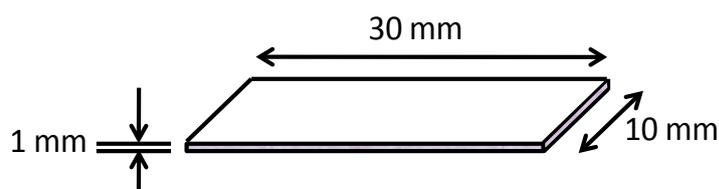


Figura III.14. Probeta utilizada para la liberación de fármacos

Se realizan dos tipos de liberación. Para el primero se utilizan las formulaciones acrílicas modificadas con los almidones, obtenidas en el apartado III.2.2, cargadas con ibandronato, y para el segundo se evalúa la liberación del colágeno hidrolizado de las formulaciones obtenidas en el apartado III.2.3.

En ambos casos se sumergen las probetas en un volumen conocido de solución tampón fosfato a pH 7,4 y se incuban a 37°C. El medio de liberación se cambia por tampón fresco a determinados tiempos y el medio sustituido se estudia por espectroscopía de ultravioleta visible en un equipo SCHIMADZU UV-160 a una determinada longitud de onda máxima de absorción. La concentración del fármaco se evalúa aplicando la Ley de *Lambert-Beer* ( $A=\varepsilon \cdot l \cdot C$ , siendo  $A$  la absorbancia de la disolución del compuesto,  $\varepsilon$  el coeficiente de extinción molar,  $l$  el camino óptico (1 cm) y  $C$  la concentración). Utilizando la recta de calibrado, previamente obtenida, se determina la absorbancia de disoluciones de concentración desconocida del compuesto. El ensayo se realiza por triplicado obteniéndose un valor promedio y la correspondiente desviación estándar.

#### III.3.8.1. Liberación de ibandronato

Para este ensayo se utilizan las formulaciones acrílicas autocurables modificadas con los almidones termoplásticos (TPS1 y TPS2). Se prepara una masa de 4 g cargada con un 33% de TPS. Parte del peso de PMMA se sustituye por el peso de la cápsula comercial del fármaco (450 mg), que contiene 150 mg de ibandronato como componente activo (Figura III.15). Una vez obtenidas las probetas cargadas con el ibandronato se sumergen en 10 mL de una solución tampón fosfato a pH 7,4 y se dejan a 37°C. A cada determinado tiempo se va

cambiando el medio de liberación y se determina la concentración de ibandronato por espectroscopía de ultravioleta visible a una longitud de onda de 208 nm.

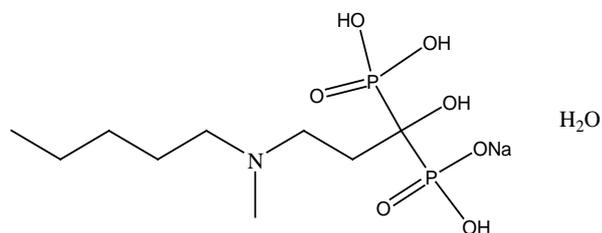


Figura III.15. Estructura del ibandronato sódico.

La recta de calibrado obtenida a 208 nm para el caso del ibandronato es la que se muestra en la Figura III.16.

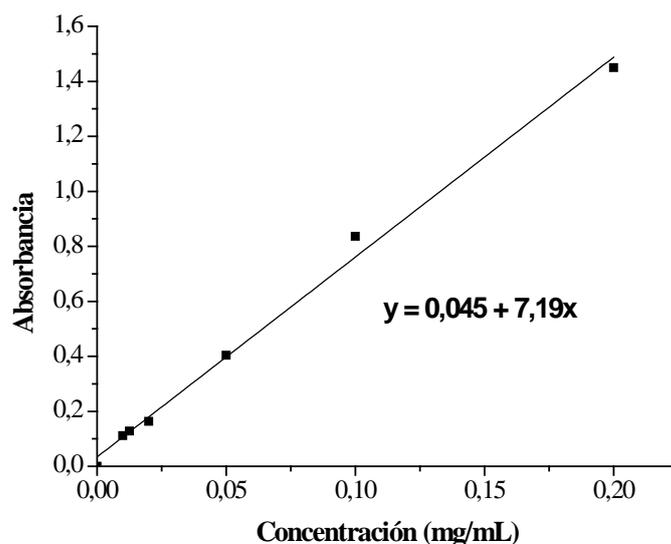


Figura III.16. Recta de calibrado para el ibandronato obtenida a 208 nm ( $r = 0,996$ )

### III.3.8.2. Liberación de colágeno hidrolizado

Las muestras que contienen el colágeno hidrolizado se sumergen en 15 mL de tampón fosfato a pH 7,4 y se estabilizan a 37°C. A cada determinado tiempo las probetas se introducen en nuevos viales con 15 mL de tampón fosfato nuevo.

El medio de liberación recogido se caracteriza mediante espectroscopía ultravioleta a una longitud de onda de 205 nm con el fin de determinar la concentración de colágeno hidrolizado liberado. La correspondiente recta de calibrado se muestra en la Figura III.17.

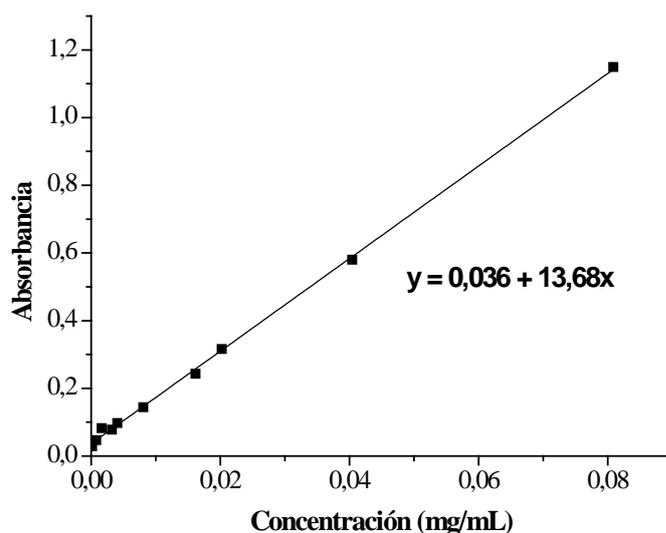


Figura III.17. Recta de calibrado para el colágeno a 205 nm ( $r = 0,999$ )

#### III.4. CARACTERIZACIÓN DE LA SUPERFICIE DE LOS MATERIALES

La microscopía electrónica de barrido (SEM) permite la observación de la superficie del material. Para ello las muestras se recubren con una fina capa de oro para conseguir conductividad. Posteriormente los materiales se observan a diferentes grados de magnificación en un microscopio ZEISS modelo DMS 960.

#### III.5. SOLUCIÓN TAMPÓN FOSFATO

Para simular las condiciones fisiológicas, en los distintos ensayos en que ha sido necesario, se prepara una solución de tampón fosfato a pH 7,4 y una fuerza iónica 0,1 M. Para obtener dicha solución amortiguada, se utilizan dos

sales de fosfato (1) dihidrógeno fosfato de sodio dihidratado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) (Scharlau) y (2) hidrógeno fosfato de sodio dodecahidratado ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ) (Scharlau). Para preparar 1 L de disolución de fuerza iónica 0,1 M se pesan 3,74 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 45,11 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  y se disuelven en dicho volumen.

### **III.6. ESTUDIOS DE BIOCOPATIBILIDAD *IN VITRO* DE LAS FORMULACIONES ACRÍLICAS MODIFICADAS CON COLÁGENO**

El análisis de la biocompatibilidad *in vitro* de las formulaciones acrílicas modificadas con colágeno hidrolizado consiste en la evaluación de la toxicidad de los propios polímeros, debido a la posible liberación de componentes tóxicos que puedan afectar cuantitativa o cualitativamente al cultivo celular.

Para este ensayo se preparan muestras, de las distintas formulaciones acrílicas autocurables modificadas con colágeno hidrolizado junto con la formulación control de PMMA. Las probetas para este ensayo son redondas cuya medida es 12 mm de diámetro y 1 mm de espesor, que se corresponde con las dimensiones de los pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos, utilizada como soporte en los diversos estudios de biocompatibilidad.

En estos ensayos, como control negativo se emplean discos de 13 mm de diámetro Thermanox<sup>®</sup> (TMX) (Labclinics) y como control positivo una disolución acuosa al 0,5% de tritón x-100 (Aldrich). Al mismo tiempo como cultivo de células adherentes se usa un cultivo primario de osteoblastos fetales humanos (HOb); (*Health Protection Agency Culture Collections*) (Figura III.18). Los HOb han sido cultivados en la Unidad de Investigación Clínica y Biopatología Experimental asociada al CSIC con sede en el Hospital Provincial de Ávila, y cuyo mantenimiento y multiplicación se realiza empleando el medio cultivo *Dubelco's Modified Eagle's Medium*, con una mezcla de nutrientes F-12 (DME/F12 1:1) modificado con HEPES [ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazino etanosulfónico]

(Sigma) y complementado con: un 10% de suero fetal bovino (FSB, Gibco), 200 mM de L-glutamina (Sigma), 100 U/ml de penicilina (Sigma) y 100 µg/ml de estreptomicina (Sigma).

Los cultivos de HOb se mantienen y multiplican a 37°C en una atmósfera con un 5% de dióxido de carbono sobre frascos de cultivo de 25, 75 y 175 cm<sup>3</sup> suministrados al igual que el restante material plástico por Sarstedt. El medio de cultivo se va cambiando cada 2 días con extremo cuidado con el fin de evitar las mínimas distorsiones en el medio de cultivo. Todos los materiales usados se esterilizan, previo a su estudio, con óxido de etileno.



*Figura III.18. Cultivo de HOb transcurridas 48 h después de ser sembradas. (Microscopía de contraste de fase. Nikon ECLIPSE TS100; 200X).*

**Test estadístico de significancia ANOVA:** El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio de la biocompatibilidad *in vitro* de las formulaciones acrílicas modificadas con colágeno hidrolizado se lleva a cabo por un análisis de la varianza (ANOVA).

### III.6.1. LIBERACIÓN DE COMPONENTES, ENSAYO MTT

El ensayo MTT<sup>16,17,18</sup> se emplea frecuentemente en la evaluación de la toxicidad del material derivada de la liberación de algún tipo de componente citotóxico (productos de su degradación, monómero residual,...)<sup>19</sup> al medio de cultivo en el que se desarrollan las células de HOb. Es una técnica colorimétrica basada en la reacción de reducción que presenta el bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazolio) (MTT) (Figura III.19) en presencia de hidrogenasas mitocondriales. El MTT es una sal de tetrazolio (amarilla) insoluble en el medio de cultivo que se reduce a la sal de formazán (violeta) correspondiente, al participar como co-catalizador en la transformación de lactato a piruvato, mediante la participación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y el sistema catalizador  $\text{NAD}^+/\text{NADH}/\text{H}^+$ . La introducción del reactivo MTT al interior de la célula se produce mediante procesos endocíticos<sup>20</sup>. Una vez allí, el MTT se reduce en el interior del citoplasma celular, tras su inclusión y acumulación en vesículas endocíticas<sup>21</sup>, generándose cristales de formazán en forma de aguja, que tras ser exocitados por la célula se acumularán en su superficie<sup>16</sup>. Posteriormente se evalúa la concentración de formazán por espectroscopía ultra violeta, midiendo la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

La Figura III.19<sup>22</sup> esquematiza el proceso donde se observa cómo es en el segundo paso, donde el catalizador transfiere dos protones desde  $\text{NADH}/\text{H}^+$  ( $E^0 = -320 \text{ mV}$ ) a la sal de tetrazolio ( $E^0$  entre  $+290$  y  $+80 \text{ mV}$ ) generando la especie reducida formazán<sup>23</sup>.

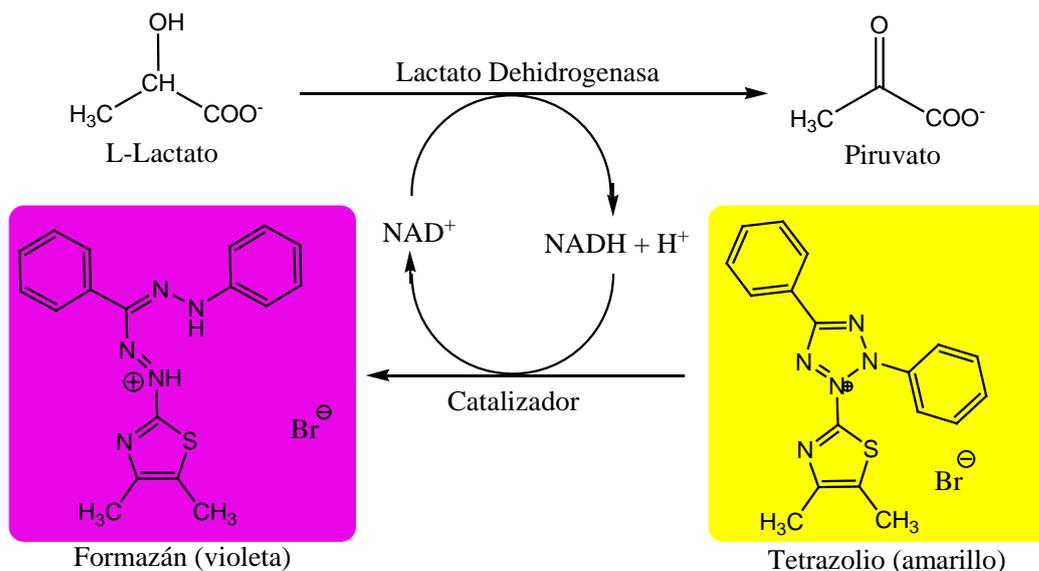
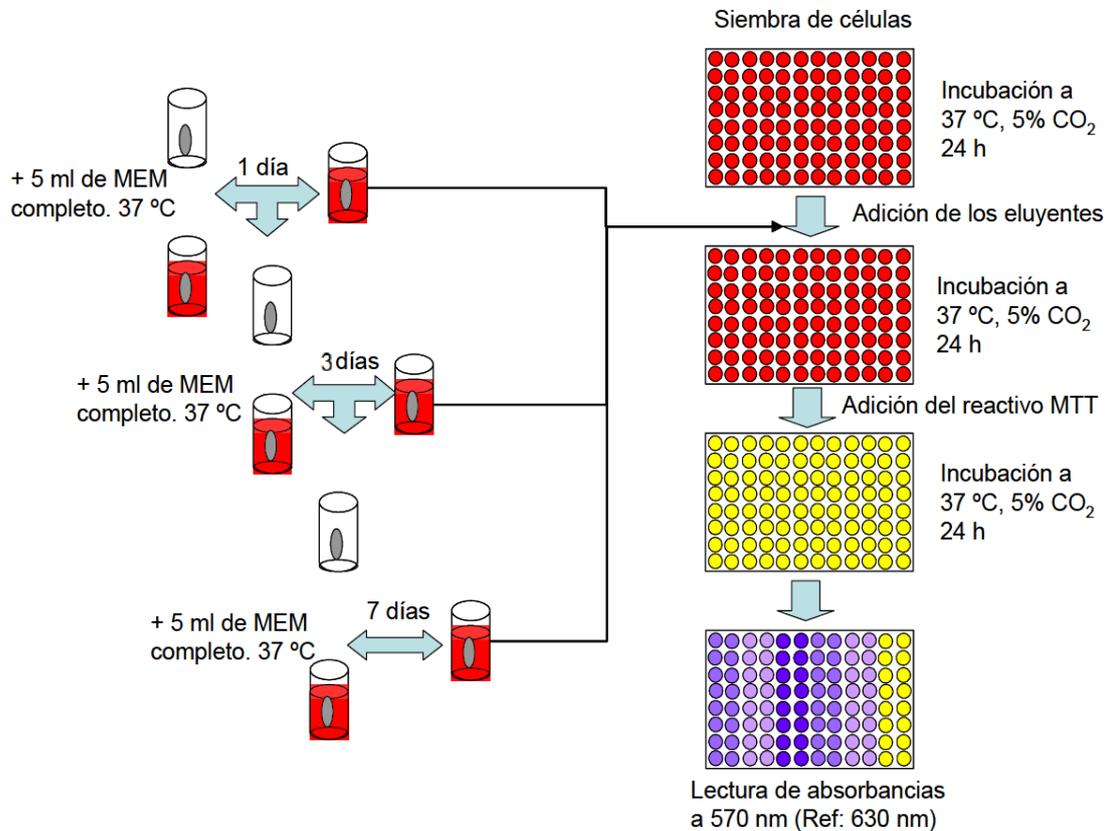


Figura III.19. Esquema de la reacción de oxido-reducción en la que el lactato se transforma en piruvato por acción de la enzima LDH y la sal de tetrazolio se reduce a formazán.

Para llevar a cabo este ensayo se utilizan en condiciones de esterilidad, cuatro discos de cada una de las formulaciones que contienen colágeno hidrolizado descritas en el apartado III.2.3.4. Como control negativo se usan discos de TMX<sup>®</sup>. Cada uno de ellos se sumerge en 5 mL de medio de cultivo completo a 37°C y en agitación. Transcurridos 1, 3 y 7 días en estas condiciones, se extrae dicho medio (eluyente) para su uso posterior, siendo sustituido en cada caso por 5 mL de suero bovino fetal fresco al cabo de 1 y 3 días (Figura III.20). En el ensayo se incluye también como control positivo una disolución al 0,5% de tritón x-100 en medio de cultivo Dubelco's, y el blanco consistente en una serie de muestras de medio completo adicionadas a pocillos en los que no se sumerge ningún material. Una vez extraídos cada uno de los eluyentes se prepara un concentrado de células de HOb en medio fresco completo a una concentración de  $1,1 \cdot 10^5$  células/ml y se realiza con él la siembra sobre placas de 96 pocillos. Para ello se adicionan 100  $\mu\text{l}$  de concentrado de células en cada uno de los pocillos y se cultivan a 37°C con una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Transcurridas 24 h de la siembra se intercambia el medio de cultivo por los eluyentes previamente extraídos, de tal modo que por cada disolución eluyente se rellenan 4 pocillos,

obteniendo así un total de 16 réplicas por material. Las placas se incuban durante otras 48 h en las mismas condiciones.



*Figura III.20. Esquema de un ensayo tipo MTT para evaluar la liberación de componentes citotóxicos. Los eluyentes recogidos a 1, 3 y 7 días se emplean para cultivar células y evaluar espectroscópicamente su efecto sobre el cultivo.*

Posteriormente se retiran los eluyentes que se sustituyen por la disolución de trabajo que contiene el reactivo MTT y se mantiene de nuevo a 37°C, durante 4 h más. Tras este tiempo se extrae el contenido de los pocillos y se añade en cada uno de ellos 100 µl de dimetil sulfoxido, con el fin de disolver los cristales de formazán que se puedan haber formado. Tras una agitación vigorosa de 20 s se realiza la lectura de densidad óptica a 570 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm en un lector de placas Biotek ELX808IU.

Una vez realizada la lectura de los valores de absorbancia y haciendo uso de la Ec. III.7, se calculan los valores de viabilidad relativa celular de cada réplica relativizándolos a los medidos para el control negativo TMX<sup>®</sup>,

$$VR = \frac{DO_M - DO_B}{DO_C} \times 100 \quad \text{Ec. III.7}$$

donde,  $DO_M$ ,  $DO_B$  y  $DO_C$  son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco (medio introducido en pocillos sin células) y el control negativo, respectivamente. Los resultados se analizan mediante análisis de la varianza (ANOVA).

### III.7. BIBLIOGRAFÍA

1. Pereira CS, Cunha AM, Reis RL, Vázquez B, San Román J. New storch-based thermoplastic hydrogels for use as bone cements or drug-delivery carriers. *J Mater Sci: Mater Med.* 1998; 9: 825-33.
2. Barrows TH. Degradable implant materials. A review of synthetic absorbable polymers and their applications. *Clin Mater.* 1986; 1: 233-57.
3. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials.* 2000; 21: 2335-46.
4. Fernández M, Méndez JA, Vázquez B, San Román J, Ginebra MP, Gil FJ, Manero J, Planell JA. Acrylic-phosphate glasses composites as self-curing controlled delivery Systems of antibiotics. *J Mater Sci: Mater Med.* 2002; 13: 1251-7.
5. Méndez JA, Fernández M, González-Corchón A, Salvado M, Collía F, de Pedro JA, Levenfeld BL, López-Bravo A, Vázquez B, San Román J. Injectable self-curing bioactive acrylic-glass composites charged with specific anti-inflammatory/analgesic agent. *Biomaterials.* 2004; 25: 2381-92.

6. Vainionpaa S, Rokkanen P, Tormala P. Surgical applications of biodegradable polymers in human tissues. *Polym Sci.* 1989; 14: 679-716.
7. Lewis DH. Controlled Release of Bioactive Agents from lactide/glycolide Polymers. En: Chasin M y Langer R, editores. *Biodegradable polymers as drug delivery system.* New York: Marcel Dekker; 1990. Pág. 1-41.
8. Ikada Y. Tissue Adhesives. En: Chu CC, von Fraunhofer LA y Greisler HP, editores. *Wound Close Biomaterials and Devices.* New York: CRC Press; 1996. Pág. 317-346.
9. Mayoux C, Dandurand J, Ricard A, Lacabanne C. Inverse suspension polymerization of sodium acrylate: Synthesis and characterization. *J Appl Polym Sci.* 2000; 77(12): 2621-30.
10. Allen T. *Particle Size Measurement 5ª ed.* Londres: Chapman & Hall; 1997.
11. Hansen JC, Maier D, Honerkamp J, Richtering W, Horn FM, Senf H. Size distribution out of static light scattering: inclusion of distortions from the experimental set-up, e.g. a SOFICA-type goniometer. *J Colloid Interf Sci.* 1987; 215: 72-84.
12. Beckman-Coulter Coulter LS Series: Product Manual. Miami: Beckman Coulter; 1994.
13. De Boer GBJ, de Weerd C, Thones D, Goossens HWJ. Laser Diffraction Spectrometry: Fraunhofer versus Mie scattering. *Part Charact.* 1987; 4: 14-9.
14. ISO Specification 5833. Standard specification for implants in surgery-acrylic resin cement. 1992.
15. ISO Specification 527-1. Standard specification for plastic determination of tensile properties. 1993.

16. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth.* 1986; 89: 271-77.
17. Van Kooten TG, Klein CL, Köhler H, Kirkpatrick CJ, Williams DF, Eloy R. From cytotoxicity to biocompatibility testing in vitro: Cell adhesion molecule expression defines a new set of parameters. *J Mater Sci.* 1997; 8: 835-41.
18. Wan H, Williams R, Doherty P, Williams DF. A study of the reproducibility of the MTT test. *J Mater Sci: Mater Med.* 1994; 5:154-9.
19. Niu QX, Zhao CY, Jing ZA. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *J Immunol Methods.* 2001; 251: 11-9.
20. Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Shubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem.* 1997; 69: 581-93.
21. Liu Y. Understanding the biological activity of amyloid proteins in vitro: from inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostasis. *Prog Neuro-psychop.* 1999; 23: 377-95.
22. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, Hursey ML, Czerwinski MJ, Fine DL, Abbot BJ, Mayo JG, Shoemaker RH, Boyd MR. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 1988; 48: 589-601.
23. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55-63.

---

**CAPÍTULO IV.**  
**INFLUENCIA DE LA NATURALEZA**  
**DEL POLÍMERO BIODEGRADABLE**  
**AÑADIDO**

---

## IV.1. INTRODUCCIÓN

Los polímeros biodegradables son aquellos que tienen la capacidad de descomponerse en compuestos de más bajo peso molecular más fácilmente eliminables por el medio que les rodea, mediante diferentes procesos físicos, químicos y biológicos<sup>1</sup>. Éstos se pueden clasificar, de forma general, en cuatro categorías:

*Polímeros naturales:* como la celulosa, el almidón y las proteínas.

*Polímeros naturales modificados:* acetato de celulosa o los polialcanoatos.

*Materiales compuestos,* que combinan partículas biodegradables con polímeros sintéticos (mezclas de almidón y poliestireno, o almidón y policaprolactona,...).

*Polímeros sintéticos:* como los poliésteres alifáticos, las poliésteramidas y los poliuretanos, entre otros.

En general, los polímeros sintéticos ofrecen mayores ventajas sobre los materiales naturales y los compuestos porque pueden ser diseñados según las propiedades requeridas. Además, éstas pueden ser estimadas o predichas teóricamente.

Con respecto a la constitución química, los materiales biodegradables de mayor uso se pueden clasificar en tres categorías: derivados de azúcares (almidón, celulosa,...), poliésteres (poliláctico,...) y proteínas.

### IV.1.1. Almidón

El almidón es un hidrato de carbono complejo ( $C_6H_{10}O_5$ ), inodoro e insípido, que se encuentra almacenado en forma de gránulo en los aminoplastos

de las células vegetales<sup>2</sup>. Se obtiene como producto final del proceso fotosintético y como tal es el principal polisacárido de reserva en la mayoría de las plantas superiores, y la principal fuente de calorías de una parte muy importante de la humanidad, proporcionando entre el 70-80% de las calorías consumidas.

El almidón está formado únicamente por cadenas poliméricas cuya estructura repetitiva es la  $\alpha$ -glucosa y se encuentra en las células formando estructuras discretas denominadas gránulos. Dichos gránulos están constituidos por macromoléculas organizadas en capas. Se presenta en dos estructuras poliméricas diferentes: la amilosa y la amilopectina, cuyas estructuras se muestran en la Figura IV.1. Ambas están constituidas a base de cadenas lineales de  $\alpha$ -glucosa con uniones  $\alpha,1\rightarrow4$ . La diferencia entre la amilosa y la amilopectina es que esta última presenta ramificaciones en su cadena principal debido a la existencia de enlaces  $\alpha,1\rightarrow6$ , cada 20-30 enlaces  $\alpha,1\rightarrow4$ .

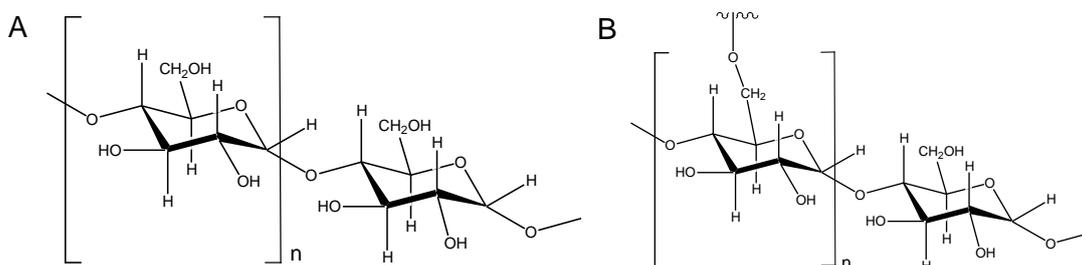


Figura IV.1. Constituyentes del almidón (A) amilosa, (B) amilopectina.

El almidón tiene muchas aplicaciones: en la industria agroalimentaria, papelera y textil, y como material termoplástico. En la industria agroalimentaria se utiliza como agente espesante, complemento gelificante, emulsificante,... En la industria papelera, se usa para dar un acabado más liso a la superficie del papel. En la industria textil se utiliza para impedir la abrasión durante su procesado. Se utiliza también como material termoplástico ya que es útil como sustituto de los plásticos basados en el petróleo debido a que es un biopolímero biodegradable y procede de fuentes renovables.

El almidón termoplástico se obtiene a partir de los gránulos de almidón y un plastificante bajo la acción de una fuente de calor y esfuerzo mecánico. Estos gránulos se desestructuran, dando lugar al almidón plastificado con capacidad de fusión por incremento de temperatura. La adición de plastificantes (glicerol, urea,...) permite obtener un producto maleable, aunque el uso de éstos provoca una variación de las temperaturas características del material<sup>3,4,5</sup>. Este material posee limitaciones en sus propiedades mecánicas y tiene un comportamiento hidrofílico derivado de la existencia de 3 grupos hidroxilo (-OH) por unidad estructural.

Son diversas las aplicaciones del almidón en el campo de la biomedicina, como por ejemplo en regeneración de la piel<sup>6</sup>, como sistemas de liberación de fármacos u hormonas<sup>7,8</sup>. También se aplican en ingeniería de tejidos como el hueso<sup>9,10</sup> y cartílago<sup>11</sup> y en regeneración vascular<sup>12</sup>.

#### **IV.1.2. Poli(ácido L-láctico), PLLA**

El poli(ácido L-láctico) (PLLA) pertenece a la familia de los poliésteres alifáticos, el cual se obtiene mediante un proceso de polimerización sintético por apertura de anillo del dímero cíclico del ácido láctico (Figura IV.2).

El monómero tiene dos carbonos asimétricos por lo que es factible preparar polímeros con diferentes estereoregularidades. El homopolímero derivado del monómero ácido L-láctico, presenta una cristalinidad del 37% debido a su estereoregularidad. El material tiene alta resistencia a la tracción y baja elongación a rotura, y consecuentemente tiene un módulo de Young elevado. Sus características térmicas están definidas por una elevada temperatura de fusión ( $T_f$ ) (175-178°C) y una temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) superior a la temperatura ambiente (60-65°C), hecho que permite su uso como material rígido a temperatura fisiológica.

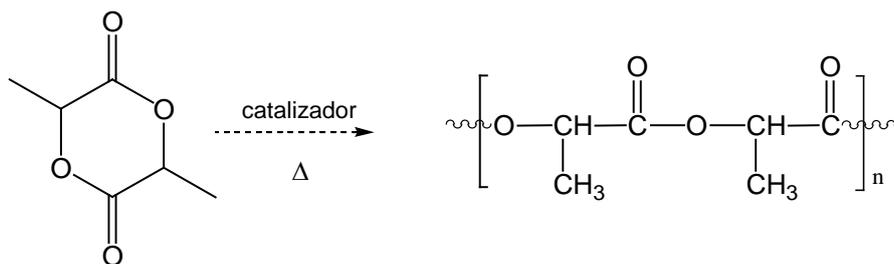


Figura IV.2. Síntesis del poli(ácido L-láctico).

Las propiedades descritas hacen del PLLA un polímero muy adecuado en la preparación de *scaffolds* (soportes celulares)<sup>13</sup>, para aplicaciones biomédicas en ingeniería de tejidos<sup>14</sup>. Sin embargo el PLLA por sí solo no proporciona una superficie favorable para la adhesión celular y la proliferación debido a la falta de reconocimiento específicos del resto de células<sup>15</sup>. Para ello se han realizado distintos trabajos en los que se incorporan nanofibras de colágeno para intentar biomimetizar los componentes de la matriz extracelular<sup>16,17,18</sup>.

### IV.1.3. Poli(β-hidroxibutirato), PHB

El poli(β-hidroxibutirato), (PHB) (Figura IV.3) es un poliéster alifático de origen bacteriano obtenido bajo condiciones de estrés nutricional en el medio de cultivo<sup>19</sup>. Se acumula en el citoplasma bacteriano dentro de gránulos y representa para el microorganismo una reserva de carbono y poder reductor. En los últimos años este material ha suscitado considerable atención como alternativa biodegradable en las aplicaciones de termoplásticos sintéticos.

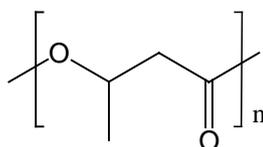


Figura IV.3. Estructura del poli(β-hidroxibutirato).

Entre sus características destaca su biodegradabilidad sin producir desechos tóxicos, su biocompatibilidad, la regular cristalinidad y moderada

resistencia mecánica, hechos que lo convierten en un material utilizable en diferentes aplicaciones una vez procesado. El PHB posee una  $T_g$  de 5°C y una  $T_f$  de 180°C.

Uno de los responsables de la limitada aplicabilidad del PHB es su elevado coste de producción. Este problema se soluciona en diversas ocasiones mediante el mezclado con otros materiales biodegradables como el almidón, madera u otros componentes de bajo coste y buena degradabilidad, para que no deterioren significativamente sus propiedades mecánicas<sup>20</sup>. Por el contrario estos materiales “mezcla” también muestran limitaciones derivadas de la baja adhesión entre los gránulos de algunos agregados y la matriz polimérica. Para reducir este efecto, se intenta someter el compuesto a ciclos de presión y temperatura durante la extrusión o inyección, o bien se revisten las partículas del material que actúa como agente reforzante con óxidos que favorezcan la adherencia de las cadenas de PHB.

Son varios los estudios realizados con PHB, y sus derivados copoliméricos, como materiales para aplicaciones biomédicas<sup>21,22</sup>. Estos nuevos materiales ofrecen una buena biocompatibilidad<sup>23</sup> ya que facilitan la adhesión y proliferación celular<sup>24</sup>. Para estos materiales, dentro del campo de la ingeniería de tejidos, se han encontrado varias aplicaciones. Por ejemplo en regeneración y reparación de la piel<sup>25</sup>, cartílago y ligamento<sup>26</sup>, hueso<sup>27</sup> y nervios<sup>28</sup>.

#### **IV.1.4. Poli( $\epsilon$ -caprolactona), PCL**

La poli( $\epsilon$ -caprolactona), PCL, es un poliéster alifático lineal y biodegradable de origen sintético. Se obtiene por un proceso de polimerización por apertura de anillo del monómero de la  $\epsilon$ -caprolactona (Figura IV.4). La PCL es un polímero semicristalino con una  $T_g$  alrededor de -60°C y una  $T_f$  entre 60-65°C.

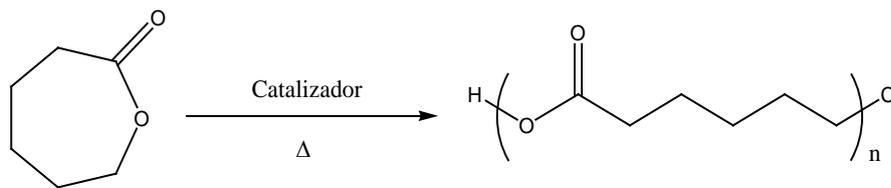


Figura IV.4. Síntesis de la poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL)

La PCL tiene una gran importancia en aplicaciones biomédicas ya que en su proceso de degradación se obtienen productos no tóxicos<sup>29</sup>. Sin embargo este material presenta elevados tiempos de degradación lo cual a veces es una desventaja en aplicaciones biomédicas<sup>30</sup>. Para incrementar la velocidad de degradación se han utilizado diferentes alternativas, como por ejemplo la formación de copolímeros derivados de la PCL con otros monómeros<sup>31</sup>.

La PCL junto con sus derivados ha sido ampliamente utilizada en la fabricación de piezas convencionales como contenedores<sup>32</sup> para la plantación de árboles y semillas, en la fabricación de bolsas de compras<sup>33</sup>. Dentro del sector biomédico en la fabricación de dispositivos implantables de liberación controlada de fármacos<sup>34</sup>, en suturas<sup>35</sup> y *scaffolds*<sup>36</sup> como soporte para crecimiento y regeneración celular para ingeniería de tejidos como hueso<sup>37</sup>, cartílago<sup>38</sup>, ligamento<sup>39</sup>, nervio<sup>40</sup>, cardiovascular<sup>41</sup> y piel<sup>42</sup>.

En este capítulo se describe la preparación y caracterización de formulaciones acrílicas autocurables modificadas con polímeros biodegradables que muestren características de interés para la liberación controlada de fármacos. Entre las características deseadas se busca que presenten propiedades mecánicas moderadas, capacidad de interacción con medios acuosos que permita la entrada del medio externo, biológico o simulado, con el fin de extraer el fármaco de forma controlada. En esta línea se plantea la modificación de la formulación acrílica convencional, formulada con PMMA, mediante la incorporación de poliésteres alifáticos con diferente estructura química de la cadena principal, tales como el PLLA, el PHB y un poliéster alifático de estructura próxima a la PCL, y un almidón termoplástico (TPS1). Se pretende estudiar de forma comparada la relación estructura-propiedades a través de diferentes

metodologías de caracterización: mecánicas, térmicas, mecanodinámicas, espectroscópicas y microscópicas, hasta determinar la estructura más optimizada para su uso como sistema de liberación controlada de fármacos útiles en la terapia de la osteoporosis.

## IV.2. RESULTADOS

Una primera aproximación para el abordaje del estudio ha sido la comprensión de las propiedades y características de la formulación acrílica autocurable convencional de PMMA cuando se modifica parcialmente con diferentes polímeros biodegradables. Estos polímeros biodegradables han sido el TPS1, PHB, PLLA y un poliéster alifático (PES). En la Tabla IV.1 se presenta la composición de las distintas formulaciones expresadas en tanto por ciento.

*Tabla IV.1. Composición de las formulaciones acrílicas.*

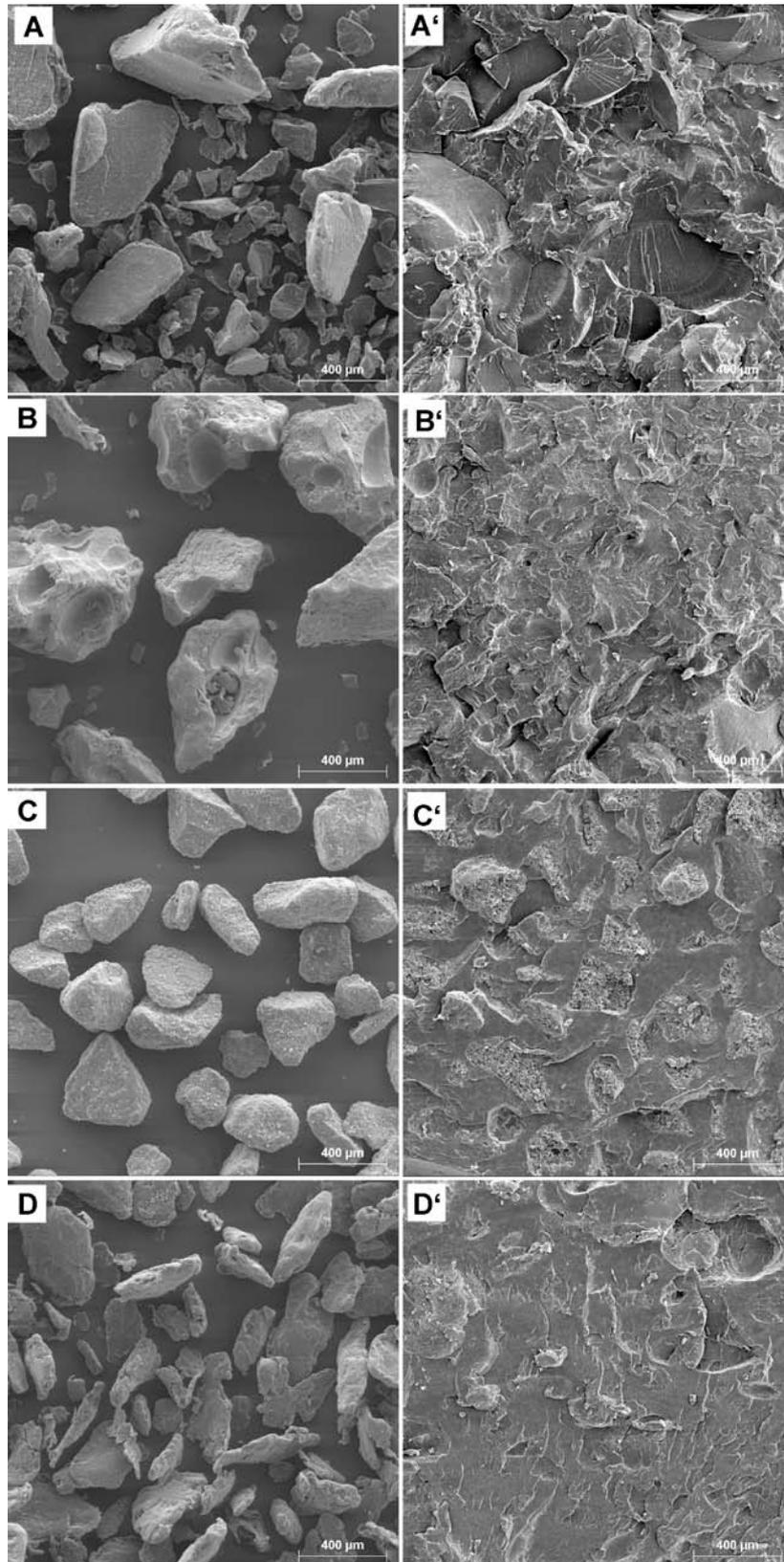
Formulación	Relación s:l	Fase sólida			Fase líquida		Contenido total PB (%)
		PMMA <sup>a</sup>	PB <sup>a</sup>	BPO <sup>a</sup>	MMA <sup>b</sup>	BZN <sup>b</sup>	
PMMA-2	2:1	98,5	-	1,5	99	1	0
PES-2	2:1	49,25	49,25	1,5	99	1	33
PHB-2	2:1	49,25	49,25	1,5	99	1	33
TPS1-2	2:1	49,25	49,25	1,5	99	1	33
PLLA-1	1:1	32,5	66	1,5	99	1	33

a. Tanto por ciento en peso respecto al total de la fase sólida.

b. Tanto por ciento en peso respecto al total de la fase líquida

### IV.2.1. Caracterización superficial

Con el fin de analizar la compatibilización de los diferentes polímeros biodegradables a la matriz polimérica de PMMA en la Figura IV.5 se presentan las microfotografías SEM realizadas a los distintos materiales en estado virgen y tras realizar el cemento.



*Figura IV.5. Microfotografías SEM de los distintos polímeros biodegradables microparticulados (A) PES, (B) PHB, (C) TPS1 y (D) PLLA. (A'), (B') (C') y (D'):* cemento óseo formulado con el correspondiente polímero biodegradable.

## IV.2.2. Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas se han evaluado bajo esfuerzos a compresión y a tracción. Este estudio ha permitido determinar la resistencia en fluencia en compresión ( $\sigma_Y$ ), la deformación en fluencia en compresión ( $\varepsilon_Y$ ), el módulo elástico a compresión ( $E_C$ ), la resistencia máxima a tracción ( $\sigma_T$ ), la deformación a la rotura en tracción ( $\varepsilon_T$ ), y el módulo de Young ( $E_T$ ).

En las tablas, Tabla IV.2 y en la Tabla IV.3, se presentan los resultados obtenidos para el ensayo de compresión y tracción respectivamente. Para ambos casos, junto al valor promedio entre corchetes se presenta el valor de la desviación estándar.

Tabla IV.2. Valores de propiedades mecánicas en compresión.

Formulación	$\sigma_Y$ (MPa)	$\varepsilon_Y$ (%)	$E_C$ (GPa)
PMMA-2	105,0 [8,4]	7,2 [1,0]	2,8 [0,2]
PES-2	55,0 [1,9]	11,1 [1,2]	1,2 [0,2]
PHB-2	74,5 [4,5]	6,1 [0,9]	2,2 [0,3]
TPS1-2	71,0 [1,7]	9,4 [1,3]	1,8 [0,2]
PLLA-1	71,4 [5,0]	7,2 [1,1]	1,9 [0,1]

Tabla IV.3. Valores de propiedades mecánicas en tracción.

Formulación	$\sigma_T$ (MPa)	$\varepsilon_T$ (%)	$E_T$ (GPa)
PMMA-2	48,8 [5,1]	7,2 [1,0]	1,6 [0,2]
PES-2	26,6 [1,6]	11,1 [1,2]	1,3 [0,2]
PHB-2	24,6 [4,8]	6,9 [0,9]	1,8 [0,3]
TPS1-2	34,9 [2,9]	9,4 [1,3]	1,7 [0,3]
PLLA-1	29,7 [4,6]	7,2 [1,1]	1,5 [0,2]

## IV.2.3. Análisis termogravimétrico (TGA)

Las propiedades de estabilidad térmica de los materiales se han evaluado mediante la técnica de termogravimetría. En la Figura IV.6 se presentan los

perfiles de degradación térmica obtenidos para los distintos materiales. En cada una de las figuras se compara el polímero biodegradable, el cemento control, donde el único componente polimérico es el PMMA, y el cemento óseo acrílico formulado. En la Tabla IV.4 se detallan los valores obtenidos de temperaturas de degradación térmica inicial ( $T_{d,i}$ ) y máxima ( $T_{d,máx}$ ), según la primera derivada, para las formulaciones acrílicas autocurables.

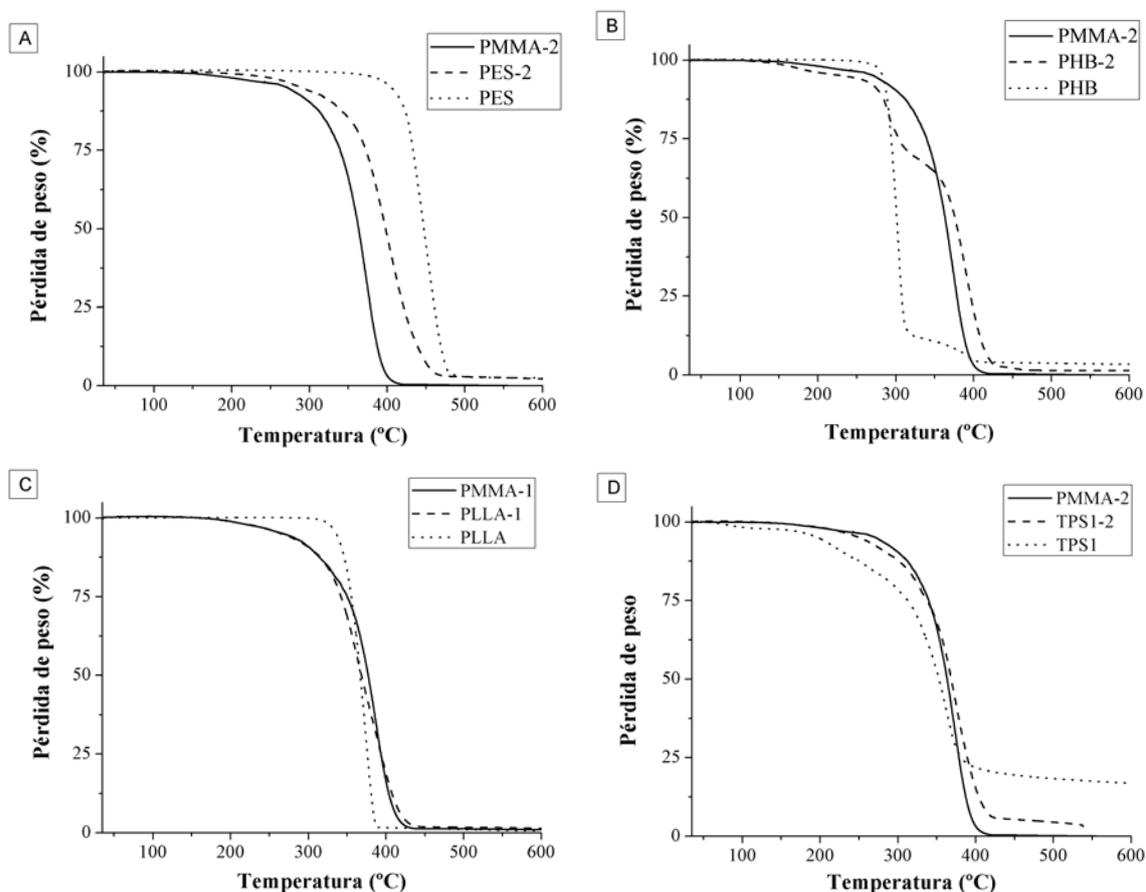


Figura IV.6. Perfiles de degradación térmica de los distintos materiales. (A) PES, (B) PHB, (C) PLLA y (D) TPS1.

Tabla IV.4. Valores de las temperaturas de degradación térmica según la primera derivada.

Formulación	1ª degradación		2ª degradación	
	$T_{d,i}$	$T_{d,máx}$	$T_{d,i}$	$T_{d,máx}$
PMMA-2	318	373	-	-
PES-2	336	400	-	-
PHB-2	261	291	345	389
TPS1-2	234	-	320	374
PLLA-1	297	380	-	-

#### IV.2.4. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

**DSC-dinámico.** Mediante la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en modo dinámico se ha realizado el estudio de las propiedades térmicas de los distintos materiales. Se estudia la temperatura de transición vítrea en DSC ( $T_g^{DSC}$ ), así como el intervalo de la transición ( $\Delta T_g^{DSC}$ ). Además también se han calculado los valores de la temperatura de fusión ( $T_f$ ) y la entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ) del polímero biodegradable adicionado. En la Tabla IV.5 se muestran los valores obtenidos.

Tabla IV.5. Valores de  $T_g^{DSC}$ ,  $T_f$  y  $\Delta H_f$  para el ensayo de DSC.

Formulación	$T_g^{DSC}$ (°C)	$\Delta T_g^{DSC}$ (°C)	$T_f$ (°C)	$\Delta H_f$ (Jg <sup>-1</sup> )
PMMA	115,6	13,9	-	-
PMMA-2	106,5	15,7	-	-
PES	-	-	83,2	194,0
PES-2	-	-	82,4	29,6
PHB	-	-	186,8	188,9
PHB-2	-	-	186,1	56,3
TPS1	-	-	107,4	144,8
TPS1-2	91,0	8,7	-	-
PLLA	68,6	4,7	189,1	121,5
PLLA-1	-	-	177,2	17,9

A partir de la Tabla IV.5 se puede observar que los valores de  $T_g^{DSC}$  no son apreciables para todas las formulaciones. En cambio, los valores de  $T_f$  se observan para los polímeros biodegradables así como también para su correspondiente formulación acrílica excepto para la formulación TPS1-2.

**DSC-isotérmico.** A partir de la técnica DSC en modo isotérmico a 25°C se ha realizado el estudio de las propiedades de curado de las formulaciones acrílicas. Para ello se evalúa la entalpía de curado ( $\Delta H_c$ ), el tiempo en el que se halla el máximo de energía liberada ( $t_p$ ), el tiempo inicial y final de la exoterma así como el intervalo diferencial ( $\Delta t$ ) calculado como la diferencia entre el tiempo final ( $t_f$ ) e inicial ( $t_i$ ).

Tabla IV.6. Valores de curado mediante DSC-isotérmico a 25°C.

Formulación	$\Delta H_c$ (J·g <sup>-1</sup> )	$t_i$ (min)	$t_p$ (min)	$t_f$ (min)	$\Delta t$ (min)
PMMA-2	69,3	4,7	11,2	18,7	14,0
PES-2	72,0	5,5	12,2	18,1	13,1
PHB-2	59,3	5,0	12,2	18,1	13,1
TPS1-2	59,2	6,3	10,5	13,4	7,1
PLLA-1	154,5	9,2	15,7	22,0	12,8

#### IV.2.5. Análisis Térmico Mecanodinámico (DMTA)

Mediante el ensayo térmico mecanodinámico (DMTA) se evalúa la temperatura de transición vítrea ( $T_g^{DMTA}$ ). Se han realizado dos barridos obteniéndose  $T_g^{DMTA'}$  y  $T_g^{DMTA''}$  correspondientes al primer y segundo barrido, respectivamente. En la Tabla IV.7 se muestran los valores de  $T_g$ . En ella se puede apreciar como el valor de la  $T_g^{DMTA'}$  es inferior a la  $T_g^{DMTA''}$  para todos los materiales sintetizados.

Tabla IV.7. Valores de  $T_g$  para el ensayo de DMTA.

Formulación	$T_g^{DMTA'}$ (°C)	$T_g^{DMTA''}$ (°C)
PMMA-2	122,5	125,8
PHB-2	110,1	114,7
TPS1-2	116,0	116,7
PES-2	110,1	114,7
PLLA-1	112,1	116,6

En la Figura IV.7 se presentan las curvas de módulo de almacenamiento ( $E'$ ) respecto a la temperatura.

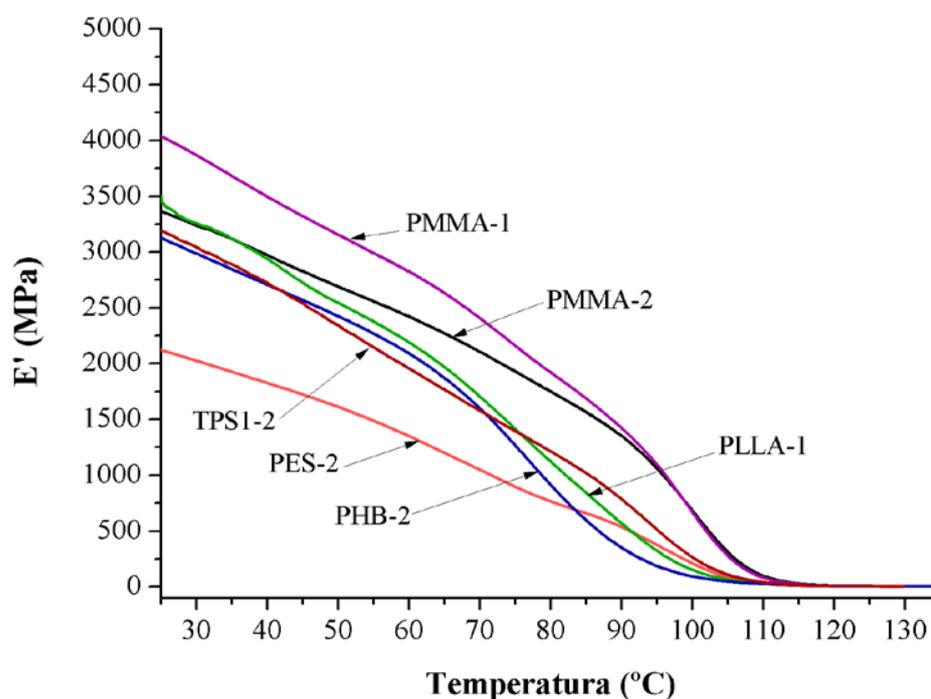


Figura IV.7. Módulo de almacenamiento ( $E'$ ) de las distintas formulaciones acrílicas autocurables modificadas con polímeros biodegradables.

#### IV.2.6. Monómero residual

Los contenidos en monómero residual (CMR) analizados mediante las técnicas de resonancia magnética nuclear de protón ( $^1\text{H-RMN}$ ) y cromatografía de gases (GC), para las diferentes formulaciones se muestran en la Tabla IV.8, junto

con su desviación estándar entre corchetes. Tal y como se aprecia, las formulaciones que presentan la misma relación sólido-líquido tienen valores aproximados de CMR, mientras que la formulación acrílica autocurable de PLLA presenta un valor más elevado en monómero residual ya que en su formulación total contiene más fase líquida.

Tabla IV.8. Valores de contenido de monómero residual.

Formulación	CMR (%)	
	<sup>1</sup> H-RMN	GC
PMMA-2	2,2	0,40 [0,02]
PES-2	2,6	2,32 [0,04]
PHB-2	2,3	2,50 [0,05]
TPS1-2	2,0	2,16 [0,06]
PLLA-1	7,5	4,03 [0,01]

#### IV.2.7. Parámetros de curado

Los parámetros de curado temperatura máxima ( $T_{m\acute{a}x}$ ) y tiempo de fraguado ( $t_{fraguado}$ ) se muestran en la Tabla IV.9. Se presentan los valores obtenidos según norma ISO-5833<sup>43</sup> junto a su desviación estándar entre corchetes.

Tabla IV.9. Parámetros de curado.

Formulación	$T_{m\acute{a}x}$ (°C)	$t_{fraguado}$ (min)
PMMA-2	75,6 [1,1]	8,9 [0,5]
PES-2	50,5 [0,7]	9,4 [1,7]
PHB-2	55,5 [0,9]	13,5 [1,4]
TPS1-2	60,3 [1,3]	8,9 [0,2]
PLLA-1	66,2 [1,0]	10,4 [0,8]

### IV.2.8. Comportamiento *in vitro*

En la Figura IV.8 se muestra el grado de hidratación ( $H_{hid}$ ) que han sufrido las muestras durante un periodo de inmersión de 30 días en condiciones fisiológicas simuladas (pH 7,4 y a 37°C). Se puede observar que las formulaciones acrílicas modificadas con poliésteres se comportan como materiales hidrofóbicos ya que no absorben más de un 2% de solución. En cambio, la formulación modificada con TPS1 ha alcanzado valores de  $H_{hid}$  próximos al 12% en peso.

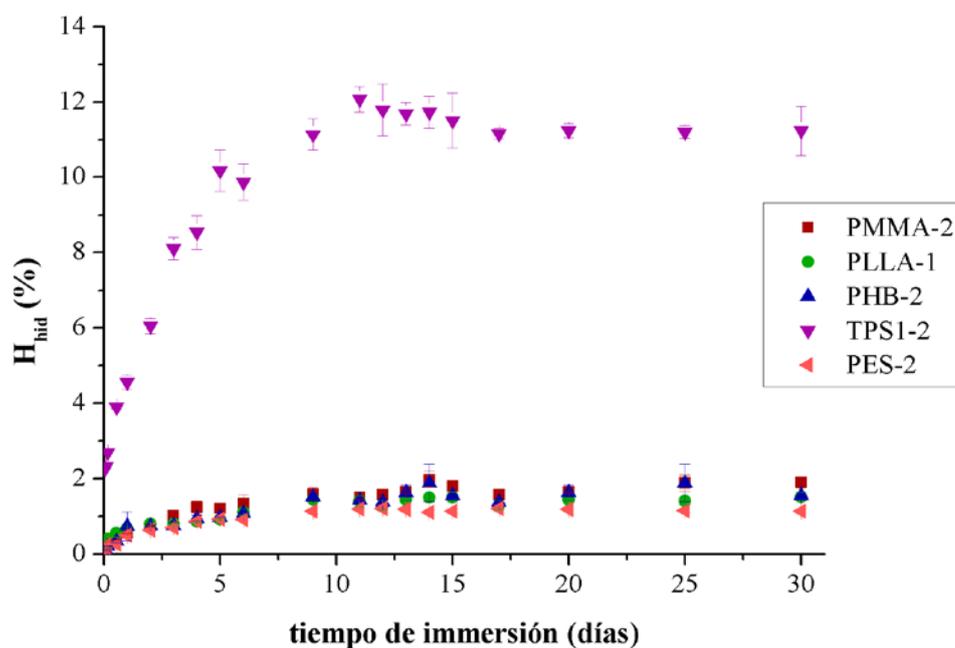


Figura IV.8. Comportamiento *in vitro* de las formulaciones acrílicas.

También se ha estudiado la pérdida de peso ( $P_p$ )(Figura IV.9). Para su representación gráfica se ha tomado como resultado el valor absoluto.

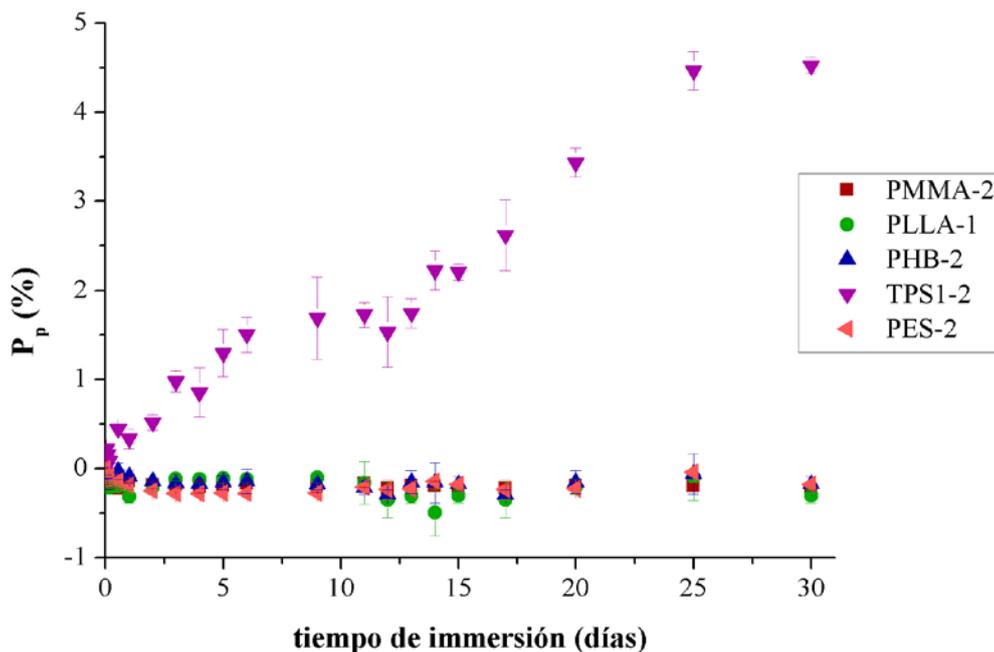


Figura IV.9. Pérdida de peso de las formulaciones acrílicas.

#### IV.2.9. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO

A partir de las microfotografías SEM que se muestran en la Figura IV.10 se pueden observar las diferentes superficies de las distintas formulaciones acrílicas que han estado inmersas 4 meses en solución tampón fosfato.

Tal y como se muestra en la imagen Figura IV.10, para el caso del PHB no se observan diferencias significativas en la superficie de la muestra al cabo de 4 meses, hecho que ha sido reproducido por todas las formulaciones a excepción de las desarrolladas con almidón termoplástico. En este último caso se observa como en la superficie de la formulación acrílica autocurable modificada con el biopolímero TPS1 desarrolla cierta porosidad (Figura IV.10 (D)).

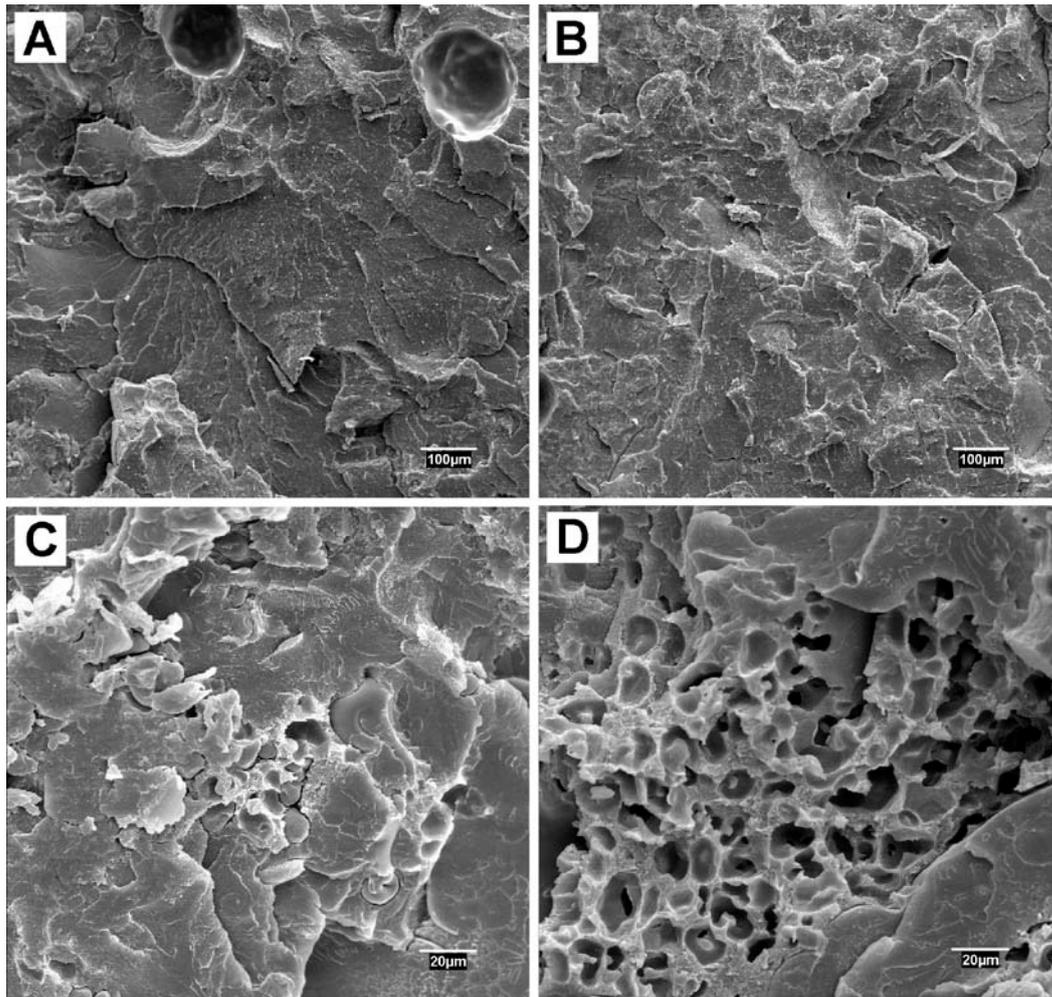


Figura IV.10. Microfotografías SEM de distintas FAA a distintos tiempos de inmersión. (A) PHB-2 y (C) TPS1-2 a tiempo cero. (B) PHB-2 y (D) TPS1-2 tras 16 semanas.

### IV.3. DISCUSIÓN

El uso de formulaciones acrílicas autocurables está ampliamente desarrollado dentro del campo de la cirugía ortopédica y bucodental. Ello es debido a la alta rigidez mecánica que ofrece el PMMA así como a su moderada resistencia mecánica bajo esfuerzos a compresión.

La viabilidad de una formulación acrílica autocurable está controlada de forma mecánica a través de la norma ISO-5833<sup>43</sup>, en la cual se afirma que una

formulación es viable si soporta una carga mínima de 70 MPa bajo esfuerzos a compresión.

En el caso de las formulaciones desarrolladas en este trabajo, se ha llevado a cabo la evaluación de la influencia en las propiedades mecánicas que puede sufrir la formulación control PMMA-2 en función de la modificación de su composición. En esta línea, la formulación básica acrílica, basada en PMMA como componente polimérico y MMA como fase líquida, ha sido alterada a nivel de la fase sólida. En este caso se ha sustituido el 33% en peso de la formulación con un polímero biodegradable con el fin de obtener un sistema parcialmente biodegradable o bioreabsorbible que permita la liberación controlada de fármacos. En la Tabla IV.1 se detalla que las cantidades del polímero modificador han variado en función de la relación sólido:líquido aplicada.

El polímero biodegradable se ha añadido a la fase sólida en formato de polvo con un tamaño de partícula de 300  $\mu\text{m}$ , para todas las formulaciones. La baja o nula solubilidad de la mayoría de los polímeros en el monómero ha dado lugar a la formación de un *composite* polímero-polímero, en el cual el PMMA actúa como matriz y el polímero biodegradable como agente reforzante o de relleno. A su vez, las perlas de PMMA (fase sólida) también actúan como agente de refuerzo/relleno debido nuevamente a la baja solubilidad en el monómero durante el proceso de curado, quedando como partículas esféricas embebidas en la matriz. En la Figura IV.5 se observan las microfotografías SEM y en ellas se puede ver la coexistencia de las partículas de los polímeros biodegradables embebidos en la matriz de PMMA. La existencia de diferentes estructuras químicas en cada formulación ha dado lugar a diferentes comportamientos mecánicos y térmicos en función de diferentes factores como la adhesión interfacial, la polaridad, la rugosidad superficial del agente modificante de la formulación,...

El estudio mecánico bajo esfuerzos a compresión, resumido en la Tabla IV.2, ha revelado un comportamiento más limitado de las formulaciones modificadas con los polímeros biodegradables que el de la formulación control

PMMA-2. La pérdida de resistencia máxima en compresión se halla entre el 29% sufrido por la formulación PHB-2 y el 48% sufrida por PES-2. En cualquier caso son pérdidas sustanciales de resistencia mecánica, aunque salvo la formulación modificada con el PES, el resto de formulaciones se ha mantenido por encima de los requerimientos de la norma ISO-5833<sup>43</sup> de formulaciones acrílicas autocurables. La pérdida de propiedades mecánicas es atribuida a las limitaciones en la compatibilización interfacial con el PMMA. La existencia de diferentes estructuras químicas en la formulación del material acrílico da lugar a una baja adhesión entre la matriz y el polímero biodegradable. Este efecto provoca la existencia de un número mayor de defectos físicos en el interior del material resultando en una disminución de la resistencia mecánica. Este efecto ya ha sido observado por Méndez y col.<sup>44</sup> en sistemas híbridos PMMA-PCL en el que las perlas de PMMA fueron polimerizadas en presencia de PCL.

La disminución de la resistencia en fluencia a la compresión también se observa en la propiedad análoga en el ensayo a tracción, es decir, la resistencia máxima a tracción (Tabla IV.3). En este caso el valor más elevado ha correspondido nuevamente al experimentado por la formulación control PMMA-2. Los valores más bajos de resistencia a la tracción han sido de nuevo para la formulación PES-2.

La rigidez del material se evalúa tanto a compresión como en tracción a través del módulo elástico (módulo elástico a compresión y módulo de Young). Los módulos elásticos son medidos como la pendiente de la curva tensión-deformación a bajas deformaciones. Dicho módulo es dependiente de los módulos correspondientes de cada componente. En ambos casos se observa que la adición del componente biodegradable nuevamente da lugar a un empobrecimiento de la propiedad, siendo el valor mínimo medido el atribuido nuevamente a la formulación PES-2. En el caso de la formulación PES-2, el polímero biodegradable adicionado es el poliéster insaturado suministrado por Novamont. Existe un compromiso entre el proveedor y el grupo de investigación, donde se ha desarrollado este trabajo de investigación, para no investigar la composición química de este material, aunque el valor de la temperatura de fusión

cercano a 80°C es indicativo de una estructura análoga a la PCL con elevado peso molecular tal y como ya se ha descrito en estudios anteriores por Chen y col<sup>45</sup>. Este polímero tiene unas propiedades mecánicas a tracción muy limitadas: 23 MPa para la resistencia mecánica y 0,5 GPa para el módulo de Young. Es fácilmente observable que la disminución de propiedades mecánicas de la formulación acrílica autocurable es debida a las bajas propiedades del polímero modificante, aunque ésta no es la única razón tal y como se demostrará posteriormente.

La formulación TPS1-2 está basada en un almidón termoplástico con grado de inyección, suministrado por Novamont. La hoja de especificaciones de este material informa de una resistencia mecánica y módulo de Young de 30 MPa y 2 GPa, respectivamente. Estos valores moderados de propiedades mecánicas confieren al material final una menor pérdida de propiedades debido al efecto interfacial.

Debido a la diferente estructura química de los polímeros biodegradables, el comportamiento del proceso de mezclado con la fase líquida de la formulación ha sido diferente para algunos materiales. Este es el caso de la formulación PLLA-1, en la cual se ha aplicado una relación sólido:líquido inferior (más cantidad de monómero) ya que la relación 2:1 no tiene suficiente monómero para dar lugar a una formulación semi-fluida durante el mezclado. Esta modificación de la relación sólido:líquido tiene su principal inconveniente en la cantidad de monómero que queda sin reaccionar, debido al aumento de la viscosidad conforme transcurre el tiempo de curado. Este contenido en monómero residual, recogido en la Tabla IV.8 medido a través de <sup>1</sup>H-RMN, superó el 7,5% en peso, respecto del contenido en PMMA, para la formulación PLLA-1, valor que disminuye si se compara con el peso total de *composite* dado que el PMMA representa el 66,6% del peso total del material final. Si se estudia a través de GC éste valor es del 4%, todo y que parece ser menor el CMR, el valor es mayor con respecto a la formulación control PMMA-2. En el caso del resto de materiales acrílicos autocurables formulados con la relación sólido:líquido 2:1 los valores de monómero residual han sido más bajos, no dependientes del polímero

biodegradable adicionado, y en un intervalo comprendido entre el 2,2 y el 2,6% en peso, respecto del contenido en PMMA. En el caso del ensayo de GC los valores para el resto de formulaciones acrílicas autocurables modificadas con polímeros biodegradables han sido análogos de  $^1\text{H-RMN}$ , entre 2,1 y 2,5, pero superiores a la formulación control 0,40.

Los parámetros de curado de los cementos óseos vienen determinados por la norma ISO-5833<sup>43</sup>. En ella se describe que la temperatura máxima alcanzada por la formulación no podrá ser superior a 90°C y el tiempo de fraguado debe de ser entre 5 y 10 minutos. Para las formulaciones modificadas con polímeros biodegradables se han obtenido temperaturas de curado inferiores a 90°C para todos los casos, incluso para la formulación PLLA-1 que contiene una mayor relación sólido líquido. Este hecho se debe a que la adición de partículas en el cemento provoca una disminución de la temperatura de curado ya que las propias partículas son las encargadas de disipar la energía, provocando de este modo una disminución de la temperatura de curado. Con respecto al tiempo de fraguado se obtienen valores entorno los 10 minutos.

Las propiedades de curado de las formulaciones también se han evaluado mediante la técnica de DSC en modo isotérmico a 25°C. Los resultados que nos ha proporcionado la técnica, Tabla IV.6, son la  $\Delta H_c$ , el  $t_p$ , así como los tiempos iniciales y finales de curado. Con respecto a la reacción de polimerización del MMA en presencia de PMMA y de los distintos polímeros biodegradables debemos decir que se trata de un proceso exotérmico, tal y como se esperaba. Se ha comprobado que la formulación que presenta una menor relación sólido:líquido (PLLA-1) lleva asociada una mayor  $\Delta H_c$  con respecto a las formulaciones que presentan una relación sólido:líquido mayor. En cambio, para las que contienen una misma relación sólido:líquido los valores de menor energía de curado los proporciona la formulación de TPS1-2. Esto se debe a que un mayor contenido de MMA produce una reacción con mayor liberación de energía. De cualquier modo, los valores obtenidos de  $\Delta H_c$  son muy inferiores a los de la entalpía de polimerización del MMA<sup>46</sup> de 577J·g<sup>-1</sup>. En todos los casos la presencia de partículas poliméricas de PMMA, con conductividad térmica muy baja (0,19 W·m<sup>-1</sup>

$^1 \cdot K^{-1})^{47}$ , disipa esta energía evitando que sea absorbida por el medio biológico. Esta disminución de tiempo reduce el riesgo de necrosis asociada al incremento de temperatura ya que el material en proceso de curado está menos tiempo a alta temperatura.

Según el tiempo total de curado ( $\Delta t$ ), la formulación de TPS1-2 reduce el tiempo a la mitad con respecto la formulación control PMMA-2. Esta disminución de tiempo reduce el riesgo de necrosis.

Mediante el análisis de TGA se ha evaluado la estabilidad térmica de las formulaciones. En la Figura IV.6 se muestran los perfiles de degradación térmica mientras que en la Tabla IV.4 se exponen las temperaturas iniciales y máximas de degradación térmica según la primera derivada,  $T_{i,máx}$  y  $T_{d,máx}$ , respectivamente. En el caso de la formulación PES-2 (Figura IV.6 (A)) se percibe un aumento de la  $T_{d,máx}$  en aproximadamente 30°C con respecto la formulación control PMMA-2. Para el resto de formulaciones no se nota un aumento significativo (2-3°C). Este hecho puede ser debido a la solubilización observada del PES en MMA durante el curado. El PES es soluble en MMA por encima de 35–40°C, por lo que a la temperatura máxima de curado (50,5°C) el polímero está parcialmente disuelto en el monómero. La solubilización del PES en el monómero modifica la temperatura de degradación del PES-2 y la desplaza al intervalo entre la del PES y la del PMMA. Este fenómeno es consecuencia de una mejor dispersión del biopolímero en la matriz de PMMA-2. Esta hipótesis se ve confirmada en las microfotografías SEM (Figura IV.5) ya que no se observan claramente las partículas de PES en comparación con las de, por ejemplo, el TPS1 en el cemento TPS1-2.

Para el caso de la formulación PHB-2 se pueden diferenciar dos saltos (Figura IV.6 (B)). El primero corresponde al propio PHB y el segundo al PMMA-2, ya que el PHB no es soluble en el MMA durante el curado. Este hecho se corrobora con los correspondientes solapamientos de las curva de degradación del propio polímero PHB y de la formulación control PMMA-2. Además el primer salto correspondiente al PHB representa aproximadamente un 33% de la masa total.

Para el caso de la formulación de PLLA-1 se observa una única descomposición térmica. Este hecho se debe a que las  $T_{d,máx}$  del PLLA y de la formulación control PMMA-1 son muy próximos entre sí.

Finalmente, el TPS1-2 presenta una  $T_{d,máx}$  similar a la formulación control PMMA-2 (Figura IV.6). Sin embargo la formulación no presenta una degradación total. Esto es debido a la composición del TPS1, donde se ha incorporado un aditivo polimérico que incrementa la termoplasticidad del almidón nativo. Según Vega y col<sup>5</sup> este polímero es el EVOH (polietilen-vinil alcohol) con una temperatura de degradación superior a los 650°C<sup>48</sup>, hecho que condiciona que no se haya degradado en el experimento desarrollado en este trabajo. Para el caso del TPS1 también se observan otras dos degradaciones: entorno a los 100°C que se atribuye al agua ambiental absorbida y entorno a los 230-280°C que corresponde a la degradación de plastificantes como el glicerol.

Este diferente comportamiento del polímero biodegradable en el monómero durante el curado corrobora los valores de propiedades mecánicas obtenidos. El PES no da lugar a un *composite* segregado y no incrementa su resistencia mecánica. Por el contrario los polímeros que no se solubilizan permanecen en su estructura particulada dentro del cemento manteniendo las propiedades mecánicas.

Para poder determinar la  $T_f$  y su  $\Delta H_f$  el polímero debe ser semicristalino. En la Tabla IV.5 se resumen los valores encontrados de  $T_f$  y  $\Delta H_f$ . Se han podido determinar todas las  $T_f$ , para las formulaciones modificadas con polímeros biodegradables, excepto para la TPS1-2. Los valores que se han obtenido de  $T_f$  son valores próximos a los de los propios polímeros en estado nativo, hecho que corrobora la segregación del polímero biodegradable en el PMMA.

En la Tabla IV.5 también se presentan los valores de la  $T_g$ . La  $T_g$  es una temperatura asociada a la fase amorfa de los polímeros. La  $T_g$  correspondiente a las perlas de PMMA utilizadas para obtener el cemento es de aproximadamente 115°C. En cambio la formulación control PMMA-2 refleja un valor de  $T_g$  unos 9°C inferior. Este hecho ya ha sido observado por Hanks y col<sup>49</sup> y se atribuye al

monómero residual que queda en la probeta sin reaccionar. El MMA actúa como un plastificante, debido a su bajo peso molecular, quedando embebido dentro de las cadenas poliméricas de PMMA. Para el caso de las formulaciones modificadas no se aprecia la  $T_g$ . Este hecho conduce a la utilización de otra técnica para poder cuantificar la temperatura de transición vítrea. La técnica utilizada es el DMTA.

En la Tabla IV.7 se presentan los valores obtenidos de  $T_g$  a través de DMTA para el primer y segundo barrido,  $T_g^{DMTA'}$  y  $T_g^{DMTA''}$ , respectivamente. Los valores de  $T_g^{DMTA}$  son ligeramente superiores a los conseguidos por DSC. Esto se debe a que las condiciones de ensayo son distintas. Mientras que para DSC la muestra no está sometida a esfuerzos mecánicos, para el caso de DMTA la muestra está expuesta a una fuerza oscilatoria, por lo que el estímulo térmico/mecánico que provoca la transición es diferente para ambos casos y se registran temperaturas diferentes.

En ningún caso los resultados de  $T_g$  obtenidos, independientemente del barrido, para las formulaciones modificadas con los polímeros biodegradables, ofrecen valores de la  $T_g$  superior a la formulación control. Los valores exhibidos por las formulaciones modificadas con polímeros son entre 6 y 12°C inferiores. Esta disminución puede ser atribuida a la formación de un *composite* multifásico basado en la parcial compatibilización de los componentes.

Los valores de  $T_g^{DMTA'}$  respecto  $T_g^{DMTA''}$  difieren en aproximadamente 4°C, siendo la  $T_g^{DMTA'}$  superior a la  $T_g^{DMTA''}$ . Nuevamente, este aumento de la  $T_g$  puede ser atribuido al monómero residual (Tabla IV.8) que durante el calentamiento del primer barrido termina de polimerizar aumentando de este modo la parte polimérica y disminuyendo el contenido de especies de bajo peso molecular que plastifican el material. Este hecho da lugar a un aumento de la  $T_g$  con respecto el primer barrido. La presencia de monómero residual en las formulaciones acrílicas también ha sido determinada por otros autores<sup>50,51</sup>, y ha sido considerada responsable de la citotoxicidad (muerte celular) de las células del tejido adyacente donde tiene lugar la implantación de la prótesis<sup>52</sup>.

La técnica de DMTA también nos ha permitido conocer el módulo de almacenamiento ( $E'$ ). En la Figura IV.7 se representa el  $E'$  frente la temperatura de las formulaciones acrílicas modificadas, PES-2, PHB-2, TPS1-2 y PLLA-1, y sus correspondientes controles, PMMA-2 y PMMA-1. En ningún caso las formulaciones modificadas alcanzan valores superiores a la formulación control, corroborando el estudio mecánico estático bajo esfuerzos a compresión y a tracción. Este hecho pone de manifiesto que las formulaciones modificadas tienen una menor rigidez al igual que lo ya demostrado mediante caracterización mecánica estática. Si tomamos como referencia los valores de  $E'$  de las distintas formulaciones, a 37°C se puede apreciar que para todas las formulaciones se obtienen valores superiores a 2750 MPa, excepto para la formulación PES-2, de la que se obtiene un valor de 1800 MPa. Este dato, nuevamente, pone de manifiesto que el PES no actúa como un agente de refuerzo, hecho que corrobora la hipótesis de la solubilización parcial del PES en el MMA durante el proceso de preparación de la probeta. En el resto de formulaciones el  $E'$  no alcanza el valor del control, aunque el valor del TPS1-2 alcanza el valor más elevado de las formulaciones que se obtienen con una relación sólido:líquido 2.

Ya que la aplicabilidad de estos materiales está relacionada con su capacidad de permanencia en un medio fisiológico, se ha estudiado su comportamiento en un medio fisiológico simulado. Así, diferentes muestras de cada material se han expuesto a un medio tamponado y a una temperatura fisiológica, 7,4 y 37°C, respectivamente. En estas condiciones se han determinado las capacidades de absorción de agua de cada material así como la posible pérdida de peso del mismo por acción física (disolución) o química (hidrólisis). Tal y como se puede observar en la Figura IV.8 todos los materiales formulados con polímeros biodegradables de naturaleza poliéster alifático (PHB, PES y PLLA) han dado como resultado valores muy bajos de capacidad de absorción de agua, los cuales no han estado en ningún caso superiores al 2% en peso, y no han mostrado diferencias significativas entre sus perfiles. Además este incremento de peso atribuido a la entrada de agua se obtiene en 1-2 días, por lo que con estos datos se puede afirmar que se trata de una adsorción superficial, donde el agua no tiene capacidad de entrar en el material. Este efecto se atribuye al carácter

hidrofóbico asociado a su larga cadena alifática, la cual no tiene presencia de grupos funcionales con capacidad de interactuar con el medio externo al pH de estudio. Por el contrario, la formulación TPS1-2 ha experimentado un considerable incremento de peso debido a la entrada de agua en la estructura. Se alcanza una absorción superior al 12% durante los primeros 10 días de estudio. Teniendo en cuenta que el almidón presenta 3 grupos funcionales hidroxilo por unidad estructural de la macromolécula, es fácilmente relacionable este incremento de la capacidad de absorción de agua con la polaridad del material. El periodo hasta alcanzar la máxima absorción y el valor elevado de ésta sugieren un mecanismo de absorción donde el agua penetra en el material.

Una observación más profunda del perfil de agua absorbida experimentado por la formulación TPS1-2 (Figura IV.8) revela que a partir de aproximadamente el décimo día de inmersión en la solución amortiguadora se produce una pérdida de peso del material. Dado que no cabe esperar un efecto de deshidratación, ya que el material se encuentra sumergido en el medio hídrico, este fenómeno se identifica con una pérdida de peso del mismo. En esta línea, las probetas utilizadas para el ensayo de absorción de agua se han secado, a 50°C, hasta pesada constante y se ha determinado el porcentaje de pérdida de peso respecto del peso inicial de la misma. La representación de esta pérdida de peso conforme transcurre el tiempo de inmersión se muestra en la Figura IV.9. Se aprecia que desde el primer momento del ensayo se produce una pérdida progresiva de peso en el material, que se compensa por la entrada de agua. Esta compensación resulta en el incremento de agua absorbida observado en la Figura IV.8 hasta el décimo día de inmersión. Pero una vez que el material ha llegado al equilibrio de máxima absorción de agua, el efecto global revela la pérdida de peso ya que el material va perdiendo peso desde el inicio del ensayo. Este efecto se atribuye a una parcial solubilización del polímero biodegradable en el medio de ensayo aunque un efecto hidrolítico no se puede descartar. Otros estudios demostraron que los componentes del almidón termoplástico que se solubilizan son los plastificantes, los cuales no aportan toxicidad a los lixiviados<sup>53,54</sup>.

Para confirmar esta hipótesis se han expuesto las muestras de TPS1-2 y de uno de los otros materiales que no ha experimentado pérdida de peso (PHB-2) durante 4 meses, en tampón fosfato y a 37°C, y se ha estudiado la superficie del material por SEM con el fin de determinar la naturaleza de la pérdida de peso. En las micrografías de la Figura IV.10 se resume el ensayo realizado. Las figuras a y b corresponden al material PHB-2 antes de sumergir y después de 4 meses de inmersión, respectivamente. Tal y como se puede apreciar, no existe ningún cambio físico en la superficie del material que indique un incremento de la porosidad del mismo debido a un proceso degradativo. De hecho el PHB requiere de al menos 350 semanas de inmersión en agua salada para dar lugar a la degradación de una pieza de este material de 1 mm de espesor<sup>55</sup>. Por el contrario, en las figuras c y d de la misma Figura IV.10, correspondientes a la formulación TPS1-2, se observa un incremento de porosidad en las zonas en las cuales se encontraba el almidón, dando lugar a una estructura porosa debida al proceso de eliminación del material. Este hecho confirma la pérdida de peso de este material observada a través del estudio *in vitro* y se atribuye a la solubilización de los plastificantes<sup>56</sup>.

A partir de los resultados obtenidos en las diferentes caracterizaciones se puede afirmar que la formulación que contiene TPS1 en su composición es la mejor candidata para realizar un estudio más amplio. El TPS1-2 ha ofrecido una resistencia a compresión superior 70 MPa junto con el PHB-2 y el PLLA-1, siendo el mínimo exigido por la norma ISO-5833<sup>43</sup>, aunque solo el TPS1-2 ha presentado una resistencia a la tracción superior a 30 MPa<sup>57,58</sup>. En lo que respecta a las propiedades de curado todas las formulaciones acrílicas autocurables con los polímeros biodegradables ofrecen temperaturas de curado inferiores a 90°C, máximo exigido por la norma ISO-5833<sup>43</sup>, pero al realizar el curado en DSC-isotermo el TPS1-2 es el que ofrece una menor  $\Delta H_c$  y un menor tiempo de curado. Por otro lado, los valores de CMR también han sido los más reducidos para la formulación TPS1-2. Finalmente, la capacidad de interactuar con el medio hídrico, produciendo cierta porosidad en las formulaciones permite considerar el TPS1 como un potencial sistema en aplicaciones tales como liberación controlada de medicamentos, sistema de crecimiento celular,..., hecho que motiva un estudio

más profundo para determinar los factores que afectan a su comportamiento en medio fisiológico. Por ello en el siguiente capítulo se estudiará con más profundidad.

#### **IV.4. BIBLIOGRAFÍA**

1. ASTM Standard D-5488-94, 2002, "Standard Terminology of Environmental Labeling of Packaging Materials and Packages". ASTM International, Withdrawn, PA, 2002, DOI: 10.1520/D5488-94DE01. [www.astm.org](http://www.astm.org).
2. Yuryev VP, Nemirosvkaya IE, Maslova TD. Phase state of starch gels at different water contents. *Carbohydr Polym.* 1995; 26(1): 43-6.
3. Shogren RL, Fanta GF, Doane WN. Development of starch based plastics, a reexamination of selected polymer systems in historical prospective. *Starch/Stärke.*1993; 45(8): 276-80.
4. Kenshi M, Noritaka K, Hidematsu S, Yoshiharu M, Yoshiyuki N. Thermal and viscoelastic properties of alginate/poly (vinyl alcohol) blends cross-linked with calcium tetraborate. *Carbohydr Polym.* 1999; 39(2): 139-44.
5. Vega D, Villar MA, Failla MD, Vallés EM. Thermogravimetric analysis of starch-based biodegradable blends. *Polymer Bulletin.* 1996; 37(2): 229-35.
6. Pal K, Banthia AK, Majumdar DK. Preparation of transparent starch based hydrogel membrane with potential application as wound dressing. *Trends in Biomaterials and Artificial Organs.* 2006; 20(1): 59-67.
7. Pereira CS, Cunha AM, Reis RL, Vazquez B, San Roman J. New starch-based thermoplastic hydrogels for use as bone cements or drug-delivery carriers. *J Mater Sci: Mater Med.* 1998; 9(12): 825-33.

8. Elvira C, Mano JF, San Romín J, Reis RL. Starch-based biodegradable hydrogels with potential biomedical applications as drug delivery systems. *Biomaterials*. 2002; 23(9): 1955-66.
9. Salgado AJ, Gomes ME, Chou A, Coutinho OP, Reis RL, Hutmacher DW. Preliminary study on the adhesion and proliferation of human osteoblasts on starch-based scaffolds. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2002; 20(1): 27-33
10. Gomes ME, Azevedo HS, Moreira AR, Ellä V, Kellomäki M, Reis RL. Starch-poly( $\epsilon$ -caprolactone) and starch-poly(lactic acid) fibre-mesh scaffolds for bone tissue engineering applications: Structure, mechanical properties and degradation behaviour. *J Tissue Eng Regen Med*. 2008; 2(5): 243-52.
11. Oliveira JTJ, Crawford AA, Mundy JMJ, Moreira ARA, Gomes MEM, Hatton PVP, et al. A cartilage tissue engineering approach combining starch-polycaprolactone fibre mesh scaffolds with bovine articular chondrocytes. *J Mater Sci Mater Med*. 2007; 18(2): 295-302.
12. Marques AP, Reis RL, Hunt JA. An In Vivo Study of the Host Response to Starch-Based Polymers and Composites Subcutaneously Implanted in Rats. *Macromol Biosci*. 2005; 5(8): 775-85.
13. Sultana N, Kadir MRA. Study of in vitro degradation of biodegradable polymer based thin films and tissue engineering scaffolds. *Afr J Biotechnol*. 2011; 10(81): 18709-15.
14. Zhang R, Ma PX. Poly(alpha-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J Biomed Mater Res* 1999; 44: 446-55.
15. Nejati E, Mirzadeh H, Zandi M. Synthesis and characterization of nanohydroxyapatite rods/poly(L-lactide acid) composite scaffolds for bone tissue engineering. *Compos Part A Appl Sci Manuf*. 2008; 39: 1589-96.

16. Su Y, Su Q, Liu W, Lim M, Venugopal JR, Mo X, et al. Controlled release of bone morphogenetic protein 2 and dexamethasone loaded in core-shell PLLA-Collagen fibers for use in bone tissue engineering. *Acta Biomater.* 2012; 8(2): 763-71.
17. Ravichandran R, Venugopal JR, Sundarrajan S, Mukherjee S, Ramakrishna S. Precipitation of nanohydroxyapatite on PLLA/PBLG/Collagen nanofibrous structures for the differentiation of adipose derived stem cells to osteogenic lineage. *Biomaterials.* 2012; 33(3): 846-55.
18. Ghaedi M, Soleimani M, Shabani, I, Duan Y, Lotfi AS. Hepatic differentiation from human mesenchymal stem cells on a novel nanofiber scaffold. *Cell Mol Biol Lett.* 2012; 17(1): 89-106.
19. Povolo S. Biosintesi di poliesteri di origine microbica: i poliidrossialcanoati di *Rhizobium* sp. Tesis doctoral. Bologna: Università degli Studi di Bologna, 1995.
20. Caraschi JC, Leão AL. Wood flour/polyhydroxybutyrate composites, *International Symposium on Natural Polymers and Composites.* Rio de Janeiro. 2000; 426-430.
21. Esposito AR, Duek EAR, Lucchesi C. Cytocompatibility of poly(p-dioxanone)/poly(hydroxybutic) (ppd/phb) blends to cartilage tissue engineering. *Polímeros-Ciencia e Tecnologia.* 2010; 20: 383-8.
22. Naveen N, Kumar R, Balaji S, Uma TS, Natrajan TS, Sehgal PK. Synthesis of nonwoven nanofibers by electrospinning - a promising biomaterial for tissue engineering and drug delivery. *Adv Eng Mater.* 2010; 12(8): B380-7.
23. Zhijiang C, Chengwei H, Guang Y. Poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate)/bacterial cellulose composite porous scaffold: Preparation, characterization and biocompatibility evaluation. *Carbohydr Polym.* 2012; 87(2): 1073-80.

24. Ahmed T, Marcal H, Lawless M, Wanandy NS, Chiu A, Foster LJ. Polyhydroxybutyrate and its copolymer with polyhydroxyvalerate as biomaterials: influence on progression of stem cell cycle. *Biomacromolecules*. 2010; 11(10): 2707-15.
25. Ma G, Yang D, Wang K, Han J, Ding S, Song G, et al. Organic-soluble chitosan/polyhydroxybutyrate ultrafine fibers as skin regeneration prepared by electrospinning. *J Appl Polym Sci*. 2010; 118(6): 3619-24.
26. Rathbone S, Furrer P, Lübben J, Zinn M, Cartmell S. Biocompatibility of polyhydroxyalkanoate as a potential material for ligament and tendon scaffold material. *J Biomed Mater Res*. 2010; 93A(4): 1391-403.
27. Paula ACC, Silva ARP, Zonari AAC, et al. New approach to human adipose stem cell seeded on PHB-HV scaffolds for bone tissue engineering applications. *Int J Artif Organs*. 2011; 34(8): 684.
28. Khorasani MT, Mirmohammadi SA, Irani S. Polyhydroxybutyrate (PHB) scaffolds as a model for nerve tissue engineering application: fabrication and in vitro assay. *Int J Polym Mater*. 2011; 60(8): 562-75.
29. Chen DR, Bei JZ, Wang SG, Polycaprolactone microparticles and their biodegradation. *Polym Degrad Stab*. 2000; 67: 455–9.
30. Sun HF, Mei L, Song CX, Cui XM, Wang PY. The in vivo degradation, absorption and excretion of PCL-based implant. *Biomaterials*. 2006; 27: 1735–40.
31. Hiltunen K, Seppälä J, Härkönen M. Lactic acid based poly(ester-urethane)s: The effects of different polymerization conditions on the polymer structure and properties *J Appl Polym Sci*. 1997; 64(5): 865-73.

32. Pitt CG, Chasalow FI, Hibionada YM, Klimas DM, Schindler A. Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) in vivo. *J Appl Polym Sci.* 1981; 26: 3779-87.
33. Ali SAM, Zhong SP, Doherty PJ, Williams DF. Mechanisms of polymer degradation in implantable devices: I. Poly(caprolactone). *Biomaterials.* 1993; 14: 648-56.
34. Engelberg I, Kohn J. Physico-mechanical properties of degradable polymers used in medical applications: A comparative study. *Biomaterials.* 1991; 12: 292-304.
35. Dinarvand P, Hashemi SM, Seyedjafari E, Shabani I, Mohammadi-Sangcheshmeh A, Farhadian S, et al. Function of poly (lactic-co-glycolic acid) nanofiber in reduction of adhesion bands. *J Surg Res.* 2012; 172(1): e1-e9.
36. Lim JS, Ki CS, Kim JW, Lee KG, Kang SW, Kweon HY, et al. Fabrication and evaluation of poly(epsilon-caprolactone)/silk fibroin blend nanofibrous scaffold. *Biopolymers.* 2012; 97(5): 265-75.
37. Song HH, Yoo MK, Moon HS, Choi YJ, Lee HC, Cho CS. A novel polycaprolactone/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering., *Key Eng. Mater.* 2007; 265–8.
38. Mohan N, Nair PD. Polyvinyl alcohol-poly(caprolactone) semi IPN scaffold with implication for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater.* 2008; 84(2): 584–94.
39. Gercek I, Tigli RS, Gumusderelioglu M. A novel scaffold based on formation and agglomeration of PCL microbeads by freeze-drying. *J Biomed Mater Res A.* 2008; 86(4): 1012–22.

40. Nisbet DR, Rodda AE, Horne MK, Forsythe JS, Finkelstein DI, Neurite infiltration and cellular response to electrospun polycaprolactone scaffolds implanted into the brain. *Biomaterials*. 2009; 30(27): 4573–80.
41. Andukuri A, Kushwaha M, Tambralli A, Anderson JM, Dean DR, Berry JL, et al. A hybrid biomimetic nanomatrix composed of electrospun polycaprolactone and bioactive peptide amphiphiles for cardiovascular implants. *Acta Biomater*. 2011; 7(1): 225–33.
42. Lowery JL, Datta N, Rutledge GC. Effect of fiber diameter, pore size and seeding method on growth of human dermal fibroblasts in electrospun poly(epsilon-caprolactone) fibrous mats. *Biomaterials*. 2009; 31(3): 491–504.
43. ISO Specification 5833. Standard specification for implants in surgery-acrylic resin cement. 1992.
44. Méndez JA, Abraham GA, Fernández MM, Vázquez B, San Román J. Self-curing acrylic formulations containing PMMA/PCL composites: properties and antibiotic release behaviour. *J Biomed Mat Res*. 2002; 61: 66-74.
45. Chen HL, Li LJ, Ou-Yang WC, Hwang JC, Wong WY. Spherulitic crystallization behavior of poly(ε-caprolactone) with a wide range of molecular weight. *Macromolecules*. 1997;30(6): 1718-22.
46. Vázquez B, Gallardo A, Elvira C, San Román J. Acrílicos, Estirenos. En: Garrido, L.; Ibarra, L.; Marco, C. *Ciencia y Tecnología de Materiales Poliméricos, Volumen II*. Madrid: Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros, CSIC; 2004. Capítulo II.
47. Furuta I, Kimura SI, Iwama M. *Polymer Handbook*. En: Brandrup J, Immergut EH, Grulke EA, editores. New York: John Wiley & Sons; 1999: 4ª edición. Capítulo V

48. Matsuda N, Shirasaka H, Takayama K, Ishikawa T, Takeda K. Thermal degradation and flame retardancy of ethylen-vinyl alcohol copolymer blend with amonium polyphosphate. *Polymer Degradation and Stability*. 2003; 79: 13-20.
49. Hanks CT, Kohn D, Koran A, O'Brien WJ, Powers JM, Wagner WC, Wataha JC. Restorative dental materials. En: Craig RG, Harcourt Brace, editores. St. Louis, 1997:10ª edición.
50. Méndez JA, Fernández M, González-Corchón A, Salvado M, Collía F, de Pedro JA, et al. Injectable self-curing bioactive acrylic-glass composites charged with specific anti-inflammatory/analgesic agent. *Biomaterials*. 2004; 25(12): 2381-92.
51. Vallo CI, Montemartini PE, Cuadrado TR. Effect of residual monomer content on some properties of a poly(methyl methacrylate)-based bone cement. *J Appl Polym Sci*. 1998; 69(7): 1367-83.
52. Kindt-Larsen T, Smith DB, Jensen JrS. Innovations in acrylic bone cement and application equipment. *J App Biomater*. 1995; 6(1): 75-83.
53. Bastioli C. Properties and applications of Mater-Bi starch-based materials. *Polym Degrad Stab*. 1998; 59: 263–72.
54. Mani R, Bhattacharya M. Properties of injection moulded blends of starch and modified biodegradable polyesters. *Eur Polym J*. 2001; 37: 515–26.
55. Hocking PJ, Marchessault RH. Polyhydroxyalkanoates. En: Kaplan DL, editores. *Biopolymers from Renewable Resources*. New York: Springer; 1998. Pág. 220-244.
56. Azevedo HS, Gama FM, Reis RL. In vitro assessment of the enzymatic degradation of several starch based biomaterials. *Biomacromolecules*. 2003; 4: 1703-1712.

57. Vargas R, Cervantes JM, Cauich JV, Vera R, Martinez A. Estudio de las propiedades de cementos óseos preparados con metacrilatos funcionalizados e hidroxiapatita. *Rev Mex Ing Biomed.* 2001; 22: 54–60.
58. Temenoff JS, Mikos AG. Injectable biodegradable materials for orthopaedic tissue engineering. En: Reis RL, Cohn D, editores. *Polymer based systems on tissue engineering, replacement and regeneration.* Dordrecht: Kluwer; 2001.

---

**CAPÍTULO V.**  
**DISEÑO DE SISTEMAS**  
**AUTOCURABLES DE LIBERACIÓN**  
**CONTROLADA DE BISFOSFONATOS**  
**DE TERCERA GENERACIÓN**

---

## V.1. INTRODUCCIÓN

A partir de los resultados obtenidos en el capítulo anterior se decide desarrollar un estudio más ampliado con el almidón termoplástico (TPS) ya que es el material que presenta propiedades mecánicas moderadas bajo los dos tipos de esfuerzos ensayados y un favorable comportamiento *in vitro*, demostrados mediante SEM, para la liberación controlada de especies activas.

En este estudio se evaluará la influencia de la composición del almidón termoplástico así como el tamaño de partícula añadido a la formulación autocurable. En todos los casos la composición en almidón del material termoplástico será constante y representará el 33% p/p respecto del peso total del cemento. Posteriormente las formulaciones se modificarán con bisfosfonatos de 3ª generación para estudiar su capacidad de liberación para el tratamiento de la osteoporosis.

### V.1.1. BISFOSFONATOS

Los bisfosfonatos son compuestos sintéticos estructuralmente análogos a los pirofosfatos, donde el átomo de oxígeno se ha sustituido por el átomo de carbono (Figura V.1), quedando libres las dos valencias del carbono que se sustituyen por R y R'. El hecho de poseer el átomo de carbono hace que los bisfosfonatos sean difícilmente biodegradables, y por dicha razón son absorbidos, almacenados y excretados por el organismo sin metabolizar.

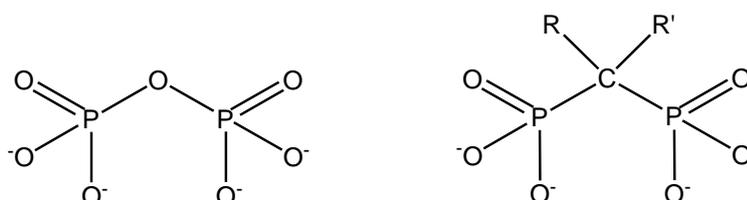


Figura V.1. Estructura química del pirofosfato (izda) y del bisfosfonato (dcha).

Los bisfosfonatos son medicamentos que se usan para ayudar a fortalecer los huesos y reducir el riesgo de fracturas<sup>1,2</sup>. Adicionalmente se administran para reducir el dolor óseo (dorsalgia en el caso de la columna vertebral) siempre que la patología no sea de tipo oncológico. Además, también pueden ayudar a combatir la reducción de la densidad de los huesos (osteoporosis)<sup>3</sup> que se puede presentar a causa del tratamiento con inhibidores de la aromatasa<sup>4</sup>.

Los bisfosfonatos, en función de los sustituyentes R y R', se pueden clasificar en tres grupos<sup>5</sup>. Los bisfosfonatos de primera generación (medronato, clodronato y etidronato) son los que no contienen nitrógeno en sus cadenas laterales. Los de segunda generación (alendronato, pamidronato) y los de tercera generación (ibandronato, risedronato y zolendronato) son los bisfosfonatos nitrogenados y más potentes que los de primera generación. En la Figura V.2 se detallan las estructuras químicas de los distintos bisfosfonatos anteriormente mencionados.

En el hueso, los bisfosfonatos se encuentran unidos con alta afinidad a los cristales de hidroxapatita de la superficie ósea, inhibiendo su rotura. Desde aquí se absorben rápidamente y se dirigen principalmente hacia áreas de remodelación activa, actuando como potentes inhibidores de la resorción ósea. Los bisfosfonatos también impiden la formación de cristales de fosfato de calcio e inhiben la apoptosis de osteocitos y osteoblastos<sup>6,7</sup>.

La forma de administración y dosificación varía entre los distintos tipos de bisfosfonatos. En la Tabla V.1 se presentan los distintos tipos de bisfosfonatos que se comercializan en nuestro país junto con su nombre comercial, forma de administración (oral, iv (intravenosa), d (diaria), m (mensual) y trim (trimestral)) y la dosificación. También se presenta la potencia que presenta cada uno de ellos con respecto al etidronato, que se ha tomado como valor de referencia igual a 1<sup>5</sup>.

*Tabla V.1. Bisfosfonatos comercializados en nuestro país, potencia, tipo de presentación y dosificación.*

<b>Bisfosfonato</b>	<b>Potencia</b>	<b>Presentación</b>	<b>Nombre comercial</b>	<b>Dosificación</b>
<b>Etidronato</b>	1	Oral (d)	Difosfen®	200 mg
<b>Pamidronato</b>	100	iv (m)	Aredia®	30 mg
<b>Alendronato</b>	1.000	Oral (s)	Fosamax®	70 mg
<b>Risendronato</b>	5.000	Oral (s)	Actonel®	35 mg
		Oral (m)	Acral®	75 mg
<b>Ibandronato</b>	10.000	Oral (m)	Bonviva®	150 mg
		iv (trim)	Bonviva®	3 mg
<b>Zolendronato</b>	20.000	iv (m)	Zometa®	4 mg
			Aclasta®	5 mg

Independientemente del tipo de bisfosfonatos, sólo los que son administrados por vía intravenosa poseen una biodisponibilidad del 100%, mientras que si se toman por vía oral tienen una biodisponibilidad del 1 al 5% y tan solo, aproximadamente el 50-80% del bisfosfonato disponible es absorbido por el hueso<sup>8</sup>. Esto es debido a que cuando se administra por vía oral la absorción se realiza por difusión pasiva en el estómago y en el intestino y disminuye si éste se ingiere con algún tipo de alimento. La vida media en el plasma es tan solo de 1-2 horas, mientras que los bisfosfonatos en el hueso suelen persistir muchos años<sup>9</sup>.

Para este trabajo se ha escogido el ibandronato de Bonviva® ya que administrado en dosis oral, es el que presenta una mayor potencia con un intervalo de tiempo superior entre cada administración. Se pretende incorporar el ibandronato en la zona directamente afectada por la patología para aumentar su biodisponibilidad. Las distintas formulaciones autocurables preparadas se han caracterizado siguiendo las metodologías descritas en el capítulo III. Finalmente,

se evaluará la cinética de liberación del ibandronato para determinar su capacidad de liberación en el tratamiento de la osteoporosis.

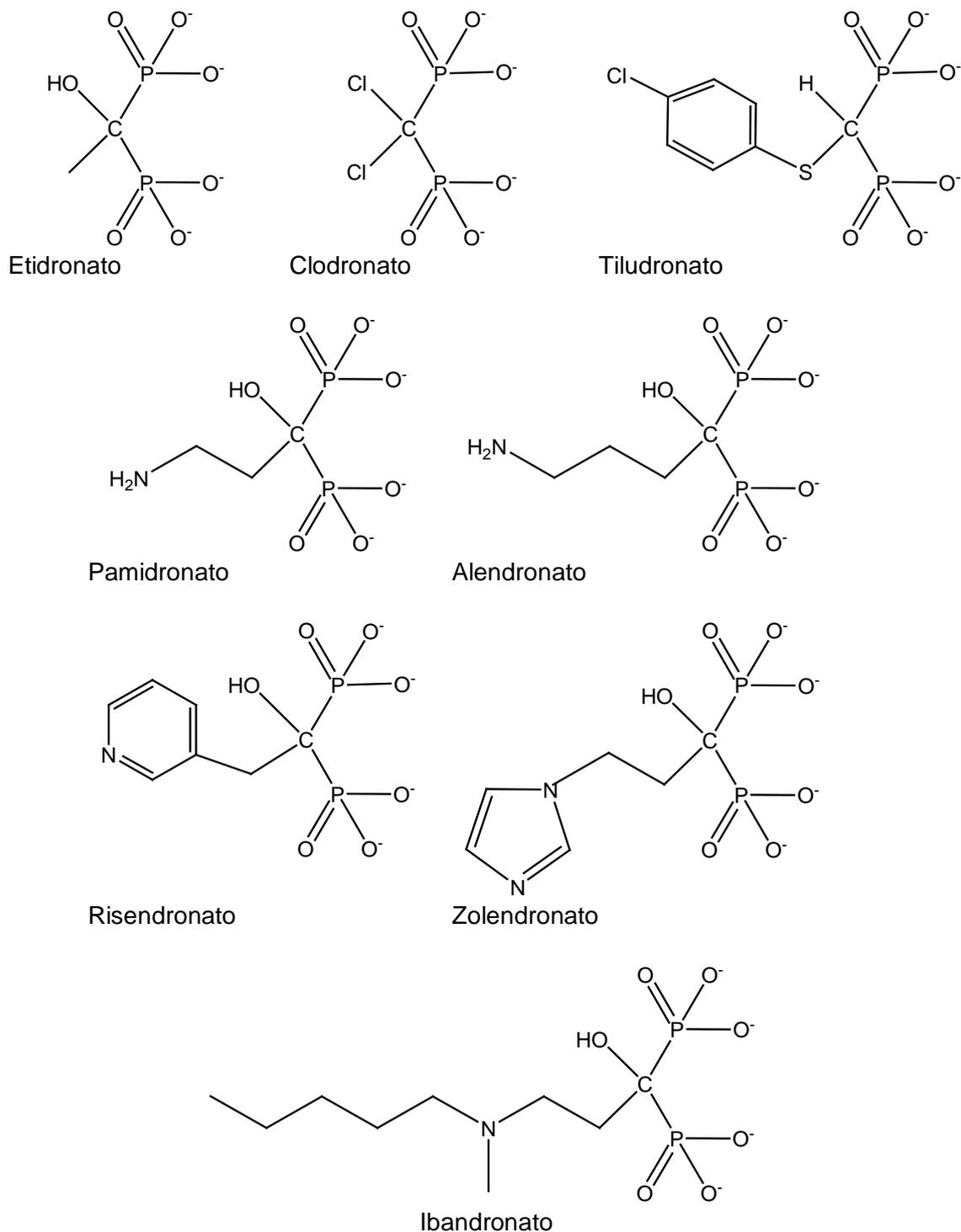


Figura V.2. Estructura molecular de los bisfosfonatos.

## V.2. RESULTADOS

Para este estudio se han empleado dos tipos de almidón termoplástico comercial, Mater-Bi (TPS1) y Avebe (TPS2), de los cuales se tomaron muestras con distintos tamaños de partícula (300, 150 y 75  $\mu\text{m}$ ). La composición final del TPS en la formulación acrílica autocurable es, al igual que en el estudio del capítulo anterior, el 33% respecto del peso total. En la Tabla V.2 se presenta la composición de las diferentes formulaciones empleadas (expresadas en tanto por ciento en peso), así como también la nomenclatura utilizada para su denominación.

*Tabla V.2. Composición de las formulaciones acrílicas.*

Formulación	Relación s:l	Fase sólida			Fase líquida		Contenido total TPS
		PMMA <sup>a</sup>	PB <sup>a</sup>	BPO <sup>a</sup>	MMA <sup>b</sup>	BZN <sup>b</sup>	
<b>PMMA-2</b>	2:1	98,5	-	1,5	99	1	0
<b>PMMA-1,5</b>	1,5:1	98,5	-	1,5	99	1	0
<b>PMMA-1</b>	1:1	98,5	-	1,5	99	1	0
<b>TPS1-300-2</b>	2:1	49,2	49,3	1,5	99	1	33
<b>TPS1-150-1,5</b>	1,5:1	43,5	55,0	1,5	99	1	33
<b>TPS1-75-1</b>	1:1	32,5	43,5	1,5	99	1	33
<b>TPS2-300-2</b>	2:1	49,2	49,3	1,5	99	1	33
<b>TPS2-150-1,5</b>	1,5:1	43,5	55,0	1,5	99	1	33
<b>TPS2-75-1</b>	1:1	32,5	66,0	1,5	99	1	33

a. Tanto por ciento en peso respecto a la fase sólida.

b. Tanto por ciento en peso respecto a la fase líquida.

### V.2.1. CARACTERIZACIÓN SUPERFICIAL

Se ha desarrollado un estudio microscópico (SEM) con el fin de analizar la incorporación/compatibilización de los diferentes tamaños de partículas (300, 150 y 75  $\mu\text{m}$ , obtenidos tras triturarlos y tamizarlos) en la formulación acrílica autocurable. En la Figura V.3 se presentan las microfotografías SEM realizadas al material TPS-1 con sus distintos tamaños de partícula en estado virgen y tras obtener el cemento.

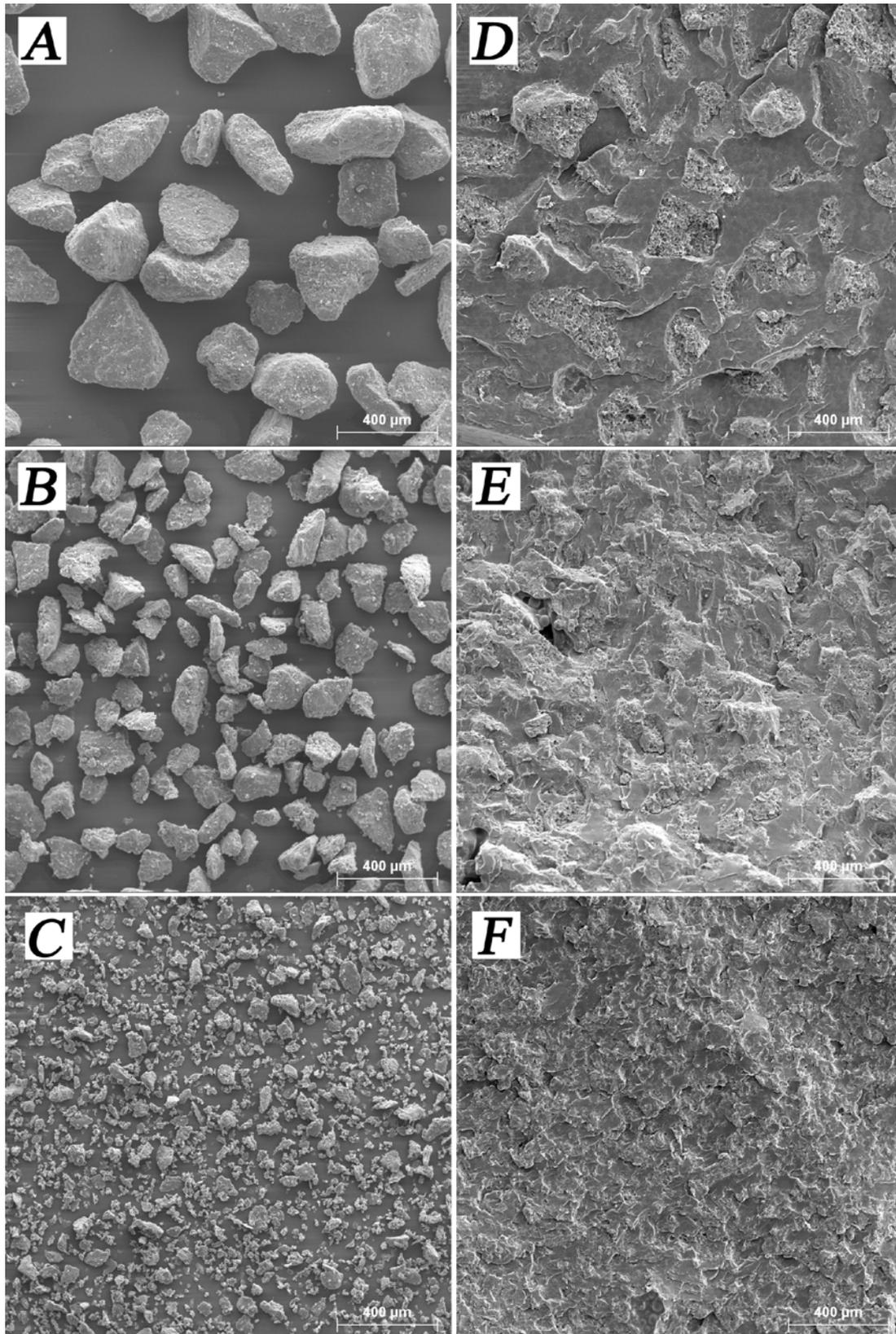


Figura V.3. Microfotografías SEM de los TPS1 con su correspondiente cemento con distintos tamaño de partícula.  
(A) y (D) 300 μm; (B) y (E) 150 μm y (C) y (F) 75 μm

## V.2.2. PROPIEDADES MECÁNICAS

Las propiedades mecánicas se evalúan a compresión y a tracción. El ensayo de compresión se realiza con probetas secas y con probetas incubadas a diferentes tiempos de inmersión, 2 y 16 semanas, en solución de tampón fosfato a pH 7,4 y a 37°C, para simular condiciones fisiológicas. El estudio a compresión ha permitido determinar la resistencia a rotura en compresión ( $\sigma_C$ ), y el módulo elástico a compresión ( $E_C$ ). En las figuras: Figura V.4 y Figura V.5, se presentan los resultados obtenidos, junto con la barra de error que corresponde a la desviación estándar, para las distintas formulaciones modificadas con los almidones termoplásticos TPS1 y TPS2.

En cuanto al ensayo de tracción las propiedades que se han medido son la resistencia máxima a tracción ( $\sigma_T$ ), la deformación a la rotura ( $\varepsilon_T$ ), y el módulo de Young ( $E_T$ ) en estado seco. En la Tabla V.3 se presentan los valores que se obtuvieron para el ensayo a tracción, tanto para las formulaciones modificadas con TPS1 y TPS2, así como también para los materiales TPS1 y TPS2 comerciales y procesados mediante inyección en forma de alterios según la norma ISO-527-1<sup>10</sup>. Todos ellos se representan junto con su desviación estándar (entre corchetes).

*Tabla V.3. Valores de propiedades mecánicas en tracción.*

<b>Formulación</b>	<b><math>\sigma_T</math> (MPa)</b>	<b><math>\varepsilon_T</math> (%)</b>	<b><math>E_T</math> (GPa)</b>
<b>TPS1</b>	30,6 [0,1]	2,0 [0,0]	2,85 [0,01]
<b>TPS1-300-2</b>	34,9 [2,9]	3,3 [0,2]	1,70 [0,30]
<b>TPS1-150-1.5</b>	23,5 [1,9]	1,8 [0,1]	1,54 [0,04]
<b>TPS1-75-1</b>	14,6 [2,6]	1,4 [0,2]	1,40 [0,12]
<b>TPS2</b>	4,8 [0,1]	9,4 [0,5]	0,13 [0,00]
<b>TPS2-300-2</b>	21,9 [3,9]	2,3 [0,5]	1,62 [0,06]
<b>TPS2-150-1.5</b>	21,5 [3,5]	2,2 [0,3]	1,50 [0,04]
<b>TPS2-75-1</b>	17,9 [0,6]	2,0 [0,1]	1,4 [0,10]

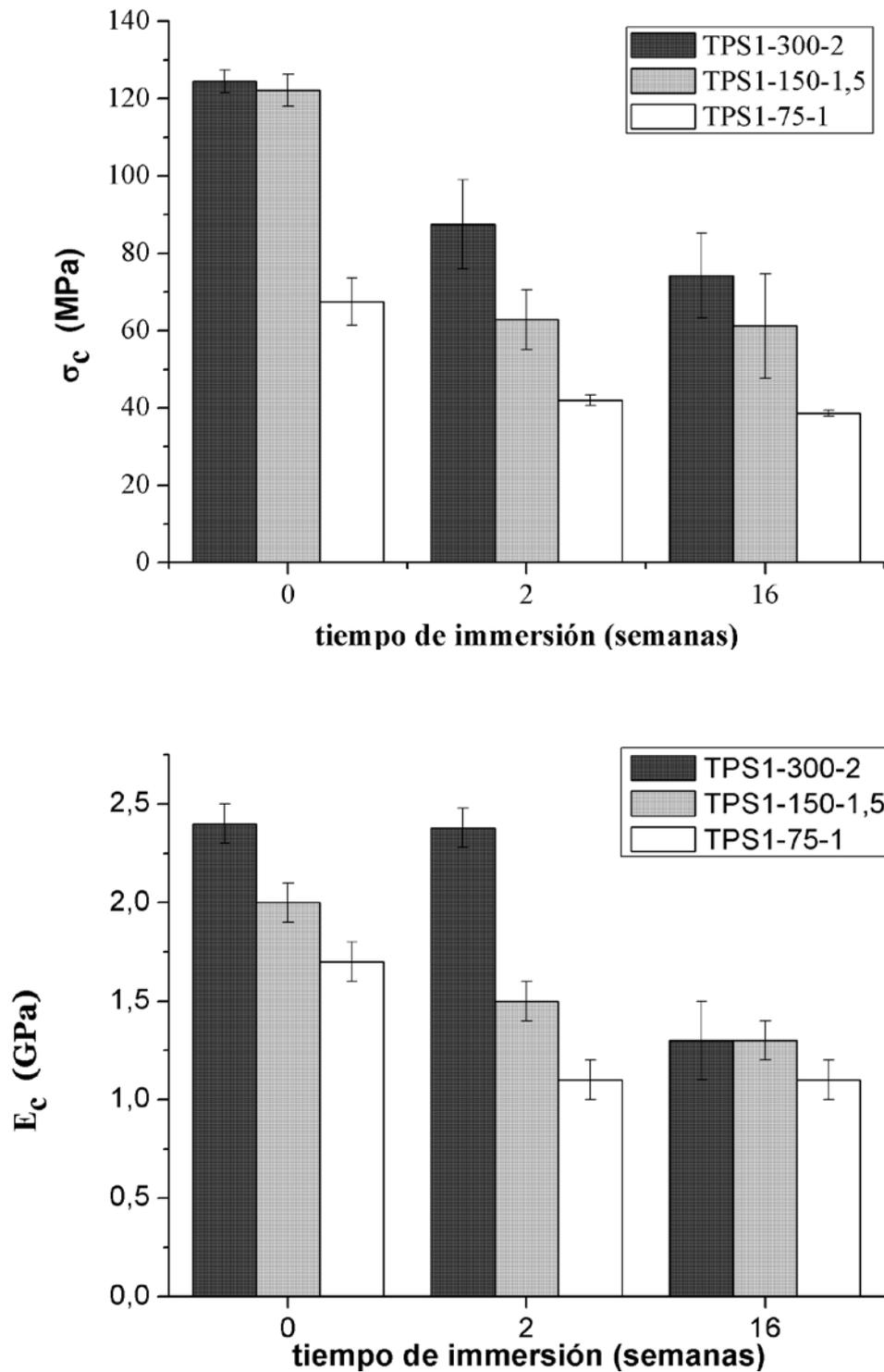


Figura V.4. Propiedades mecánicas a compresión de las formulaciones modificadas con TPS, resistencia a compresión (arriba) y módulo elástico a compresión (debajo).

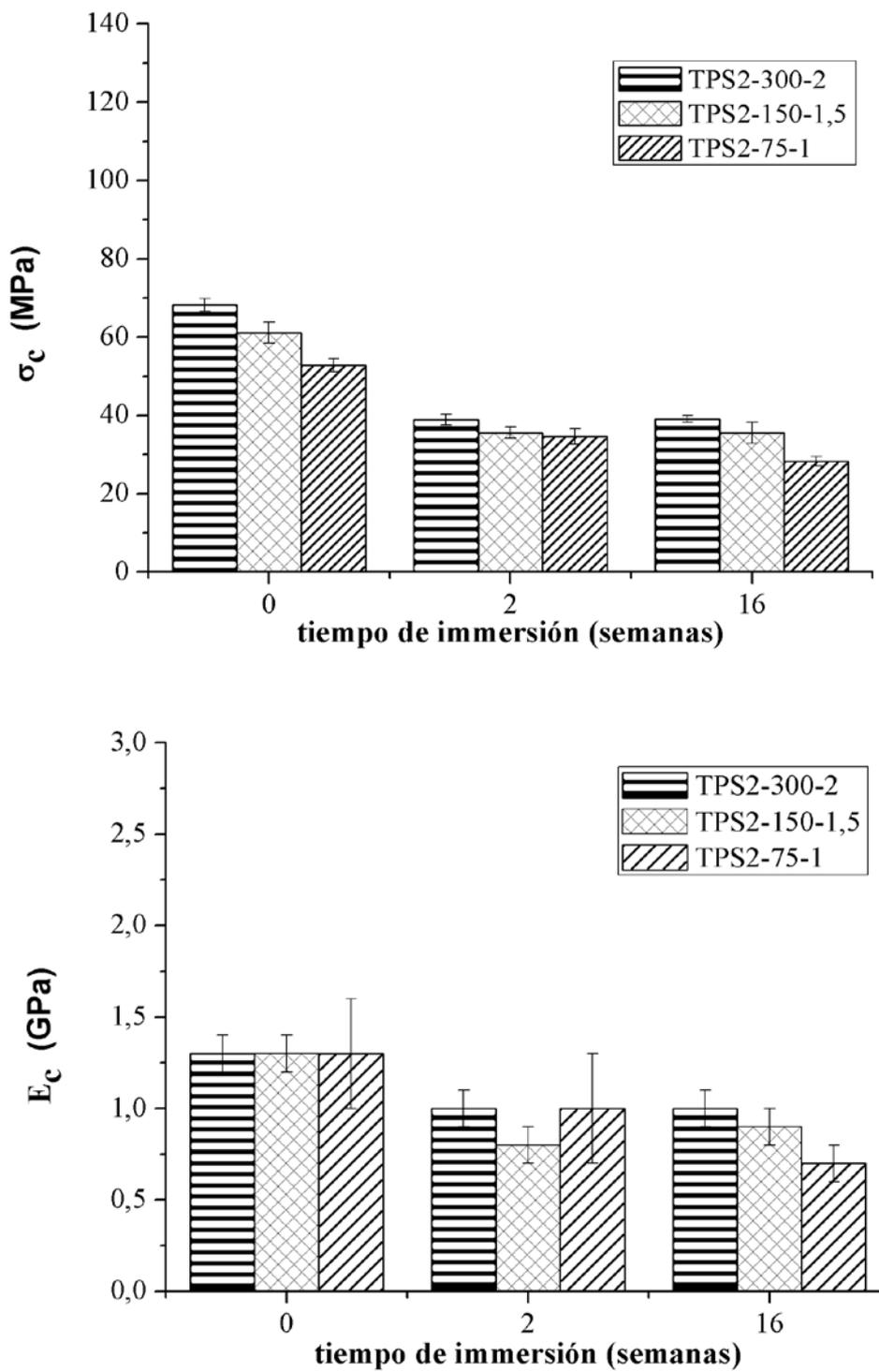


Figura V.5. Propiedades mecánicas a compresión de las formulaciones modificadas con TPS2, resistencia a compresión (arriba) y módulo elástico a compresión (debajo).

### V.2.3. ANÁLISI TERMOGRAVIMÉTRICO (TGA)

En la Figura V.6 se exhiben los perfiles de degradación térmica obtenidos para los distintos materiales formulados con TPS1 y TPS2.

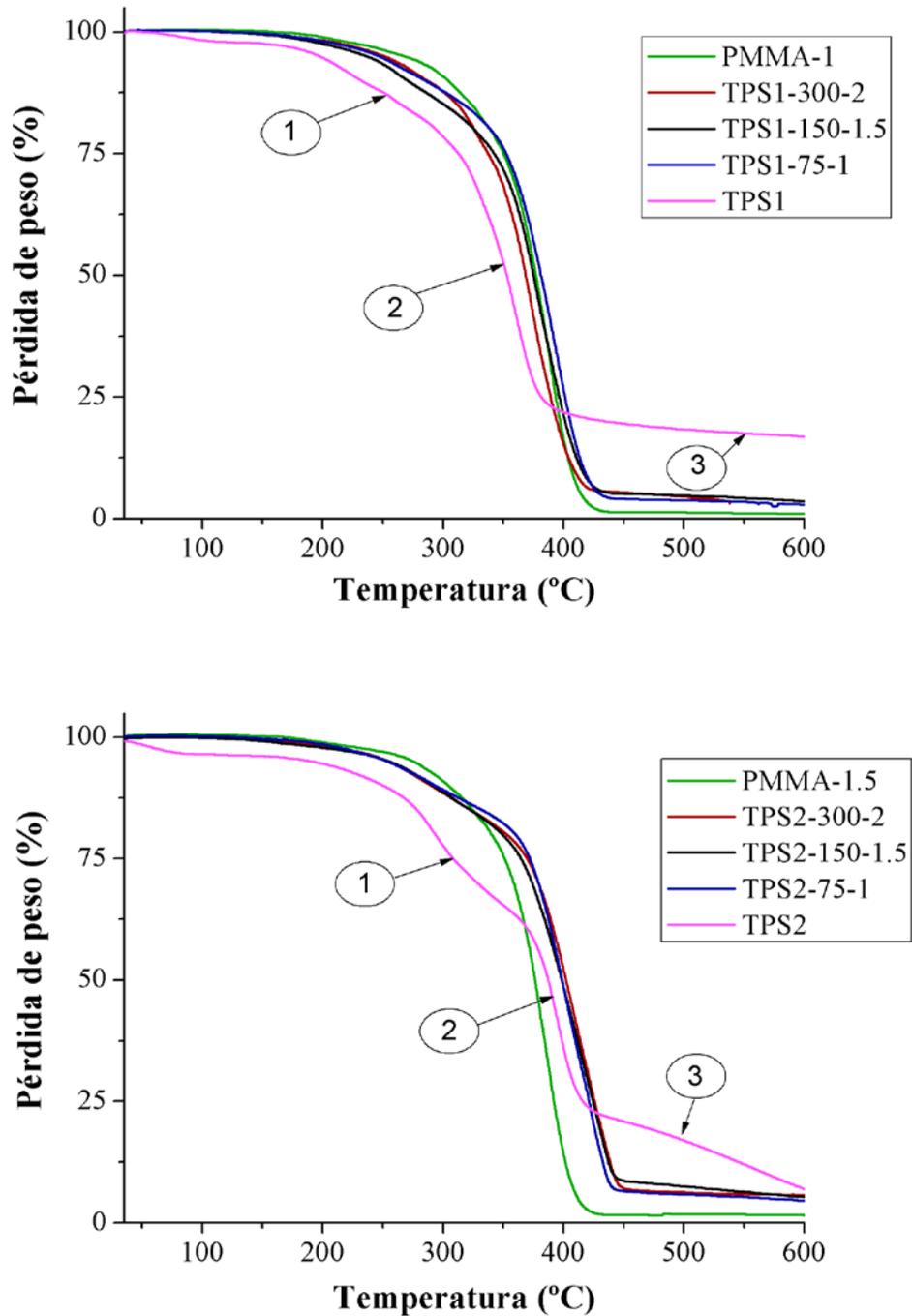


Figura V.6. Perfiles de degradación térmica de los materiales formulados con TPS1 (arriba) y TPS2 (debajo).

A modo de resumen, en la Tabla V.4 se presentan los valores obtenidos de la temperatura inicial de degradación ( $T_{d,i}$ ) y la temperatura máxima de degradación ( $T_{d,máx}$ ) obtenidos mediante la primera derivada de la curva de degradación térmica de cada una de las formulaciones y los correspondientes TPS en estado virgen.

Tabla V.4. Valores de las temperaturas de degradación térmica según la primera derivada.

Formulación	1ª degradación		2ª degradación	
	$T_{d,i}$	$T_{d,máx}$	$T_{d,i}$	$T_{d,máx}$
PMMA-2	318	373	-	-
PMMA-1.5	335	386	-	-
PMMA-1	339	388	-	-
TPS1	133	207	283	355
TPS1-300-2	234	-	320	374
TPS1-150-1.5	219	265	334	383
TPS1-75-1	241	-	328	394
TPS2	248	288	349	395
TPS2-300-2	227	286	345	410
TPS2-150-1.5	237	292	339	421
TPS2-75-1	240	284	347	422

#### V.2.4. CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

**DSC-dinámico.** La técnica de DSC en modo dinámico ha permitido estudiar las propiedades térmicas de los distintos materiales. Se ha evaluado la temperatura de transición vítrea ( $T_g^{DSC}$ ), el intervalo de la transición ( $\Delta T_g^{DSC}$ ), la temperatura de fusión ( $T_f$ ) y la entalpía de fusión ( $\Delta H_f$ ). En la Figura V.7 se muestran los perfiles de flujo de calor normalizado vs temperatura para determinar la  $T_g$ .

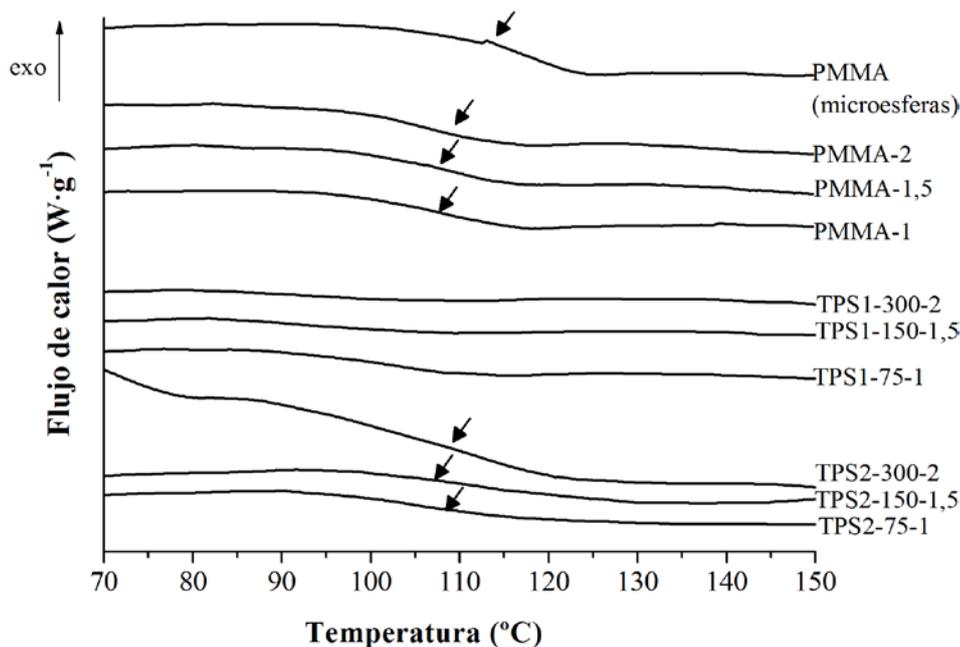


Figura V.7. Variación de la  $T_g$  en función de la temperatura.

No ha sido posible determinar la  $T_g$  para todas las formulaciones modificadas con TPS. Los valores de  $T_g$  que han podido ser determinados han sido marcados en la Figura V.7 y se recogen en la Tabla V.5. Adicionalmente se muestran también los valores de  $T_f$  y  $\Delta H_f$  de los almidones termoplásticos puros.

Tabla V.5. Valores  $T_g^{DSC}$  para el ensayo DSC.

Formulación	$T_g^{DSC}$ (°C)	$\Delta T_g^{DSC}$ (°C)	$T_f$ (°C)	$\Delta H_f$ (J·g <sup>-1</sup> )
PMMA	115,6	13,8	-	-
PMMA-2	106,5	15,7	-	-
PMMA-1.5	106,2	18,6	-	-
PMMA-1	107,0	18,5	-	-
TPS1	-	-	107,4	144,8
TPS1-300-2	-	-	-	-
TPS1-150-1.5	-	-	-	-
TPS1-75-1	100,4	19,8	-	-
TPS2	-	-	110,1	191,6
TPS2-300-2	105,3	19,9	-	-
TPS2-150-1.5	106,1	17,1	-	-
TPS2-75-1	106,8	23,1	-	-

**DSC-isotérmico.** A partir de la técnica DSC en modo isotérmico, a 25°C, se realiza el estudio de las propiedades de curado de las formulaciones modificadas con almidones termoplásticos comerciales. Para ello se evalúa la entalpía de curado ( $\Delta H_c$ ), el tiempo inicial y final de la exoterma ( $t_i$ ) y ( $t_f$ ), respectivamente, así como su intervalo ( $\Delta t$ ) y el tiempo en el que se observa el máximo de energía ( $t_p$ ).

Tabla V.6. Valores de curado mediante DSC-isotérmico a 25°C.

Formulación	$\Delta H_c$ (J·g <sup>-1</sup> )	$t_i$ (min)	$t_p$ (min)	$t_f$ (min)	$\Delta t$ (min)
PMMA-2	69,3	4,7	11,2	18,7	14,0
PMMA-1.5	108,1	6,4	11,9	17,4	11,0
PMMA-1	117,0	10,3	17,6	24,8	14,5
TPS1-300-2	59,2	6,3	10,5	13,4	7,1
TPS1-150-1.5	72,6	5,2	9,8	15,4	10,2
TPS1-75-1	117,0	8,6	14,3	19,3	10,7
TPS2-300-2	56,2	5,2	9,5	15,4	10,2
TPS2-150-1.5	72,6	5,2	9,8	15,4	10,2
TPS2-75-1	117,2	8,6	14,3	19,3	10,7

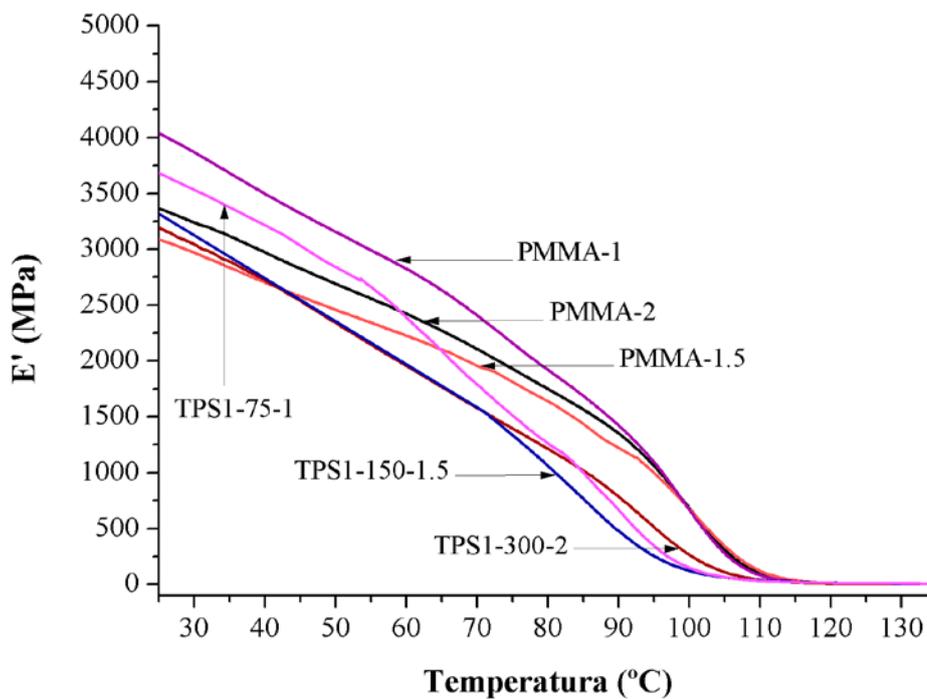
### V.2.5. ANÁLISIS TÉRMICO MECANODINÁMICO (DMTA)

Mediante el análisis térmico mecanodinámico (DMTA) se caracteriza la temperatura de transición vítrea ( $T_g^{DMTA}$ ) de todas las formulaciones. Se realizan dos barridos obteniéndose  $T_g^{DMTA'}$  y  $T_g^{DMTA''}$  correspondientes al primer y segundo barrido respectivamente. En la Tabla V.7 se presentan los valores de  $T_g$ .

Tabla V.7. Valores de  $T_g$  para el ensayo DMTA.

Formulación	$T_g^{DMTA'}$ (°C)	$T_g^{DMTA''}$ (°C)
PMMA-2	122,5	125,8
PMMA-1.5	123,8	126,2
PMMA-1	124,8	128,7
TPS1-300-2	116,0	116,7
TPS1-150-1.5	115,5	117,0
TPS1-75-1	114,1	118,6
TPS2-300-2	120,4	123,4
TPS2-150-1.5	118,0	124,0
TPS2-75-1	117,4	125,8

Mediante el ensayo de DMTA también se obtienen los perfiles del módulo de almacenamiento ( $E'$ ) en función de la temperatura a una frecuencia constante de 1 Hz. En la Figura V.9 se muestran las tendencias de  $E'$  para las formulaciones modificadas con TPS1 y TPS2.

Figura V.8. Perfiles del  $E'$  de las formulaciones TPS1.

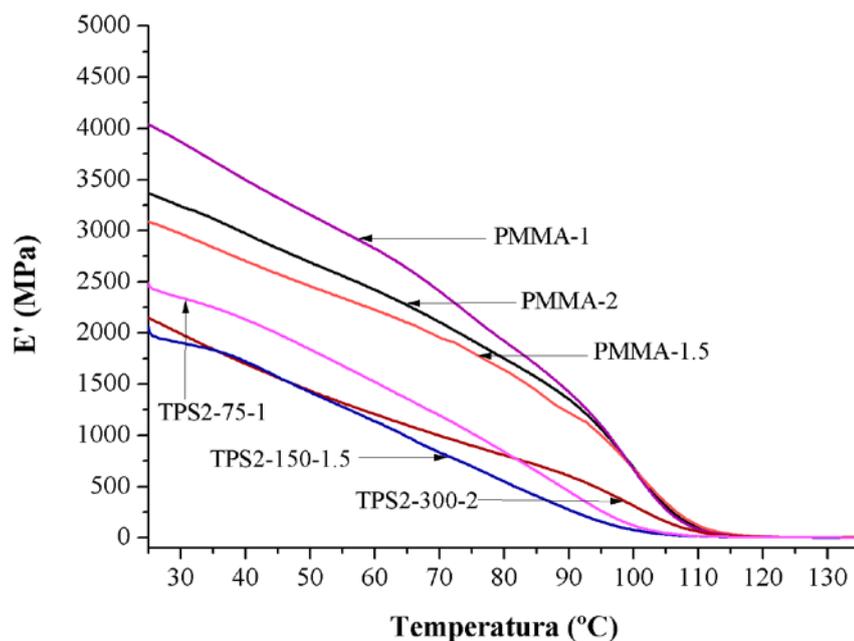


Figura V.9. Perfiles del  $E'$  de las formulaciones TPS2.

## V.2.6. MONÓMERO RESIDUAL

Los contenidos en monómero residual (CMR) para las diferentes formulaciones se muestran en la Tabla V.8. Tal y como se observa, las formulaciones que presentan valores más elevados de CMR son las que presentan más fase líquida con respecto a la fase sólida.

Tabla V.8. Valores de contenido de monómero residual.

Formulación	CMR (%)	
	$^1\text{H-RMN}$	GC
PMMA-2	1,80	0,40 [0,02]
PMMA-1.5	2,01	0,60 [0,02]
PMMA-1	2,76	1,10 [0,03]
TPS1-300-2	1,66	2,16 [0,67]
TPS1-150-1.5	1,69	2,97 [0,05]
TPS1-75-1	7,78	3,50 [0,06]
TPS2-300-2	0,90	1,05 [0,04]
TPS2-150-1.5	1,83	2,51 [0,03]
TPS2-75-1	2,48	2,86 [0,03]

### V.2.7. PARÁMETROS DE CURADO

El estudio de los parámetros de curado, según norma ISO-5833<sup>11</sup>, temperatura máxima ( $T_{máx}$ ) y tiempo de fraguado ( $t_{fraguado}$ ), para las distintas formulaciones se presenta en la Tabla V.9.

Tabla V.9. Parámetros de curado.

Formulación	$T_{máx}$ (°C)	$t_{fraguado}$ (min)
PMMA-2	75,6 [1,1]	8,9 [0,5]
PMMA-1.5	87,7 [0,7]	13,7 [0,8]
PMMA-1	92,3 [1,1]	14,4 [0,9]
TPS1-300-2	60,3 [1,3]	8,9 [0,2]
TPS1-150-1.5	55,6 [0,2]	12,1 [0,5]
TPS1-75-1	54,4 [0,5]	13,4 [0,7]
TPS2-300-2	65,7 [0,1]	8,4 [0,4]
TPS2-150-1.5	68,8 [1,1]	10,0 [0,2]
TPS2-75-1	65,9 [0,5]	14,4 [1,0]

### V.2.8. COMPORTAMIENTO *IN VITRO*

En la Tabla V.10 se muestran, para las formulaciones modificadas con los dos tipos de TPS, los valores máximos de absorción de agua ( $H_{hid}$ ) y pérdida de peso ( $P_p$ ), junto con su desviación estándar entre corchetes, después de mantener las probetas incubadas hasta 30 días en tampón fosfato a pH 7,4 y a 37°C, simulando condiciones fisiológicas.

Tabla V.10. Valores máximos de hidratación ( $H_{hid}$ ) y pérdida de peso ( $P_p$ ).

Formulación	$H_{hid}$ (%peso)	$P_p$ (% peso)
TPS1-300-2	12,0 [0.5]	4.5 [0.5]
TPS1-150-1.5	13.6 [0.4]	6.9 [1.1]
TPS1-75-1	15.3 [1.0]	9.2 [0.4]
TPS2-300-2	8.6 [0.8]	5.8 [0.1]
TPS2-150-1.5	11.2 [1.4]	6.7 [0.4]
TPS2-75-1	13.1 [1.1]	9.1 [1.0]

### V.2.9. LIBERACIÓN IBANDRONATO

En las figuras, Figura V.10 y en la Figura V.11, se presentan los perfiles de liberación de ibandronato para las formulaciones modificadas con los almidones termoplásticos TPS1 y TPS2.

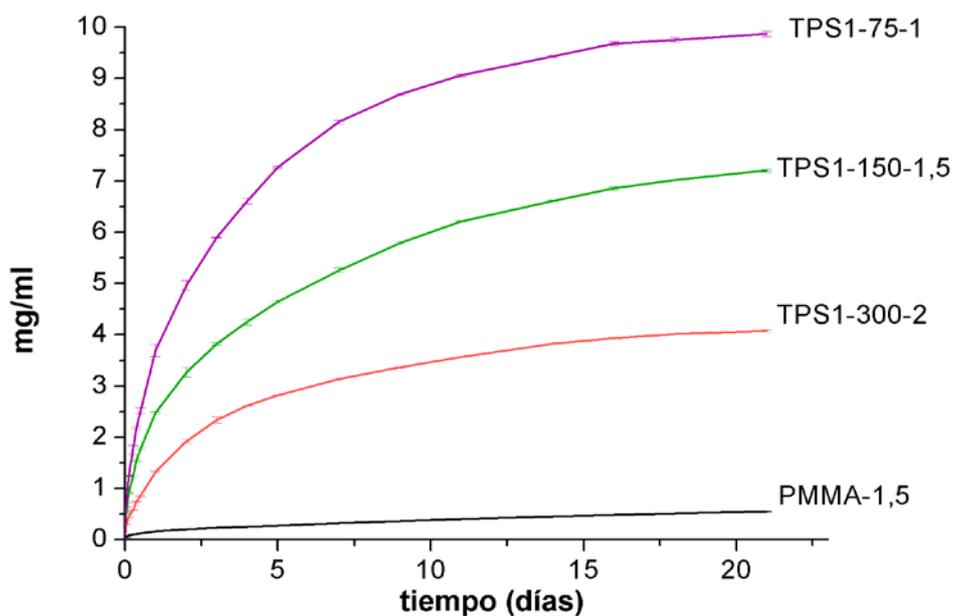


Figura V.10. Perfiles de liberación de ibandronato para la formulación TPS1.

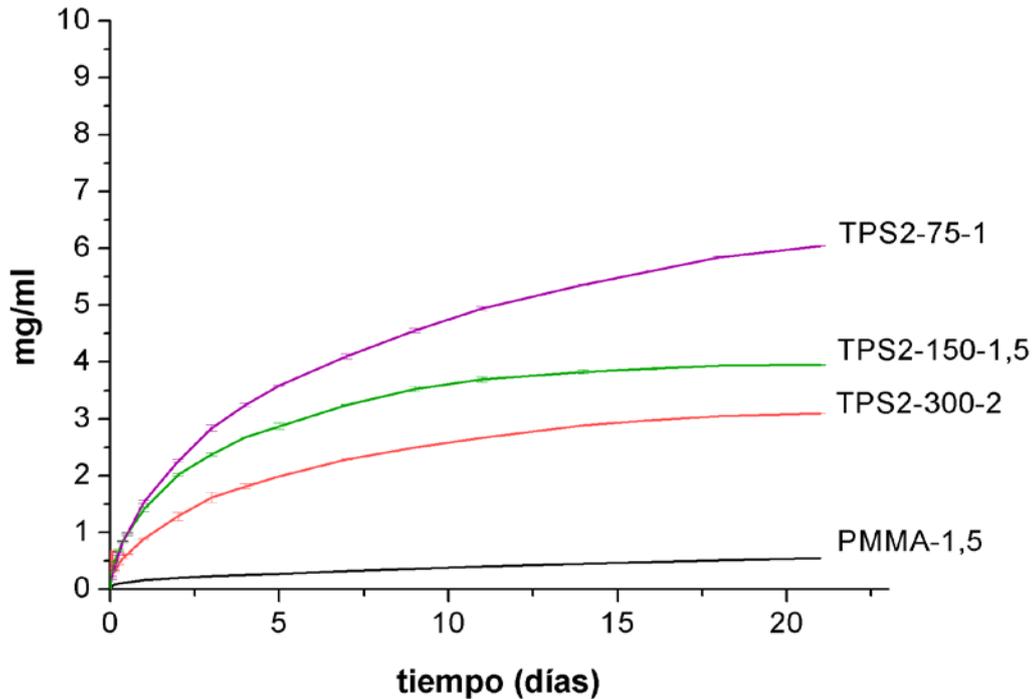


Figura V.11. Perfiles de liberación de ibandronato para la formulación TPS2.

### V.3. DISCUSIÓN

Tal y como se ha observado en el capítulo anterior, el almidón termoplástico ofrece interesantes características para ser considerado como un componente en la formulación de cementos óseos acrílicos. Entre estas características cabe destacar que cuando es adicionado en un porcentaje del 33% en peso a la formulación básica permite mantener la resistencia mecánica bajo esfuerzos a compresión requerida por las especificaciones ISO-5833<sup>11</sup>. Por otro lado, el material formulado con almidón es el que menor pérdida de propiedades experimenta bajo ensayos a tracción, cuando es comparado con la formulación control PMMA-2 y con las formulaciones basadas en los otros polímeros biodegradables. Finalmente, el material ofrece una capacidad hidrofílica interesante así como una pérdida progresiva de peso a lo largo del tiempo de ensayo *in vitro* que hace de él un candidato potencial para ser utilizado como sistema de liberación controlada de medicamentos así como de soporte celular en

ingeniería de tejidos. Esta hidrofilia es requerida para permitir la entrada del medio externo en el interior del material y favorecer el proceso de liberación del fármaco.

Es por ello que se lleva a cabo un estudio más intensivo del uso de almidón termoplástico para su uso como aditivo de formulaciones acrílicas autocurables. En este sentido se evalúa la influencia que ejerce el tipo de almidón adicionado así como el tamaño de partícula del mismo en las propias características del material final: propiedades mecánicas (tracción y compresión), propiedades calorimétricas (TGA, DSC, DMTA), parámetros de curado, monómero residual (CMR), comportamiento *in vitro* (evaluación de la capacidad de absorción de agua) y estudio de la liberación controlada de ibandronato.

Para llevar a cabo este estudio se han elegido dos almidones comerciales: Materbi-Bi YI014U/C (TPS1) y Avebe (TPS2) suministrados por Novamont y Avebe, respectivamente. La principal característica que diferencia ambos materiales es la aplicación para la cual han sido sintetizados. El material TPS1 presenta una alta capacidad para ser inyectado, con una resistencia mecánica próxima a 30 MPa y un módulo de Young superior a 2 GPa. En el caso del material TPS2, este polímero biodegradable presenta unas capacidades mecánicas inferiores, 4,8 MPa de resistencia mecánica y 0,13 GPa de módulo de Young, que motivan que su aplicación principal se centra en la obtención de filmes por soplado. Adicionalmente, la capacidad de absorción de agua de ambos materiales es diferente siendo superior para el caso del TPS1. Esta diferencia en la susceptibilidad de interacción con agua se alcanza a través de la diferente composición del material comercial. Los almidones termoplásticos son aditivados con poliésteres alifáticos o poli(etilen vinil alcohol (EVOH)<sup>12</sup> para incrementar la procesabilidad del material<sup>13</sup>, hecho que modifica radicalmente la población de grupos hidroxilo, responsables de la capacidad hidrofílica. Se ha considerado que esta diferente composición, no caracterizada en este trabajo, puede ser influyente en el comportamiento final del cemento óseo.

La granza de ambos polímeros biodegradables se ha reducido a polvo con diferentes tamaños de partícula para ser incorporada a la formulación acrílica. Se

ha modificado la relación sólido:líquido con el fin de obtener la formulaciones con las características idóneas para un correcto mezclado.

Las microfotografías SEM de los materiales modificados con TPS1, incorporando diferentes tamaños de partículas revelan una buena impregnación y una buena dispersión de partículas sin aparente formación de agregados.

En el caso del estudio mecánico en compresión de las formulaciones modificadas con almidones termoplásticos no se ha utilizado el punto de resistencia en fluencia tal y como se ha hecho en el capítulo anterior. Ello es debido a que los materiales formulados con poliésteres alifáticos permiten observar el punto de fluencia, tal y como el mostrado en la Figura V.12.a y recogido en la norma ISO-5833<sup>11</sup>. Por otro lado los materiales formulados con almidón termoplástico no muestran dicho punto de forma explícita Figura V.12.b, por lo que el punto en el cual se considera el final del ensayo es el punto de rotura. Este efecto es atribuido a la mayor tenacidad que ofrece el almidón frente a los poliésteres alifáticos que permiten mayores porcentajes de deformación obteniéndose resistencias mecánicas superiores. Debido a este fenómeno en esta parte de la investigación se utilizan valores de resistencia mecánica a la rotura y deformaciones a rotura (subíndice C en lugar de Y).

El estudio mecánico bajo esfuerzos a compresión se ha llevado a cabo en tres fases: (1) antes de sumergir en tampón fosfato, (2) después de 2 semanas y (3) después de 16 semanas de inmersión en el medio tamponado a temperatura fisiológica. Esta metodología se ha propuesto con el fin de evaluar la influencia del agua absorbida en el interior del material. Los resultados mostrados en las figuras Figura V.4 y Figura V.5 revelan tendencias análogas para ambos almidones termoplásticos sobre las propiedades del material final, aunque los valores de dichas propiedades son inferiores en el caso del material formulado con el TPS2 que en el caso del TPS1. Nuevamente, este efecto se relaciona con las menores propiedades intrínsecas del polímero biodegradable comercial TPS2 a consecuencia de su composición.

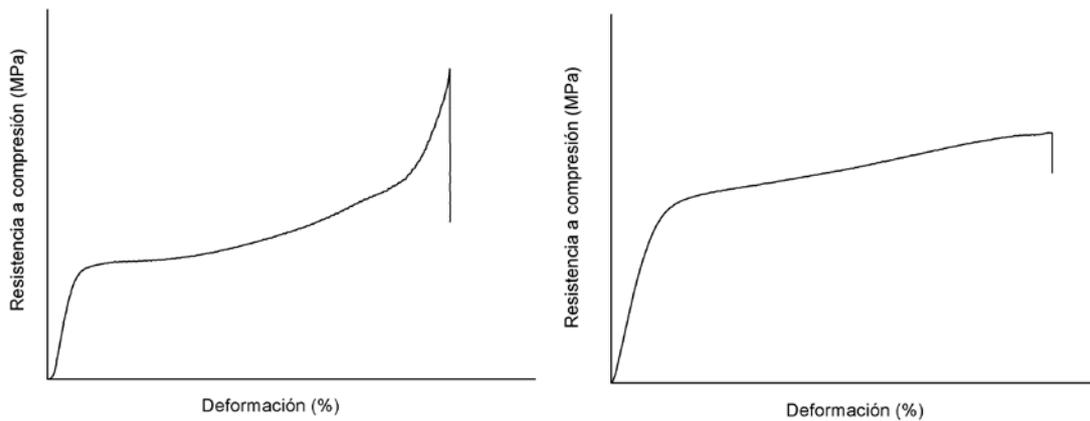


Figura V.12. Comportamiento a compresión en fluencia (izda) y a rotura (dcha).

Desde el punto de vista de la resistencia a la rotura en compresión y del correspondiente módulo, la adición de tamaños de partícula inferiores, para materiales formulados con el mismo almidón termoplástico, da lugar a resistencias a rotura y módulos a compresión más bajos. La explicación de este efecto se relaciona con la diferente estructura química que presentan el almidón y el PMMA. El almidón es hidrofílico, debido a la existencia de grupos hidroxilo en la superficie de las partículas, y el PMMA es completamente hidrofóbico, con porcentajes de absorción de agua inferiores al 2% en peso, tal y como se ha mencionado anteriormente. La disminución del tamaño de partícula del almidón termoplástico genera un incremento de la superficie específica del material, incrementándose así la superficie de interacción entre dos polímeros poco compatibles. Este efecto provoca una deficiente transferencia de esfuerzos entre los componentes del cemento que deriva en una pérdida de propiedades mecánicas. Este mismo efecto explica la menor respuesta mecánica de las formulaciones modificadas con almidón termoplástico, comparado con la de la formulación control de PMMA.

Desde el punto de vista de la influencia de los tiempos de inmersión en tampón fosfato a temperatura fisiológica se observa una clara disminución de las propiedades mecánicas conforme aumenta dicho tiempo de inmersión. Ello se atribuye al efecto plastificante del agua absorbida así como a la pérdida de material mostrada en la Tabla V.10. El material se vuelve más débil conforme se incrementa el tiempo de exposición en el medio simulado. Este efecto es común a

otros observados en diferentes estudios de cementos óseos y justifica el uso de estas formulaciones en aplicaciones en las cuales el material no presente una elevada demanda de resistencia bajo carga, como es el caso de tratamiento de defectos óseos provocados por osteoporosis. La pérdida de propiedades mecánicas así como la liberación del material, previamente demostrado, debería estimular la colonización de nuevo tejido vivo en los espacios libres dejados por el material, estimulándose así el efecto osteointegrador.

El estudio mecánico bajo esfuerzos a tracción, resumido en la Tabla V.3, revela un comportamiento análogo al observado en compresión. La disminución del tamaño de partícula nuevamente perjudica tanto a la resistencia máxima como al módulo de Young, atribuyendo este efecto a la baja compatibilidad entre ambos materiales.

A partir del análisis de TGA se estudia la estabilidad térmica de las formulaciones modificadas con TPS1 y TPS2. En la Figura V.6, que se muestran los perfiles de degradación térmica, ambas formulaciones presentan un comportamiento similar. En ambos casos se aprecia una pequeña pérdida de peso cerca de 100°C que es atribuida a la adsorción de agua ambiental. La degradación térmica de los almidones termoplásticos en estado virgen se lleva a cabo en tres etapas<sup>12</sup>. La primera etapa, entre 230 y 280°C, se relaciona con la degradación de los plastificantes como el glicerol; la segunda etapa, entre 320-350°C, está básicamente relacionada con la descomposición térmica del polisacárido nativo (el almidón); y la tercera etapa, que no se ha degradado completamente en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo, corresponde al polímero añadido al almidón nativo para promover su termoplasticidad, siendo el poli(etilen vinil alcohol) (EVOH) el más frecuentemente utilizado<sup>12,14</sup>. En la Tabla V.5 se puede apreciar que para ambas formulaciones modificadas con TPS la  $T_{d,máx}$  no se ve perjudicada por la incorporación del componente biodegradable. Además, esta adición conduce incluso a valores de la  $T_{d,máx}$ , ligeramente superiores a los del control PMMA. Este hecho corrobora la existencia de microdominios del almidón termoplástico en el cemento que

degradan a diferente temperatura que la matriz de PMMA. En cuanto al efecto del tamaño de partícula éste no afecta a los valores de degradación térmica.

La evaluación de la  $T_g$  ofrece información sobre el proceso de transformación de los materiales amorfos. En la Tabla V.5 se resumen los valores obtenidos de  $T_g$  a partir de la técnica DSC (Figura V.7). Tal y como ha sucedido en el capítulo anterior tampoco se han podido determinar con claridad los valores de  $T_g$  para todas las formulaciones, ya que no se han observado saltos energéticos claramente diferenciados. Los cambios de flujo de calor en la transición han presentado valores alrededor de  $0,1 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$ , una energía muy baja asociada al proceso, que dificulta su resolución por DSC. Por esta razón, de igual modo que en el capítulo anterior la  $T_g$  se ha resuelto por DMTA, tomando para ello el máximo de la representación de la  $\tan\delta$  en función de la temperatura. En la Tabla V.7 se presentan  $T_g^{DMTA'}$  y  $T_g^{DMTA''}$  que corresponden a los valores de  $T_g$  obtenidos para el primer y segundo barrido, respectivamente. En ambos barridos los valores de  $T_g$  para las formulaciones modificadas con TPS son inferiores al correspondiente control de PMMA para una misma relación sólido:líquido. La presencia de trazas de agua así como de monómero residual en las formulaciones modificadas con los almidones, observada en el ensayo de TGA, inducen a la disminución de la temperatura de transición vítrea siguiendo un mecanismo de plastificación. La  $T_g^{DMTA'}$  es inferior a la  $T_g^{DMTA''}$ , hecho que confirma nuevamente la presencia de monómero residual que durante el primer barrido termina de curar y produce un aumento del valor de la  $T_g$  en el segundo barrido ya que ha aumentado la fase polimérica y ha disminuido el contenido en especies de bajo peso molecular con capacidad plastificante.

El análisis de DMTA también permite evaluar el módulo de almacenamiento ( $E'$ ) cuyos perfiles en función de la temperatura se muestran en las figuras Figura V.8 y Figura V.9. En todos los casos las formulaciones modificadas con cualquiera de los dos TPS presentan valores de  $E'$  inferiores al de la formulación control, a causa de la mencionada incompatibilidad química entre ambos componentes. Se observan además diferencias significativas en función del tipo de almidón ya que el TPS1 presenta valores mayores con respecto al TPS2. Esto es debido a la

propia naturaleza química de los almidones termoplásticos, ya que TPS1 se utiliza para inyección y TPS2 se utiliza para soplado. Con respecto al tamaño de partícula de TPS empleados, para obtener la formulación acrílica, también se pueden apreciar diferencias significativas ya que sorprendentemente un tamaño menor ofrece valores mayores de  $E'$ . Para la formulación TPS1-75-1, a 37°C, el valor de  $E'$  representa el 92% del valor de la formulación control PMMA-1, hecho que pone de manifiesto que las partículas de TPS1 están actuando como agente de refuerzo ya que se encuentran bien dispersas en el cemento. Esta mejora en el valor de  $E'$  conforme disminuye el tamaño de partícula se relaciona con la mayor capacidad de dispersión de los tamaños de partícula pequeños comparado con los grandes, tal y como se ha puesto de manifiesto en el estudio microscópico (Figura V.3). Chen y col<sup>15</sup> demostraron que el incremento en la dispersabilidad de los refuerzos en el seno de materiales compuestos incrementa el módulo del material final.

El análisis de DSC en modo isotérmico permite evaluar la energía liberada durante el proceso de curado ( $\Delta H_c$ ) así como sus tiempos de curado. En la Tabla V.6. se puede apreciar como las formulaciones, tanto las control como las modificadas con almidones termoplásticos, conforme disminuye su relación sólido:líquido presentan un valor mayor de  $\Delta H_c$ . Este fenómeno es consecuencia de que al existir una mayor cantidad de monómero MMA, durante el proceso de curado, con respecto a la fase sólida.

Los parámetros de curado, según norma ISO-5833<sup>11</sup>, también se han evaluado y se recogen en la Tabla V.9. Los valores obtenidos revelan un buen comportamiento térmico de la exotermia de los materiales formulados con ambos almidones termoplásticos. En ambos casos, todas las formulaciones experimentan una disminución de la temperatura máxima de curado, incluso cuando se incrementa la cantidad de monómero, debido a la modificación de la relación sólido:líquido. La norma ISO-5833<sup>11</sup> sugiere una temperatura máxima de curado inferior a 90°C para minimizar los efectos necróticos del tejido adyacente al implante.

Por otro lado, la disminución del tamaño de partícula da lugar a una disminución en las temperaturas máximas de curado y a un alargamiento de los tiempos de curado. El primer efecto se relaciona con la existencia de mayor superficie de contacto PMMA-TPS. La energía liberada debe cruzar un mayor número de interfases perjudicando la transmisión del calor hacia el medio externo. Además, estas partículas suponen un impedimento al tránsito por difusión del monómero, hecho que retrasa su polimerización y alarga su reacción de curado. El mismo efecto ha sido reportado en la formulación de materiales autocurables modificados con partículas inorgánicas (biovidrios) para fomentar la osteoingracción<sup>16</sup>.

El contenido en monómero residual es menor para las formulaciones con relaciones sólido:líquido superiores y mayor en las formulaciones con menor valor de dicha relación. Nuevamente este efecto se atribuye a la existencia de mayor monómero en la formulación que condiciona el atrapamiento de mayor cantidad de éste por efecto del incremento de viscosidad durante el curado.

El comportamiento *in vitro* de los materiales muestra las diferencias entre ambos tipos de almidones adicionados (Tabla V.10). El material TPS1 induce mayor capacidad de absorción de agua en el material final que el material TPS2. Este efecto se reproduce incluso comparando formulaciones con el mismo tamaño de partícula, siendo los tamaños de partícula inferiores los que muestran mayor capacidad hidrofílica. Tal y como se ha mencionado anteriormente, la disminución del tamaño de partícula genera una mayor superficie interfacial entre ambas fases de la formulación acrílica autocurable. Ello significa una disminución de las propiedades mecánicas por incremento de dicha interfase y ahora da lugar a una mayor capacidad de absorción de agua a través de dicha interfase. Ésta actúa como una *canalización* del agua del medio externo al interior del material y a su vez una vía de liberación posterior del fármaco.

Los perfiles de liberación de ibandronato se muestran en la Figura V.10 para el TPS1 y en la Figura V.11 para el TPS2. En ellos se pone de manifiesto como la adición de un polímero hidrofílico favorece la liberación del ibandronato

con respecto a la matriz polimérica de PMMA que es hidrofóbica. Así cabe destacar la gran dependencia que tiene la liberación con la capacidad de absorción de agua. No se debe olvidar que el agua es el vehículo de liberación del fármaco y una hidrofilia del material superior condicionará liberaciones superiores. Además también se puede observar una clara dependencia de la naturaleza del TPS añadido. La formulación modificada con TPS1 presenta unos mayores perfiles de liberación que TPS2. Este fenómeno es debido a la distinta naturaleza de los TPS, ya que TPS1 presenta una mayor capacidad de absorción de agua que TPS2 (Tabla V.10). El tamaño de partícula utilizado también afecta a los perfiles de liberación ya que cuanto menor es el tamaño de partícula (75µm) de TPS en la formulación acrílica aurocurable se obtienen mayores valores de liberación. Este efecto queda avalado nuevamente por la existencia de interfases no compatibilizadas PMMA-TPS.

#### V.4. BIBLIOGRAFÍA

1. Black DM, Cummings SR, Karpf DB, Cauley JA, Thompson DE, Nevitt MC et al. Randomized trial of effect of alendronate on risk of fracture in women existing vertebral fractures. Fracture Intervention Trial Research Group. The Lancet. 1996; 348(9041): 1535-41.
2. Reginster J, Minne HW, Sorensen OH, Hooper M, Roux C, Brandi ML, Lund B, et al. Randomized trial of the effects of risendronate on vertebral fractures in women with established postmenopausal osteoporosis. Vertebral Efficacy with Risedronate. Therapy (VERT) Study Group. Osteoporos Int. 2000; 11(1): 83-91.
3. Delmas PD, Bernard C. The use of biphosphonates in the treatment of osteoporosis. Current Opn Rheumatol. 2005; 17: 462-6.

4. Marcus R, Kosek J, Pfefferbaum A, Horning S. Age-related loss of trabecular bone in premenopausal women: a biopsy study. *Calcif Tissue Int.* 1983; 35(4-5): 406-9.
5. Torregrosa JV, Ramos AM. Uso de bisfosfonatos en la enfermedad renal crónica. *Nefrología.* 2010; 30(3): 288-96.
6. Ridley AJ, Hall A. The small GTP-binding protein RHO regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell.* 1992; 70(3): 389-99.
7. Russell RG, Watts NB, Ebtino FH, Rogers MG. Mechanisms of action of biphosphonates: similarities and differences and their potential influence on clinical efficacy. *Osteoporosis Int.* 2008; 19(6): 733-59.
8. Fleisch H. Biphosphonates: mechanisms of action. *Endocr Rev* 1998, 19(1): 80-100.
9. Roelofs AJ, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6222-30.
10. ISO Specification 527-1. Standard specifications for plastic determination of tensile properties. (1993).
11. ISO Specification 5833. Standard specifications for implants in surgery-Acrylic resin cements. (1992).
12. Vega D, Villar MA, Failla MD, Vallés EM. Thermogravimetric analysis of starch-based biodegradable blends. *Polymer Bulletin.* 1996; 37(2): 229-35.
13. Shogrun RL. Starch: properties and materials applications. En: Kaplan DL, editor. *Biopolymers from Renewable Resources.* New York: Springer; 1998. pág. 30-43.

14. Matsuyama H, Kobayashi K, Maki T, Tearamoto M, Tsuruta H. Effect of the Ethylene Content of Poly(ethylene-co-vinyl alcohol) on the Formation of Microporous Membranes via Thermally Induced Phase Separation. *J Appl Polym Sci.* 2001; 82: 2583–9.
15. Chen B, Sun K. Poly( $\epsilon$ -caprolactone/hydroxyapatite composites: effects of particle size, molecular weight distribution and irradiation on interfacial interaction and properties. *Polym Test.* 2055; 24(1): 64-70.
16. Méndez JA, Fernández M, González-Corchón A, Salvado M, Collia F, de Pedro JA, et al. Injectable self-curing bioactive acrylic-glass composites charged with specific anti-inflammatory/analgesic agent. *Biomaterials* 2004; 2381-92.



---

**CAPÍTULO VI**  
**FORMULACIONES ACRÍLICAS**  
**AUTOCURABLES**  
**MODIFICADAS CON PROTEÍNAS**

---

## VI.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo anterior se han sentado las bases del diseño de un sistema de liberación controlada de medicamentos solubles en agua. La incorporación de almidón termoplástico, polímero altamente hidrofílico, en la estructura del cemento óseo acrílico ha permitido la “extracción” de los bisfosfonatos mejorando los perfiles de liberación de las formulaciones control altamente hidrofóbicas. Como contrapartida, las formulaciones que presentan mejor capacidad de liberación de Ibandronato presentan bajas capacidades mecánicas, en seco, comparadas con el control de PMMA, con disminuciones superiores al 50%.

En el presente capítulo se pretende desarrollar un nuevo sistema acrílico autocurable, con capacidad de liberación de moléculas altamente polares, como es el caso de las proteínas, y que a su vez minimice la pérdida de propiedades mecánicas.

### VI.1.1. PROTEÍNAS MORFOGÉNICAS ÓSEAS

Desde el punto de vista de los biomateriales utilizados para la liberación controlada de fármacos, la tendencia es obtener sistemas inteligentes<sup>1</sup>, cargados con el principio activo, que respondan a estímulos del ambiente y puedan liberar su carga en el lugar, el tiempo y a la velocidad deseada. Es por ello que en las últimas décadas los polímeros son ampliamente estudiados para su aplicación en este área gracias a que sus propiedades pueden ser diseñadas de acuerdo con las características específicas que se requieran para atender las necesidades en la liberación controlada de especies activas<sup>2</sup>, como la insulina<sup>3</sup>, morfina<sup>4</sup>, hormonas<sup>5</sup>, proteínas<sup>6</sup>,...

Una gran familia de proteínas con una amplia incidencia en el crecimiento de nuevo tejido óseo es la de las proteínas morfogénicas óseas (BMPs), las cuales son factores de crecimiento pertenecientes a los denominados factores de crecimiento transformantes TGF- $\beta$ <sup>7,8</sup>. Estos factores presentan una elevada

capacidad inductora de tejido óseo y cartilaginoso. Las BMPs interactúan con receptores específicos que se encuentran en la superficie celular, conocidos como receptores de proteínas morfogénicas óseas (BMPRs), generando una transducción de la señal que provoca la movilización de proteínas de la familia de Smad. Las rutas de señalización en las que participan BMPs, BMPRs y Smads son importantes en el desarrollo del corazón, el sistema nervioso central, y el cartílago, además de participar en el desarrollo post-natal del hueso. Las BMPs tienen un papel importante durante el desarrollo de los patrones embrionarios y la formación temprana del esqueleto. Las BMPs presentan bajos pesos moleculares (< 30000 Da), son solubles en agua y tienen elevada capacidad de difusión a través de los fluidos corporales, por lo que utilizando un portador adecuado pueden ser depositadas localmente en el área afectada por el proceso osteoporótico, con el fin de incrementar el crecimiento de nuevo tejido óseo.

#### **VI.1.2. SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA DE ESPECIES HIDROSOLUBLES**

Los hidrogeles representan un importante grupo de biomateriales ya que gracias a su carácter hidrofílico presentan unas propiedades de hinchamiento elevadas en medio acuoso<sup>9</sup>, el cual se debe a la presencia de grupos hidroxilo, carbonilo, amida y sulfónico en su estructura química. Es por ello, que son considerados sistemas inteligentes, ya que tienen una respuesta de hinchamiento selectiva dependiendo de las condiciones del medio<sup>10</sup> como pH, temperatura, fuerza iónica, campo eléctrico y magnético,... Por lo tanto es posible realizar la liberación de diferentes principios activos hacia sitios específicos del organismo, por ejemplo en el pH característico del tracto gastrointestinal<sup>11</sup> y además se caracterizan por realizar una liberación de forma controlada en periodos de tiempo prolongados<sup>12,13</sup>.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el cemento óseo está compuesto mayoritariamente por poli(metacrilato de metilo) (PMMA), un material hidrofóbico con grados de hidratación inferiores al 2%. Las formulaciones de

cementos óseos cargados con principios activos altamente solubles en agua requieren modificaciones químicas que permitan la entrada del medio externo para liberar el fármaco. En la actualidad existen diferentes sistemas poliméricos acrílicos con capacidad de interacción con medios acuosos<sup>14</sup>. Este es el caso de poli(ácido metacrílico) (PMAA), el cual como homopolímero o copolimerizado con otros monómeros<sup>15</sup> es capaz de conformar un polímero de naturaleza acrílica, con una elevada capacidad de absorción y retención de agua y que por su naturaleza acrílica puede compatibilizar con el PMMA. Por ejemplo, la acrilamida copolimerizada con el ácido acrílico se utiliza como superabsorbente<sup>16</sup>, por su gran capacidad de retención de agua dentro de su estructura, presentando diversos usos en medicina<sup>17</sup> y agricultura<sup>18</sup>.

### **VI.1.3. METODOLOGÍAS DE SÍNTESIS DE POLÍMEROS ACRÍLICOS HIDROFÍLICOS**

El proceso de polimerización por suspensión en fase inversa permite la obtención de polímeros hidrosolubles mediante la reacción de una solución monomérica acuosa dispersada, con ayuda de agitación, en un medio orgánico, en donde se dispersan gotas de monómero que se comportan como microreactores de polimerización en masa<sup>19,20</sup>. Se denomina polimerización en suspensión en fase inversa porque los monómeros se hallan solubilizados en el agua, junto con el iniciador, y se utiliza como medio continuo un disolvente orgánico, al contrario que en el caso de la polimerización en suspensión.

Con el fin de obtener una dispersión uniforme de gotas de monómero dentro de la fase continua se utilizan sustancias como coloides protectores, estabilizantes o agentes de suspensión que ayudan a que las gotas de monómero se mantengan aisladas<sup>21,22</sup>. De este modo se previene su coalescencia durante el proceso de polimerización. Al finalizar el proceso de polimerización se obtienen partículas sólidas de forma esférica cuyo tamaño oscila entre 10 y 1000  $\mu\text{m}$ . Al final de la polimerización el producto obtenido se puede separar por sedimentación o flotación cuando se detiene la agitación.

Este tipo de polimerización permite obtener elevados valores de conversión y partículas con un tamaño deseado. Esto se debe a la posibilidad de controlar los distintos parámetros que regulan el mecanismo de reacción como son: grado de neutralización del ácido acrílico, cantidad de agente entrecruzante (bisacrilatos, bisacrilamidas), temperatura de reacción, cantidad y tipo de agente estabilizante y velocidad de agitación<sup>10,23</sup>.

En este trabajo se pretende obtener un sistema de liberación controlada de proteínas como modelo teórico para la liberación de proteínas morfogénicas óseas. Para ello se modificará la composición convencional del cemento acrílico con microesferas de polímeros acrílicos hidrofílicos, los cuales permitirán una más optimizada liberación de la proteína. En este sentido se ha desarrollado un trabajo de síntesis de microesferas de PMAA cargadas con la proteína modelo, el colágeno hidrolizado, habiendo sido escogida por su elevada solubilidad en agua y bajo peso molecular (<20000 Da). El trabajo se fundamenta en la síntesis de las microesferas, caracterización, incorporación en los cementos óseos acrílicos y caracterización de éstos a través de diferentes técnicas para finalizar con la evaluación de su capacidad de liberación controlada de colágeno hidrolizado y estudio de toxicidad.

## **VI.2. RESULTADOS**

La modificación principal que se lleva a cabo en este proyecto de tesis doctoral es la sustitución parcial de la fase sólida del cemento óseo acrílico convencional mediante la adición de polímeros biodegradables, sintéticos y de origen natural, para alcanzar un fin común: obtener sistemas de liberación controlada de especies activas para el tratamiento terapéutico de la osteoporosis. En el caso de los otros capítulos la modificación por el polímero biodegradable era considerada desde un punto de vista estructural, es decir, el propio polímero biodegradable colaboraba en las propiedades mecánicas del material. En esta parte del estudio, el polímero biodegradable, el colágeno hidrolizado (HC), no se considera un componente estructural, sino una especie activa que nos permitirá la

evaluación del cemento óseo como sistema de liberación de proteínas. Para poder liberar el colágeno del cemento, éste ha sido modificado químicamente a través de la incorporación de un polímero acrílico hidrofílico, el PMAA, el cual sí colabora en el desarrollo mecánico del material.

A continuación se muestran los resultados de la caracterización físico-química del PMAA, sintetizado a partir de la síntesis de copolimerización de los monómeros: ácido metacrílico (MAA) y metilen-bis-acrilamida (MBA). El PMAA se ha obtenido en forma de microesferas estables en medio acuoso siguiendo un sistema de polimerización en suspensión en fase inversa. La incorporación del colágeno hidrolizado en las microesferas y finalmente la caracterización de cada una de ellas una vez incorporadas al cemento óseo acrílico.

### **VI.2.1. SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE LAS MICROESFERAS Y MICROCÁPSULAS**

Se sintetizan dos formulaciones de microesferas de PMAA, entrecruzadas con un 10 y un 15% de MBA. En ambos casos se obtienen micropartículas esféricas de color blanco y con rendimientos superiores al 96%. Las dos formulaciones presentan capacidad de absorción de disoluciones acuosas a causa de la elevada hidrofilia del PMAA y del entrecruzamiento con MBA. Se ha observado que porcentajes de MBA inferiores al 10% p/p no permiten mantener la forma esférica de las microesferas después del hinchamiento en agua.

El proceso de carga de la proteína es instantáneo por absorción de la disolución de éste. La posterior liofilización vuelve a dar un material microparticulado que posteriormente se caracterizó.

La caracterización de las microesferas de PMAA y las microcápsulas de PMAA/HC se realiza con el fin de determinar su morfología superficial, resistencia térmica, naturaleza termoestable y estructura química. Los métodos utilizados para este fin son espectroscópicos, microscópicos, ópticos y térmicos.

### VI.2.1.1. Morfología y tamaños de partículas

Las microesferas de PMAA, M10 y M15, que se obtienen a través de una reacción de polimerización en suspensión en fase inversa del monómero MAA, entrecruzadas con un 10 y un 15% de MBA, junto con las perlas comerciales de PMMA, se analizan mediante difracción de luz láser para determinar su distribución de tamaños. En la Figura VI.1 se muestran los resultados obtenidos y se puede observar cómo los sistemas M15 y M10 presentan un promedio de tamaños de partícula superiores y unas distribuciones más anchas y multimodales que las de las microesferas de PMMA comercial.

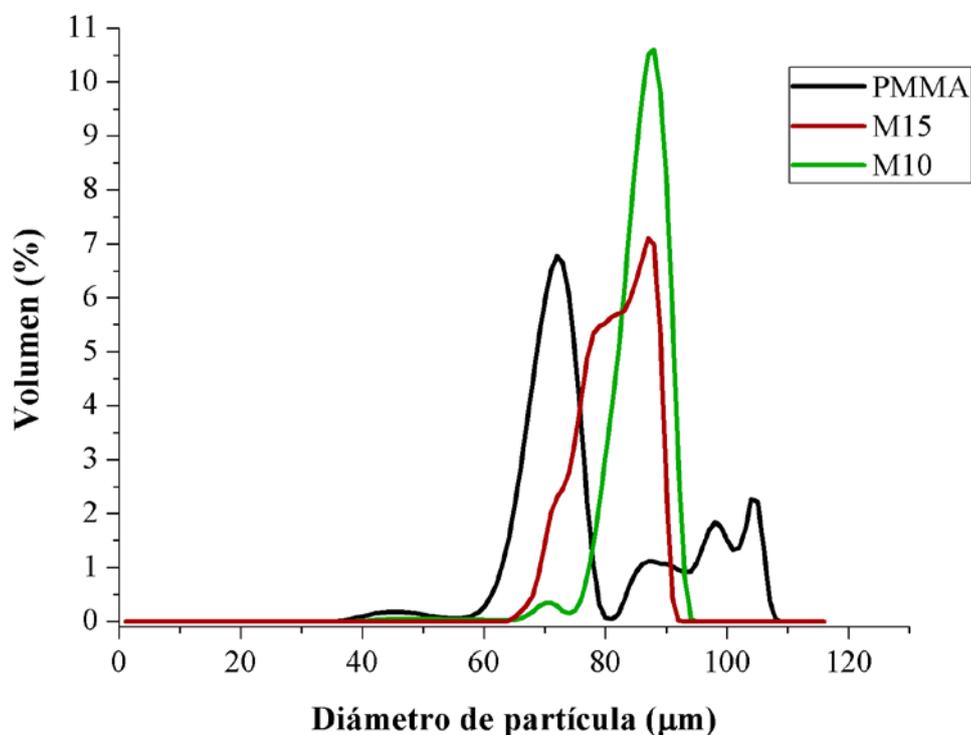


Figura VI.1. Representación de la difracción de diámetros de partícula de las microesferas M10 y M15 y las perlas comerciales de PMMA.

La morfología y los tamaños de partículas también se caracterizan a partir del estudio mediante SEM, el cual se presenta en la Figura VI.2. Este estudio demuestra que una gran mayoría de las partículas se encuentran formando agregados, hecho que se relaciona directamente con la mayor dispersión de tamaños obtenida por difracción de luz láser.

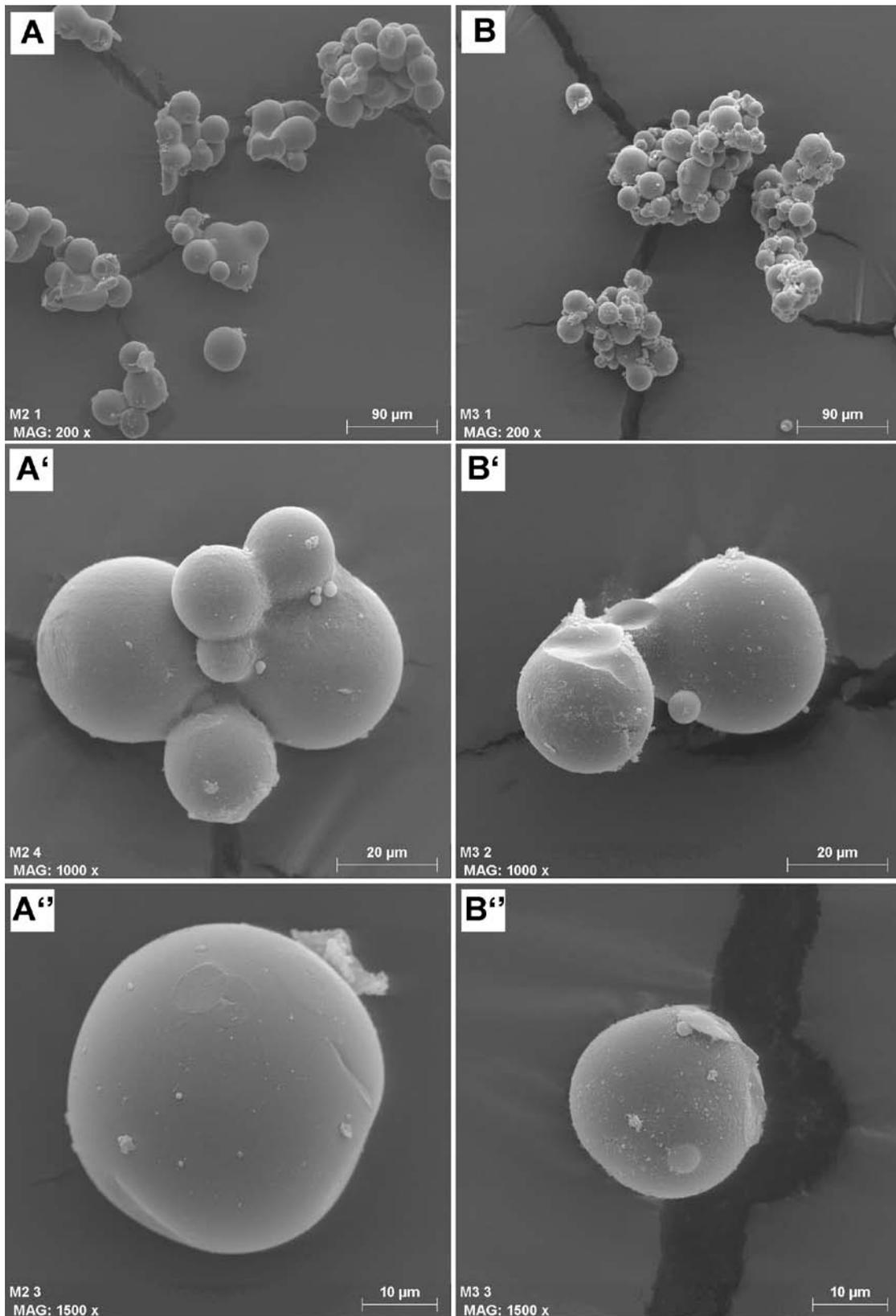


Figura VI.2. Micrografías SEM de las microesferas en la parte izquierda M10 y en la parte derecha M15 a distintos grados de magnificación.

También se estudian mediante microscopía SEM las microesferas (M10) cargadas con distintas cantidades de colágeno hidrolizado, un 10 y un 25%, respectivamente. En la Figura VI.3 se muestran las microfotografías SEM tomadas a las microcápsulas M10-10 y M10-25. En las imágenes se aprecia como las microcápsulas M10-25 tienen la superficie menos uniforme a consecuencia de la incompleta absorción del HC por la microesfera.

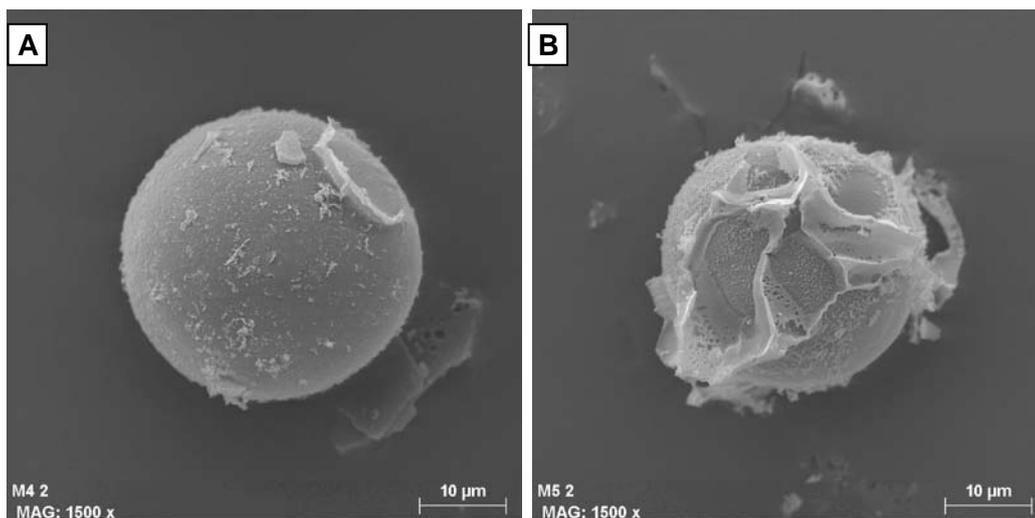


Figura VI.3. Microfotografías SEM de las microcápsulas (A) M10-10 y (B) M10-25.

#### VI.2.1.2. Estructura química

En la Figura VI.4 se exponen los espectros FT-IR obtenidos de las muestras de colágeno hidrolizado, las microesferas de PMAA con un 15% de agente entrecruzante (M15) y las microcápsulas M15 cargadas con un 25% de colágeno hidrolizado (M15-25).

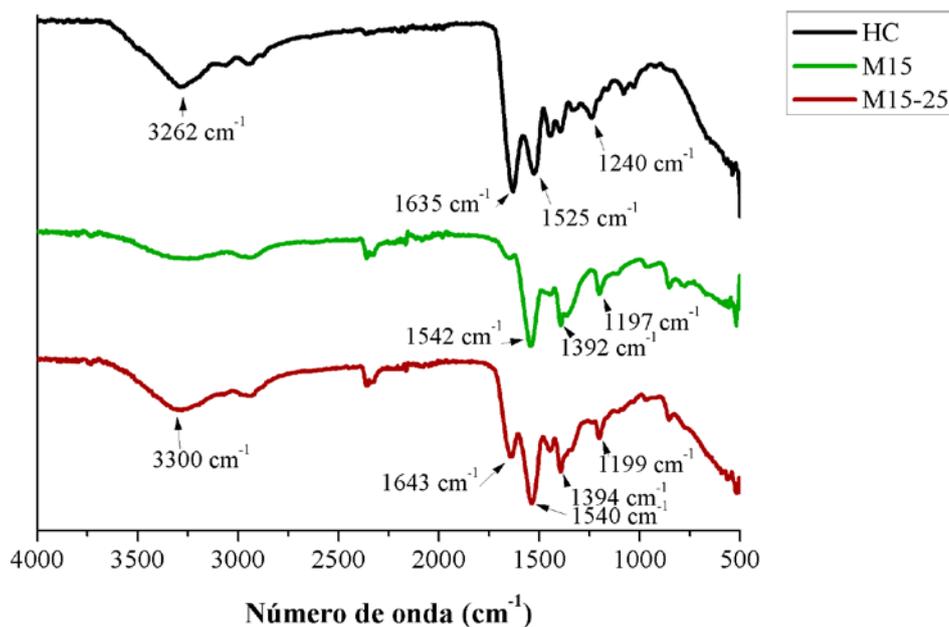


Figura VI.4. Espectro FT-IR del HC, M15 y M15-25.

Se observa como el espectro obtenido para las microcápsulas M15-25 confirma la presencia de colágeno hidrolizado ya que presenta las bandas características del mismo. Las bandas a  $3300\text{ cm}^{-1}$  y a  $1643\text{ cm}^{-1}$  se atribuyen a la vibración del enlace N-H y la tensión simétrica del carbonilo (C=O), respectivamente, ambas de la amida. Por otro lado las bandas características correspondientes a la estructura del PMAA neutralizado con hidróxido sódico, es decir (poli (metacrilato sódico)), a  $1540$  y a  $1394\text{ cm}^{-1}$  correspondientes a la tensión simétrica y antisimétrica del grupo  $\text{COO}^-$ , respectivamente, y la banda de  $1199\text{ cm}^{-1}$ , que hace referencia a la tensión del grupo C-COO<sup>-</sup>.

### VI.2.1.3. Estabilidad térmica

En la Figura VI.5 se recogen los termogramas de las microesferas de M10 y M15) junto con las distintas microcápsulas cargadas con colágeno hidrolizado (M10-10, M10-25, M15-10 y M15-25) obtenidas a partir de la incorporación del colágeno hidrolizado a las microesferas M10 y M15.

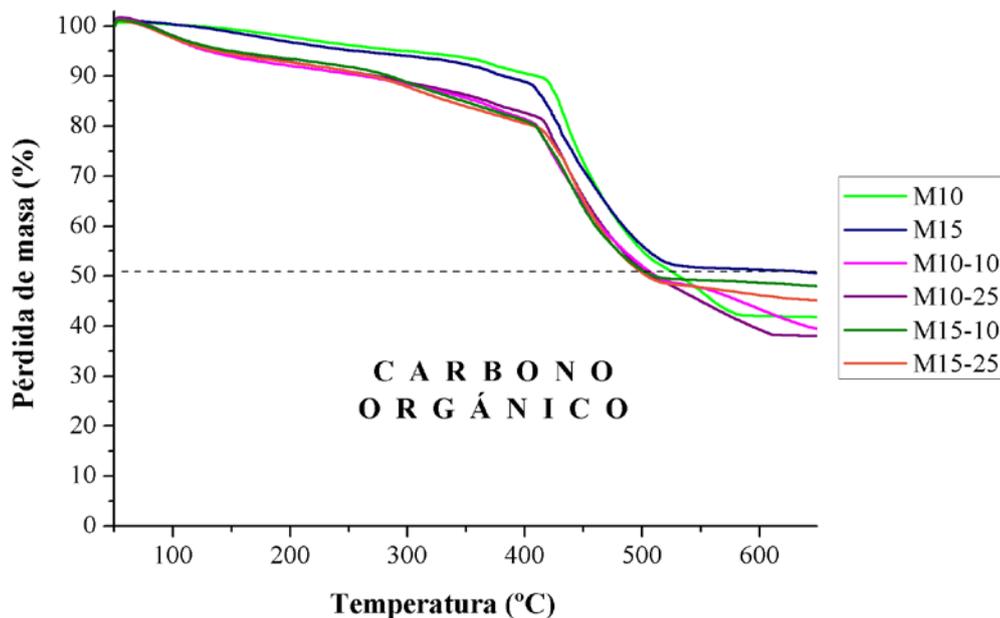


Figura VI.5. Termograma TGA de las microesferas de PMAA y las microcápsulas PMAA/HC

Los materiales que contienen colágeno hidrolizado en su composición presentan una pérdida de peso inicial entorno al 6% cerca de los 100°C, que corresponde a la pérdida de agua ambiental absorbida por las muestras. Por otro lado, una vez alcanzados los 500°C de temperatura, donde muchos de los materiales plásticos convencionales ya se han degradado en su totalidad (su peso ha alcanzado el valor de 0%), en el caso de las formulaciones de micropartículas presentan un contenido en peso de carbono orgánico entre un 37 y un 51% en peso.

#### VI.2.1.4. Efecto del agente entrecruzante

En la Figura VI.6 se muestran los perfiles de calorimetría diferencial de barrido (DSC) en régimen dinámico de todas las formulaciones de microesferas y microcápsulas sintetizadas. En todos ellos se observa una tendencia invariable de la línea base sin aparecer la transición vítrea ( $T_g$ ) en todo el intervalo de ensayo.

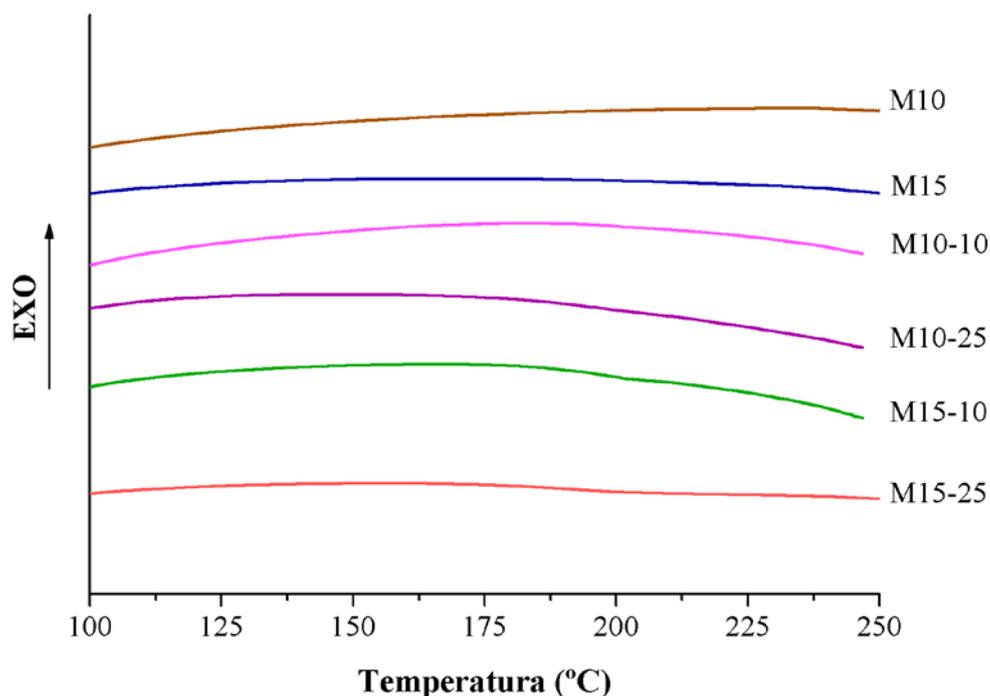


Figura VI.6. Termograma DSC de las microesferas M10 y M15 y de las microcápsulas M10-10, M10-25, M15-10 y M15-25.

## VI.2.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES ACRÍLICAS AUTOCURABLES

Las diferentes formulaciones preparadas con las distintas microesferas y microcápsulas sintetizadas, junto con el colágeno hidrolizado se han caracterizado con el fin de evaluar sus propiedades físico-químicas. En la Tabla VI.1 se presenta a modo de resumen la nomenclatura de cada una de las formulaciones, utilizada en este capítulo, junto con sus componentes en la fase sólida y su tanto por ciento total de colágeno hidrolizado en el cemento.

Tabla VI.1. Resumen y nomenclatura de los materiales usados.

Nomenclatura	Fase sólida			HC total en el cemento (%)
	PMMA	PMAA	HC	
<b>PMMA-1</b>	X			0
<b>FC-10</b>	X		X	2,5
<b>FC-25</b>	X		X	6,25
<b>FM10</b>	X	X		0
<b>FM15</b>	X	X		0
<b>FM10-10</b>	X	X	X	2,5
<b>FM10-25</b>	X	X	X	6,25
<b>FM15-10</b>	X	X	X	2,5
<b>FM15-25</b>	X	X	X	6,25

### VI.2.2.1. Parámetros de curado

En la Tabla VI.2 se exhiben los valores, de temperatura máxima de curado ( $T_{m\acute{a}x}$ ) y tiempo de fraguado ( $t_{fraguado}$ ), obtenidos para las distintas formulaciones.

 Tabla VI.2. Parámetros de curado. Según (a) norma ISO-5833<sup>24</sup>.

Formulación	$T_{m\acute{a}x}$ (°C)	$t_{fraguado}$ (min)
<b>PMMA-1</b>	92,3 [1,1]	14,4 [0,9]
<b>FC-10</b>	85,8[0,6]	13,1 [0,9]
<b>FC-25</b>	75,4 [1,6]	13,1 [0,3]
<b>FM10</b>	62,0 [0,7]	15,1 [0,1]
<b>FM15</b>	65,8 [2,4]	13,5 [0,3]
<b>FM10-10</b>	64,8 [1,0]	14,1 [0,6]
<b>FM10-25</b>	63,4 [0,6]	14,8 [0,1]
<b>FM15-10</b>	61,1 [0,7]	14,5 [2,4]
<b>FM15-25</b>	67,3 [1,3]	13,4 [0,3]

Cabe destacar como en ninguna de las formulaciones se obtiene una temperatura máxima de curado superior a los 90°C, el cual es el valor máximo exigido por la norma ISO-5833<sup>24</sup>. Los valores de tiempo de fraguado no difieren unos de los otros y en todos los casos son superiores a los requeridos por la norma.

### VI.2.2.2. Propiedades mecánicas a compresión

En la Tabla VI.3 se presentan los valores obtenidos de resistencia a compresión en fluencia ( $\sigma_c$ ), para el ensayo a compresión, junto con su desviación estándar entre corchetes. Tal y como se puede observar en la mayoría de las formulaciones, ensayadas en seco, se obtienen valores, de resistencia a compresión, próximos o superiores al mínimo exigido por la norma ISO-5833<sup>24</sup>. Mientras que en el caso de las formulaciones modificadas con PMAA después de estar 15 días inmersas en solución tampón fosfato a pH 7,4 y 37 °C, se alcanzan valores de pérdida de resistencia superiores al 50%.

Tabla VI.3. Valores obtenidos para la resistencia a compresión.

Formulación	$\sigma_c$ (MPa)	
	seco	15 días
<b>PMMA-1</b>	82,1 [1,5]	78,8 [1,8]
<b>FC-10</b>	75,2 [0,8]	71,4 [1,9]
<b>FC-25</b>	77,6 [1,9]	60,5 [0,9]
<b>FM10</b>	74,3 [2,7]	27,3 [3,5]
<b>FM15</b>	67,4 [0,8]	29,7 [1,3]
<b>FM10-10</b>	68,7 [2,6]	28,7 [1,8]
<b>FM10-25</b>	66,4 [0,9]	28,8 [1,4]
<b>FM15-10</b>	67,0 [3,0]	29,0 [1,7]
<b>FM15-25</b>	64,9 [0,6]	28,8 [1,2]

### VI.2.2.3. Comportamiento *in vitro*

En la Figura VI.7 se muestra la evolución, en función del tiempo, de la absorción de agua de las probetas inmersas en solución tampón fosfato a 37°C hasta un máximo de 15 días. *A priori* se distinguen dos tendencias. La primera está constituida por las formulaciones acrílicas autocurables que contienen microesferas de PMAA, las cuales presentan una mayor absorción del medio externo, y la segunda por las que no contienen las microesferas, las cuales es el grupo que muestra una menor absorción.

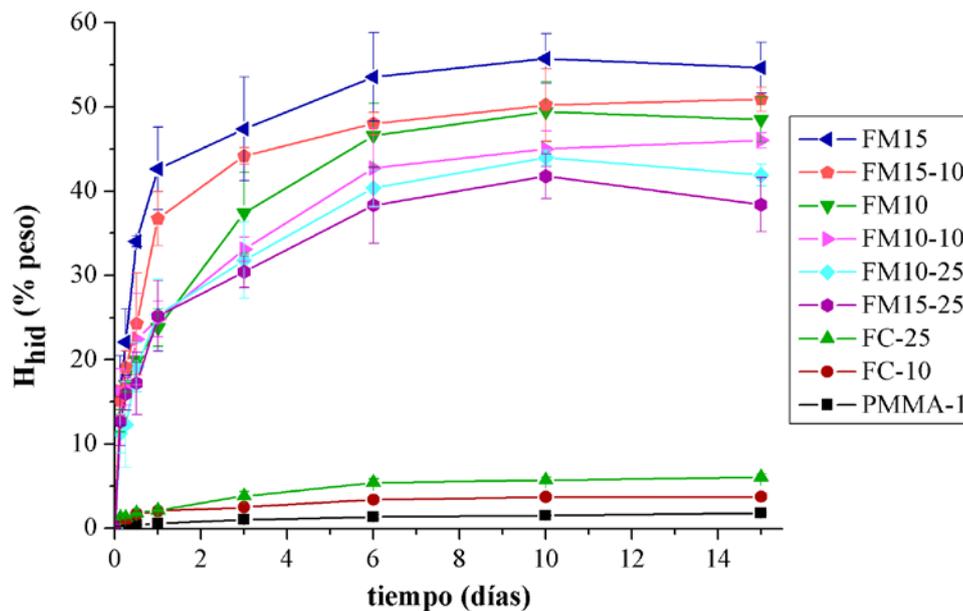


Figura VI.7. Evolución de la absorción de agua en función del tiempo de las distintas formulaciones modificadas con HC y PMAA-HC.

En la Figura VI.8 se muestra la pérdida de peso de las muestras después de haber estado inmersas un tiempo conocido en tampón fosfato y secadas hasta peso constante.

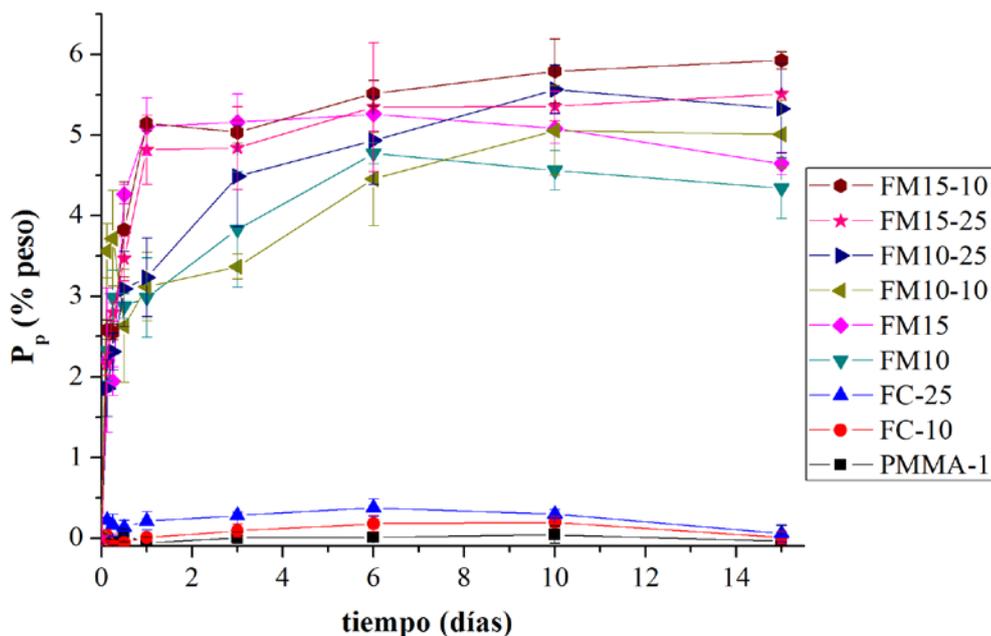


Figura VI.8. Representación de la pérdida de peso de las distintas formulaciones modificadas con HC y PMAA-HC.

#### VI.2.2.4. Liberación de colágeno hidrolizado

En la Figura VI.9 se muestra el perfil de liberación del colágeno hidrolizado respecto el tiempo.

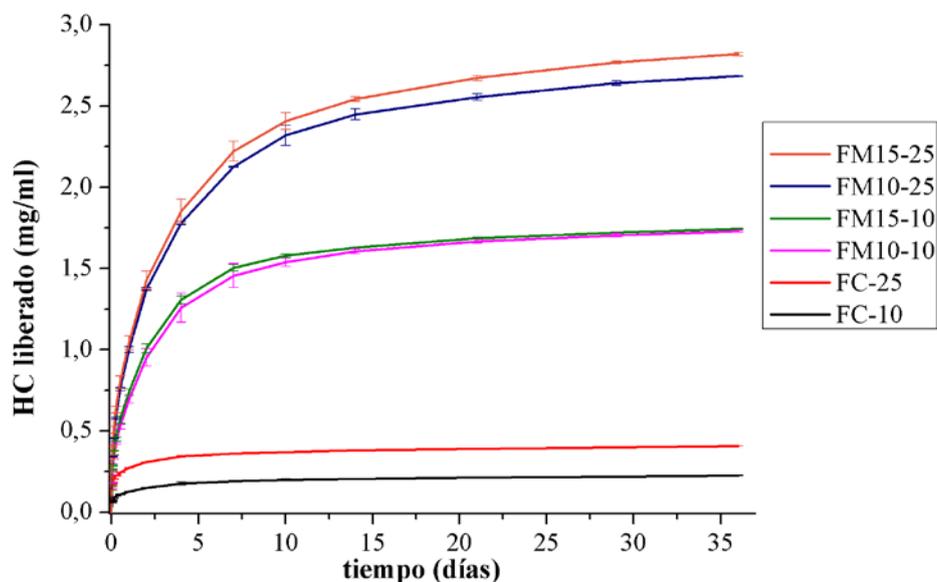
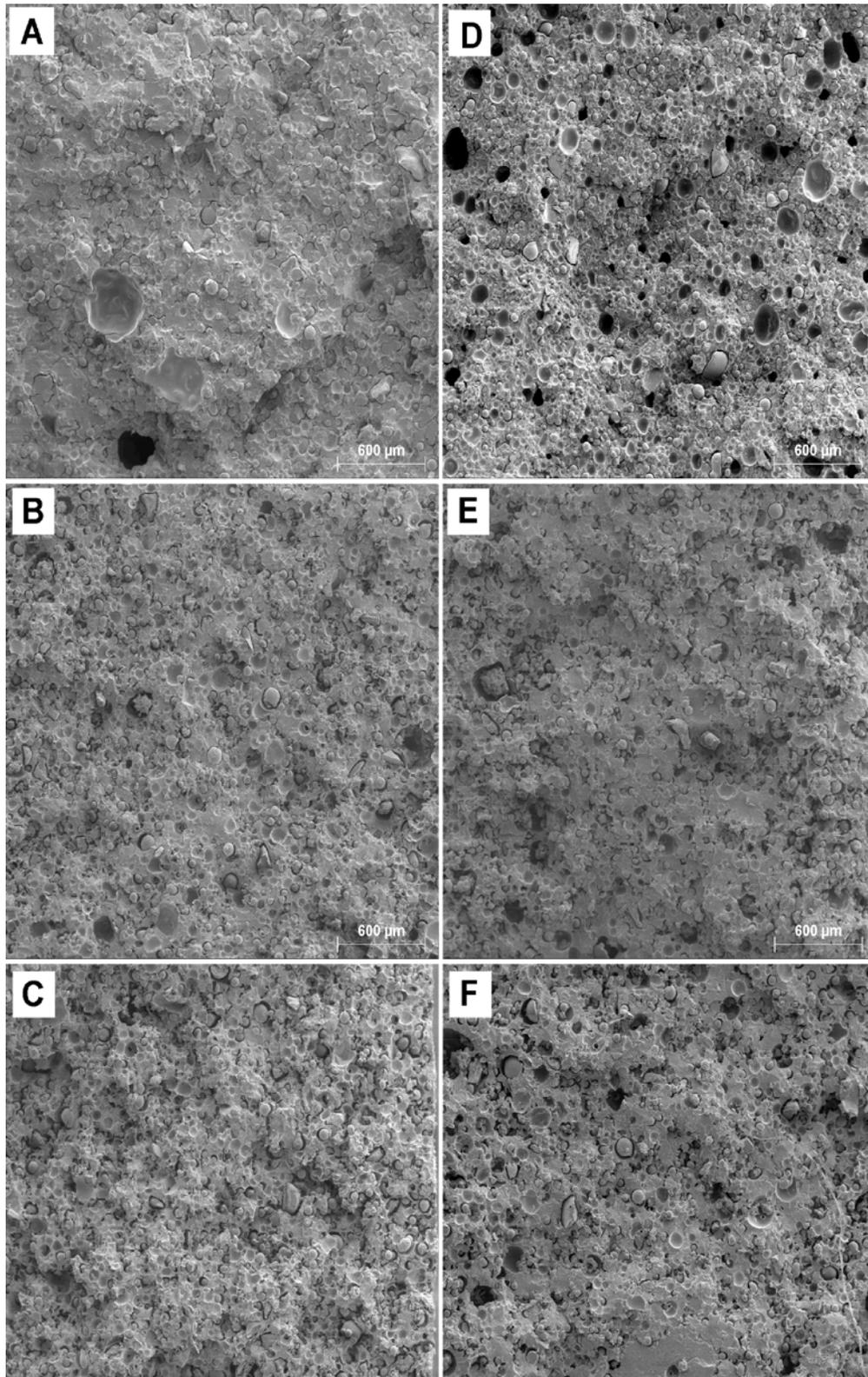


Figura VI.9. Perfil de liberación acumulada del colágeno hidrolizado.

Se puede apreciar que las formulaciones que contienen una cantidad superior de colágeno hidrolizado liberan mayor cantidad al medio, es decir, las formulaciones FM10-25 y FM15-25. También se puede afirmar que las formulaciones modificadas con las microesferas de PMAA liberan más fácilmente el colágeno hidrolizado al medio, respecto a las que no están modificadas con el polímero hidrofílico.

En la Figura VI.10 se pueden examinar las microfotografías SEM de la formulación FM15-25 a distintos tiempos de inmersión en tampón fosfato, a pH 7,4 y a 37°C. Se observa que a mayores tiempos de inmersión se forman cavidades de mayor tamaño debido a la liberación del colágeno hidrolizado hacia el medio.



*Figura VI.10. Microfotografías SEM a distintos tiempos de inmersión: (A) 0 días, (B) 6 días y (C) 16 días de la formulaciones acrílicas autocurables FM15, (D) 0 días, (E) 6 días y (F) 16 días de la formulaciones acrílicas autocurables FM15-25.*

### **VI.2.3. EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO* DE SISTEMAS POLIMÉRICOS**

La biocompatibilidad *in vitro* de las formulaciones acrílicas modificadas con colágeno se evalúa mediante el ensayo de MTT para determinar la toxicidad de los lixiviados de los materiales.

#### **VI.2.3.1. Liberación de componentes, ensayo MTT**

El ensayo MTT se aplica para analizar la posible citotoxicidad de los extractos de las formulaciones acrílicas autocurables modificadas con colágeno hidrolizado, tomando muestras de los distintos lixiviados a 1, 3 y 7 días.

La Figura VI.11 muestra como los valores de viabilidad celular relativa obtenidos para las formulaciones estudiadas son significativamente inferiores a los obtenidos para el control negativo TMX y las muestras de PMMA en todos los casos salvo para las muestras de las formulaciones FM15-25 y FC10. Los lixiviados obtenidos a 1, 3 y 7 días a partir de las muestras de las restantes formulaciones (FM10-10, FM10-25, FM15-10 y FC25) tienen como efecto un descenso en la viabilidad celular de entre el 55 y el 75% con respecto al control negativo, siendo los lixiviados de la formulación FC25 la que presenta una mayor toxicidad para la estirpe celular utilizada a todos los tiempos de extracción incluidos en el diseño.

Se ha observado así mismo un incremento en la viabilidad relativa en los cultivos mantenidos con los lixiviados de 7 días de las formulaciones más tóxicas: como se puede ver en la Figura VI.11, los valores de viabilidad para las muestras FM10-10, FM10-25, FM15-10 y FC25 mantenidas con los extractos de 7 días superan a los obtenidos para 1 y 3 días.

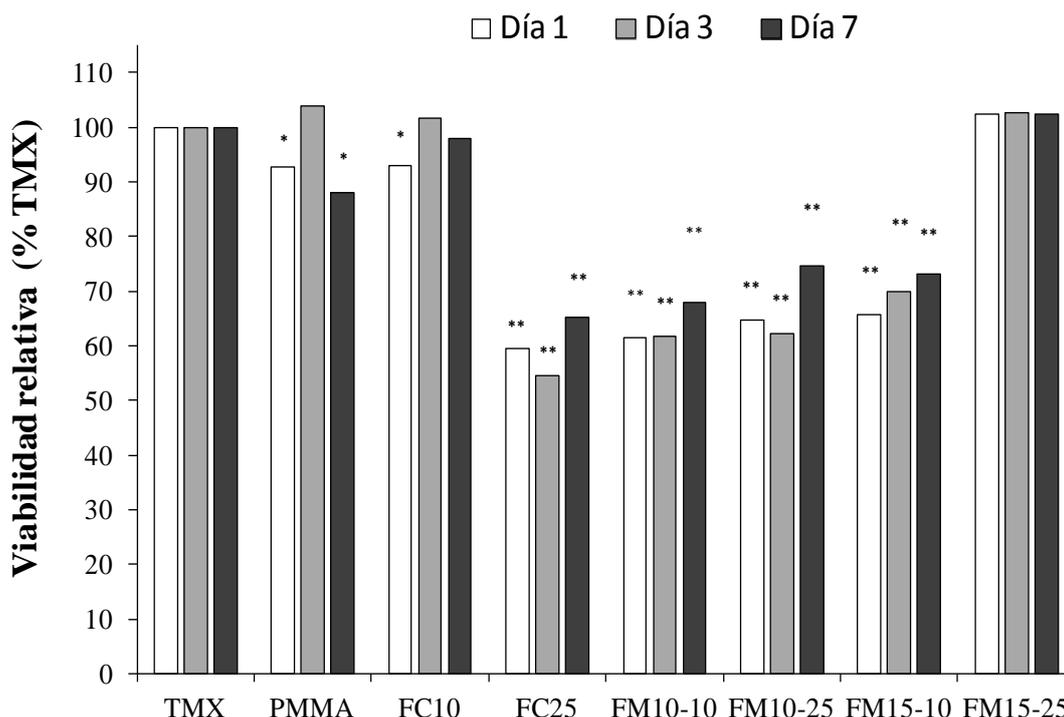


Figura VI.11. Resultados del ensayo MTT de muestras control TMX y PMMA junto con las formulaciones acrílicas autocurables. Se representa la media junto con su desviación estándar ( $n=6$ ) y las diferencias significativas obtenidas en los ANOVA frente a TMX (\*:  $p<0.01$ , \*\*:  $p<0.001$ ).

## VI.3. DISCUSIÓN

### VI.3.1. CARACTERIZACIÓN DE LAS PERLAS

La polimerización en suspensión es una metodología de polimerización que permite la polimerización de monómeros para obtener polímeros con un cierto nivel de pureza<sup>25</sup>. Es un sistema de polimerización alternativo a la polimerización en masa que ayuda a controlar el proceso de polimerización así como la etapa de terminación de una forma más efectiva.

Este sistema de polimerización se utiliza frecuentemente para polimerizar monómeros y obtener polímeros insolubles en medios acuosos, lo que permite utilizar a éstos como medios dispersantes<sup>26</sup>. Entre los monómeros más

frecuentemente polimerizados utilizando este sistema cabe destacar la familia de los metacrilatos de alquilo tales como el metacrilato de metilo o de etilo<sup>25</sup>. Normalmente se utiliza como dispersante una disolución de polivinilalcohol (PVOH) 2-3%, el cual actúa como estabilizante de la suspensión.

La polimerización en suspensión también se ha descrito para sistemas en los cuales el monómero metacrílico es soluble en agua y la fase “dispersante” en este caso debe de ser la orgánica<sup>23</sup>. Este tipo de polimerización se denomina polimerización en suspensión en fase inversa y utiliza disolventes orgánicos como medio dispersante y el monómero es añadido a la reacción directamente, si es líquido, o bien disuelto en la mínima cantidad de medio acuoso posible en el caso de ser un sólido.

En este trabajo se ha aplicado esta variante del sistema de polimerización en suspensión para polimerizar en forma de microesferas el MAA. Debido a la naturaleza orgánica y a la vez hidrofílica de este monómero cabe esperar que este monómero sufra un fenómeno de reparto líquido-líquido entre las dos fases que conforman la reacción. Como tal este fenómeno es negativo ya que condiciona la composición del polímero final así como el rendimiento de la reacción. Con el fin de evitarlo, el monómero se neutralizó estequiométricamente con una disolución de NaOH, previamente a la reacción de polimerización, para evitar el reparto antes mencionado, obteniéndose la sal sódica correspondiente del ácido metacrílico: el metacrilato sódico. Este monómero es totalmente soluble en medios acuosos e insoluble en medios orgánicos, hecho que le permitirá polimerizar en la fase acuosa y permanecer sus micropartículas dispersadas en la fase orgánica.

El proceso de polimerización en suspensión en fase inversa ha dado lugar a microesferas totalmente insolubles en agua y con capacidad de albergar cantidades controladas de este medio. Esta insolubilidad es debida a la adición del agente entrecruzante MBA que permite establecer puentes covalentes entre diferentes cadenas del polímero generado (Figura VI.12), impidiendo así su capacidad de solubilización en ningún medio así como su fusión por incremento

de temperatura, conformándose un polímero termoestable cuya morfología (la de la pieza obtenida, microesferas en este caso) no puede ser modificada posteriormente a su obtención.

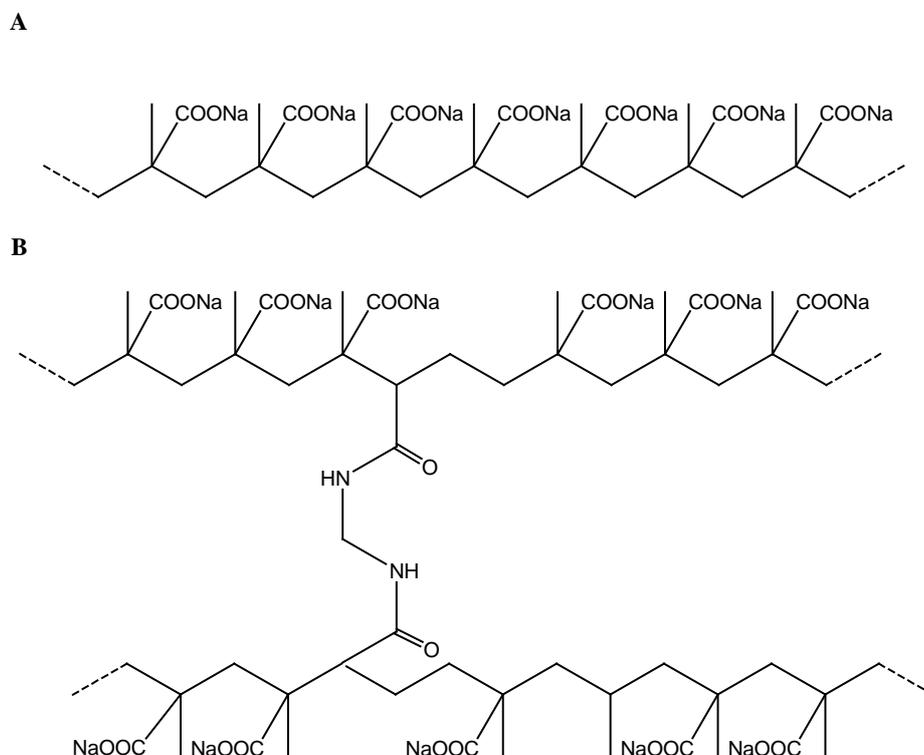


Figura VI.12. Estructura química del entrecruzamiento del poli(metacrilato sódico) con MBA. A) Estructura química del polímero termoplástico y B) estructura química del polímero entrecruzado termoestable.

La incorporación de un mínimo de un 10% de MBA está condicionada a la no solubilidad del polímero en medios acuosos en condiciones fisiológicas. Esta mínima composición permite mantener la forma esférica de las microesferas, incluso después de poner en contacto el material particulado con un medio acuoso. Mediante este sistema de polimerización se han obtenido dos formulaciones de micropartículas de PMAA, o más propiamente dicho poli(metacrilato sódico), debido a la neutralización previa del monómero.

Los dos materiales particulados, M10 y M15, presentan distribuciones de partículas multimodales que indican la existencia de no solo diferentes tamaños de partícula sino que además estos tamaños de partículas se ajustan a diferentes

valores promedio, lo que confirma el resultado obtenido a través de SEM. Las partículas se agregan para formar estructuras de mayores dimensiones debido a que su capacidad hidrofílica favorece fenómenos de adhesión interpartícula. Independientemente de este fenómeno, la población de partículas con valores de diámetro centradas en 85  $\mu\text{m}$ , para las dos formulaciones, representa la población más abundante.

Este tipo de agregados no suponen ningún impedimento a la hora de desarrollar la aplicación para la cual se ha diseñado el material, ya que como tal no se busca un sistema con elevada homogeneidad, sino que permita albergar el colágeno hidrolizado dentro de ellas y que el medio fisiológico externo pueda “extraerlo” hacia el exterior.

En el estudio del tamaño de partícula de las microesferas comerciales de PMMA, las cuales se utilizarán posteriormente para la obtención de las formulaciones de cementos óseos, se observa una fracción de partículas mayoritariamente centrada en 70  $\mu\text{m}$ , aunque existen fracciones con un diámetro superior que se atribuyen nuevamente a agregados de partículas. Este valor promedio de diámetro de partícula es muy próximo al observado para las formulaciones M10 y M15, por lo que *a priori* cabe esperar una buena distribución física de las microesferas de PMAA en las de PMMA a la hora de preparar el correspondiente cemento óseo. Este hecho puede favorecer la permanencia de propiedades mecánicas del material convencional, equilibrando la más que probable pérdida de propiedades atribuida a la formulación de un material a partir del mezclado de otros con diferentes polaridades.

Las microesferas de PMAA se cargaron con diferentes cantidades de colágeno hidrolizado a través de su hinchamiento con disoluciones de esta proteína en agua. La absorción de la disolución fue instantánea incrementándose el volumen de las microesferas de forma inmediata. Esta absorción es atribuible a la elevada hidrofilia del polímero constituyente de las microesferas, la cual provoca la retención de moléculas polares en su estructura, tales como el agua o el propio colágeno. No debemos olvidar que las proteínas son estructuras

poliméricas en las que el grupo funcional que se repite en la cadena principal es el grupo amida, altamente polar y constituido por elementos químicos altamente electronegativos, tales como el nitrógeno o el oxígeno, capaces de establecer enlaces de hidrógeno con el agua y otros grupos funcionales polares. En la Figura VI.13 se muestran las posibles interacciones agua-PMAA-colágeno hidrolizado que justifican la absorción de la disolución de agua por parte de las microesferas así como la retención del colágeno hidrolizado.

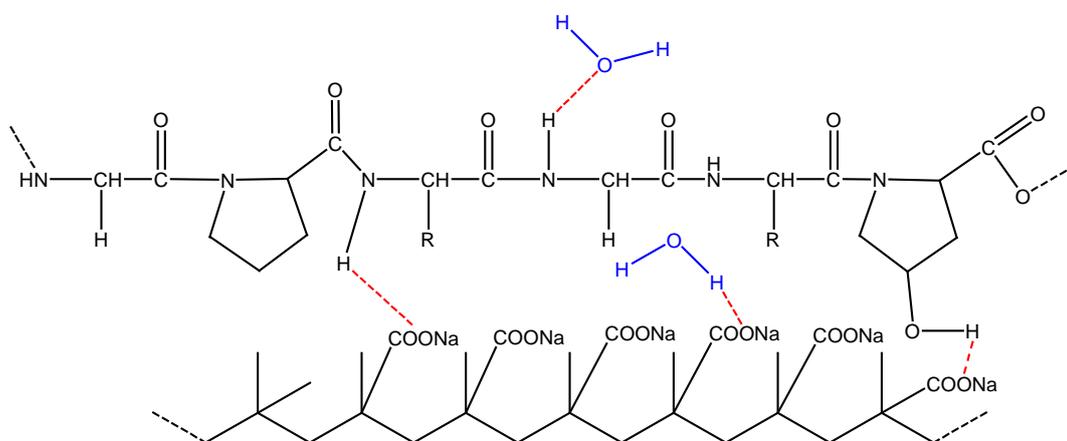


Figura VI.13. Posibles interacciones agua-PMAA-Colágeno hidrolizado.

Tras el proceso de absorción, y posterior liofilización, se obtuvieron nuevamente micropartículas (a las que denominaremos microcápsulas) totalmente esféricas (Figura VI.13), lo que confirma la naturaleza entrecruzada del sistema, hecho que favorece su uso en medios fisiológicos impidiendo su disolución en los mismos. Además, tal y como se muestra en el estudio morfológico superficial (SEM) en la formulación de microesferas M10, cargada con un 10% en peso de colágeno (formulación M10-10) prácticamente no se observa colágeno adherido en la superficie, lo que sugiere que la proteína se encuentra en el interior de la microesfera, tal y como se demostrará posteriormente en el estudio de la liberación del colágeno. Por otro lado, la formulación M15-25 sí que muestra un mayor contenido de colágeno hidrolizado fuera de la micropartícula, hecho que sugiere que esta composición no permite incorporar esta cantidad de colágeno en su interior, quedando la misma saturada. Cabe esperar que este colágeno superficial pueda perjudicar la interfase

micropartícula-PMMA en el cemento dando lugar a la pérdida de propiedades mecánicas.

El estudio termogravimétrico pone de manifiesto la suficiente resistencia térmica de cualquiera de las formulaciones preparadas en este trabajo para su uso en contacto con medios fisiológicos (37°C). En el caso de las microesferas M10 y M15, hasta temperaturas superiores a los 200°C no se observan pérdidas substanciales de peso atribuidas a procesos termodegradativos o de despolimerización del material. Por el contrario, las formulaciones cargadas con colágeno hidrolizado presentan una pérdida de peso entorno a los 100°C atribuida a la absorción de agua medioambiental, así como un perfil de pérdida de peso, hasta el inicio de la máxima degradación térmica, con una pendiente más elevada. Estas dos percepciones en el termograma afirman la extremadamente complicada eliminación en su totalidad del contenido en agua a causa de la excepcional solubilidad que tiene esta proteína en este medio, y la menor resistencia térmica del colágeno respecto al PMAA.

Por otro lado, se ha observado que tras llevarse a cabo el proceso termodegradativo quedaba un contenido muy elevado de residuo sólido en el crisol de ensayo. Estos residuos se obtienen ya que el estudio se realiza en medio inerte (nitrógeno), por lo que parte de la materia se piroliza dejando un residuo carbónico. Este fenómeno de generación de un elevado contenido en carbono (inglés *char*) a baja temperatura de descomposición es común a todos los materiales metacrílicos, y fundamentalmente a sus sales metálicas, siendo por ello utilizados en muchos casos como componente de materiales con mejorada resistencia a la temperatura por formación de cenizas que forman una barrera aislante frente a esta degradación<sup>27</sup>.

El estudio calorimétrico ha mostrado un material totalmente entrecruzado. Esta afirmación se deriva de la ausencia de transición vítrea ( $T_g$ ) de todos los sistemas en los cuales se ha adicionado el MBA. En la bibliografía está descrito este fenómeno, en el cual a partir de un determinado porcentaje de agente entrecruzante la movilidad de las cadenas poliméricas se limita de tal forma que

antes de que el sistema reblandezca se produce su degradación. Así Brock Thomas y col.<sup>28</sup> encontraron que la incorporación de un 0,43% de agente entrecruzante en la polimerización de ácido metacrílico incrementa la  $T_g$  del sistema unos 7°C, de los 178,4°C ( $T_g$  del polímero sin entrecruzar) a los 185,2°C. Si la cantidad de agente entrecruzante es del 3% la  $T_g$  aparece a 222,2°C. El desplazamiento de la  $T_g$  a temperaturas superiores se relaciona con la composición de agente entrecruzante de forma exponencial, por lo que en las condiciones experimentales de este trabajo, con unos valores de agente de entrecruzamiento entre el 10 y el 15% en peso, esta  $T_g$  se encuentra por encima del rango estudiado, y no se pudo observar debido a que se induciría la degradación del material antes de poder determinarla. Este hecho confirma nuevamente la naturaleza termoestable de las microesferas de PMAA, las cuales se hinchan en agua pero ni se disuelven ni se funden debido al entrecruzamiento.

El estudio espectroscópico a través de espectroscopia infrarroja (FT-IR) revela la coexistencia de los dos componentes esperados en las microesferas: PMAA y colágeno hidrolizado. Tras la incorporación del colágeno hidrolizado las bandas características de tensión simétrica del enlace nitrógeno-hidrógeno (N-H) de la amida<sup>29</sup> y la tensión simétrica del grupo carbonilo de la amida I permanecen en la microesfera lo que demuestra que el proceso de incorporación mediante absorción ha sido efectivo.

Otro hecho destacable es la confirmación de la naturaleza del polímero constituyente, es decir, poli(metacrilato sódico) frente a poli(ácido metacrílico). Las bandas de tensión simétrica y antisimétrica del grupo carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) se encuentran perfectamente definidas en el espectro. Además y como corroboración de esta hipótesis la presencia de la banda correspondiente a la tensión simétrica, centrada a  $1199\text{ cm}^{-1}$ , de la estructura carbono-carboxilato ( $\text{C-COO}^-$ ) confirma la estructura del polimetacrilato en su forma salina<sup>30</sup>.

### VI.3.2. CARACTERIZACIÓN DE LAS FORMULACIONES ACRÍLICAS

La caracterización de los cementos ha permitido, determinar la viabilidad de las formulaciones como sistemas de liberación controlada de proteínas. Se han llevado a cabo caracterizaciones físicas, tales como las propiedades mecánicas o las propiedades térmicas; caracterizaciones químicas, entre las que cabe destacar la absorción de agua o la capacidad de liberación del colágeno hidrolizado de forma controlada.

El estudio del proceso de curado permite determinar las temperaturas de curado que alcanzan los cementos de las diferentes formulaciones y el tiempo que necesitan para fraguar. La norma ISO-5833<sup>24</sup> sugiere una temperatura máxima de curado de 90°C para minimizar los efectos necróticos del tejido adyacente al implante. Todas las formulaciones cumplen la norma, de esta manera favorecen la integración del material en la cavidad ósea, disminuyendo el riesgo necrótico por aumento de temperatura.

Con el fin de obtener una formulación fácilmente manejable, que permita unos tiempos de manipulación adecuados para la introducción de la masa polimerizante en los moldes de curado, y posteriormente aplicables en la metodología quirúrgica, se determina el tiempo de fraguado. Para todas las formulaciones se han obtenido tiempos análogos, entre 13 y 15 min. Esta constancia del tiempo de fraguado se explica por la aplicación de una única relación sólido:líquido. La utilización de una misma cantidad de monómero en todas las formulaciones debe proporcionar como resultado valores de tiempos de fraguado análogos. Estos valores de curado son más altos que los sugeridos por la norma ISO-5833<sup>24</sup>. Este hecho no perjudica el uso de estas formulaciones para nuestra aplicación particular, ya que como se debe rellenar el defecto óseo, se necesitará de un tiempo ligeramente más largo para la inyección de éste. Además, un tiempo de fraguado más largo ayuda a disponer de más margen para la manipulación de la muestra, durante la intervención quirúrgica, antes de introducirla en la cavidad ósea.

Dado que estas formulaciones deben poder ser aplicables en defectos óseos provocados por la osteoporosis, es de interés determinar si poseen la resistencia a la compresión necesaria para soportar el peso de las mismas. Por ello el ensayo mecánico que permite conocer estas propiedades es el ensayo de compresión.

Tal y como se ha mencionado anteriormente, el estudio mecánico de las formulaciones de *composites* autocurables para aplicaciones biomédicas, está normalizado a través de la norma ISO-5833<sup>24</sup> para cementos óseos acrílicos. Según se desprende de los resultados de la Tabla VI.3, la incorporación de componentes poliméricos diferentes del PMMA, siempre lleva asociado una disminución de las propiedades mecánicas a compresión<sup>31,32</sup>. Este efecto, se atribuye al establecimiento de interfases no compatibilizadas entre las microesferas de PMMA y las de PMAA, y consecuentemente en aquellas modificadas con colágeno hidrolizado. Estas interfases conducen a la aparición de defectos en el material, a través de las cuales progresan con más facilidad las facturas por compresión. En cualquier caso la pérdida de propiedades mecánicas, no genera valores muy por debajo de 70 MPa, siendo la formulación más perjudicada a FM10-25, cuyo valor de resistencia es 66,4 MPa, representando una disminución de un 21% respecto de la formulación control. Esta mayor pérdida de propiedades mecánicas se justifica por la existencia del colágeno hidrolizado (6,25% respecto el total del cemento), ya que su estructura química no es compatible con la de los metacrilatos. A través del estudio microscópico SEM mostrado en la Figura VI.3.b se ha observado un contenido elevado de colágeno fuera de la micropartícula, el cual se espera que ejerza este efecto negativo sobre las propiedades mecánicas a causa de su diferente polaridad respecto al PMMA. En el caso de las formulaciones modificadas con microesferas M10 y M15 la pérdida de resistencia es más baja: 9,5 y 18%, respectivamente. Esta menor pérdida de propiedades mecánicas, comparada incluso con la que muestran también los materiales modificados con almidones termoplásticos pone de manifiesto el mejor comportamiento mecánico de los sistemas con estructuras de naturaleza química análoga, como es el caso del PMMA y PMAA. La pérdida se

atribuye a la incompatibilidad que puede derivarse de la presencia de los grupos polares del PMAA frente a la cadena hidrofóbica del PMMA.

El estudio mecánico se completa determinando la resistencia mecánica de los materiales después de 15 días de inmersión en tampón fosfato en condiciones fisiológicas. La Tabla VI.3 muestra una disminución drástica de las propiedades mecánicas de todos los materiales una vez alcanzado el estado de equilibrio de absorción de agua. La caída de la resistencia a compresión en fluencia depende de la presencia de las microesferas/microcápsulas de PMAA, ya que las formulaciones control FC-10 y FC-25 presentan disminuciones más moderadas (9,3 y 23,2%, respectivamente), mientras que el resto de formulaciones reflejan una disminución promedio del 63-65%. Esta disminución de propiedades no está relacionada con la liberación de colágeno al medio, ya que es independiente de la presencia o ausencia de la proteína. Se relaciona con el fenómeno de plastificación del material a causa de la entrada de moléculas de agua, hecho que provoca que el material se vuelva flexible y su resistencia mecánica disminuya.

Desde el punto de vista de la capacidad de absorción del agua, existe una marcada diferencia entre las formulaciones en función de la presencia de PMAA en la composición. Las formulaciones que no tienen microesferas de PMAA, componente hidrofílico, absorben cantidades muy bajas de agua. Este efecto se debe a la hidrofobicidad del PMMA y condiciona una muy baja permeabilidad al agua. En cambio cuando se añade colágeno hidrolizado al PMMA, para obtener las formulaciones FC-10 y FC-15, existe un ligero incremento a la capacidad de absorción de agua, que es superior para la formulación FC-15 que contiene cantidades superiores de colágeno hidrolizado. Este efecto se debe a la alta hidrofilia de esta proteína.

Por otro lado, destacan las elevadas cantidades de agua absorbida por las formulaciones que presentan microesferas de PMAA. En este sentido la presencia de más agente entrecruzante condiciona a valores más elevados de absorción de agua. Este hecho se relaciona con la elevada interacción de esta molécula con el

agua, a través de la formación de los correspondientes enlaces de hidrógeno, N-H (Figura VI.12).

La presencia de colágeno hidrolizado también condiciona el establecimiento de enlaces de hidrógeno con el PMAA y el MBA, ya que una menor cantidad de agua podrá interactuar con el polímero. Este fenómeno justifica la más baja capacidad de absorción de agua de las formulaciones portadoras del colágeno hidrolizado.

El estudio a través de UV-VIS de las disoluciones de colágeno hidrolizado pone de manifiesto el cumplimiento de la ley de Lambert Beer, en la cual la absorbancia en esta ventana del espectro guarda proporcionalidad con la concentración del soluto, siendo el coeficiente de extinción molar ( $\epsilon$ ) el coeficiente de proporcionalidad. Este hecho nos permite utilizar esta técnica para determinar la cantidad de colágeno hidrolizado que se libera del cemento óseo acrílico.

Los perfiles de liberación muestran la dependencia que tiene la dosificación del colágeno hidrolizado con la presencia/ausencia del PMAA. Los valores de liberación inferiores a 0,33 mg/mL, corresponden a las formulaciones no cargadas con microesferas de PMAA. La baja polaridad del PMMA impide la entrada de agua en la probeta, fenómeno que ya ha sido observado en el estudio de absorción de agua, dando lugar a una muy baja liberación de la proteína al medio externo. Además, la baja concentración de colágeno liberada tiene lugar en 24-48h de liberación. Este efecto de liberación limitada por la hidrofobicidad del PMMA ya ha sido recogido frecuentemente en la literatura<sup>31,32</sup>. Este colágeno corresponde a las capas más externas del material, que son más accesibles por el medio externo ya que el colágeno localizado más internamente en la probeta no tiene capacidad de poder ser liberado, dado que al agua le cuesta más trabajo penetrar.

Las formulaciones cargadas con PMAA dan lugar a liberaciones superiores de la proteína y más sostenidas en el tiempo, con valores de tiempo de liberación superiores a 25 días. En este caso la presencia del polímero hidrofílico, PMAA,

ayuda a liberar más cantidad de colágeno hidrolizado, y de zonas más internas de la probeta a causa de su mayor polaridad.

La formación de las microesferas con diferentes contenidos de MBA no condiciona la liberación de más cantidad de colágeno. Si se requiere una mayor liberación del colágeno, el material debe haber sido cargado previamente con más cantidad de la proteína, tal y como se desprende de los perfiles de liberación. Por consiguiente, el agente entrecruzante es fundamental para la permanencia de la morfología de las microcápsulas pero no ejerce ningún efecto de control de la liberación.

Finalmente el estudio de viabilidad celular pone de manifiesto la toxicidad de diferentes formulaciones ensayadas. Existen tres componentes de los cementos capaces de provocar dicha disminución de la viabilidad y que son los tres monómeros utilizados en la fabricación de las formulaciones: MMA, MAA y MBA. Esta hipótesis se avala por el incremento en la viabilidad celular manifestada a los 7 días de incubación. Dado que a cada tiempo de estudio el medio es substituido por nuevo medio fresco, el material sufre un proceso de “lavado”, eliminándose los componentes de bajo peso molecular existentes en el cemento. Una citotoxicidad manifiesta del material polimérico debería ser permanente y no mostrar este efecto después de los lavados a 1 y 3 días.

#### **VI.4. BIBLIOGRAFÍA**

1. Peppas NA, Hilt JZ, Khademhosseini A, Langer R. Hydrogels in biology and medicine: from molecular principles to bionanotechnology. *Adv Mater.* 2006; 18: 1345-60.
2. Langer R, Peppas NA. Chemical and physical structure of polymers as carriers for controlled release of bioactive agents: a review. *Polymer Reviews.* 1983; 23(1): 61-126.

3. Kim YJ, Choi S, Koh JJ, Lee M, Ko KS, Kim SW. Controlled release of insulin from injectable biodegradable triblock copolymer. *Pharm Res.* 2001; 18(4): 548-50.
4. Roskos K.V, Tefft J.A., Frintzinger B.K., Heller J. Development of a morphine-triggered naltrexone delivery system. *J Control Release.* 1992; 19(1-3): 145-59.
5. Carr DA, Gómez-Burgaz M, Boudes MC, Peppas NA. Complexation Hydrogels for the Oral Delivery of Growth Hormone and Salmon Calcitonin. *Ind Eng Chem Res.* 2010; 49(23): 11991-5.
6. Bergmann NM, Peppas NA. Molecularly imprinted polymers with specific recognition for macromolecules and proteins. *Prog Polym Sci* 2008; 33(3): 271-88.
7. Abdalla MA, Suhaimi F, Das S, Shuid AN, Mohamed Z, Soelaiman IN. Expression of TGF-B1 in the blood during fracture repair in an estrogen-deficient rat model. *Clinics.* 2011; 66(12): 2113-9.
8. Chen DI, Zhao M, Mundy GR. Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors.* 2004; 22(4): 233-41.
9. Shimomura T and Namba T, in *Superabsorbent Polymers Science and Technology*, ed by Buchholz FL, Peppas NA, ACS Symposium Series 573, pp 121–124 (1994).
10. Buchholz FL, Peppas NA. *Superabsorbent polymers science and technology.* En Buchholz FL, Peppas NA, editores ACS Symposium Series: 1994. vol. 573, pág. 121–4.
11. Bilia A, Carelli V, Colo D, Nannipieri E. In vitro evaluation of a pH-sensitive hydrogel for control of GI drug delivery from silicone-based matrices. *Int J Pharm.* 1996; 130(1): 83–92.

12. Escobar JL, García DM, Zaldivar D, Katime I. Hidrogeles. Principales características en el diseño de sistemas de liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 2002; 3(3): 1-25.
13. Lee PI, Kim C J. Probing the mechanisms of drug release from hydrogels. *J Control Release*. 1991; 16: 229-36.
14. Huang CF, Chang FC. Comparison of hydrogen bonding interaction between PMMA/PMAA blends and PMMA-co-PMAA copolymers. *Polymer*. 2003; 44(10): 2965-74.
15. Kabiri K, Omidian H, Hashemi SA, Zohuriaan-Mehr MJ. Synthesis of fast-swelling superabsorbent hydrogels: effect of crosslinker type and concentration on porosity and absorption rate. *Eur Polym J*. 2003; 39(7): 1341-8.
16. Buchholz FL, Graham T. *Modern superabsorbent polymer technology*. New York: Wiley-VCH; 1998. p. 1-152.
17. Peppas NA, Bures P, Leobandung W, Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Euro J Pharm and Biopharm*. 2000; 50: 27-46.
18. Mo C, Shu-quan Z, Hua-Min L, Zhan-bin H, Shu-qin L. Synthesis of poly(acrylic acid)/sodium humate superabsorbent composite for agricultural use. *J Appl Polym Sci*. 2006; 102: 5137-43.
19. Renard B, McKenna TF. Kinetics of polymerization of partially neutralized acrylic acid in inverse suspensions. *Macromol Symp*. 2000; 150: 251-7.
20. Dowding PJ, Vincent B. Suspension polymerisation to form polymer beads. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*. 2000; 161(2): 259-69.
21. Holmberg K, et al. *Surfactants and polymers in aqueous solutions*. "2nd Editions, John Wiley & Sons Ltd, England 251-257. 2000.

22. Omidian H, Zohuriaan-Mehr MJ, Bouhendi H. Polymerization of sodium acrylate in inverse-suspension stabilized by sorbitan fatty esters. *Eur Polym J.* 2003; 39(5): 1013-8.
23. Mayoux C, Dandurand J, Ricard A, Lacabanne C. Inverse suspension polymerization of sodium acrylate: synthesis and characterization. *J Appl Polym Sci.* 2000; 77: 2621–30.
24. ISO Specification 5833. Standard specification for implants in surgery-acrylic resin cement, 1992.
25. Gallardo A, Lozano AE. Polimerización. En: Garrido L, Ibarra L, Marco C, editores. *Ciencia y tecnología de materiales poliméricos.* Madrid: Instituto de ciencia y tecnología de polímeros, CSIC Madrid, España. 2004. Pág. 23-143, vol.1.
26. José Alberto Méndez. Tesis doctoral: Formulaciones acrílicas polimerizables a baja temperatura para aplicaciones biomédicas. Universidad Complutense de Madrid, Madrid, España. 2002.
27. Thomas J. Xue, Charles A. Wilkie. *Thermal degradation of Poly(styrene-g-acrylonitrile).* Elsevier Science Limited. 1997.
28. Brock Thomas J, Creecy C, McGinity JW, Peppas NA. Synthesis and properties of lightly crosslinked poly((meth)acrylic acid) microparticles prepared by free radical precipitation polymerization. *Polymer Bulletin* 2006 May 18; 57(1):11-20.
29. Muyonga JH, Cole CGB, Duodu KG. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of acid soluble collagen and gelatin from skins and bones of young and adult Nile perch (*Lates niloticus*). *Food Chem.* 2004; 86(3): 325-32.

30. Kim B, Peppas NA. Analysis of molecular interactions in poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol) hydrogels. *Polymer*. 2003; 44(13): 3701-7.
31. Méndez JA, Fernández M, González-Corchon A, Salvado M, Collía F, de Pedro JA, et al. Injectable self-curing bioactive acrylic-glass composites charged with specific anti-inflammatory/analgesic agent. *Biomaterials*. 2004; 25(12): 2381-92.
32. Méndez JA, Abraham GA, Fernández MD, Vázquez B, San Román J. Self-curing acrylic formulations containing PMMA/PCL composites: Properties and antibiotic release behavior. *J Biomed Mater Res*. 2002; 61(1): 66-74.

---

# **CAPÍTULO VII**

## **CONCLUSIONES GENERALES**

---

A partir de los resultados obtenidos a lo largo de todo este trabajo, y tras una discusión detallada de los mismos, cabe destacar las siguientes conclusiones:

- La incorporación de polímeros biodegradables, tanto de naturaleza sintética como biológica, no perjudica los condicionantes térmicos de la norma ISO 5833, al no alcanzarse valores máximos de curado superiores a los 90°C. Este hecho permite aceptar un bajo riesgo necrótico del tejido circundante al implante durante el proceso de curado.

- Desde el punto de vista mecánico no todos los materiales aportan la resistencia mecánica necesaria al material para poder ser aplicados como cementos óseos acrílicos. La naturaleza alifática e hidrofóbica de los poliésteres alifáticos, y particularmente del PES, no contribuye a la mejora de las propiedades mecánicas del material. Este efecto se ha atribuido a la solubilización del PES en el monómero durante el curado, impidiendo así la formación de un *composite*.

- La incorporación del almidón termoplástico (TPS) ha resultado ser la más apropiada para su uso como sistema de liberación controlada de especies bioactivas, dando lugar al menor detrimento de la calidad mecánica, comparadas con las de los poliésteres alifáticos.

- El almidón ha demostrado una elevada capacidad de absorción de agua a consecuencia de su elevada hidrofilia y de la formación de superficies porosas a través de las cuales el medio externo puede difundir hacia el interior del material, y posteriormente permitir la salida de los agentes bioactivos que puedan incorporarse al cemento durante la etapa de preparación.

- La composición química, y por tanto la polaridad, del almidón termoplástico, así como el tamaño de las partículas incorporadas y la relación sólido:líquido empleadas han mostrado tener una influencia significativa en las propiedades físico-químicas de los cementos obtenidos.

- El control y modificación de estos parámetros, tanto físicos como químicos, permite obtener una muy amplia familia de cementos óseos con capacidad de liberación controlada de bisfosfonatos de tercera generación, como el Ibandronato. Este resultado ofrece la posibilidad de diseñar terapias específicas contra la osteoporosis en función de la cantidad terapéutica de fármaco requerida.

- A consecuencia de la disminución de los valores de propiedades mecánicas producida por la incorporación de almidones termoplásticos, incluso en seco, el uso de estos materiales resulta apropiado para aplicaciones con baja sollicitación mecánica, como es el caso de relleno de defectos óseos.

- La polimerización en suspensión en fase inversa ha resultado ser una metodología muy adecuada para la obtención de microesferas de poli(metacrilato sódico), entrecruzadas con MBA, cargadas con colágeno hidrolizado (proteína modelo). Se obtiene un sistema altamente estable en medios acuosos y con capacidad de retención de agua y especies activas muy solubles en agua.

- Las propiedades mecánicas de los materiales modificados con microesferas/microcápsulas de PMAA, comparadas con el control de PMMA, presentan valores por debajo de los obtenidos en los cementos modificados con almidones. Este efecto se ha atribuido a la mayor compatibilización química del sistema PMMA-PMAA que la del PMMA-TPS.

- La incorporación de las microesferas de PMAA inducen una marcada liberación de la proteína modelo comparada con los controles de PMMA/HC. Los materiales cargados con mayores cantidades de colágeno mostraron perfiles de liberación con mayores cantidades de proteína liberada. El agente entrecruzante no ha sido un factor controlante del mecanismo de liberación.

- Los perfiles de liberación se extienden de forma controlada más allá de los 25 días de exposición al medio fisiológico simulado, comparativamente superior a los 1-2 días de los controles. Este hecho avala el uso del sistema PMMA-PMAA cargado con colágeno como sistema modelo liberador de proteínas para el tratamiento de la osteoporosis.

- El estudio de la toxicidad de los lixiviados de las formulaciones modificadas con el sistema PMMA-PMAA da como resultado una disminución generalizada en la viabilidad celular. Este efecto se atribuye a la liberación al medio de monómeros residuales de las formulaciones, ya que a los 7 días de incubación la viabilidad celular vuelve a aumentar. Se asume que el proceso de “lavado” del material al cambiar el medio elimina esta citotoxicidad obteniéndose un material más biocompatible.