

UTILIZACIÓN DE GASES EN LA CARACTERIZACIÓN TERMODINÁMICA DE NUEVOS CEMENTOS ÓSEOS FOTOPOLIMERIZABLES

El empleo de cementos óseos en Traumatología y Odontología constituye hoy en día una práctica habitual. Sin embargo, los cementos óseos disponibles actualmente no cubren toda una serie de características y propiedades que sería deseable exigir a un material que ha de cumplir toda una serie de funciones.

Desde el punto de vista de su aplicación, las principales limitaciones impuestas por los cementos desarrollados hasta el momento son dos: el tiempo *limitado de su manipulación* durante su aplicación, antes de que el cemento “fragüe” o endurezca y el calor liberado durante el proceso de fraguado (polimerización), o ocasiona necrosis en los tejidos circundantes al implante del cemento óseo.

Con el fin de resolver estas limitaciones, iniciamos en nuestros laboratorios el presente Trabajo de Investigación dirigido al desarrollo de nuevos cementos óseos fotopolimerizables con carga de hidroxiapatita. Es decir, composites en los que el proceso de polimerización o fraguado se lleva a cabo de forma controlada por medio de la luz. Esta característica permite disponer de cementos óseos ya formulados con un tiempo de vida de manipulación ilimitado y, al mismo tiempo, con una velocidad de endurecimiento o fraguado controlable y, por tanto, controlable igualmente la liberación de calor de polimerización. Según nuestro conocimiento no existe ningún antecedente en la bibliografía científica y técnica relacionado con estas características de aplicación.

Los resultados obtenidos a la realización del presente Trabajo ponen de manifiesto la viabilidad de dichos cementos óseos, mediante la adecuada formulación, dentro de un amplio intervalo de composiciones de Quitosano y Ácido Acrílico en medio acuoso como matriz orgánica e hidroxiapatita como cargas. La irradiación con luz visible, de estas formulaciones, conduce al fraguado o solidificación de las mismas mediante un proceso de fotopolimerización con formación de un composite.

Tanto las propiedades del material final obtenido, como su comportamiento bajo irradiación, pueden ser modulados mediante la adecuada selección de los diferentes componentes de estas formulaciones, así como con la concentración de canforquinona como fotoiniciador y con la intensidad y el tiempo de irradiación.

Todo ello permite disponer de una gama de materiales fotopolimerizables empleables como cemento y rellenos óseos adaptables a diferentes aplicaciones dentro del campo de la Traumatología y la Odontología.

INDICE

CAPÍTULO I.- INTRODUCCIÓN.	1
CAPÍTULO II.- ANTECEDENTES.	7
2.1.- Sistemas poliméricos biodegradables.	9
2.1.1.- Aplicaciones biomédicas	13
2.1.2.- Membranas biodegradables a partir de quitosana.	22
2.1.3.- Aplicaciones de la quitosana	27
2.2.- Bioactividad y biodegradación de fosfatos de calcio.	30
2.2.1.- Ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	34
2.2.1.1.- Ensayos <i>in vitro</i> .	35
2.2.1.2.- Ensayos <i>in vivo</i> .	37
CAPÍTULO III.- CEMENTOS ÓSEOS FOTOPOLIMERIZABLES	41
3.1.- Síntesis y caracterización de la hidroxiapatita (HA) y la hidroxiapatita sinterizada (HAS).	41
3.1.1.- Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).	41
3.1.2.- Difracción de Rayos X.	42
3.1.3.- Tamaño y área superficial de las partículas.	43
3.1.4.- Análisis químico. Determinación de la relación Ca/P.	44
3.2.- Modificación superficial de la HA. Caracterización.	45
3.2.1.- Espectroscopía Infrarroja.	46
3.2.2.- Grado de modificación.	50
3.2.3.- Difracción de Rayos X. Tamaño y área superficial de las partículas funcionalizadas.	52
3.3.- Preparación de composites.	53
3.4.- Cinética de fotopolimerización de los composites preparados.	57
3.4.1.- Influencia del contenido de HA.	57
3.4.2.- Influencia del contenido de CHI y del método de preparación.	61
3.4.3.- Influencia del contenido de ácido acrílico.	70
3.4.4.- Influencia de la naturaleza del relleno.	74

3.5.- Propiedades físicas de los composites.	76
3.5.1.- Determinación de la temperatura máxima de polimerización.	76
3.5.2.- Determinación del por ciento de dobles enlaces residuales (%DER).	77
3.5.3.- Determinación del coeficiente de difusión (D) en suero fisiológico (SBF).	81
3.6.- Propiedades térmicas.	92
3.6.1.- Análisis termogravimétrico.	95
3.6.2.- Determinación de la Temperatura de transición vítrea (Tg) de los composites.	101
3.6.2.1.- Determinación calorimétrica (DSC).	102
3.6.2.2.- Determinación mediante Análisis Dinamo-Mecánico (DMA).	105
3.7.- Propiedades Mecánicas.	111
3.7.1.- Ensayo de tracción.	112
3.7.2.- Ensayo de compresión.	118
3.8.- Degradación en SBF de los composites preparados.	123

CAPÍTULO IV.- PARTE EXPERIMENTAL. 133

4.1.- Materiales.	133
4.1.1.- Disolventes.	133
4.1.2.- Monómero.	133
4.1.3.- Fotoiniciador.	133
4.1.4.- Reactivos.	134
4.2.- Síntesis de compuestos.	136
4.2.1.- Obtención y purificación de la quitosana.	136
4.2.2.- Síntesis de la 4-aminobenzil alcohol (DMOH).	137
4.2.3.- Síntesis de la hidroxiapatita.	137
4.2.4.- Modificación de la hidroxiapatita.	138
4.2.4.1.- Sinterización.	138
4.2.4.2.- Modificación superficial con agentes funcionalizantes con grupos carboxílicos.	138

4.3.- Técnicas de caracterización.	139
4.3.1.- Espectroscopía Infrarroja.	139
4.3.2.- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protón, RMN-H ¹ .	139
4.3.3.- Espectroscopía Ultra Violeta Visible, UV-Vis.	139
4.3.4.- Viscosimetría.	139
4.3.5.- Calorimetría Diferencial de Barrido, DSC.	140
4.3.6.- Difracción de Rayos X.	140
4.3.7.- Microscopía.	140
4.3.8.- Medida del tamaño de partícula por dispersión de la luz.	140
4.3.9.- Medida del área superficial de partículas. Método BET.	141
4.3.10.- Determinación de la relación calcio/fósforo (Ca/P).	144
4.3.10.1.- Determinación de calcio.	144
4.3.10.2.- Determinación de fósforo.	146
4.3.11.- Grado de modificación superficial.	147
4.4.- Técnicas de irradiación.	148
4.4.1.- Fotocalorimetría Diferencial de Barrido (PDSC).	148
4.4.1.1.- Aspectos teóricos.	150
4.4.1.2.- Métodos de operación.	151
4.4.2.- Sistema de irradiación convencional.	153
4.5.- Métodos.	154
4.5.1.- Determinación del grado de acetilación de la quitosana.	154
4.5.2.- Determinación del Peso Molecular de la quitosana.	156
4.5.3.- Estudio de la viscosidad.	157
4.5.4.- Estudio del pH.	157
4.5.5.- Análisis Termogravimétrico (TGA).	157
4.5.6.- Determinación de la temperatura de polimerización.	158
4.5.7.- Determinación del por ciento de dobles enlaces residuales (DER).	159
4.5.8.- Análisis Mecánico-Dinámico (DMA).	159
4.5.9.- Determinación de la temperatura de transición vítrea (T _g).	160
4.5.10.- Ensayos Mecánicos.	161

4.5.10.1.- Ensayos de Tracción.	163
4.5.10.2.- Ensayos de Compresión.	163
4.5.11.- Ensayos de hinchamiento. Preparación de muestras.	164
4.5.12.- Preparación de muestras para el ensayo de degradación.	164
ANEXO I.- FOTOPOLIMERIZACIÓN RADICAL.	167
ANEXO II.- QUITOSANA.	183
ANEXO III.- HIDROXIAPATITA	197
BIBLIOGRAFIA	223

Capítulo I.- Introducción

El desarrollo y avance de la industria de los biomateriales, presenta hoy en día un enorme interés, tanto desde el punto de vista social y económico como científico. El término biomaterial abarca cualquier producto natural, natural modificado o sintético, preparado para ser utilizado como un dispositivo médico o parte de él; es decir, materiales aptos para ser utilizados en seres humanos con fines de tratamiento o alivio de una enfermedad o lesión, o bien para la sustitución o modificación de su anatomía o de un proceso fisiológico. La diferencia con los medicamentos estriba en que lo que se desea obtener no se alcanza por medios farmacológicos, químicos o inmunológicos, ni metabólicos, aunque en su función pueden concurrir tales medios. En su definición más amplia abarcan desde los materiales típicamente implantables (obturantes dentales, lentes de contacto, sangre artificial, etc), hasta los utilizados en la fabricación del instrumental médico y de enfermería que entran en contacto, directo o indirecto, con el organismo (guantes, suturas, bolsas de sangre, etc).

La utilización de biomateriales con fines médicos se remonta a unos cuatro mil años, cuando aparecen las primeras suturas. Sin embargo, no es hasta el siglo XX cuando verdaderamente comienza a haber un interés concreto en este tipo de materiales. Desde que Frankel realizará el primer implante de un material polimérico en 1894¹, mediante la inserción de celuloide en el cráneo de un paciente, la utilización de polímeros con fines médicos ha experimentado una evolución favorable, de tal forma que hoy en día existe una gran variedad de polímeros sintéticos que son utilizados como biomateriales.

Ya sean de origen natural o sintético, los polímeros representan el grupo de mayor importancia de todos los biomateriales debido a la versatilidad estructural que los mismos presentan, lo cual permite, mediante los cambios adecuados, seleccionar entre una extensa gama de propiedades. Esto ofrece grandes posibilidades, ya que mediante una adecuada selección de estructuras pueden prepararse dispositivos biológicamente inertes o biodegradables, con excelente tolerancia por parte del organismo debido a su biocompatibilidad.

Dentro del campo de la Medicina, es la Implantología la especialidad que ha introducido un mayor número de biomateriales entre sus aplicaciones. El desarrollo de sistemas implantables requiere la participación de diferentes disciplinas, ya que no es posible encontrar un material que cumpla todas las propiedades que requiere la aplicación de los mismos, por lo que los sistemas más avanzados están basados en el diseño de materiales compuestos o composites, en los que la participación de dos o más componentes proporciona sistemas con un conjunto de propiedades excepcionales.

Puesto que los biomateriales diseñados para este fin se aplican en un medio fisiológico y con propiedades que se diferencian de individuo a individuo, es tan importante la constitución química o la forma física y el diseño de dispositivos, como las características estructurales y morfológicas de su superficie, ya que los fenómenos de interfase son responsables de la aceptación o rechazo de un biomaterial, la formación de cápsula fibrosa o la adhesión bacteriana o proteica, plaquetaria y en general celular. Es por ello que un implante debe poseer unas características superficiales que promuevan la adhesión celular del tejido, pero no la de bacterias, ya que de lo contrario daría lugar a un proceso infeccioso y en definitiva al rechazo del implante.

La integración ideal de un biomaterial implantado se lograría mediante el establecimiento de una unión íntima entre el implante y el tejido receptor, para lo cual sería necesario una adhesión tisular a su superficie, incluso mediante puentes químicos a través de enlaces covalentes entre el implante y el tejido. Para lograr estas características es conveniente utilizar sistemas con superficies rugosas o incluso porosas, que permitan el crecimiento celular y la integración tisular hacia el interior del implante.

Hasta el momento, se han propuestos muchos materiales para su uso como implantes óseos en el organismo humano, tanto para la reparación de lesiones en el hueso como para su

sustitución, temporal o permanente. En ambos casos, el material esta en contacto con el hueso, por lo cual resulta imprescindible el estudio de su biocompatibilidad. Es deseable que estos materiales presenten características biodegradables o bioactivas, ya que de ser bioinertes éste no queda unido a la parte del hueso vivo del organismo.

El primer material propuesto para la reparación ósea data de París en 1900 y fue el yeso². Sin embargo, en 1965 se concluyó que el yeso es reabsorbido por el organismo más rápidamente que el crecimiento del nuevo hueso, por lo que su empleo con estos fines fue abandonado. Desde entonces, los fosfatos de calcio están siendo estudiados como materiales o componentes de implantes óseos³. Es en esta línea de trabajo en la que se encuadra la familia de las apatitas, debido a su probada capacidad para formar enlaces con el hueso, al tiempo que presentan buenas características de biocompatibilidad.

En la década de los 60 se produjo un gran avance en el campo ortopédico al desarrollarse una nueva modificación en el método de fijación de las prótesis al hueso⁴. El uso de cementos óseos a partir de poli-metilmetacrilato, PMMA, se ha mantenido desde entonces, con sus seguidores y detractores. Sin embargo, es sabido que la fijación que este material produce entre la prótesis y el hueso no es eterna y es necesaria a veces una segunda revisión operatoria para reemplazar las pérdidas que se producen.

Los problemas fundamentales de los cementos de PMMA son: su alta temperatura de fraguado que puede provoca necrosis en el tejido circundante⁵; la contracción que alcanzan al fraguar, lo cual puede inducir a que se creen espacios entre la prótesis y el lugar del implante, lo que conlleva al fenómeno de osteólisis; y la presencia de monómero residual, que no polimeriza en la matriz polimérica, lo que ha provocado algunos casos de embolismo⁶.

A pesar de estas desventajas, el número de operaciones donde se utiliza este tipo de cementos llega a ser numeroso y presentan un promedio de vida de 12 años. Otro de los problemas más controvertidos que presentan estos materiales es su biocompatibilidad. En este punto, la incorporación de rellenos de hidroxapatita supone un avance. Por otra parte, la incorporación de polvos de cerámica bioactiva en el PMMA permite crear un buen enlace entre el hueso y el implante después de la cirugía⁷. Otros estudios muestran la incorporación de

factores de crecimiento en los cementos con el objetivo de incrementar la osteointegración y reducir el riesgo de formación de tejido fibroso en la interfase con el hueso⁸.

Los primeros estudios de estos materiales se hicieron con vistas a realizar reparaciones y aumentos de masa ósea. La hidroxiapatita, HA, y el β -fosfatotricálcico, β -FTC, son los materiales de fosfato de calcio de mayor interés dentro de este campo debido a su biocompatibilidad⁹. Se puede utilizar con diferentes configuraciones como: conos, barras, discos, etc., lo cual permite utilizar diferentes maneras de realizar reparaciones óseas. Sin embargo, las más usadas son los granulados, ya que estos pueden rellenar cualquier geometría y pueden mezclarse con colágeno y con proteínas inductoras de crecimiento. La HA se emplea para casos de aumentos del reborde alveolar, fusión espinal y cirugía de tumores¹⁰. El β -FTC se aplica, fundamentalmente, en la reparación de defectos óseos periodontales y para el relleno de lesiones periapicales endodónticas¹¹.

A pesar de lo comentado anteriormente, los fosfatos de calcio no tienen una aplicación práctica generalizada, ya que uno de los problemas fundamentales de estos materiales es su capacidad de migrar de la zona del implante, lo cual trae como consecuencia que el crecimiento del hueso en la zona afectada se vea disminuido, así como sus pobres propiedades mecánicas¹². Investigaciones realizadas para prevenir el proceso de migración de las partículas de HA, mediante la utilización de matrices de colágeno, han dado como resultado el uso de estos composites como implantes en cirugía de médula espinal, en casos de trauma, en reparaciones de defectos óseos y en el aumento de rebordes alveolares¹³. Los materiales presentan una excelente biocompatibilidad y no presentan reacciones adversas.

Evidencias de que los materiales de fosfatos de calcio estimulan el proceso de osteointegración, (capacidad del medio para adaptarse a la presencia de un implante), lo encontramos en los estudios realizados con implantes de HA en monos, sin que los implantes tuvieran factores de crecimiento observándose la formación de hueso nuevo¹⁴. Otros investigadores recogen en sus estudios la formación de tejido nuevo en bloques de HA implantados en tejidos musculares y subcutáneos de monos Rhesus¹⁵. Por otra parte, los composites de colágeno-HA inducen la formación de hueso en implantes realizados en caninos y

se ha observado la formación de hueso en la intermembrana que se crea entre el hueso y el implante, entre la séptima y novena semana de realizada la operación.

Teniendo en cuenta lo explicado anteriormente, Bonfield plantea que el futuro de los biomateriales esta en los sistemas multicomponentes¹⁶. Entre estos sistemas encontramos a los composites. Un composite no es más que una combinación de dos o más materiales diferentes. Las características de estos materiales dependen, en gran medida, de las propiedades de sus componentes, entre los que encontramos: la biodegradabilidad, biocompatibilidad, módulo elástico, comportamiento mecánico y los tipos de interacciones que se crean entre los componentes. Todas estas variables interactúan entre de forma compleja. Una detallada investigación de cada una de estas propiedades resulta imprescindible a la hora de analizar el comportamiento del material final. Los composites actuales tienden a simular o imitar a los compuestos naturales. El hueso humano, por ejemplo, es un composite de colágeno-proteína y mineral de hidroxiapatita. Es por ello, que las tendencias, a la hora de seleccionar los diferentes componentes, están dirigidos a la utilización de fosfatos de calcio como refuerzos y matrices que presenten características que permitan su uso en organismos biológicos¹⁷.

Por otra parte, un factor que influye sobre el comportamiento de los biomateriales a partir de polímeros es el método de polimerización que se utilice. De forma general, existen dos métodos fundamentales: por vía química, sistemas autocurados, y por la acción de la luz, sistemas fotocurados. Ambos métodos deben de cumplir una serie de requisitos para lograr una óptima polimerización. En los materiales implantables se ha observado que la fotopolimerización permite un mejor control y manipulación del material que los sistemas autocurados, una menor porosidad en el material final, y además presentan mayor resistencia a la abrasión que los sistemas autocurados en sistemas *in vivo*, como demuestran los resultados de las investigaciones realizadas en monos¹⁸.

La fotopolimerización, que constituye en la actualidad un área de investigación multidisciplinar, está experimentando un gran desarrollo, tanto en el entorno académico como en el industrial, debido a las ventajas que posee como: control espacial y temporal, razones de tipo técnico y ecológico e incluso energéticas. Estas ventajas que suponen los procesos por vía Fotoquímica en el área de los polímeros han despertado el interés de los diferentes sectores de

aplicación industrial como la Electrónica, las Artes gráficas, y los Recubrimientos, entre otras. Actualmente, dentro de Fotoquímica de Polímeros pueden agruparse sus aplicaciones en varios grupos, atendiendo a la naturaleza del proceso: Reacciones de Síntesis, Fotodegradación-Fotoestabilización y procesos de Fotopolimerización-Fotoentrecruzamiento¹⁹.

El objetivo de este trabajo es el desarrollo de nuevos materiales compuestos fotopolimerizables a partir de polímeros y monómeros como matriz orgánica, y fosfatos de calcio como material de relleno, en la preparación de materiales de implante o reparación ósea. Los materiales desarrollados pretenden ser una aportación dentro del área de indudable interés aplicado. Se ha llevado a cabo un estudio del comportamiento bajo irradiación, tanto de la matriz sin relleno como del material final, así como la influencia de diversas variables sobre el comportamiento térmico y mecánico de los materiales obtenidos.

Capítulo II.- Antecedentes

A pesar de la intensa actividad que se ha venido desarrollando en el campo de los Biomateriales, durante los últimos veinte años, y su aplicación en Biomedicina y Cirugía, no se ha llegado aún a obtener un conocimiento adecuado que permita relacionar con certeza las características y las propiedades químicas y físicas de los biomateriales con la respuesta que genera su implantación en el organismo humano.

El primer requisito indispensable de cualquier biomaterial aplicable en seres humanos es su biocompatibilidad. Este concepto abarca la capacidad de un material para conseguir una respuesta apropiada del organismo en una aplicación específica. Un biomaterial no debe inducir ningún tipo de reacción en el organismo receptor y su resistencia mecánica, así como su resistencia a la fatiga, deben ser las adecuadas al tipo de aplicación para el que este destinado.

Cuando un dispositivo o prótesis se implanta en el organismo humano, se establece una interacción directa entre el biomaterial y el tejido que lo rodea. De acuerdo con la respuesta que provocan los diferentes tipos de biomateriales se pueden clasificar en tres grupos²⁰:

- *Los materiales biotolerables*, que interaccionan con los tejidos a través de efectos electrostáticos, iónicos o a través de la migración o formación de compuestos de bajo peso molecular. Entre ellos encontramos a los cementos óseos acrílicos, polietileno y sistemas compuestos de polietileno.

- *Los materiales bioinertes*, que son los que no provocan ningún tipo de reacción apreciable en el tejido receptor. Un ejemplo de estos materiales lo encontramos en los metales utilizados como elementos de fijación de prótesis.
- *Los materiales bioactivos*, constituidos por sistemas que estimulan el crecimiento o en general la reacción del tejido en el que son implantados, para con ello conseguir una integración tisular lo más perfecta posible. Dentro de estos sistemas encontramos todos aquellos sistemas compuestos que contienen elementos tales como los fosfatos de calcio, a los que se les ha reconocido un carácter osteogénético apreciable.

Es fácil comprender que resulte muy complicado diseñar sistemas artificiales que reflejen fielmente la compleja estructura de sistemas naturales tan elaborados y especializados. Sin embargo, gracias a la preparación de sistemas compuestos o composites estratégicamente diseñados, es posible desarrollar formulaciones que se aproximen a los sistemas naturales, sino en su estructura al menos en su comportamiento. Una de las grandes limitaciones que se presentan en la preparación de composites sintéticos es que rápidamente tienden a formar sistemas difásicos.

Afortunadamente, para la preparación de sistemas compuestos con características parecidas a los sistemas naturales se dispone al menos de compuestos orgánicos e inorgánicos de altas prestaciones, que pueden combinarse con materiales poliméricos, tanto termoplásticos como termoestables, para formar el composite adecuado. Asimismo, los sistemas naturales nos enseñan que la superficie de los composites debe de estar funcionalizada o presentar una estructura adecuada para controlar la capacidad de adhesión en un entorno mecanoquímico muy complejo, como es el medio fisiológico. Todos estos factores están sirviendo de estímulo para que se produzca un rápido crecimiento en el desarrollo de sistemas que se denominan *biocomposites*.

Como se ha mencionado anteriormente, los composites son materiales compuestos por dos o más componentes dando como resultado un híbrido, con características combinadas de sus componentes. Uno de los sistemas más estudiados, y que será objeto de estudio en este trabajo, son los sistemas poliméricos biodegradables que utilizan como relleno un fosfato de calcio, en

este caso la hidroxiapatita. A continuación, y a modo de información, se mencionan algunas de las características más importantes de estos sistemas haciendo una distinción entre los polímeros que constituyen la fase orgánica y los materiales de fosfatos de calcio utilizados como relleno.

2.1.- Sistemas poliméricos biodegradables.

El organismo humano tiene una poderosa capacidad para desarrollar una acción regenerativa de tejidos u órganos dañados por una lesión. Gracias a ello, en muchas aplicaciones es conveniente la utilización de sistemas temporales mientras el propio organismo regenera el tejido afectado. Los biomateriales quirúrgicos biodegradables ofrecen una alternativa adecuada para la inmovilización interna de tejidos traumatizados, ya que en un primer período de aplicación, ya sea en el hueso, piel o ligamento, el componente biodegradable proporciona una función mecánica adecuada que permite la regeneración tisular óptima.

De forma general, existen dos argumentos a favor de la utilización de sistemas biodegradables:

- La biodegradación constituye un mecanismo práctico y útil para eliminar el biomaterial a través de una vía natural después de haber concluido su función.
- La biodegradación ofrece la oportunidad de poder conseguir un proceso de curación completo, con la recuperación total de la funcionalidad del sistema fisiológico, ya que ha de tenerse en cuenta que una tendencia del organismo humano o de sus componentes fisiológicos es la capacidad que desarrolla para adaptarse a su entorno.

Atendiendo a esto, el comportamiento degradativo de sistemas fisiológicos puede considerarse como dos procesos diferenciados: la biodegradación, como proceso por el cual un sistema o dispositivo es atacado para dar lugar a fragmentos u otros productos degradados y la bioabsorción y biorreabsorción, que son términos que hacen referencia a sistemas biodegradables en medios activos, cuyos productos de degradación son compuestos de bajo peso molecular solubles en el medio fisiológico, siendo eliminados del organismo por métodos típicos.

Los requerimientos que se le exigen a un material biodegradable son muy estrictos. Primeramente, los materiales de partida y los productos de su degradación deben de ser inocuos. En segundo lugar las propiedades mecánicas mínimas exigidas deben de mantenerse durante el proceso de regeneración del tejido defectuoso. Finalmente, los productos iniciales y los de degradación, no deben de entorpecer la regeneración tisular, sino en todo caso, acelerar el proceso de curación. Por último, el implante no debe de degradarse durante el proceso de esterilización.

Los polímeros naturales ofrecen la posibilidad de mimetizar, incluso ser idénticos, a las sustancias macromoleculares naturales frente a las que el medio biológico esta preparado para reconocer y metabolizar²¹. De este modo se evitan los problemas de estimulación de una reacción inflamatoria crónica y la toxicidad, asociados frecuentemente al uso de muchos polímeros sintéticos. Los polímeros naturales se degradan en medios fisiológico mediante enzimas naturales, lo cual es una garantía de que el implante será degradado y metabolizado por mecanismos biológicos. En cierta medida es posible controlar la velocidad de degradación y, por tanto, la vida media del implante, llevando a cabo modificaciones químicas como entrecruzamientos. En la Figura 1 se muestran las familias de polímeros biodegradables más utilizados:

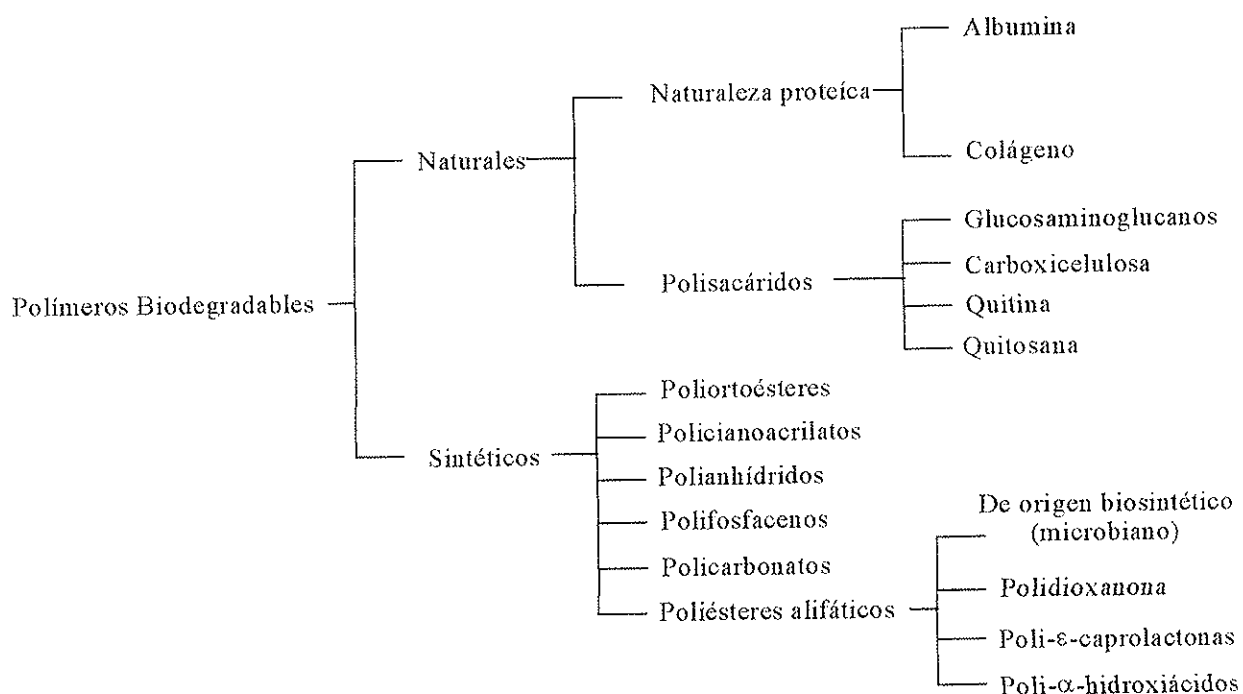


Figura 1.- Familias de polímeros biodegradables.

La mayoría de los polímeros biodegradables contienen grupos funcionales sensibles a procesos hidrolíticos como éster, carbonato anhídrido, uretano, ortoéster o amida, aunque los más utilizados (como los poliésteres alifáticos), son los que contienen ésteres de ácidos carboxílicos. Cuando un material, obtenido a partir de polímeros degradables, es introducido en un medio fisiológico, el agua penetrará en la matriz polimérica, comenzando el proceso de hidrólisis de los enlaces hidrolíticamente inestables.

Un gran número de factores (Figura 2), influyen en el proceso degradativo de los polímeros biodegradables^{22,23}. Si la velocidad de difusión del agua es mayor que la rotura hidrolítica en el polímero, será una degradación en bloque. Si ocurre lo contrario, será una degradación superficial.

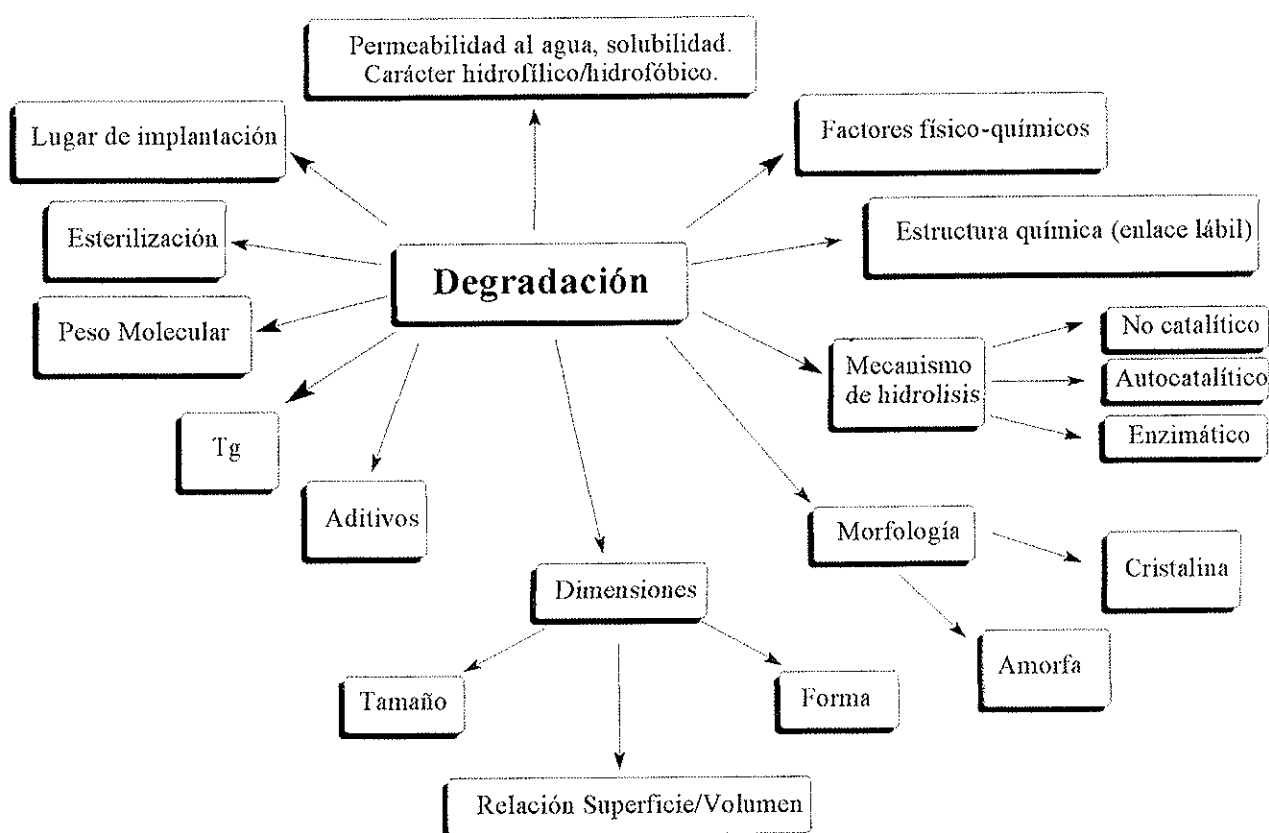


Figura 2.- Factores que afectan el proceso de degradación.

Actualmente, se han alcanzado importantes desarrollos, dentro del campo de la medicina, en la utilización de polímeros degradables. Estos materiales son empleados en el tratamiento

local del cáncer²⁴, liberación de vacunas²⁵, y como materiales de implante²⁶, entre otras aplicaciones. Debido a la naturaleza de estos materiales, las investigaciones en este campo se han dirigido a estudiar el comportamiento que estos presentan bajo diversas condiciones. Ejemplo de esto lo tenemos en el estudio de la pérdida de estabilidad mecánica de los polímeros durante el proceso de erosión²⁷, en la estabilidad del material a los cambios químicos y físicos²⁸ y en el estudio de los productos de degradación que se liberan al medio, como medida indirecta de la toxicidad y citotoxicidad que presenta el material²⁹.

La degradación polimérica juega un importante papel en todos los tipos de polímeros. La relación entre la escala de tiempo de degradación y la escala de tiempo de la aplicación es la que establece las diferencias entre materiales biodegradables y los no-degradables. De forma general se asigna el término “degradable” a los materiales que se degradan durante su aplicación o inmediatamente después de esta. Los no-degradables son aquellos que presentan un tiempo mayor para degradarse que el tiempo necesario en su aplicación.

Tanto la degradación como la erosión han sido investigadas en muchos campos de la ciencia, como el tratamiento de residuos o la ciencia espacial³⁰. Por esta razón, coexisten en la literatura diferentes definiciones de degradación y erosión y muchas veces mezcladas unas con otras³¹. Las siguientes definiciones se adoptan en este trabajo: el proceso de “degradación” describe el proceso de escisión de la cadena del polímero formándose oligómeros y finalmente monómeros; la “erosión” se designará como la pérdida de material, en forma de monómeros u oligómeros, que salen del polímero³².

Existen diferentes tipos de degradación de polímeros, entre las que encontramos: la fotodegradación, la degradación térmica, y la degradación química. En biomateriales no juega un papel fundamental la fotodegradación, debido al sitio donde estos se aplican. La degradación térmica es importante en el caso de los polímeros no-degradables³³, siendo la degradación química la más importante, ya sea mediante vía hidrolítica o enzimática, ya que todos los polímeros degradables contienen en su estructura enlaces hidrolizables. La degradación enzimática se refiere a los procesos de degradación que ocurren en sistemas biológicos³⁴.

Los procesos implicados en la erosión de los polímeros degradables son complicados. El medio, generalmente agua en situaciones *in vitro*, penetra en la masa del polímero hinchándola.

La intrusión del agua desencadena la degradación química, creando oligómeros y monómero. La degradación progresiva cambia la microestructura de la matriz, mediante la formación de poros, a través de los cuales tanto oligómeros como monómeros son liberados. La salida de estos del material trae como consecuencia la pérdida de peso del material.

Entre los factores que afectan el proceso de erosión hay que tener en cuenta los cambios morfológicos, cambios en el valor del pH y el comportamiento de los productos de degradación del polímero. El primer cambio morfológico durante la erosión es relativo a la superficie del polímero. En el caso de los polianhídridos se puede observar la formación de grietas inmediatamente después de entrar en contacto con el medio adecuado³⁵. Otros estudios muestran que la superficie de los poliortoésteres aumenta su rugosidad en un medio alcalino^{36,37}. De modo general puede decirse que durante el proceso de erosión el material pasa a una estructura más porosa, a través de las cuales pasan al medio los productos de la degradación.

El valor del pH influye significativamente en la velocidad de degradación y erosión de materiales en cuya composición están presentes los polímeros. A medida que el valor del pH favorezca el proceso de degradación, la superficie de este se hace más porosa, incrementando el tamaño de las grietas. Estos dos factores combinados influyen de manera positiva en los procesos de erosión y degradación. Por otra parte, durante la degradación de las cadenas de polímero, los oligómeros y monómeros que se forman no son liberados inmediatamente. Los oligómeros del ácido láctico (PLA), por ejemplo, forman sales con diferentes propiedades que las de sus compuestos protonados³⁸. Li y Vert, observaron que el PLA tiende a cristalizar durante el proceso de degradación³⁹. Por otra parte, también los monómeros que se generan son capaces de cristalizar durante la erosión.

A continuación exponemos un breve resumen de las aplicaciones más significativas de los polímeros biodegradables utilizados como biomateriales hoy en día.

2.1.1.-Aplicaciones biomédicas.

Los implantes biodegradables no necesitan cirugía para ser eliminados del organismo, una vez que se haya completado el proceso de destrucción por parte del mismo. Los polímeros

degradables presentan un gran interés en aplicaciones a corto o medio plazo, en las que se requieren solo la presencia temporal de un implante polimérico. Una ventaja adicional de este tipo de implantes es que su uso puede evitar algunos de los problemas relacionados con la durabilidad a largo plazo de dispositivos implantados permanentemente.

Alguna de las aplicaciones prácticas de los implantes degradables son: soportes o andamiajes temporales; barreras temporales; sistemas de liberación de fármacos y matrices de soportes temporales para la ingeniería tisular^{40,41}. A continuación se exponen los aspectos más importantes y ejemplos más comunes de estas aplicaciones:

(a) Soportes temporales.

Los soportes o andamiajes temporales abarcan a todos aquellos materiales quirúrgicos que son implantables. Desde un proceso de cicatrización, un hueso fracturado, hasta un vaso sanguíneo dañado, son ejemplos de situaciones donde el uso de los implantes biodegradables es extensivo.

En todos estos casos, el implante degradable proporciona un soporte mecánico temporal hasta que el tejido natural sana y recupera sus propiedades iniciales. Para que la función del material implantado fuera ideal debería de existir una transferencia gradual de función, es decir, a medida que el tejido se recupera, el implante debería de eliminarse gradualmente. Este es uno de los mayores retos en el diseño de estos soportes temporales.

Suturas quirúrgicas.

El mayor éxito de los soportes temporales son las suturas quirúrgicas⁴². Las suturas pueden clasificarse como reabsorbibles y no reabsorbibles. Las primeras pueden dividirse en dos grandes grupos: de origen natural (se degradan por la acción de las enzimas) o de origen sintético (degradables o no enzimáticamente).

El ejemplo más común de suturas de origen natural es el "Catgut", que durante décadas fue el único elemento de suturas absorbibles⁴³. Las primeras suturas degradables sintéticas se desarrollaron a base de poliácido glicólico, PGA, y aparecieron en el mercado hacia la década de

los 70 bajo el nombre de Dexón®. Este ejemplo representó el primer uso extendido de un polímero sintético biodegradable en una aplicación clínica importante.

Dispositivos de fijación ósea.

Aunque habitualmente la fijación metálica es el proceso más utilizado en el tratamiento de fracturas, la diferencia entre las propiedades mecánicas entre los metales y el hueso trae como consecuencia, muchas veces, que una gran parte de las tensiones mecánicas se transfieran al implante, lo que induce el deterioro y resorción del hueso. Este problema, sumado a la posibilidad de corrosión implica, en muchos casos, la necesidad de una segunda operación para extraer el implante⁴⁴.

Un implante biodegradable debería de poseer una resistencia y rigidez comparable con el hueso y debería de descomponerse lenta, pero gradualmente, para asegurar una transferencia de tensión progresiva hacia el tejido regenerado. La aplicación de materiales quirúrgicos biodegradables es una excelente alternativa para adecuarse a este patrón ideal y mejorar la regeneración tisular. Por otra parte deberá de proporcionar un proceso de curación óptimo, ya que el nuevo tejido autóctono reemplazaría al material biodegradable, lo cual implica una recuperación total de la funcionalidad del sistema fisiológico.

Debido al proceso degradativo que debe sufrir el implante, la resistencia y el esfuerzo mecánico se pueden transferir paulatinamente al tejido regenerado. Además, en ambos casos no es necesaria una segunda operación, con todos los beneficios que esto supone. Los primeros materiales utilizados con este fin fueron los polímeros o copolímeros de PLA y PGA, debido a la biocompatibilidad que estos presentan⁴⁵.

Sin embargo, las propiedades mecánicas sufren una brusca disminución a las pocas semanas de implantados, incluso antes de la pérdida de masa por biodegradación y, en la mayoría de los casos, antes de que el organismo haya recuperado la resistencia necesaria en la zona afectada, tal y como se muestra en la Figura 3.

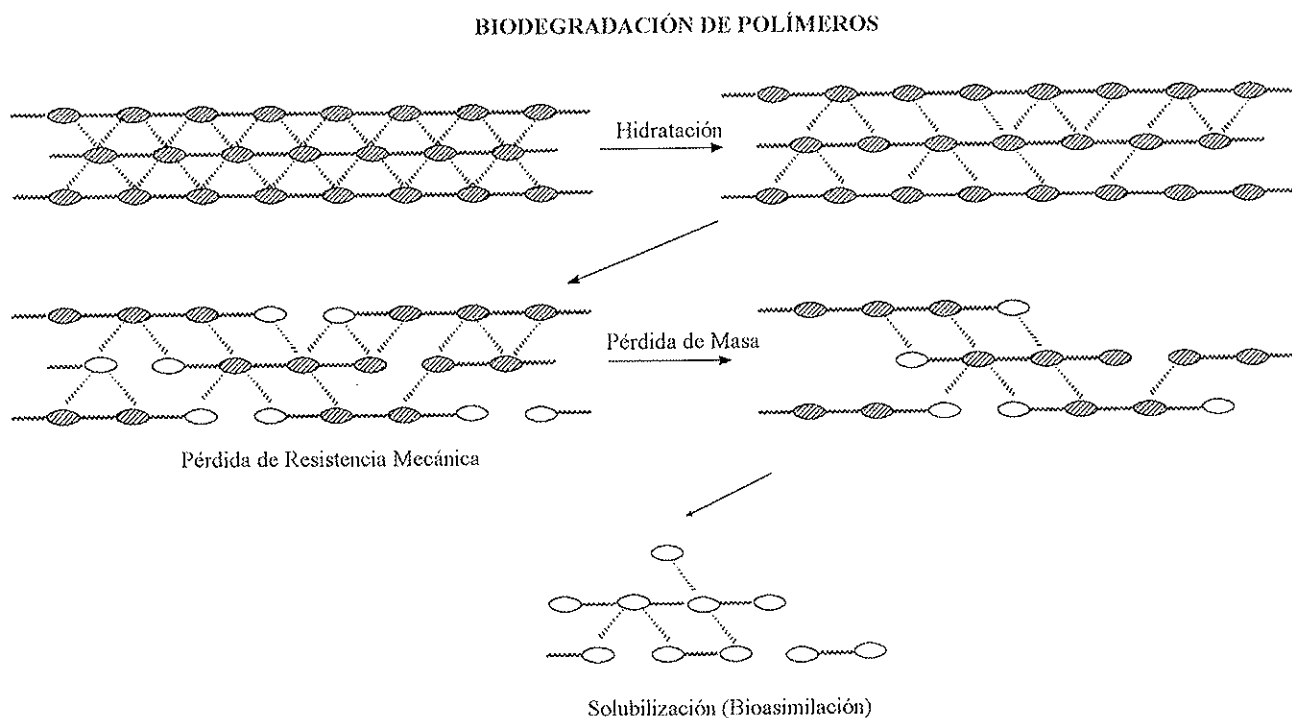


Figura 3.- Mecanismo de biodegradación de los poli- α -hidroxiácidos.

En primer lugar, el implante biodegradable sufre un proceso de hinchamiento y de absorción de agua, que se difunde hacia el interior de la masa del polímero en un espacio corto de tiempo. Posteriormente, comienza el proceso hidrolítico, con rotura de los enlaces al azar a lo largo de la cadena principal del soporte polimérico, formándose, como consecuencia del mismo, cadenas cortas del polímero.

Este proceso es la causa de la pérdida de propiedades mecánicas, la cual se produce antes de que haya una pérdida de masa real. Esta última es un requisito evidente para la regeneración tisular y el reemplazo del implante por nuevo tejido. Finalmente, en las últimas etapas del proceso degradativo se producen fenómenos de migración, bioasimilación o solubilización de las cadenas cortas, pudiendo empezar el proceso concomitante de regeneración ósea.

Estos problemas han impulsado la búsqueda de soluciones y el inicio del desarrollo de sistemas en varias direcciones. Una de ellas considera la utilización de sistemas autorreforzados con fibras del mismo biomaterial embebidas en una matriz amorfa a base de ácido poliglicólico (PGA), ácido poliláctico (PLA) o copolímeros. Ejemplos de estos materiales lo encontramos en

el Biofix®, preparado a partir de la sinterización de suturas de PGA comercial, o los materiales obtenidos por Pennings y col., que consiguen un PLA superresistente mezclándolo con poli-ε-caprolactona y copolímeros de caprolactona y trimetilcarbonato⁴⁶.

Siguiendo otra dirección, se han utilizado sistemas compuestos con un componente biodegradable y otro bioestable que garantice la resistencia mecánica necesaria durante el proceso de curación (sistemas compuestos parcialmente biodegradables). Como elementos biodegradables pueden utilizarse cualquiera de los materiales poliméricos existentes. Como componentes bioestables se han utilizado materiales tan diversos como fibras de carbono, fibras cerámicas y copolímeros acrílicos, fibras de poliamida, poliuretanos, hidroxiapatita, vidrios bioactivos⁴⁷ e incluso polipéptidos helicoidales⁴⁸. Con ello se consiguen buenas propiedades mecánicas y se garantiza su mantenimiento durante el primer período postoperatorio, absolutamente necesario para conseguir el éxito de cualquier intervención quirúrgica.

El componente biodegradable, en forma de fibras inmersas en la matriz bioestable, es capaz de sufrir un proceso de bioreabsorción, dando lugar a una estructura porosa, que posteriormente será colonizada por el tejido fibroso y en último término por tejido óseo formado por osteogénesis natural en la zona del implante⁴⁹.

Otra vía de preparación de implante de dos componentes, pero no en forma de mezcla, es la preparación de copolímeros de injerto formados por bloques biodegradables y bioestables hidrosolubles^{50,51}. Una primera ventaja de estos materiales es que las cadenas macromoleculares contendrán ya los dos componentes unidos químicamente, es decir, la combinación está diseñada a escala molecular, a diferencia de los componentes basados en sistemas reforzados. Esto también significa que los problemas de segregación y desarrollo de un sistema de mezcla adecuado estén bien resueltos.

Pero estos sistemas poseen otra característica posiblemente más interesante: en los primeros estadios de la degradación, que es cuando las prótesis biodegradables fallan, previsiblemente mantendrán sus propiedades mecánicas gracias al componente bioestable. Pero además, el resultado último de la degradación de los bloques biodegradables es la formación de una cadena con el resto bioestable hidrosoluble gracias al diseño de la síntesis. Esto significa que

es posible una reabsorción total del implante, idealmente, cuando el nuevo tejido posea suficiente resistencia mecánica; los bloques biodegradables serán eliminados por solubilización (a diferencia de los compuestos mezclados) y el tejido podrá regenerarse completamente, Figura 4.

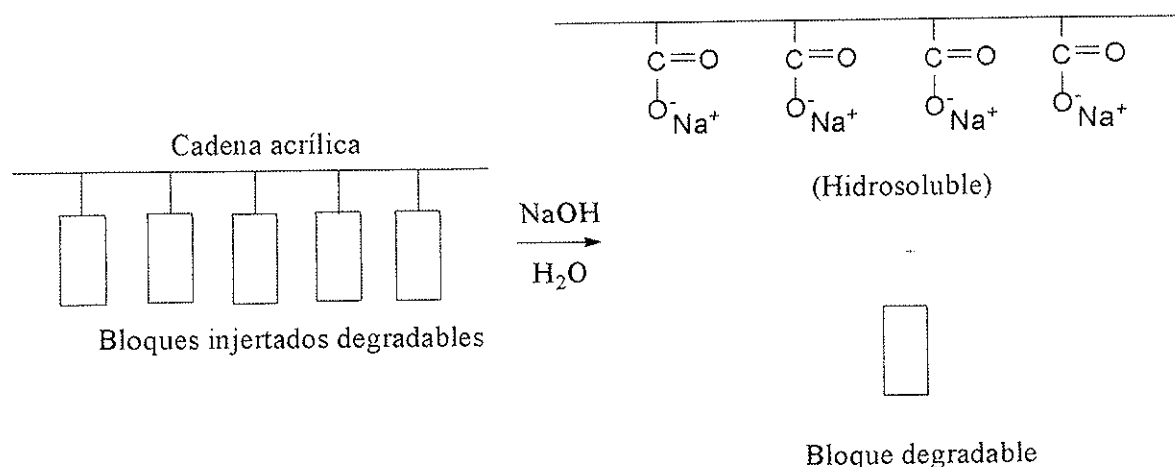


Figura 4.- Mecanismo de reabsorción de los copolímeros de injerto con bloques biodegradables hidrosolubles.

Injertos vasculares

En este campo se le viene dedicando una especial atención y dedicación al desarrollo de expansores y prótesis vasculares aceptables de pequeño diámetro, a las que se les incorporan matrices que pueden ser absorbidas por un nuevo tejido en crecimiento⁵². El complejo gelatina-heparina adecuadamente entrecruzado podría actuar, simultáneamente, como superficie antitrombogénica temporalmente y como una excelente subestructura para un nuevo tejido⁵³. Se ha observado que recubrimientos reabsorbibles de naturaleza acrílica y portadores de agentes antiagregantes plaquetarios tiene buen comportamiento *in vivo* y poseen cierta capacidad para promover la endotelización^{54,55}.

(b) Barrera temporal.

El uso de implantes biodegradables como barrera temporal esta circunscrito a la prevención de la adhesión y al uso como piel artificial. Las adhesiones son uno de los problemas más frecuentes después de los tratamientos quirúrgicos cardiovasculares, espinales o de tendón.

En estos casos, el implante toma forma de un filme polimérico fino o de un dispositivo tipo malla que se coloca entre los tejidos implicados en la adhesión en el momento de la operación⁵⁶.

La piel artificial para el tratamiento de quemaduras y otras lesiones de piel es otra aplicación ampliamente investigada como dispositivos tipo barrera de carácter temporal. La mayoría de las pieles artificiales desarrolladas han utilizado polímeros biodegradables como el colágeno, quitina y poli-L-leucina^{57,58}, los cuales son polímeros enzimáticamente degradables.

Prevención de la adhesión.

Matsuda y colab.⁵⁹ han desarrollado un mucopolisacárido fotopolimerizable como un nuevo material para la prevención de la adhesión tisular, que reúne una serie de propiedades, como: biocompatibilidad, características superficiales no adhesivas, biodegradabilidad en conjunción con la curación de la lesión e inocuidad.

Hubbell y colab.⁶⁰ han descrito un gel bioerosionable basado en macromonómeros de copolímeros de bloque de polietilenglicol (PEG) y PLA o PGA con grupos acrílicos terminales, los cuales se usaron para la gelificación *in vivo* por exposición a la luz UV, obteniendo resultados prometedores en ratas.

Piel artificial.

Koide y colab.⁶¹ desarrollaron un nuevo tipo de biomaterial para piel artificial, en forma de esponja, combinando colágeno fibrilar con gelatina. La esponja fue estabilizada metabólicamente y físicamente, introduciendo entrecruzamientos.

Yasutomi y colab.⁶² prepararon un drenaje biosintético con capacidad de liberación de fármacos, compuesto de una mezcla esponjosa de colágeno modificado con quitosana que es laminada con una membrana de poliuretano impregnada en sulfato de gentamicina, un antibiótico. La evaluación *in vivo* mostró que este sistema era capaz de suprimir el crecimiento bacteriano y minimizar el daño celular.

(c) Dispositivos de liberación controlada de fármacos.

El uso de una matriz polimérica para controlar la carga y liberación de fármacos tiene un enorme interés por dos motivos fundamentales: en primer lugar, es interesante de cara a conseguir un nivel terapéutico adecuado durante períodos de tiempo mayores que los que se consiguen mediante administraciones convencionales (unas pocas horas), períodos que pueden llegar a ser de varios meses, como algunos sistemas anticonceptivos desarrollados.

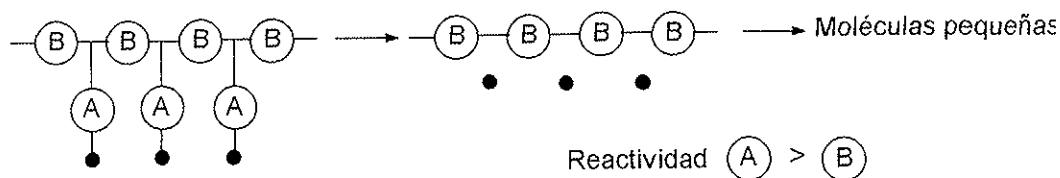
Esta dosificación controlada es aplicable también para el tratamiento de afecciones que necesitan medicación constante. En este sentido, una liberación controlada óptima no significa obligatoriamente una concentración plasmática constante, sino una liberación que se adecue a las necesidades terapéuticas del paciente, quien, debido a los ciclos metabólicos u otras causas, puede necesitar un mayor aporte del fármaco, por ejemplo, en determinados momentos del día. En definitiva, se trata de conseguir una buena relación farmacodinámica/farmacocinética.

El segundo aspecto por el que un sistema de dosificación es de interés es el de la vectorización, que se define como la capacidad de dirigir el efecto del fármaco al tejido o área enferma, en vez de distribuirlo sistemáticamente por todo el organismo; aspecto de gran importancia cuando se trata de fármacos de alta toxicidad sistémica, como los anticancerígenos.

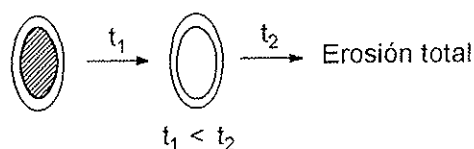
Conseguir transportar y liberar el agente activo en la zona a tratar mediante un transportador polimérico es un área de gran interés en la actualidad y existen numerosos equipos de trabajo dedicados a ellos. Recientemente se han preparado sistemas inteligentes biodegradables que permitan la liberación del fármaco como respuesta a un estímulo, por ejemplo, la temperatura⁶³.

Ya que los dispositivos implantables de liberación de fármacos son, por necesidad, mecanismos temporales, el desarrollo de sistemas implantables de liberación de fármacos es probablemente la aplicación más investigada de polímeros degradables^{64,65}. La liberación de un fármaco en un dispositivo biodegradable o bioerosionable puede ocurrir por algunos de los tres mecanismos representados en la Figura 5.

Mecanismo I



Mecanismo II



Mecanismo III

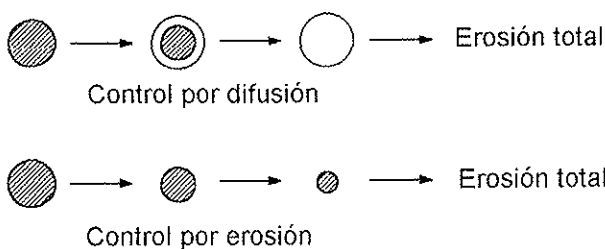


Figura 5.- Mecanismos de liberación de principios activos en una matriz biodegradable.

En el mecanismo I, el agente activo o fármaco está unido covalentemente al esqueleto macromolecular bioerosionable o biodegradable y su liberación se produce a través de la rotura hidrolítica del enlace A. Para conseguir cierto control en la liberación y debido también a que no es deseable la liberación de fármacos con fragmentos de polímero todavía unido, la reactividad del enlace A debería ser significativamente mayor que la del enlace B. Por otro lado, no es necesario que el enlace B sea lábil, pues el resto macromolecular poli-B puede ser reabsorbible por solubilización.

En el mecanismo II, el agente activo se incorpora en el interior de una membrana permeable bioerosionable. La liberación del componente activo es, en este caso, controlada por la difusión a través de la membrana. En el mecanismo III, el agente bioactivo es dispersado en un polímero bioerosionable y su liberación se controla por difusión, por una combinación de difusión y erosión o por pura erosión.

(d) Matrices en ingeniería de tejidos.

Los polímeros biodegradables se usan en el campo de la ingeniería de tejidos como andamiajes temporales en los que las células pueden crecer y formar tejidos⁶⁶. Un objetivo en ingeniería de tejidos es definir estructuras químicas que mimeticen el ambiente *in vivo*, en el cual las células existen naturalmente, y estimular a las células a formar tejido.

En particular, un soporte o andamiaje para ingeniería de tejidos necesita proporcionar una estructura tridimensional que facilite la unión celular y la regeneración tisular, al mismo tiempo que preserva la expresión o diferenciación de los fenotipos celulares. La química de los polímeros puede contribuir en la unión celular y en la biocompatibilidad. Poli- α -hidroxiésteres, tales como PLA, han sido considerados en ingeniería de tejidos como soportes poliméricos^{67,68}.

El desarrollo de piel artificial híbrida es otro reto importante en ingeniería biomédica. En este caso, polímeros sintéticos y cultivos celulares se combinan para formar un composite sintético-biológico. En esta aplicación puede necesitarse un polímero biodegradable como soporte para el crecimiento de células y de tejido *in vivo*.

Otra interesante aplicación es la regeneración guiada de tejidos direccionales como el nervioso. En este sentido, se están llevando a cabo esfuerzos en distintas direcciones que consideran que la aplicación de diferentes materiales degradables como poli (láctico-co-caprolactona)^{69,70,71}.

2.1.2.- Membranas biodegradables a partir de quitosana.

En los últimos años, se le viene prestando especial atención al estudio de mezclas de polímeros capaces de generar complejos interpoliméricos entre sí, a través de fuerzas de enlace secundarias, como interacciones electrostáticas, enlaces por enlace de hidrógeno (de acuerdo con la nomenclatura IUPAC), fuerzas de Van der Waals e interacciones hidrofóbicas^{72,73}. Estos materiales compuestos presentan un gran interés dentro de diferentes campos y áreas de aplicación médica debido, fundamentalmente, a su posible uso como sistemas liberadores de medicamentos⁷⁴, posibilidad de controlar la compatibilidad de sus componentes, así como a su capacidad de unirse con proteínas para el reconocimiento molecular en sistemas biológicos⁷⁵.

Este tipo de complejos pueden ser, reversiblemente, disociados en sus componentes mediante cambios en el medio en los que son implantados. Sin embargo, la adición de agentes entrecruzantes en su estructura dan lugar a membranas interpenetradas^{76,77}. Estas membranas poseen unas características únicas que solo dependen de los monómeros o de los polímeros que conforman su estructura y del tipo de interacción que se produzca entre sus componentes.

Dentro de los polímeros más utilizados en la obtención de membranas interpenetradas encontramos a la quitosana (1,4)-[2-amino-2-desoxi-β-D-glucano] (CHI). Esta biomacromolécula natural se obtiene a partir de un proceso de desacetilación parcial⁷⁸ de la quitina dando lugar a un polímero que contiene unidades de glucosamina y unidades de N-acetilglucosamina, tal y como se muestra en la Figura 6.

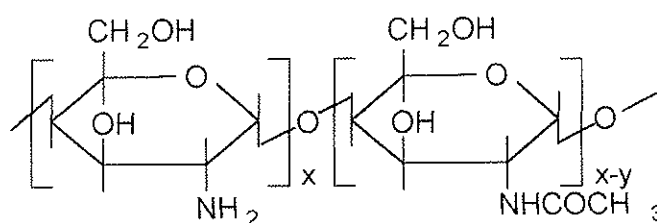


Figura 6.- Estructura química de la quitosana (CHI).

Entre las características más importantes de la quitosana encontramos su alto grado de biodegradabilidad y su alta biocompatibilidad⁷⁹ con el organismo humano, características que hacen que este polisacárido tenga grandes posibilidades en áreas de aplicación química y biomédicas⁸⁰, como clarificador de aguas residuales⁸¹, agente cicatrizante y agente hipocolestirémico⁸², entre otros. La principal dificultad que se presenta en la utilización de la CHI con fines aplicados es su solubilidad. La CHI es soluble solamente en soluciones ácidas, tales como el ácido clorhídrico y el ácido fosfórico⁸³ dentro de los ácidos inorgánicos, mientras que en ácidos orgánicos solo es soluble en acético, láctico o ácido L-glutámico⁸⁴. Para resolver esta dificultad se han estudiado diversos métodos alternativos para la preparación de CHI en soluciones acuosas⁸⁵.

Como hemos indicado anteriormente, en la estructura química de la CHI encontramos grupos amino, que son los responsables de su carácter policationico y de la formación de

complejos intermoleculares e intramoleculares con los grupos carboxílicos y policarboxílicos de ácidos orgánicos, a través de interacciones electrostáticas. En los últimos años se han estudiado extensivamente la preparación de hidrogeles mediante la mezcla íntima de macromoléculas y diferentes cadenas poliméricas aprovechando este tipo de interacciones⁸⁶. Entre los sistemas más utilizados se encuentra la copolimerización de diversos polisacáridos, como son la dextrana y la quitina, mediante polimerización radical con monómeros vinílicos y acrílicos embebidos en dichas macromoléculas naturales^{87,88}.

En este sentido, la CHI es un polímero iónico patrón utilizable en la preparación de modelos macromoleculares con monómeros acrílicos, entre los que encontramos el ácido acrílico, ácido metacrílico, acrilamida y derivados de estos^{89,90}. La característica más importante de estos sistemas es la capacidad que poseen estos monómeros ácidos para formar complejos iónicos mediante interacción de sus grupos carboxílicos con los grupos amino presentes en los anillos piránicos de las cadenas de CHI. Esto permite la formación de membranas interpenetradas, al formarse cadenas de poliacrilatos, producto de la polimerización radical del correspondiente monómero acrílico utilizado.

Cuando el proceso de polimerización de estos monómeros tiene lugar en una matriz de CHI, se forman diferentes proporciones de copolímeros a través de dos mecanismos diferentes. El primero es la reacción de amidación entre el grupo carboxílico del monómero ácido y los grupos amino de la CHI, que se convierten así en puntos de anclaje a la cadena polimérica. El segundo mecanismo consiste en las eventuales reacciones de transferencia de los radicales poliméricos en crecimiento a los grupos funcionales de los ciclos pirano de la CHI, que incluyen tanto a los grupos amino $-NH_2$ como a los grupos $-OH$ presentes en su estructura⁹¹. Estos mecanismos explican el hecho que, después de la reacción de polimerización, se observen estructuras de red tridimensional en los copolímeros obtenidos.

Quizás uno de los sistemas más estudiado es el que forman la CHI y el ácido poliacrílico (PAA)⁹². Esta descrito en la literatura que el complejo interpolimérico que se obtiene en esta mezcla presenta interesantes propiedades para la preparación de membranas y de otros dispositivos médicos⁹³. El procedimiento más común para la preparación de este material es la polimerización radical de ácido acrílico (AA) en presencia de CHI, para obtener redes interpenetradas de CHI y PAA, tal y como se muestra en la Figura 7. Esta combinación da lugar

a la formación de nuevos sistemas poliméricos con propiedades especiales, cuyo uso potencial se puede encontrar en varios campos de interés médico, como en Odontología y Traumatología, entre otros.

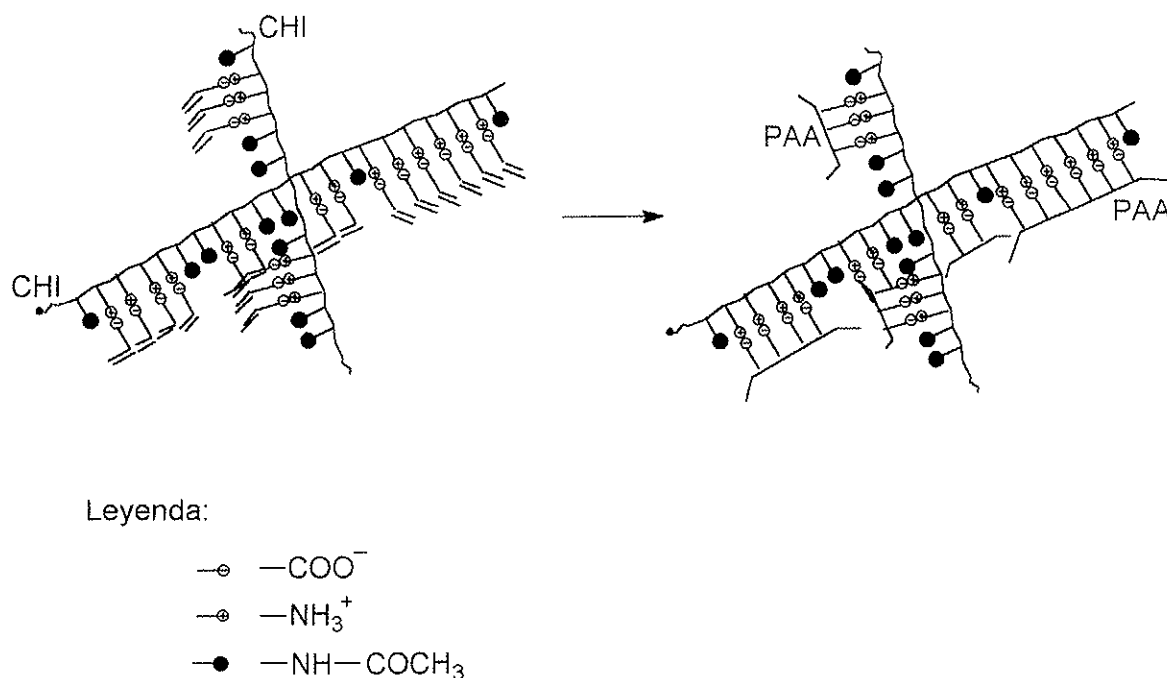


Figura 7.- Representación de la polimerización radical de AA en presencia de CHI considerando un proceso de propagación intra e intermolecular.

El polímero obtenido a partir del posible complejo entre CHI y AA, al que denominaremos de aquí en adelante CHI^+PAA , en forma de sal, es soluble en agua y en saliva artificial, lo que demuestra el carácter iónico de esta especie. Medidas realizadas por GPC muestran que este complejo se disocia en agua en una mezcla de los dos polímeros, CHI y PAA y que la distribución del peso molecular de la CHI no cambia durante el proceso de polimerización⁹⁴. Estos resultados ponen de manifiesto que la polimerización del AA en geles de CHI da como resultado un copolímero de injerto entre ambas especies.

Los métodos de polimerización más utilizados para obtener este tipo de membranas son la polimerización térmica⁹⁵ y la polimerización vía redox^{96,97}. La polimerización térmica transcurre alrededor de los 100 °C, con la consiguiente formación de agua y de los enlaces de amida correspondiente (—NH—CO—), como se muestra en la Figura 8.

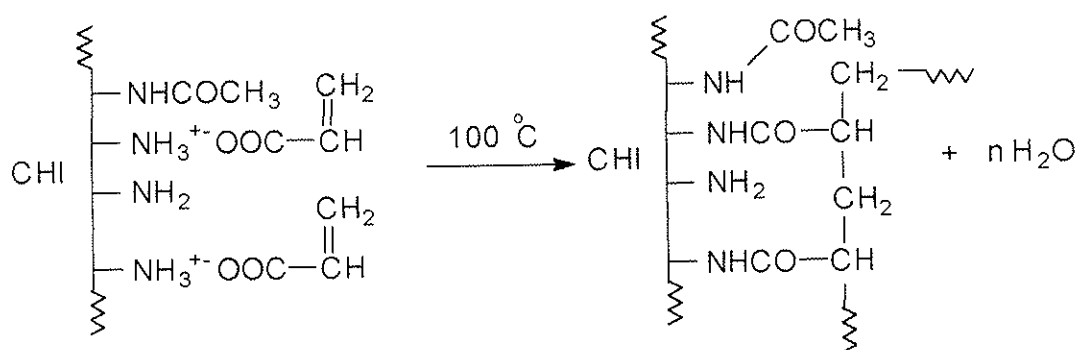


Figura 8.- Polimerización térmica del complejo CHI⁺AA.

A medida que transcurre la polimerización, el polímero formado se hace más insoluble en agua, de forma que para un tiempo de reacción de diez minutos, en el cual se alcanza un 40% de conversión de los dobles enlaces, el CHI⁺PAA obtenido es completamente insoluble. Si se prolonga el tiempo de reacción hasta las 2 horas, la conversión aumenta hasta un 75%, como máximo, debido a la formación de una estructura entrecruzada muy densa, lo cual limita la reacción de propagación y que progrese la conversión. La explicación de la alta densidad de entrecruzamiento del polímero radica en la simultaneidad de las reacciones de propagación inter/intra molecular de las cadenas en crecimiento.

En el caso de la polimerización vía redox, la principal ventaja que presenta es la posibilidad de obtener membranas a una temperatura próxima a la temperatura del cuerpo humano, con las mismas características que las del método térmico pero sin entrecruzarse. Este método permite ampliar las posibilidades de utilización de estos materiales en sistemas biológicos, señalados anteriormente, como son el transporte y dosificación de fármacos y el relleno de cavidades óseas.

Sin embargo, solo se encuentra un antecedente en la literatura acerca de los métodos de polimerización fotoiniciada en la preparación de membranas de CHI/PAA⁹⁴. Es conocido que este método de polimerización ofrece ciertas ventajas con respecto a los anteriormente mencionados, ya que permite un control espacial y temporal de la polimerización, se generan una mayor cantidad de radicales libres, se minimiza el efecto del oxígeno sobre la velocidad de propagación y las temperaturas de polimerización son inferiores a las empleadas en otros métodos^{98,99,100}. Todo esto hace que resulte atractivo explorar las posibilidades de la polimerización fotoiniciada en la obtención de este tipo de materiales.

Por esta razón uno de los objetivos principales de este trabajo ha estado dirigido a la preparación de geles de CHI y AA y al estudio de su fotopolimerización para la obtención de membranas interpenetradas de CHI⁺PAA, así como la evaluación de las propiedades químicas y físicas de los materiales obtenidos, con vistas a su potencial utilización con fines médicos.

2.1.3.- Aplicaciones de la quitosana.

La quitosana es uno de los polímeros naturales de mayor uso en numerosas industrias debido a sus diversas propiedades, entre las que encontramos: agente quelatante, facilidad de conformar fibras, buena biocompatibilidad, biodegradabilidad y actividad antihemostática entre muchas otras lo cual hace que su uso se haya extendido a numerosos campos de aplicación¹⁰¹. A continuación se mencionan algunos de estos usos:

- a) Clarificación y limpieza de aguas de proteínas y metales pesados.

Debido a su estructura química uno de los empleos más extendidos de la quitosana es la purificación de aguas residuales. La quitosana provoca la coagulación de las proteínas que contienen estos desechos y los productos de coagulación son degradables y no poseen ninguna toxicidad y por tanto su uso es preferible al de otros productos sintéticos. Por otra parte, los jugos de frutas y vegetales también pueden ser clarificados con ayuda de la quitosana.

Tanto la quitina como la quitosana son agentes quelatantes que poseen la habilidad de formar complejos con muchos iones metálicos. Estos cationes se coordinan con el par de electrones libres del nitrógeno y del oxígeno presentes en la estructura de la quitosana. Por esta afinidad y a que es posible regenerar la quitosana con la ayuda de los ácidos apropiados (ej.: ácido sulfúrico diluido) uno de los campos de aplicación de la quitosana es la purificación de metales pesados del agua contaminada.

- b) En forma de fibras en la industria textil.

La posibilidad de obtener fibras de quitosana por métodos relativamente sencillos y económicos ha hecho posible su utilización en la industria textil. Estas fibras poseen mejor

comportamiento elástico que las fibras convencionales. Por otra parte, el hecho de poder introducir grupos colorantes en la quitosana a través de enlaces covalentes con el grupo amino presente en su estructura, u otros grupos capaces de mejorar las propiedades de la quitosana esta siendo objeto de estudio actualmente¹⁰².

c) La quitosana y sus derivados se degradan por la acción de enzimas endógenas y no poseen ningún efecto alérgico sobre el organismo humano. Es por ello que es posible su uso en diferentes campos de aplicación médica entre los que podemos mencionar: materiales de sutura, agente cicatrizante, componente del vendaje de heridas y como piel sintética entre otras^{103,104}.

Yong y col.¹⁰⁵, estudiaron la influencia de el grado de desacetilación de la quitosana en la aceleración del proceso de cicatrización en un ensayo realizado en ratas. El estudio histológico demostró que las quitosanas con un mayor grado de desacetilación presentaban, a los 7 días de realizado el implante, mejor integración con el tejido circundante. Se observó además que el tejido en el lugar de la herida estaba completamente repitelizado y reemplazado mediante un proceso de fibrosis.

La piel artificial para el tratamiento de quemaduras y otras lesiones es otra de las aplicaciones más investigadas de la quitosana y sus derivados. Muchos trabajos^{106,107} recogen estudios de diversas matrices de quitosana con otros polímeros biodegradables como el colágeno y poli-L-leucina, los cuales son polímeros degradables enzimáticamente, que se colocan en forma de películas finas en la zona afectada reduciendo el riesgo de infección y promoviendo el crecimiento epitelial.

d) Recientemente, derivados de la quitosana son usados en la industria farmacéutica como un componente de productos de belleza gracias a sus propiedades de acondicionamiento, hidratación de la zona de aplicación, posibilidad de liberar ingredientes bioactivos de las formulaciones y a la capacidad de estimular el crecimiento de las células de las pieles dañadas¹⁰⁸. Su uso se amplía en cremas y ungüentos como materiales cosméticos.

e) La capacidad de formar membranas interpenetradas de la quitosana hace posible su uso como sistemas de liberación controlada de fármacos, membranas para la ultrafiltración y actualmente como matriz orgánica en composites parcial o totalmente biodegradables¹⁰⁹.

En la literatura se recogen muchos trabajos sobre este tema de estudio. Yao y col. obtienen membranas interpenetradas de quitosana con glutaraldehído y estudian su cinética de hinchamiento y liberación de gentamicina¹¹⁰, obteniendo cinéticas de liberación de orden cero. Wang y col.¹⁰⁰ mezclan quitosana y ácido poliacrílico, utilizando el glutaraldehído como agente entrecruzante para obtener membranas con mejores propiedades mecánicas y características de liberación controlada similares a las obtenidas en otros trabajos.

Onishi y col.¹¹¹, estudian y evalúan conjugados de drogas con quitosana y sus derivados, para reducir la toxicidad de las drogas empleadas y ampliar su actividad terapéutica, para combatir tumores cancerígenos. Estos conjugados pueden cambiar la retención de los fármacos en el organismo o liberarlos en el lugar deseado. Los agentes estudiados fueron: 5-fluoracil, 5-fluoridina y mitomicina. Se realizaron evaluaciones “*in vitro*” e “*in vivo*” obteniendo reducciones del tumor de un 56 por ciento.

Otros autores^{112,113,114} preparan microcápsulas de quitosana con diferentes agentes entrecruzantes como el polietilenglicol, alginato y ácidos carboxílicos entre otros para la liberación de diferentes fármacos con actividades antitrombogénicas, analgésicas, vacunas, etc, para su liberación en el organismo humano. Por otra parte, las características de bioabsorción y no toxicidad de este polisacárido la hacen un material casi ideal para esta aplicación.

Otra aplicación de la quitosana como red interpenetrada es la posibilidad de preparar membranas de ultrafiltración. Hideo y col.¹¹⁵, preparan membranas de quitosana y polivinil alcohol (PVA), por polimerización térmica para la separación de proteínas de medios biológicos con recuperaciones de más del 60%. Por otra parte, Sakurai y col., preparan membranas utilizando diferentes cantidades de polietilenglicol (PEG) como entrecruzante para el mismo fin pero controlando el pH de la solución con resultados similares¹¹⁶.

Quizás una de las aplicaciones de mayor importancia y de mayor estudio de la quitosana sea la de matriz orgánica en composites de aplicación biomédica^{117,118,119}. En la literatura abundan estudios de implantes biodegradables que usan como soporte de la carga empleada, membranas de quitosana y derivados entrecruzadas con diferentes agentes.

Por ejemplo, Carotenuto y col.¹⁵, preparan composites a partir de biomembranas de quitosana y poliácido acrílico por vía térmica y utilizan como carga la hidroxiapatita, para su uso como relleno de defectos periodontales. Ensayos histológicos realizados 6 meses después del implante muestran que el material presenta buena compatibilidad, la membrana es resorbible en condiciones fisiológicas y promueve el crecimiento celular.

Otros autores preparan membranas de quitosana con ácido málico y colágeno, por precipitación y polimerización radical para confinar las partículas de la carga en una zona determinada sin que ocurra la migración de estas^{120,121}. En estos trabajos se realizan implantes en el fémur de ratas de los materiales preparados encontrándose que al cabo de las 8 semanas de haberse realizado el implante se observaba una completa colonización, por parte del organismo, del implante en forma de tejido interconectivo. En ningún momento se observó la presencia de anomalías en la zona afectada, ni signos de necrosis o degeneración del tejido.

Muzarrelli y col.¹²², preparan composites de hidroxiapatita en soluciones de quitosana en ácido acético para aprovechar las propiedades biológicas de ambas sustancias. Los ensayos en conejos se realizaron en el condilo femoral de estos animales. No se observó ninguna complicación postoperatoria, los animales ganaron peso y no hubo reacciones de inflamación en el tejido circundante al implante. Los animales fueron sacrificados al cabo de los 2 meses de haber realizado el implante y se realizaron ensayos histológicos que demostraron que el implante presentaba evidencias de procesos de osteoinducción entre el hueso y el implante con respecto a controles de hidroxiapatita.

2.2.- Bioactividad y biodegradación de fosfatos de calcio.

La biocompatibilidad de los materiales a partir de fosfato de calcio como relleno óseo radica en su capacidad para formar una unión íntima con el hueso circundante¹²³. Por ello, los fosfatos de calcio son clasificables como materiales bioactivos, cuya respuesta viene determinada, principalmente, por su reactividad en medios fisiológicos y patológicos. Estos biomateriales implantables se caracterizan por poseer un perfil biológico que incluye la ausencia de reacciones inflamatorias, ausencia de toxicidad local o sistémica, la ausencia de formación de tejido fibroso entre el implante y el hueso y la capacidad de unirse directamente a un tejido o hueso que los rodea.

Una explicación del perfil biológico que presentan estos materiales, recae en la naturaleza química de los mismos, ya que estos materiales están compuestos principalmente por los mismos iones que constituyen el hueso natural: iones calcio y fósforo. Por tal motivo, cuando estos materiales se implantan en el organismo son capaces de participar en el equilibrio orgánico sólido-solución de los fosfatos cálcicos. Los iones calcio y fosfato necesarios para establecer este equilibrio pueden ser suministrados por el implante, el hueso circundante o por ambos. Se ha demostrado¹²⁴, que todos los implantes de fosfato de calcio llegan a ser recubiertos con una capa microscópica de apatito biológico poco tiempo después de su implantación.

En la interfase entre un implante poroso o denso de estos biomateriales y el hueso, el implante se encuentra en contacto directamente sobre la superficie del hueso, sin la presencia de una cápsula de tejido fibroso. A partir de estudios realizados *in vivo*¹²⁵, realizados con materiales de fosfatos de calcio porosos, se concluyó que la unión entre el tejido calcificado y estos materiales es de tipo químico y no mecánico. Este hecho ha sido observado por numerosos investigadores utilizando diversos materiales y animales de experimentación¹²⁶. Cualitativamente, esta unión se caracteriza por la incapacidad para separar el implante de fosfato cálcico del hueso circundante sin romper el implante o el hueso, ya que raramente se produce la rotura de la interfase.

En el caso de la hidroxiapatita (HA), este tipo de unión presenta un crecimiento epitaxial en la interfase hueso-implante. El término epitaxia, en biología ósea, se emplea específicamente para describir el crecimiento orientado de los cristales de HA siguiendo las fibras de colágeno. Algunos autores han sugerido un mecanismo de unión iónico-covalente, el cual podría ligar a la superficie del biomaterial cristales óseos de HA y residuos de aminoácidos¹²⁷. Otros trabajos¹²⁸ consideran que el fenómeno de la epitaxia podría participar en el establecimiento de la interfase y que los iones liberados a partir de la superficie de los implantes contribuirían a formar la matriz inorgánica del hueso nuevo. Esto implica que la epitaxia, en si misma, es similar a la del hueso.

Aunque no se conoce muy bien la composición exacta del “cemento” que mantiene unidos al tejido y al implante, sin embargo, se ha conseguido una cierta información a partir de la observación al microscopio de algunas secciones descalcificadas y sin descalcificar de la interfase hueso-implante. En estas observaciones, la sustancia que se aprecia en la superficie del

implante posee características similares a la sustancia cementante del hueso natural, habiéndose caracterizado como una estructura amorfa, fuertemente mineralizada y rica en mucopolisacáridos¹²⁹.

La ausencia de toxicidad sistémica o local presentada por los fosfatos de calcio se debe a su naturaleza química, habiéndose comprobado que únicamente son liberados al medio fisiológico iones calcio y fósforo. A partir de numerosos estudios se ha podido concluir que dichos iones entran a formar parte de las reservas del organismo, siendo utilizados de una manera normal. Materiales con una relación molar Ca:P de 1:6 o mayor, muestran un contacto directo con el hueso que las rodea en el orden de un 70 - 90%, mientras que los implantes con fosfato tricálcico difícilmente presenta esta unión.

Una propiedad importante de estos materiales es su posible biodegradación o biorreabsorción. Los factores que determinan la velocidad y grado de biorreabsorción constituyen un tema de controversia y discusión. De la literatura se recogen datos sobre la biodegradación de diferentes hidroxiapatitas, pero no dan una idea precisa de su comportamiento en medios biológicos, debido a la diversidad de los métodos que se emplean para su estudio^{130,131}.

Los implantes biodegradables se utilizan fundamentalmente para restaurar la función normal del hueso. Estos implantes estimulan el crecimiento del hueso, facilitándose así la integración del implante. La velocidad de reabsorción del implante no debe exceder a la velocidad de formación del hueso, así como la disminución en su resistencia, que debe de ser similar al incremento en la resistencia del hueso neoformado. La degradación de los fosfatos cálcicos se produce por¹³²:

- Proceso de disolución fisicoquímica, cuya velocidad viene determinada por el pH y la composición química de los fluidos biológicos y por la superficie específica y cristalinidad del material.
- Desintegración física del material en pequeñas partículas debida al ataque químico preferencial de los límites del grano.

- Proceso biológico, tal como la fagocitosis, la cual produce una disminución en el pH local.

Los factores que con más frecuencia se discuten en la literatura como responsables de la biodegradación de los fosfatos de calcio son: la relación calcio/fósforo, Ca/P, la estructura cristalina y el grado de porosidad.

Como se ha mencionado anteriormente, existen dos tipos de porosidad: macro y microporosidad. Se señala que la microporosidad es la que determina, junto a los factores anteriormente citados, la velocidad de biorreabsorción, mientras que la macroporosidad no posee una influencia significativa.

Este hecho ofrece la posibilidad de regular la velocidad de reabsorción mediante la introducción de diferentes grados de microporosidad en los implantes. La disolución parcial de estos materiales produce un aumento de la cantidad de iones calcio y fosfato en los fluidos biológicos, lo que conlleva a la precipitación, por saturación, de microcristales de apatito, tal y como se aprecia en la Figura 9.

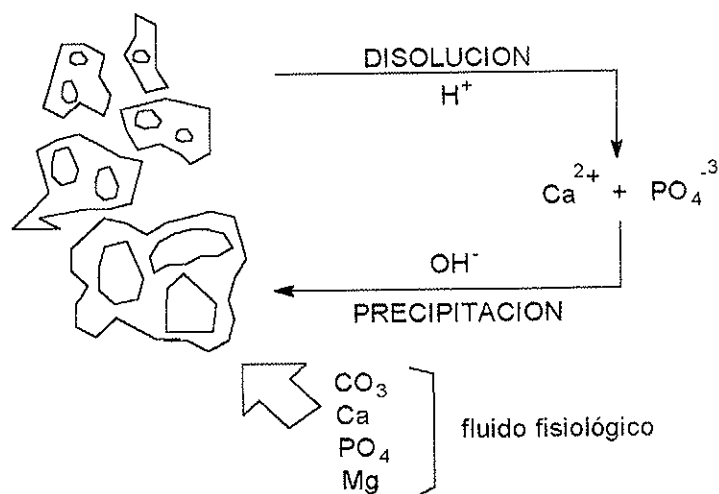


Figura 9.- Mecanismo de biodegradación de cerámicas de fosfato cálcico.

Estos cristales incorporan iones inorgánicos como, Ca^{+2} , Mg^{+2} , CO_3^{-2} , HPO_4^{-2} , PO_4^{-3} , y moléculas orgánicas, proteínas, presentes en los fluidos del organismo. Mediante espectroscopía IR se observó que el apatito carbonatado que se forma está asociado a una matriz orgánica¹³³.

Los implantes de fosfato cálcico no inducen formación del hueso, no son osteoinductores “per se”, sino que en áreas donde preexisten elementos osteógenos (situación subperióstica), inducen el depósito de matriz ósea sobre sus superficies, por lo que podemos decir que los fosfatos cálcicos poseen una capacidad de “osteoinducción condicionada”. Además, estos materiales guían el crecimiento del hueso en áreas en las que en ausencia del implante no llegarían a ser ocupadas por el hueso neoformado. Esta propiedad ha sido denominada por varios investigadores con el término de “osteconductividad”¹³⁴.

2.2.1.- Ensayos *in vitro* e *in vivo*.

Todos los implantes utilizados en cirugía han de tener una característica fundamental: los componentes que lo forman han de ser biocompatibles. Probablemente ninguno de los materiales que se emplean hoy en día es absolutamente compatible, pero la necesidad clínica requiere su uso y empleo. Por lo tanto, el objetivo básico a alcanzar en el empleo de estos materiales es la de lograr un grado de compatibilidad tisular que permita el uso clínico con un aceptable nivel de seguridad.

Entre los ensayos *in vitro* están los de citotoxicidad, hemocompatibilidad y mutagénesis. Las pruebas *in vivo* son de toxicidad sistémica aguda, irritación cutánea, implantación a corto y largo plazo, y carcinogénesis. También se recomienda un seguimiento clínico durante el período inicial de su empleo en humanos. Las normas específicas de un tipo de material se recogen en el protocolo de ensayo para evaluar la respuesta tisular producida en animales tras la implantación intramuscular, subcutánea y en hueso del material. Se describe el tamaño, las características y el número de muestras a implantar, el tipo y número de animales que se debe emplear, el lugar y método de implantación, el calendario de sacrificio, los exámenes macro y microscópico que han de llevarse a cabo y la interpretación de los resultados.

Para seleccionar el tipo de ensayo a que va a someterse un material, es necesario conocer la composición química y su absorción y metabolización en el organismo. De cualquier forma, la biocompatibilidad es un tema complejo, ya que no solo depende del material en sí mismo, sino que puede variar en función de diversos factores según la aplicación final del implante.

De forma resumida a continuación se hace una revisión de los resultados obtenidos en ensayos *in vitro* e *in vivo* llevados a cabo sobre materiales de fosfato de calcio.

2.2.1.1.- Ensayos *in vitro*.

A la hora de evaluar un biomaterial, los métodos de ensayos *in vitro* proporcionan una valiosa información y ayuda a seleccionar y simplificar los métodos *in vivo*. Este tipo de ensayo abarca un amplio espectro, desde la evaluación de la citotoxicidad, hasta comprobar si existen alteraciones en la adhesión de células, en la proliferación de las mismas y en la actividad biosintética.

Las ventajas de los métodos *in vitro* tales como la rapidez, bajo coste y la alta sensibilidad, así como el hecho de evitar la muerte masiva de animales de experimentación, han de ser valoradas frente al problema que se supone la extrapolación de resultados frente a la situación *in vivo*. En términos generales se puede decir que se deben realizar los dos tipos de ensayos (*in vitro* e *in vivo*), haciendo hincapié en que el primero no puede sustituir al segundo, sino que para el control de los biomateriales se requiere una adecuada combinación de los dos tipos de ensayos. En los materiales a partir de fosfatos de calcio los ensayos *in vitro* se centran, no solo en poner de manifiesto la ausencia de toxicidad, sino también en esclarecer los mecanismos de interacción entre el material y las células. Este tipo de ensayo es muy variado y se pueden dividir en dos grandes grupos: aquellos que utilizan técnicas de cultivos celulares y los que emplean soluciones fisiológicas.

Uno de los ensayos más extendidos es en el que se mide la respuesta celular a un implante de fosfato de calcio. Se considera que se puede evaluar la toxicidad de un material en un cultivo celular, observando la variación del número de células en el cultivo y la liberación de las mismas de lactato deshidrogenasa y/o enzimas lisosómicos¹³⁵. Algunos autores plantean que aunque un material no sea lo suficientemente tóxico como para matar a las células o aumentar la liberación de enzimas, puede inhibir las funciones celulares normales¹³⁶; por ello, proponen ensayar el material con cultivos de células típicas de los lugares de implante, eligiendo células óseas y fibroblastos del periostio, obtenidas a partir del cráneo del conejo, y condrocitos, provenientes del tejido cartilaginoso que rodea al condilo femoral del conejo. Otros autores¹³⁷,

proponen evaluar la citotoxicidad de los fosfatos de calcio en cultivos de célula tipo L, haciendo un recuento de las células adheridas al material y observando las mismas mediante la técnica de Microscopía Electrónica de Barrido (SEM).

Otro tipo de cultivo extendido en este tipo de ensayo es el de los fibroblastos gingivales humanos¹³⁸. Con el objetivo de determinar la respuesta celular a este tipo de materiales, estudian el crecimiento celular haciendo recuentos del número de células, con un hematímetro, en suspensiones de células tripnizadas, y la síntesis de proteínas midiendo la incorporación de ¹⁴C-Leucina. La evaluación de la adhesión de las células al material la realizan mediante SEM y Microscopía Electrónica de Transmisión (TEM).

Un método para determinar la influencia de los fosfatos cálcicos sobre la actividad osteoblástica de las células es el propuesto por Grégoire¹³⁹. Para ello se preparan cultivos celulares a partir de fragmentos de huesos trabeculares humanos y miden la influencia de la adición del material en la producción de osteocalcina, en la actividad específica de la fosfatasa alcalina y en la incorporación de aminoácidos en la síntesis de proteínas utilizando aminoácidos marcados. En este trabajo se describe también la evaluación de la biodegradación del material en estos cultivos, estudiando la actividad fagocítica de las células sobre los materiales por TEM y SEM.

Cuando los ensayos se realizan en soluciones fisiológicas, se refieren principalmente a la biodegradación fisico-química de los materiales. En estos medios se estudian la influencia de la estequiometría, cristalografía y condiciones de sinterización sobre la velocidad de disolución de fosfatos cálcicos. Para ello se incuban las muestras en un tampón lactato (pH = 5.2) y se determina por colorimetría los niveles de fósforo en la solución. Utilizando este método, algunos autores hacen el mismo estudio, pero además realizan la comparación con la suspensión de materiales en un medio básico tamponado con EDTA (pH = 8.2)¹⁴⁰ y acetato (pH = 5), y estudian la relación HA/FTC de muestras bifásicas sobre la velocidad de disolución de las mismas, con determinación de los niveles de calcio en solución a distintos tiempos.

Otro ensayo de este tipo es el de la estabilidad del material frente a suero fisiológico¹⁴¹. Las células solo pueden vivir en medios con intervalos de pH y presión osmótica muy estrechos

(pH = 7.3 - 7.6). Es necesario, por tanto, controlar la variación del pH y cesión de iones por el material en condiciones fisiológicas.

2.2.1.2.- Ensayos *in vivo*.

Como se ha mencionado anteriormente, las pruebas *in vivo* nos dan una idea de la toxicidad sistémica, irritación cutánea, implantación a corto y largo plazo y carcinogénesis. Los ensayos *in vivo* llevados a cabo con fosfatos cálcicos, son generalmente de implantación, mediante los cuales se pretende demostrar la biocompatibilidad, bioactividad y posible degradación de estos.

A través de la implantación se evalúan los efectos patológicos locales sobre el tejido vivo, a nivel macro y microscópico, del material. La elección del sitio donde se realiza el implante viene dado por su posterior aplicación clínica. También se puede evaluar la toxicidad subcrónica si se investigan los efectos en el ámbito sistémico. Investigaciones llevadas a cabo han mostrado que la respuesta del tejido al material varía con el tipo de animal, sitio de la implantación y el material que se evalúa¹⁴².

Las especies animales que más se utilizan son la rata, el conejo y el perro. Debido a la aplicación clínica dada a los biomateriales de fosfato cálcico, los lugares comunes de implantación son los huesos de las extremidades inferiores y las estructuras óseas periodontales y maxilofaciales. Una vez que se ha elegido la zona del implante se procede a crear, de forma artificial, grandes defectos óseos, mediante la eliminación de segmentos de hueso o pequeños defectos que posteriormente se rellenan con el material a evaluar. Como control se toma defectos óseos vacíos o rellenos de hueso autólogo. La implantación puede ser a largo o corto plazo y se estudia su evolución a través de exámenes radiográficos.

Tras este período se extrae del organismo vivo el implante junto con el tejido circundante para su posterior examen, que puede ser de dos tipos:

- Examen macroscópico. Se realiza a simple vista o con ayuda de una lente de pocos aumentos.

- Examen histológico. Se hacen secciones transversales que se incluyen en resinas especiales y se tiñen con colorantes específicos, siendo los más utilizados la hematoxidina, la eosina, el azul de toluidina y la tinción de Van Gieson. A veces es necesaria la descalcificación de las secciones, mediante la cual se disuelve el material y desmineraliza el hueso quedando solo el tejido y la matriz ósea. Posteriormente se examinan las secciones histológicas por diversas técnicas microscópicas: SEM, TEM, microscopía óptica, microrradiografía, microsonda electrónica (EMP) y espectroscopía electrónica Auger (AES).

Una primera evaluación puede llevarse a cabo mediante estudios radiográficos, en los que la ausencia de radiolucencias en la región del hueso próxima al implante significa la deposición del hueso alrededor del material implantado. Estudios comparativos entre una cerámica de HA y una cerámica vítrea de fosfato de calcio implantados en una tibia de conejo demostraron que en el caso de la HA no existían radiolucencias, mientras que en el caso de la vitrocerámica aparecían en los exámenes radiográficos¹⁴³. Mediante estudios histológicos se observa la formación de tejido óseo nuevo por la presencia de osteocitos en estrecho contacto con la superficie del implante, lo que pone de manifiesto que en el borde cerámico existe una actividad osteoblástica y osteocítica normal. Asimismo, el implante aparece cubierto por una capa continua de tejido óseo conectado con el hueso circundante. La concentración inicial de osteoblastos, condroblastos y fibroblastos varían en función de la idoneidad del implante y de la condición del defecto óseo. Por esto los implantes bioactivos requieren un período de incubación antes de la proliferación del hueso y posterior unión.

El comportamiento de los granulados de la HA sobre defectos maxilofaciales fue estudiado por de Lange¹⁴⁴. A través de la microscopía óptica observó que los gránulos de HA se encuentran totalmente rodeados de tejido óseo. La totalidad de la superficie examinada está cubierta por una capa ósea, la cual está interconectada con el tejido que rodea los gránulos adyacentes. El tejido óseo neoformado es de tipo esponjoso con presencia de osteocitos, observándose médula ósea normal entre las trabéculas. No se observó formación de tejido conectivo fibroso, así como tampoco la presencia de células inflamatorias, macrófagos o células gigantes en la interfase hueso-implante.

Otros trabajos recogen la implantación de cerámicas densas de HA en tibia de conejo¹⁴⁵. Mediante el estudio al microscopio óptico de la distribución de fluorocromos se observa como, pocos días después del implante, el hueso empieza a crecer en las regiones periosteal y cortical a lo largo de la cerámica. El hueso que ha proliferado en la superficie de los implantes realizados presenta cierto grado de reorganización y se observan osteoblastos y fibroblastos. El tejido neoformado en un principio presenta una estructura entrelazada que se convierte en laminar a medida que madura. La demarcación entre el hueso preexistente y el neoformado es totalmente visible por diferencias en la mineralización, orientación laminar y ocasional presencia de pequeños canales situados donde el hueso nuevo rodea al viejo. La falta de existencia de una unión íntima entre hueso e implante se identifica fácilmente por la presencia de tejido conectivo fibroso en la interfase y recubriendo el implante; también existen macrófagos y células gigantes.

En la década de los 80, Jarcho¹⁴⁶ propuso que la interfase creada por los materiales de HA proviene de una interdigitación del colágeno con la superficie del material. Observaciones realizadas por TEM de la interfase creada por estos materiales, demostraron que las fibras de colágeno están alineadas paralelamente a la superficie del material implantado y separadas de él por una zona de unión amorfa. Sin embargo, estudios posteriores demostraron que este proceso de ordenación de fibras paralelas se produce sin interdigitación superficial¹⁴⁷.

De Lange realizó un estudio estructural de la interfase implante de HA-hueso a partir de ultrasecciones descalcificadas. A través de SEM observó el crecimiento de hueso en las irregularidades superficiales más finas del implante. La microscopía electrónica de alta resolución puso de manifiesto la existencia de fibras de colágeno intrínsecas del tejido óseo, cercanas a la superficie del implante. En la interfase se observa una capa densa de electrones que contiene material orgánico. Una capa similar se encuentra en las paredes más finas de la laguna osteocítica y en la periferia del hueso como resultado de una reacción histofisiológica normal del tejido óseo adulto y joven.

Otros exámenes por SEM se secciones sin descalcificar revela que la zona amorfa de unión observada en la interfase estaba calcificada con cristales minerales de hueso, los cuales se habían depositado directamente e irregularmente sobre la superficie del implante de HA. Posteriormente, usando una combinación de técnicas de microscopía y difracción de rayos-X, se

descubrió la existencia de una zona calcificada, pero el depósito de los cristales sobre el implante era en dirección perpendicular y en empalizada.

La ausencia de reacciones adversas por parte del organismo hacia los implantes de estos materiales ha sido objeto de numerosos estudios por parte de los investigadores. En un estudio realizado en perros utilizando un implante poroso de fosfato tricálcico para su uso en fusiones espinales y tras un tiempo de implantación, se observó que la mayoría de los implantes se desprendían del sitio por incapacidad mecánica. Sin embargo, el examen histológico posterior reveló la ausencia de inflamación o de respuesta del organismo hacia el material.

En estudios radiográficos se observó que el índice de degradación de estos materiales viene dado por una pérdida gradual, a lo largo del tiempo de implantación, de la radiodensidad del material. En la observación al microscopio óptico y electrónico se ponen de manifiesto la biodegradación por la presencia de numerosas células implicadas en el proceso, tales como los osteoclastos, células gigantes y macrófagos, cerca de los lugares de implantación, existiendo una relación entre el número de células grandes y el grado de absorción del implante. Cuando el material es poroso, el proceso de degradación se pone de manifiesto por un aumento en el tamaño de poro y, como consecuencia, una disminución de la cantidad de cerámica y un incremento progresivo en la cantidad de hueso y médula hematopoyética.

Son numerosos los trabajos realizados sobre el comportamiento de estos materiales en humanos, así como las publicaciones de los resultados clínicos. A partir de los mismos se aconseja el empleo de estos en la reconstrucción de estructuras o defectos óseos en zonas exentas de carga, principalmente en el área de cirugía otorrinolaringológica y maxilofacial¹⁴⁸, o en situaciones de mecánica de compresión, como son la reconstrucción de reborde alveolar o del platillo tibial o su utilización en Odontología¹⁴⁹.

Capítulo III.- Cementos Óseos Fotopolimerizables

En este Capítulo se abordarán los aspectos más importantes a tener en cuenta a la hora de preparar un composite utilizando como relleno un fosfato de calcio como la hidroxiapatita. En el Anexo III se recogen las características físicas, químicas y reológicas más importantes de este relleno, así como los métodos de síntesis y caracterización más utilizados para su estudio.

3.1.- Síntesis y caracterización de hidroxiapatita (HA) e hidroxiapatita sinterizada (HAS).

La hidroxiapatita utilizada en el presente trabajo se preparó utilizando el método general de Rathje¹⁵⁰, como se describe en el Capítulo IV, sección 4.2.3. Posteriormente se modificó esta HA para obtener HAS mediante el método descrito en la sección 4.2.4.1 del Capítulo mencionado anteriormente. A continuación se describen los resultados obtenidos en la caracterización de ambos rellenos.

3.1.1.- Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR).

Los espectros infrarrojos de las hidroxiapatitas sintetizadas se muestran en la Figura 10, en donde podemos observar bandas en la región de los $3570 - 3700 \text{ cm}^{-1}$, correspondientes a las vibraciones de tensión del grupo OH^- de agua absorbida, en forma de una banda ancha, y otra

estrecha e intensa, característica del OH^- de la hidroxiapatita. Estas asignaciones se confirman al analizar el espectro de la HAS, donde no aparece la banda ancha en 3500 cm^{-1} y sí la ubicada en los 3700 cm^{-1} .

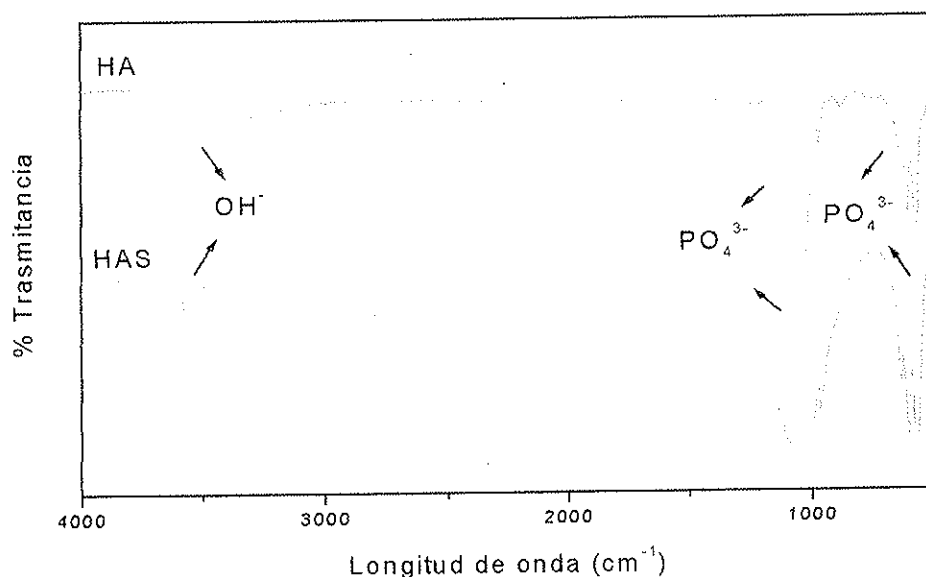


Figura 10.- Espectro FTIR de la hidroxiapatitas sintetizadas.

Por otra parte, se observan bandas intensas entre los $1100 - 1030\text{ cm}^{-1}$ y $560 - 620\text{ cm}^{-1}$, que corresponden a los diferentes modos de vibración del grupo PO_4^{3-} . Por otra parte, no se observan otras bandas en los espectros obtenidos, lo cual permite afirmar que, en principio, las hidroxiapatitas sintetizadas son prácticamente puras.

3.1.2.- Difracción de Rayos X (DRX).

De acuerdo al método de síntesis empleado en la obtención de la HA, el producto obtenido puede presentar otras fases correspondientes a impurezas, como el óxido de calcio u otros fosfatos de calcio. Por otra parte, durante el proceso de sinterizado la hidroxiapatita se puede descomponer en otras fases como por ejemplo: β -fosfato tricálcico¹⁵¹. La técnica de difracción de rayos X nos permite conocer si el producto sintetizado se presenta en una sola fase o si es una mezcla. Los difractogramas obtenidos para las hidroxiapatitas se muestran en la Figura 11.

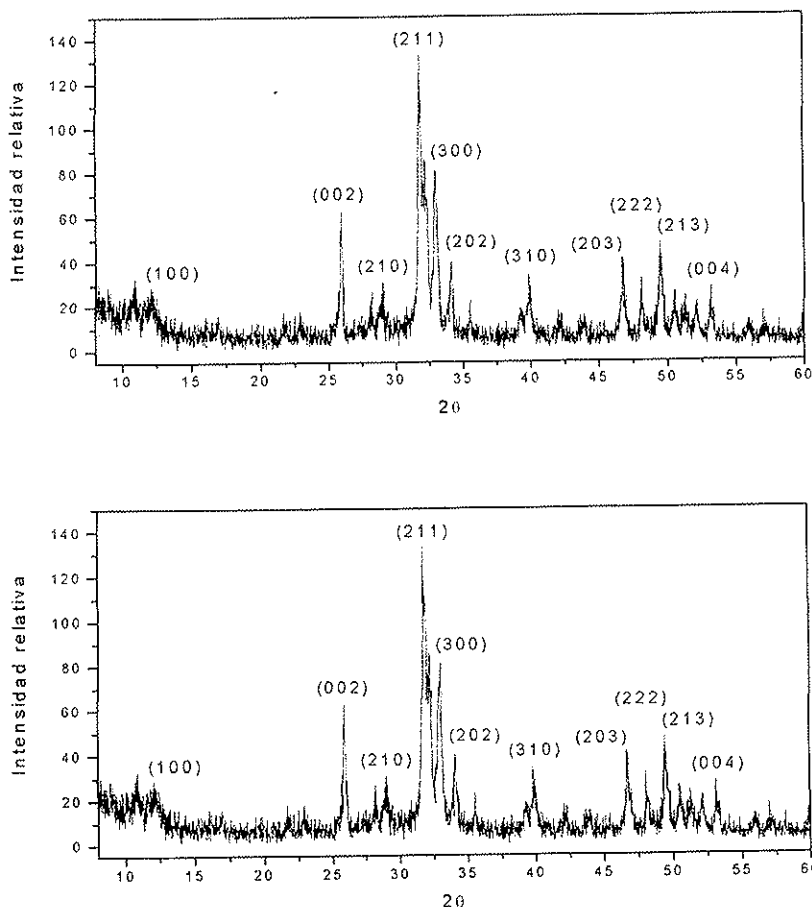


Figura 11.- Difractogramas obtenidos de las correspondientes hidroxiapatitas.

El análisis de los picos se realizó utilizando la base de datos JCPDS¹⁵² y las fichas ASTM encontrándose una total concordancia para ambos casos, por lo que podemos decir que la fase apatítica se mantiene aún después del tratamiento de sinterización. La diferencia entre ambos difractogramas reside en que los picos obtenidos para el caso de la HAS son más estrechos debido, fundamentalmente, al mayor por ciento de cristalización que se alcanza durante este proceso.

3.1.3.- Tamaño y área superficial de partícula.

Al analizar la distribución del tamaño de partícula de las cargas obtenidas, mediante la utilización de un equipo Coulter LS 130, cuyos resultados se recogen en la Figura 12, observamos diferencias en la distribución de tamaños mayor en el caso de la HA que en la HAS.

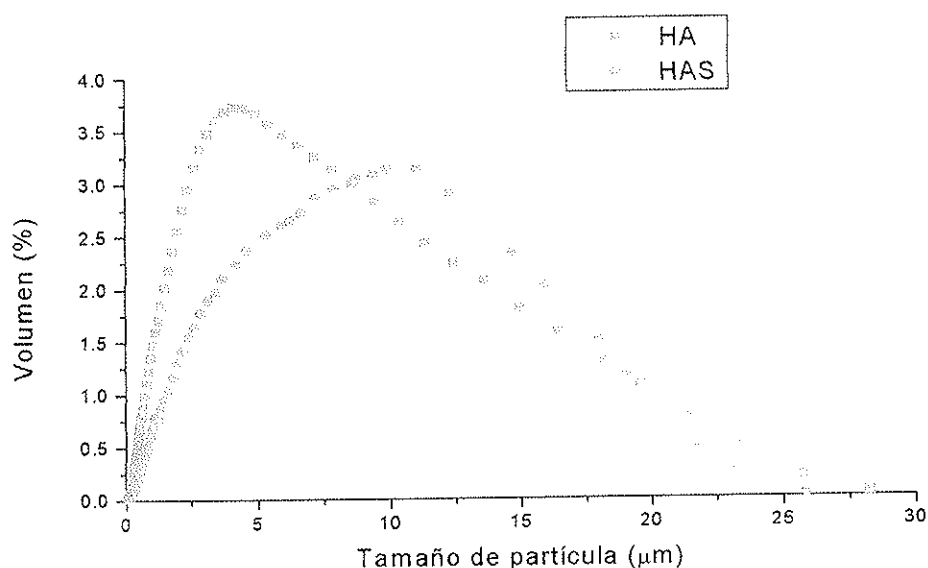


Figura 12.- Distribución de tamaños de partículas para las hidroxiapatitas sintetizadas.

Los resultados obtenidos arrojan unos valores medios de 4.3 μm para el caso de la HA y de 11.2 μm para la HAS. Al analizar estos resultados debemos recordar que la hidroxiapatita tiende a formar aglomerados, por lo que el tamaño de partícula que estamos midiendo es en realidad el tamaño de estos y no el tamaño real de la partícula aislada. El aumento que se produce al sinterizar la hidroxiapatita, se debe a que durante este proceso tiene lugar la fusión de las partículas.

La medida del área superficial de la partícula (S_{BET}) se realizó mediante el método BET y se utilizó como solvente, para evitar lo más posible el efecto de aglomeración, alcohol isopropílico. Los resultados fueron de 41.8 m^2/g para la HA y de 4.9 m^2/g para la HAS. Estos resultados son explicable sobre la base de que en el proceso de sinterización las partículas disminuyen el área superficial de la muestra. En ambos casos las muestras presentaron un comportamiento del tipo II y no presentaron porosidad (ver Capítulo IV, sección 4.3.9).

3.1.4.- Análisis químico. Determinación de la relación Ca/P.

El porcentaje de calcio, determinado mediante el método descrito en el Capítulo IV, sección 4.3.10, para tres muestras de cada uno de los materiales obtenidos fue de un 39.3 % para

la HA y un 39.9% para la HAS. Del análisis de fósforo, descrito en la misma sección señalada anteriormente, se obtuvo un porcentaje del 17.1% y de 16.5% respectivamente. A partir de los valores obtenidos se calcula la relación molar Ca/P que en ambos casos es de 1.67, lo cual indica que el método permite obtener una hidroxiapatita estequiométrica. Los valores que se recogen en la literatura oscilan entre 1.64 y 1.70 para diferentes materiales de fosfatos de calcio¹⁵³.

3.2.- Modificación superficial de la Hidroxiapatita (HA). Caracterización.

Es sabido que entre el relleno y la matriz de los composites se crea una región, denominada interfase, como consecuencia del carácter inorgánico del primero y orgánico del segundo. De la naturaleza y extensión de esta interfase depende la formación de intersticios y otros defectos que originan microfracturas en el composite final. A su vez, estos defectos microestructurales son la causa de que las propiedades mecánicas disminuyan¹⁵⁴, lo que trae como consecuencia un rápido desgaste y poca retención del relleno. Gran número de trabajos se han dirigido a la mejora de esta interfase mediante la aplicación de diversos métodos; Como son el enlace micromecánico, el grabado químico¹⁵⁵ y la funcionalización de la superficie del relleno¹⁵⁶, siendo este último con el que se han obtenido los mejores resultados.

A su vez, el método más empleado dentro de los procesos de funcionalización es el denominado silanización¹⁵⁷, consistente en el acople de grupos silanos, mediante adsorción o enlace químico, a la superficie del relleno. Este método, además de mejorar la compatibilidad entre la fase orgánica y el relleno, hace que se reduzca las tensiones internas del material, y por tanto, disminuye el proceso de contracción durante la polimerización del composite. Sin embargo, diversos estudios han puesto de manifiesto la existencia de reacciones entre los agentes silanizantes y el relleno, e incluso reacciones de condensación entre los primeros con formación de metanol, lo cual presenta ciertos inconvenientes e induce una mayor porosidad en el material final que hace que disminuyan sus propiedades mecánicas¹⁵⁸.

Recientes trabajos^{159,160} han estado dirigidos al estudio de nuevos agentes funcionalizantes a partir de buffers ácido/sal, que contienen grupos carboxílicos en su estructura capaces de absorberse o reaccionar, según sea el caso, sobre la superficie de la hidroxiapatita,

con el fin de mejorar su posterior compatibilidad con diversas matrices orgánicas, tal y como se muestra en la Figura 13.

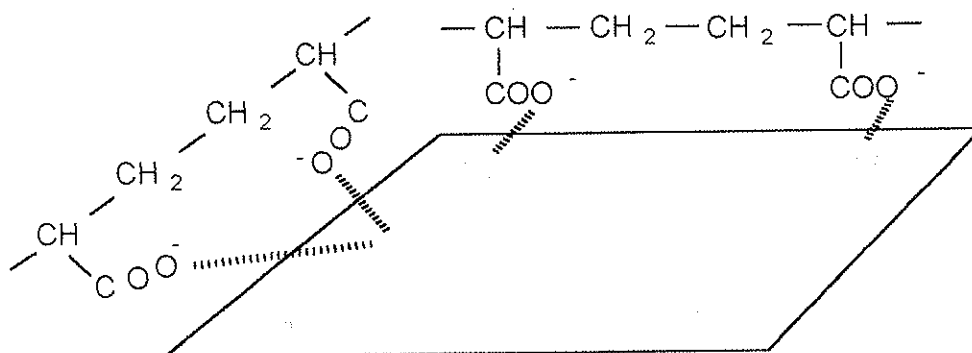


Figura 13- Modos de enlace de los grupos carboxílicos con la hidroxiapatita.

Esta modificación superficial fue llevada a cabo tal y como se describe en el Capítulo IV, sección 4.2.4.2. Los agentes funcionalizantes utilizados fueron los siguientes: acetato sódico (Ac-Na), acrilato sódico (Acr-Na), metacrilato sódico (Met-Na), citrato sódico (Cit-Na) y succinato sódico (Succ-Na), todas a partir de disoluciones 0.5 M a pH = 7 y 5, utilizando el ácido correspondiente a la sal para lograr este último valor de pH.

3.2.1- Espectroscopía Infrarroja.

Los espectros FTIR obtenidos en el tratamiento de la HA con los diferentes agentes funcionalizantes a pH 7 y 5, se muestran en la Figura 41. Se tomó como indicador de que el proceso de funcionalización ha tenido lugar, la aparición de las bandas correspondientes de los agentes funcionalizantes en los espectros de las hidroxiapatitas tratadas. Para ello y teniendo en cuenta que en todas las disoluciones de los agentes funcionalizantes estudiados esta presente el equilibrio entre la estructura del anión carboxilato (COO^-) y el grupo carboxilo (COOH), serán las bandas correspondientes a estas estructuras, entre los $1720 - 1700 \text{ cm}^{-1}$, asignables a la vibración característica del COOH , así como las bandas entre los 1550 y 1400 cm^{-1} , correspondientes a las vibraciones asimétricas y simétricas del COO^- , las que determinaran si el proceso de funcionalización ha tenido lugar.

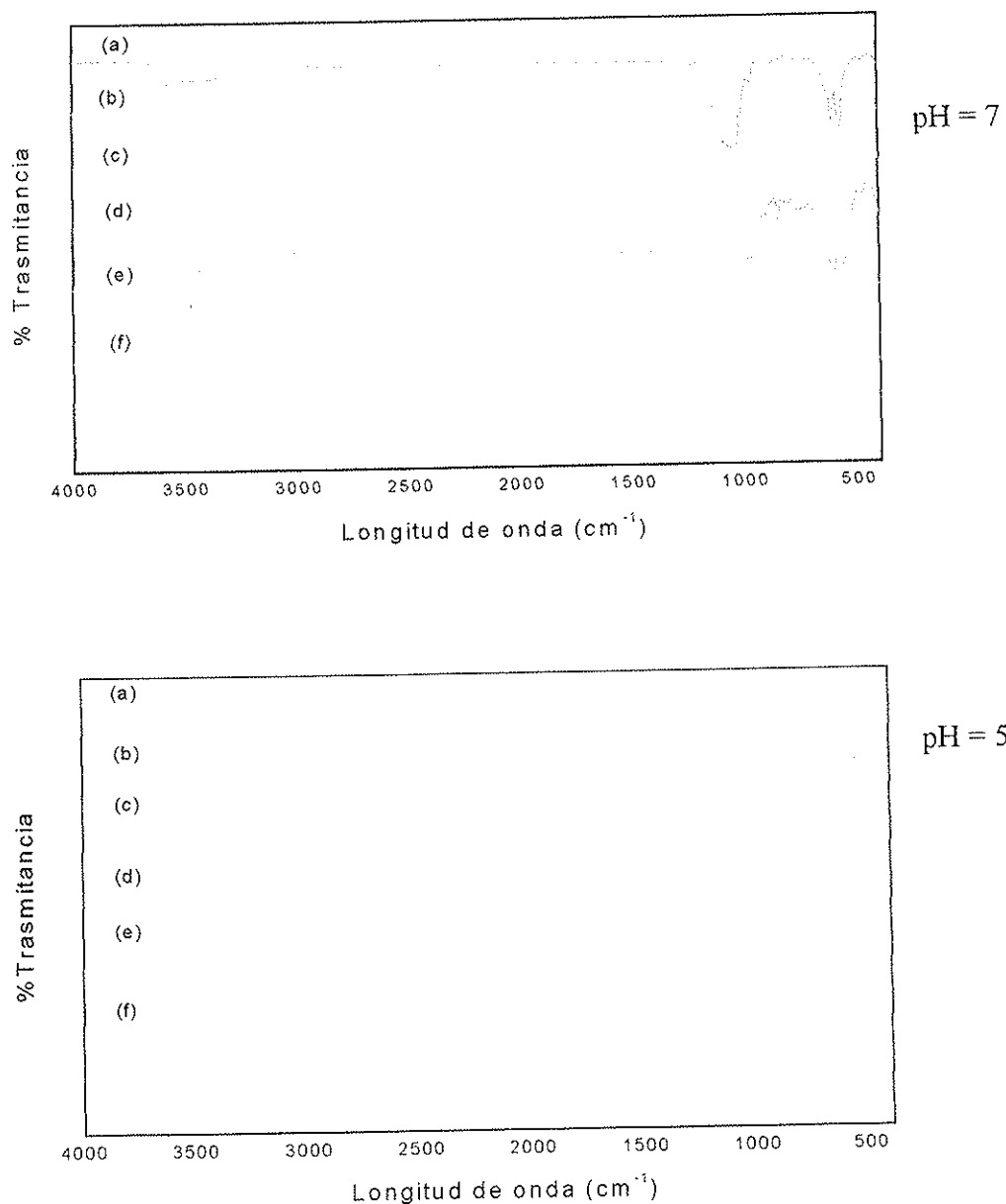


Figura 14.- Infrarrojos de la HA tratada con diferentes agentes funcionalizantes a pH 7 y 5.

**(a) HA (b) HA + AcetNa (c) HA + CitNa (d) HA + AcriNa
(e) HA + MetNa (f) HA + SuccNa.**

Al analizar los espectros FTIR mostrados en la Figura 14 a pH = 7, se puede afirmar que, excepto en los casos de los tratamientos con Ac-Na, en los demás espectros se observan bandas intensas correspondientes al COO⁻, lo que indica que ha tenido lugar el proceso de funcionalización sobre la superficie de la HA. En esta misma serie de espectros y tomando en

consideración la intensidad de dichas bandas, podemos decir que el proceso de funcionalización se ve favorecido en los casos del Cit-Na y del Succ-Na, donde la cantidad de grupos COO^- , tres y dos respectivamente, es mayor que en los restantes agentes funcionalizantes utilizados. A $\text{pH} = 5$ y teniendo en cuenta lo explicado anteriormente, se mantiene la misma tendencia, en cuanto a la capacidad de funcionalización. Sin embargo, la intensidad de las bandas del COO^- es menor con respecto a los espectros IR obtenidos anteriormente, por lo que se puede decir que la disminución del pH trae consigo, en principio, una disminución en la capacidad funcionalizante de los agentes estudiados.

Estos resultados se pueden explicar si tenemos en cuenta que el punto isoelectrico (pzc) de la HA^{161} , se alcanza un valor de $\text{pH} = 8.7$, por lo que a valores superiores de pH la especie cargada que predomina es el OH^- , con lo cual la partícula de hidroxiapatita se encuentra cargada negativamente, mientras que a $\text{pH} < 8.7$, el ión que predomina es el Ca^{2+} , encontrándose pues la HA cargada positivamente. Si tenemos en cuenta este aspecto y que los valores de pH en este trabajo están por debajo de 8.7, podemos decir que en todo momento la densidad de carga de la superficie de la HA es positiva. Por otra parte, al analizar el pH de las disoluciones preparadas de estos agentes funcionalizantes encontramos que ya a $\text{pH} = 7$ se rebasan los valores de pK_a de los ácidos correspondientes a las sales utilizadas (Tabla 1).

Tabla 1.- Valores de pK_a de los ácidos correspondientes a los agentes funcionalizantes.

Acidos	pK_a
Acido acético	$\text{pK}_{a1} = 4.8$
Acido acrílico	$\text{pK}_{a1} = 4.3$
Acido cítrico	$\text{pK}_{a1} = 3.1, \text{pK}_{a2} = 4.8, \text{pK}_{a3} = 6.4$
Acido metacrílico	$\text{pK}_{a1} = 4.5$
Acido succínico	$\text{pK}_{a1} = 4.2, \text{pK}_{a2} = 5.6$

Cuando el valor de pH es mayor que el pK_a , los grupos carboxílicos de las sales están totalmente desprotonados, por tanto, la carga que posee el ión es negativa; es decir predomina en la disolución la especie COO^- , y esto aumenta la tendencia a la combinación con los iones Ca^{2+} de la HA. Teniendo en cuenta estas consideraciones podemos decir, de forma preliminar, que el

enlace que se forma entre los agentes funcionalizantes y la HA es a través de un tipo de interacción entre los iones calcio, Ca^{2+} , de la superficie de esta última y el grupo COO^- de los primeros, ya sea por enlace directo o por interacción electrostática. En el caso de la HAS los espectros se muestran en la Figura 15.

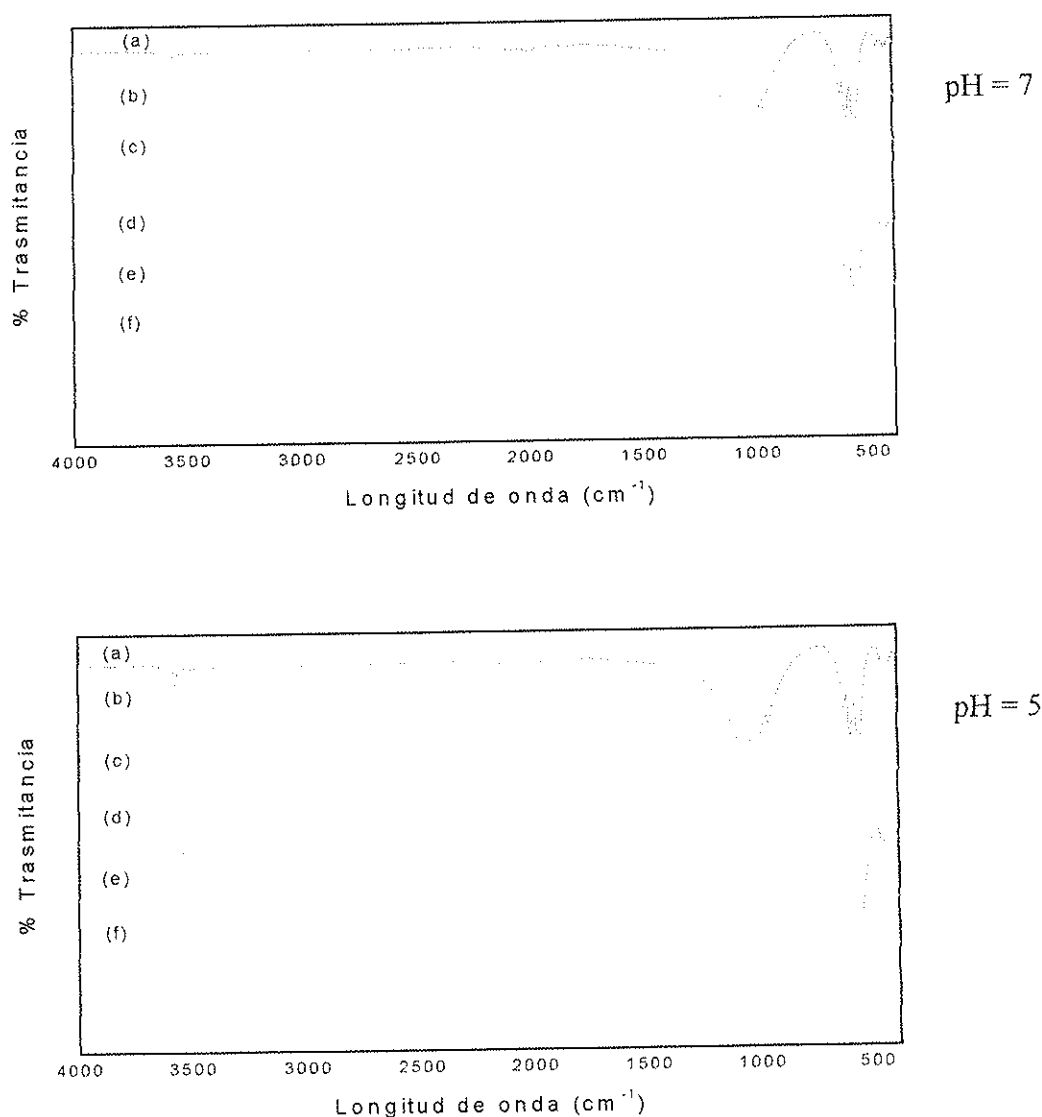


Figura 15.- Infrarrojos de la HA tratada con diferentes agentes funcionalizantes a pH 7 y 5.

**(a) HA (b) HA + AcetNa (c) HA + CitNa (d) HA + AcriNa (e) HA + MetNa
(f) HA + SuccNa.**

Como se puede observar, en este caso el proceso de funcionalización solo ha ocurrido en los casos en los que se utiliza el Cit-Na y el Succ-Na, manteniéndose también la tendencia

observada anteriormente con la disminución del pH. El hecho de que el proceso de modificación solo haya tenido lugar con los agentes funcionalizantes con dos y tres grupos carboxilos en su estructura, confirma la idea de que este proceso transcurre mediante una reacción de estos grupos carboxilos con los iones calcio de la superficie de la HA. El catión Ca^{2+} se enlaza mejor con aquellos agentes cuyas estructuras puedan satisfacer su demanda electrónica, en detrimento de aquellas en las que se necesitarían dos moléculas del agente por cada catión presente, además del problema de impedimento estérico que esta última situación crearía.

Por otra parte, al comparar las intensidades de las bandas de funcionalización para la HA y la HAS vemos como los mejores resultados se obtienen cuando se emplea HA. Para explicar este resultado tenemos que tener en cuenta que la HAS posee una menor área superficial que la HA, como se ha señalado anteriormente. Como el proceso de funcionalización tiene lugar a través de la interacción de los iones Ca^{2+} de la HA con los iones COO^- de los agentes funcionalizantes, la disminución del área superficial dificulta esta interacción, por lo que la funcionalización de la HAS presenta una mayor restricción. Por otra parte, es sabido que la disminución del área superficial en los fosfatos de calcio trae consigo una disminución de su reactividad.

Teniendo en cuenta estos resultados, se decidió desechar los rellenos modificados de HAS, debido a la menor funcionalización alcanzada con respecto a los de HA. Por otra parte teniendo en cuenta que la modificación con Acet-Na no tuvo lugar para ninguna de las hidroxiapatitas estudiadas, tampoco se trabajara con este tipo de relleno.

3.2.2.- Grado de modificación.

Una vez conocido los agentes funcionalizantes que modifican la superficie de la HA, se cuantificó su capacidad de modificación, a partir de la determinación de la cantidad de agente que queda en la disolución final, una vez terminado el proceso, con respecto a la concentración inicial y a la cantidad de HA empleada. A tal fin se utilizó la Espectrofotometría Ultravioleta-Visible. La determinación del grado de modificación (A) se llevó a cabo mediante el método descrito en el Capítulo IV, sección 4.3.11. A modo de ejemplo, y con el fin de facilitar su comprensión, se muestran en la Figura 16 solamente los espectros UV de las disoluciones

preparadas para los agentes metacrilato y acrilato de sodio, así como la correspondiente curva de calibración. Es de destacar que en el caso del Acr-Na y el Succ-Na se tuvo que acidular el sistema hasta un valor de $\text{pH} = 2$, mediante la adición de $\text{HCl } 1\text{N}$, para poder realizar las medidas.

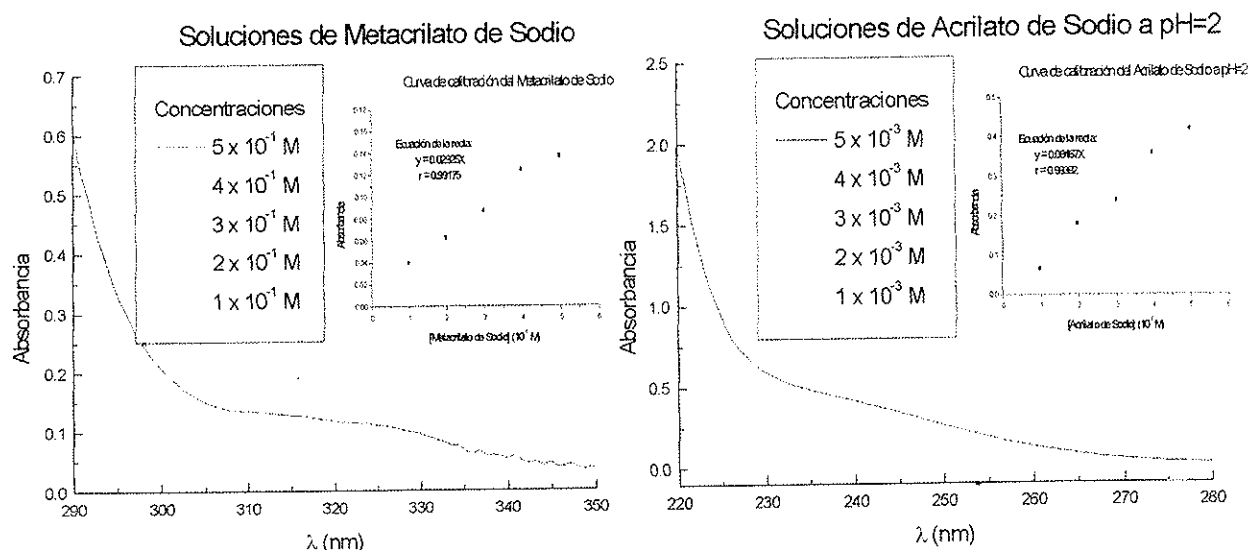


Figura 16.- Espectros UV-Vis de las disoluciones de los agentes funcionalizantes para la determinación del coeficiente de extinción.

Las determinaciones del coeficiente de extinción se llevaron a cabo en la forma habitual, tomando la pendiente de las rectas de Absorbancia vs Concentración, en los máximos correspondientes en cada caso: 202 nm para el Succ-Na; 240 nm para el Acr-Na; 260 nm para el Cit-Na y en 310 nm para el caso del Met-Na. Los resultados se recogen en la Tabla 2.

Tabla 2.- Valores del coeficiente de extinción molar (ϵ) obtenidos para los agentes funcionalizantes estudiados y su coeficiente de correlación (r).

Agente funcionalizante	$\epsilon \text{ (M}^{-1} \text{ cm}^{-1}\text{)}$	r
Cit-Na	0.630	0.952
Succ-Na	29911	0.9971
Acr-Na	84	0.9939
Met-Na	0.293	0.9917

Una vez determinados los coeficientes de extinción se procedió a la medida de la concentración del agente (C_f) en las disoluciones obtenidas al final del proceso de funcionalización, mediante la aplicación de la Ley de Lambert-Beer. Una vez conocido este parámetro, así como la concentración inicial ($C_o = 0.5 \text{ M}$) y la cantidad de relleno tratado ($W = 20 \text{ g}$), se procede al cálculo del grado de modificación (A) de la superficie de la HA. Los valores obtenidos para ambos parámetros se recogen a continuación en la Tabla 3.

Tabla 3.- Resultados de la concentración final (C_f) y el grado de modificación (A) para los agentes funcionalizantes en estudio.

Agente funcionalizante	$C_f (\text{mol/L})$	$A (10^3 \text{ mol/g})$
Cit-Na	0.32	1.8
Succ-Na	0.38	1.2
Acr-Na	0.41	0.9
Met-Na	0.45	0.5

Como se desprende de estos resultados, los mayores valores del grado de adquisición se obtuvieron para el caso del Cit-Na, lo que cual parece ser debido a la mayor cantidad de grupos carbonilos presentes en este compuesto, con respecto a los demás agentes en estudio, con aumento de la probabilidad de enlace sobre los iones calcio de la superficie de la HA. Este hecho se ve reforzado cuando analizamos los valores de A para los demás agentes donde encontramos que la tendencia es Succ-Na > Acr-Na > Met-Na. Estos resultados parecen confirmar el hecho de que los enlaces con el calcio se realiza preferentemente con moléculas de agentes funcionalizantes que presenten al menos dos grupos carboxílicos en su estructura.

3.2.3.- Difracción de rayos X. Tamaño y área superficial de las partículas funcionalizadas.

Los difractogramas obtenidos para las diferentes HA modificadas mostraron que este proceso no afecta la morfología de las partículas y que la fase apatítica no sufre cambios apreciables. La determinación del tamaño y del área superficial se llevó a cabo por los mismos métodos que para la hidroxiapatita sin modificar. Los resultados obtenidos se recogen a continuación en la Tabla 4.

Tabla 4.- Tamaño y área superficial (S_{BET}) de las hidroxiapatitas modificadas.

Muestra	Tamaño de partícula (μm)	S_{BET} (m^2/g)
HA	4.3	41.8
HA-Acr	11.9	42.9
HA-Metacr	5.6	49.7
HA-Succ	6.8	46.6
HA-Cit	3.6	22.8

Como podemos observar, el proceso de funcionalización induce un ligero aumento en el tamaño y en el S_{BET} de la partícula, excepto en el caso de la HA modificada con citrato de sodio. Este hecho parece indicar que durante el proceso de modificación las partículas tienden a formar agregados, tal y como se ha observado también en otros trabajos que se recogen en la literatura¹⁶².

En el caso de la modificación con citrato de sodio, el tamaño disminuye ligeramente, mientras que el área superficial de la partícula disminuye casi a la mitad que la HA original. Para explicar este resultado tenemos que tener en cuenta que los iones citrato son agentes emulsificantes debido a la capacidad del citrato de formar complejos del tipo $[\text{Ca}(\text{Cit})_2]^{4-}$, razón por la cual las partículas de HA-Cit tienden a disgregarse¹⁶³. Si unimos esto al hecho de que en la medición por el método BET la HA sin modificar se encuentra, generalmente, formando agregados de partículas, podemos decir que la HA-Cit se encuentra más disgregada que la HA y por tanto su área superficial es menor.

3.3.- Preparación de composites. Máximo contenido de relleno.

La preparación de los composites de hidroxiapatita se llevó a cabo a partir de los geles de quitosana estudiados en el Capítulo anterior y añadiendo diferentes contenidos de HA, tanto sin modificar como modificada, desde un 40% a un 60% en peso. Como resultado de esta preparación se obtuvieron materiales compuestos por tres métodos diferentes, que se describen esquemáticamente en la Figura 17.

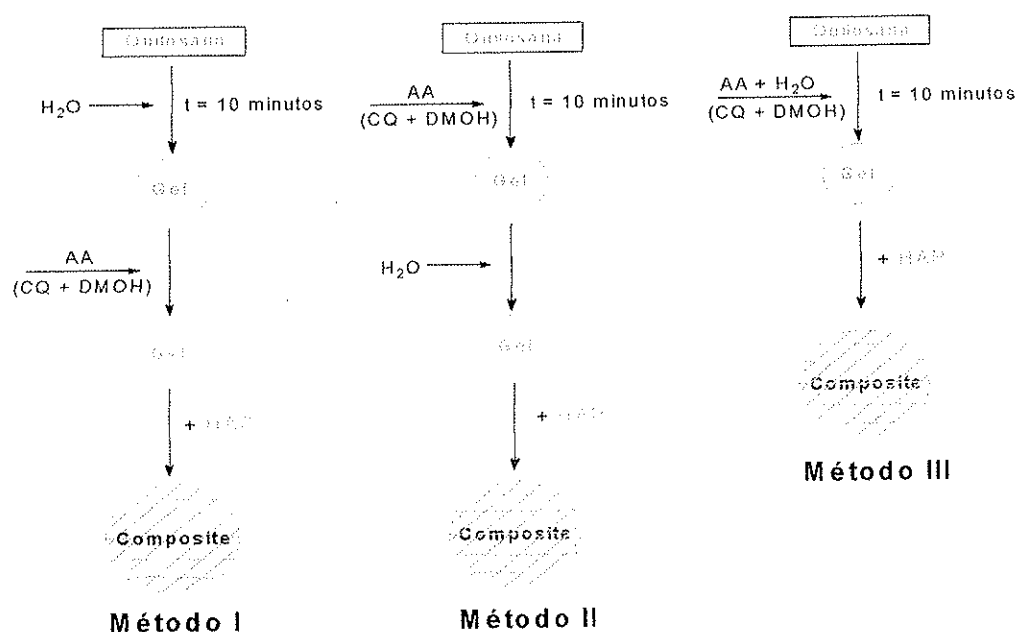


Figura 17.- Métodos de preparación de los composites de HA.

Para analizar el contenido máximo de relleno permisible de las HA obtenidas en los composites preparados, se tomó como criterio de admisibilidad que el material final tuviera una apariencia homogénea y manejable, sin que se apreciara segregación durante el proceso de su manipulación. En la Tabla 5 se recogen los porcentajes de relleno admitidos por los diferentes geles.

Tabla 5.- Contenidos máximos de rellenos para los geles preparados por los diferentes métodos.

Tipos de relleno	Contenidos máximos de rellenos (% en peso)		
	Geles I	Geles II	Geles III
HA	60	60	60
HAS	65	65	65
HA-Acr.	65	60	65
HA-Metac.	65	60	65
HA-Succ.	65	65	70
HA-Cit.	70	70	75

Como podemos apreciar, el contenido máximo para el caso de la HA sin modificar es del 60% para cualquiera de los métodos empleados. A partir de este por ciento de relleno el material, para cualquier contenido de CHI, presentaba segregación de partículas en su superficie y su manipulación resultaba casi imposible. Es de destacar que en el caso de los geles preparados mediante el método II, la adición de HA resultaba un poco más difícil que en los restantes métodos, siendo el método III el que presenta más fácil manipulación.

Por otra parte, al emplear HA modificada, tanto por el proceso de sinterización como por la modificación de la superficie mediante ácidos carboxílicos, se observa un aumento del grado de admisibilidad entre un 5 y un 15%. Este resultado indica que el proceso de modificación juega un papel importante sobre este parámetro, explicable sobre la base del aumento de la densidad del relleno y a la funcionalización de la superficie (compatibilización). Por otra parte, es de todos conocido que durante el proceso de sinterización disminuye el área superficial y aumenta el tamaño de las partículas, producto de la fusión entre estas, y por tanto aumenta la densidad del relleno¹⁶⁴. Este hecho hace que se pueda introducir mayor cantidad de relleno, en peso, en los materiales compuestos, lográndose un aumento de la cantidad de carga utilizando HAS.

La influencia de la funcionalización afecta de manera más directa a las interacciones que se crean entre el relleno inorgánico y la matriz monomérica. En la HA sin modificar, la superficie esta compuesta en su totalidad por iones inorgánicos que son incompatibles con la parte orgánica creándose una tercera fase, denominada interfase o mesofase, considerada como una zona homogénea e isotrópica de tamaño finito, donde tiene lugar la interacción entre el relleno y la matriz.

Teniendo en cuenta ambas características es explicable el hecho de que los composites preparados utilizando HA modificadas acepten un mayor contenido de carga que sus homólogos preparados con HA sin modificar. Es de destacar que se mantiene la misma tendencia, en cuanto a los métodos de preparación, que se obtuvo para el caso de la HA. Por otra parte, observamos que los composites preparados utilizando HA-Cit son los que mayor cantidad de carga aceptan, llegando a un 75% en peso, lo cual esta en concordancia con los resultados obtenidos por espectroscopía FTIR y grado de modificación. Con el fin de confirmar estas consideraciones se realizó un estudio óptico de los composites preparados mediante el método III y con un 15% de

CHI, al variar el contenido y naturaleza del relleno empleado, mediante microfotografías de su superficie, como se muestra en la Figura 18.

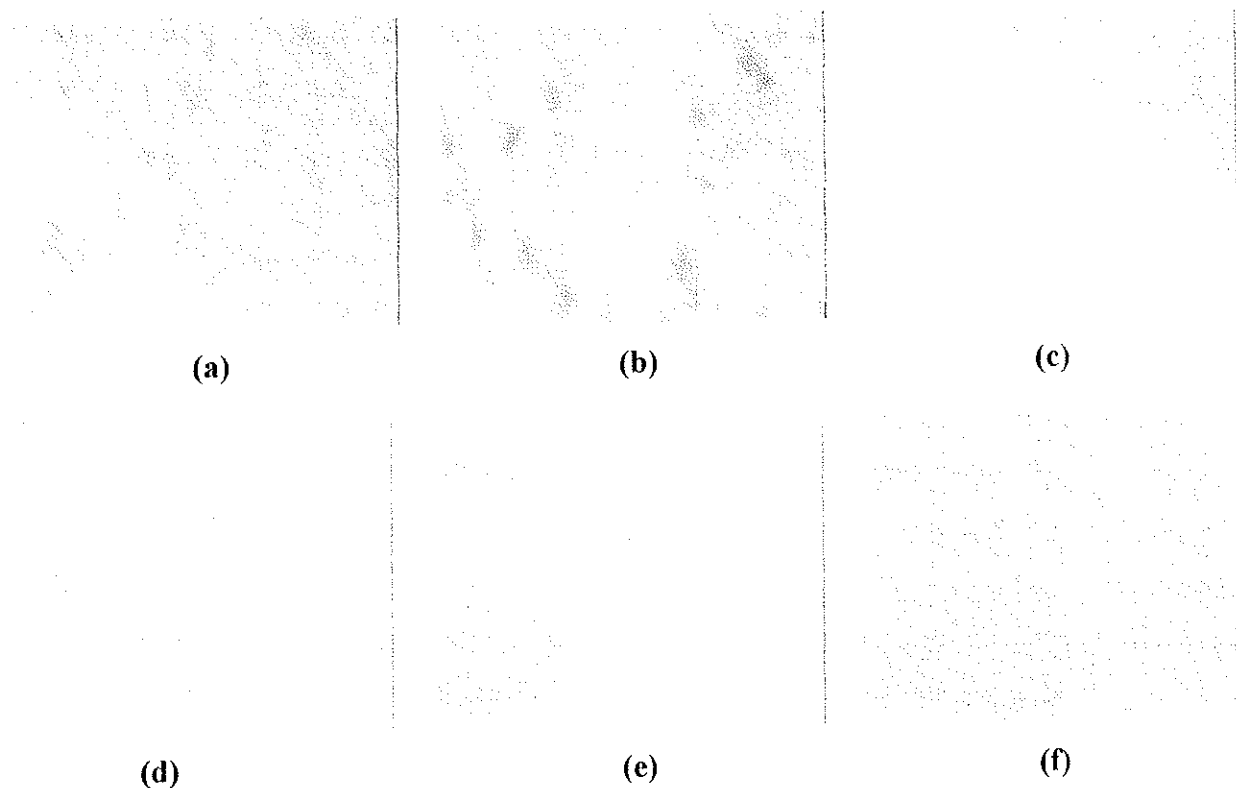


Figura 18.- Microfotografías de la superficie de los composites preparados mediante el método III variando el contenido y naturaleza de la carga con un aumento de 4X.

(a, b y c) = composites con 40, 50 y 60 % de HA sin modificar.

(d, e, y f) = composites con 40, 50 y 60% de HA-Cit.

En estas microfotografías (a, b y c) se observa como a medida que se aumenta la cantidad de HA el composite toma una consistencia más heterogénea. Mientras que para un 40% todas las partículas del relleno quedan atrapadas dentro de la matriz del gel, cuando el contenido de HA es del 60% existen zonas del composite donde comienzan a observarse agregados del relleno que no están cubiertas por el gel, con la presencia de algunas discontinuidades en la superficie del material. Este hecho se acentúa cuando el por ciento de CHI presente en los geles de partida pasa de un 10 a un 25% con respecto al monómero. En la comparación de los composites preparados por los diferentes métodos en estudio podemos decir que no existen diferencias apreciables entre las muestras con el mismo contenido de HA en cuanto al grado de homogeneidad.

Las imágenes obtenidas con las diferentes HA tratadas superficialmente, confirman los resultados obtenidos anteriormente. En el ejemplo mostrado, en la Figura 45 (d, e y f), para un mismo contenido de relleno, observamos como los composites con HA-Cit presentan una mayor homogeneidad, incluso para el mayor contenido de carga, que los preparados con HA sin modificar, lo que indica que el proceso de funcionalización superficial mejora la compatibilidad entre el relleno y la parte orgánica permitiendo una mejor y mayor incorporación de carga en un mismo material.

3.4.- Cinética de fotopolimerización de los composites.

A la hora de abordar el estudio de comportamiento bajo irradiación de estos composites, nos encontramos con la dificultad adicional, respecto de los geles anteriormente estudiados, de la presencia en el medio de otro componente más de naturaleza inorgánica. Su presencia, además de incidir sobre posibles interacciones de carácter químico entre la matriz orgánica y el relleno o carga inorgánica, le confiere al material resultante un carácter heterogéneo que da lugar a fenómenos físicos de interacción de la luz con estos nuevos materiales, lo cual puede condicionar su comportamiento bajo irradiación.

Dada la complejidad del sistema que se pretende estudiar, resulta pues difícil la utilización de técnicas convencionales empleadas en el estudio y cuantificación de los procesos fotofísicos y fotoquímicos puestos a juego en estos sistemas. Gracias a la adaptación de la fotocalorimetría diferencial de barrido al presente caso, se ha podido detectar y seguir en tiempo real la fotopolimerización del monómero acrílico, AA, presente en estos composites, incluso en proporciones minoritarias.

En los siguientes apartados se describen los resultados obtenidos bajo irradiación, al variar los diferentes componentes principales presentes en la formulación de estos materiales.

3.4.1.- Influencia del contenido de hidroxiapatita.

El aumento de la proporción o contenido de relleno o carga en un composite, generalmente, se relaciona con una mejora de las propiedades mecánicas del mismo. En el

presente caso, la hidroxiapatita (HA) posee otras propiedades tales como: capacidad de generar osteointegración, osteoinducción¹⁶⁵ y un alto grado de biocompatibilidad¹⁶⁶ por lo que es de esperar que un aumento en el contenido de HA en el composite no solo mejore sus propiedades mecánicas, sino también el resto de propiedades que hace de ella un relleno con características especiales.

Se ha descrito que un incremento de la carga de HA en composites quirúrgicos, mejora notablemente la integración del implante en la zona de aplicación y disminuye el tiempo de recuperación del paciente con respecto a zonas de control donde se ha empleado una menor cantidad de HA en el material implantado¹⁶⁷.

Por otra parte, se ha comprobado que un aumento de la carga en este tipo de biomateriales no solo acelera el proceso de integración del implante en el organismo humano, sino que además disminuye el rechazo por parte de este¹⁶⁸.

Con vistas a obtener composites con un alto contenido de HA, se decidió tomar como geles de partida los obtenidos con un 15% de CHI, con respecto al AA, y con una relación AA:H₂O del 50:50. La razón de elegir este gel en concreto estuvo basada en su baja viscosidad, ya que intuitivamente pensamos que la “mojabilidad” y admisión de mayor contenido de carga se verían favorecidos por esta composición del gel.

La incorporación de cantidades en peso de HA inferiores al 40% daba lugar a materiales con una consistencia parecida a la de la pintura viscosa. A partir de contenidos del 40% y superiores, se obtuvieron unos materiales con una consistencia similar al de una masilla, fácilmente manejable y moldeable, de aspecto homogéneo. Al aumentar el porcentaje de HA por encima del 40%, la consistencia del composite obtenido era cada vez mayor, hasta alcanzar un 60% de carga. Por encima de este valor en peso del relleno se obtenían unos materiales de aspecto arenoso y difícilmente manejables, ya que durante su preparación se segregaban partículas a medida que se aumentaba el contenido en HA, hasta obtenerse materiales totalmente disgregados.

Ante estas observaciones, en cierta forma subjetivas, se decidió utilizar los composites obtenidos, con proporciones en peso de HA de 40 al 60% para estudiar su comportamiento bajo irradiación.

En la Figura 19 y Tabla 6 se recogen los resultados obtenidos para la R_p en estos composites al variar el contenido de HAP, preparados por los métodos en estudio. Como podemos observar, al disminuir el contenido de relleno en los composites aumenta el valor de la R_p , cualesquiera que sea el método de preparación empleado.

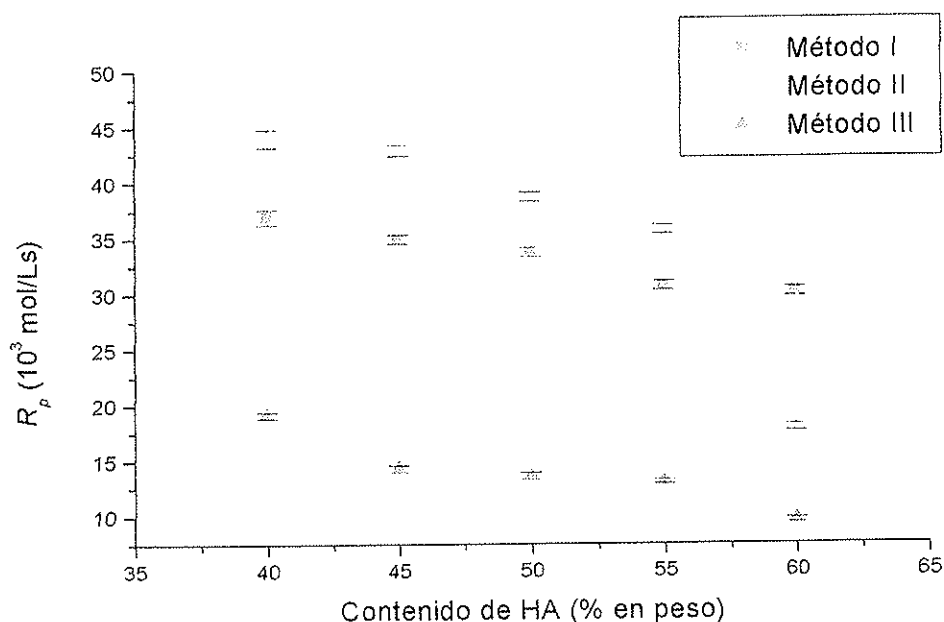


Figura 19.- Dependencia de la R_p con la variación del contenido de HA para los composites preparados mediante los diferentes métodos en estudio.

Estos resultados son explicables sobre la base de la teoría de las tres fases para composites (TTFC)^{169,170}. Dicha teoría considera que en un composite existen tres fases perfectamente distinguibles: la carga o relleno, la matriz o parte orgánica, y la mesofase (interface). El elemento principal de esta teoría es la tercera fase, una película híbrida entre las fases orgánica e inorgánica, donde tienen lugar los fenómenos de transición entre las propiedades de estas, lo cual caracteriza la efectividad de la interacción entre relleno y matriz.

Tabla 6.- Resultados obtenidos para la R_p con la variación del contenido de HA en los composites preparados.

%HA (en peso)	$R_p \cdot 10^3$ (mol/Ls)		
	Método I	Método II	Método III
40	36.9 ± 0.4	44.0 ± 0.3	19.1 ± 0.2
45	34.9 ± 0.4	42.9 ± 0.4	14.3 ± 0.2
50	33.7 ± 0.4	38.7 ± 0.4	13.6 ± 0.3
55	30.7 ± 0.4	35.7 ± 0.5	13.1 ± 0.3
60	30.1 ± 0.7	17.9 ± 0.8	9.6 ± 0.3

La mesofase se genera alrededor de las inclusiones de la partícula, y se considera como una película de espesor definido y características homogéneas. Algunas propiedades de la mesofase, como su densidad y viscosidad, son generalmente mayores que las de la matriz orgánica; esto conduce a un decremento en la movilidad y difusión de los radicales y por tanto en los valores de k_p , por lo que los valores de la R_p disminuyen. Si tenemos en cuenta que al aumentar el contenido de relleno aumenta la cantidad de mesofase presente, y conociendo que un incremento de esta produce un decremento en la velocidad de polimerización debido a la alta viscosidad y baja movilidad molecular de los radicales en esta fase se pueden explicar los valores obtenidos.

Es de destacar que en el caso de los composites II el paso de un 55% a un 60% de HA conlleva a una disminución brusca de la R_p , encontrándonos que para el resto de composiciones en relleno las velocidades que presentan estos composites son superiores a las que presentan los composites preparados por otros métodos, manteniendo una correspondencia con los valores que se obtienen para los respectivos geles de partida.

Este comportamiento hecho corrobora la idea de que la homogeneidad de la matriz influye positivamente sobre la cinética de polimerización en este tipo de materiales. El paso de un 55% a un 60% produce un aumento de la heterogeneidad de los materiales y por consiguiente el medio de reacción se hace más discontinuo, al tiempo que la aglomeración de partículas de

HA segregadas presenta un efecto pantalla frente a la transmisión de la luz en el interior del material lo cual conlleva al aumento de los valores de R_p .

Para estas mismas muestras, en la Tabla 7 se recogen los valores de R_p'' y el GC a los 4 minutos de irradiación en función del contenido de HA.

Tabla 7.- Resultados obtenidos para la R_p'' y el GC con la variación del contenido de HA en los composites preparados.

%HA	Método I		Método II		Método III	
	R_p'' (10^3 mol/Ls)	GC (%)	R_p'' (10^3 mol/Ls)	GC (%)	R_p'' (10^3 mol/Ls)	GC (%)
40	35.0 ± 0.3	80 ± 3	41.1 ± 0.4	88 ± 4	22.7 ± 0.4	55 ± 2
45	28.4 ± 0.3	75 ± 4	35.1 ± 0.4	81 ± 3	19.8 ± 0.3	48 ± 2
50	27.1 ± 0.4	71 ± 2	34.0 ± 0.5	77 ± 3	18.4 ± 0.2	45 ± 2
55	25.6 ± 0.4	68 ± 2	33.5 ± 0.5	73 ± 3	17.2 ± 0.2	40 ± 2
60	24.7 ± 0.3	65 ± 2	25.1 ± 0.4	52 ± 2	11.0 ± 0.1	37 ± 1

Como podemos observar, tanto la R_p'' como el GC tienen la misma tendencia mostrada anteriormente. El hecho de que el aumento del contenido de carga aumente la heterogeneidad del medio hace que la extensión de la reacción sea menor por lo que la velocidad, cuando el proceso de difusión de radicales libres es el que gobierna el proceso de polimerización, disminuye por la menor movilidad de estos radicales con respecto a composites con un menor contenido de relleno y por consiguiente la conversión de monómero a polímero se ve afectada de igual manera.

3.4.2.- Influencia del contenido de CHI y del método de preparación.

Inicialmente se realizó un estudio del comportamiento bajo irradiación de los composites preparados con un 60% de HA, con el fin de determinar la influencia del contenido de CHI y del método de preparación sobre diferentes parámetros cinéticos de interés.

Con el fin de facilitar su comprensión, en la Figura 20 se muestran, a título de ejemplo, solo las curvas cinéticas obtenidas bajo irradiación con los composites preparados mediante el método I al variar el porcentaje de CHI. De las partes lineales de estas curvas se calcularon las correspondientes velocidades de polimerización (R_p), cuyos valores, junto con los obtenidos para los otros métodos de preparación, se recogen en la Tabla 8.

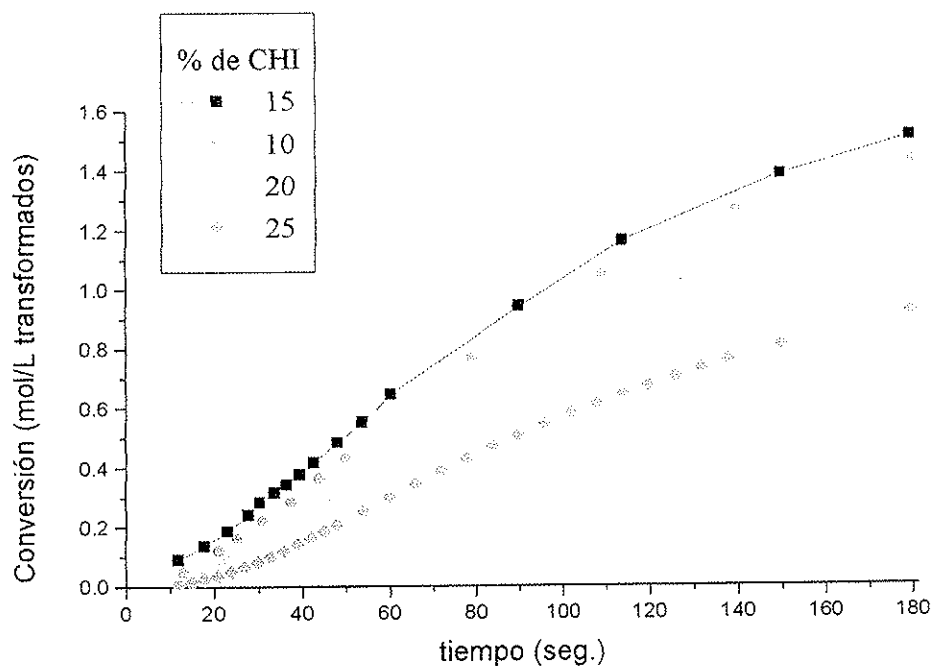


Figura 20.- Curvas cinéticas obtenidas para los composites preparados por el método I variando el por ciento de CHI y manteniendo constante el contenido de HA.

Tabla 8.- Resultados de la R_p para los composites de HA obtenidos mediante los diferentes métodos de preparación.

% CHI	$R_p \cdot 10^3$ (mol/Ls)		
	Método I	Método II	Método III
10	26.4 ± 0.5	13.0 ± 0.5	8.3 ± 0.3
15	30.1 ± 0.7	17.9 ± 0.7	9.6 ± 0.3
20	27.3 ± 0.7	17.2 ± 0.7	12.1 ± 0.4
25	20.8 ± 0.7	12.7 ± 0.7	11.6 ± 0.4

Todos los composites muestran un comportamiento similar bajo irradiación: a una etapa inicial de retardo, dentro de los 10 a 20 segundos de irradiación, le sigue una velocidad de polimerización inicial alta, seguido de un decremento de la actividad de polimerización alrededor del minuto de irradiación, aparentemente debido a la vitrificación que sufre el sistema con el aumento de la extensión de la reacción.

De las experiencias realizadas se deduce que en el caso de los composites preparados por los métodos I y II la R_p aumenta ligeramente hasta el 15% de CHI y después disminuye. En el caso de los composites preparados mediante el método III, la R_p aumenta hasta el 20% de CHI, disminuyendo posteriormente. Al comparar los valores obtenidos con los composites preparados por los tres métodos encontramos que, en todo el intervalo de porcentajes de CHI estudiado, los valores de velocidad de polimerización que se obtienen para los composites I son superiores al resto.

Estos resultados parecen indicar que la homogeneidad que presentan estos materiales juega un papel fundamental sobre la cinética de fotopolimerización. Al aumentar el contenido de CHI, la heterogeneidad del medio aumenta en todos los composites preparados. Este aumento de las imperfecciones del material provoca discontinuidades, lo cual trae como consecuencia una disminución en la movilidad y difusión de los radicales en el medio de polimerización y, por tanto, de la R_p .

Este aumento de la heterogeneidad del material se pone de manifiesto a partir del 15% de CHI, en el caso de los composites I y II, y a partir de un 20% de CHI, para el caso de los composites III, relacionable con la fluidez de los geles de partida, como se ha demostrado en el Capítulo anterior. En la Figura 21 se muestran de forma comparada, los valores de la R_p de los composites preparados por los diferentes métodos, con respecto a los geles de partida.

En este caso, en el que los composites preparados contienen el máximo de relleno, es de esperar que toda, o casi toda, la matriz orgánica este formando parte de la mesofase y por tanto se produzca una disminución de los valores de la R_p con respecto a la matriz sin relleno, como se obtiene en el caso de los composites II y III. Sin embargo, los composites preparados mediante el método I presentan una tendencia opuesta, excepto para un contenido de CHI del 25%. Este

comportamiento, aparentemente anómalo, parece ser relacionable con los fenómenos físicos de interacción de la luz incidente con el material¹⁷¹.

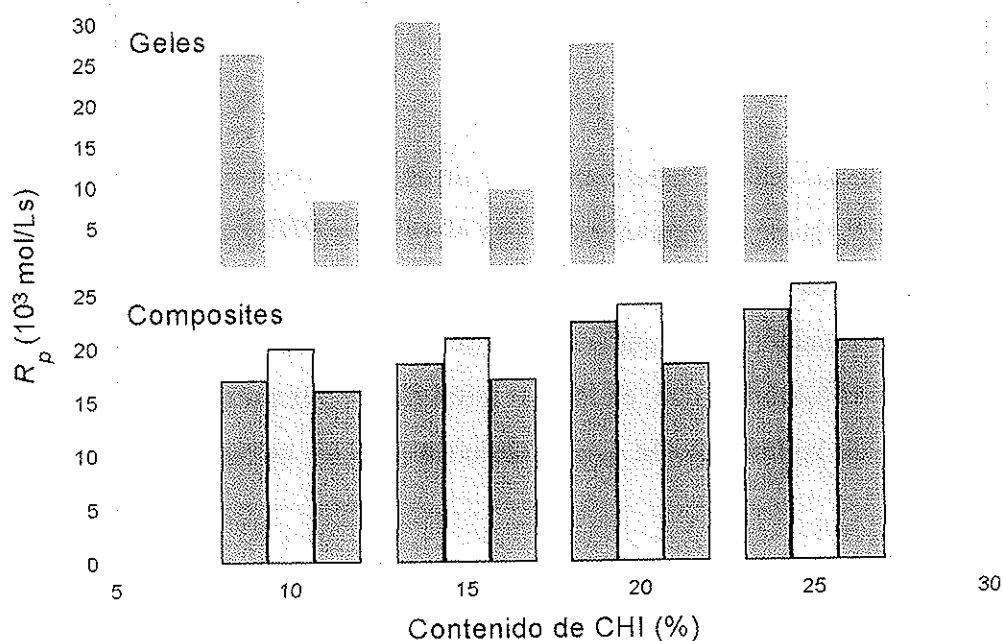


Figura 21.- Comparación de la R_p entre geles y composites, con un 60% de HA, preparados mediante los diferentes métodos empleados.

La dependencia de la velocidad de fotopolimerización, R_p , con la intensidad de luz absorbida, I_a , viene dada por la ecuación general:

$$R_p = \frac{k_p}{k_t^{0.5}} [M] (\phi_i I_a)^{0.5}$$

donde :

$[M]$ = concentración del monómero.

k_p y k_t = constante de propagación y terminación respectivamente.

ϕ_i = rendimiento cuántico de iniciación.

I_a = intensidad de luz absorbida.

Es sabido que en sistemas heterogéneos, como los aquí estudiados, las partículas de relleno interactúan ópticamente con la luz incidente, produciendo fenómenos de reflexión y dispersión en la masa del sistema irradiado. Así pues, además de los clásicos procesos de absorción-trasmisión, en un medio heterogéneo este tipo de interacciones de la luz incidente con la carga o relleno (reflexión y dispersión), implica que el recorrido de la luz dentro del material (camino óptico) aumenta, con respecto al recorrido por la luz en un medio homogéneo, en el que coincide con el espesor del material respecto a la normal de la luz incidente.

Teniendo en cuenta que la luz absorbida, I_a , viene determinada por la expresión general derivada de la ley de Lambert-Beer, un aumento del camino óptico, l , se traducirá en el correspondiente aumento de la intensidad absorbida y, por consiguiente, de la velocidad de polimerización, de acuerdo a las anteriores expresiones. Puesto que los fenómenos de reflexión y dispersión de la luz son dependientes de la naturaleza, proporción y tamaño de partícula de la carga, dichos procesos tendrán una relación directa, en el presente caso para una misma carga, con el estado de agregación de las partículas.

En general, un aumento de la carga por encima de un determinado valor, conduce a la formación de agregados de partículas, de forma que actúan de “pantalla” frente a la luz incidente; lo cual impide su propagación en el interior de la muestra irradiada.

Si partimos del hecho, demostrado anteriormente, de que la viscosidad que presentan los geles muestran la siguiente tendencia: geles II > geles I > geles III, al adicionar la máxima cantidad de relleno este queda mejor disperso en el caso de los geles III que en los demás, por lo que el camino óptico en esos composites aumentará respecto a los preparados mediante los restantes métodos, tal y como se muestra, idealmente representado en la Figura 22, a la vez que se incrementa la cantidad de parte orgánica que pasa a la mesofase. Por lo tanto, los composites preparados mediante el método I se encuentra en una situación intermedia en cuanto a estos parámetros. Como hemos explicado, estos dos factores tienen efectos opuestos sobre la cinética de fotopolimerización. El aumento del camino óptico trae consigo el aumento de la R_p y el incremento de la mesofase la disminuye, por lo que se establece un compromiso entre estos factores a la hora de analizar el comportamiento cinético a cada composite en concreto.

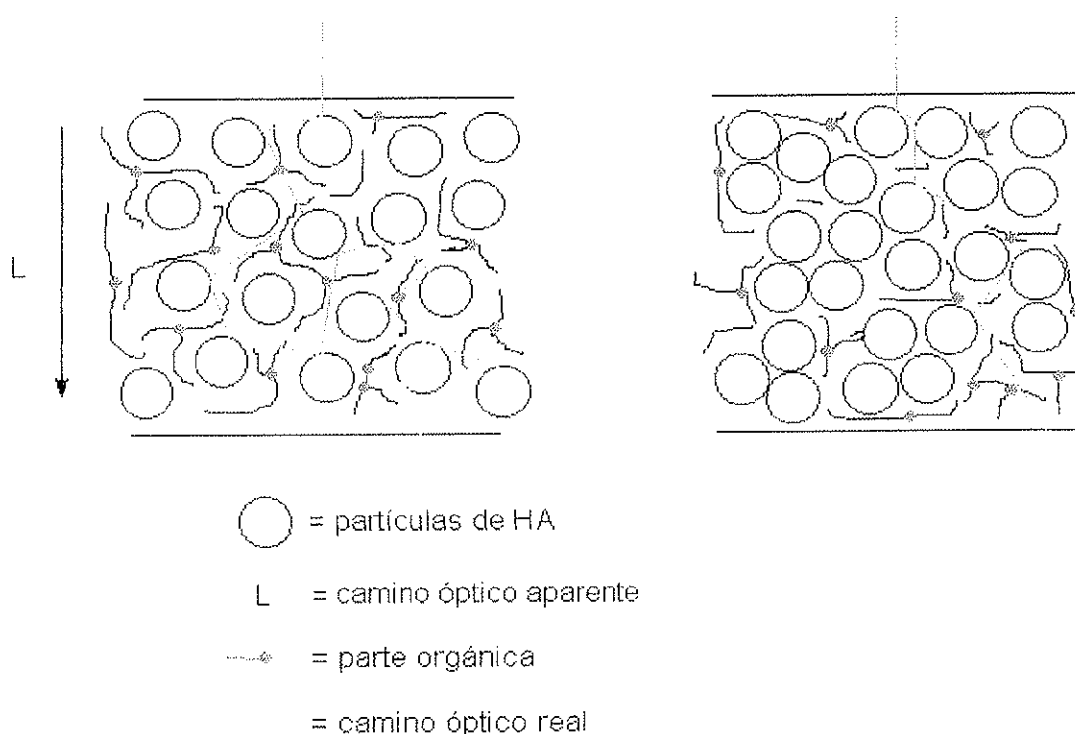


Figura 22.- Aumento del camino óptico en los composites preparados.

En el caso de los composites I, el aumento del camino óptico tiene mayor peso que el incremento de la mesofase, por lo que los valores de la R_p son mayores que los del correspondiente gel de partida. En el caso de los composites II y III el factor que predomina sobre la cinética de fotopolimerización es la mesofase lo cual explica los resultados obtenidos.

Para confirmar esta hipótesis, se calculó el camino óptico para cada contenido de CHI, en cada uno de los métodos de preparación, tomando como camino óptico en el caso de los geles el espesor de la muestra empleada en los ensayos cinéticos (0.15 cm). Para realizar este calculo se parten de dos premisas:

- Tanto los valores de k_t como de k_p , así como el de ϕ_i , son iguales o similares en los geles y composites correspondientes, por tanto la relación de velocidades entre ambos medios puede expresarse como:

$$R_p = KI_a^{0.5} \quad \text{por tanto} \quad \left(\frac{R_{pcomp}}{R_{pgel}} \right)^2 = \frac{I_{acomp}}{I_{agel}}$$

donde:

K = constante.

R_{pcomp} = velocidad de polimerización del composite.

R_{pgel} = velocidad de polimerización del gel.

I_{acomp} = intensidad absorbida por el composite

I_{agel} = intensidad absorbida por el gel

- b) Atendiendo al hecho de que en los casos en estudio el valor de la $Abs \leq 0.1$ y que tanto para geles como para composites I_o , c y ε son iguales la relación que describe la relación de intensidades de luz absorbida (I_a) de composites y geles se puede escribir como:

$$\frac{I_{acomp}}{I_{agel}} = \frac{L_{comp}}{L_{gel}}$$

donde:

I_{acomp} = intensidad de luz absorbida por el composite.

I_{agel} = intensidad de luz absorbida por el gel.

L_{comp} = camino óptico del composite.

L_{gel} = camino óptico del gel.

Conociendo el valor de R_p obtenidos para el caso de geles y composites y del camino óptico para el caso de los geles (0.15 cm) podemos calcular, a través de las expresiones anteriores, el camino óptico promedio correspondiente a cada uno de los composites estudiados. En la Tabla 9 se muestran los resultados obtenidos.

Tabla 9.- Resultados de la determinación de L_{comp} promedio para los diferentes composites.

% CHI	Camino óptico promedio (cm)		
	Método I	Método II	Método III
10	0.36	0.06	0.04
15	0.39	0.11	0.05
20	0.22	0.07	0.06
25	0.11	0.04	0.05

De estos valores se desprende que, en el caso, de los composites I, los valores del L_{comp} promedio son superiores al valor del camino óptico de los correspondientes geles, para contenidos de CHI del 10 al 20%. Su disminución para el mayor contenido de CHI es explicable basándose en la agregación de partículas de HA, cuyo tamaño presenta el efecto pantalla antes mencionado.

Para los composites II y III los valores calculados para el L_{comp} promedio guardan un paralelismo con los correspondientes valores de velocidad, aunque en todos los casos dichos valores son inferiores al camino óptico correspondiente al gel. Hay que señalar que en estos cálculos no se ha tenido en cuenta el efecto debido a la presencia de la mesofase, de acción opuesta a la del aumento del camino óptico, y que para el caso de estos composites II y III prevalece, con velocidades de polimerización inferiores a las obtenidas con sus correspondientes geles.

Otros parámetros cinéticos de interés, como la velocidad de polimerización en la segunda etapa, R_p'' , que comienza aproximadamente a los 60 segundos de iniciada la irradiación y el grado de conversión (GC) que se alcanza a los 4 minutos de iniciada la irradiación se recogen en la Tabla 10.

Tabla 10.- Resultados de la R_p'' y el GC para los composites preparados.

% CHI	Método I		Método II		Método III	
	R_p''	GC	R_p''	GC	R_p''	GC
	(10^3 mol/Ls)	(%)	(10^3 mol/Ls)	(%)	(10^3 mol/Ls)	(%)
10	20.3 ± 0.2	62 ± 2	20.5 ± 0.2	44 ± 1	8.2 ± 0.1	31 ± 1
15	24.7 ± 0.3	65 ± 2	25.1 ± 0.4	52 ± 2	11.0 ± 0.1	37 ± 1
20	20.6 ± 0.3	56 ± 2	21.9 ± 0.4	49 ± 3	13.1 ± 0.1	51 ± 2
25	17.2 ± 0.5	49 ± 3	19.4 ± 0.5	47 ± 3	12.7 ± 0.2	41 ± 2

Los resultados obtenidos en el caso de la R_p'' muestran la misma tendencia, con el aumento del contenido de CHI, que los obtenidos para la velocidad de polimerización inicial, por lo que podemos decir, en un principio, que el grado de homogeneidad en la distribución de la carga sigue jugando un papel fundamental en estos sistemas complejos. Sin embargo, es de destacar que en todo el intervalo estudiado los valores de R_p'' son superiores a los obtenidos para los geles de partida tal y como se muestra en la Figura 23 para el caso de los composites I.

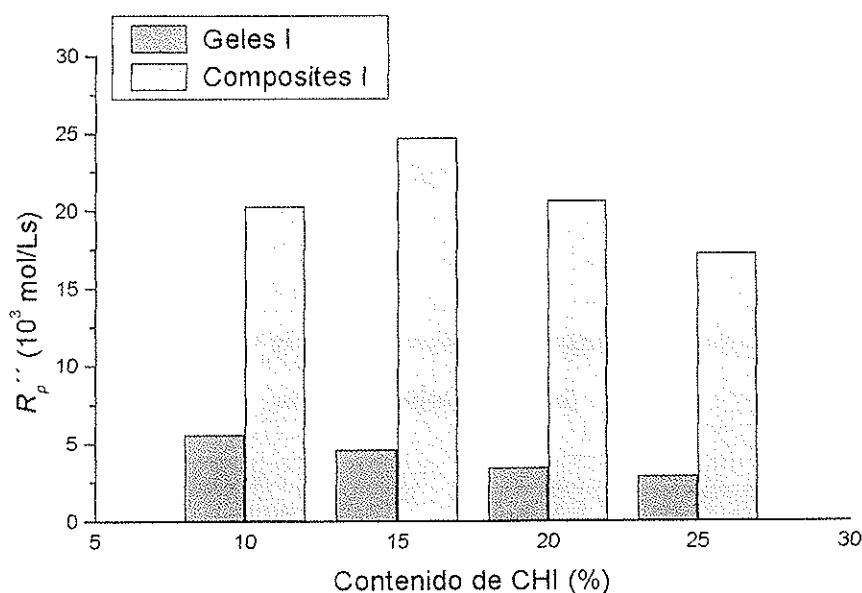


Figura 23.- Comportamiento de la R_p'' para geles y composites preparados mediante el método I.

Este resultado parece indicar que en la matriz polimérica de los composites es decisivo el fenómeno de vitrificación del sistema que tiene lugar en los geles y, por consiguiente, el proceso de polimerización alcanza una mayor extensión en este caso. Si tenemos en cuenta que el proceso de polimerización en los composites ocurre en la vecindad de las partículas del relleno que están recubiertas por la parte orgánica y que este relleno actúa difundiendo la luz, como se ha explicado anteriormente, es razonable el pensar que el proceso de polimerización se verá favorecido en toda la masa del composite, lo que influye de forma proporcional sobre la velocidad global de polimerización. Al analizar los valores alcanzados por el GC se confirma lo anterior (Tabla 10). Para todos los materiales preparados, el valor obtenido es superior al alcanzado por los correspondientes geles de partida, lo cual es una consecuencia directa del aumento de la conversión favorecida por el papel del relleno como difusor de la luz incidente.

3.4.3.- Influencia del contenido de Acido Acrílico.

Una vez analizados los resultados descritos anteriormente y teniendo en cuenta que el grado de homogeneidad del medio parece jugar un papel fundamental, se fijó una composición de CHI e HA y se varió únicamente la cantidad de AA presente en el composite, con el fin de esclarecer su influencia sobre la cinética de fotopolimerización del material. La formulación escogida fue la misma que la mencionada en la sección anterior en cuanto al contenido de CHI y se varió la relación AA:H₂O desde un 40:60 a un 60:40, manteniéndose constante la cantidad de HA en un 60%. Las composiciones estudiadas se muestran en la Tabla 11. En todo momento se mantuvo constante e igual a 1% en peso el contenido de CQ con respecto al monómero en estudio.

Tabla 11.- Composición de los composites con un 15% de CHI y un 60% de HA variando la concentración de AA.

Muestra	AA:H ₂ O	[AA] (mol/L)	[CQ] (mol/L)
1	40:60	5.18	0.0225
2	50:50	6.37	0.0275
3	60:40	7.47	0.0324

Al preparar estas formulaciones se observó como a medida que se aumentaba la proporción de AA presente en los composites, preparados por un mismo método, la homogeneidad del material era mayor, encontrándose que el composite que contiene mayor cantidad de AA posee una mayor homogeneidad que los composites preparados con menor cantidad de este monómero. Con el fin de confirmar esta apreciación se realizó un estudio óptico de los composites preparados mediante el método III, al variar el contenido de AA, mediante microfotografías de su superficie, tal y como se muestra en la Figura 24.

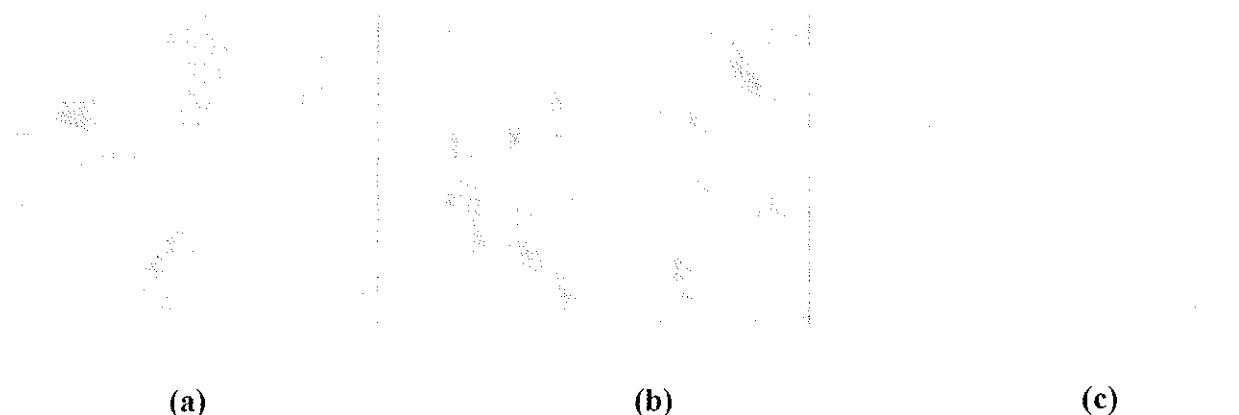


Figura 24.- Composites preparados mediante el método III variando el contenido de AA y manteniendo constante el por ciento de CHI e HA.
(a) con un 40% de AA (b) con un 50% AA (c) con un 60% de AA.

En dichas imágenes se puede apreciar como a medida que aumentamos la concentración de monómero, en el sistema, el material final presenta una estructura más continua y homogénea, en donde toda la HA utilizada como relleno esta recubierta totalmente por la red del gel. Al disminuir el contenido de AA, la HA tiende a formar grumos y a presentar discontinuidades, incluso con un 40% de AA se detecta claramente la presencia de aglomerados de partículas de HA segregadas del gel.

Con respecto a los diferentes métodos de preparación no existen diferencias apreciables en cuanto a su manipulación y homogeneidad. Sin embargo, los composites preparados mediante el método II mostraban una mayor heterogeneidad que sus homólogos preparados por los restantes métodos. Es de destacar que estas diferencias eran igualmente menos marcadas al ir aumentando el contenido en monómero.

Los resultados obtenidos al irradiar los diferentes composites se recogen en la Tabla 12. Vemos como el aumento del contenido de AA trae consigo un aumento de la R_p para todos los métodos utilizados, como, en principio es lógico de esperar teniendo en cuenta que el aumento de la concentración de monómero determina de forma directamente proporcional el valor de la velocidad de polimerización. Los resultados obtenidos, con respecto a los métodos de preparación, siguen la tendencia mostrada con los recogidos para la variación de CHI, aunque siempre los valores en el caso de los composites I son superiores.

Tabla 12.- Resultados de R_p para los composites preparados variando el contenido de AA.

Muestra	$R_p \cdot 10^3$ (mol/Ls)		
	Método I	Método II	Método III
1	20.4 ± 0.8	15.0 ± 0.8	5.9 ± 0.3
2	30.1 ± 0.7	17.9 ± 0.8	9.6 ± 0.3
3	60.4 ± 0.2	55.4 ± 0.6	26.8 ± 0.3

Hay que tener presente que, a medida que aumentamos la concentración de AA en los composites preparados, aumenta ligeramente también la concentración del sistema de (Tabla 27), lo cual conlleva el que se genere una mayor cantidad de radicales por lo que también puede existir una contribución en este aspecto al valor de R_p . Estos resultados de velocidad de polimerización también mantienen esta tendencia a tiempos de irradiación mayores. En la Tabla 29 se observan los resultados obtenidos para la R_p'' , calculada en el intervalo de tiempo entre los 60 y los 200 segundos de irradiación.

Tabla 29.- Dependencia de la R_p'' con la variación del contenido de AA en los composites.

Muestra	$R_p'' \cdot 10^3$ (mol/Ls)		
	Método I	Método II	Método III
1	16.0 ± 0.5	15.3 ± 0.7	6.4 ± 0.3
2	24.7 ± 0.3	25.1 ± 0.4	11.0 ± 0.1
3	32.1 ± 0.3	37.3 ± 0.4	23.8 ± 0.1

Vemos como también con el incremento del contenido de AA aumenta los valores de R_p'' , lo que parece indicar que el sistema no ha vitrificado aún a las conversiones alcanzadas a estos tiempos de irradiación. De igual forma, la confirmación de este comportamiento se deduce de los resultados obtenidos para el grado de conversión (GC) alcanzado a los 4 minutos de irradiación, tal y como se muestra en la Figura 25.

Observamos como con el aumento del AA en los composites la conversión de monómero a polímero aumenta paralelamente. Este comportamiento refleja que el sistema no ha vitrificado, tal y como indicamos al analizar los valores de la velocidad de polimerización R_p'' .

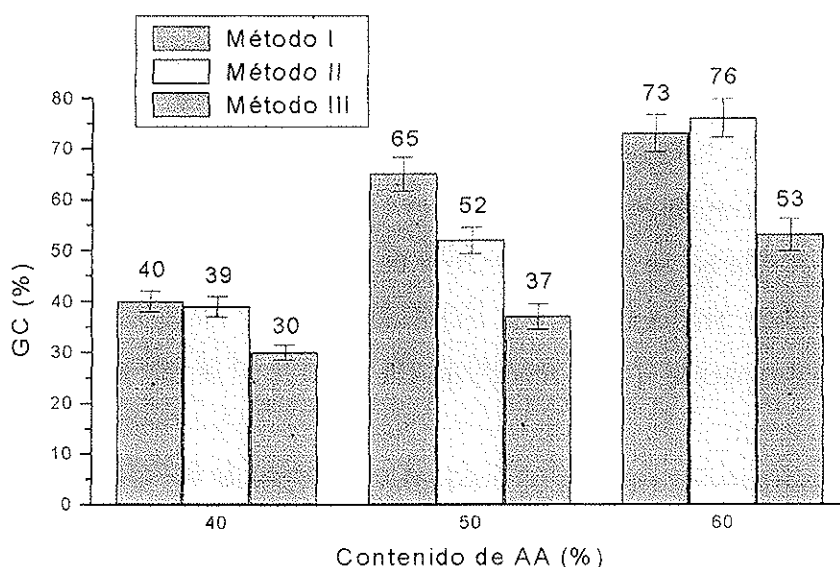


Figura 25.- Dependencia del GC con el contenido de AA en los composites preparados mediante los métodos en estudio manteniendo constante el porcentaje de CHI e HA.

El valor del GC final es determinante desde el punto de vista de las propiedades finales de cualquier composite. Un mayor GC trae consigo, generalmente, un aumento de las propiedades físicas y mecánicas¹⁷² y, lo que es también importante desde el punto de vista aplicado, se reduce el nivel de citotoxicidad y genotoxicidad¹⁷³ que potencialmente pueda presentar el material final, al existir menor cantidad de monómero libre residual en el sistema que pueda migrar hacia el medio en el que es implantado.

Como conclusión parcial podemos decir que el aumento del contenido de AA presente en estos composites, para el intervalo de concentraciones estudiado, da lugar a un aumento de la velocidad de polimerización del sistema sin llegar a vitrificar el medio, lo cual permite que el grado de conversión alcanzado aumente al pasar del 40 a un 60% de AA, lo que se reflejará en las propiedades finales del material. Así pues, este comportamiento es debido tanto al aumento de la velocidad de polimerización, que es directamente proporcional al valor de la concentración de HA, así como por el aumento del grado de homogeneidad del composite al aumentar la concentración de AA en el sistema.

3.4.4.- Influencia de la naturaleza del relleno.

Una vez estudiado el comportamiento cinético de los composites con carga de HA estudiamos la influencia del proceso de modificación superficial del relleno sobre los mismos parámetros estudiados. Para este estudio se escogió nuevamente un gel preparados mediante el método II y con un contenido de CHI igual al 15% respecto al monómero y con una relación AA:H₂O 50:50. A este gel se le añade un 50% de las diferentes HA modificadas y se estudia su comportamiento bajo irradiación, a una intensidad de 0.26 mcal/seg, en comparación con los resultados obtenidos para la HA sin modificar. En la Tabla 13 se recogen los valores obtenidos.

Tabla 13.- Resultados de cinética de fotopolimerización de los composites preparados con las HA funcionalizadas.

Tipo de relleno	R_p (10^3 mol/Ls)	R_p'' (10^3 mol/Ls)	GC (%)
HA	38.7 ± 0.4	34.0 ± 0.5	77 ± 3
HAS	6.3 ± 0.4	5.4 ± 0.4	24 ± 4
HA-Cit.	40.2 ± 0.7	21.9 ± 0.9	73 ± 9
HA-Succ.	10.4 ± 0.7	5.5 ± 0.5	27 ± 8
HA-Acr.	8.8 ± 0.6	7.5 ± 0.5	24 ± 2
HA-Metac.	7.9 ± 0.7	7.7 ± 0.5	34 ± 7

Los valores obtenidos para la R_p en el caso de los rellenos HA-Acr, HA-Metc, HA-Succ y HAS son similares, debido a que toda la parte orgánica de estos composites se encuentra

presente en la mesofase. Esto significa que los valores de las constantes cinéticas, k_p y k_t , tienen valores iguales en estos materiales. Sin embargo, existe una pequeña disminución en el caso de la HAS lo cual puede explicarse debido al mayor tamaño de partícula que esta presenta, relacionable con los efectos ópticos que se originan. Estos resultados se confirman al analizar los valores de R_p'' y del GC para estos mismos materiales. Sin embargo, en el caso de los composites preparados con HA-Cit, los valores cinéticos que se obtiene son superiores a los obtenidos para todas las HA modificadas e incluso ligeramente superior, en el caso de la R_p , a la del relleno sin modificar. Esto indica que en estos composites la cantidad de matriz orgánica presente en la mesofase es menor que en sus homologas. Los factores que afectan, fundamentalmente, el tamaño de la mesofase en los composites son dos: la magnitud de la interacción relleno-matriz orgánica, y el área interfacial que existe entre la matriz y el relleno.

En este caso y teniendo en cuenta que el tamaño de partícula es similar, excepto para la HA-Acr, en todas las HA modificadas es la interacción entre el área de la partícula y la matriz orgánica el factor que más afecta a la mesofase. La HA-Cit presenta una menor área superficial ($22.8 \text{ m}^2/\text{g}$) como resultado del proceso y grado de modificación, por tanto la interacción que se alcanza es más débil que en los otros casos y la mesofase es menor. Por otra parte, al comparar los resultados obtenidos para la R_p de los diferentes rellenos con respecto a la HA podemos observar que, excepto en el caso de la HA-Cit, todos los valores obtenidos son inferiores. Este comportamiento es lógico de esperar ya que, como hemos mencionado anteriormente, el proceso de modificación trae consigo un aumento de la mesofase presente en los composites. En el caso de la HA-Cit este aumento de R_p no se produce debido a la disminución de su área superficial, y por tanto un aumento de la densidad de la carga, en un 50%, con respecto a la HA.

Como conclusión de este apartado se puede decir que el comportamiento de la R_p en los composites estudiados se puede explicar a través de los factores de interacción entre matriz y relleno, (que crea un espacio intermedio denominado mesofase) donde la alta viscosidad y la menor movilidad de los radicales causa una disminución de la R_p , y los efectos de aumento del camino óptico que provocan las partículas que inciden directamente sobre la cantidad de luz absorbida y por tanto aumenta la R_p . Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el aspecto cinético se decidió utilizar, únicamente, la HA-Cit como relleno para la preparación de composites, por los diferentes métodos empleados, utilizables en el estudio de sus propiedades.

3.5.- Propiedades físicas de los composites.

3.5.1.- Determinación de la temperatura máxima de polimerización (T_{max}).

Como se ha demostrado a lo largo de este trabajo, el proceso de fotopolimerización de estos composites es un proceso exotérmico. Debido al carácter exotérmico de la reacción de polimerización, la temperatura del material aumenta, encontrándose que mayores velocidades de polimerización conducen a un aumento de la temperatura máxima (T_{max}) del proceso¹⁷⁴. El valor de la temperatura alcanzada por un material implantable es uno de los parámetros físicos que reviste mayor importancia a la hora de validar un material con este fin. Un aumento de la temperatura en el lugar del implante, superior a los 70 °C, provoca la necrosis del tejido circundante e incluso la del propio hueso, lo cual favorece su rechazo por parte del organismo, molestias al paciente y el fallo total del implante.

Por esta razón, consideramos imprescindible el determinar dicha temperatura para el caso de los composites estudiados. En la Figura 26 se muestra la evolución de la T_{max} en el tiempo con respecto al contenido y naturaleza de la HA utilizada como relleno en los composites preparados mediante el método II. Los resultados obtenidos para este y los restantes métodos se recogen en la Tabla 14.

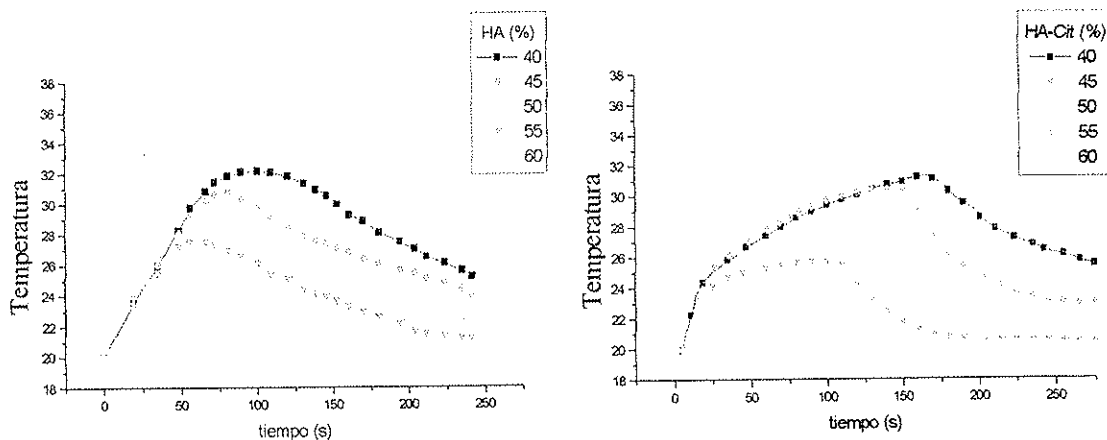


Figura 26.- Evolución de la temperatura durante el proceso de fotopolimerización de los composites preparados mediante el método II variando el contenido y naturaleza del relleno.

Tabla 14.- Resultados de la T_{max} obtenidos para los composites preparados variando el contenido y la naturaleza del relleno.

HA (%)	T_{max} (°C)					
	Composite HA			Composite HA-Cit		
	Método I	Método II	Método III	Método I	Método II	Método III
40	31.8	32.0	30.2	32.8	33.3	31.3
45	30.4	30.7	29.2	31.7	32.5	30.1
50	28.4	28.6	27.4	29.8	31.0	28.0
55	26.1	27.5	25.1	26.6	29.3	25.7
60	25.7	25.0	24.8	25.6	26.3	24.2

Como podemos observar los mayores valores de T_{max} se obtienen en el caso de los composites preparados utilizando como relleno HA-Cit y mediante el método II, siendo el valor máximo alcanzado de tan solo 33.3 °C. Teniendo en cuenta que la temperatura a la cual se inicia la polimerización fue tan solo de 20 °C, y que la temperatura corporal es de 37 °C, la extrapolación de los resultados obtenidos son alentadores, ya que ninguno de los materiales preparados sobrepasa la temperatura de necrosis de tejidos, por lo que, desde este punto de vista, pueden ser utilizados como implantes.

Las pequeñas diferencias encontradas entre ambos rellenos es esperable, ya que en los composites preparados con HA-Cit, la cantidad global de masa monomérica, gel en este caso, es superior a los materiales preparados con HA sin modificar, por lo que la cantidad de calor que se libera es superior, lo cual esta en concordancia con los valores de la R_p obtenidos para ambos casos. Un razonamiento similar es aplicable al analizar el comportamiento de la T_{max} con el aumento del contenido de relleno, donde observamos como, independientemente del relleno utilizado, la temperatura alcanzada disminuye.

3.5.2.- Determinación del por ciento de dobles enlaces residuales (%DER).

La conversión de dobles enlaces en matrices poliméricas, de forma general, nunca alcanza el 100 por ciento¹⁷⁵. Ello es debido a la formación de un enrejado tridimensional muy viscoso durante

el proceso de propagación de la polimerización, en el que quedan atrapadas moléculas del monómero que no han reaccionado. Por la misma razón en la matriz polimerizada, en el presente caso, quedan cantidades de monómero residual, causa principal de la potencial toxicidad de los biomateriales de naturaleza acrílica.

El grado de conversión se determina, generalmente, mediante la Espectroscopia Infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR). Esta técnica se basa en la determinación de la disminución de la absorbancia del doble enlace correspondiente a los monómeros acrílicos, entre los $810 - 820 \text{ cm}^{-1}$, durante el proceso de polimerización, con respecto a una banda de referencia. La cantidad de estos grupos sin reaccionar o DER se expresa, como porcentaje con relación al número total de grupos acrílicos en el material de partida, sin polimerizar¹⁷⁶.

En materiales compuestos, la determinación espectroscópica está dificultada por la presencia en los espectros de las bandas correspondientes al relleno. Además, en este caso, el factor de viscosidad se reduce, ya que aunque a pequeños contenidos de HA la viscosidad del composite se incrementa bruscamente con respecto al gel, dicha viscosidad permanece casi invariable con respecto a mayores contenidos de carga para el mismo sistema.

En este estudio se prepararon composites a partir de geles con un 15% de CHI con respecto al AA, obtenidos mediante los diferentes métodos en estudio, y se estudio la dependencia del %DER con respecto a varios parámetros como: variación del contenido de carga desde un 40 a un 60%; naturaleza del relleno empleado (HA y HA-Cit). La determinación del %DER se realizó tal y como se describe en el Capítulo IV sección 4.5.7. En la Tabla 15 se recogen los resultados obtenidos, para un tiempo de irradiación inicial de 2 minutos, solo para los composites preparados utilizando HA.

De forma general, para todos los métodos de preparación utilizados, el aumento del contenido de HA conlleva un aumento del %DER, lo cual esta en concordancia con los resultados de la cinética de polimerización de estos materiales. Al elevar el porcentaje de carga, la velocidad de polimerización disminuye, por los efectos de la mesofase y de “pantalla” antes mencionados, y esto trae consigo que la conversión de monómero a polímero tenga una menor extensión.

Tabla 15.- Determinación del %DER en los composites preparados mediante los diferentes métodos, variando el contenido de HA y el medio de polimerización.

HA (%)	DER (%)					
	Método I		Método II		Método III	
	Seco	H ₂ O	seco	H ₂ O	seco	H ₂ O
40	12 ± 2	8 ± 1	4 ± 2	5 ± 1	24 ± 1	17 ± 1
45	19 ± 1	12 ± 2	17 ± 2	19 ± 1	25 ± 1	17 ± 1
50	21 ± 2	17 ± 1	33 ± 3	22 ± 1	26 ± 2	19 ± 2
55	38 ± 2	24 ± 2	50 ± 2	14 ± 2	28 ± 1	20 ± 2
60	46 ± 2	27 ± 2	60 ± 4	16 ± 2	30 ± 1	22 ± 2

Al analizar la influencia del medio encontramos que, de forma general, los valores obtenidos en medio acuoso son menores que los obtenidos en medio seco. Estos resultados son explicables sobre la base de que en presencia de agua el monómero sin polimerizar y las cadenas de bajo peso molecular del polímero migran hacia el medio, por lo que en la determinación del %DER los valores obtenidos son inferiores. Es de destacar que en el caso de los composites II los valores obtenidos en medio acuoso para el caso de las formulaciones con un 55% y un 60% de HA son inferiores a los obtenidos para un 50% de relleno. Este resultado, aparentemente anómalo, lo cual lleva a pensar que el tipo de red tridimensional formada durante el proceso de polimerización es menos densa a mayores contenidos de HA y por tanto el monómero será más fácilmente extraíble en medio acuoso.

Al comparar la dependencia del %DER con los métodos empleados en este estudio observamos que, para el intervalo entre un 40 y un 45% de HA, los valores más bajos se obtienen para el caso de los composites II, lo cual puede explicarse si tenemos en cuenta que la velocidad de polimerización en el segundo tramo, R_p'' (Tabla 13), es superior a las obtenidas por los restantes métodos. Sin embargo, a partir de un 50% de HA los valores de %DER son menores para el caso de los composites III. Hay que tener en cuenta que los composites preparados mediante este método son los más fáciles de manipular, debido a su mayor grado de homogeneidad y/o viscosidad, lo que conlleva a que el proceso de vitrificación en estos materiales se alcance a mayores conversiones que los preparados por los restantes métodos. Este

hecho explica que al cabo de las 24 horas de comenzada la polimerización la conversión de monómero a polímero sea superior en estos composites.

Un análisis de los resultados obtenidos muestra que los altos valores de %DER que se obtienen en el caso de los composites I y II, para altos contenidos de HA, lo cual hace poco recomendable su uso como material de implante, ya que la cantidad de monómero residual que queda en estos composites es elevada y por consiguiente su potencial toxicidad aumenta. Sin embargo, la fotopolimerización del material se llevo a cabo con una intensidad de luz incidente elevada, alrededor de 3 mcal/s, lo cual conlleva una rápida vitrificación de la matriz monomérica, que también aumenta por el alto contenido de carga, y que el espesor de la muestra es superior a los 3 mm, lo que hace que la luz no llegue de forma uniforme a todo el material y por tanto la polimerización no transcurra con igual extensión.

Es por ello, y teniendo en cuenta que en este tipo de materiales uno de los objetivos fundamentales es aumentar el contenido de HA, por sus características de biocompatibilidad y de inducción a la osteointegración del implante al organismo humano, por lo que se recomienda su utilización en situaciones que requieran poca cantidad y/o espesor de material e intensidades de luz incidente menores para que el proceso de conversión sea mayor. Por otra parte, se realizó un estudio de la influencia de la modificación superficial de la HA sobre la conversión. A tal fin, se prepararon composites por el método II utilizando como relleno HA-Cit en el mismo intervalo de porcentajes de carga utilizado anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16.- Determinación del %DER en los composites preparados mediante el método II con HA-Cit.

Contenido de HA (%)	HA		HA-Cit	
	seco	H ₂ O	seco	H ₂ O
40	4 ± 2	5 ± 1	5 ± 4	6 ± 3
45	17 ± 2	19 ± 1	9 ± 3	9 ± 3
50	33 ± 3	22 ± 1	27 ± 3	21 ± 3
55	50 ± 2	14 ± 2	36 ± 3	28 ± 3
60	60 ± 4	16 ± 2	45 ± 3	32 ± 3

Vemos que en todo el intervalo estudiado los valores del %DER son inferiores cuando se utiliza la HA modificada con citrato en medio seco. Estos resultados confirman que tanto la velocidad de polimerización como la homogeneidad y/o viscosidad del medio que se alcanza en los composites preparados con HA modificada son mayores que cuando los obtenidos con HA sin modificar. Es de destacar que cuando analizamos los resultados en medio acuoso los valores obtenidos para un 55% y un 60% de carga son superiores en el caso de la HA-Cit que en sus homólogos, lo cual indica que existe menor migración de material sin polimerizar hacia el medio, debido a una mayor densidad de la red tridimensional formada, así como a la mayor conversión que se alcanza en estos composites.

3.5.3.- Cinética de absorción en suero fisiológico (SBF). Mecanismo de transporte.

Los procesos implicados en la difusión de pequeñas moléculas de solvente en materiales poliméricos pueden tener lugar en prácticamente todas las situaciones en las cuales son utilizados los polímeros. El control de dichos procesos presenta importantes implicaciones tecnológicas, por lo que es necesario describir adecuadamente las propiedades y el comportamiento de estos sistemas.

Es conveniente distinguir situaciones donde el equilibrio final de la cantidad de agente difusor que adquiere la muestra es muy pequeña, tanto que las moléculas del solvente no afectan de forma significativa la organización molecular local, como otras donde la cantidad del solvente induce cambios sustanciales en las propiedades del polímero, de forma que la solución final polímero-solvente es un material completamente diferente al polímero seco inicial.

De forma general, el proceso de hinchamiento en matrices poliméricas está gobernado por la relajación de tensiones de las cadenas, como consecuencia del fenómeno de presión osmótica que tiene lugar durante este proceso¹⁷⁷. Cuando un polímero se sumerge en un solvente, el cual no provoca su disolución, existe exclusivamente una difusión del solvente a la masa del polímero lo cual da lugar a su hinchamiento. El equilibrio de absorción se alcanza cuando la velocidad de difusión del solvente al polímero es igual a la velocidad de difusión del polímero al medio. Este proceso puede durar minutos, días o semanas, en dependencia de la naturaleza química del polímero.

Existen tres clasificaciones del comportamiento de hinchamiento de materiales o matrices poliméricas¹⁷⁸:

- Caso I o comportamiento Fickiano, donde la velocidad de difusión del solvente es mucho más pequeña que las relajaciones estructurales que ocurran en el sistema polímero-solvente. El equilibrio de sorción se alcanza rápidamente independientemente de los enlaces que existan entre el soluto y el solvente.
- Caso II o Supercaso II, como límite del mismo, es el extremo opuesto, la difusión es muy rápida comparada con los procesos de relajación. En estos casos, el proceso de sorción depende fuertemente de la cinética de hinchamiento.
- Comportamiento no Fickiano o anómalo. Se presenta en aquellos casos en los que las velocidades de difusión y de relajación son comparables.

De acuerdo a la literatura sobre el tema, la difusión anómala no Fickiana y el Caso II están relacionadas y son consecuencia directa de la transición vítrea del sistema¹⁷⁹.

El comportamiento no Fickiano o anómalo de difusión de un solvente se puede explicar de la siguiente manera. Cuando un polímero vítreo se sumerge en un solvente, las moléculas de este comienzan a difundirse siguiendo un frente definido a una velocidad determinada. La presencia del solvente provoca tensiones en el material, los cuales se compensan por el aumento del radio de giro y de la distancia extremo-extremo de las moléculas. Este incremento de las dimensiones iniciales es un fenómeno de relajación que no es instantáneo y puede ser descrito como un tiempo de relajación característico. El aumento del radio de giro lleva al hinchamiento del sistema haciendo que la interfase polímero-solvente se mueva hacia el medio, al mismo tiempo que la interfase vítreo-caucho se mueve en dirección opuesta. Esto trae como consecuencia que el espesor de la muestra cambie en el tiempo.

El Caso II se caracteriza por tres factores: (a) un avance nítido del frente del solvente entre la parte del estado vítreo y la parte externa hinchada; (b) en la región hinchada, el gel esta en equilibrio de hinchamiento pero, dado que esta región sufre las constricciones impuestas por

la parte vítrea, el estado de equilibrio mencionado no debe de corresponder al mismo presente en el gel tensionado; (c) la frontera entre el gel hinchado y la parte vítrea avanza a velocidad constante. Como consecuencia, el aumento de peso inicial es directamente proporcional al tiempo.

El comportamiento macroscópico de los sistemas poliméricos se pueden describir a partir de la Ley de Fick de la difusión. Esta ley establece que el flujo del solvente es proporcional al gradiente de su concentración y cuya constante de proporcionalidad es el coeficiente de difusión (D) que, de forma general, es función de la concentración.

El tipo de mecanismo de transporte puede predecirse mediante la ecuación propuesta por Ritger y Peppas¹⁸⁰:

$$\frac{W_t}{W_\infty} = kt^n$$

donde:

W_t = el peso de la muestra hinchada a tiempo t .

W_∞ = el peso de la muestra inicial seca.

k y n = constantes.

Cuando esta expresión se aplica a bajos grados de hinchamiento se obtienen rectas de la representación del gráfico $\ln (W_t/W_\infty)$ vs $\ln t$, y de los valores de su pendiente (n) se estima el comportamiento de hinchamiento de la muestra. Para que exista un comportamiento Fickiano, el valor de n debe oscilar entre 0.45 – 0.5. En el caso de un comportamiento anómalo los valores de n oscilan en el intervalo de 0.5 a 1. Si el valor de n es igual a 1 nos encontramos en el Caso II y si $n > 1$ el comportamiento corresponde al Supercaso II.

En el presente estudio se prepararon composites a partir de un gel con un contenido de CHI del 15% con respecto al monómero y se varió, tanto el contenido y naturaleza del relleno como el método de preparación. El método empleado en la determinación del coeficiente de

difusión en solución de suero fisiológico, SBF, y a una temperatura de 37 °C se describe en el Capítulo IV, sección 4.5.11. El solvente utilizado fue escogido sobre la base de que es uno de los solventes que más se asemeja, en cuanto a composición iónica, a los fluidos que se encuentran en el organismo humano. Cabe señalar que se observó, de forma general, un aumento de la elasticidad y maleabilidad de las muestras sumergidas con el tiempo.

El grado de hidratación de las muestras (H) se determinó midiendo el peso de las muestras cada cinco minutos durante la primera media hora de inmersión, y posteriormente cada treinta minutos hasta el final del experimento (6 horas), de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$H = \frac{W_t - W_o}{W_t}$$

Con el fin de mejorar la comprensión por parte del lector de los resultados obtenidos en este estudio, en la Figura 27, a título de ejemplo, se muestra solamente las curvas de absorción obtenidas en el caso de los composites II preparados con HA sin modificar, ya que los restantes composites presentaban un comportamiento similar.

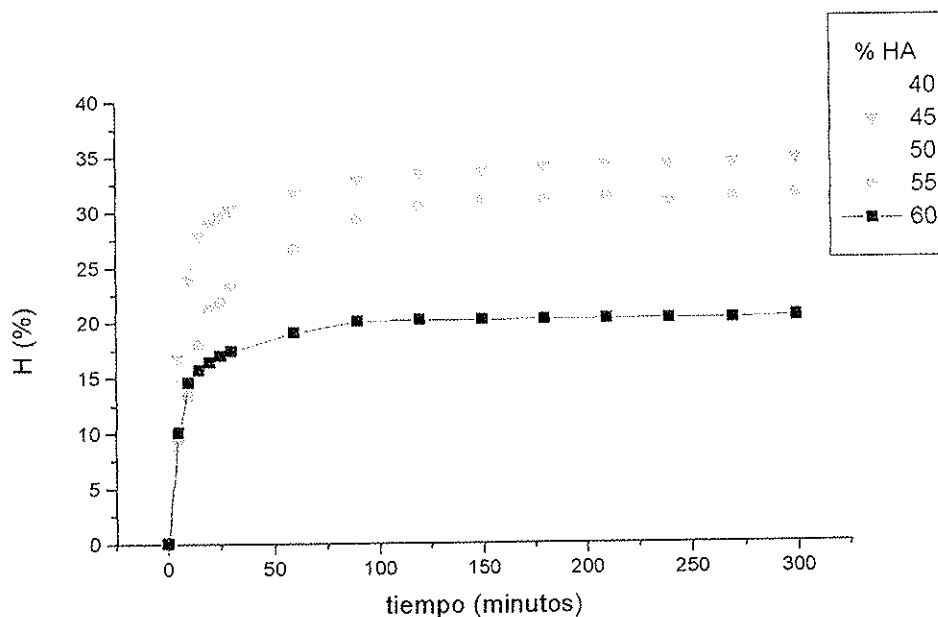


Figura 27.- Curvas de hinchamiento obtenidas en SBF y a una temperatura de 37 °C, para los composites preparados mediante el método II, variando el contenido de carga.

Como podemos observar, la forma de las curvas de absorción obtenidas es similar. Al inicio del experimento, la curva presenta un comportamiento lineal que va desapareciendo a medida que aumenta el tiempo. Este comportamiento está asociado al tiempo que necesitan las cadenas del polímero para responder a la fuerza de hinchamiento y reordenarse para acomodar las moléculas del solvente¹⁸¹. La velocidad de hinchamiento a tiempos cortos es muy alta, lo cual se explica por el gradiente de concentración existente. Este gradiente va disminuyendo con el tiempo y por tanto la velocidad de hinchamiento evoluciona hacia el equilibrio.

Por otra parte, a medida que se aumenta la cantidad de HA en los composites disminuye el valor de H al final del experimento lo cual es de esperar ya que la parte que se hincha en estos composites, masa de gel, disminuye con el aumento del contenido de carga. Se tomo como valor de hinchamiento final (H_{∞}) el obtenido al cabo de las 24 horas, el cual no difería mucho del valor obtenido a las seis horas de comenzado el experimento. En la Figura 28 se muestra la tendencia de los valores de H_{∞} , con el contenido de HA, obtenidos para todos los composites en estudio.

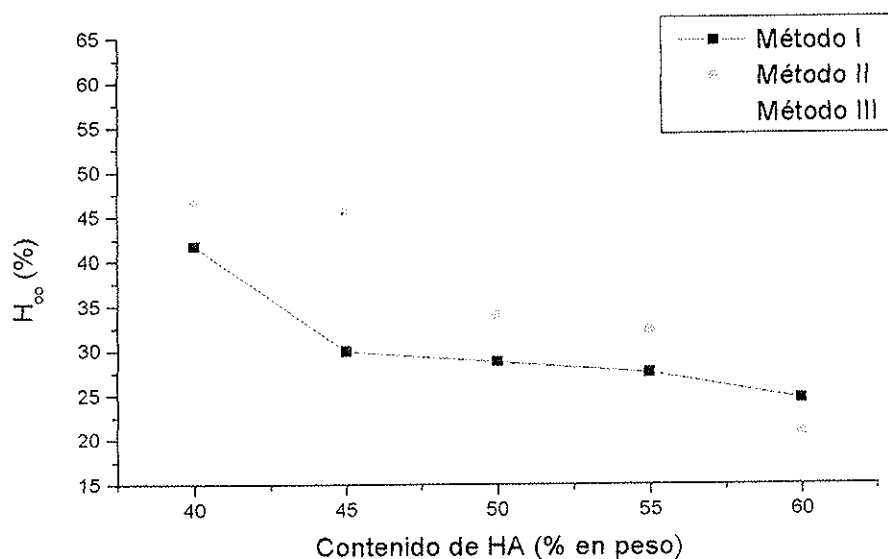


Figura 28.- Grado de hinchamiento en el equilibrio para los composites preparados por los diferentes métodos en estudio y variando el contenido de HA.

Al analizar los resultados para los diferentes métodos de preparación, encontramos que para todo el intervalo de HA estudiado los mayores valores se obtienen para el caso de los

composites preparados mediante el método III. La fase orgánica presente en los composites, geles de CHI/AA, es más homogénea y menos viscosa en el caso del método III, por ello la fase orgánica queda distribuida de forma más uniforme en el composite. Esto hace que la entrada de solvente se vea favorecida en este caso y, por consecuencia, el material absorba mayor cantidad de solvente. Una vez obtenidas las curvas correspondientes a cada contenido de HA, para cada método de preparación, se pasó a determinar los valores de n a través de las ecuaciones descritas anteriormente. Los valores obtenidos se recogen en la Tabla 17.

Tabla 17.- Análisis del mecanismo de transporte presente en los composites preparados variando el contenido de HA.

Contenido de HA (%)	n		
	Método I	Método II	Método III
40	0.49	1.19	0.14
45	0.46	1.12	0.14
50	0.45	0.47	0.12
55	0.45	0.52	0.12
60	0.44	0.13	1.87

Los valores de n obtenidos muestran, de forma general, tendencia a disminuir a medida que aumenta el contenido de carga en los composites, lo que indica que el proceso de difusión de SBF en estos materiales se modifica gradualmente. Un aumento de la rigidez del medio, como consecuencia del incremento de HA, trae consigo que la velocidad del proceso de difusión sea menor que la velocidad de relajación de las cadenas de macromoléculas y que, por tanto, el mecanismo de la difusión se aproxime más a un comportamiento fickiano. Por otra parte, para bajos contenidos en HA, con menor rigidez del medio, el proceso se hace más no-fickiano¹⁸². La aplicación de la Ley de Fick de la difusión unidimensional asume que el coeficiente de difusión (D) del solvente y el espesor del filme (e) permanecen constantes durante todo el proceso de hinchamiento¹⁸³. La ecuación que describe el proceso es la siguiente:

$$\frac{W_t}{W_\infty} = \frac{8}{\pi^2} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{1}{(2n+1)^2} \exp \left\{ - \left[\frac{(2n+1)\pi}{e} \right]^2 Dt \right\}$$

donde W_{∞} es el peso de la muestra en el equilibrio. Para tiempos cortos de hinchamiento, el valor de $n \gg 1$ y la ecuación se simplifica pudiéndose escribir:

$$\frac{W_t}{W_{\infty}} \cong 2 \left(\frac{Dt}{\pi e^2} \right)^{1/2}$$

por lo tanto, el coeficiente de difusión se puede ahora calcular a partir de la pendiente (m) de la curva W_t/W_{∞} vs. $t^{1/2}$, mediante la expresión:

$$D = \frac{m^2 \pi e^2}{4}$$

Algunos autores consideran que el hecho de que el espesor de la muestra sea mucho menor que su ancho o largo mejora los experimentos de sorción¹⁸⁴. Por esta razón se asume, incorrectamente, que el carácter tridimensional del proceso de absorción no juega un papel importante y explican las formas de las curvas obtenidas a través de un modelo unidimensional. La realidad es que debido a la presencia del solvente, durante el proceso de difusión, las diferentes regiones del polímero se hinchan en diferentes extensiones. La elasticidad entre las diferentes regiones permiten alcanzar el estado de equilibrio. Este efecto es inherente al modelo tridimensional, y depende de la geometría de la muestra y determina la extensión y forma de la curva de absorción¹⁸⁵. Es por ello que para el cálculo de D , y teniendo en cuenta que la muestra fue colocada de forma tal que el solvente penetrara por ambas caras, se tomo como espesor de la muestra la mitad de su espesor real. Los valores de D obtenidos para los casos donde n oscila entre 0.4 y 0.5, se recogen en la Tabla 18.

Como podemos observar, el coeficiente de difusión disminuye con el incremento de la cantidad de HA presente en los composites, como era de esperar, ya que la rigidez del medio aumenta disminuyendo el número de moléculas del solvente que pueden introducirse en la matriz del polímero. Por otro lado, los valores de D obtenidos en el caso de los composites II son superiores a sus homólogos del método I, lo cual indica que la matriz polimérica de estos composites es más permeable a la entrada del solvente.

Tabla 18.- Valores de los coeficientes de difusión (D) para lo composites preparados.

Contenido de HA (%)	D (10^{-7} cm ² /s)		
	Método I	Método II	Método III
40	4.7	-	-
45	4.2	-	-
50	4.1	5.4	-
55	3.9	5.1	-
60	3.3	-	-

(-) = no se cumple la Ley de Fick

Por otra parte, para la explicación del comportamiento no-fickiano de parte de las muestras estudiadas, Schott¹⁸⁶ propuso un modelo teórico para describir el comportamiento de hinchamiento de muestras poliméricas rígidas, considerando que la Ley de Fick no es aplicable. Como se ha mencionado anteriormente, la aplicación de la Ley de Fick implica que tanto el coeficiente de difusión como el espesor de la muestra permanecen constantes durante todo el proceso de hinchamiento¹⁸⁷. Sin embargo, para largos períodos de hinchamiento el espesor de las muestras no permanece constante.

Se ha demostrado¹⁸⁸, que para una cinética de hinchamiento de segundo orden, el inverso de la velocidad de hinchamiento (t/W) se relaciona con el tiempo de tratamiento mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{t}{W} = A + Bt$$

los parámetros A y B son dos coeficientes cuyo significado físico puede ser interpretado de la siguiente manera: a tiempos grandes de hinchamiento el valor de $Bt \gg A$ y de acuerdo a la ecuación anterior, $B = 1/W_{\infty}$, es decir, el recíproco del grado de hinchamiento en el equilibrio.

Por el contrario, a tiempos muy cortos de tratamiento, $A \gg Bt$ y en el límite la ecuación se convierte en:

$$\lim_{t \rightarrow 0} \left(\frac{dW}{dt} \right) = \frac{1}{A}$$

por tanto, A es el recíproco de la velocidad inicial de hinchamiento. De forma general, la ecuación de Schott puede representarse de la siguiente forma:

$$\frac{dW}{dt} = K(W_{\infty} - W_t)^2 = \frac{1}{A} \left(\frac{W_{\infty} - W_t}{W_{\infty}} \right)^2$$

Así, la velocidad de hinchamiento de la muestra es de segundo orden con respecto a su capacidad de hincharse en el solvente. En vistas a que no todos los composites preparados se ajustaban al comportamiento fickiano se realizó un ajuste, a través de la ecuación de Schott, de los datos de hinchamiento obtenidos para las muestras preparadas por los diferentes métodos. En la Figura 29 se muestra los resultados obtenidos para el caso de los composites III teniendo en cuenta que el comportamiento fue similar para los métodos restantes.

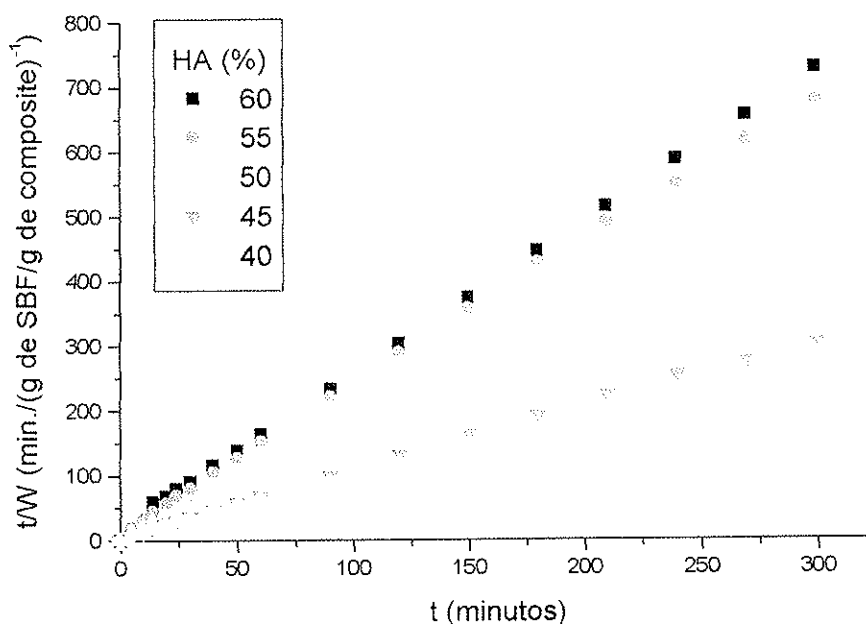


Figura 29.- Representación gráfica de la ecuación de Schott para los composites preparados mediante el método III variando el contenido de HA.

Como podemos observar, el comportamiento de estos composites corresponde a una cinética de segundo orden. Este resultado puede explicarse si tenemos en cuenta que la entrada de solvente en la matriz puede provocar la ruptura de los enlaces secundarios existentes entre las cadenas del polímero formado, PAA, y la quitosana, CHI y, por tanto, permitirá que la red polimérica se expanda y se acomode al flujo de solvente a través de los procesos de relajación que se producen por presión osmótica.

Es de destacar que en el caso de los composites I y II el proceso de hinchamiento sigue una cinética de segundo orden a partir de los primeros 15 minutos de comenzado el proceso por lo que podemos decir que en este tipo de materiales, en un inicio, el comportamiento de hinchamiento se corresponde a una cinética de primer orden o Ley de Fick, y posteriormente el sistema cambia y se ajusta a una cinética de segundo orden o comportamiento de Schott.

Por otro lado, se estudio también la influencia que tendría el tipo de relleno empleado en la cinética de hinchamiento de los composites preparados. Los experimentos se realizaron de idéntica forma, pero solo para el caso de los composites preparados mediante el método II. En la Figura 30 se recogen los resultados obtenidos.

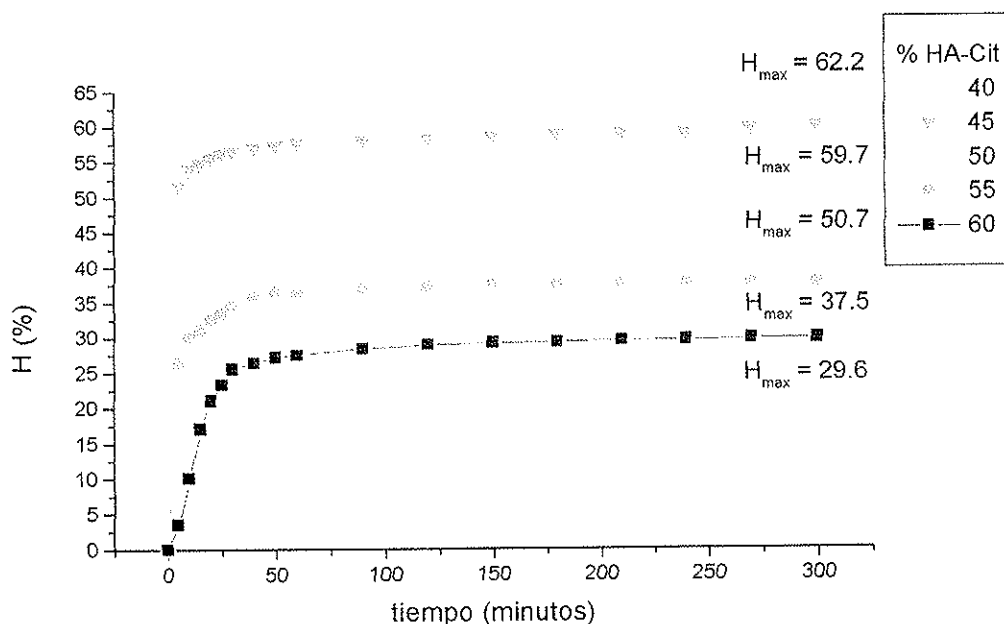


Figura 30.- Cinética de hinchamiento de los composites II preparados con HA-Cit.

Como podemos observar, la forma de las curvas se mantiene igual, pero el grado de hinchamiento máximo presenta valores superiores a los obtenidos para composites preparados con HA sin modificar, para todo el intervalo de contenidos de relleno estudiado. Resultado lógico de esperar debido a que la mayor densidad de la HA-Cit hace que la cantidad en peso de matriz orgánica presente en estos nuevos composites sea superior a la que contienen sus homólogos y, por tanto, la cantidad de solvente que difunde será mayor.

Por otra parte, al analizar los valores de n y D obtenidos (Tabla 19) para estos composites encontramos que las únicas formulaciones que presentan un comportamiento fickiano son aquellas donde el contenido de carga es igual o superior a un 55% en peso, lo cual corrobora que a mayor rigidez del medio el comportamiento de difusión es más fickiano.

Tabla 19.- Valores de n y D para los composites II utilizando como relleno HA-Cit.

Contenido de HA-Cit (%)	n	D (10^{-7} cm ² /s)
40	0.07	-
45	0.10	-
50	0.11	-
55	0.49	6.3
60	0.51	7.9

Es de destacar que cuando se utiliza HA el comportamiento empieza a ser de primer orden a partir de un 50% y pasa a ser anómalo a contenidos de carga igual a un 60%. Por otra parte los valores de D son superiores a los obtenidos para sus homólogos preparados con HA, debido a la mayor cantidad de fase orgánica presente en estas formulaciones.

Se realizó también un ajuste de Schott para estos materiales cuyos resultados se muestran en la Figura 31, observándose un comportamiento similar al obtenido en el caso donde se utiliza como relleno HA sin modificar.

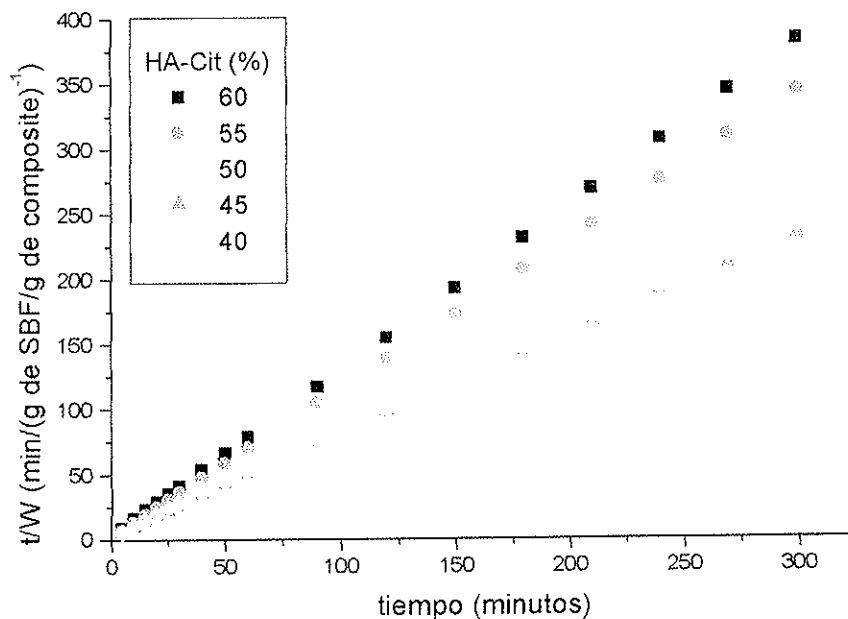


Figura 31.- Comportamiento cinético de segundo orden para los composites II preparados con HA-Cit y variando el contenido de relleno.

En este caso observamos como, para todos los contenidos de relleno estudiados, la cinética de hinchamiento de estos materiales es de segundo orden con respecto al monómero. Como conclusión podemos decir que la introducción de cargas modificadas aumenta el coeficiente de difusión y modifica la cinética de hinchamiento de estos materiales.

3.6.- Propiedades térmicas.

El empleo en la industria de polímeros de cargas inorgánicas como aditivos es una práctica habitual en la obtención de materiales plásticos de utilidad. Las partículas inorgánicas se adicionan a los materiales poliméricos para mejorar algunas de sus propiedades e incrementar su estabilidad térmica, aparte de abaratar su coste. Las propiedades del material resultante se ven afectadas por las propiedades químicas y físicas de sus componentes, así como por la naturaleza de la interacción entre las fases que se forman.

Estudios sobre los materiales de refuerzo en polímeros indican que el esfuerzo es transferido desde la matriz del polímero a las partículas de carga. Las propiedades macroscópicas

de estos composites son función de las propiedades microscópicas de esta interfase. La distribución y la superficie de contacto de la fase dispersa en la matriz del polímero presenta también una gran importancia e influencia sobre las tensiones que se crean en esta interfase. Además de las propiedades químicas y físicas de los componentes del composite, el método de preparación es otro factor que afecta también las propiedades del material final.

Otro de los factores más importantes a la hora de determinar el comportamiento viscoelástico de los composites de matriz polimérica es la adsorción de macromoléculas del polímero sobre la superficie del relleno, así como la adhesión entre la matriz y las inclusiones. La adsorción del polímero sobre las partículas de relleno es la causa de la creación de diferentes conformaciones de las macromoléculas en esa región. El cambio de las formas de las moléculas determina una región, en los alrededores de cada partícula, con diferente estructura y propiedades que la matriz.

De esta manera, la presencia de un relleno en una matriz polimérica da lugar a imperfecciones en la red del polímero. Estas interacciones por adsorción restringen la movilidad segmental y afectan al empaquetamiento molecular en la región de la matriz polimérica que esta en contacto directo con la superficie de la carga. Esta región de enlace se denomina interfase o mesofase, aunque, en realidad puede considerarse como una tercera fase caracterizada por sus propias propiedades¹⁸⁹.

El efecto de la mesofase sobre las propiedades de los composites ha sido objeto de numerosos estudios¹⁹⁰. Una primera aproximación consiste en considerar esta interfase del material como una zona homogénea e isotrópica¹⁹¹, mientras que otros modelos sugieren que es una fase no homogénea¹⁹².

A la hora de cuantificar, el comportamiento y las propiedades térmicas de la interfase, se ha comprobado que dependen, entre otras, de las técnicas experimentales aplicadas en la caracterización y determinación de alguna propiedad en concreto. Asimismo, existen discrepancias en la determinación del efecto de la fracción de relleno sobre la Tg de estos composites. Algunos investigadores han encontrado una relación lineal entre el aumento de esta

temperatura y el aumento del contenido en relleno¹⁹³, mientras otros estudios observan que la temperatura de transición vítrea no se ve afectada apreciablemente por la presencia de relleno¹⁹⁴.

Es de sobra conocido que cuando se calienta o enfría un polímero, tienen lugar ciertos tipos de transiciones, que se reflejan en cambios en las propiedades físicas del material. Una de las transiciones más importantes es la transición vítrea, T_g , considerada como la temperatura a la cual el carácter amorfo del polímero cambia al calentar, de un material rígido a un material elástico, tipo caucho. Esta transición puede explicarse de la siguiente manera: por encima de la temperatura de transición vítrea existe rotación libre de los enlaces dentro de la propia molécula y la energía de agitación térmica, producto de estas rotaciones, es suficiente como para superar las fuerzas de atracción de las moléculas entre sí. Cuando la temperatura es suficientemente baja, la energía de agitación térmica de los segmentos de cadena decae, hasta el punto en que no es suficiente como para superar las fuerzas intramoleculares. Cuando esto sucede, los segmentos de cadena comienzan a “congelarse” en posiciones fijas, como las moléculas en un sólido clásico. Bajo estas condiciones, los cambios en la conformación de las macromoléculas, resultado de la rotación de los enlaces, es suprimida y, por lo tanto, su capacidad de experimentar deformaciones tipo caucho.

Como se ha mencionado anteriormente, algunos autores han estudiado el efecto de la adición de partículas de relleno en matrices poliméricas sobre esta temperatura de transición. En estos trabajos se plantea que, debido a la menor movilidad de las cadenas del polímero en las cercanías de las partículas del relleno, su T_g aumenta, con respecto a la del polímero sin relleno. Medidas realizadas por RMN- H^1 , por otros investigadores, confirman este hecho¹⁹⁵. Además, la formación de una interfase en el área de contacto entre la matriz y el relleno, afecta el comportamiento viscoelástico del composite.

Las propiedades de esta interfase se corresponden directamente con la eficiencia de adhesión entre las dos fases principales, por lo que su influencia sobre los valores de la T_g es importante. Es de suponer que esta interfase del material se caracteriza por una mayor T_g con respecto a la de la matriz, lo cual trae consigo que en la región interfacial, entre la fase orgánica y la inorgánica, la T_g se desplace de igual manera que en mezclas compatibles de polímeros.

Existe una extensa literatura del estudio de la Tg en sistemas compuestos. Manson y Sperling¹⁹⁶ concluyeron que en polímeros con carga los cambios que se producen en la Tg dependen de la naturaleza de la superficie del relleno y de las interacciones que se creen entre las fases presentes. Toussaint¹⁹⁷ clasifica los cambios en la Tg de acuerdo con tres tipos de interacciones: hidrodinámica, adsorción física y absorción química. Estas interacciones desplazan la Tg en dependencia del volumen de la fracción de relleno empleada y de las interacciones físicas y químicas que se producen en este caso. Otro aspecto a tener en cuenta es el área superficial y el tamaño de las partículas empleadas, habiéndose encontrado incrementos de la Tg con la disminución del tamaño de las partículas de relleno para un contenido en volumen constante¹⁹⁸.

En otro orden de cosas, hay que tener en cuenta que a la hora de cuantificar el valor de la Tg, en el caso de las medidas calorimétricas (DSC) o dilatométricas, uno de los factores que afecta al valor obtenido para la temperatura de transición vítrea es la velocidad de calentamiento. Se ha observado¹⁹⁹ que, en dependencia de la velocidad de calentamiento, se han obtenido diferencias de hasta 15 °C respecto de los resultados obtenidos por medidas realizadas por DSC para un mismo polímero.

En este mismo sentido hay que tener en cuenta que cada tipo de técnica empleada en la determinación de la Tg mide un correspondiente movimiento molecular, por lo que los resultados no son comparables en la mayoría de los casos. Un ejemplo de esto lo tenemos en las técnicas de DSC y DMA. Mientras que las medidas dinámicas miden las interacciones entre el polímero y la superficie del relleno, las medidas por DSC detectan las interacciones segmentales de cadena-superficie. Por tanto, es lógico de esperar que los valores de Tg obtenidos por DMA sean superiores a los obtenidos por DSC.

3.6.1.- Análisis termogravimétrico.

En este estudio se analizó el comportamiento térmico de los composites preparados mediante el método II al variar el contenido de relleno y su naturaleza. Los resultados obtenidos se analizaron tomando como referencia los resultados obtenidos previamente para los geles. En este caso, las muestras para el análisis se prepararon en un molde de teflón con un espesor de 2

mm e irradiando durante 1 minuto por cada cara del molde, a través de cristales de cuarzo de 0.5 mm, con una lámpara de luz visible Visilux 2, 3M, con una intensidad de luz incidente de 3 mcal/s. Posteriormente, las muestras se colocaron en un desecador a vacío durante 24 horas antes de comenzar el análisis. Primeramente, se obtuvieron los termogramas de los rellenos utilizados en este estudio, HA e HA-Cit., así como del correspondiente agente funcionalizante, citrato trisódico dihidratado. En la Figura 32 y Tabla 20 se muestran los resultados obtenidos para estos tres componentes.

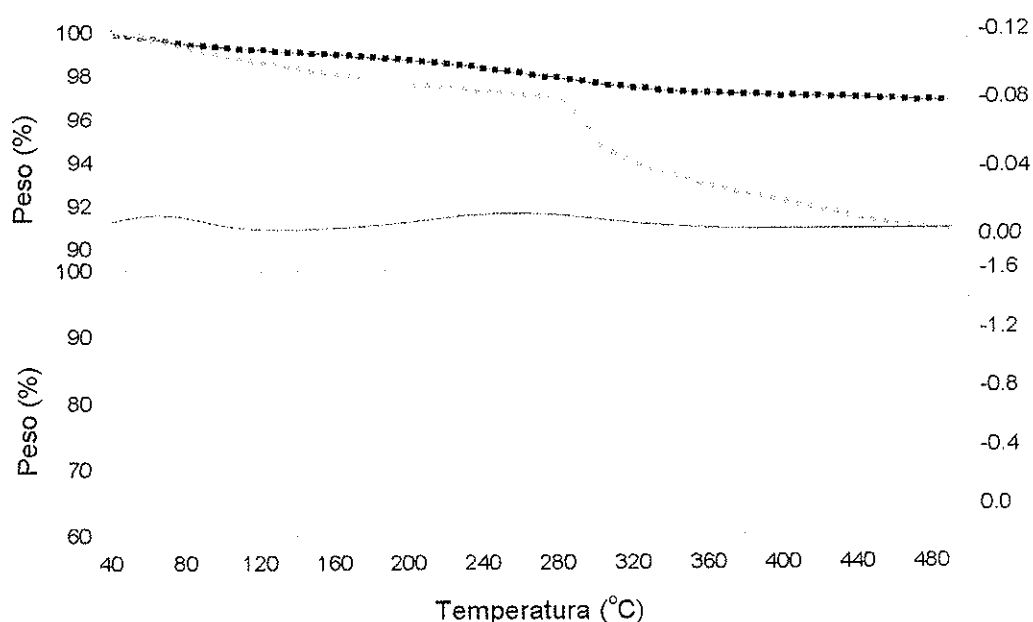


Figura 32.- Termogramas de los rellenos y el agente funcionalizante empleado.

(.....) HA () HA-Cit. () Citrato trisódico.

Como podemos observar, el termograma de la HA sin modificar presenta dos máximos en su derivada, el primero (I) ubicado en los 64 °C, assignable a la pérdida de agua residual²⁰⁰ y el segundo (II) en los 255 °C, que corresponde a la disociación del ión HPO_4^{2-} , presente en el cristal de la HA, en $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ y liberando agua²⁰¹. En el caso de HA-Cit. observamos también dos máximos en la derivada, el primero (I) en los 70 °C, que se le asigna también a la pérdida de agua residual y el segundo máximo (II) en los 293 °C, que se considera una mezcla de la disociación del ion HPO_4^{2-} y parte del agente funcionalizante que se encuentra sobre la superficie del relleno. Por otra parte, la pérdida en peso total de la HA-Cit., hasta el valor de temperatura

estudiado, es superior al que presenta la HA sin modificar, lo cual confirma los resultados obtenidos en las medidas realizadas por FTIR y UV.

Tabla 20.- Datos obtenidos del análisis de ambos rellenos y del agente funcionalizante.

Muestras	Temperatura de pérdida (Td) y Pérdida de peso (Ppeso)	
	Td (°C)	Ppeso (%)
HA	64; 255	3.3
HA-Cit	70; 293	9.6
Citrato trisódico dihidratado	183; 327; 486	36.7

Al analizar los resultados obtenidos para el agente funcionalizante encontramos que se detectan tres máximos en su derivada. Al primer escalón de pérdida (I) en los 183 °C, se le asigna a la pérdida de agua de hidratación. El segundo escalón (II), ubicado en los 327 °C es el correspondiente a la pérdida de agua intramolecular, con la consiguiente formación de la sal trisódica del ácido 1,2,3-carboxi-propenoico. Este máximo, que es característico de la molécula del agente funcionalizante empleado, se corresponde con el análisis realizado para la carga modificada descrito anteriormente. El tercer máximo de la derivada (III) se encuentra en 486 °C y se le asigna a la pérdida de CO₂ correspondiente al proceso de degradación de la molécula orgánica. En la Figura 33 se muestra el esquema de degradación descrito:

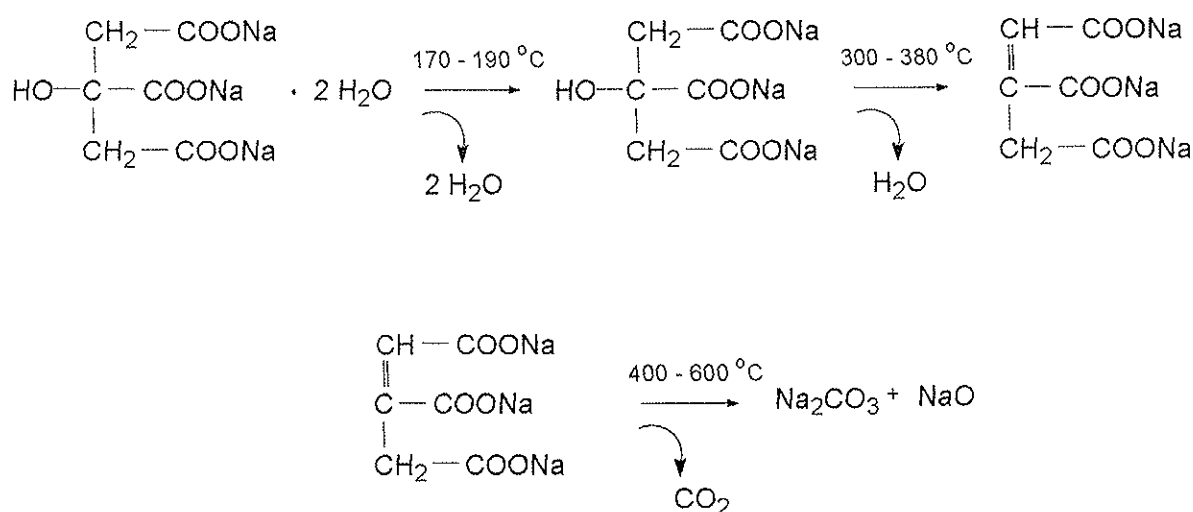


Figura 33.- Esquema de degradación de la sal de sodio del ácido cítrico.

Tomando estos resultados como referencia, se analizaron los composites preparados variando el contenido y naturaleza del relleno. Los termogramas obtenidos, para el caso de los composites con HA sin modificar, se muestran en la Figura 34 para porcentajes de relleno del 40% y del 60%. Los resultados para todos los contenidos estudiados, se recogen en la Tabla 21.

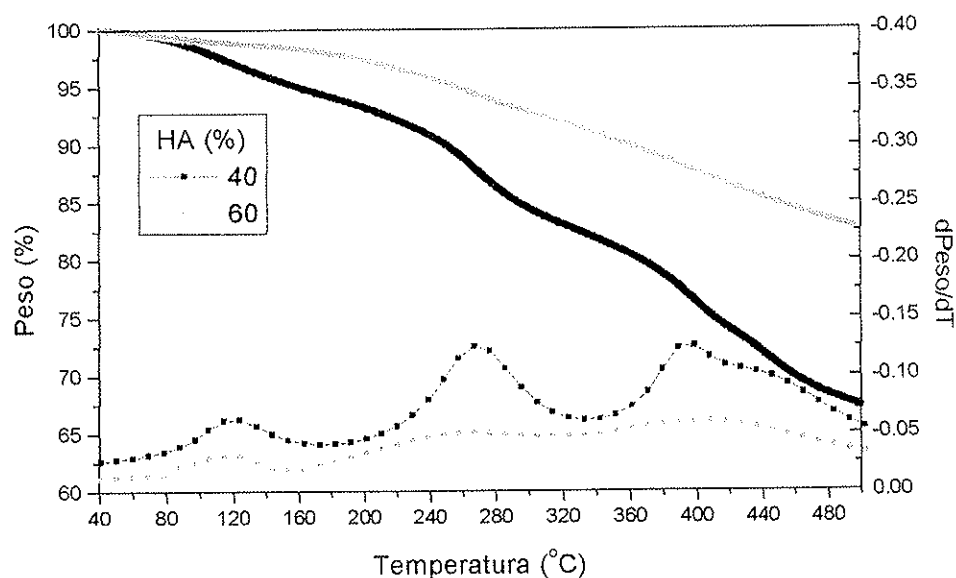


Figura 34.- Termogramas obtenidos, con sus derivadas, para los composites con HA sin modificar.

Tabla 21.- Resultados del análisis termogravimétrico realizado a los composites analizados.

% HA	Temperatura de pérdida (Td) y Pérdida de peso (Ppeso)	
	Td (°C)	Ppeso (%)
40	114; 268; 395; 444	32.8
45	114; 278; 408; 455	35.1
50	114; 280; 408; 457	24.0
55	114; 277; 427; 457	23.8
60	114; 261; 404; 465	17.5

Estos resultados parecen indicar que a medida que aumentamos la cantidad de relleno en los composites, los valores correspondientes a la pérdida de peso tienden a disminuir, lo cual es lógico de esperar ya que disminuye la proporción de fase orgánica presente, que es la que experimenta las pérdidas en peso en el intervalo de temperaturas de estudio. Asimismo, en todos los casos se obtienen cuatro máximos en la derivada de los correspondientes termogramas que a continuación comentaremos.

El primer máximo (I) se ubica en los 114 °C y permanece constante para todos los composites preparados. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente para los componentes de estos composites podemos decir que este máximo corresponde a la pérdida de agua durante el proceso de deshidratación de HA. El segundo máximo (II), en el intervalo de los 260–280 °C, es asignable a varios procesos que ocurren simultáneamente: la pérdida de agua por parte del complejo CHI^+PAA presente en los geles, con la correspondiente formación de amida; al proceso de desacetilación por parte de la CHI, que puede quedar sin injertar en el PAA de la matriz y a la pérdida de agua de constitución de la HA. El tercer máximo (III), en el intervalo de 395–427 °C, es el correspondiente a la degradación del PAA de la matriz orgánica con formación de anhídrido y el cuarto máximo (IV), en el intervalo de 440–465 °C, corresponde a la degradación del PAA por ruptura de cadena y formación de residuos cíclicos, tal y como se ha discutido en la sección de geles.

Es de destacar como a medida que se aumenta el contenido de HA en estos composites, desde un 40 a un 55% en peso, los máximos de las derivadas se desplazaban a temperaturas más altas, lo cual indica que la estabilidad térmica de estos materiales se incrementa con el aumento de carga. Sin embargo, para un 60% de HA, a excepción del primero y del último escalón de pérdida, los demás se encuentran a temperaturas inferiores que los composites con menos carga, lo cual puede explicarse si tenemos en cuenta que durante la preparación de los composites con altos contenidos de carga, se observó una disminución de la homogeneidad del material final, por lo que es de esperar que, las interacciones entre la parte orgánica y la inorgánica disminuyan.

Por otra parte, y con el objetivo de analizar el efecto sobre el comportamiento térmico y de degradación de los composites al variar la naturaleza de la carga empleada, en la Figura 35 y Tabla 22 se recogen los resultados obtenidos para el caso de los composites preparados con HA-

Cit. Hay que señalar que se siguió el mismo proceso de preparación que el empleado en el caso de la HA sin modificar.

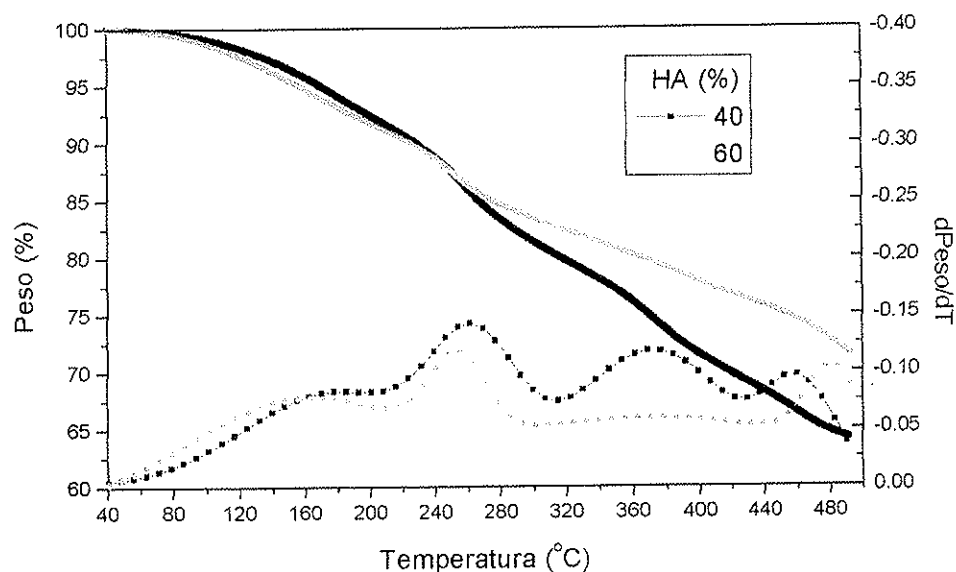


Figura 35.- Termogramas obtenidos, con sus derivadas, para los composites con HA-Cit.

Tabla 22.- Resultados del análisis termogravimétrico realizado a los composites preparados con HA-Cit.

% HA-Cit.	Temperatura de pérdida (Td) y Pérdida de peso (Ppeso)	
	Td (°C)	Ppeso (%)
40	178; 261; 368; 460	35.9
45	155; 247; 400; 468	33.9
50	147; 270; 400; 476	32.4
55	168; 262; 407; 484	32.1
60	163; 255; 377; 477	28.6

Como podemos observar, se mantiene la misma tendencia, en cuanto a la pérdida de peso con el aumento del contenido de relleno, que en los homólogos preparados con HA sin modificar. Sin embargo, en todos los casos, el porcentaje de pérdida es superior cuando se utiliza

HA-Cit. Este hecho esta en concordancia con los resultados obtenidos en el análisis de los rellenos por separado, donde encontramos que HA-Cit. perdía un 6.3% más que la HA de partida, atribuible a la parte orgánica correspondiente a la modificación. Además, el hecho de que el relleno modificado utilizado presente una menor densidad que la HA sin modificar también influye en la pérdida de parte orgánica del composite al encontrarse mayor cantidad, en volumen, del gel utilizado como soporte o matriz.

Por otra parte, también se observa la presencia en los termogramas de cuatro máximos en la derivada. Los primeros máximos se asignan de igual forma que en los composites preparados con HA sin modificar. El tercer máximo (III), ubicado en el intervalo que oscila entre los 368-407 °C, corresponde con las pérdidas de agua de constitución del agente funcionalizante y comienzo de la degradación del PAA. El cuarto máximo (IV), en los 460-484 °C, aparece rápidamente después de la tercera pérdida y se le asigna a los productos de degradación térmica, tanto del PAA como de la parte correspondiente al agente funcionalizante.

Como conclusión de este apartado podemos decir que la adición de HA, modificada y sin modificar, aumenta la estabilidad térmica de la parte orgánica de estos composites, con aumento de las temperaturas a las cuales se producen los procesos de degradación de la parte orgánica. Este hecho demuestra que existen interacciones químicas entre la fase orgánica y la inorgánica, posiblemente entre los iones calcio de la HA y los iones carboxilos del PAA. Además, se confirma que la modificación superficial de la HA, mediante agentes con iones carboxílicos en su estructura, mejora su estabilidad térmica, ya que en los composites con relleno modificado los valores de temperatura obtenidos son superiores a los que presentan los preparados con HA sin modificar. Si tenemos en cuenta que la modificación superficial de la HA aumenta la cantidad de interfase o mesofase presente en estos materiales, los procesos térmicos degradativos de la matriz orgánica se ven afectados por la presencia de esta nueva fase, aumentando el valor de las temperaturas de degradación.

3.6.2.- Determinación de la temperatura de transición vítrea (Tg).

Como se ha mencionado anteriormente, la presencia en los composites de una tercera fase, aparte de la orgánica e inorgánica (en este caso, los geles de CHI/AA y la HA modificada y

sin modificar respectivamente), es de esperar que influya significativamente sobre la temperatura de transición vítrea, Tg. De manera general, como ya se mencionó anteriormente, la presencia de un relleno en una matriz polimérica incrementa la Tg de la misma, debido a la disminución de la movilidad de las cadenas en la vecindad de las partículas del relleno. Sin embargo, el aumento de la cantidad de fase inorgánica conlleva frecuentemente a resultados aparentemente contradictorios.

Es conocido que la viscosidad de la interfase es superior a la de la matriz. Este hecho trae como consecuencia que el valor de la Tg correspondiente a esta mesofase sea superior a los que presente la matriz orgánica. Por otro lado, cuando el espesor de la interfase creada se incrementa, el valor de la Tg tienden a aumentar siempre y cuando existan interacciones entre el relleno y la parte orgánica. Cuando esta interacción no existe, los valores correspondientes de Tg no sufren variación alguna con el incremento de la carga²⁰².

Como señalamos anteriormente, es sabido que en dependencia del método empleado en la determinación de la temperatura de transición vítrea los valores obtenidos sufren variaciones, es por ello que, en este trabajo se estudió la dependencia de la Tg con el aumento del contenido de relleno y su naturaleza, mediante determinaciones por Calorimetría Diferencial del Barrido (DSC) y Análisis Dinamo-Mecánico (DMA).

3.6.2.1.- Medidas calorimétricas (DSC).

El estudio de los valores de Tg de los composites mediante la técnica de DSC se describe en el Capítulo V, sección 5.5.9. En este trabajo solo se estudiaron los composites preparados mediante el método II utilizando HA sin modificar e HA-Cit. y variando su contenido. Las muestras se prepararon en moldes cilíndricos de vidrio con dimensiones de 5 mm de diámetro y 5 mm de altura. Una vez relleno el molde se procedió a su irradiación, utilizando una lámpara de luz Visible Visilux2 3M, a una longitud de onda de 480 nm y una intensidad de luz incidente de 3 mcal/s, durante 1 minuto por cada cara del cilindro a través de cristales de cuarzo de 0.5 mm de espesor. Posteriormente el material se colocó en un desecador a vacío durante 24 horas a una temperatura de 37 °C para eliminar la mayor parte del agua residual que queda en el composite. En la Figura 36 y Tabla 23 se recogen los resultados obtenidos en este estudio.

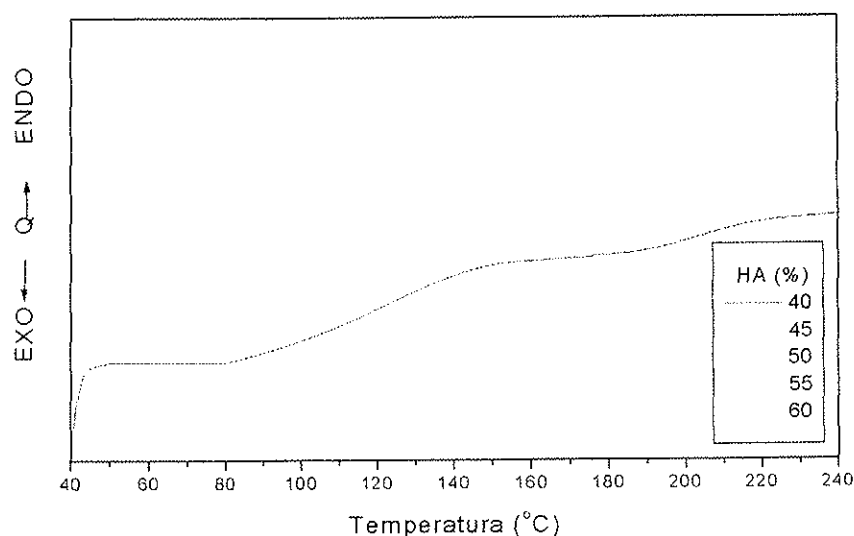


Figura 36.- Termogramas DSC de los composites preparados mediante el método II y variando el contenido de HA.

Como podemos observar, en todos los termogramas obtenidos se muestran dos transiciones endotérmicas hacia 115-126 °C y 205-206 °C. Mientras que la segunda, ubicada en los 206 °C, permanece invariable con el aumento del contenido de relleno, la primera se desplaza a mayores temperaturas con el aumento de este en la región comprendida entre 115 °C y 126 °C, para porcentajes de relleno desde un 40% a 55% de HA. A mayores contenidos, 55 y 60%, la transición permanece constante en 126 °C.

Tabla 23.- Resultados de la determinación de la Tg de los composites preparados con HA.

Contenido de HA (%)	Tg (°C)
40	115; 205
45	119; 206
50	122; 206
55	126; 206
60	126; 206

El error en la determinación es de ± 2 °C

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos para el caso de los geles, la primera transición se corresponde a la Tg del PAA libre que se encuentra en la matriz. Los valores son superiores a la Tg obtenida en el caso del gel de partida (110 °C), lo cual puede explicarse por la mayor rigidez que se alcanza en el medio al introducir la carga.

Por otra parte, las interacciones que se producen entre el PAA y la HA, en la superficie de las partículas, condiciona que las cadenas del polímero tengan menor movilidad en los composites que en la matriz sin rellenar y, por tanto, los valores de la Tg sean superiores, lo cual confirma los resultados obtenidos en el análisis termogravimétrico.

Al ir introduciendo más carga en los composites, la movilidad de las cadenas del polímero ira disminuyendo gradualmente debido a la rigidez que alcanza el medio. Así, en el intervalo entre un 40 y un 55% de HA, tanto la rigidez del medio como la extensión de las interacciones entre el PAA y la HA van aumentando, lo cual conduce a un aumento de la temperatura de esta transición. Para un contenido de carga del 55%, puede considerarse que prácticamente toda la matriz orgánica esta formando parte de la interfase, e incluso que parte de la carga no queda “atrapada” por la red conformada por la matriz, por lo que el valor de la Tg permanece invariable al seguir aumentando el contenido en carga (60%).

La segunda transición, ubicada en los 205-206 °C, en principio pensamos que correspondía al complejo CHI^+PAA que se encuentra en el gel de partida y cuya temperatura de transición, en el gel sin carga, es de 168 °C. Este salto brusco de temperatura, que en principio podría explicarse sobre la base de un aumento de la rigidez del medio al incorporar la carga, no parecía ser muy consistente, ya que dicha temperatura permanece constante, independientemente de la proporción de la carga empleada (ver Tabla 23). Sin embargo, si tenemos presente los resultados del análisis termogravimétrico, obtenidos anteriormente, todo parece indicar que la Tg que se aprecia en los termogramas corresponde a la amida que se forma en la matriz, a partir del complejo CHI^+PAA , producto del aumento de temperatura. El hecho de que el valor de Tg no varíe, con el aumento del contenido de HA, se debe a que no existen interacciones entre este compuesto y la carga, ya que todos los grupos carboxilos del PAA están enlazados a los grupos amino de la quitosana.

Al variar la naturaleza de la carga inorgánica empleada, utilizando HA-Cit., cuyos resultados se recogen en la Tabla 24, se observó un comportamiento similar al obtenido para la HA sin modificar.

Tabla 24.- Valores de la Tg de los composites preparados con HA-Cit.

Contenido de HA-Cit. (%)	Tg (°C)
40	117; 207
45	120; 207
50	126; 207
55	127; 208
60	127; 208

El error en la determinación es de $\pm 2^{\circ}\text{C}$

La transición vítrea correspondiente al PAA libre en este sistema se encuentra a temperaturas ligeramente superiores a sus homologas sin modificar, lo cual confirma lo explicado anteriormente con respecto a la influencia de la interfase sobre la temperatura de transición vítrea de los composites. En estos nuevos composites las interacciones que existen en la interfase son más fuertes que las presentes en los composites con HA sin modificar, debido al efecto de compatibilización que produce el proceso de organofilización al cual es sometida la superficie de la HA; por lo tanto, existe una mayor compatibilidad y enlace entre la parte orgánica y la carga inorgánica presente. Estas interacciones conllevan a que la movilidad de las cadenas del polímero se vean aún más constreñidas en su movilidad y la temperatura a la cual pueden superar este impedimento sean superiores.

3.6.2.2.- Medidas dinamomecánicas (DMA).

De forma genérica, se consideran como propiedades dinamomecánicas (DMA) aquellas propiedades que presentan los materiales bajo una deformación periódica. La investigación de los diferentes parámetros dinámicos en un amplio intervalo de temperaturas y frecuencias es de especial interés en el estudio estructural de polímeros y de las variaciones de las propiedades que estos presentan en relación con sus condiciones de empleo. Estos parámetros dinámicos pueden

ser utilizados para determinar la región de transición térmica, el espectro de relajación, el grado de cristalinidad, la orientación molecular, el entrecruzamiento, las separaciones de fases, así como la composición química de mezclas de polímeros, polímeros injertados y copolímeros²⁰³. En adición a estas relaciones estructura-propiedad, los estudios dinamomecánicos han sido extendidos al campo de los composites²⁰⁴.

Las propiedades dinamomecánicas de composites vienen condicionadas por las propiedades que presenten sus componentes por separado, la morfología del sistema y la naturaleza de la interfase que se crea entre ellos. Asimismo, una gran variedad de propiedades pueden medirse a través de la variación de la estructura del sistema o de las características de la interfase. Esta última presenta una característica importante, como es el grado de adhesión por enlace entre las fases presentes²⁰⁵.

Es de destacar que en el caso que nos ocupa, composites para uso como material de implante en organismos vivos, las medidas realizadas por DMA nos pueden ofrecer una visión del comportamiento del material bajo los esfuerzos cíclicos que se generan en el cuerpo humano en movimiento. Un material ideal para este tipo de aplicación será aquel cuyas propiedades correspondan a las del tejido que va a reemplazar y, por supuesto, que presente un buen comportamiento frente a la degradación y al mismo tiempo, de biocompatibilidad²⁰⁶.

En el análisis dinamomecánico las relajaciones se estudian a través del comportamiento de tres parámetros: el componente elástico, denominado módulo de almacenamiento (E'), otro viscoso denominado módulo de pérdida (E''), y el cociente entre la energía disipada y la energía almacenada, al que se le denomina tangente de pérdida y se simboliza como $\tan \delta$. El módulo de pérdida tiene un máximo cerca de los valores de la T_g y está un poco por debajo del valor de temperatura que le corresponde al máximo de la tangente de pérdida. El módulo de almacenamiento tiene un punto de inflexión en la curva vs. temperatura.

Estudios del efecto de rellenos rígidos en este tipo de propiedades en diversas matrices indican que el módulo de almacenamiento (E') aumenta con el contenido de carga. El aumento del valor de estos parámetros nos da, pues, una medida directa acerca de la rigidez que se alcanza

en los materiales y, además, nos ofrece una visión de la heterogeneidad y morfología de las muestras en estudio²⁰⁷.

El efecto más pronunciado de la inclusión de rellenos sobre los valores de la $\tan \delta$ es el de ensanchamiento de la región de transición para altos contenidos en relleno. En algunos casos, la presencia de relleno desplaza la $\tan \delta$, correspondiente a la T_g a mayores temperaturas. Este resultado puede explicarse como resultado del rozamiento que se genera entre el polímero y las partículas, incrementándose con el contenido y el tamaño de las partículas utilizadas como relleno²⁰⁸.

Otros estudios demuestran que la aparición de nuevos procesos de relajación en la tangente de pérdida de materiales compuestos, a temperaturas inferiores que un homólogo con menor cantidad de relleno, es una consecuencia de procesos de escisión o de procesos de degradación que pueden ocurrir en la fracción molecular de la parte orgánica, por lo que podemos decir que el DMA es una técnica que permite detectar procesos degradativos²⁰⁹.

En el presente estudio por DMA solo se tomaron los composites preparados con HA sin modificar, ya que se trataba de verificar si esta técnica era válida en la determinación de los procesos de transición térmica observados mediante DSC, así como analizar sus posibilidades a la hora de obtener información sobre el comportamiento mecánico del material bajo condiciones de esfuerzos cíclicos similares a las que puede estar sometido en el organismo humano.

El procedimiento seguido para la realización de este ensayo se recoge en el Capítulo IV sección 4.5.8. Las muestras fueron preparadas en un molde rectangular de dimensiones 30 x 10 x 1 mm mediante la irradiación, con un lámpara de luz Visible Visilux2 3M, a una longitud de onda de 480 nm y una intensidad de luz incidente de 3 mcal/s, durante 1 minuto por cada cara del molde, igualmente a través de cristales de cuarzo de 0.5 mm de espesor. Es de destacar, que antes de realizar las mediciones, las muestras fueron sometidas a un proceso de secado exhaustivo, en un desecador a vacío y a una temperatura de 37 °C, hasta que alcanzaron peso constante. En la Figura 37 se muestran los resultados obtenidos para los composites preparados mediante el método II y variando el contenido de HA.

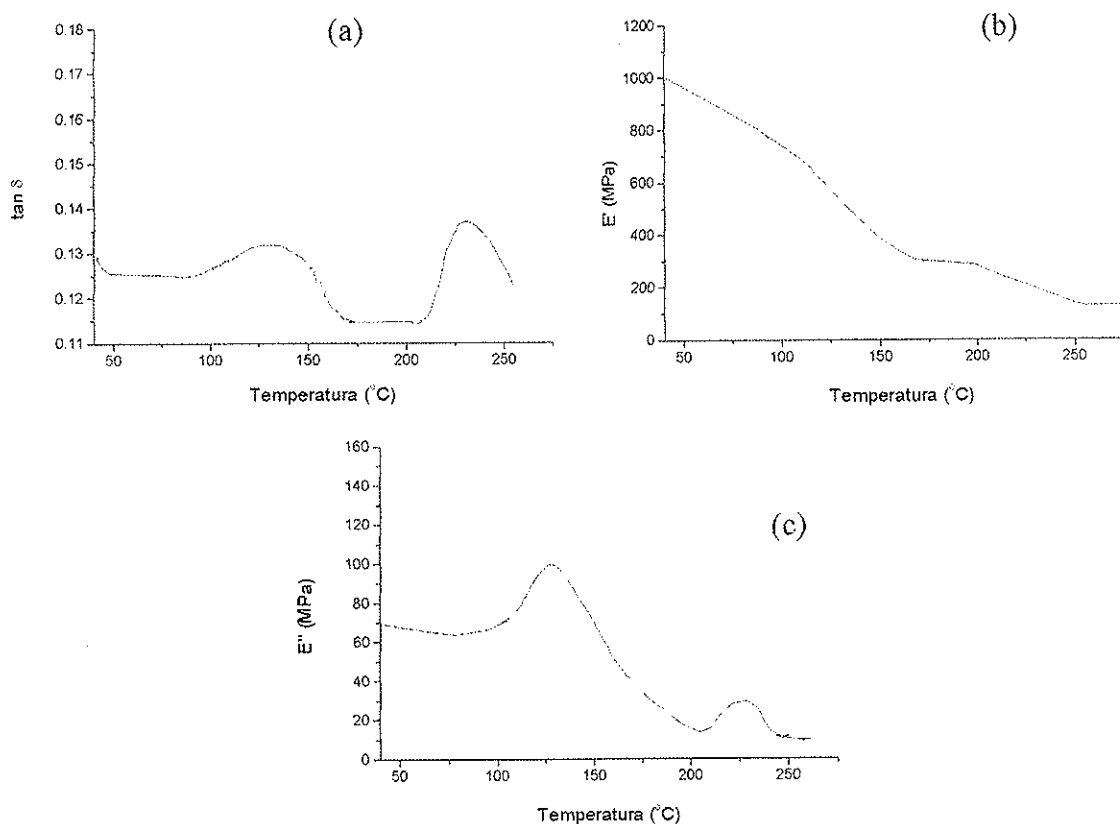


Figura 37.- Comportamiento de las relajaciones encontradas para los composites en estudio variando el contenido de carga presente.

(.....) 40% (---) 45% (—) 50% (---) 55% (-.-.-) 60% en peso de HA.

De las gráficas mostradas podemos decir que, en el intervalo de temperaturas en estudio y a la frecuencia de 1 Hz, los composites de HA presentan dos procesos de relajación. Ambos procesos están relacionados con el comportamiento viscoelástico que presentan estos materiales con la temperatura. En la Figura 64a se observan dos máximos en la tangente de pérdida ($\tan \delta$), el primero máximo oscila en el intervalo entre los 130 y los 142 °C, para los contenidos de relleno en estudio y el segundo máximo permanece inalterable en los 230 °C.

Ambas transiciones se corresponden con los valores de T_g obtenidos en el estudio calorimétrico para el PAA libre presente en el sistema y para la amida producto de la deshidratación del complejo que este forma con la CHI respectivamente. Por otra parte, en la literatura se recogen valores para la transición vítrea del PAA en ensayos mediante DMA de 131

y 135 °C para frecuencias de oscilación de 1 Hz y 3 Hz respectivamente²¹⁰. Este comportamiento corrobora que el incremento del contenido de relleno conlleva a un aumento de los valores de la Tg y, por lo tanto, a un desplazamiento hacia mayores temperaturas del máximo de la $\tan \delta$. Además, se observa un ensanchamiento de esta banda, en la zona de transición, a mayores contenidos de HA lo cual es característica intrínseca de la técnica empleada. El hecho de que para un 40% de HA la Tg del PAA encontrada sea ligeramente inferior a la del PAA sin relleno, se puede explicar si tenemos en cuenta el efecto plastificante del agua presente en estos composites, que al parecer es superior al efecto que ejerce la carga sobre la transición térmica correspondiente.

Por otra parte, al analizar las Figuras 64b y 64c, donde se muestra la dependencia del módulo de almacenamiento (E'), y del módulo de pérdida (E''), con el incremento del contenido de relleno encontramos que, de forma general, el comportamiento es similar al de la $\tan \delta$. Es de destacar, que para el caso del E' , la variación observada en el punto de inflexión es muy pequeña con respecto a los máximos que se obtienen en el caso del E'' , siendo este último el que mayor fiabilidad ofrece a la hora de determinar la temperatura de transición correspondiente. En la Tabla 25 se recogen los valores de la Tg obtenidas a través de los diferentes parámetros. En todos los casos, los valores obtenidos son superiores a los que se obtienen mediante la técnica de DSC, lo cual esta acorde con los resultados que se recogen en la literatura²¹¹.

Tabla 25.- Valores de la Tg de los composites preparados mediante DMA con la variación del contenido de relleno.

Contenido de HA (%)	Tg (°C)		
	E'	E''	$\tan \delta$
40	130; 229	128; 226	130; 230
45	134; 229	130; 228	134; 230
50	138; 230	135; 228	138; 230
55	142; 230	140; 228	142; 230
60	142; 230	140; 228	142; 230

El error en la determinación es de ± 2 °C

Por otra parte, a medida que se aumenta el contenido de HA presente en estos materiales se puede observar un incremento en el valor de ambos módulos, lo cual es una medida de la mayor rigidez que alcanzan estos composites cuando el porcentaje de relleno aumenta. Los resultados obtenidos para ambos parámetros en el primer máximo de la $\tan \delta$, dentro el intervalo de temperatura estudiado, se muestran en la Figura 38.

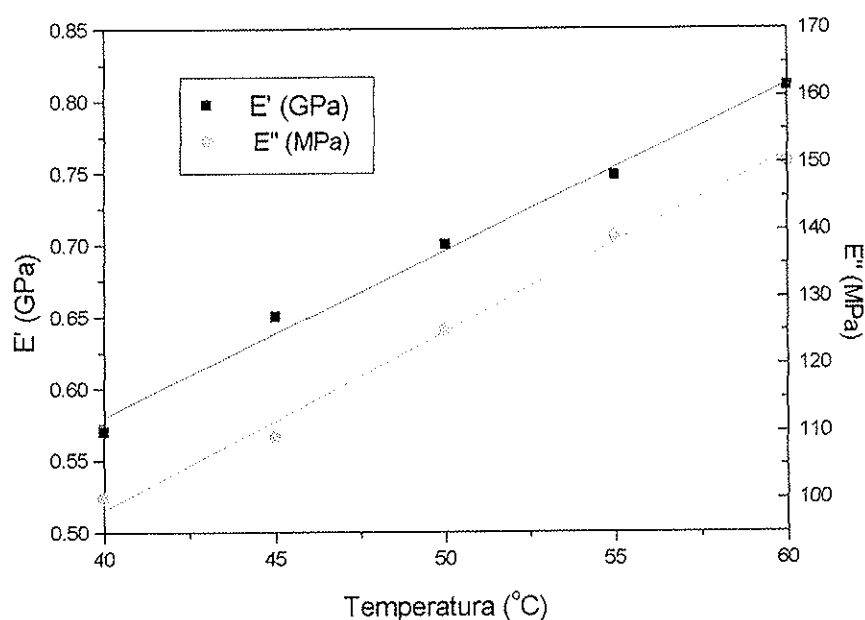


Figura 38.- Dependencia del E' y de E'' de los composites de HA con la variación del contenido de relleno.

Estos resultados confirman que la incorporación de relleno a estos materiales aumenta la temperatura de transición vítrea del PAA presente en la fase orgánica y no afecta a la transición del complejo interpolimérico de la membrana interpenetrada que actúa como matriz. En este mismo sentido, la rigidez del medio aumenta progresivamente, lo que afecta proporcionalmente a los módulos correspondientes. Esto indica claramente que la técnica de DMA puede ser utilizada en la caracterización, en cuanto a transiciones térmicas y propiedades mecánicas, de los biomateriales compuestos aquí estudiados.

3.7.- Propiedades mecánicas.

Las propiedades mecánicas de los materiales compuestos dependen, fundamentalmente, del grado de homogeneidad que se alcance al mezclar la carga inorgánica y la matriz orgánica y a la naturaleza y extensión de la interfase que se cree entre estas dos fases²¹². La incorporación de diferentes tipos de relleno: fibras, partículas, plastificantes, producen materiales con unas particulares propiedades térmicas y mecánicas. La versatilidad que se alcanza con estos composites en cuanto a flexibilidad, resistencia y módulo, bajo los diferentes tipos de ensayo, hacen que estos materiales presenten mejores propiedades que algunos metales. Las aplicaciones de estos materiales han llegado a ser orientadas hasta con fines militares e incluso espaciales y su mercado ha experimentado una espectacular expansión durante los últimos años.

Si se tiene en cuenta que en los composites preexisten grietas, distribuidas aleatoriamente en orientación, tamaño y número, entonces, para un esfuerzo dado existe la probabilidad de que una de esas grietas se propague de forma catastrófica y se rompa el material. A temperatura ambiente, a este proceso se le denomina crecimiento subcrítico de grietas. El origen de la fractura no proviene necesariamente de la zona sometida a mayor tensión, sino que depende del nivel de tensión y del tamaño, orientación y número de grietas. Por este motivo, una misma estructura (probeta) puede romperse bajo diferentes cargas.

Otro aspecto a tener en cuenta son las interacciones que se pueden generar entre la matriz orgánica y el relleno que se incorpora. A mayor número de interacciones que se generen, la compatibilidad entre ambas fases tiende a aumentar y el número de intersticios o defectos que se crean en el material son inferiores a cuando no existen dichas interacciones, lo cual trae consigo el aumento de algunas propiedades mecánicas, lo que a su vez pone en evidencia la importancia que tienen estas interacciones.

En materiales que polimerizan mediante la luz visible hay que tener en cuenta otros aspectos. Los fenómenos de refracción y reflexión de la luz incidente, como consecuencia de la presencia de partículas de relleno, afectan de manera directa al grado de polimerización que alcanza la matriz orgánica. A medida que se adiciona relleno a una matriz el camino óptico se incrementa, debido al efecto dispersión de la luz mencionado en otras secciones de este trabajo,

por lo que la conversión aumenta. Sin embargo, a partir de un determinado contenido o concentración, este fenómeno compite con el efecto “pantalla” que generan las partículas. Este comportamiento tiene el efecto contrario sobre la conversión que la dispersión de la luz, ya que disminuye la intensidad de luz incidente que llega a la matriz.

Por tanto, el análisis del comportamiento mecánico de los composites fotocurados deberá de hacerse teniendo en cuenta una serie de factores que pueden incidir sobre sus propiedades finales, entre los que encontramos: distribución y tamaño de las partículas del relleno, contenido de carga, interacciones entre el relleno y la matriz y los fenómenos ópticos que pueden tener lugar en el material durante el proceso de fotopolimerización.

3.7.1.- Ensayo de tracción

La adición de cargas inorgánicas a matrices poliméricas tiene muchos propósitos, entre los que encontramos, entre otros: aumento de la resistencia a la tensión, a la compresión, al impacto, estabilidad dimensional, así como la modificación de sus propiedades eléctricas. Como se ha mencionado anteriormente, las propiedades mecánicas del composite final deben de ser isotrópicas, por lo que la distribución del relleno en la matriz polimérica es una característica importante a tener en cuenta.

El comportamiento ideal sería que el relleno estuviera homogéneamente disperso en la matriz polimérica. De esta manera, todo esfuerzo aplicado a lo largo del material encontraría la misma respuesta, independientemente del punto donde fuera aplicado. En el caso de los biomateriales el estudio de su comportamiento mecánico nos da una idea de la resistencia que ofrece el material en cuestión bajo los distintos esfuerzos que se generan en el cuerpo humano. Según la región del organismo donde vaya a ser implantado el material, se requieren determinadas propiedades mecánicas para que su uso sea efectivo²¹³.

Por esta razón consideramos de interés el analizar el comportamiento de los materiales aquí preparados, bajo un esfuerzo en tracción, con respecto al contenido y naturaleza de la carga, el método de preparación y el análisis del módulo de elasticidad (E), a través de los modelos teóricos de Kerner²¹⁴, Cohen Ishai²¹⁵ y Guth-Smallwood²¹⁶.

A continuación exponemos las ecuaciones teóricas que se utilizan para la predicción del módulo de elasticidad en materiales compuestos:

- (1) La ecuación de Guth-Smallwood, que relaciona el módulo de elasticidad del composite (E_c), el del polímero (E_p) y la fracción en volumen del relleno (f):

$$E_c = E_p (1 + 2.5f + 14.1f^2)$$

- (2) La ecuación de Kerner, que es una alternativa de la ecuación (1) para el caso de los materiales con poco contenido de relleno (por debajo del 40%) y que llamaremos Kerner-1:

$$E_c = E_p \left\{ 1 + \left[15(1 - \nu_p) / (8 - 10\nu_p) \right] f / (1 - f) \right\}$$

donde ν_p = es el radio de Poison, en nuestro caso, para el poliácido acrílico.

- (3) En el caso de que el relleno sea superior al 50%, la ecuación anterior de Kerner-1 se modifica y la llamaremos Kerner-2:

$$E_c = E_p (1 + f - 1.8f^2)$$

- (4) En el caso de que el relleno este compuesto por partículas rígidas y esféricas, Cohen-Ishai han propuesto la siguiente ecuación:

$$E_c = E_p \left[1 + f / (1 - f)^{1/3} \right]$$

El método y la técnica empleada en este ensayo se describen en el Capítulo IV sección 4.5.10.1. Los composites se prepararon mediante los tres métodos en estudio.

Las muestras se polimerizaron mediante irradiación, a través de cristales de cuarzo de 0.5 mm de espesor, en moldes de teflón de dimensiones 50 x 20 x 2 mm con una lámpara de irradiación UV-Visible Visilux 2 3M, a una longitud de onda de 480 nm y una intensidad de luz

incidente de 3 mcal/s, a temperatura ambiente y sin control de la humedad, durante 1 minuto por cada lado de cada espécimen. Una vez irradiadas, las muestras se colocaron en una estufa a 37°C, durante 24 horas antes de realizar el correspondiente ensayo. En la Figura 39 y Tabla 26 se recogen los resultados obtenidos, para la fuerza de tensión máxima (T_m) y módulo de elasticidad (E) de los composites II.

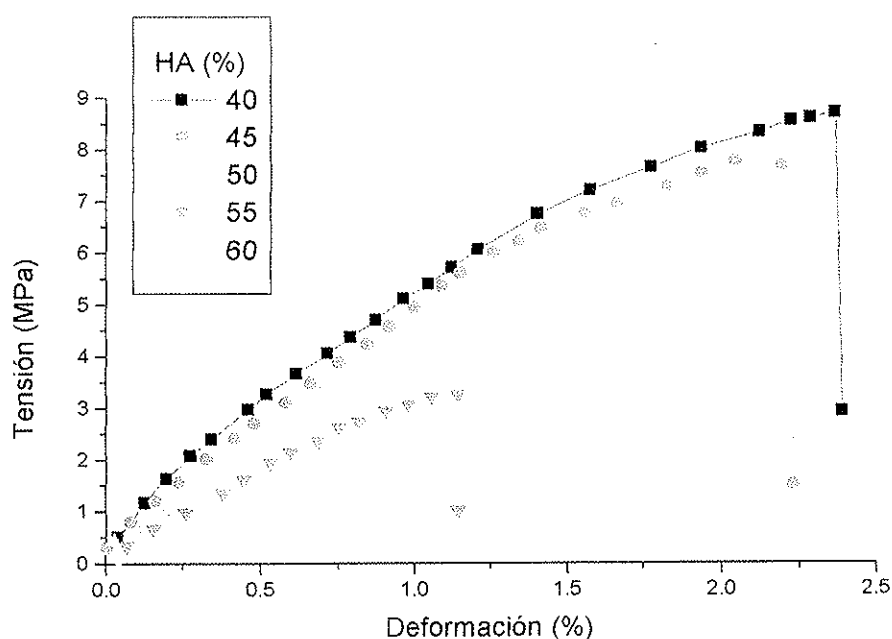


Figura 39.- Comportamiento bajo tracción de los composites preparados mediante el método II y variando el contenido de HA.

Como podemos observar en los resultados mostrados en la Figura los valores de la T_m aumentan, con respecto al material sin carga solamente para el caso de un 40-45% de HA, disminuyendo a mayores contenidos, para todos los composites preparados, cualesquiera sea el método de preparación utilizado.

Un comportamiento similar lo encontramos para los resultados obtenidos con respecto al módulo de elasticidad, donde el aumento de los valores correspondientes se mantiene hasta un 50% de carga.

Tabla 26.- Resultados de la T_m y E de los composites preparados por los diferentes métodos y variando el contenido de HA.

%HA (en peso)	$T_m \pm \Delta T_m$ (MPa)			$E \pm \Delta E$ (GPa)		
	Método I	Método II	Método III	Método I	Método II	Método III
0	7.0 ± 0.2	8.1 ± 0.5	5.1 ± 0.3	0.42 ± 0.02	0.52 ± 0.03	0.38 ± 0.02
40	7.9 ± 0.2	8.7 ± 0.4	5.6 ± 0.3	0.46 ± 0.02	0.57 ± 0.02	0.44 ± 0.02
45	7.1 ± 0.2	7.9 ± 0.3	5.1 ± 0.2	0.48 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.48 ± 0.05
50	6.4 ± 0.2	6.5 ± 0.2	4.9 ± 0.3	0.45 ± 0.02	0.47 ± 0.02	0.52 ± 0.04
55	3.8 ± 0.3	3.2 ± 0.2	4.0 ± 0.3	0.28 ± 0.02	0.23 ± 0.03	0.33 ± 0.02
60	2.0 ± 0.3	1.8 ± 0.3	3.4 ± 0.2	0.15 ± 0.02	0.10 ± 0.02	0.21 ± 0.02

Sabemos, por los resultados de otros estudios anteriores realizados en este trabajo, que el aumento del contenido de carga aumenta la rigidez del medio. La T_m nos da una idea del esfuerzo que soporta el material antes de sobrepasar el punto de fluencia, donde las propiedades elásticas del material dejan de estar gobernadas por la Ley de Hooke. A medida que aumenta la rigidez del medio, la deformación elástica que soporta el material es menor y el esfuerzo necesario para llegar a esta deformación crítica disminuye.

Por otro lado, sabemos que, a partir de un cierto contenido de relleno, el material se hace más heterogéneo y la separación de fases se hace más evidente. Al ir perdiendo uniformidad en la distribución de la carga o relleno, en el composite final, la T_m y E del material disminuyen con rapidez. La existencia de discontinuidades en el material trae consigo la formación de huecos e intersticios entre las partículas de relleno y la parte orgánica y por consiguiente la posibilidad de fractura en estas zonas aumenta con respecto de otras del mismo material en las que la distribución de carga, dentro de la matriz polimérica, es uniforme.

Además, el grado de conversión, para altos contenidos de carga disminuye, por el efecto pantalla de las partículas de relleno frente a la luz incidente, lo que también influye de forma negativa sobre las propiedades mecánicas. Estos dos factores explicarían la evolución de los valores obtenidos para la T_m a partir de un 50% de HA en todos los composites preparados.

Con respecto al método de preparación, en el intervalo comprendido entre el 40 y el 50% de contenido de HA, los mayores valores de T_m se obtienen en el caso de los composites preparados mediante el método II. A mayores contenidos, 55 y 60%, los mejores resultados se obtienen para los composites preparados por el método III. De nuevo, Para explicar esta tendencia tenemos que tener presente que los composites preparados mediante este método son más homogéneos que los restantes materiales obtenidos, lo que influye de forma significativa sobre sus propiedades mecánicas. Adicionalmente, el grado de conversión que alcanzan estos composites a partir de un 50% de HA es igual o superior a los que presentan los composites I y II, por lo que es lógico de esperar estos resultados.

Con objeto de conocer la influencia sobre este comportamiento de la naturaleza del relleno empleado, se procedió a la medida de los parámetros mostrados en la Tabla anterior, para composites preparados mediante el método II, y utilizando como relleno HA-Cit. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27.- Resultados mecánicos obtenidos en el ensayo de tracción para los composites preparados por el método II variando la naturaleza del relleno.

Contenido de HA-Cit. (%)	$T_m \pm \Delta T_m$ (MPa)	$E \pm \Delta E$ (GPa)
40	8.1 ± 0.2	0.48 ± 0.02
45	7.4 ± 0.2	0.53 ± 0.02
50	6.1 ± 0.2	0.45 ± 0.02
55	4.1 ± 0.2	0.41 ± 0.03
60	3.8 ± 0.2	0.36 ± 0.02

Como podemos observar, estos resultados presentan la misma tendencia que cuando se utiliza HA sin modificar. En contra de lo esperado, los valores de ambos parámetros son inferiores, en el intervalo entre 40 – 50%, a los que se obtienen en los composites preparados con HA, ya que pensábamos que al estar la carga modificada el grado de compatibilización entre el relleno y la matriz traería como consecuencia una mejora de sus propiedades mecánicas. Sin embargo, hay que tener en cuenta que el proceso de organofilización de la superficie de la HA trae consigo un aumento de la densidad del relleno, por lo que, para un mismo contenido de

relleno, la fase polimérica presente es mayor en el caso de los composites preparados con HA-Cit que la misma fase en los composites preparados con HA sin modificar. Al existir mayor cantidad de fase polimérica, el material se hace más elástico y menos rígido, por lo que este efecto disminuye las propiedades mecánicas.

Por otra parte, a partir de un 55% de HA, los resultados son superiores cuando se utiliza HA modificada. Este hecho puede explicarse sobre la base del mayor grado de conversión y homogeneidad del material que se alcanzan cuando se utiliza este tipo de relleno. A un mayor grado de conversión las propiedades mecánicas de la matriz polimérica aumentan y el grado de homogeneidad que se alcanza disminuyen la posibilidad y el número de grietas e intersticios que conlleven a una rotura del material. Por lo tanto, estos factores ejercen un mayor efecto que la contribución elástica de la fase polimérica con respecto a los materiales preparados con HA. Con respecto al comportamiento del módulo de elasticidad (E), obtenido en este estudio, en la Figura 40 se muestran, para el caso de los composites II, a título de ejemplo, con el fin de mejorar su comprensión, el modelo teórico que mejor se ajustó a los resultados, para todo el intervalo de contenidos de HA y también al variar la naturaleza de la fase inorgánica.

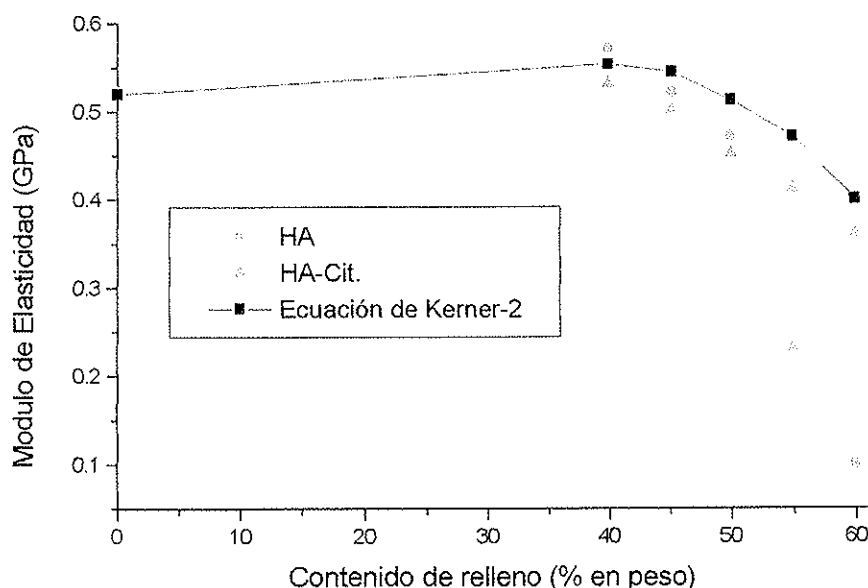


Figura 40.- Modelos teóricos y resultados experimentales obtenidos para el módulo de elasticidad en el ensayo de tracción con la variación de la naturaleza y contenido de relleno.

Vemos que el mejor ajuste se obtiene con el uso de la ecuación de Kerner-2, modelo aplicable para composites con altos contenidos en carga. La disminución del módulo de elasticidad de estos materiales se puede explicar a través de la separación que tiene lugar entre las fases presentes para altos contenidos, debido al grado de heterogeneidad que se alcanza, lo cual hace disminuir sus propiedades mecánicas. Una confirmación a esta hipótesis se obtiene al analizar el comportamiento en los composites preparados con HA-Cit. En estos materiales la homogeneidad es mayor, debido a la mayor compatibilización existente producto de la modificación superficial, y el relleno se encuentra más homogéneamente distribuido en la fase polimérica, por lo que sus propiedades mecánicas se incrementan.

3.7.2.- Ensayo de compresión.

Los esfuerzos de compresión son, quizás, los más numerosos e importantes de todos los tipos de esfuerzos que se generan en el organismo humano. De forma general, los ensayos de compresión dan mayores resultados, en cuanto a módulo de elasticidad y resistencia, que los resultados obtenidos mediante el ensayo de tracción.

En este apartado, se analiza la influencia sobre los parámetros mecánicos antes descritos del contenido de relleno, su naturaleza y el método de preparación empleado en la obtención de los composites en estudio. El método y la técnica empleada en este ensayo se describen en el Capítulo IV sección 4.5.10.2. Los composites se prepararon igualmente mediante los tres métodos en estudio.

Las muestras para el ensayo se polimerizaron por irradiación, a través de cristales de cuarzo de 0.5 mm de espesor, en moldes cilíndricos de teflón de dimensiones correspondientes a 5 mm de diámetro interno y 5 mm de altura, con una lámpara de irradiación UV-Visible Visilux 2 3M, a una longitud de onda de 480 nm y una intensidad de luz incidente de 3 mcal/s, a temperatura ambiente y sin control de la humedad durante 1 minuto por cada lado de cada espécimen.

Las muestras, una vez desmoldeadas, fueron retiradas del molde e irradiadas, durante el mismo tiempo, por las caras laterales de cada espécimen. Una vez irradiadas, las muestras se

colocaron en una estufa a 37 °C, durante 24 horas antes de realizar el correspondiente ensayo. Se realizaron un total de 7 muestras para cada contenido de relleno estudiado, por cada método de preparación utilizado.

En el ensayo de compresión realizado no se produce una rotura frágil, sino que después de que se alcanza un punto máximo en la ordenada (carga), esta cae y a continuación sigue aumentando pero esta vez de forma más lenta. Este ciclo va acompañado del abarilamiento de la probeta en los esfuerzos compresivos, debido a que la expansión del material no es uniforme a lo largo de la probeta, por los procesos de fricción que se generan en la zona de contacto entre la superficie del material y el plato de carga. Cuando se alcanza el punto de máxima carga, se observan grietas oblicuas a la generatriz del cilindro. Debido a esto, la carga última y la deformación a la rotura se toman justo en el punto de fluencia.

En la Figura 41, y a modo de ejemplo, se muestran las curvas Carga vs. deformación, obtenidas para el caso de los composites preparados mediante el método II. En la Tabla 28 se muestran los resultados obtenidos de resistencia a la compresión, σ_c , y módulo elástico a compresión, E_c , de todos los materiales ensayados.

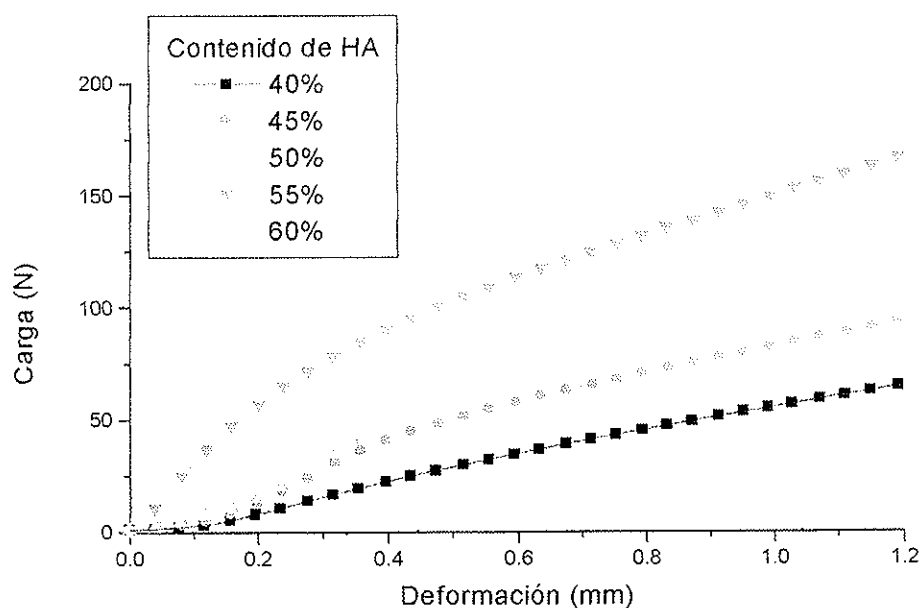


Figura 41.- Curvas carga-deformación para los composites preparados por el método II variando el contenido de HA.

Tabla 28.- Resultados de la Fuerza de compresión (σ_c) y el módulo de Youngs (E_c) para los composites estudiados.

Contenido de HA (% en peso)	Método I		Método II		Método III	
	$\sigma_c \pm \Delta \sigma_c$ (MPa)	$E_c \pm \Delta E_c$ (MPa)	$\sigma_c \pm \Delta \sigma_c$ (MPa)	$E_c \pm \Delta E_c$ (MPa)	$\sigma_c \pm \Delta \sigma_c$ (MPa)	$E_c \pm \Delta E_c$ (MPa)
40	1.6 ± 0.2	14 ± 2	2.8 ± 0.1	25 ± 6	0.8 ± 0.1	9 ± 1
45	2.8 ± 0.2	26 ± 5	4.4 ± 0.2	39 ± 7	1.2 ± 0.1	19 ± 1
50	5.2 ± 0.3	55 ± 9	7.4 ± 0.2	62 ± 16	4.2 ± 0.2	35 ± 6
55	8.6 ± 0.5	87 ± 9	10.2 ± 0.4	95 ± 7	8.0 ± 0.5	78 ± 8
60	9.1 ± 1.1	95 ± 18	11.8 ± 1.7	99 ± 20	8.8 ± 1.3	85 ± 20

Como podemos observar, el aumento del contenido de HA en los composites preparados trae consigo el aumento tanto de la fuerza de compresión, en el punto de fluencia, como del módulo de elasticidad, mientras que disminuye la elongación. Es de destacar que en este ensayo la probeta no rompe como en el caso del ensayo de tracción, comportándose como un material dúctil, lo cual es consecuencia de las dimensiones de la probeta. Es por ello que, para el intervalo de contenidos de HA estudiados, no se observa una disminución de ambos parámetros a partir de un cierto valor de porcentaje de relleno. Si bien es lógico de esperar que un aumento del contenido de HA traiga consigo un aumento de la rigidez del medio, lo cual conlleva a que los valores del E_c se incrementen, sabemos que en los materiales con altos contenidos de carga la heterogeneidad es muy grande y la adhesión entre la fase inorgánica y la orgánica disminuye, por lo que las propiedades también deberían de disminuir.

Sin embargo, el ensayo de compresión no depende de la microestructura del material. El tipo de deformación que ocurre en este ensayo es contrario al que ocurre en el ensayo de tracción. Mientras que en tracción las fuerzas que se ejercen tienden a separar el material, en el ensayo de compresión estas fuerzas tienden a compactar el material, por lo que en un determinado momento todas las partículas del relleno se encuentran más unidas entre sí, y esto trae como consecuencia que tanto el número como el tamaño de las grietas existentes disminuya. En este mismo sentido, tenemos que tener en cuenta que el esfuerzo aplicado en la generatriz de

la muestra recibe la suma de la respuesta de la matriz más la del relleno, por lo que es lógico de esperar que con el aumento del relleno aumente estas propiedades mecánicas del material. Por otra parte, en la Figura 42 se muestran los resultados obtenidos en función del método de preparación empleado.

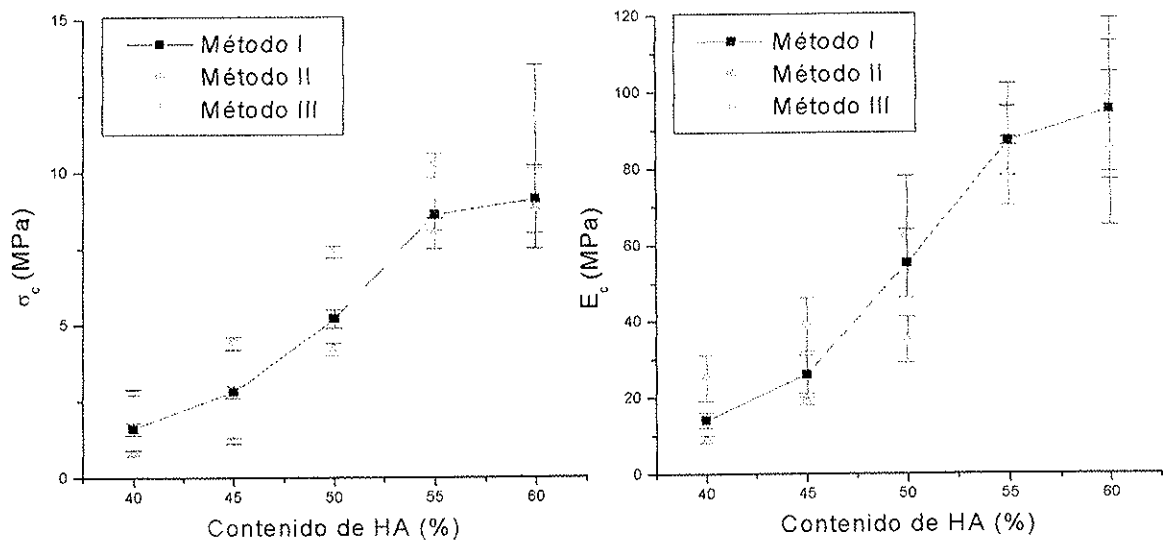


Figura 42.- Resultados obtenidos, en el ensayo de compresión, para los composites preparados por los diferentes métodos en estudio.

Como podemos ver, los mayores valores se obtienen en el caso del método II, para todo el intervalo de porcentajes de relleno. En el intervalo comprendido entre un 40 y un 50% de HA, los resultados están en concordancia con los obtenidos en el ensayo de tracción y con los valores de conversión que se alcanzan en estos materiales. Cuando los porcentajes de relleno son superiores, entre un 55 – 60%, y teniendo en cuenta que no existen diferencias significativas entre ambos para los valores obtenidos, los resultados son superiores al resto de composiciones, a pesar de que tanto la heterogeneidad del medio como la conversión de la matriz disminuyen.

Este resultado indica que, en el ensayo de compresión, no influye de forma significativa el grado de conversión que alcanza la matriz en el composite y que la heterogeneidad que alcanza el material no es suficiente como para provocar una disminución en esta propiedad.

Igualmente, se prepararon composites, mediante el método II, utilizando como relleno HA modificada con citrato para conocer la influencia de la naturaleza de la carga sobre los parámetros mecánicos de compresión descritos en este estudio. Los resultados obtenidos, con respecto a sus homólogos de HA sin modificar, se muestran en la Figura 43.

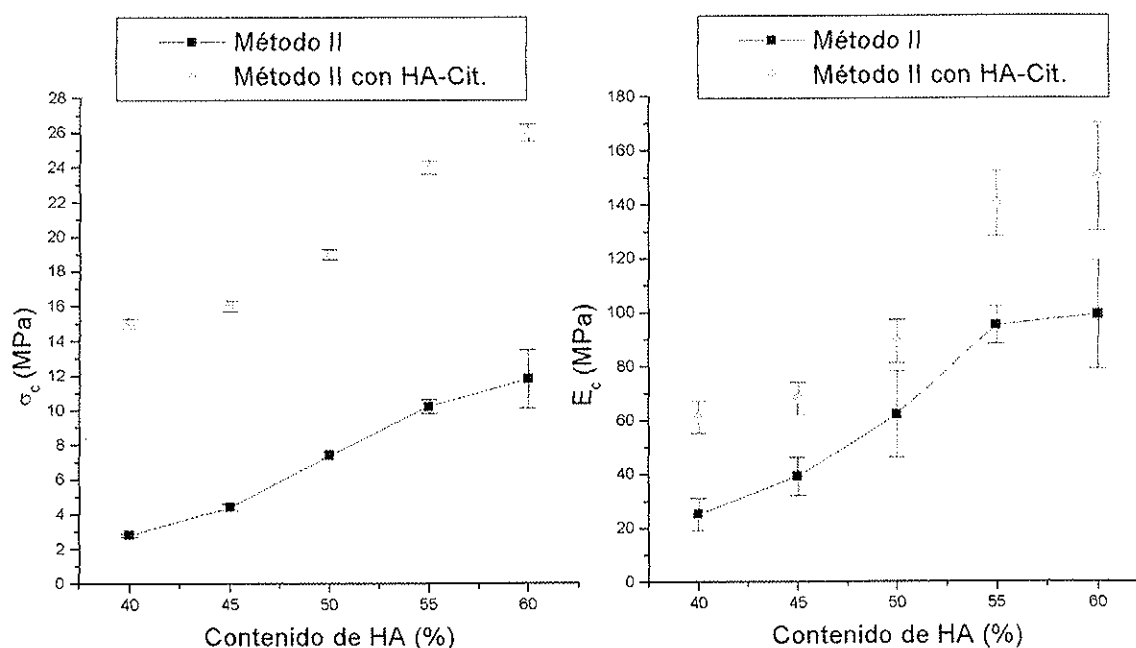


Figura 43.- Dependencia de σ_c y de E_c con la naturaleza del relleno empleado, para los composites preparados mediante el método II.

Como podemos observar, en todo el intervalo de contenidos de carga estudiado, los valores de los parámetros medidos son superiores en el caso de los composites preparados con HA-Cit que los que se obtienen en el caso de los composites preparados con HA sin modificar. Este resultado se puede explicar si tenemos en cuenta que la HA-Cit, el proceso de organofilización de su superficie conlleva a una mejor y mayor compatibilización entre la fase orgánica y el relleno.

Al mejorar estas propiedades y aumentar la proporción de interfase en el material, se obtienen materiales más homogéneos y disminuye la cantidad de imperfecciones que pueden producirse en el material. Esto trae como consecuencia que el uso de un relleno modificado, para un mismo

contenido de carga, presente mejores propiedades mecánicas de compresión que cuando se utiliza el relleno sin modificar.

3.8.- Degradación en SBF de los composites preparados.

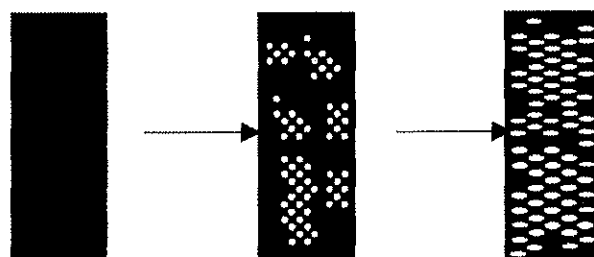
Existen cuatro términos para indicar que un material o dispositivo dado desaparecerá eventualmente tras ser implantado en un organismo vivo. Estos términos son *biodegradación*, *bioerosión* y *bioabsorción* o *biorreabsorción*. El significado, en la literatura, del prefijo “bio” no esta bien establecido, lo que trae como consecuencia el empleo indistinto de los términos *degradación* y *biodegradación* o *erosión* y *bioerosión*. No es hasta 1991 cuando se define, de forma práctica, el término *biodegradación* como la destrucción gradual de un material mediada por un sistema biológico, lo que implica que el sistema biológico no tiene por que ser la causa del proceso degradativo, sino solamente el medio en que se produce²¹⁷.

Por otra parte, Heller²¹⁸ sugirió que un polímero *bioerosionable* es un polímero insoluble en agua que se convierte, bajo condiciones fisiológicas, en un material o materiales solubles en agua sin importar el mecanismo implicado en el proceso. Por tanto, el término *bioerosión* incluye procesos físicos (como disolución) y químicos (como rotura de cadena). Por tanto, el término *bio*, en este caso, significa que la erosión transcurre bajo condiciones fisiológicas, en contraposición con otros procesos de erosión causados, por ejemplo, por la alta temperatura, ácidos y bases fuertes, luz ultravioleta o condiciones ambientales. Los términos *biorreabsorción* y *bioabsorción* se usan pues indistintamente e implican, de forma general, que el polímero o sus productos de degradación son eliminados por actividad celular; por ejemplo fagocitosis, en un ambiente biológico. Estos dos último términos son de alguna manera superfluos y no han sido definidos claramente.

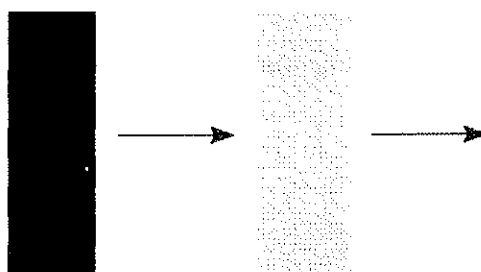
La degradación de polímeros es la llave del proceso de erosión. Existen dos formas principales mediante las cuales los enlaces pueden ser separados: pasivamente por hidrólisis o activamente por reacción enzimática²¹⁹. La última opción es efectiva únicamente en polímeros naturales, como polisacáridos, proteínas, y poli- β -hidroxiácidos²²⁰, cuando existan las enzimas apropiadas en el medio donde tiene lugar la degradación.

Para la mayoría de los polímeros biodegradables, especialmente los polímeros sintéticos, la hidrólisis pasiva es el modo de degradación más importante. Existen muchos factores que influyen en la velocidad de esta reacción: el tipo de enlace químico, el pH, la composición del copolímero y, el más importante, que es el grado de hinchamiento. Los cambios químicos y físicos son consustanciales con la degradación de polímeros biodegradables, como la cristalización de oligómeros y monómeros²²¹, o cambios de pH²²². Alguno de estos factores tienen un efecto decisivo sobre la velocidad de degradación.

Todos los polímeros degradables comparten propiedades de erosión con propiedades de degradación. Ambos son decisivos en el comportamiento de un material degradable en el lugar de aplicación. Para clasificar los polímeros degradables es necesario hacer una distinción entre la superficie (heterogénea) y la masa (homogénea) del material erosionable, tal y como se muestra en la Figura 44.



Erosión superficial



Erosión de la masa del polímero

Figura 44.- Esquema de los procesos de degradación superficial y de la masa del polímero.

Durante la aplicación del material, la superficie de los polímeros erosionables pierden material de la superficie únicamente. Esta pérdida no provoca cambios en la geometría y forma del material inicial. En el caso de la erosión de la masa del polímero, la degradación y la erosión no están confinadas a la superficie del material, por lo tanto, el tamaño del material se mantendrá constante durante una considerable porción de tiempo durante su aplicación. El avance de la superficie de erosión del polímero es predecible a través del proceso de erosión. Esto resulta conveniente en el caso de polímeros que se utilizan como liberadores de fármacos, donde la velocidad de liberación del principio activo está ligado directamente a la velocidad de erosión del polímero²²³.

La erosión es un proceso más complejo que la degradación, debido a que depende de muchos otros procesos como la degradación, el hinchamiento, la disolución y la difusión de oligómeros y monómeros, y los cambios morfológicos. Otros parámetros también influyen en el caso de los materiales que son erosionables eléctricamente²²⁴, o que tienen aplicaciones *in vivo*²²⁵. Aunque la degradación es más importante, dependiendo del tipo de polímero, otros parámetros pueden llegar a hacerse críticos en el comportamiento y control del proceso de erosión. El conocimiento de este proceso es, por lo tanto, más importante para las aplicaciones de polímeros biodegradables. Como la degradación, han sido propuestos muchos indicadores para explicar este comportamiento, como la pérdida de peso molecular, pérdida de peso y cambios en la geometría de la muestra. Teniendo en cuenta lo expresado podemos decir que la erosión es un proceso individual para cada polímero.

En este estudio, se analiza los procesos de degradación y erosión que presentan los materiales preparados en una disolución de suero fisiológico (SBF), teniendo en cuenta su utilización como implante en el organismo humano, a través de la medición de la pérdida de peso y de microfotografías de la superficie de las muestras con el tiempo. El método y la técnica empleada en este ensayo se describen en el Capítulo IV sección 4.5.11.

En la Figura 45 se muestran los resultados obtenidos en cuanto a la pérdida de peso de las muestras ensayadas en el tiempo, para el caso de los composites preparados utilizando como relleno HA sin modificar.

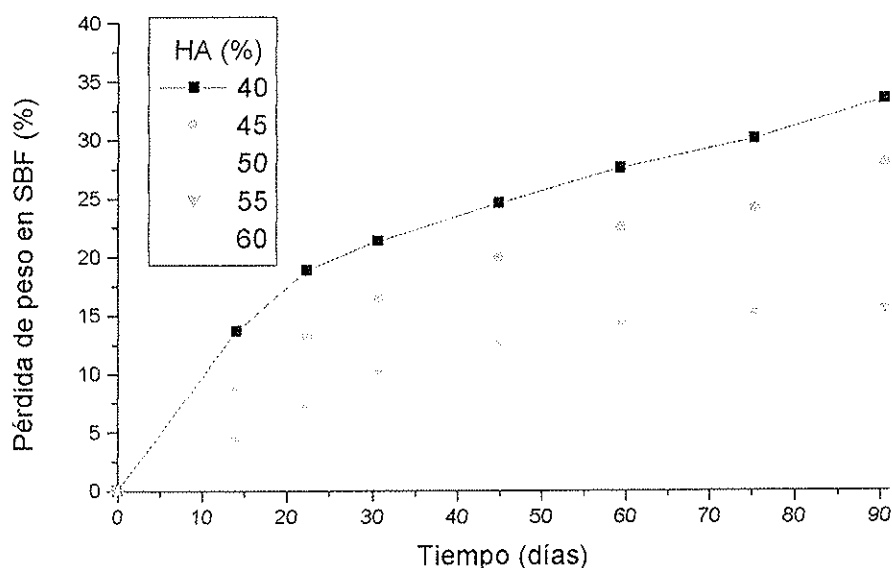


Figura 45.- Comportamiento de erosión de los composites II variando el contenido de HA.

Como podemos observar, a medida que se aumenta el contenido de HA en los composites, la pérdida de peso de los materiales disminuye. Si tenemos en cuenta que la cantidad de fase orgánica presente disminuye también con el aumento del relleno, podemos decir que el resultado es lógico de esperar. Al cabo del tiempo de estudio, tres meses, el composite preparado con un 60 % de HA solo ha perdido un 7.5 % en peso, mientras que el contiene un 40 % en peso pierde un 33.4 %, lo que parece indicar que, en medio fisiológico, la erosión es mayor cuanto mayor sea la parte orgánica presente en este tipo de materiales.

Cabe destacar que durante las dos primeras semanas de ensayo, la solución de SBF, inicialmente incolora, adquiere un color amarillo, siendo menos intensa esta coloración a medida que disminuye el contenido de carga. Después de transcurrido este tiempo, las soluciones renovadas de SBF permanecían incoloras. Este hecho indica que parte de la muestra, en concreto el monómero y oligómeros del PAA que contienen parte del fotoiniciador disuelto, son capaces de migrar al medio fisiológico durante los primeros días del ensayo.

En el caso que nos ocupa, la matriz polimérica esta compuesta por una mezcla de PAA y copolímero de injerto CHI^+PAA . Mientras que el primero es un polímero reabsorbible a pH

básicos, el segundo presenta unas características mezcla del PAA y de la CHI, esta última con un carácter acentuadamente biodegradable, típico de los polisacáridos.

El pH de la solución de SBF es de 7.25, por lo que el proceso de reabsorción del PAA se produce de forma lenta. Al migrar parte del monómero al medio el pH disminuye, por lo que este proceso prácticamente se detiene. Por otra parte, la disminución del pH aumenta la degradación del copolímero CHI^+PAA , debido a la contribución de la quitosana, que bajo estas condiciones se degrada rápidamente, por escisiones en la cadena, disminuyendo el peso molecular correspondiente. Por otra parte, los cambios sucesivos de solución de SBF dan lugar a que el pH tienda nuevamente a ser neutro, aumentando de esta manera la velocidad de reabsorción del PAA.

La presencia de relleno también juega un papel importante en los procesos descritos anteriormente. En una matriz sin relleno, el SBF que penetra en ella, compite solamente con los enlaces que la forman. En presencia de carga, se pueden producir nuevas interacciones de tipo carga-polímero que aumenten o disminuyan los procesos de degradación. Si las interacciones que se crean disminuyen la fuerza de los enlaces que mantienen unida a las cadenas del polímero, la energía necesaria para romper estos enlaces es menor y el proceso de degradación transcurre rápidamente. Si por el contrario, las interacciones presentes son más fuertes que las que presenta la matriz por si sola, la cantidad de energía aumenta y la velocidad del proceso disminuye.

En este caso, sabemos que la introducción de HA en el material genera la aparición de interacciones entre el PAA y la HA, que incrementan la estabilidad térmica del material y producen un aumento de la T_g del PAA, por lo que podemos decir que a medida que se incrementa el contenido de relleno, la mayor parte del PAA se verá involucrado en este tipo de interacciones.

En este mismo sentido, sabemos que la heterogeneidad de los composites se incrementa a medida que se aumenta la cantidad de relleno. Tanto la degradación como la erosión dependen de la cantidad de poros que presente el material, ya que a través de ellos se liberan al medio los productos de estos procesos. También el proceso de erosión superficial descrito en este apartado,

contribuye a la pérdida de peso, ya que se generan poros y también se pueden perder partículas de relleno que se liberen de la matriz, producto de la degradación que esta sufre. Es por ello que se tomaron microfotografías de la superficie de las muestras ensayadas con el fin de verificar si tiene lugar el proceso de erosión.

Con el fin de mejorar la comprensión de estos resultados, en la Figura 46 se muestran las microfotografías obtenidas en el caso del composite con un 40% de carga al inicio y durante el tiempo de ensayo.

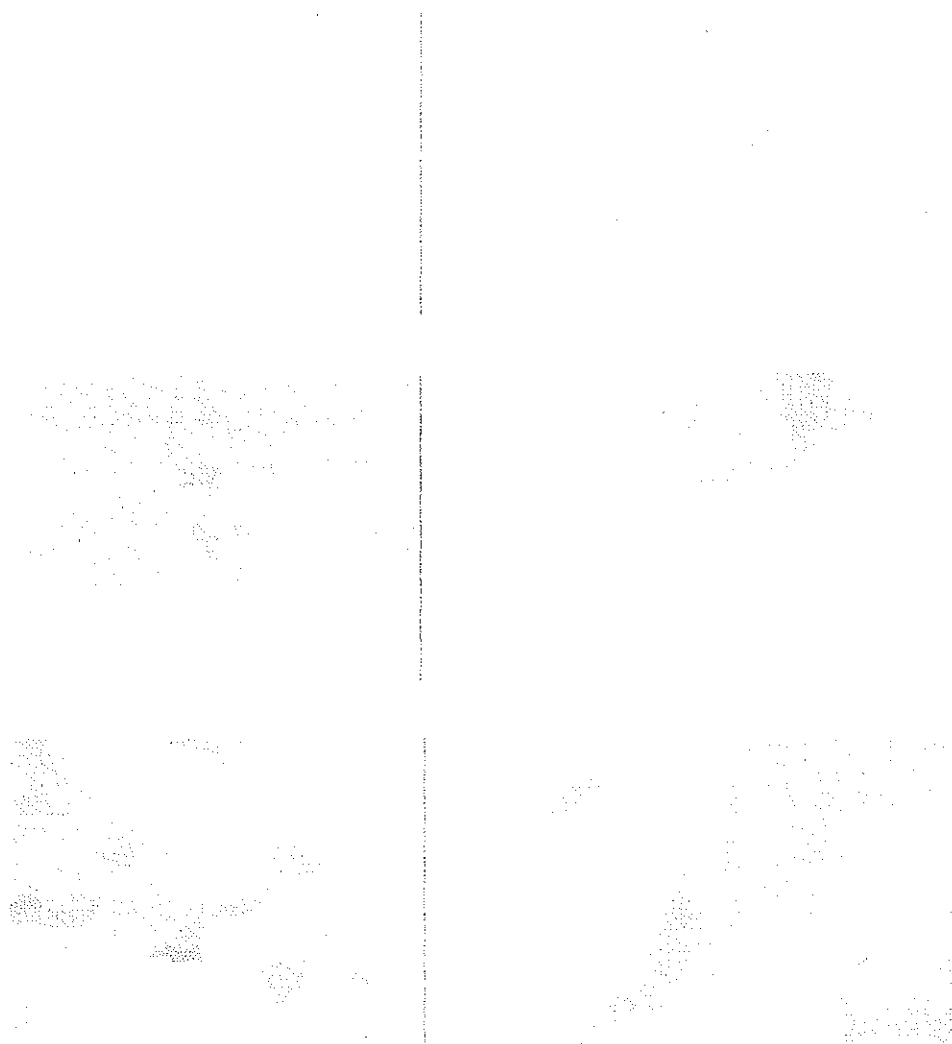


Figura 46.- Microfotografías tomadas al inicio y a los 15, 30, 60, 75 y 90 días, respectivamente, de la superficie de un composite con un 40 % de HA, preparado mediante el método II.

Como podemos observar, a medida que aumenta el tiempo de ensayo, en la superficie del material se observa la aparición y aumento del tamaño de grietas, por lo que podemos decir que el proceso de erosión ocurre de manera inicial sobre la superficie del material. A través de estas grietas tiene lugar la salida de los oligómeros y monómero que queda sin reaccionar desde la matriz hacia el medio, característica indeseable en todos los materiales para uso en el organismo humano. Mientras mayor sea el número y el tamaño de las grietas, el parámetro que se mide en este ensayo, pérdida de peso, se incrementa. Este crecimiento se hace crítico a los 75 días de inmersión en SBF como podemos comprobar, en la microfotografía realizada, en las que se observan partículas de relleno que, al no encontrarse atrapadas en la matriz polimérica, empiezan a migrar hacia el medio. Al ir aumentando la carga en el composite, el proceso de formación de grietas aumenta en los primeros días de comenzado el ensayo, lo que puede explicarse si tenemos en cuenta el grado de heterogeneidad que alcanza el composite a altos contenidos de relleno. Sin embargo, después de treinta días el proceso se detiene, lo que puede ser una consecuencia de que la parte que es capaz de migrar rápidamente del material se agota transcurrido este tiempo.

Por otra parte, en la Figura 47 se muestra la pérdida de peso obtenida, para la misma familia de composites mostrada anteriormente, pero utilizando como relleno la HA modificada con citrato.

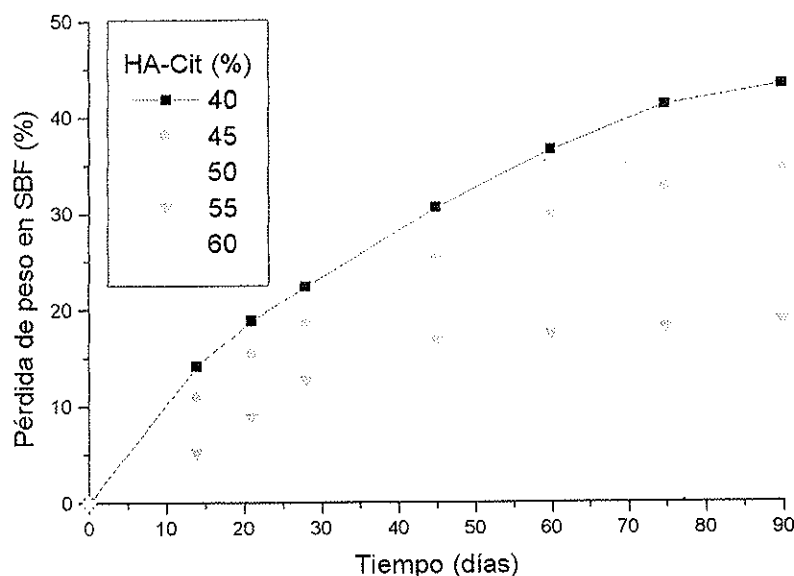


Figura 47.- Pérdida de peso de los composites II preparados con HA-Cit.

El comportamiento de estos composites indica que se pierde mayor cantidad de peso que en el caso de sus homólogos preparados con HA sin modificar, para todo el intervalo de contenidos de relleno en estudio. Para explicar este resultado debemos de tener en cuenta que la parte orgánica, responsable fundamental de la pérdida de peso observada, para un mismo contenido de relleno, es superior cuando se utiliza HA-Cit debido a la mayor densidad que este relleno presenta. Esto hace que la cantidad de material que migra hacia el medio sea superior.

En la Figura 48 se muestran las microfotografías obtenidas de la superficie del mismo composite mostrado anteriormente pero utilizando HA-Cit., para diferentes tiempos.

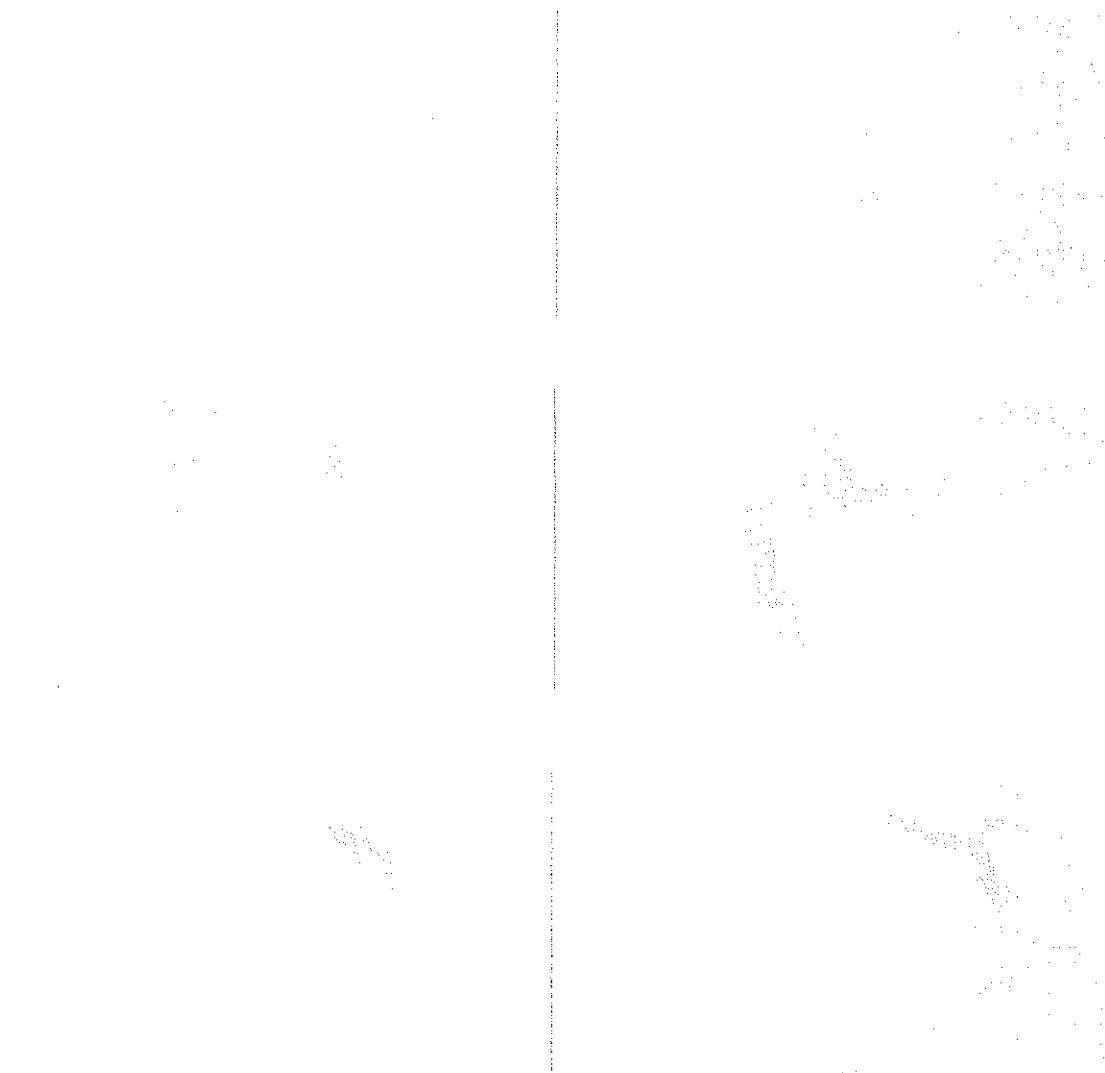


Figura 48.- Microfotografías tomadas al inicio y a los 15, 30, 60 y 90 días, respectivamente, de la superficie de un composite con un 40 % de HA-Cit.

En las microfotografías vemos como en un inicio el relleno del composite se encuentra más homogéneamente distribuido en toda la matriz. A medida que transcurre el tiempo, comienza la aparición de grietas de forma rápida durante los primeros treinta días e incluso como algunas partículas de HA-Cit se han desprendido del material. Al cabo de los sesenta días de ensayo, las microfotografías tomadas muestran como la matriz que se encontraba en la superficie del composite ha migrado hacia el medio por solubilización, quedando exclusivamente una masa compacta asociada casi en su totalidad al relleno, que incluso se sigue desprendiendo de la matriz restante, en el tiempo, creando grietas en capas más profundas del composite.

Como conclusión de este apartado podemos decir que en estos materiales, el proceso predominante es la erosión superficial. Si bien es cierto que en un inicio parte de monómero y los oligómeros del polímero correspondiente que se encuentran sobre la superficie del material migran hacia el medio, esto es un proceso local que termina rápidamente. Una vez que comienza el proceso de erosión de la superficie, a través de la creación y crecimiento de grietas con pérdida parcial de relleno, es cuando comienza a tener lugar tanto la degradación como la erosión en la masa del composite, migrando sus productos al medio.

Capítulo IV.- Parte Experimental

4.1.- MATERIALES.

4.1.1.- Disolventes:

Se utilizaron disolventes comerciales con el grado de pureza adecuado a cada caso. Algunos simplemente fueron sometidos a un tratamiento de secado y posterior destilación siguiendo los procedimientos habituales. En el registro de los espectros de RMN- H^1 se emplearon disolventes grado UVASOL de Merck.

4.1.2.- Monómero:

Como monómero se utilizó el ácido acrílico, AA, suministrado con grado de pureza analítico por la casa Merck (99 %). Este monómero se utilizó sin purificación previa.

4.1.3.- Fotoiniciador:

Como fotoiniciador de polimerización se empleó la canforquinona, CQ, suministrada por la casa Fluka, con un grado de pureza $> 99\%$. El fotoiniciador comercial se utilizó directamente, sin previa purificación.

4.1.4.- Reactivos:

El 4-dimetilaminobenzaldehído y el borohidruro de sodio (Across, 99%), utilizados en la síntesis de la amina, fueron destilados a vacío antes de su utilización. El ácido ortofósforico (H_3PO_4 , 85%) (Fluka) y el hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, 95%) (Aldrich) empleados en la síntesis de la hidroxiapatita se utilizaron sin purificación previa.

Los reactivos empleados en la determinación analítica del calcio y del fósforo fueron suministrados por diferentes casas comerciales con el grado de pureza adecuado para cada caso. El ácido acético glacial utilizado en la purificación de la quitosana fue suministrado por la casa Merck con un grado de pureza $> 99\%$.

En el caso de la solución de fluido biológico, SBF, se utilizaron los siguientes reactivos: cloruro de sodio (NaCl , Fluka), hidrógeno carbonato de sodio (NaHCO_3 , Fluka), cloruro de potasio (KCl , Fluka), hidrógeno fosfato de potasio trihidratado ($\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Merck), cloruro de magnesio hexahidratado ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Merck), cloruro de calcio (CaCl_2 , Merck), sulfato de sodio (Na_2SO_4 , Aldrich), ácido clorhídrico 1 N (HCl , Aldrich) y treshidroximetilaminometano ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$, Aldrich).

El protocolo seguido en la preparación de la solución de SBF, con una concentración iónica cercana la plasma sanguíneo humano y ajustado a $\text{pH} = 7.25$, se describe a continuación:

1. Lavar una botella de polietilentereftalato (PET) y un frasco de vidrio de 1L, que se utilizaran con una solución 1N de HCl , detergente natural y agua destilada. Séquelos cuidadosamente.
2. Añada 500 mL de agua desionizada y destilada en una botella de PET de 1L y tápelos con un vidrio reloj.
3. Agite el agua con un agitador magnético y vaya añadiendo los reactivos que se dan en la Tabla 29 en el agua uno a uno en el mismo orden en que se muestran, después de que el reactivo añadido se haya disuelto completamente.

4. Ajuste la temperatura de la solución a 36.5 °C con un baño de agua y ajuste el pH de la solución a 7.25 agitando la solución y valorando con HCl 1N. Cuando el pHmetro se remueva de la solución, añada el agua usada para lavar el electrodo en la solución).
5. Transfiera la solución de la botella a un volumétrico de vidrio. Añada el agua usada para lavar el frasco inicial en el frasco de vidrio.
6. Ajuste el volumen total de la solución a 1L con la adición de agua destilada y guarde el frasco a 20 °C.
7. Transfiera la solución del frasco a una botella de PE y guarde la botella en el refrigerador a una temperatura que oscile entre los 5 y los 10 °C. Si precipita la solución no puede utilizarse.

Tabla 29.- Reactivos para la preparación de SBF

Orden	Reactivo	Cantidad
1	NaCl	7.996
2	NaHCO ₃	0.350
3	KCl	0.224
4	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0.228
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.305
6	HCl (1N)	40 mL
7	CaCl ₂	0.278
8	Na ₂ SO ₄	0.071
9	NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃	6.057

En la Tabla 30 se muestran las concentraciones iónicas obtenidas en el SBF preparado con respecto al plasma sanguíneo humano.

Tabla 30.- Comparación de la concentración de iones (mM).

Ión	SBF	Plasma sanguíneo
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	147.5	103.0
HCO ³⁻	4.2	27.0
HPO ₄ ²⁻	1.0	1.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5

La solución preparada fue utilizada en la determinación del por ciento de dobles enlaces residuales y como medio activo en los ensayos de degradación correspondientes.

4.2.- SÍNTESIS DE COMPUESTOS.

4.2.1.- Obtención y purificación de la Quitosana (CHI).

La quitosana (CHI) utilizada en el presente estudio se obtuvo a partir de caparazones de langosta (*Panulirus argus*), como se describe detalladamente en otros trabajos²²⁶. Para su purificación, se disuelve la CHI (1g) en una solución acuosa de ácido acético (1 mL en 100 mL de agua) durante 24 horas, mediante agitación magnética. Posteriormente, esta disolución se filtra sobre fibra de vidrio y se precipita con una disolución acuosa de NaOH (Panreac), al 40%. El gel precipitado se lava varias veces con agua destilada y se liofiliza durante 24 horas, en un liofilizador LIOALFA-6 de la casa Telstar. La espuma blanca de quitosana obtenida se tritura hasta obtener el polímero en forma de finas partículas, con un tamaño de grano en el intervalo entre las 50 y las 200 μm . El material final fue caracterizado por técnicas de FTIR y RMN- ^1H .

La determinación del peso molecular se realizó mediante el método viscosimétrico dando como resultado un peso molecular de $1.5 \cdot 10^5$. El grado de acetilación, GA, de la quitosana

purificada se determinó mediante técnicas de FTIR y RMN- H^1 dando como resultado valores de 14.6% y 11.1% respectivamente.

4.2.2.- Síntesis de la 4-aminobenzil alcohol (DMOH).

La DMOH se preparó mediante la reducción del 4-dimetilaminobenzaldehído (Merck) con borohidruro de sodio, $NaBH_4$ (Merck), en medio alcalino, tal y como se describe en la Figura 49. A una solución de 4-dimetilaminobenzaldehído (0.1 mol, 15.1 g) en metanol (100 mL), se le añadió, bajo agitación magnética, una solución de borohidruro sódico (0.037 mol, 1.4 g) en hidróxido de sodio, $NaOH$, 2M (2 mL) diluida con agua (18 mL), a una velocidad de 0.5 mL/min., manteniendo la reacción entre los 18-25 °C, durante toda la noche.

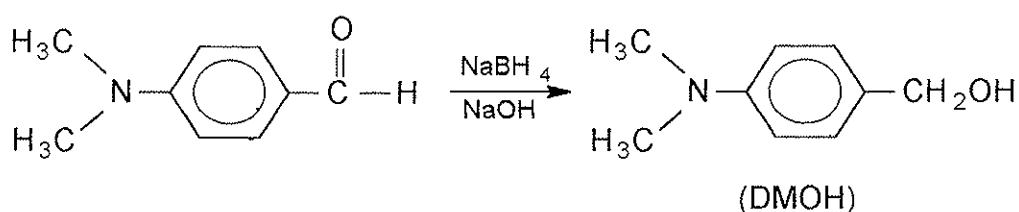


Figura 49.- Esquema de la síntesis de la 4-aminobenzilalcohol (DMOH).

A continuación, se eliminó el metanol y el sólido blanco resultante se extrajo con éter; se seca sobre sulfato de magnesio, $MgSO_4$ (Panreac), y se elimina el solvente a presión reducida, obteniéndose un sólido cuyo punto de fusión, por DSC, es 44 ± 1 °C. El producto se destiló a vacío (0.5 mm de Hg) a 110 °C. El rendimiento de la reacción fue de un 90%.

La amina obtenida, DMOH, se caracterizó mediante técnicas de RMN- H^1 obteniéndose los siguientes resultados: δ (CH_2 del OH) = 4.52 ppm, δ (α - CH_3) = 2.95 ppm, δ (H del benceno) = 6.80 y 7.42 ppm

4.2.3.- Síntesis de la Hidroxiapatita (HA).

La HA estequiométrica, con una relación calcio/fósforo = 1.67, se preparó siguiendo el método de Rathje. Para ello se toman 500 mL de solución 0.3 M de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) en un embudo y se gotean, a una velocidad de 4 mL/min, sobre un matraz que contenía 500 mL

de una solución 0.5 M de hidróxido de calcio (Ca(OH)_2), calentada a ebullición previamente y con agitación magnética a una velocidad de 300 rpm. La solución final se calienta a reflujo durante seis horas.

Posteriormente se filtra a vacío y se lava varias veces con agua destilada. El producto resultante se seca en una estufa a una temperatura de 105 °C durante toda la noche. El producto seco resultante se tritura y tamiza con una malla de 0.1 mm. El producto así obtenido se caracterizó mediante FTIR, DRX y la determinación de la relación Ca/P se llevo a cabo mediante volumetría. El tamaño de partícula y el área superficial se determinó mediante las técnicas de dispersión de luz y BET, respectivamente.

4.2.4.- Modificación de la hidroxiapatita.

4.2.4.1.- Sinterización.

Una porción de la hidroxiapatita, sintetizada anteriormente, fue calentada a 1100 °C, en una mufla programable de la casa Selecta, durante 12 horas y se le aplicó el mismo procedimiento de tamizado. A esta hidroxiapatita sinterizada se le denominó HAS. El producto fue caracterizado mediante las técnicas mencionadas anteriormente.

4.2.4.2.- Modificación superficial con agentes funcionalizantes con grupos carboxílicos.

Como agentes funcionalizantes se utilizaron las siguientes sales: acetato sódico (Ac-Na), citrato sódico (Cit-Na), acrilato sódico (Acr-Na), metacrilato sódico (Met-Na) y succinato sódico (Succ-Na) en disoluciones 0.5M de cada uno de ellos a pH= 7 y 5, utilizando el ácido correspondiente a la sal para lograr este último valor de pH.

El proceso de funcionalización consistió en poner en contacto, bajo agitación magnética, 20 ml de la disolución de agente funcionalizante, a los diferentes pH escogidos, con 1g de las diferentes hidroxiapatitas a temperatura de 25 ± 0.5 °C, durante un período de 12 horas, el cual se considero suficiente para alcanzar el equilibrio. Pasado este tiempo, se separa el polvo de la disolución mediante filtración a vacío con una placa filtrante para el caso de la HA, y por centrifugación a una velocidad de 3000 rpm durante 15 minutos, las que contienen HAS. Los

polvos así obtenidos se secan en una estufa a 60 °C durante otras 12 horas. Posteriormente se someten a los procesos de triturado y tamizado descrito anteriormente y se caracterizan según los métodos convencionales.

4.3.- TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN.

4.3.1.- Espectroscopía Infrarroja, FT-IR

Los espectros infrarrojos obtenidos fueron registrados en un espectrofotómetro Nicolet 520, generalmente en forma de pastillas de KBr. Se realizan 32 barridos por muestra y con una resolución de 2 cm⁻¹.

4.3.2.- Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de protón, RMN-H¹.

Los espectros se registraron en un espectrómetro Variant 400, operando a 400 MHz. Los valores de los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón, δ (ppm), tomando la señal correspondiente a los protones del TMS o del solvente utilizado como referencia interna.

4.3.3.- Espectroscopía UltraVioleta Visible, Uv-Vis.

Para la obtención de los espectros UV-Vis se utilizó un espectrofotómetro de doble haz Perkin-Elmer Lambda 16, UV-250. Generalmente se emplearon cubetas de cuarzo "Espectrosil" con un camino óptico de 1 cm.

4.3.4.- Viscosimetría.

Para la determinación del peso molecular mediante medidas de la viscosidad se utilizó un viscosímetro Ubbelohde 01 de la casa Schott-Geräte, con un diámetro de capilar de 0.46 mm y una constante k de 0.005. El viscosímetro es sumergido en un baño termostatzado, CT-1450/2 a una temperatura de 25 $\pm$ 0.1 °C. Para la medida del tiempo de caída de las disoluciones preparadas y del disolvente se utilizó un equipo automatizado SCHOTT AVS 350, que trabaja con un error en la medida del orden de 0.1 segundos.

Por otro lado, para la medida de la viscosidad de los geles se utilizó un viscosímetro Brookfield, modelo RTV y microadaptador SSA, trabajando invariablemente con muestras de 5 mL a una temperatura de 25 ± 1 °C.

4.3.5.- Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC).

Para la determinación de los puntos de fusión y temperatura de transición se realizaron medidas calorimétricas en un Calorímetro Diferencial de Barrido Perkin-Elmer DSC-4. Las medidas se realizaron bajo flujo de nitrógeno y a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min. Antes de realizar las medidas se realizó un calibrado del aparato (temperatura y entalpía) con patrones de indio y zinc.

4.3.6.- Difracción de Rayos-X.

La difracción de rayos X de las muestras de hidroxiapatita se realizó con un difractómetro de polvo RIGAKU Rotaflex RU-200B con ánodo rotatorio y monocromador de Germanio. La radiación utilizada fue la $K\alpha_1$ del Cu ($\lambda=1.5405$ Å). Para el análisis de los difractogramas obtenidos se utilizó la base de datos JCPDS y las fichas ASTM.

4.3.7.- Microscopía

Las microfotografías tomadas en este trabajo se realizaron en un microscopio Nikon, eclipse, modelo E400, con un aumento de 4X controlado por el programa informático Matrox Inspector versión 3.00. El microscopio posee una cámara CCD de la casa Sony modelo C370P.

4.3.8.- Medida del tamaño de partícula por dispersión de luz.

Las medidas de tamaño de las partículas de las diferentes hidroxiapatitas utilizadas como material de relleno se llevaron a cabo en un equipo COULTER LS 130, que utiliza radiación láser de 750 nm para la medida de tamaños entre 0.1 y 900 μm de diámetro. El equipo consiste en un módulo en el que se introduce la muestra dispersa en un fluido que la mantenga en

suspensión evitando en lo posible los fenómenos de agregación. En nuestro caso, las diferentes hidroxiapatitas empleadas, se utilizó invariablemente isopropanol.

4.3.9.- Medidas del área superficial. Método de BET.

El área superficial específica y la porosidad de los sólidos son parámetros muy importantes a determinar en las cargas de composites con aplicaciones médicas, ya que estos valores condicionaran las posibilidades reales de su posterior aplicación. Estos parámetros pueden determinarse por varios métodos, entre ellos podemos mencionar la adsorción-desorción de gases, porosimetría de mercurio, termoporosimetría, permoporosimetría, etc.. En nuestro caso elegimos el método de adsorción-desorción de gases por ser un método no destructivo, con la ventaja adicional de que permite la determinación simultánea del área superficial y la porosidad, y es un método relativamente fácil y rápido.

La curva que representa el volumen de gas adsorbido a cada presión aplicada en función de dicha presión, a temperatura constante, se denomina “isoterma de adsorción” y se representa como en la Figura 50.

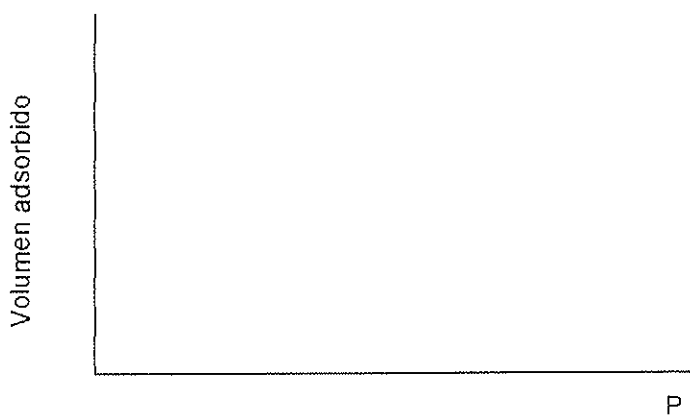


Figura 50.- Isotherma de adsorción.

Existen cinco tipos de isothermas de adsorción, Figura 51. Para explicar estas isothermas obtenidas experimentalmente, Brunauer establece una clasificación.

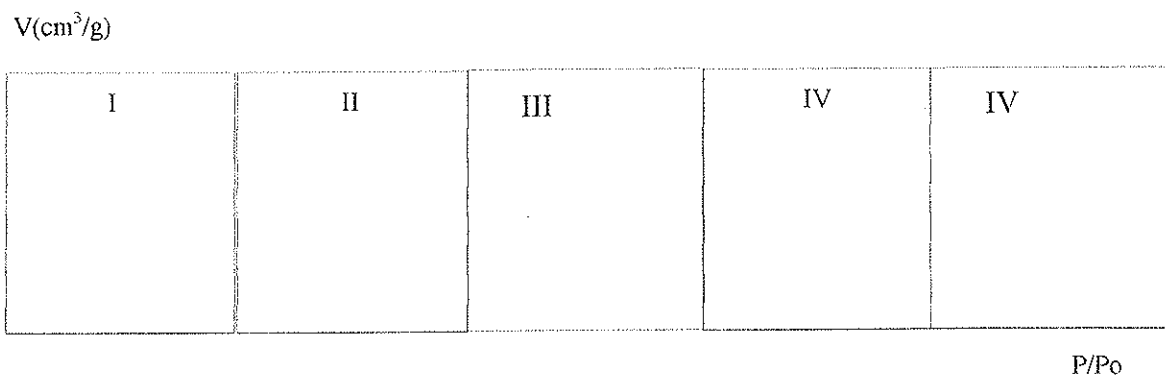


Figura 51.- Tipos de isothermas de adsorción.

La isoterma tipo I se denomina isoterma de Langmuir; su forma indica que el sólido estudiado es microporoso y que tiene una superficie externa muy pequeña. La isoterma tipo II la presentan los sólidos no porosos o macroporosos; esta isoterma refleja la formación no solo de la monocapa, sino de las multicapas de adsorción. La isoterma tipo III se presenta raramente; describe el comportamiento de un sistema cuando el calor de licuefacción es mayor que el calor de adsorción. Las isothermas de tipo IV y V son análogas a las de II y III pero asociadas a sólidos mesoporosos.

La S_e se puede determinar por el método BET, basado en un modelo teórico del proceso de adsorción propuesto por Brunauer, Emmet y Teller. Estos autores modelaron el equilibrio entre un vapor y el adsorbente en el cual capas múltiples de moléculas de vapor son adsorbidas sin la completa adsorción de las capas subyacentes. Se considera que no existen sitios preferenciales de adsorción ni interacciones laterales entre moléculas absorbidas y que las fuerzas de condensación son activadas en la adsorción. Esta teoría se cumple en el intervalo de presiones relativas (P/P_o) de 0.05 a 0.35. La ecuación lineal del método BET que relaciona el volumen total adsorbido a cierta presión relativa, con el volumen correspondiente a la monocapa para el cálculo de S_e es la siguiente:

$$\frac{P/P_o}{V \cdot (1 - P/P_o)} = \frac{1}{V_m \cdot c} + \frac{c - 1}{V_m \cdot c}$$

donde c es una constante del sistema BET que está ligada a la energía de adsorción. El valor de c se encuentra en el intervalo de 50-300 para muchos adsorbentes cuando el adsorbato utilizado es el nitrógeno. Al representar $(P/P_o)/V(1-P/P_o)$ frente a P/P_o en la ecuación de BET se obtiene

una línea recta cuya pendiente es igual a $(c-1)/(V_m c)$ y su intercepto en el eje de las abscisas se corresponde con el valor de $1/(V_m c)$. A partir de estos resultados se puede calcular el volumen necesario para llenar la monocapa (V_m), Figura 52.

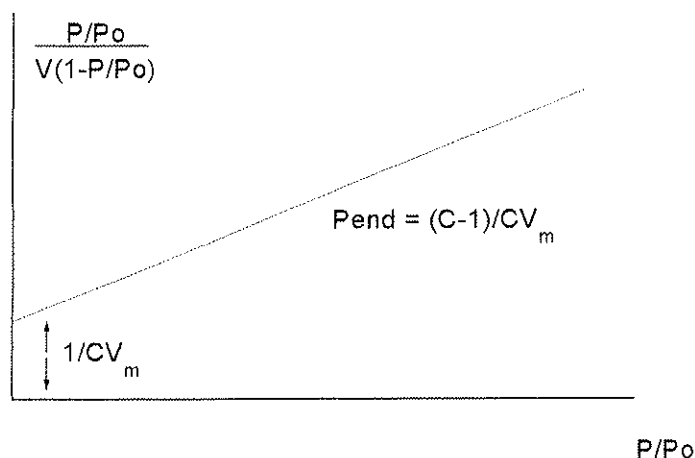


Figura 52.- Isoterma de adsorción en multicapas BET.

La S_e vendrá dada por la siguiente expresión:

$$S_e = \frac{V_m N_A A}{M}$$

donde:

N_A = es el número de Avogadro.

A = es el área que ocupa una molécula de adsorbato (N_2).

M = peso molecular del adsorbato.

Las medidas de S_e mediante el método de BET pueden llevarse a cabo por el método de un solo punto (si $c \gg 1$) o por el de multipuntos. Hay que destacar que en este no se puede aplicar en el caso de las isothermas del tipo III y V. Las medidas de área superficial fueron realizadas en un equipo ASAP 2000, Micrometrics INC, mediante adsorción de nitrógeno a una temperatura de 77 K. Las condiciones de medida para todas las muestras analizadas fue desgasificación a alto vacío durante 24 h con N_2 y a una temperatura de 200°C, para lograr la total

deshidratación de la muestra. Posteriormente, se realizó el análisis inmediatamente, para evitar la posible hidratación de la muestra.

4.3.10.- Determinación de la relación calcio/fósforo (Ca/P).

4.3.10.1.- Determinación de calcio.

En un erlenmeyer de 100 mL se adicionan 25 mL de la muestra preparada (ensayando con un blanco simultáneamente con H₂O), 25 mL de EDTA (0.01 mol/L), 10 mL de buffer amoniacal y una pequeña cantidad de Negro de Eriocromo T. A continuación se valora con solución de zinc, Zn²⁺, (0.01 mol/L) hasta viraje de color de azul a rosado.

Preparación de los reactivos:

Muestra: Pesar exactamente alrededor de 0.1 g de la muestra de hidroxiapatita y disolver en 40 mL de HCl (1:3) hasta total disolución. Trasvasar cuantitativamente a un matraz de 250 mL y enrasar.

Solución de Zn²⁺: pesar exactamente entre 0.6-0.7 g de granallas de Zn, (≥ 99.5%) y trasvasar a un vaso de precipitado de 250 mL. Añadir 20 mL de ácido clorhídrico, HCl (1:3) y 1 mL de ácido nítrico, HNO₃ concentrado, tapar con un vidrio reloj y dejar reaccionar. Al concluir la reacción, si queda algún sólido sin disolver, se calienta suavemente hasta total disolución, y si aún así no se logra la total disolución, se añade una nueva porción de 5 mL de HCl (1:3). La solución, una vez fría, se trasvasa cuantitativamente a un matraz aforado de 1000 mL y se enrasa con agua y se homogeneiza por agitación.

Solución de EDTA: pesar 3.8 g de sal disódica del EDTA dihidratado y disolver en 700-800 mL de agua. Completar con agua hasta el enrase y homogeneizar.

Buffer Amoniacal: pesar 53.5 g de cloruro de amonio, NH₄Cl que se disuelven en 400-500 mL de agua. Añadir 410 mL de amoniaco, NH₃, concentrado (25 %), agitar y completar con H₂O hasta 1000 mL y homogeneizar.

Negro de Eriocromo T: Pulverizar 1 parte de Negro de Eriocromo T con 99 partes de KCl.

Cálculos:

$$\%Ca = \frac{f \cdot 0.01(Vb - Vm) \cdot 0.04008}{p} \frac{250}{25}$$

donde:

- %Ca** = por ciento de calcio en la muestra de HA
- f** = es el factor de la solución de Zn
- 0.01** = es la concentración molar de la solución de Zn
- Vb** = es el volumen del blanco (agua)
- Vm** = es el volumen de la muestra de Zn gastada en la valoración
- 0.04008** = es el factor de adecuación para el calcio
- 250** = el volumen donde se prepara la muestra
- 25** = el volumen de la muestra de HA a valorar
- p** = la masa que se pesa de la muestra de HA para la determinación.

El cálculo del factor **f** se realiza de la siguiente manera:

$$f = \frac{m_{zn} / C_{zn}}{PM_{zn}}$$

donde:

- m_{zn} = la masa de zinc en gramos (0.6083 g)
- C_{zn} = la concentración molar de la solución de zinc (0.01 mol/L)
- PM_{zn} = la peso molecular del zinc (65.37 g/mol)

De esta forma el valor obtenido para el factor **f** fue de 0.9305

4.3.10.2.- Determinación de fósforo.

Inicialmente, es necesario obtener una curva de calibración a partir de disoluciones de 100 mL a las que se le adicionan respectivamente 0, 1, 5, 10, 15 y 20 mL de una solución patrón de fósforo (P) de 100 ppm, 0.8 mL de HCl (1:1), 8 mL de solución patrón de calcio, 5 mL de HNO₃ concentrado y 10 mL de reactivo para P. Se enrasa y se homogeniza. Al mismo tiempo, y por triplicado, se toman exactamente 20 mL de la muestra preparada (se utiliza la misma que para el calcio), a la que se le adicionan 5 mL de HNO₃ concentrado y 10 mL de reactivo para P en un matraz aforado de 100 mL; se enrasa y se homogeniza. En cubetas de vidrio óptico de 1 cm, a 425 nm y a los 30 minutos de desarrollado el color se mide la absorbancia de todas las muestras preparadas empleando como blanco la solución que no contiene fósforo en la curva de calibración.

Preparación de los reactivos:

Muestra: la muestra se prepara de idéntica a la del calcio.

Patrón de Ca 1000 ppm: Pesar exactamente 2.4975 g de carbonato de calcio, CaCO₃, y disolver en la mínima cantidad de HCl (1:1). Enrasar y homogeneizar en un matraz aforado de 1000 mL.

Patrón de P 1000 ppm: Pesar exactamente 4.3943 g de dihidrógeno fosfato de potasio, KH₂PO₄, previamente secado a 105 ± 5°C durante una hora y disolver en la mínima cantidad de HCl (1:1). Enrasar hasta un volumen de 1000 mL y homogeneizar.

Reactivo para fósforo: Disolver 10.00 ± 0.01 g de molibdato de amonio en 100 mL de H₂O. Si fuese necesario, calentar a 50-60°C agitando continuamente. Añadir agitando 2 mL de HNO₃ concentrado. Filtrar si aparece algún precipitado. (Solución A). Disolver 0.3 ± 0.01 g de metavanadato de amonio (NH₄VO₃) en 50 mL de H₂O, calentando hasta 50-60°C si es necesario. Dejar enfriar y adicionar 50 mL de HNO₃ concentrado (Solución B). Mezclar las soluciones A y B y adicionar 16 mL de HNO₃ concentrado. Enrasar y almacenar en frasco ámbar.

Cálculos:

$$\%P = \frac{C \cdot 0.125}{p}$$

donde:

$\%P$ = el por ciento de fósforo en la muestra de HA.

C = la concentración de la muestra en ppm (determinada por interpolación a partir de la curva de calibración).

p = la masa exacta de la muestra en g

0.125 = factor de corrección

4.3.11.- Grado de modificación.

Con el fin de determinar la extensión de la modificación de una carga inorgánica se utilizan diferentes métodos analíticos convencionales aplicables sobre la carga modificada. Sin embargo, cuando la aplicación de dichos métodos no resulta factible, es práctica habitual el cuantificar la cantidad de reactivo orgánico consumido en el proceso de modificación. Algunos autores denominan “grado de adquisición” a la proporción o cantidad porcentual del agente funcionalizante consumido en el tratamiento de la carga, ya que, en determinados casos, no resulta factible establecer que parte o proporción del agente funcionalizante está anclado por enlace químico a la carga y que parte está ocluido o adsorbido sobre su superficie. Para la determinación del grado de adquisición (A) se utiliza la expresión:

$$A = \frac{V \cdot \Delta C}{W}$$

donde:

V = es el volumen de la solución (en Litros)

W = son los gramos de HA a funcionalizar. (en g)

ΔC = es la diferencia entre las concentraciones al inicio (C_o) y al final del tratamiento (C_f).

Se conocen los valores de V , W y la C_o de las disoluciones de los agentes empleados por lo que el parámetro a determinar es el valor de C_f . Para ello se realizó una determinación espectrofotométrica por UV-Vis del agente funcionalizante en las disoluciones obtenidas al principio y al final del tratamiento. Primeramente se obtienen las curvas de calibración de los diferentes agentes funcionalizantes, mediante la preparación de disoluciones acuosas de estos entre 5×10^{-1} M y 1×10^{-6} M y variando el valor del pH con HCl (1N) según el tipo de agente.

De la pendiente de las curvas obtenidas se obtuvo el coeficiente de extinción molar (ϵ). Una vez obtenidos los coeficientes de extinción se procede a la medida de la absorbancia (Abs) de la disolución final, en las mismas condiciones mencionadas anteriormente, obtenida en el proceso de funcionalización y se determinó la C_f mediante la expresión : $C_f = \text{Abs}/\epsilon l$. Es de destacar que los valores obtenidos no difieren entre si cuando se utiliza como blanco en las determinaciones agua con hidroxiapatita.

4.4.- TÉCNICAS DE IRRADIACIÓN.

4.4.1.- Fotocalorimetría Diferencial de Barrido (PDSC).

La calorimetría diferencial de barrido permite, al mismo tiempo, medir una propiedad macroscópica y obtener información a nivel molecular. Por otro lado, teniendo en cuenta la elevada exotermicidad de la mayoría de los procesos de polimerización en cadena, esta técnica presenta toda una serie de ventajas adicionales sobre otros métodos más tradicionales utilizados en el estudio de las cinéticas de polimerización como son: la medida directa de la velocidad de polimerización y la posibilidad de utilizar muestras de pequeño tamaño y de controlar la atmósfera bajo la cual se realiza la medida, lo que permite comparar sistemas bajo idénticas condiciones.

El estudio de las cinéticas de polimerización se llevaron a cabo en un fotocalorímetro diferencial de barrido (PDSC) desarrollado en los laboratorios del Instituto de Ciencia de

Tecnología de Polímeros, Figura 53, mediante la modificación de un calorímetro diferencial de barrido de Perkin-Elmer DSC-4^{227,228}.

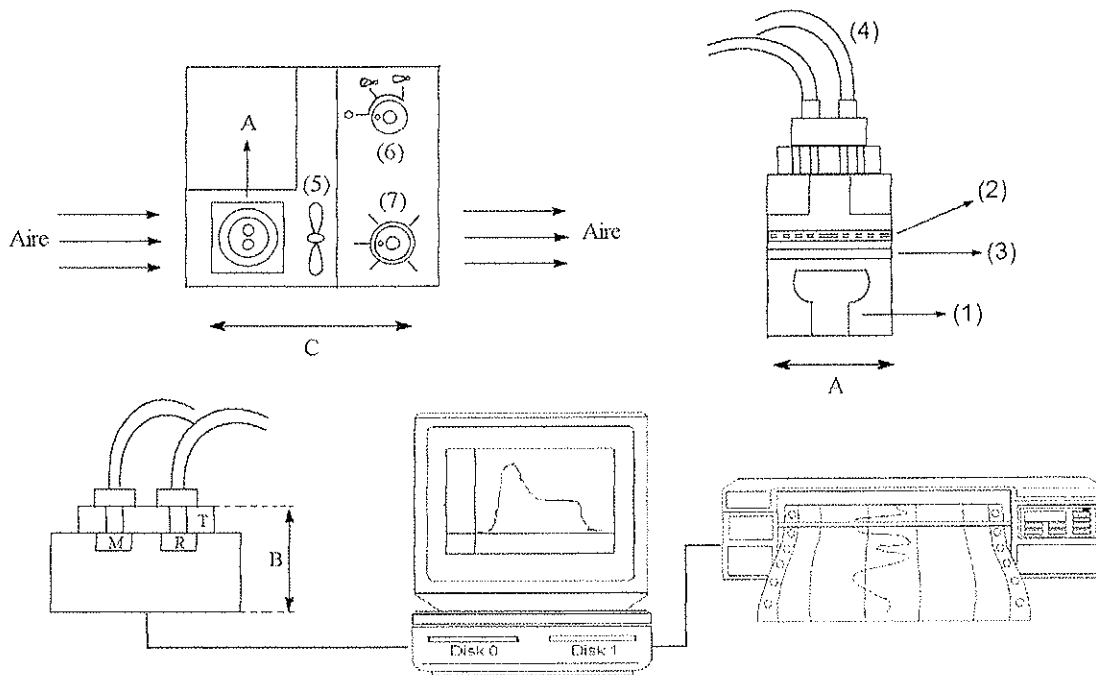


Figura 53.- Sistema de Fotocalorimetría.

Para irradiar con luz visible se utiliza un sistema (A) compuesto por una lámpara halógena Schott KL-1500 (1) con un filtro IR (Schott KG-1) (2) y otro de interferencia con máxima transmisión a 470 nm (Schott VG 9) (3). Se acoplan fibras ópticas de la firma Schott, de 50 cm de longitud y 0.5 cm de diámetro (4) a la salida de la lámpara. El sistema de enfriamiento de esta fuente de irradiación (C) es un ventilador acoplado a la lámpara de luz halógena (5). En la parte superior de este sistema se encuentran dos interruptores, el de alimentación general (6) y el potenciómetro de la lámpara (7). El primero es el encargado de suministrar la energía eléctrica al sistema en dos regímenes diferentes: a media lámpara (8) y a lámpara completa (9). El segundo interruptor varía la potencia de irradiación de la lámpara en 5 posiciones. La combinación de ambos interruptores permite irradiar a diferentes intensidades de luz incidente.

En la tapa del fotocalorímetro (B) se realizaron sendos orificios circulares sobre los pocillos de referencia (R) y muestra (M) que fueron recubiertos de teflón. A ellos se les hace

llegar las terminales de las fibras ópticas que están conectadas a la fuente de irradiación. En la parte inferior de la tapa (T) están los conductos que permiten el paso del nitrógeno. El fotocalorímetro está conectado a la unidad de datos Perkin-Elmer 3600, provista de pantalla y un registrador. Este sistema permite recoger la exoterma de polimerización de la muestra una vez que esta es irradiada (el retraso en la respuesta del sistema es inferior a 0.1 s).

En los ensayos convencionales realizados, la intensidad de luz incidente se mantuvo constante e igual a 0.26 mcal/seg a 470 nm (filtro Schott VG 9). Se trabajó a valores de absorción superiores de 2 ua, es decir, absorción total. Las medidas de la intensidad de luz incidente y el control de la estabilidad de la lámpara se determinaron por irradiación simultánea de dos cápsulas: una vacía en el pocillo de referencia y otra grafitada en el pocillo de muestra. De la diferencia de calor desprendido en cada cápsula se dedujo de la intensidad de luz incidente (en mcal/seg). Se ha comprobado que este valor obtenido concuerda con el hallado por actinometría²²⁹.

4.4.1.1.- Aspectos teóricos.

Es sabido que la calorimetría diferencial de barrido, DSC, permite medir la velocidad de desprendimiento de calor en una reacción química. En todo proceso de polimerización el calor desprendido se puede relacionar con el grado de conversión de monómero a polímero, por lo tanto, el grado de conversión (α) en cada momento se obtiene dividiendo el área integrada de la exoterma hasta ese tiempo (ΔH_t) por el calor total de polimerización (ΔH_o).

$$\alpha = \frac{\Delta H_t}{\Delta H_o}$$

El valor del ΔH_o se puede obtener, a su vez, a partir de la misma exoterma para largos tiempos de irradiación, donde teóricamente se alcanza el 100% de conversión, o se usan los datos descritos en la literatura. De la representación gráfica de la variación de la concentración molar del monómero polimerizado con el tiempo de irradiación se obtiene una curva, cuyo tramo inicial se puede ajustar a una recta. La pendiente de dicha recta es el valor de la velocidad de polimerización inicial (R_p).

Conocida la intensidad de luz incidente y la absorbancia de la muestra a la longitud de onda de irradiación, resulta inmediato el cálculo del valor de la intensidad absorbida a cada tiempo. Representando gráficamente los moles de monómero transformados frente a la energía de absorbida a cada tiempo de irradiación (en einstein) obtenemos el rendimiento cuántico de polimerización inicial, ϕ_m , a partir del valor de la pendiente de la recta, ajustada por mínimos cuadrados, en el primer tramo de la representación.

$$\phi_m = \frac{R_p}{I_a}$$

Debemos señalar que en estos cálculos se hace la suposición de que la absorbancia, y por tanto, la concentración del fotoiniciador, permanecen constantes durante el proceso de irradiación, lo cual es válido, como mínimo, para los primeros instantes de irradiación. Bajo la suposición del estado estacionario y en ausencia de reacciones de transferencia de cadena, es aplicable la ecuación general:

$$R_p = \frac{k_p}{2k_t^{1/2}} [M] R_i^{1/2}$$

donde k_p y k_t son las constantes de velocidad de propagación y terminación, $[M]$ es la concentración de monómero y R_i es la velocidad de iniciación. Asimismo, de la determinación experimental de R_p es posible, mediante el uso dicha expresión, calcular el valor de R_i , ya que en la literatura se reportan en la literatura los valores de las constantes de la velocidad de propagación y de terminación para una concentración de monómero para el caso de diferentes monómeros acrílicos²³⁰.

4.4.1.2.- Métodos de operación.

La forma convencional de operar en una experiencia de polimerización fotoiniciada consiste, en primer lugar, en la medida en el propio calorímetro de la intensidad de luz incidente con una cápsula grafitada idéntica a la que se va a usar para la irradiación de la muestra tal y

como se describió anteriormente. A continuación, con la ayuda de una microjeringuilla Hamilton, o por pesada directa en el caso de los sólidos, se deposita en la cápsula la cantidad de muestra apropiada, consistente en la mezcla del sistema de iniciación-monómero previamente preparada a la concentración elegida. Una vez transcurridos cinco minutos de acondicionamiento de muestra, se abre manualmente el obturador y la curva exoterma se visualiza sobre la pantalla de la unidad de datos P-E 3600 unida al PDSC. Los resultados generados se almacenan en un disco de ordenador y se registran, si se desea, sobre papel mediante un registrador unido al sistema. La integración de la exoterma para obtener el calor de polimerización, se realiza con ayuda del correspondiente software y la unidad de datos, iniciándose justo en el instante en que la luz incide sobre la muestra y aplicable a lo largo de toda la irradiación hasta el momento en que la luz se bloquee.

De los datos cinéticos almacenados, una vez adecuadamente integrados y analizados, se calcula directamente la conversión, y de su relación con el tiempo de irradiación la velocidad de polimerización y otros parámetros cinéticos. Habida cuenta de que conocemos el valor de las intensidades incidente y absorbida, el cálculo de los rendimientos cuánticos es igualmente inmediato. Un aspecto a tener en cuenta es el tamaño y/o espesor de la muestra. La gran sensibilidad conseguida con el PDSC, permite utilizar pequeños tamaños de muestra, del orden de los miligramos o mililitros. Por consiguiente la elección de la cápsula portamuestra está condicionada por el tamaño y espesor elegido en cada caso en particular.

En este trabajo se utilizó agua como disolvente y puesto que este solvente, bajo las condiciones experimentales estudiadas, es relativamente volátil, se modificó las cápsulas estándar. Puesto que es condición indispensable el que la luz incida directamente sobre la mezcla monómero-sistema de fotoiniciación, se diseñó una nueva cápsula que pudiera ser sellada con un material inerte y que a la vez fuese transparente a la longitud de onda de irradiación. El esquema de esta nueva cápsula se muestra en la Figura 54.

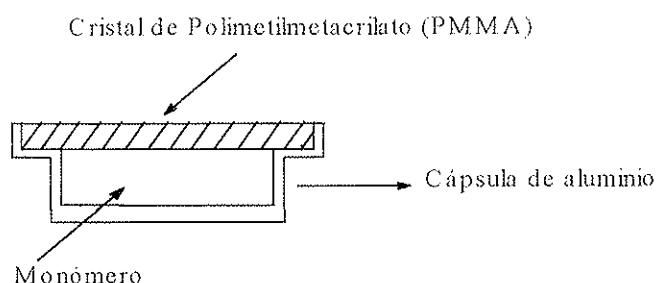


Figura 54.- Sección transversal de la cápsula de aluminio utilizada.

Dichas cápsulas fueron fabricadas a partir de láminas de aluminio destemplado con un espesor de 100 nm, mediante un troquel de acero inoxidable especialmente diseñado para este fin. Es imprescindible que el disco de polimetilmetacrilato (PMMA) encaje y se asiente perfectamente sobre la cápsula. Obviamente, las medidas de intensidad de la luz incidente deben hacerse sobre la nueva cápsula conveniente grafitada. Mediante la utilización de este tipo de cápsulas se ha podido realizar el estudio de las cinéticas de polimerización de monómeros y mezclas de monómeros volátiles empleando el fotocalorímetro.

4.4.2.- Sistema de irradiación convencional

Para el estudio y determinación de los rendimientos cuánticos de fotorreducción en condiciones de irradiación estacionarias se empleo un sistema de irradiación en continuo. Este sistema consta de los siguientes elementos dispuestos sobre un banco óptico y se muestran en la Figura 55:

- A.- Lámpara de luz Ultra-Violeta Visible, Schott KL-1500, alojada en un carcasa con refrigeración mediante un ventilador y un sistema óptico de focalización terminados en dos fibras ópticas, con su correspondiente sistema de arranque y fuente de alimentación.
- B.- Filtro de Infrarrojo Schott KG-1 y de absorción a 470 nm, Schott VG 9.
- C.- Portamuestra termostatzado, con agitador y portadetector
- D.- Radiómetro, International Light, IL 700, unido al correspondiente portadetector.

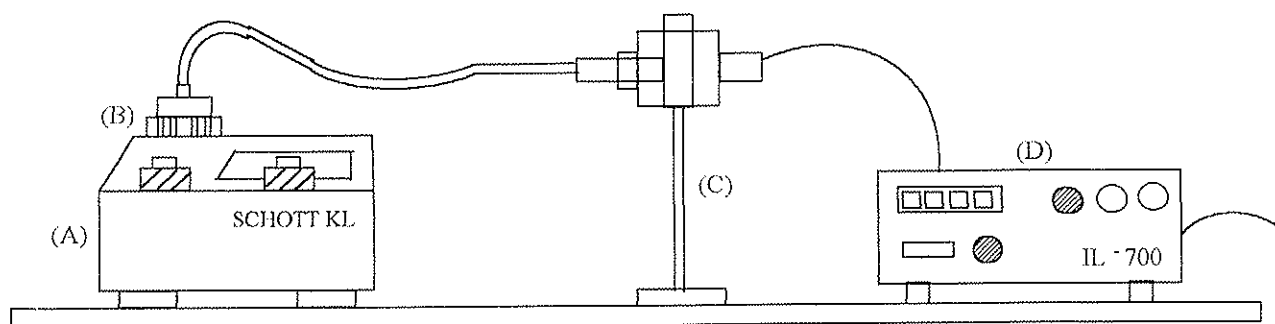


Figura 55.- Esquema del sistema de irradiación en condiciones estacionarias empleado en las experiencias de fotorreducción.

Las irradiaciones se han llevado a cabo en disoluciones de acetato de etilo, utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm de camino óptico y 3 mL de volumen total. Esta cubeta se coloca en el portamuestra para permitir su irradiación. El rendimiento cuántico de fotorreducción (Φ_f) se define como la relación existente entre el número de moles de producto transformados y el número de fotones (einsteins) absorbidos por la muestra.

La valoración del producto desaparecido por fotorreducción se ha llevado a cabo midiendo la caída de la absorción, con el tiempo de irradiación, que se produce en el máximo de la curva correspondiente al fotoiniciador (470 nm), aplicando la Ley de Lambert-Beer, mediante medidas espectrofotométricas por UV-Vis. Con objeto de tener en cuenta la variación de la absorbancia a la longitud de onda de irradiación, conforme el producto va desapareciendo, este valor de absorbancia se ha ido corrigiendo a lo largo de la experiencia para cada uno de los intervalos de irradiación. La intensidad de luz incidente se determinó mediante medidas fotocalorimétricas y se mantuvo constante e igual a 0.26 mcal/s.

4.5.- METODOS.

4.5.1.- Determinación del grado de acetilación (GA) de la quitosana.

La determinación del grado de acetilación de la quitosana (GA) se realizó por dos vías: mediante FTIR y por RMN- ^1H .

a) FTIR

Se toman espectros infrarrojos de la quitosana, tal y como se describe anteriormente, y se miden las intensidades de las bandas en 3450 cm^{-1} y 1655 cm^{-1} , correspondientes al grupo OH y al doble enlace de hidrógeno de la amida I, respectivamente. El grado de acetilación se calcula a través de la expresión:

$$\%GA = \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} \right) \times 115$$

b) RMN- ^1H .

Los espectros RMN- ^1H se obtuvieron en un espectrómetro Variant 400, operando a 400 MHz y calentando la muestra a $80\text{ }^{\circ}\text{C}$. La muestra de quitosana se disuelve en D_2O (UVASOL) con gotas de HCl 2M (Merck) y homogenizándolas en un baño de ultrasonidos durante treinta minutos. El GA se obtuvo a partir de la integración de las intensidades de los protones del metilo (CH_3) correspondientes al grupo acetilado, I_{MET} , relacionadas con las integrales de las intensidades de los restantes protones del anillo glicosídico de la quitosana. Los cálculos se realizaron mediante las siguientes expresiones:

$$\%GA = \left[\frac{I_{\text{MET}}/3}{I_{\text{H}2}} \right] \times 100$$

$$\%GA = \left[\frac{I_{\text{MET}}/3}{I_{\text{H}2/6}/6} \right] \times 100$$

donde:

I_{MET} = intensidad integrada de la señal de los protones metilos del grupo acetilo.

$I_{\text{H}2}$ = intensidad integrada de la señal del protón correspondiente al carbono 2 del anillo glicosídico de la quitosana.

$I_{\text{H}2/6}$ = suma de las intensidades integradas de las señales correspondientes a los protones enlazados a los carbonos 2, 3, 4 y 5 del anillo glicosídico de la quitosana.

4.5.2.- Determinación del Peso Molecular de la quitosana.

Para la determinación del peso molecular de la quitosana por viscosimetría primeramente se obtiene una curva de calibración, midiendo la relación entre los tiempo de caída de soluciones de CHI de concentración conocida y el tiempo de caída del disolvente empleado. Para la preparación de las soluciones de CHI, el material pesado es añadido, bajo agitación, a una cantidad conocida de disolución 0.5M de ácido acético, AcOH. Cuando la CHI se ha disuelto completamente, se añade acetato de sodio, NaOAc, en la cantidad necesaria para lograr una concentración de la sal igual a 0.2 M. Posteriormente, esta disolución se centrifugó a 6000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga Megafuge 1.0 de la casa Heraeus. Todas las disoluciones así obtenidas se miden inmediatamente de ser preparadas, para evitar la posible despolimerización de las cadenas. Se realizaron 5 determinaciones del tiempo de caída para cada muestra analizada. Teniendo en cuenta que para disoluciones diluidas de polímeros se puede expresar la viscosidad como una relación de los tiempos de caída de la solución (t) y del disolvente (t_0), cuando fluyen a través de un capilar, de forma que:

$$\eta_s = \frac{t - t_0}{t_0}$$

donde η_s es la viscosidad específica. Por otra parte, se define como viscosidad relativa (η_{rel}) a la relación:

$$\eta_{rel} = \frac{t}{t_0}$$

Dividiendo la viscosidad específica por la concentración del polímero en disolución, se obtiene la viscosidad reducida (η_s/c), pero esta sigue siendo una viscosidad dependiente de la concentración del polímero. Para eliminar esta dependencia se utiliza la viscosidad reducida o intrínseca, que se define como:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} (\eta_s / c)$$

Para determinar la viscosidad intrínseca de las disoluciones de los polímeros, se mide la viscosidad específica para valores decrecientes de la concentración. La representación de η_s/c frente a la concentración y extrapolando la recta a concentración cero, se obtiene la viscosidad intrínseca. La relación entre la viscosidad intrínseca y el peso molecular se define mediante la conocida ecuación de Mark-Huggins:

$$[\eta] = KM^a$$

donde K y a son parámetros viscosimétricos que dependen del solvente y del tipo de polímero para una temperatura dada.

4.5.3.- Estudio de la viscosidad.

Las medidas de la viscosidad de los geles se realizaron utilizando un viscosímetro Brookfield, modelo RTV, provisto de un microadaptador SSA con el objeto de poder realizar las mediciones con volúmenes de 5 mL, a una temperatura de 25 ± 0.1 °C. Este último se sumerge en el seno del gel aplicándole un movimiento de rotación a diferentes velocidades. Todas las mediciones de la viscosidad fueron tomados directamente del equipo a los 2 minutos después de comenzar la medición y se reporta el valor promedio de cinco medidas. Previamente se efectuó una calibración del equipo utilizando como patrón una glicerina de viscosidad conocida.

4.5.4.- Estudio del pH.

En la medida de los valores de pH de los geles preparados se utilizó un pH-Metro, modelo C6-841, previamente calibrado con soluciones estándar de Tritisol® (Merck). Todas las mediciones se realizaron a temperatura ambiente. Se sumerge el electrodo en el seno del gel tratando de que este quede cubriendo totalmente al electrodo. Las medidas del pH fueron realizadas a partir de 1 hora hasta 3 horas después de preparados los geles, con un intervalo de 30 minutos entre ellos y posteriormente se realizó una medición a las 24 horas. Se reporta el promedio de, al menos, tres medidas.

4.5.5.- Análisis Termogravimétrico (TGA).

Se evaluó la estabilidad térmica de los geles y composites obtenidos mediante la técnica de análisis térmico diferencial (DTA). El analizador termogravimétrico utilizado fue de la casa Perkin-Elmer, modelo TGA-7 y consta de un horno de precisión que dispone de una balanza sensible en el orden de los 10^{-6} g, que permite seguir la evolución de la pérdida de peso de la muestra con la temperatura. Las medidas se realizaron a una velocidad de $10\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$ y en el intervalo de temperaturas entre los 40 y los $500\text{ }^{\circ}\text{C}$, bajo atmósfera de nitrógeno. En todos los casos la cantidad de muestra estuvo entre los 5 y los 10 mg .

4.5.6.- Determinación de la temperatura de polimerización.

La determinación de la temperatura de polimerización se lleva a cabo en un molde de teflón de las siguientes dimensiones: 6 mm de diámetro y 5 mm de profundidad. La temperatura del ensayo oscilo en el intervalo de $20 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ y fue controlada con un termopar acoplado a un sistema de medición TERMOPAR 3250 tal y como se muestra en la Figura 56.

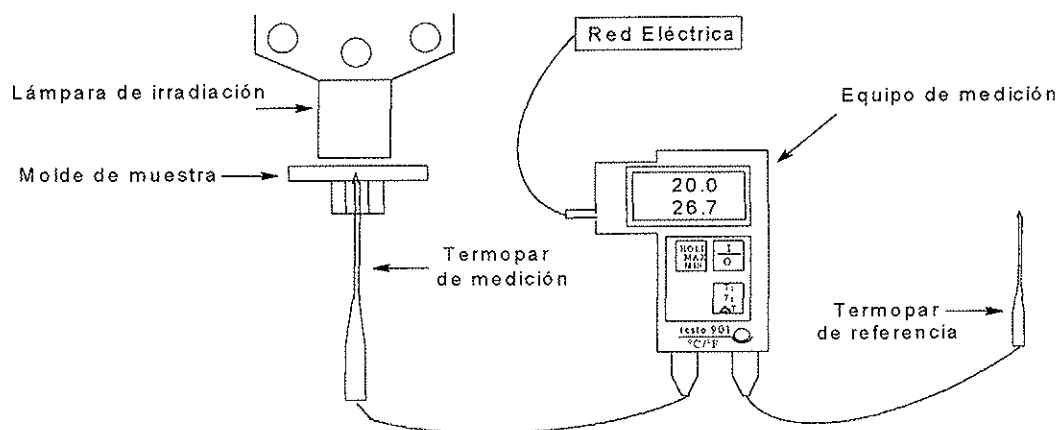


Figura 56.- Sistema de medición empleado en la medición de la temperatura de polimerización.

La fuente de iluminación, una se coloca a 2 mm de la superficie del material y se irradia hasta que la temperatura máxima alcanzada varió solo $0.2\text{ }^{\circ}\text{C}$. La punta del termopar fue introducida hasta llegar a 2 mm de la superficie de irradiación en todos los casos. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

4.5.7.- Determinación del por ciento de dobles enlaces residuales (DER).

Este parámetro se determinó a las 24 horas después de iluminación de las muestras ya que después de este tiempo de reacción, no se observan cambios significativos en %DER medidos mediante FTIR. Las polimerizaciones fueron realizadas depositando una porción del composite en un molde cilíndrico de 5 mm de diámetro y 5 mm de altura. Posteriormente se irradiaban con la lámpara de luz UV-Visible durante 1 minuto por cada cara del material. El composite polimerizado se retira del molde y se guarda en una estufa a 37 °C durante 24 horas. Un homologo de este composite se sumerge en 10 mL de solución de SBF y se somete a las mismas condiciones de almacenamiento para determinar el %DER en solución. A las 24 horas se retiraban ambas muestras y se obtenían los espectros IR correspondientes. Además, se obtienen los espectros IR de los composites sin polimerizar en pastillas de KBr.

El método para la determinación del por ciento de dobles enlaces residuales (%DER), consiste en la medida de la relación de absorbancias de las bandas de vibración de valencia de los dobles enlaces alifáticos a 1638 cm⁻¹ y la absorbancia de la banda de vibración de valencia del grupo carbonilo presente en el polímero acrílico ubicada en los 1720 cm⁻¹ antes y después de la polimerización. Esta última banda permanece constante durante toda la reacción, por lo que puede ser usada como patrón interno. El %DER se calcula según:

$$\%DER = \frac{[Abs(C = C) / Abs(C...C)]_{polimero}}{[Abs(C = C) / Abs(C...C)]_{monomero}} \times 100$$

4.5.8- Análisis Mecánico-Dinámico (DMA).

El análisis mecanodinámico, DMA, es una técnica que permite obtener información sobre las propiedades viscoelásticas de un polímero, al medir la respuesta mecánica del mismo cuando es deformado mediante un esfuerzo periódico.

Es sobradamente conocido que en un material viscoelástico la deformación producida por un esfuerzo de tipo sinusoidal está desfasada, siendo el módulo resultante complejo, con un componente elástico denominado módulo de almacenamiento (E'), y otro viscoso denominado

módulo de pérdida (E''). Al cociente entre la energía disipada y la energía almacenada se le denomina tangente de pérdida y se simboliza como $\tan \delta$.

En el análisis mecanodinámico se determina la variación de los módulos en función de la temperatura y de la frecuencia. Este tipo de medidas proporciona información sobre los movimientos locales de las cadenas poliméricas a temperaturas inferiores a la temperatura de transición vítrea (T_g) y de los movimientos segmentales generalizados, correspondientes a esta transición. En ambos casos se manifiestan como máximos, tanto en el módulo de pérdida como en la tangente de pérdida. En el caso de los polímeros semicristalinos estos máximos se ven perturbados por la presencia del cristal. Estas relajaciones llevan asociadas una energía de activación, ya que se obtiene de la variación de los máximos en función de la frecuencia y que corresponde a un comportamiento de Arrhenius en el caso de las relajaciones secundarias, por debajo de la T_g . Sin embargo, la T_g está gobernada por el volumen libre y se ajusta mejor a las expresiones de Williams-Landel-Ferry o de Vogel-Fulcher²³¹.

En el presente trabajo se realizaron las mediciones correspondientes en un analizador mecanodinámico TA Instruments, DMA 983. Aunque el equipo está diseñado para trabajar en diferentes modos de operación, se escogió el de oscilación a frecuencia fija, con el modo de deformación en flexión. Las muestras se prepararon en formas de pastillas rectangulares. Las mordazas utilizadas fueron de tipo vertical con sujeción en dos puntos, formando parte de dos brazos paralelos, que están montados en unos pivotes flexibles que permiten la oscilación a la misma frecuencia. Uno de los brazos se mueve mediante un rotor electromagnético mientras que el otro está fijo y acoplado al equipo. La respuesta de la muestra al esfuerzo aplicado se mide mediante un transductor.

Las dimensiones de las probetas una vez colocadas en las mordazas, fue de 11 x 10 x 2 mm. Las muestras fueron medidas a un valor de frecuencia de 1 Hz y una amplitud de oscilación de 0.4 mm en todos los casos. La velocidad de barrido fue de 5 °C/min desde los 40 a 200 °C.

4.5.9.- Determinación de la temperatura de transición vítrea (T_g).

Para la determinación del valor de la Tg de los geles y composites preparados se utilizó un Calorímetro Diferencial de Barrido Perkin-Elmer DSC-4. Las medidas se realizaron en cápsulas de aluminio tapadas, bajo flujo de nitrógeno y a una velocidad de calentamiento correspondiente a 10 °C/min, en todos los casos. Antes de comenzar la medida las muestras fueron acondicionadas por calentamiento hasta 80 °C, durante los primeros 5 minutos, con el objetivo de eliminar los restos de fotoiniciador que pudieran quedar ocluidos en los materiales. El calorímetro fue calibrado (temperatura y entalpía) con patrones de indio y zinc.

4.5.10- Ensayos mecánicos.

A título general, y con la intención de recordar los conceptos generales empleados en los resultados obtenidos en el estudio de las propiedades mecánicas de nuestros materiales, a continuación se describen, de forma resumida, dichos conceptos:

Cuando un material sufre una deformación mecánica, la fuerza (F) que se ejerce por unidad de superficie (S) se define como tensión (σ) y normalmente se expresa mediante la expresión:

$$\sigma = \frac{F}{S}$$

Al aplicar una carga sobre un material se pueden producir, solas o en combinación, tres tipos de tensiones sobre el mismo:

1. Tracción. Fuerzas que intentan “separar” un objeto.
2. Compresión. Una carga sobre un objeto.
3. Torsión. Cargas que conducen al “deslizamiento” de unas capas del material sobre otras.

Como resultado de aplicar una carga en el objeto tiene lugar una deformación (L), que se clasifica de acuerdo con el tipo de carga aplicada, tal y como se aprecia en la Figura 57.

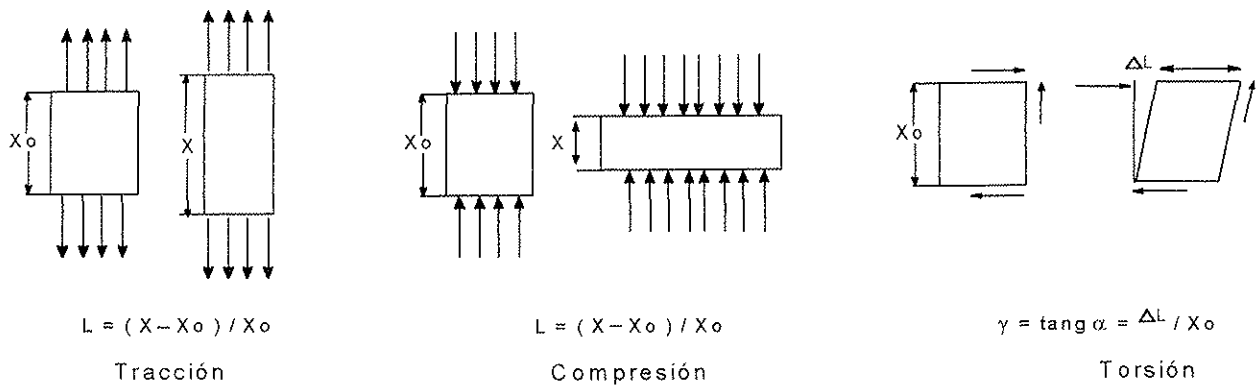


Figura 57.- Tipos de deformación.

Al representar, de forma gráfica, el comportamiento tensión-deformación, se obtiene una curva que se corresponde a la respuesta continua del material a la fuerza aplicada (Figura 58).

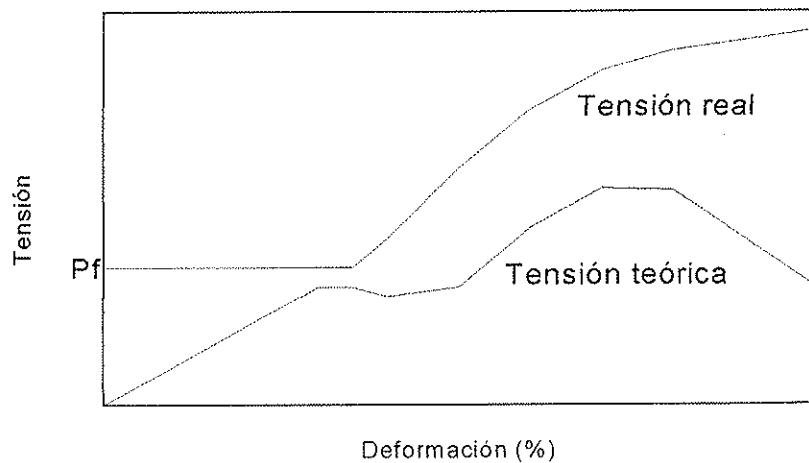


Figura 58.- Comportamiento de tensión-deformación de un material ideal.

Esta curva está dividida por el punto de fluencia (Pf) entre las regiones elástica y plástica. En la región elástica la deformación aumenta en proporción directa a la tensión según la Ley de Hooke:

$$\sigma = E \cdot \varepsilon$$

La pendiente (E) se denomina módulo de Young o módulo de elasticidad, y representa el valor de la relación tensión-deformación. Cuanto más rígido sea un material, mayor será su

módulo de Young, siendo, por tanto, más difícil deformarlo. Las unidades de E son iguales a las de la tensión (Pa), ya que el grado de deformación (ε) es un parámetro adimensional.

Una vez sobrepasado el punto de fluencia, en la región plástica, la deformación no es proporcional a la tensión; además, al eliminar la tensión aplicada, el material no recupera la forma original, sino que permanece deformado, denominándose a este fenómeno deformación plástica. Como se observa en la curva de tensión teórica, el punto de máxima tensión va seguido de una disminución aparente, hasta que se alcanza un punto en el que el material rompe. En el caso de la deformación no-plástica los átomos se mueven de una forma limitada unos sobre otros, y al eliminar la carga los átomos vuelven a su posición original. Cuando un material se deforma plásticamente, los átomos se mueven unos sobre otros de forma que sus átomos vecinos son distintos de los que tenía inicialmente; al eliminar la carga, no pueden recuperar sus posiciones iniciales.

4.5.10.1.- Ensayos de Tracción.

Los ensayos se realizaron en una Máquina Universal de Ensayos MTS Synergie 200, con una célula de 100 N y a una velocidad de 0.5 mm/minuto. La distancia entre mordazas fue de 1 cm. El instrumento es controlado a través del programa informático Test Works 4.0 ver. 4.01 Build 164. El programa analiza el comportamiento de la elongación del material con respecto a la fuerza ejercida sobre el y nos da como resultado diferentes parámetros de interés, entre los que encontramos tensión máxima (T_m , MPa), elongación en ruptura (X , mm), carga máxima (C_m , N) y módulo de elasticidad (E , GPa). Los resultados mostrados son la media de seis experiencias realizadas por cada muestra.

4.5.10.2.- Ensayos de Compresión.

Los ensayos se realizaron en una Máquina Universal de Ensayos Instron. Microtest, Modelo 1114, con una célula de carga de 500 Kg y a una velocidad de 0.5 mm/minuto. El instrumento es controlado a través del programa informático Microtest S.C.M. 3000 ver. 3.3. El programa analiza el desplazamiento que realiza en el eje transversal las placas de compresión con respecto a la fuerza que se ejerce sobre la muestra dando como resultado una gráfica de

Fuerza (F , N) versus desplazamiento (X , mm). De las gráficas obtenidas, y a través de las expresiones correspondientes es posible calcular la resistencia a la compresión (σ_c , MPa), y el correspondiente modulo de elasticidad (E_c , GPa). Los resultados mostrados son la media de seis experiencias realizadas por cada muestra.

4.5.11.- Ensayos de hinchamiento. Preparación de muestras.

Se prepararon pastillas de muestra mediante irradiación, a través de cristales de cuarzo de 0.5 mm de espesor, en moldes circulares de 21 mm de diámetro y 0.5 mm de espesor, con una lámpara de irradiación UV-Visible Visilux 2 3M, a una longitud de onda de 480 nm y una intensidad de luz incidente de 3 mcal/s, a temperatura ambiente durante 1 minuto por cada lado de cada espécimen. Las muestras se colocaron en bolsas de poliéster poroso, con el objetivo de mantener la pastilla en posición vertical en la solución de SBF y permitir la difusión por ambas caras, y se pesan. Se procede a su inmersión en 50 mL de solución de SBF, a una temperatura de 37 °C, en un baño adecuado. Durante los primeros 5 minutos de inmersión se retira la muestra, se seca y se pesa cada minuto. Posteriormente la medida del peso se realiza cada 5 minutos. Transcurrida la primera media hora del ensayo esta medida se realiza cada treinta minutos. Se toma como peso final la medida que se realiza a las 24 horas de comenzado el ensayo. La solución de SBF se cambió periódicamente en el transcurso del ensayo.

4.5.12.- Preparación de muestras para el ensayo de degradación.

Las muestras para el ensayo se polimerizaron por irradiación, a través de cristales de cuarzo de 0.5 mm de espesor, en moldes rectangulares de teflón de dimensiones 30 x 10 x 2 mm, con una lámpara de irradiación UV-Visible Visilux 2 3M, a una longitud de onda de 480 nm y una intensidad de luz incidente de 3 mcal/s, a temperatura ambiente y sin control de la humedad durante 1 minuto por cada lado de cada espécimen. Inmediatamente se colocaron en frascos que contenían 20 mL de la solución de SBF, de tal forma que el medio rodeara totalmente a ambas superficies de la muestra. Se realizaron un total de 3 muestras para cada contenido de relleno estudiado.

Capítulo V.- Conclusiones

- Se ha desarrollado una metodología para la organofilización de la superficie de hidroxiapatita (HA) con agentes que presenten grupos carboxílicos en su estructura. Además, se puso a punto una técnica para la determinación del grado de modificación de la HA por Ultravioleta Visible. La funcionalización de la HA se ve favorecida a valores de pH neutro y cuando existe una mayor cantidad de grupos carboxílicos en la estructura del agente funcionalizante.
- La presencia de HA en los composites preparados, conlleva una disminución en la velocidad de fotopolimerización cuyo comportamiento puede explicarse mediante la Teoría de las Tres Fases (TTF). El empleo de HA funcionalizada, para un mismo contenido de HA, da resultados inversos, debido a la compatibilización que alcanza el relleno y la matriz orgánica.
- Con el aumento del contenido en ácido acrílico en los composites preparados aumenta la velocidad de fotopolimerización de estos materiales. Dicho aumento corresponde, no solo al simple aumento de la concentración de monómero, sino también a la mejora de la compatibilización que se alcanza al utilizar HA funcionalizada. Mediante FTIR se demostró la existencia de una reacción entre el ácido acrílico y la HA.
- Para todo el amplio intervalo de composiciones estudiado, se ha comprobado que la temperatura máxima de polimerización (T_{max}) no excedió, en ningún caso, los 40 °C lo cual indica que es posible utilizar estos materiales sin peligro de necrosis térmica en los tejidos que rodean al sitio del posible implante. La variación de la naturaleza del relleno trae consigo solo un ligero aumento de la temperatura y el incremento del contenido en carga el efecto inverso.
- Se ha comprobado que existe una relación directa entre el por ciento de dobles enlaces residuales y contenido en relleno, para todos los materiales en estudio. De forma general, los valores obtenidos en solución de suero fisiológico (SBF) fueron menores que los que presentan en fase seca. Los materiales preparados con HA funcionalizada presentan un menor %DER que sus homólogos en el caso de la fase seca y superiores en SBF.

- A medida que aumenta la cantidad de carga en el composite, su grado de hinchamiento disminuye, al disminuir la fase hinchable presente en el sistema. El proceso de difusión en SBF de estos materiales se modifica también con el aumento de relleno, acercándose a un comportamiento cinético de primer orden (Ley de Fick), con disminución del coeficiente de difusión. En este mismo sentido pasados los primeros minutos de inmersión, se observó que el sistema seguía una cinética de segundo orden (Ley de Schott). La funcionalización del relleno trae consigo un aumento del valor del coeficiente de difusión, modificándose ligeramente la cinética de hinchamiento.
- La incorporación de HA conlleva a una mejora de la resistencia térmica de estos materiales. El empleo de HA funcionalizada, de mayor densidad, trae como resultado una disminución de esta resistencia, debido a la fase orgánica presente en la superficie del relleno, así como al mayor contenido, en volumen, de gel como matriz orgánica.
- Los resultados obtenidos en la determinación de las temperaturas de transición de estos composites, muestran que al incrementar la cantidad de HA, la Tg correspondiente al PAA aumenta, debido a la disminución de la movilidad de las cadenas del polímero en la vecindad de las partículas de relleno y a las interacciones entre HA y PAA. Una segunda transición, a mayores temperaturas, es asignable a la transición correspondiente a la amida que se forma en el sistema producto del calentamiento al cual es sometida la muestra. Esta transición permanece constante con la composición, debido a que no presenta ningún tipo de interacción con el relleno.
- Los ensayos de degradación de los composites en SBF muestran que en todos los casos queda monómero sin polimerizar y este sale al medio en los primeros estadios de inmersión de la muestra, siendo mayor la pérdida de peso en los materiales con menor contenido en relleno. Posteriormente, aparecen las primeras señales de erosión superficial del material, en forma de grietas y fisuras, que permiten la salida de las fracciones de polímero de bajo peso molecular, y monómero sin polimerizar, al medio de degradación. El empleo de HA funcionalizada en la preparación de estos composites, trae consigo un aumento en la pérdida de peso de los materiales preparados y una disminución del tiempo al cual se detecta la formación de defectos superficiales.

Anexos

FOTOPOLIMERIZACIÓN RADICAL.

Durante la última década los procesos de fotopolimerización han experimentado un notable desarrollo dentro de las aplicaciones industriales y médicas²³². Como bien indica la palabra, en este proceso juega un papel fundamental la luz, que interviene en la primera parte de la reacción dando lugar a las especies que iniciaran la polimerización. Sin dejar a un lado la búsqueda de nuevos polímeros, con estructuras que cumplan los requerimientos necesarios para una determinada aplicación, se investiga en las modificaciones de polímeros conocidos, mediante reacciones químicas (copolimerizaciones, injertos, etc) o combinaciones de tipo físico (mezclas o blendas en el caso de otros polímeros y composites si se trabaja con fibras o rellenos inorgánicos). Esto hace de los materiales poliméricos fotosensibles un campo atractivo para el desarrollo de diversas aplicaciones, como por ejemplo: sistemas formadores de imagen, recubrimientos y sellantes y obturantes dentales, entre otras^{233,234,235}.

En los procesos de fotopolimerización en cadena o polimerización fotoiniciada, como es el caso que nos ocupa, en función de la naturaleza de la especie que inicia y se propaga, puede establecerse una clasificación atendiendo al tipo de iniciación del proceso de polimerización: radical (vía radicales libres), catiónica (vía cationes) y aniónica (vía aniones)²³⁶.

En todas ellas, existen tres etapas bien diferenciadas: la *iniciación*, en la que a partir de un compuesto o sistema denominado iniciador, se crea una especie activa, a la que se unirán posteriormente las unidades de monómero en la etapa de *propagación*, y la etapa de *terminación*

que transcurre, de forma general, por interacción entre dos especies activas, bien combinándose o desproporcionándose.

Simultáneamente con estas reacciones pueden tener lugar reacciones secundarias, como las denominadas de transferencia de cadena, en las que la actividad de la cadena en crecimiento pasa a otra especie, que una vez activadas es capaz de iniciar la polimerización. Por lo general, estas reacciones conllevan una disminución de los pesos moleculares obtenidos.

El primer paso que obligadamente tiene lugar, en una fotopolimerización, consiste en la absorción de la luz incidente por el fotoiniciador el cual da lugar a una especie electrónicamente excitada que conduce a la formación de la primera especie activa, por lo cual se la denomina también polimerización fotoiniciada.

El sistema de fotoiniciación más simple es aquel en que la molécula que absorbe luz produce la iniciación, este es el caso de los fotoiniciadores que actúan por fragmentación. Sin embargo, en otros sistemas, como el que se empleará en el presente estudio, interviene una segunda molécula, denominada coiniador, que en el caso de que el mecanismo sea a través de un proceso de abstracción de hidrógeno actuará como donador de hidrógeno.

El sistema iniciador en este caso consta, por tanto, de dos especies:

- Fotoiniciador: cuya función principal es la de absorber eficazmente luz, generando un estado electrónicamente excitado, el cual reacciona bien directamente (fotopolimerización), o bien con el coiniador y, por ejemplo, abstrae hidrógeno.
- Coiniciador: No absorbe luz directamente, pero interviene de forma directa en la iniciación, por ejemplo transfiriendo un hidrógeno a la especie excitada electrónicamente.

Las reacciones de fotopolimerización en cadena, se pueden llevar a cabo, tanto en un medio homogéneo, polimerización en disolución o en bloque, o en un medio heterogéneo, en suspensión y en emulsión.

En la industria médica el proceso de curado fotoquímico no se introdujo hasta mediados de 1970, en el caso de la práctica odontológica²³⁷. Los materiales preparados mediante este procedimiento presentan actualmente una alta demanda en el mercado. Las razones que justifican este interés residen en las siguientes características: a diferencia de la mayoría de los iniciadores que actúan térmicamente, los fotoiniciadores pueden reaccionar a temperatura ambiente, sin aporte térmico adicional; la velocidad de curado es superior a la de otros sistemas, llegándose a completar incluso en fracciones de segundos en algunos casos, además de ofrecer control temporal, ya que la reacción puede interrumpirse al cortar la luz, y por último, en estos sistemas la reacción puede realizarse localmente, lo cual se conoce como control espacial.

De esta manera, la fotopolimerización brinda al experimentalista una mayor facilidad a la hora de la aplicación del material, proporcionando a su vez al polímero obtenido similares o mejores propiedades que los sistemas autocurados²³⁸.

Además de lo mencionado anteriormente, los materiales fotopolimerizables se presentan, de forma general, en un solo componente, que contiene la parte polimerizable, junto al sistema de iniciación, lo que garantiza un fraguado rápido en el momento de la aplicación al incidir sobre el material un haz de luz.

Proceso de Fotoiniciación.

La eficiencia de un proceso de fotopolimerización depende, en gran medida, del fotoiniciador que se emplee y de la reactividad de las especies iniciadoras generadas. Es por ello que el fotoiniciador constituye una parte fundamental en el desarrollo de un material fotocurado. A la hora de evaluar un sistema fotoiniciador es necesario estudiar los siguientes procesos primarios de la etapa de fotoiniciación:

- Absorción de luz y creación de estados excitados.
- Generación de radicales primarios iniciadores a partir de los estados excitados, mediante reacciones unimoleculares de fragmentación o reacciones bimoleculares con el coiniador.

- Iniciación de la polimerización mediante la reacción de los radicales procedentes del sistema iniciador con monómeros u oligómeros reactivos.

De forma general, el fotoiniciador al absorber luz es promovido al primer estado excitado singlete, el cual, debido a un rápido cruce intersistema, pasa al estado triplete. Es desde este estado excitado donde, generalmente, se producen los radicales primarios capaces de reaccionar con la molécula de monómero e iniciar el proceso de polimerización. Asimismo, la formación de radicales compite con otros procesos de desactivación del estado excitado triplete: fosforescencia, conversión intersistema, desactivación bimolecular, autodesactivación y transferencia de energía tal y como se muestra la Figura 59.

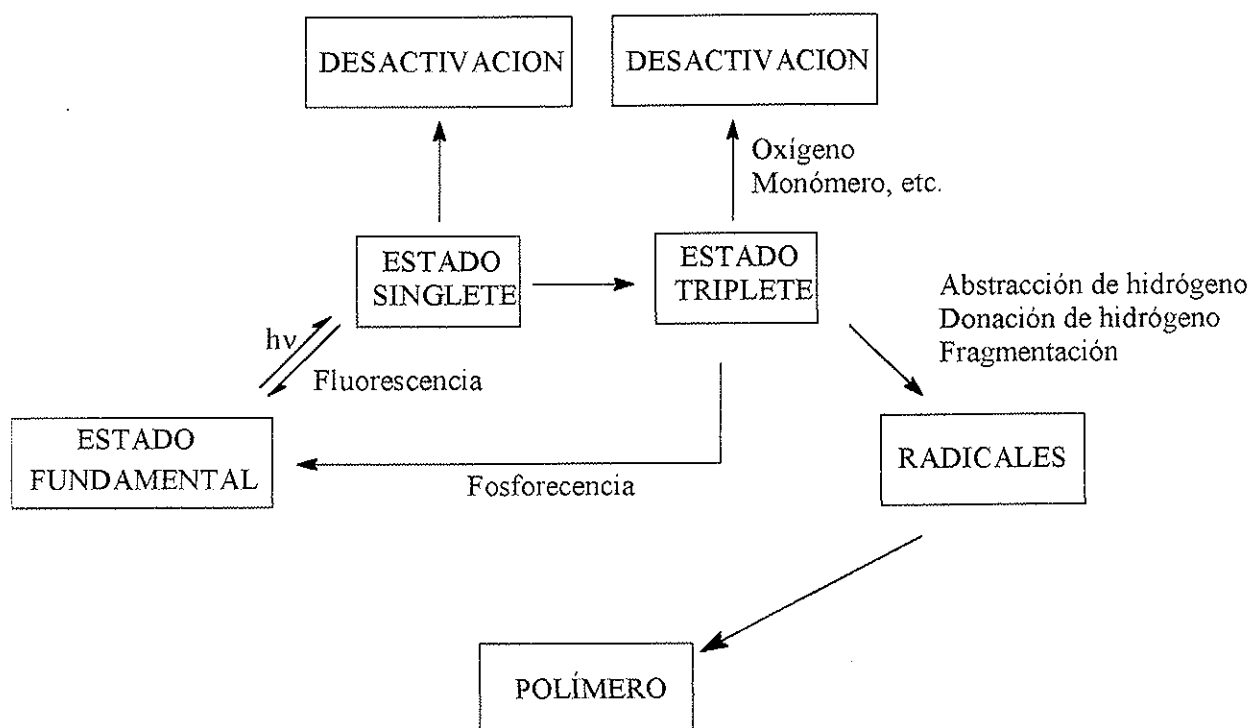


Figura 59.- Esquema de la fotoiniciación de la polimerización.

Como anteriormente señalamos, los fotoiniciadores se dividen en dos grandes grupos, dependiendo del tipo de reacción fotoquímica responsable de la formación de radicales: de tipo I, que reacciona mediante una reacción unimolecular, y los de tipo II, que lo hacen mediante reacciones bimoleculares. El fotoiniciador utilizado en este trabajo corresponde a los del tipo II, por lo que a continuación se describen los aspectos de su comportamiento bajo irradiación.

Fotoiniciadores de tipo II. Mecanismo de iniciación.

Las reacciones que producen los radicales libres en este tipo de fotoiniciadores son:

- Captura directa de hidrógeno, este proceso puede ser intramolecular o intermolecular. En el último caso las aminas y los alcoholes son los donadores de hidrógeno que se utilizan con mayor frecuencia como coiniciadores y en especial las aminas terciarias alifáticas.
- Captura de hidrógeno en dos pasos: transferencia electrónica seguida de transferencia protónica.

En los primeros materiales fotocurables desarrollados, el proceso de fraguado o polimerización se llevaba a cabo por la acción de luz ultravioleta (UV), en presencia de fotoiniciadores capaces de producir una adecuada cantidad de radicales libres al ser irradiados con longitudes de onda dentro del intervalo de la luz UV, por ejemplo, compuestos análogos del éter metílico de la benzoína, tal y como se muestra en la Figura 11a. Sin embargo, estos sistemas de iniciación han sido sustituidos rápidamente por otros sistemas fotosensibles a la luz visible, debido, fundamentalmente a razones de peligrosidad de la luz UV como: potencial daño ocular que puede provocar tanto al operario como al paciente en el momento de su aplicación, su carácter cancerígeno y el peligro de quemadura de tejidos²³⁹.

Por ello, actualmente, en la cavidad oral solo está permitido el empleo de radiaciones de longitudes de onda por encima de los 400 nm. Entre los compuestos que absorben en este intervalo de longitudes de onda se encuentran las dicetonas y las cetonas aromáticas de las cuales la más utilizada y aceptada por la FDA (Food and Drugs Association), es la camforquinona (CQ)²⁴⁰, que presenta un máximo de absorción de luz en los 470 nm.

Esta dicetona, en combinación con una amina terciaria (coiniciador), forma, al ser irradiada, a través de un mecanismo de transferencia de carga, el correspondiente excíplejo, cuya descomposición conduce a la formación de amino-radicales capaces de iniciar el proceso de polimerización del material. Las estructura de este fotoiniciador se muestran en la Figura 60b.

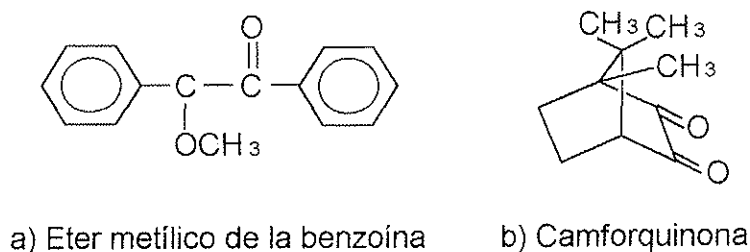


Figura 60.- Fotoiniciadores de uso más común en sistemas de iniciación fotopolimerizables.

La mayoría de las reacciones orgánicas bimoleculares fotoquímicas transcurren a través del estado excitado triplete. La captura de hidrógeno intermolecular puede transcurrir por dos mecanismos: la captura directa de hidrógeno a partir del estado excitado, y la transferencia electrónica seguida de una transferencia protónica. En cualquiera de ambos casos es necesaria la presencia de un coiniador de la polimerización que actúa como donador de hidrógeno. En general, se suelen emplear con este fin como las aminas terciarias²⁴¹.

La eficiencia de este sistema de iniciación depende, en cierta medida, de la naturaleza del coiniador, de las concentraciones de CQ y amina, así como de la relación entre ambos, e incide directamente sobre las propiedades químico-físicas, físico-mecánicas, clínicas y estéticas de las formulaciones fotocuradas. Entre estos coiniadores o aceleradores de la polimerización se encuentran las aminas terciarias aromáticas y más recientemente las alifáticas, funcionalizadas capaces de copolimerizar con monómeros metacrílicos, dando lugar a los llamados sistemas híbridos de fotoiniciación.

Es importante establecer el límite inferior de las concentraciones de fotoiniciador y de coiniador (sin afectar la eficiencia del sistema de iniciación), ya que el exceso de ambos empeora las propiedades estéticas del material final (la CQ proporciona una coloración amarilla al material y la amina contribuye a la inestabilidad del color mediante la formación de productos colaterales de oxidación). Además, las aminas residuales aumentan la toxicidad potencial de estas formulaciones, debido a su carácter tóxico y mutagénico²⁴².

Es de destacar que para disminuir el efecto tóxico del coiniador se ha empezado a utilizar aminas terciarias de alto peso molecular que debido a su voluminosidad, presentan menor volatilidad, menor velocidad de difusión hacia el medio fisiológico y un menor potencial de

penetración en los tejidos blandos, disminuyendo así su toxicidad²⁴³. En la Figura 61 se muestran las estructuras de las aminas más comunes, utilizadas en materiales fotopolimerizables.

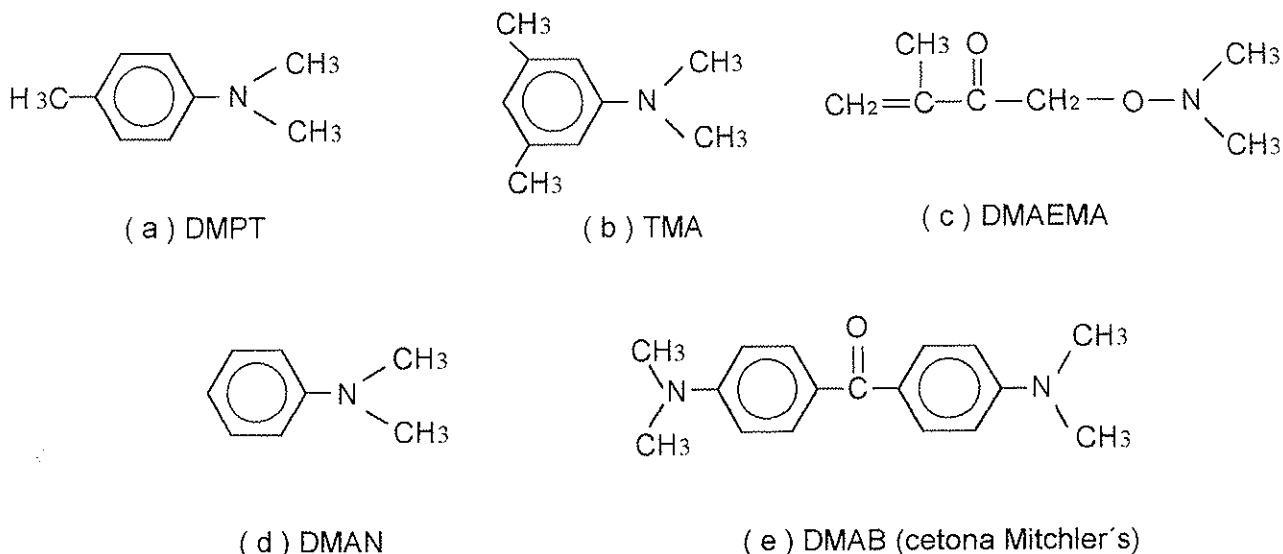


Figura 61.- Ejemplos de aminas utilizadas como coiniciadores en sistemas de fotoiniciación.

Al absorber la luz visible, la molécula de la CQ pasa primeramente a su estado excitado singlete (S_1), y a continuación al estado excitado triplete (T_1), mediante una conversión intersistema de extremada rapidez ($\sim 10^{10} \text{ s}^{-1}$). Este estado triplete interacciona con la amina formando un complejo de transferencia de carga (exciplejo)²⁴⁴.

Una vez formado el exciplejo este puede desaparecer por tres vías: desactivación, la cual conduce a los productos de partida; transferencia de un electrón de la amina al triplete, para dar lugar al catión radical-amino y al anión radical pinacol-camforquinona que pueden revertir a los productos de partida; transferencia de hidrógeno de la amina al fotoiniciador, para formar radicales alquilaminos y pinacol-camforquinona. Los radicales alquilaminos son los verdaderos iniciadores de la polimerización radical en cadena, por lo que la naturaleza de la amina utilizada como coiniciador juega un papel fundamental²⁴⁵. En la Figura 62 se muestra el mecanismo de fotoiniciación.

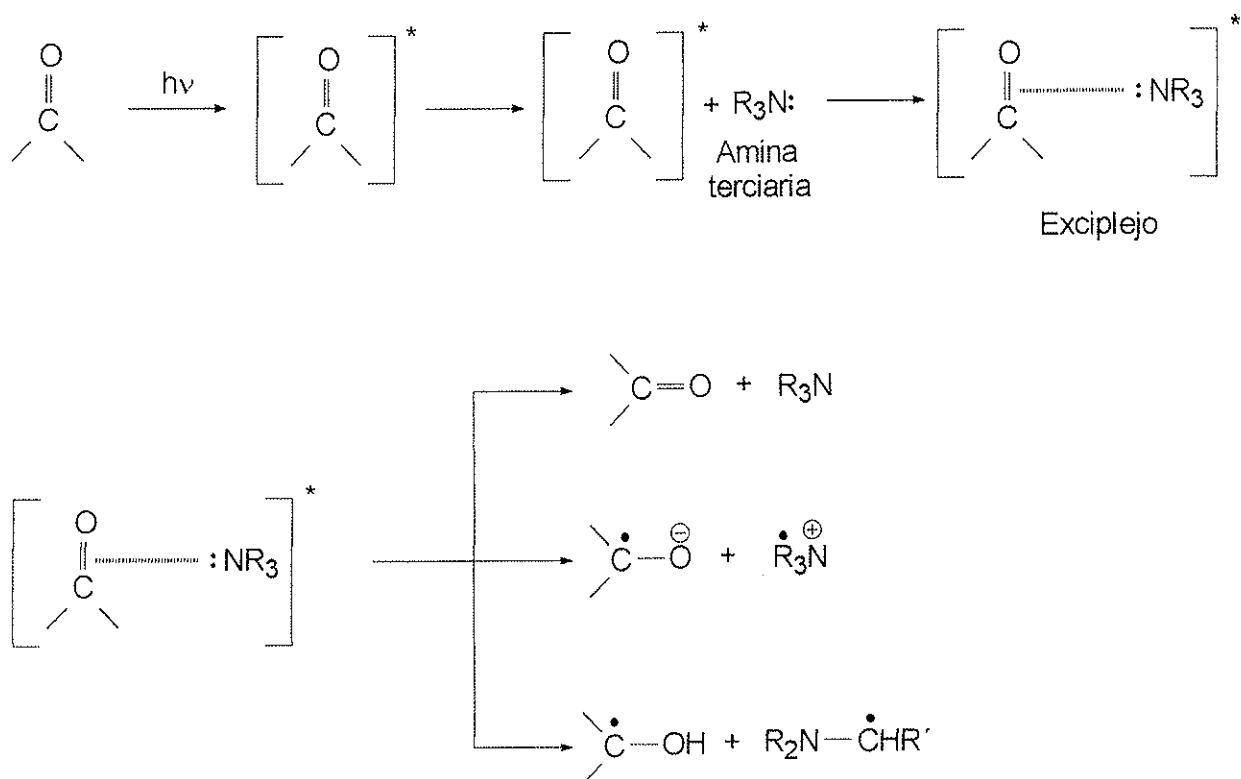


Figura 62.- Mecanismo de iniciación del sistema CQ y amina.

Las aminas presentan considerables ventajas en los procesos de captura de hidrógeno frente a otros posible donadores de hidrógeno:

- Reaccionan tanto con estados excitados tripletes de diferente naturaleza. El mecanismo de captura implica en ambos casos la formación de complejos intermoleculares de transferencia de carga o excíplejos.
- Reducen el nivel de oxígeno en la formulación fotocurable. El oxígeno desactiva los estados excitados tripletes del fotoiniciador por choque bimolecular. En presencia de una amina disminuye esta influencia del oxígeno, ya que los radicales alquilaminos reaccionan con el oxígeno del medio consumiéndolo. De esta manera se las aminas funcionan como agentes reductores, atrapando el oxígeno y disminuyendo la concentración de éste en el medio.
- Las aminas tienen también ventajas debido a su bajo potencial de ionización que favorece la formación del excíplejo mediante transferencia electrónica.

A continuación se detalla la cinética de polimerización radical fotoiniciada cuyas etapas se recogen en la Figura 63.

- *Iniciación*

$$R \cdot + M \xrightarrow{k_i} M \cdot \quad R_i = k_i [M] [R \cdot] \quad (2)$$

- *Propagación*



- Terminación

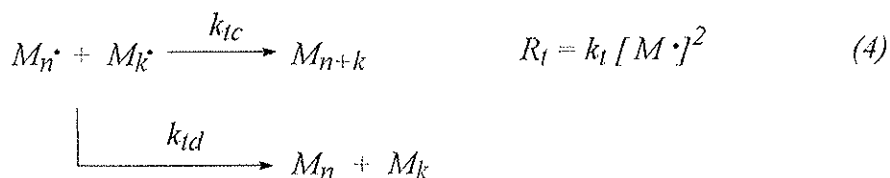


Figura 63.- Etapas de la fotopolimerización radical.

175

fotoquímica de producción de la especie iniciadora y las clásicas reacciones de iniciación, propagación y terminación.

De esta forma la primera etapa incluye la formación de los radicales libres, los cuales se adicionan a una molécula de monómero dando lugar al monómero radical. En la etapa de propagación, a estos centros activos se le adiciona monómero (macrorradical), con el crecimiento de la cadena polimérica. En la última etapa, la terminación, ocurren las reacciones de eliminación de los radicales libres, que pueden ser por desplazamiento o desproporción.

Es necesario aclarar que existen vías de terminación prematura de la cadena polimérica, mediante reacciones de transferencia de un átomo lábil, por ejemplo hidrógeno, desde algún compuesto presente en el sistema, como son el fotoiniciador, el monómero y el propio polímero.

En el esquema mostrado anteriormente se encuentran, de manera implícita, cuatro suposiciones básicas:

- Las constantes de propagación son iguales $k_{p1} = k_{p2} = \dots = k_{pn}$. La reactividad de radicales no depende de la longitud de la cadena. Las constantes de terminación no dependen tampoco de la longitud de la cadena.
- El monómero se consume fundamentalmente en la etapa de propagación.
- Se cumple la hipótesis de estado estacionario: la velocidad de iniciación es igual a la velocidad de terminación, por lo que se puede considerar que la concentración de radicales y macrorradicales es constante.
- Los radicales primarios no intervienen significativamente en la etapa de terminación.

Según el esquema propuesto, la velocidad total de la reacción depende de la velocidad de iniciación (R_i) y de la velocidad de propagación (R_p), en ausencia de procesos secundarios, por lo que la velocidad de desaparición o consumo de monómero, M , se puede expresar como:

$$-\frac{d[M]}{dt} = R_p + R_i \quad (5)$$

Puesto que el consumo de monómero en el paso de iniciación es mucho menor que en el paso de propagación, la velocidad de polimerización es prácticamente igual a la velocidad de propagación, pudiéndose expresar la ecuación (5) como:

$$-\frac{d[M]}{dt} = R_p = k_p [M][M\cdot] \quad (6)$$

Este mecanismo simplificado, asumiendo estado estacionario y que las constantes de propagación y terminación no dependen del tamaño del macrorradical, lleva a que R_p pueda ser expresado en función de estos parámetros de la siguiente manera:

$$R_p = -\frac{d[M]}{dt} = \frac{k_p}{k_t^{1/2}} R_i^{1/2} [M] \quad (7)$$

El término polimerización fotoiniciada implica en el paso de iniciación una absorción de luz. Bajo estas condiciones, la velocidad de iniciación es directamente proporcional a la intensidad de la luz absorbida (I_a):

$$R_i = \Phi_i I_a \quad (8)$$

El término ϕ_i es el rendimiento cuántico de iniciación, que nos da una medida de los moles de radicales que inician el crecimiento de cadena producidos por mol de fotones absorbidos (einstein). La ecuación (7) puede expresarse entonces en estos términos:

$$R_p = \frac{k_p}{k_t^{1/2}} [M] (\phi_i I_a)^{1/2} \quad (9)$$

Por otra parte, la intensidad de luz absorbida es igual a la diferencia entre la intensidad de luz incidente (I_o), y la intensidad de luz transmitida por el material (I_t):

$$I_a = I_o - I_t \quad (10)$$

Puesto que la absorbancia (*Abs*), de acuerdo a la Ley de Lambert-Beer, puede expresarse de la siguiente manera:

$$Abs = \log \frac{I_o}{I_a} = \epsilon cl \quad (11)$$

donde ϵ es el coeficiente de extinción molar del fotoiniciador, c es la concentración del fotoiniciador y l es el camino óptico del sistema irradiado. Entonces:

$$I_t = I_o 10^{-\epsilon cl} \quad (12)$$

que al sustituir en la ecuación 10, queda como:

$$I_a = I_o (1 - 10^{-\epsilon cl}) \quad (13)$$

Sustituyendo en la ecuación (9) la ecuación (13) se obtiene la ecuación general de fotopolimerización:

$$R_p = \frac{k_p}{k_t^{1/2}} [M] [\Phi_i I_o (1 - 10^{-\epsilon cl})]^{1/2} \quad (14)$$

Aquí se pueden considerar tres casos:

- Altas absorbancias, $Abs > 2$, la intensidad absorbida es igual a la intensidad incidente, $I_a = I_o$, luego la ecuación anterior se transforma en:

$$R_p = \frac{k_p}{k_t^{1/2}} [M] [\Phi_i I_o]^{1/2} \quad (15)$$

- Absorbancias medias, $0.1 < Abs < 1.5$, la intensidad absorbida se deduce a partir de la ley de Lambert-Beer y la ecuación general queda expresada por la ecuación 14.
- Bajas absorbancias, $Abs < 0.1$, la intensidad de luz absorbida es:

$$I_a = 2.303 I_o \epsilon c l \quad (16)$$

quedando la ecuación:

$$R_p = \frac{k_p}{k_t^{1/2}} [M] [2.303 \Phi_i I_o \epsilon c l]^{1/2} \quad (17)$$

La eficiencia de un fotoiniciador puede describirse por dos rendimientos cuánticos: de iniciación (ϕ_i) y de polimerización (ϕ_m). Este último nos da la medida de los moles de unidades monoméricas adicionadas por mol de fotones absorbidos (en einstein). Ambos, en ausencia de reacciones de transferencia de cadena, están relacionados por el grado de polimerización (GP), de la siguiente forma:

$$\Phi_i = \frac{R_i}{I_a} \quad \text{y} \quad \Phi_m = \frac{R_p}{I_a} \quad (18)$$

$$GP = \frac{\Phi_i}{\Phi_m} = \frac{R_p}{R_i} \quad (19)$$

De la ecuación 18 se desprende que el grado de polimerización es inversamente proporcional a la velocidad de iniciación.

Proceso de Fotopolimerización.

El primer estudio sistemático de la dependencia de la velocidad de reacción con respecto a variables como: intensidad de luz incidente, concentración de fotoiniciador, concentración de monómero y temperatura aparece en 1979²⁴⁷. Desde entonces, la cinética de fotopolimerización de

monómeros ha sido estudiada por muchos autores. Sin embargo, el mecanismo completo no ha sido completamente elucidado en algunos detalles.

Las curvas cinéticas obtenidas en presencia de aire, que es el medio más usual, tienen de forma general una forma sigmoideal, con un período de inducción inicial debido a la presencia del oxígeno atmosférico, que es un reconocido inhibidor de la polimerización radical²⁴⁸. En la polimerización en bloque, a medida que la polimerización avanza, el incremento de la formación de polímero inhibe la difusión del monómero y de otras especies insaturadas a los sitios o puntos donde se produce la reacción de propagación.

De esta manera, existe un gran número de radicales que comienzan a “congelarse” en el seno del polímero formado, que se hace más acusado cuando uno de los monómeros tiene más de un doble enlace en su estructura (entrecruzamiento). El coeficiente de difusión varía con la densidad de entrecruzamiento, por lo que la constante de la velocidad de terminación cambia continuamente durante la polimerización. La reducción de movilidad causada por el incremento de la velocidad y el entrecruzamiento provoca una disminución del proceso de terminación, pero también la movilidad del monómero libre disminuye y la velocidad de polimerización comienza a estar limitada por la difusión.

Como consecuencia de este efecto, las constantes de velocidad en polimerizaciones en masa dependen de la conversión y de la contracción que alcance el sistema. Estudios realizados en la determinación de las constantes de propagación y terminación, k_p y k_t respectivamente, en la fotopolimerización del 1,6-hexanediol diacrilato a diferentes grados de conversión muestra que ambas disminuyen con el incremento del por ciento de conversión. Sin embargo, la velocidad de terminación disminuye más rápidamente que la velocidad de propagación, por lo que podemos decir que existe un control por difusión en el proceso de propagación.

De forma general, en un polímero no se alcanza el cien por cien de conversión de los dobles enlaces presentes en el medio. Esto se debe fundamentalmente a la formación de un enrejado tridimensional muy viscoso durante el proceso de propagación de la polimerización, que “atrapa” las moléculas del monómero que no han reaccionado, impidiendo su incorporación a las cadenas

poliméricas. Por la misma razón en la matriz fotocurada quedan cantidades de monómero residual y monómero “colgante” o terminal²⁴⁹.

Estudios realizados sobre la fotopolimerización de monómeros vinílicos muestran que también hay radicales libres quedan ocluidos en la matriz polimérica²⁵⁰. Estos radicales quedan atrapados desde el principio de la reacción en presencia de una gran cantidad de monómero sin reaccionar. Este proceso es indicativo de la existencia de regiones de diferentes movilidad. Estas regiones se componen de microgeles de partículas entrecruzadas en forma de aglomerados, las cuales le confieren un carácter heterogéneo a la red polimérica.

El grado de conversión de un polímero puede ser determinado mediante técnicas espectroscópicas, generalmente Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FT-IR), por técnicas calorimétricas, como el DSC, y la dilatometría, entre otras²⁵¹. La cantidad de dobles enlaces residuales, DER, es un factor significativo en cuanto a las propiedades físicas, químicas, mecánicas y además influye en la biocompatibilidad de los materiales²⁵². Con respecto a las propiedades químico-físicas y físico-mecánicas se ha demostrado que el aumento del %DER disminuye la resistencia a la degradación; reduce la dureza y la resistencia al desgaste, y afecta la estabilidad del color de estos materiales²⁵³.

Varios autores plantean que los grupos acrílicos colgantes²⁵⁴ participan en reacciones de ciclización intramolecular en dependencia de la estructura de los monómeros utilizados. Sin embargo, Brauer y col.²⁵⁵ encontraron que aún a pequeñas conversiones se restringe la movilidad del final de las cadenas reactivas, lo cual demuestra que el efecto de Trommsdorf (efecto gel o autoaceleración)²⁵⁶, es el principal causante del por ciento de DER en el material final. También la reactividad y concentración de los componentes del sistema de iniciación influyen significativamente sobre la conversión.

La autoaceleración es un proceso que está controlado, generalmente, por la difusión del sistema. Esta terminación está comprendida por difusión traslacional, difusión segmental y reacción química. La viscosidad también es pues un factor importante a tener en cuenta, ya que al ir aumentando con la conversión, la difusión de los radicales poliméricos se ve restringida severamente. Es necesario, en este caso, considerar la difusión por reacción (reaction diffusion),

además del mecanismo de terminación controlado por la difusión. Este nuevo proceso tiene lugar cuando el radical polimérico “congelado” se propaga por reacción a través del medio que contiene a los grupos funcionales que no han reaccionado, hasta encontrar un segundo radical de cadena activo con el que se produce la reacción de terminación.

Algunos estudios plantean²⁵⁷ que el mecanismo de difusión por reacción en la polimerización de monómeros con un solo doble enlace, como el caso de los monómeros acrílicos, encontrando que el mecanismo de terminación a través de la difusión por reacción se hacía dominante sólo después del comienzo del proceso de gelación, entre el 40 y el 60% de la conversión. Sin embargo, otros autores^{258,259} plantean que en el caso de los monómeros multifuncionales este mecanismo predomina desde conversiones mucho más bajas, antes del 10% de conversión. Estos estudios establecen la importancia y el significado de la terminación por difusión por reacción durante el proceso de polimerización.

QUITOSANA. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES.

Síntesis de la quitosana.

El método más utilizado en la obtención de quitosana es la reacción de conversión de quitina en este polisacárido natural. Dicho proceso se realiza mediante el tratamiento directo de la quitina con una solución concentrada de hidróxido de sodio o potasio (40 - 50%) a una temperatura de 100 °C o más, con hidrólisis de la mayoría o todos los grupos acetilos del polímero, tal y como se muestra en la Figura 64.

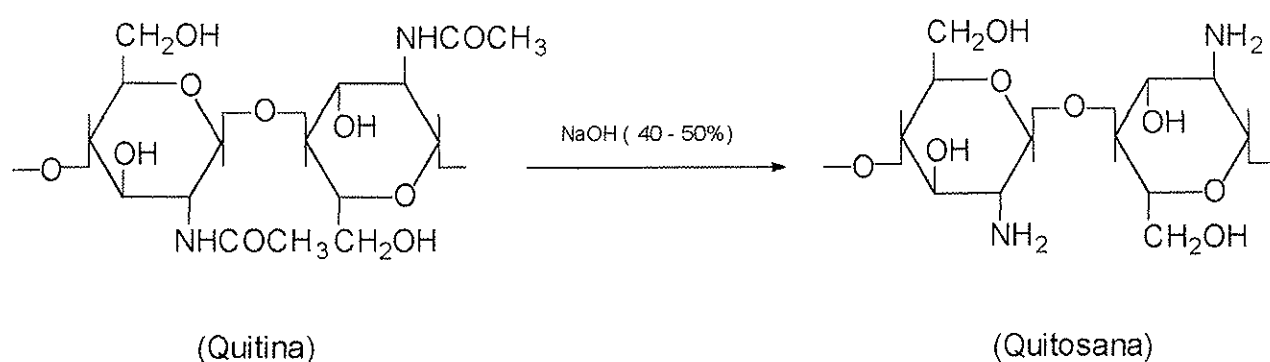


Figura 64.- Reacción de obtención de la quitosana mediante desacetilación de la quitina.

Los grupos N-acetilo de la quitina no pueden ser hidrolizados por reactivos ácidos sin provocar, a su vez, la hidrólisis del polisacárido. Por esta razón, los métodos alcalinos son los procesos comúnmente empleados para la desacetilación de la quitina. Durante este proceso son necesarias unas condiciones que permitan que el mismo transcurra en un tiempo razonable, que el rendimiento sea el adecuado y que el producto final no se degrade. Existen diversos factores que afectan el rendimiento de la producción de quitosana, como:

- Temperatura de desacetilación.
- Tiempo de reacción y concentración de la solución alcalina.
- Efecto de las condiciones de la obtención de la quitina.
- Atmósfera de reacción.
- Proporción de quitina en la solución alcalina.
- Tamaño de partícula.

a) Temperatura de desacetilación.

El efecto de la temperatura sobre la reacción de desacetilación es uno de los factores que más se ha estudiado, habiéndose encontrado que a medida que aumenta la temperatura de reacción se incrementa el por ciento de desacetilación, aunque el peso molecular disminuye debido, fundamentalmente, a las reacciones de degradación que sufren los polisacáridos. Se ha comprobado que existe una relación lineal entre la temperatura y el grado de desacetilación para el intervalo de temperaturas entre 40 y 150 °C²⁶⁰.

b) Tiempo de reacción y concentración alcalina.

A una temperatura de 100 °C y una concentración de solución alcalina del 50%, el grado de desacetilación que se alcanza durante la primera hora de reacción es aproximadamente del

68%. Sin embargo, el progreso de la reacción pasado este tiempo decrece gradualmente alcanzándose un 78% de desacetilación en 5 horas.

De este modo, el tratamiento alcalino después de 2 horas, no produce cambios significativos en el grado de desacetilación, pero si en la degradación de la cadena macromolecular de la quitosana. Estos mismos autores²⁶¹ estudiaron varias concentraciones de soluciones alcalinas de NaOH en el intervalo comprendido entre 35 y 50%, comprobando como a medida que se disminuía la concentración de NaOH, disminuía la viscosidad y el tamaño de partícula de la quitosana. Sin embargo, si las condiciones eran muy “suaves”, el producto resultante es insoluble en soluciones ácidas. Otras investigaciones han demostrado que el aumento del tiempo de reacción, para una concentración de álcali y una temperatura dada, produce una disminución de la viscosidad y del peso molecular de la quitosana²⁶².

Almuniar y col.²⁶³ estudiaron la influencia de las concentraciones de NaOH en el intervalo desde 30 a un 65% (en peso) en la producción de quitosana a temperatura ambiente. Estos investigadores encontraron que a medida que se aumentaba la concentración de la solución alcalina, el tiempo de reacción para obtener una quitosana soluble en medio ácido disminuía a partir de una concentración de NaOH del 45%.

De forma general se puede concluir que la disminución de la concentración de la solución alcalina incrementa el tiempo requerido para obtener una quitosana soluble en medio ácido; si se incrementa la concentración el tiempo disminuye, pero el efecto sobre el grado de desacetilación aumenta; es decir, un tiempo de reacción prolongado incrementa el grado de desacetilación, pero se reduce el peso molecular.

c) Efecto de las condiciones de obtención de la quitina.

El tamaño de las moléculas de quitosana se ve afectado por el proceso de desmineralización del material inicial con que se obtiene la quitina²⁶⁴. La viscosidad de una solución de quitosana disminuye con el incremento del período de desmineralización empleado a la obtención de quitina cuando el pH de la solución del ácido empleado en el proceso es igual o mayor que 3. Por otra parte se ha encontrado que el proceso de desproteinización, con un 3% de NaOH, y la

eliminación del proceso de desmineralización en la preparación de quitina, produce una disminución de la viscosidad de la quitosana obtenida en el proceso final.

Otro factor a tener en cuenta en cuanto a la viscosidad y al peso molecular de la quitosana, es el tratamiento de desproteinización del material crudo para obtener la quitina. De forma general se utilizan dos métodos: el alcalino (3% de NaOH) y el enzimático (Rhozyme-62). Mediante la utilización del primer método se obtienen quitosanas de alto peso molecular y de mayor valor de viscosidad que cuando se utiliza el método de enzimas. Una posible explicación a este fenómeno es la degradación de la estructura de la quitina debido a la presencia de carbohidrasas en la Rhozyme-62.

d) *Atmósfera.*

Cuando la reacción de obtención de la quitosana se realiza bajo atmósfera de oxígeno se observan substanciales efectos en la quitosana final. Sin embargo, cuando la atmósfera de reacción se reemplaza por nitrógeno, tanto el rendimiento, como la viscosidad y el peso molecular son superiores. El efecto degradativo del oxígeno del aire es mucho más pronunciado cuando aumenta el tiempo de reacción.

e) *Proporción de quitina en la solución alcalina.*

Durante el proceso de desacetilación es necesaria una adecuada agitación, con el fin de obtener uniformidad en la reacción. Para ello se requiere un alto grado de fluidez en la mezcla de reacción. Estudios realizados demuestran que la relación de quitina en la solución alcalina juega un papel fundamental en este aspecto²⁶⁵. En la literatura se reportan relaciones quitina:solución desde 1:10 hasta 1:100.

f) *Tamaño de partícula.*

Se ha encontrado que la velocidad de desacetilación viene determinada por la extensión del hinchamiento de las partículas de quitina en la solución. Así, cuando el tamaño de las partículas es grande se requieren largos tiempos de hinchamiento, dando como resultado que la

velocidad de desacetilación disminuya. Tamaños de partículas de quitina de 1 mm permiten obtener una quitosana de alta viscosidad y un peso molecular superior que cuando se trabaja con partículas cuyo tamaño oscila entre los 2 y 6 mm.

En la Tabla 31 se recogen las condiciones, descritas en la literatura, para la obtención de quitosana a partir de quitina de diferente procedencia:

Tabla 31.- Condiciones de desacetilación en la producción de quitosana.

Fuente	Atmósfera	[alcalina] (M)	Temperatura (°C)	Tiempo (h)	Relación (en peso)
Langosta	A/N	55% KOH	100 - 140	0.5 - 1.5	1:100
	N	47% NaOH	60 - 100	1 - 4	-
Cangrejo	N	40% NaOH	70, reflujo	10	-
	A	40% NaOH	70, reflujo	15	-
Camarón	A/N	50% NaOH	145 - 150	1 - 12	1:10
	A	50% NaOH	60	2	1:4
	A	50% NaOH	95	3	-
	A	50% NaOH	30	24 - 144	1:14-56
Gamba	A	60% KOH	100	1	1:65
	A	50% NaOH	100	2	-

(A = aire/ N = nitrógeno)

Técnicas alternativas para la desacetilación de la quitosana.

Existen otros métodos par la obtención de quitosana a partir de quitina. Por ejemplo, mediante procesos termoquímicos se ha llevado a cabo esta reacción en un reactor donde se realiza la reducción de la quitina a 230 °C, con una concentración alcalina del 10% durante 1 minuto a presión. Una descompresión repentina en el proceso y posterior tratamiento durante 24 horas, a una temperatura de 4 °C de la solución, permite alcanzar una desacetilación completa de la quitina.

Una forma sencilla y poco costosa es el tratamiento de la solución de quitina en solución alcalina a temperatura ambiente, sin calentar, con una atmósfera de oxígeno. La concentración de NaOH fue del 50% y la relación quitina:solución alcalina de 1:56 variando el tiempo de reacción. Otros trabajos²⁶⁶ se refieren al hecho de utilizar soluciones de NaOH mezcladas con solventes orgánicos, como el 2-propanol, el 2-metil-2-propanol o acetona. El uso de estos diluyentes hace posible el uso de concentraciones de NaOH más pequeñas que las empleadas sin ellos. Sin embargo, el grado de desacetilación y la viscosidad de la solución del producto final es menor cuando se utiliza únicamente NaOH.

Por otra parte, es conocida la dificultad que presenta la preparación de quitosana con un grado de desacetilación superior al 90% sin que se produzca degradación de la cadena del polímero. Sin embargo, Mima y col.²⁶⁷ establecieron un método de preparación de quitosana con un grado de desacetilación cercano al 100% sin tener degradaciones significativas en la cadena polimérica.

El método empleado consiste en lavar sucesivamente el producto intermedio con agua, dos o más veces, durante el tratamiento alcalino a un tiempo menor que 5 horas para una concentración de NaOH del 47% a una temperatura de 110 °C. Otros autores, preparan quitosana a partir de caparazones de camarón tigre (*Penaeus monodon*) desacetilando la quitina dos veces, con disoluciones de NaOH al 50% bajo vacío durante 30 minutos a 100 °C, obteniendo productos con un grado de desacetilación entre 43 y 54% en cada lavado.

Domar y Rinaudo²⁶⁸ proponen otro método para obtener quitosana completamente desacetilada sin disminución excesiva del peso molecular. El método incluye el uso del tiofenol durante los tratamientos sucesivos de álcali, durante 1 hora a una temperatura de 100 °C.

Caracterización de la quitosana.

Espectroscopia Infrarroja:

Debido a su estructura química, la quitosana presenta dos bandas de absorción entre los 2800 y los 3500 cm⁻¹ asignables a las vibraciones correspondientes a los grupos OH presentes en

la molécula en forma de una banda ancha, a 3450 cm^{-1} , y una segunda estrecha ubicada generalmente en los 2870 cm^{-1} , siendo la primera de mayor intensidad que esta última²⁶⁹. Entre los 1660 y los 1500 cm^{-1} aparecen las bandas de vibración de tensión de amida I y amida II, correspondientes al enlace N-H de las unidades acetiladas y desacetiladas de la quitosana, lo cual permite, como veremos posteriormente, conocer el grado de acetilación de las quitosanas sintetizadas mediante los diferentes métodos.

Al igual que todos los polisacáridos, la quitosana presenta bandas de absorción anchas e intensas entre los 1000 y los 1200 cm^{-1} , características del esqueleto de estos compuestos²⁷⁰.

Determinación del peso molecular.

Para evaluar el peso molecular de los polímeros se emplean diferentes técnicas, entre los que podemos encontrar: la viscosimetría y la cromatografía de permeación de gel. Estas técnicas son experimentalmente fáciles de llevar a cabo, y en tiempos razonablemente cortos. Sin embargo, los valores del peso molecular obtenidos teniendo en cuenta que al trabajar en disolución dichos valores dependen del volumen hidrodinámico de la macromolécula, que es función del peso molecular, de las propiedades conformacionales y de las interacciones polímero-solvente. Esto trae como consecuencia la necesidad de obtener, previamente, una curva de calibración. Por el contrario, el método de Light-Scattering (LS) nos da un valor absoluto del peso molecular pero a su vez es una técnica costosa y de difícil manipulación y a veces los datos no son fáciles de interpretar en presencia de agregaciones y asociaciones en las disoluciones.

A continuación se describe la adecuación de los métodos comúnmente empleados para la determinación del peso molecular de la quitosana.

a) Viscosimetría.

Aunque es práctica habitual el utilizar directamente el valor de la viscosidad como índice del peso molecular, es posible calcular a partir de la viscosidad intrínseca el cálculo del peso molecular mediante la ecuación de Mark-Houggins²⁷¹.

En esta técnica primeramente se preparan disoluciones de quitosana, de diferentes grados de desacetilación, en soluciones acuosas de sales (0.2 M Acetato de sodio – 0.5 M Ácido Acético). Como es sabido, la medida de la viscosidad de una solución se realiza, generalmente, mediante la comparación del tiempo de caída o de flujo (t) de un volumen específico de la solución de polímero a través de un tubo capilar, con respecto a el tiempo de caída o flujo (t_o) del solvente utilizado a la misma temperatura. A partir de t y t_o para diversas concentraciones del soluto se pueden definir las siguientes ecuaciones:

Viscosidad relativa:
$$\eta_r = \frac{\eta}{\eta_o} = \frac{t}{t_o}$$

Viscosidad específica:
$$\eta_{sp} = \eta_r - 1$$

Viscosidad intrínseca:
$$[\eta] = \lim(\eta_{sp} / c)_{c \rightarrow 0}$$

donde la concentración c del soluto se expresa en unidades g/dL y la viscosidad intrínseca se expresa en dL/g.

b) Cromatografía de permeación de geles

Aunque la técnica cromatografía de exclusión por tamaño SEC, comúnmente conocida como GPC (acrónimo inglés de cromatografía de permeación de geles) es una técnica establecida en la práctica habitual de medida de los pesos moleculares de polímeros y su distribución. A título recordatorio para las personas no familiarizadas con la misma permite la separación de fracciones de polímero en función de su tamaño en columnas cromatográficas rellenas de geles.

En esta técnica una muestra de solución diluida se introduce en las columnas, junto a la fase móvil, y pasa a través de las columnas. Las cadenas del polímero disuelto se difunden a través de los geles, que constituyen la fase estacionaria, en dependencia de su tamaño. Grandes cadenas del polímero solo pueden difundir pequeñas cantidades en los poros de la fase estacionaria o son completamente excluidas, por lo tanto, requieren poco tiempo para atravesar la columna. Cuando las cadenas son pequeñas ocurre todo lo contrario.

Al final del experimento se obtiene una curva de elución de la cantidad de polímero, usando el detector adecuado, contra el tiempo de retención (t_r) de los diferentes tamaños moleculares. Dependiendo del detector empleado el peso molecular no puede determinarse directamente, pero si mediante una curva de calibración del sistema en términos de tiempos de retención obtenidos con patrones de peso molecular conocido (no siempre disponibles), por lo que se suele utilizar el poliestireno como patrón universal.

La determinación por GPC de la quitosana presenta ciertas complicaciones. Primero, la forma y tamaño de la molécula del polielectrolito en disolución depende fuertemente de la fuerza iónica del medio. Segundo, existen fenómenos de ión-inclusión y de ión-exclusión presentes en la determinación. Mientras el primero no es fácil de eliminar, el segundo puede eliminarse por la adición de un electrolito de bajo peso molecular a la fase móvil. Por otra parte el pH de la solución es un factor a tener en cuenta, ya que mediante este parámetro se logra controlar el grado de ionización de las especies poliméricas y de los grupos funcionales del soporte. Todas la interacciones entre el polímero y los geles de la columna son indeseables.

Para controlar estos problemas, la determinación del peso molecular de la quitosana se realiza utilizando como fase móvil una solución de ácido acético (AcOH 0.5 M), ya que este elimina la ionización de los grupos carboxilos presentes en la superficie del soporte de la columna y reduce la adsorción de la quitosana. La adición de acetato de sodio (NaOAc 0.2 M) genera una fuerza iónica que elimina los efectos de ión-exclusión.

c) Dispersión de luz (LS).

En este método es posible medir el peso molecular promedio en peso, M_w , el radio de giro (R_G) y el segundo coeficiente del virial, A_2 , para soluciones de diferentes grados de desacetilación de la quitosana en soluciones acuosas de sal (0.2 M NaOAc - 0.5M AcOH). El método consiste en la medición de la intensidad de luz dispersada por una solución de polímero, en función del ángulo de dispersión (θ) y la concentración (c). El requisito para que se produzca la dispersión de luz es la aparición de regiones “transitorias” con índices de refracción diferentes al medio circundante. La intensidad de la luz dispersada es proporcional a la raíz de la diferencia,

en cuanto al índice de refracción, entre la solución del polímero y el solvente puro, además de la cuarta potencia de la longitud de onda (λ) y del peso molecular del soluto.

La dependencia angular de la luz dispersada surge de la interferencia de los rayos de luz de las diferentes partes de la misma molécula del polímero. Esta interferencia nos da información del tamaño de la molécula, expresado como R_G , que es independiente del peso molecular. Este efecto desaparece a ángulos θ cercanos a 0; después de la extrapolación a $\theta = 0$ el valor exacto del peso molecular se obtiene sin tener en cuenta el tamaño de la molécula. Finalmente, el segundo coeficiente del virial, A_2 , medida de las interacciones polímero-solvente, es determinado por la pendiente de la curva de Luz dispersada vs. la concentración extrapolando a 0. La ecuación que permite el cálculo del peso molecular se describe a continuación:

$$\frac{K_c}{H_\theta} = \frac{1}{M_w} + 2A_2c$$

donde H_θ es el factor de dispersión y K es una constante óptica.

El factor y la constante antes mencionados se pueden calcular mediante las siguientes ecuaciones:

$$H_\theta = \frac{(i - i_0)_\theta \sin \theta}{1 + \cos \theta}$$

donde $(i - i_0)$ es la diferencia entre la luz dispersa de la solución y el solvente a ángulo θ .

$$K = 0.517i_B (dn/dc)^2$$

donde:

i_B = intensidad de luz dispersa del benceno a $\theta = 90^\circ$.

(dn/dc) = incremento del índice de refracción específico.

Determinación del grado de acetilación.

Uno de los parámetros de mayor importancia a la hora de caracterizar la quitosana es el grado de acetilación (GA). Este parámetro se define como el número de unidades acetiladas (-NHCOCH₃) presentes en la estructura de la molécula de quitosana. Se han propuesto diversos métodos para la obtención del GA en la literatura^{272,273} con sus ventajas y desventajas, de los cuales mostramos los más utilizados:

a) Análisis elemental.

En este caso, el grado de acetilación se calcula a partir del contenido de nitrógeno presente en la muestra de quitosana y del contenido de material inorgánico presente en su residuo después de una hora de tratamiento térmico a 600 °C. La expresión utilizada en este caso es:

$$\%GA = \left[\frac{(8.695 - \%N)}{1.799} \right] \cdot 100$$

donde 8.695 es el por ciento de nitrógeno en una muestra de quitosana completamente desacetilada, 1.799 es la diferencia entre 8.695 y 6.896 (porcentaje de nitrógeno en una muestra de quitina completamente acetilada), y el %N es el por ciento de nitrógeno obtenido de la fracción orgánica de la quitosana analizada.

b) Espectroscopia UltraVioleta-Visible.

Este método, de gran precisión y sensibilidad, fue propuesto por Muzzarelli y col. para quitosanas con un bajo grado de acetilación²⁷⁴. El método consiste en la determinación de las alturas correspondientes (H) a la primera derivada de los espectros ultravioleta de soluciones de concentración conocida de N-acetilglucosamina en ácido acético 0.01 M, entre los 240 y los 190 nm, utilizando como referencia agua.

Debido a que el ácido acético presenta contribuciones de absorción a 199 nm, donde las soluciones de N-acetilglucosamina presentan un máximo, primeramente se obtienen los

espectros de la primera derivada para concentraciones de ácido acético conocidas, para así poder determinar el punto cero, donde se entrecruzan estas curvas, desde el cual se miden los valores verdaderos de H. De estas medidas se obtiene una curva de calibración de H versus concentración de N-acetilglucosamina, C, y la correspondiente ecuación de la recta $H = f(C)$.

Posteriormente se prepara una solución de 500 g de quitosana en 50 mL de solución 0.1 M de ácido acético que se disuelve totalmente en 500 ml de agua. Se registra su espectro ultravioleta, en cubetas de 1 cm de camino óptico, en el mismo intervalo de longitudes de onda mencionado anteriormente. El valor de H obtenido se sustituye en la ecuación obtenida para la curva de calibración y el valor de C que se obtiene es directamente el grado de acetilación de la quitosana valorada.

c) Espectroscopia Infrarroja (IR).

Por su sencillez la espectroscopia infrarroja es, quizás, el método más empleado en la determinación cuantitativa del grado de acetilación de quitosana. El método consiste en la medida de las intensidades de las bandas de absorción correspondientes a amida I y amida II, utilizando una referencia interna para corregir el espesor de la muestra en un filme o la concentración en la pastilla de bromuro de potasio (KBr):

Filmes: se preparan filmes de soluciones 0.5 % en peso de quitosana a partir de soluciones 0.1 M de ácido acético, que se secan a temperatura ambiente durante toda la noche. Posteriormente se lavan en soluciones de amonio en metanol, luego en agua y se secan a 60 °C bajo vacío otras 24 horas.

Pastillas: se mezclan 2 mg de la muestra en polvo con 100 mg de KBr y se obtiene la pastilla a vacío, según el procedimiento habitual. La pastilla se seca durante 24 horas a 110 °C y se mantiene en un desecador a vacío hasta su registro en el espectrofotómetro.

Una vez obtenidos los espectros correspondientes, el GA se calcula mediante la relación de bandas de absorción $A_{\text{AMIDA}}/A_{\text{REFERENCIA}}$. En la literatura se proponen diferentes relaciones de bandas, en cuanto a las longitudes de onda tanto de la banda de amida como de la de

referencia²⁷⁵. Entre las relaciones más utilizadas esta la propuesta por Baxter y col.¹⁶⁵, A_{1655}/A_{3450} , que toma como línea base la comprendida entre los 4000 cm^{-1} y los 2500 cm^{-1} para la banda A_{3450} correspondiente a el grupo OH de la quitosana, y otra entre los 1800 cm^{-1} y los 1600 cm^{-1} , para la banda de absorción en los 1655 cm^{-1} , correspondiente a la amida I. El grado de acetilación se obtiene a través de la expresión:

$$GA(\%) = \frac{A_{1655}}{A_{3450}} \cdot 115$$

Mediante este procedimiento se obtiene buenos resultados y correlaciones con otros métodos para muestras con un grado de acetilación entre 0 y 55%. Sin embargo, cuando se trabaja con muestras que presentan un alto grado de acetilación, el método pierde precisión, debido a que la absorción en 1655 cm^{-1} es una mezcla de dos componentes: una centrada en 1655 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de tensión N-H, y la otra, centrada en 1630 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de tensión N-H₂.

Teniendo esto en cuenta, se propone medir la absorción a 1655 cm^{-1} con una línea base comprendida entre los 1800-1500 cm^{-1} , y para la banda de absorción a 1630 cm^{-1} una línea base entre 1650 y 1600 cm^{-1} . En este caso el GA se calcula mediante la siguiente expresión:

$$GA(\%) = \left(\frac{A_{1655}}{A_{3450}} + \frac{A_{1630}}{A_{3450}} - 0.13 \right) \cdot 85.5$$

Los resultados obtenidos mediante esta expresión presentan una buena correlación con los obtenidos mediante RMN-H¹ para un grado de acetilación entre 0 y 100%. Los únicos inconvenientes de esta técnica es que la cantidad de muestra debe de ser lo suficientemente pequeña como para asegurar que la banda del OH posea una transmisión cercana al 10% y que, en el caso particular de una quitosana a la que se varía su estructura mediante acetilación con soluciones ácidas de ácido clorhídrico, todos los grupos éster presentes como impurezas deben de ser eliminados del medio con una solución etanólica de concentración 0.5 M de hidróxido de potasio, KOH, antes de registrar los espectros.

d) Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).

La determinación del grado de acetilación por RMN- ^1H es la técnica más utilizada para el estudio de estructuras de carbohidratos. La caracterización por RMN es simple, rápida, y forma parte de la rutina de análisis de estos compuestos²⁷⁶. En principio, las técnicas de RMN- ^1H y de RMN- ^{13}C son aplicables para la determinación del grado de acetilación. Sin embargo, la espectroscopia de ^{13}C se aplica de forma más extensiva para el caso de muestras sólidas donde se utilizan también algunos aditivos que mejoran la sensibilidad y la resolución de esta técnica como son Desacoplador de protón de alta potencia para polarización cruzada/desacoplamiento dipolar de protón (High power proton decoupler for cross-polarization/proton-dipolar decoupling.)

La mayor dificultad para aplicar esta técnica, en este caso en particular, es la baja solubilidad de la CHI en los disolventes comunes utilizados en este tipo de determinaciones. Para minimizar esta dificultad se utiliza como solvente agua deuterada, D_2O , a $\text{pH} = 3$, ajustando con ácido clorhídrico, HCl , o bien obteniendo el derivado clorado de la quitosana, el cual es bastante soluble en D_2O .

Generalmente la determinación se realiza a temperaturas que oscilan entre 70 y 90 $^{\circ}\text{C}$, con el fin de disminuir el efecto de la viscosidad. Es recomendable utilizar campos altos debido a la simplificación que se obtiene en los espectros. En RMN- ^1H , especialmente a campos bajos, la señal del solvente solapa las señales de resonancia de los carbohidratos y hace difícil su análisis²⁷⁷. El cálculo del GA de la CHI se determina por la relación entre la intensidad relativa de la señal del protón N-acetilado y las intensidades de las resonancias de los restantes protones.

HIDROXIAPATITA. SÍNTESIS, CARACTERIZACIÓN Y PROPIEDADES.

Composición química.

En la naturaleza se encuentran muchos materiales que presentan características cristalinas. A este tipo de compuestos se les denomina isomorfos, lo cual es una definición de estructura y no de composición. La familia de las “apatitas” pertenece a este tipo de estructuras y por tanto la hidroxiapatita (HA) puede ser clasificada bajo esta definición.

La hidroxiapatita pura es un fosfato básico de calcio y su composición química, cuando su estequiometría es perfecta, se representa por la fórmula: $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, siendo su relación molar calcio/fósforo (Ca/P) = 1.67. Las diez cargas positivas de los cationes calcio (Ca^{2+}) están compensadas por nueve cargas negativas de los aniones fosfato (PO_4^{3-}) y por una carga negativa del anión hidróxilo (OH^-). Es un sólido iónico neutro, pero su superficie puede contener cationes o aniones, en función del medio en que se encuentre. Generalmente se utiliza la fórmula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, la cual permite simplificar la representación de las hidroxiapatitas sustituidas.

La HA puede estar sustituida por diferentes iones. El ejemplo más conocido es el de la Fluorapatita de fórmula $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})_{1-x}\text{F}_x$, para una hidroxiapatita parcialmente fluorada. También pueden haber iones magnesio (Mg^{2+}) que reemplazan a los iones Ca^{2+} , dando lugar a la Magnesioapatita, $\text{Mg}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ aunque también los iones PO_4^{3-} pueden ser sustituidos por

iones carbonatos o por iones hidrógenofosfatos, pudiéndose expresar mediante la fórmula $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_4(\text{HPO}_4)(\text{CO}_3)(\text{OH})_2$. En la práctica todas las combinaciones de sustitución son posibles y en cantidad variable. Es decir, la familia de la hidroxiapatita abarca una gran variedad de composiciones químicas, siendo la HA estequiométrica la que se corresponde con la fórmula base.

Estructura

La HA cristaliza en un sistema hexagonal. Los parámetros de la red cristalina característicos son los siguientes: $a = 9.4128$, $c = 6.88 \text{ \AA}$, $\alpha = \beta = 90^\circ$ y $\gamma = 120^\circ$ y $Z = 2$. En la literatura²⁷⁸ se recoge que su estructura esta basada en dos capas de redes hexagonales formadas por tetraedros PO_4^{3-} . En la Figura 65 se muestra como estas dos capas coinciden, aproximadamente, con dos planos de reflexión situados a $z = \frac{1}{4}$ y $z = \frac{3}{4}$, en las que se disponen alternativamente los tetraedros.

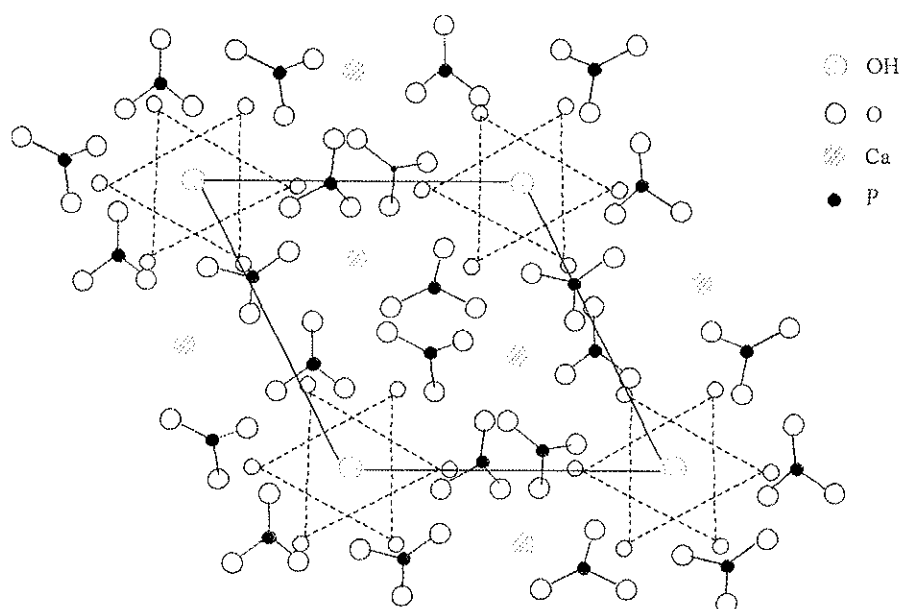


Figura 65.- Disposición del P en la red de la HA. Plano 0001.

De esta manera, el P y los dos oxígenos quedan al mismo nivel del plano correspondiente, mientras que los dos oxígenos restantes se sitúan uno por encima y otro por debajo de dicho plano, tal y como se muestra en la Figura 66.

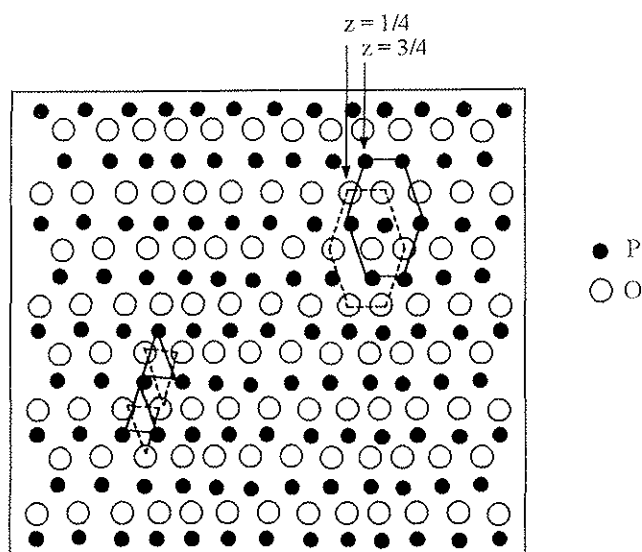


Figura 66.- Estructura de la HA proyectada sobre el plano 0001.

En cada celdilla hay dos canales del primer tipo y en cada uno de ellos se alinean dos iones calcio próximos a $z = 0$ y $z = 1/2$, que forman columnas de calcio a través de la estructura. A su vez, cada calcio se coordina con nueve oxígenos, tres por encima de él, tres por debajo y tres al mismo nivel aproximadamente. El segundo tipo de canal, en el que se centra el eje senario, está delimitado por iones calcio que se acomodan a las depresiones de los tetraedros PO_4^{3-} . Hay seis calcios rodeando cada canal, dispuestos en dos triángulos dispuestos entre sí 60° en los niveles $z = 1/4$ y $z = 3/4$, coincidentes con los dos planos de reflexión. Es decir, los iones calcio pueden ocupar dos posiciones: los Ca (I) sobre los ejes ternarios y los Ca (II) bordeando los túneles del eje senario. La posición de los OH^- puede ser un poco por encima o por debajo de los planos definidos por los Ca (II), coincidiendo con el eje senario; cada una de estas posiciones se ocupa estadísticamente en un 50%. Los OH^- situados en una misma columna están orientados de una forma similar, ya que los hidrógenos del dipolo no se pueden enfrentar dentro del espacio delimitado por los planos definidos por los Ca (II).

Síntesis de la hidroxiapatita.

Es de sobra conocido que la HA es el constituyente mayoritario de la parte inorgánica del tejido óseo y dental de los vertebrados. Además de la hidroxiapatita existen otros fosfatos de

calcio que también están presentes en el sistema óseo, como: la brushita, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y la β -Whitlockita, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ entre otras.

Se asume que algunas de estas fases son precursoras de la formación de la HA biológica, transformándose, como se ha demostrado, *in vitro*²⁷⁹, por lo que podemos hablar de procesos biológicos de síntesis. Estas transformaciones se facilitan o inhiben de acuerdo a las propiedades del medio en que se encuentran, tal y como se muestra en la Figura 67; es decir: pH, temperatura, concentración y composición.

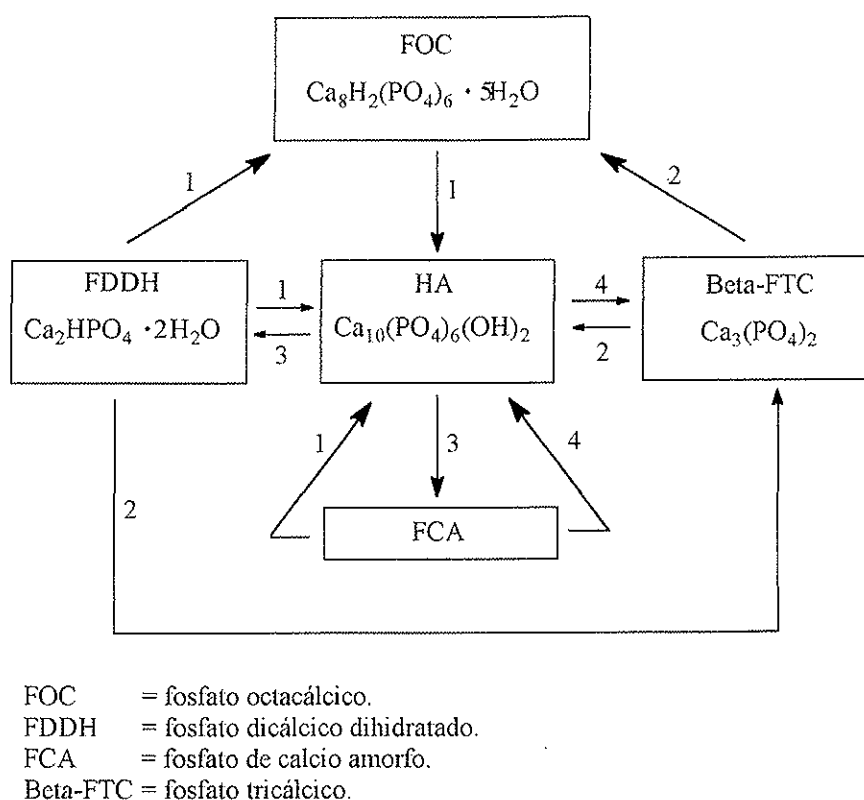


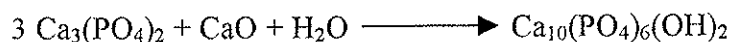
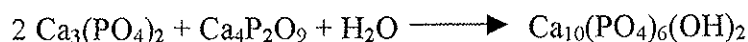
Figura 67.- Representación esquemática de la transformación de los diferentes fosfatos de calcio de una fase a otra.

Por otra parte, la síntesis de la hidroxiapatita a nivel de laboratorio, se realiza generalmente por precipitación en medio acuoso básico y a temperaturas que oscilan entre los 20 y los 100 °C, obteniéndose un precipitado que depende de numerosas variables físicas y químicas. En la bibliografía existe una gran variedad de métodos muy dispares para la obtención de este compuesto, de los cuales, los más representativos se clasifican a continuación: reacciones

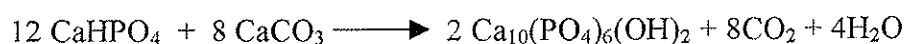
en estado sólido, precipitación por vía húmeda mediante procesos discontinuos (batch), semidiscontinuos (semibacht) y continuo, a través del empleo de Microondas y mediante procesos hidrotérmicos. Todas estas técnicas se realizan bajo diferentes condiciones, por lo que resulta muy difícil la obtención de precipitados de HA completamente puros o monofásicos.

a) Reacciones en estado sólido

Este proceso de síntesis se lleva a cabo calentando, hasta un valor óptimo de temperatura, una mezcla de compuestos sólidos. En esta reacción tiene lugar la formación de estructuras cristalinas al difundirse los diferentes constituyentes iónicos de los sólidos reaccionantes. Trömel²⁸⁰ investigó la optimización de las condiciones para la formación de la HA en estado sólido. En uno de los experimentos se hizo reaccionar los fosfatos tri y tetracálcicos y en otro fosfato tricálcico con óxido de calcio. Ambas reacciones se llevaron a cabo a 1050 °C en atmósfera de oxígeno y en pocas horas se obtuvo una HA con una relación molar Ca/P = 1.67. Las ecuaciones se representan a continuación:



Otros autores han demostrado la utilidad de este método para la obtención de HA de gran pureza. Narasaraaju y col., hicieron reaccionar polvos finamente pulverizados de fosfato dicálcico con carbonato cálcico a 1400 °C en atmósfera de aire húmedo:



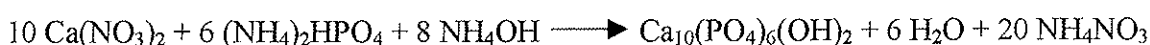
b) Precipitación por vía húmeda:

Procesos discontinuos (batch):

Estos métodos de síntesis se refieren a la síntesis de HA mediante la reacción de una sal soluble de calcio con una sal del ácido orto-fosfórico. Muchos autores^{281,282} consideran que la primera

fase, que se forma cuando se realiza la precipitación en disoluciones neutras o débilmente básicas, es un fosfato de calcio amorfo (FCA) muy hidratado, que aparece en forma de partículas esféricas monodispersas de estequiometría $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$.

Uno de los métodos más utilizados para la obtención de HA por vía húmeda fue desarrollado por Hayek y Stadlmann²⁸³, basándose en la simplicidad de las operaciones experimentales y la alta pureza de la HA obtenida. Se hace reaccionar 79 g de dihidrógeno fosfato de amonio, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, disuelto en 1600 mL de agua y ajustado el pH a 12 con solución de hidróxido de amonio, NH_4OH . Esta solución se gotea lentamente sobre una de nitrato de calcio (230 g en 1200 mL) con idéntico pH, obteniéndose alrededor de 100 g en cada proceso batch. La ecuación representativa de este método es:



Otro método para la obtención de HA de alta pureza fue desarrollado por Arnold²⁸⁴, el cual se basa en la adición simultánea de soluciones amoniacaes de acetato de calcio y fosfato de amonio sobre una solución de acetato de amonio que mantiene constante la alcalinidad del medio.

Jarcho y col.²⁸⁵ parten de nitrato de calcio, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ y la síntesis de la HA se realiza a $\text{pH} = 10-11$, añadiendo gota a gota la solución de fosfato sobre la solución de calcio. Tras un tiempo de contacto con la solución madre, se lava el precipitado y, una vez seco, se calcina a temperatura entre los 1000 y 1200 °C durante 1 hora. El material obtenido no es siempre HA pura, apareciendo a veces otras fases. Jarcho considera importante para la obtención de HA puro la utilización de una relación molar Ca/P (1.67) y sugiere también el aumento del tiempo y de la temperatura de envejecimiento del precipitado con la solución madre.

Füredi-Milhofer y col.²⁸⁶ sintetizan HA, partiendo de ácido ortofósforico, H_3PO_4 ó de dihidrógeno fosfato de potasio y de hidróxido de calcio, $\text{Ca}(\text{OH})_2$ o $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ y hacen un estudio de la síntesis realizando varias pruebas y manteniendo constante una serie de características: adición gota a gota de la solución de fosfato sobre la de calcio, atmósfera de nitrógeno, agitación constante y relación molar Ca/P = 1.67. Consideran esencial que la precipitación se realice a un valor de $\text{pH} > 7.2$ para evitar la hidrólisis de la HA a formas deficientes en calcio.

Driessens²⁸⁷ constata que la única forma de obtener HA pura es por precipitación a partir de soluciones acuosas, a pH elevados y en ausencia de dióxido de carbono, CO₂.

Quinten y col.²⁸⁸ vuelven a poner de manifiesto la dificultad en la obtención de HA puro, ya que detectan la presencia en cantidades pequeñas de otras fases tales como α y el β -TCP, al sintetizar HA añadiendo una solución de (NH₄)₂HPO₄ 0.246 M a una solución de Ca(NO₃)₂ · 4H₂O 0.082 M, preparadas ambas con agua bidestilada y a pH = 10 ajustado con amoníaco; en este mismo trabajo estudian la influencia de la temperatura de las soluciones sobre el tamaño y forma de los cristales de HA, resultando que si la temperatura es de 22 °C, los cristales son pequeños y con forma esférica, y a temperaturas de 65-75 °C los cristales son mayores y con una estructura de tipo aguja.

Bakó y Kotsis²⁸⁹ realizan un estudio de los parámetros más importantes que afectan a la síntesis de HA propuesto por Jarcho, considerando como decisivos en la obtención del producto deseado los siguientes: relación molar Ca/P inicial, pH, temperatura y tiempo de agitación en contacto con la solución madre.

Proceso semidiscontinuo (semibatch):

Es conocido que la relación molar Ca/P de la HA sintetizada por vía húmeda se ve apreciablemente afectada por el pH, tanto de las soluciones de partida, como de la solución en que se está precipitando. López-Macipe y colaboradores²⁹⁰ estudiaron la estequiometría y morfología de la HA obtenida en un proceso semibatch, observándose la posibilidad de obtener partículas de HA monodispersas con estequiometría controlada, mediante un control adecuado de la temperatura de la reacción, del pH y de la velocidad de adición de las sustancias reaccionantes.

Proceso continuo:

Gómez-Morales y colaboradores²⁹¹ han desarrollado un método continuo para la obtención de HA por vía húmeda en la que se puede obtener HA con diferentes estequiometría, mediante el control de la temperatura de la reacción, el pH y el tiempo de permanencia de la HA

precipitada, el cual viene dado por la velocidad de adición de las sustancias reaccionantes. El tamaño de las partículas obtenidas está influenciado por los mecanismos de nucleación-agregación-aglomeración y crecimiento.

Rodríguez-Clemente y colaboradores²⁹² han estudiado estos mecanismos en la precipitación de HA en procesos en continuo y batch, a partir de soluciones homogéneas de calcio y fósforo, concluyendo que estos procesos están regidos por la minimización de la energía superficial de las partículas, lo cual se refleja en la distribución final del tamaño de partículas.

c) Procesado con Microondas:

La síntesis mediante el empleo de la radiación microondas, como método de calentamiento alternativo a las técnicas convencionales, está siendo estudiado ampliamente debido a la notable disminución en los tiempos de síntesis. Varios autores han empleado este método para la obtención de HA cristalina con tamaño de partícula nanométrica. López-Macipe y colaboradores²⁹³ obtuvieron nanopartículas de HA a partir de una disolución homogénea calcio/citrato/fosfato. Estos autores sugieren que la formación de las nanopartículas siguen los siguientes pasos:

- descomplejamiento térmico de la especie $\text{Ca}(\text{Cit})^-$ y precipitación del citrato trisódico dihidratado, el cual actúa como templa.
- Absorción iónica de las especies Ca^{2+} , OH^- y HPO_4^{2-} sobre la superficie de la templa seguido de la formación de las unidades de crecimiento.
- Nucleación inducida de partículas nanométricas de fosfato amorfo sobre la superficie de la templa con la consiguiente disminución del pH, lo cual induce la disolución parcial del substrato que conlleva a la formación de la especie $(\text{HCit})^{2-}$.
- Adsorción de la especie $(\text{HCit})^{2-}$ sobre el fosfato amorfo, con lo cual comienza la formación de HA poco cristalina.

d) Proceso hidrotérmico:

El método hidrotérmico se basa en la obtención de materiales en condiciones drásticas de presión y temperatura, en un reactor cerrado herméticamente. Fujishiro y colaboradores²⁹⁴ obtuvieron por este método HA a partir de una disolución del complejo quelato Ca(EDTA)^{2-} y H_3PO_4 , a temperaturas entre 130-250°C y pH 4-10, obteniéndose cristales de tamaño superiores a 1 μm .

También el método hidrotérmico se utiliza en muchas ocasiones para realizar transformaciones químicas de un compuesto manteniendo intacta su morfología y tamaño, como es el caso de la transformación del CaCO_3 , constituyente de los corales marinos de la familia PORITES, el cual se encuentra en la variedad cristalográfica de calcita; la misma se hace reaccionar con una sal del ácido ortofosfórico utilizándose elevadas temperaturas y presiones, donde se logra la sustitución de la calcita por HA, conservándose la estructura altamente porosa de este coral, lo que favorece el factor biológico (crecimiento interno de nuevo tejido óseo debido al tamaño de los poro) al ser implantados en el organismo. Este método fue aplicado en el Centro Nacional de Investigaciones Científicas (CNIC) de Cuba lo que permitió obtener la hidroxiapatita coralina HAP-200[®] como material de implante para la restauración de lesiones óseas²⁹⁵.

Resumiendo, se puede decir que la mayoría de los autores proponen la síntesis por precipitación a partir de una sal de Ca y una sal de P, utilizando soluciones diluidas de ambas sales, coincidiendo todos ellos en que uno de los parámetros fundamentales es la utilización de una relación molar Ca/P adecuada. Algunos autores sugieren que la adición de la solución de Ca sobre la de P ha de ser lenta y en ausencia de CO_2 . Con respecto a la temperatura, algunos consideran que ha de hacerse a temperaturas del orden de los 100 °C, mientras que otros opinan que puede ser temperatura ambiente. Los valores de pH oscilan desde 6.7 a 11.

Sinterización de la hidroxiapatita.

El proceso de sinterización es un fenómeno que describe la obtención de productos sólidos a partir de polvos inorgánicos. En este proceso se calienta un polvo compacto a una

temperatura adecuada de tal manera que los mecanismos de transporte de masa sean posibles u operativos, de forma que el compacto contrae y disminuye su porosidad. La sinterización pues involucra a diversos parámetros, entre los que podemos mencionar: densidad, superficie específica y contracción²⁹⁶.

La disminución de la energía libre de un material es el mecanismo que rige el proceso de sinterización. Para alcanzar la densidad teórica, los sistemas deberían someterse a elevadas temperaturas durante el tiempo necesario, pero al volver al estado inicial, temperatura ambiente, la configuración de monocristal predominaría sobre la alcanzada y el sistema evolucionaría hacia ella. En muchos casos los poros del material estarían tan aislados que la variación de la energía libre en el tiempo sea tan pequeña que el proceso de sinterización se considere terminado. Se han estudiado diferentes variables y factores para hacer más viable la consecución de este proceso por parte de los materiales en estudio, así como los que afectan a la microestructura y a las propiedades del producto final. De forma resumida, la sinterización puede llevarse por tres vías: en estado sólido, en presencia de una fase líquida y por sinterización reactiva.

a) Sinterización en estado sólido

Cuando un polvo compacto se calcina a una temperatura por debajo del punto de fusión de cualquiera de las fases constituyentes, se denomina sinterización en estado sólido. Durante este proceso se produce una disminución en la energía libre total del material debido a la disminución de la energía libre interfacial total. Este cambio se puede expresar mediante la siguiente expresión:

$$\delta \int G_{\text{SISTEMA}} = \delta \int \gamma_{SV} \cdot dA_{SV} + \delta \int \gamma_{SS} \cdot dA_{SS}$$

donde A_{SV} y A_{SS} son las áreas de las interfases sólido-vapor y sólido-sólido respectivamente y γ_{SV} y γ_{SS} son las energías superficiales. El primer término representa el cambio en la energía libre del cuerpo debido a la disminución del área interfacial sólido-vapor total, y es negativo; el segundo representa el aumento del área interfacial sólido-sólido total (creación del borde del grano) y es positivo.

Normalmente el proceso de sinterización se divide en tres procesos basados en cambios geométricos que se producen durante la evolución microestructural desde un grupo de partículas individuales hasta una estructura policristalina densa. El **proceso inicial** se puede definir como el intervalo desde el inicio del tratamiento térmico hasta que los cuellos entre partículas se ponen en contacto unos con otros. A medida que se va produciendo la sinterización, los cuellos de las partículas se van fusionando y comienza el **proceso intermedio**, existiendo durante este paso una fase porosa continua intersectada por bordes de grano; la evolución microestructural esta gobernada por muchos fenómenos concurrentes:

- Migración de los bordes de grano; es decir, el crecimiento de los granos, que comienza cuando la porosidad es lo suficientemente baja.
- Migración de los poros con los bordes de grano pudiendo aumentar el tamaño de poro medio por coalescencia de los poros.
- La difusión superficial que puede incrementar el tamaño de los poros por redistribución del material de zonas de curvatura convexa a zonas de curvatura cóncava.

El proceso final de la sinterización conlleva a que el espacio poroso se rompe; da lugar a poros aislados, los cuales pueden permanecer sobre los bordes de los granos y, teóricamente, desaparecer tras un tratamiento térmico lo suficientemente largo, o, alternativamente, pueden aislarse a partir de los bordes de grano durante el crecimiento de grano discontinuo.

b) Sinterización en presencia de una fase líquida

El estudio de este tipo de sinterización considera el caso de una fase sólida mayoritaria sinterizando en presencia de una fase líquida en la cual el sólido es parcialmente soluble a la temperatura de sinterizado. Para que el proceso se realice satisfactoriamente se tienen que cumplir los siguientes requisitos:

- que exista una cantidad de líquido apreciable.

- que el sólido sea bastante soluble en el líquido a la temperatura escogida
- que el líquido moje completamente al sólido.

Durante la densificación se pueden definir tres procesos fundamentales:

Proceso de reorganización. Al formarse una fase líquida hay un proceso de reorganización de las partículas que produce un empaquetamiento más efectivo y una disminución de la porosidad.

Proceso de solución-precipitación. La solubilidad de las partículas pequeñas en el líquido es mayor que la de las grandes, con lo cual las primeras se disuelven en el líquido mientras que las segundas crecen por deposición desde la fase líquida.

Proceso de coalescencia. Este proceso es predominante si el líquido no penetra completamente entre los granos sólidos, con lo cual la velocidad de densificación disminuye.

El proceso de densificación se entiende mejor al considerar que las fuerzas que actúan sobre el sistema son debidas a las energías superficiales implicadas. La fuerza conductora de la densificación proviene de la presión capilar de la fase líquida situada entre las partículas sólidas pequeñas al ser mojadas por la fase líquida.

c) Sinterización reactiva.

En la última década se vienen desarrollando nuevos métodos de sinterización entre los que encontramos la sinterización reactiva. Este proceso conduce a compuestos completamente densos tras un procesamiento convencional y en el se consideran dos aspectos:

1. Se mezclan homogéneamente dos o más reactivos incompatibles y se calientan a una temperatura tal que se produzcan tanto sinterización como reacción.
2. Posible aparición durante el calentamiento de un líquido transitorio que favorezca la sinterización y/o la reacción a baja temperatura.

En estos sistemas se producen dos fenómenos: reacción y sinterización (Figura 68), resultando muy útil el saber a que velocidad se producen cada uno de los fenómenos para predecir la microestructura.

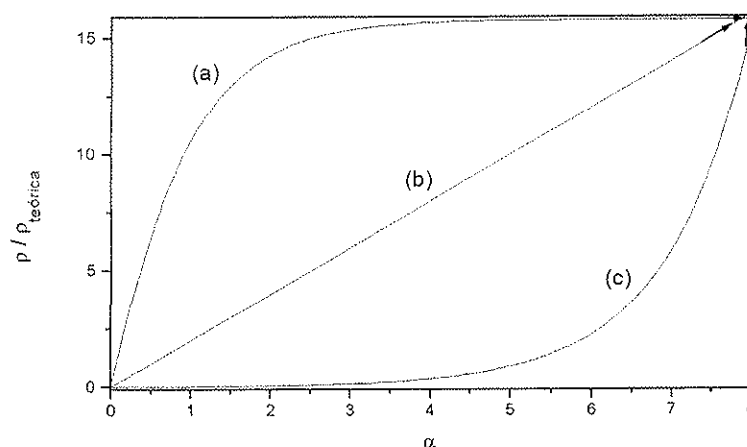


Figura 68.- Densidad relativa ($\rho/\rho_{\text{teórica}}$) frente al avance de la reacción (α).

(a) si se produce primero la densificación y luego la reacción (b) densificación y reacción simultáneos. (c) primero reacción y después densificación.

Sinterización de fosfatos cálcicos.

Como se ha mencionado anteriormente el proceso de sinterización de las cerámicas a partir de fosfato de calcio se realiza generalmente a temperaturas que oscilan entre los 1000 y los 1500 °C, dependiendo la naturaleza de las fases formadas no solo de la temperatura de sinterización, sino también de la presión parcial de vapor de agua existente en la atmósfera de calcinación. La sinterización de estos materiales es una sinterización en estado sólido, ya que la temperatura de calcinación esta por debajo del punto de fusión de los componentes del material de partida.

La microestructura del material sinterizado es importante porque determina tanto las propiedades biológicas como las propiedades mecánicas del mismo, siendo la porosidad una característica fundamental a tener en cuenta. Como se ha mencionado anteriormente hay dos tipos de porosidades: macro y microporosidad, siendo la segunda la que esta relacionada con la sinterización puesto que está constituida por los espacios que quedan cuando, tras la

sinterización, las partículas de polvo no se unen totalmente; el tamaño de los microporos es del orden de las micras, debido a que las partículas son de ese mismo orden de magnitud. Algunos autores²⁹⁷ señalan que la biodegradación esta controlada por el grado de sinterización del material por lo que consideran que la microporosidad es el factor determinante en este proceso en el caso de las cerámicas implantadas. Sin embargo, otros trabajos²⁹⁸ indican que aunque este factor es muy dominante con respecto a la velocidad de disolución no es el factor determinante en el proceso de biodegradación, sino que existen otros factores como la estructura cristalográfica y la relación molar Ca/P que intervienen en este proceso.

Por otra parte la influencia de la microestructura en las propiedades mecánicas del material es muy grande, puesto que la resistencia de un material policristalino frágil depende de la porosidad y del tamaño de grano medio. Se conoce que la resistencia a la compresión de la hidroxiapatita varía exponencialmente con la porosidad y que la resistencia a la flexión de las cerámicas de hidroxiapatita dependen más de la porosidad que del tamaño del grano medio. En la Tabla 32 se muestran algunos datos, encontrados en la bibliografía²⁹⁹, de la microporosidad y del tamaño de cristal para muestras de hidroxiapatita en forma de agregados de polvo, los cuales varían significativamente con la temperatura de sinterización.

Tabla 32.- Influencia de la temperatura de sinterización en la microporosidad y en el tamaño del cristal de la hidroxiapatita.

Temperatura (°C)	Microporosidad (%)	Tamaño del cristal (mm)
1050	5.6	0.76
1100	1.1	0.89
1150	0.6	1.59
1250	0.8	2.43
1300	0.9	5.98
1350	1.0	6.50
1450	1.6	11.50

En cuanto a las fases formadas en la sinterización, hay diversidad de opiniones, ya que mientras algunos autores afirman que tras la sinterización a 1450 °C la única fase presente es la HA, otros señalan que a partir de los 1300 °C aparece pirofosfato de calcio.

Caracterización.

Difracción de rayos-X.

Una de las técnicas de mayor uso para la caracterización de los fosfatos de calcio es la difracción de rayos X. Mediante el empleo de esta técnica es posible la identificación de estos fosfatos de calcio cristalinos que se obtienen a través de los métodos de síntesis explicados anteriormente. Una de las grandes ventajas de la difracción de rayos X es la posibilidad de realizar análisis cuantitativos de las diferentes fases cristalinas presentes en la muestra. El análisis cuantitativo de una mezcla bifásica se puede realizar a partir de la intensidad integrada (I) de las reflexiones seleccionadas de las fases, mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{I_1}{I^o_1} = \frac{w_1 \cdot \mu_1}{w_1(\mu_1 - \mu_2) + \mu_2}$$

donde:

I^o_1 = corresponde a la intensidad integrada de la fase pura 1.

I_1 = corresponde a la intensidad integrada de la fase 1 en la mezcla.

w_1 = a la fracción en peso de la fase 1.

μ_1 y μ_2 = coeficientes de absorción másica de las fases presentes en la mezcla.

Teniendo en cuenta que la absorción másica de la HA y del β -FTC son de 87.38 y 97.08 respectivamente³⁰⁰, algunos autores determinan la composición de los materiales sintetizados mediante la aplicación de la ecuación anterior. Para su cálculo utilizan los picos (300) y (0210) de la HA y del β -FTC, lo cual pone de manifiesto que la sensibilidad de la técnica no es muy grande pudiéndose llegar a cometer un error del 2% en la medición. En la Tabla 33 se muestran los datos de la difracción de rayos X correspondientes a la HA.

Tabla 33.- Datos de espaciados (d), ángulos 2θ correspondientes y valores de las intensidades relativas (I/I_1) de la HA.

d (Anstrom)	I/I_1	2θ
4.07	10	21.8
3.88	10	22.9
3.51	2	25.4
3.44	40	25.9
3.17	12	28.1
3.08	18	29.0
2.81	100	31.8
2.78	60	32.2
2.72	60	32.9
2.63	25	34.1
2.53	6	35.5
2.30	8	39.2
2.23	20	39.9
2.26	2	40.4

Por otra parte, el empleo de la ecuación de Deybe-Scherrer nos permite calcular el grado de cristalinidad de un material a partir de su espectro DRX mediante la siguiente ecuación:

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta}$$

donde:

D = tamaño de partícula.

K = factor de forma.

λ = longitud de onda correspondiente a la radiación $K\alpha$ del Cu.

β = ensanchamiento angular debido a la dimensión del cristal.

θ = ángulo de Bragg.

El grado de cristalinidad presente en los fosfatos cálcicos varía enormemente con el tiempo y la temperatura de calcinación de los mismos.

Espectroscopía Infrarroja:

La técnica de espectroscopía infrarroja también nos permite la identificación de los fosfatos de calcio cristalinos. Los espectros de los fosfatos de calcio presentan las bandas correspondientes al anión PO_4^{3-} que presenta una alta simetría. Este anión presenta cuatro modos de vibración fundamentales, que se muestran a continuación:

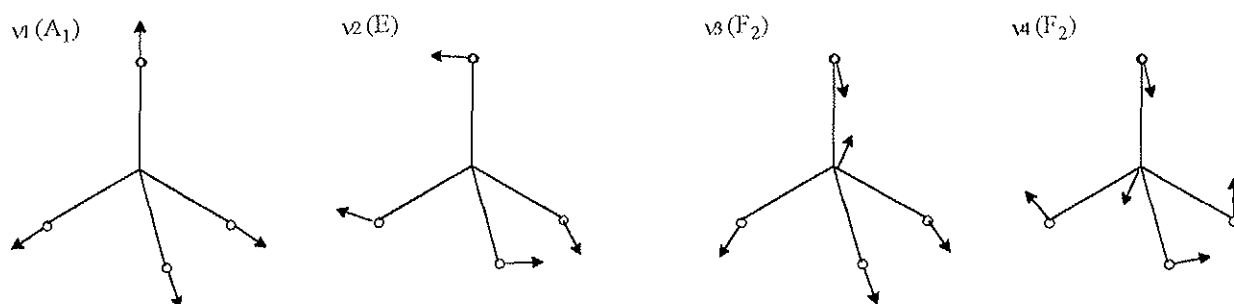


Figura 69.- Modos normales de vibración para moléculas tetraédricas XY_4 .

Las frecuencias fundamentales de vibración 1, 2, 3 y 4 del anión PO_4^{3-} se corresponden a las siguientes longitudes de onda:

- ν_1 : vibración de tensión simétrica a 940 cm^{-1} .
- ν_2 : vibración de deformación a 420 cm^{-1} .
- ν_3 : vibración de tensión asimétrica a 1020 cm^{-1} .
- ν_4 : vibración de deformación a 560 cm^{-1} .

La hidroxiapatita se caracteriza por poseer en su espectro IR bandas de absorción bien definidas en la región de los 3570 cm^{-1} , correspondiente a las vibraciones de tensión del grupo OH y que generalmente se presenta como una banda ancha. También presenta una banda de absorción en los 630 cm^{-1} , que puede deberse al modo de vibración del OH. La presencia de

estas bandas hace posible su diferenciación con el β -fosfato tricálcico (β -FTC), ya que este último no presenta en su estructura ningún grupo hidroxilo.

El espectro IR de la HA, desde los 4000 a 400 cm^{-1} , ha sido objeto de numerosos estudios^{301,302}, los cuales intentan asignar las bandas de absorción de los modos de vibración fundamentales del anión PO_4^{3-} . En la Tabla 34 se muestran las bandas de absorción del grupo fosfato para la hidroxiapatita.

Tabla 34.- Bandas de absorción del grupo PO_4^{3-} para la HA.

Modo de vibración	Frecuencia (cm^{-1})
ν_1	962
ν_2	470
ν_3	1090; 1062; 1030
ν_4	601; 571; 565

Otros autores³⁰³ han realizado un estudio donde se demuestra que intensidad de la banda del grupo hidróxilo, OH (3570 cm^{-1}), disminuye con la temperatura de calcinación de la HA, lo cual indica que la HA se encuentra totalmente hidroxilada a temperaturas entre los 800-900 °C, empezando a deshidroxilarse a temperaturas más altas.

Análisis químico

A través del análisis de los contenidos de Ca y P, principales constituyentes de los fosfatos cálcicos, es posible la identificación de los diferentes tipos de estos materiales. En la Tabla 35 se muestran las relaciones molares de los fosfatos de calcio más comunes.

La evaluación de la composición química de los fosfatos de calcio presenta algunos problemas debido a las limitaciones propias de las técnicas que se emplean. La causa fundamental de estas limitaciones viene dada por los altos porcentajes de calcio y fósforo que presentan estos materiales, lo cual implica hacer grandes diluciones o la utilización de muy poca

cantidad de muestra para que las concentraciones de Ca y P se encuentren dentro del intervalo de concentraciones detectables por la técnica a utilizar.

Tabla 35.- Relaciones molares Ca/P de los fosfatos cálcicos.

Muestra	Fórmula	Relación molar (Ca/P)
Fosfato dicálcico	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1.0
Fosfato tricálcico	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5
Fosfato tetracálcico	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	2.0
Hidroxiapatita	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67

Estos dos factores, la excesiva dilución de la muestra y la imprecisión en la pesada, pueden dar lugar a errores considerables en la determinación y cálculo de las relaciones molares Ca/P de estos materiales por métodos espectroscópicos. Dentro de las diferentes técnicas empleadas para el análisis químico de Ca y P las más utilizadas se pueden considerar las siguientes:

a) Ca

- Espectroscopia de absorción atómica (EAA).
- Valoración con EDTA, usando como indicador el negro de eriocromo.
- Volumetría: método de Koltoff y Sandell.

b) P

- Espectrofotometría UV-Vis
 - Método de Murphy y Riley
 - Formación de un complejo fosfovanadiomolibdato
- Gravimetría
- Espectrofotometría de emisión por plasma (ICP).

Los errores en la determinación de la relación Ca/P, mediante la valoración con EDTA para el calcio y el método de Murphy para el análisis del fósforo, se han estimado en un $\pm 2\%$. Cuando la determinación de P se realiza por espectrofotometría, mediante la formación del complejo de fosfovanadiomolibdato, el error en la medida es de tan solo $\pm 1\%$. Existen otros métodos de determinación de la relación Ca/P a través de técnicas físicas, como la difracción de rayos X, la cual es mucho más precisa que los métodos antes mencionados.

Propiedades

Superficie específica

Las características físicas de un material son determinantes de sus propiedades. Así, la superficie específica (S_e) de un material influye considerablemente en:

- Proceso de sinterización: para un tamaño de cristal dado, cuanto mayor sea su S_e mayor es la reactividad del polvo. La S_e , junto a otros factores, afecta al empaquetamiento de las partículas y, consecuentemente, al proceso de densificación y a la porosidad.
- La biocompatibilidad y degradación del biomaterial en un medio fisiológico: la degradación de los fosfatos cálcicos se puede explicar por dos procesos, dilución físico-química y desintegración del implante en pequeñas partículas. La velocidad de la dilución físico-química esta gobernada por una serie de factores, siendo la S_e uno de ellos; la dilución estará favorecida por la existencia de una mayor S_e .

a) Medida de la Superficie específica.

Existen muchas técnicas para realizar las medidas de la S_e . Las más comunes son la permeametría y la adsorción de gas.

- a) Permeametría: esta técnica esta basada en la resistencia que ofrece un sólido dispuesto en un lecho fijo al flujo de un gas que lo atraviesa.

- b) Adsorción de gas: Los átomos superficiales de un sólido están cargados con una cierta energía superficial que puede ser fácilmente compensada por la adsorción de algunas moléculas de gas desde la atmósfera. El enlace entre dichos átomos y el gas adsorbido puede ser grande o solamente estar unidos por una fuerza de tipo Van der Waals, lo cual permite que este gas sea fácilmente eliminado al aplicar cierto vacío. Este fenómeno de adsorción débil permite medir el área superficial de un sólido, si se puede medir la cantidad de gas adsorbido para formar una monocapa y si se conoce el tamaño de la molécula adsorbida.

La S_e se puede determinar por el método BET, basado en un modelo teórico del proceso de adsorción propuesto por Brunauer, Emmet y Teller. Estos autores modelaron el equilibrio entre un vapor y el adsorbente en el cual capas múltiples de moléculas de vapor son adsorbidas sin la completa adsorción de las capas subyacentes. Se considera que no existen sitios preferenciales de adsorción ni interacciones laterales entre moléculas adsorbidas y que las fuerzas de condensación son activadas en la adsorción.

Porosidad

Tanto el tamaño como la distribución de los poros es un factor crítico en el diseño de los implantes cerámicos con aplicación clínica, afectando no solo la penetración de los tejidos y crecimiento interno del hueso a través del implante, sino a la resistencia física del material. Al aumentar la porosidad disminuye la resistencia según la siguiente ecuación:

$$\sigma = \sigma_0 \cdot e^{-cp}$$

donde:

σ = es la resistencia

σ_0 = resistencia para una porosidad 0

c = es una constante

p = porosidad

La penetración por parte de los tejidos que rodean al implante y la formación del hueso requiere que el tamaño de los poros del material sean grandes, macroporos, mientras que las propiedades mecánicas se ven favorecidas por la existencia de poros pequeños, microporos. Esta disyuntiva implica que debe de establecerse un balance entre ambas necesidades.

Se encuentra descrito en la literatura que un tamaño de poro mínimo de aproximadamente 100 μm es el tamaño óptimo para el crecimiento del hueso a través de las cerámicas porosas³⁰⁴. Otros autores hacen referencia a materiales porosos que presentan una distribución de poros interconectados con un tamaño de poro entre 160-210 μm y 210-300 μm que permiten el crecimiento del hueso y al mismo tiempo que el material presente buenas propiedades mecánicas³⁰⁵.

La porosidad es pues uno de los factores, junto a otros, que afecta la bioreabsorción de los materiales a base de HA. Estudios realizados por de Groot concluyen que la velocidad de este proceso esta controlada por la microporosidad ya que beneficia la disolución parcial del material en fluidos biológicos³⁰⁶.

Entre las técnicas para la medida de este parámetro y que son igualmente utilizables para la medición de la superficie específica podemos encontrar: la porosimetría de mercurio y la adsorción de gas.

a) Porosimetría de mercurio.

Cuando el mercurio se introduce en un capilar de radio r , y teniendo en cuenta que es un líquido no humectante, la fuerza que se opone a su penetración es igual a :

$$F = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot \gamma \cdot \cos \phi$$

donde:

γ = es la tensión superficial del mercurio

θ = es el ángulo de contacto

si forzamos la penetración aplicando una cierta presión (P), la fuerza conductora del mercurio hacia dentro de los poros será:

$$-F = P \cdot \pi \cdot r^2$$

el capilar se llenará cuando se cumpla la siguiente relación:

$$-\pi \cdot r^2 \cdot P = 2 \cdot \pi \cdot r \cdot \cos \phi$$

por lo que la presión P será:

$$P = \frac{-2 \cdot \gamma \cdot \cos \phi}{r}$$

esta expresión permite deducir el radio de poro a partir de la presión aplicada para que el mercurio penetre en dicho poro. El intervalo de radio de poro que se puede medir con esta técnica comprende desde $> 2000 \mu\text{m}$ hasta $0.002 \mu\text{m}$. Las curvas porosimétricas se obtienen al representar la distribución de volumen de poro vacíos en función de sus respectivos radios. Estas curvas presentan cinco características comunes:

- En las muestras de polvos porosos el mercurio penetra en los vacíos interparticulares a bajas presiones y en los poros intraparticulares a elevadas presiones.
- Todas las curvas porosimétricas presentan histéresis.
- Después del primer ciclo de intrusión-extrusión parte del mercurio queda retenido en la muestra, con lo cual la curva no regresa al origen sino que intercepta el eje de las abscisas a un valor finito.
- En los sucesivos ciclos va disminuyendo la histéresis, lo que significa que la retención del mercurio va cesando.

- Cada paso en la curva de intrusión se corresponde con otro en la extrusión, pero a más baja presión.

Mediante esta técnica de porosimetría de mercurio es posible obtener los siguientes datos:

- Distribución del tamaño de poro, acumulativa y diferencial.
- Volumen total de poros y porcentaje de porosidad.
- Densidad aparente y real.
- Distribución de áreas superficiales de poros.
- Área total de poros.
- Compresibilidad.
- Complejidad de los poros.

b) Adsorción de gas.

Se puede utilizar esta técnica para la determinación de poros cuyos tamaños estén comprendidos entre 0.1 m y 0.0015 m. Se asume que el proceso de adsorción está favorecido en los poros pequeños debido a que en el equilibrio los potenciales superficiales del adsorbato líquido y su vapor coinciden, lo que da lugar a la condensación del adsorbato hasta alcanzar un radio de poro r donde la condensación y la evaporación son iguales. Por ello, r se puede relacionar con la presión de vapor P en el poro mediante la ecuación de Kelvin:

$$\ln \frac{P}{P_0} = -\frac{2 \cdot \gamma \cdot \bar{V}}{r \cdot R \cdot T} \cdot \cos \theta$$

donde:

P_o = es la tensión de vapor en el equilibrio de líquido libre.

γ = es la tensión superficial del líquido.

$\bar{V}$ = es el volumen molar del líquido.

θ = ángulo de contacto del líquido y la pared del poro.

La representación gráfica más común es la variación del volumen de poros en función del radio y pueden presentar histéresis. Existen varios tipos de histéresis las cuales se corresponden con una forma particular de poro las cuales se recogen a continuación:

- a) Histéresis tipo A: corresponde a poros tubulares abiertos por ambos lados. Este tipo de histéresis es la común.
- b) Histéresis tipo B: corresponde con los poros de la forma de “hendidura” que son aquellos formados por la superposición de plaquetas cristalinas paralelas entre sí separados por pequeñas partículas o, a veces, por ciertos defectos cristalinos.
- c) Histéresis tipo C y D: derivan de los tipos A y B respectivamente. El tipo C corresponde a poros cónicos o piramidales y el D a poros formados entre plaquetas cristalinas no paralelas.
- d) Histéresis tipo E: indica la presencia de poros en forma de botella. Estos poros son característicos de sólidos formados por aglomerados de pequeñas partículas esferoidales.

Por otro lado, y aunque en general todos los fosfatos de calcio son poco solubles en agua, la HA es el menos soluble al pH fisiológico. El producto de solubilidad del mismo es del orden de 10^{-59} , es decir que es prácticamente imposible tener iones Ca^{2+} y PO_4^{3-} disueltos en agua pura a pH neutro; debido a esto, la mayor parte del Ca del organismo esta presente en estado sólido, almacenados en los tejidos óseos. Sin embargo, la HA es más soluble en medios acuosos ácidos que en medios biológicos y se podría dar en el caso de una infección en los bordes de los osteoclastos. La dureza de la HA es de 5 mhos y su densidad es de 3,156 g/mL. Su coeficiente de expansión térmica tiene un valor de $11.6 \cdot 10^{-6} \text{ } ^\circ\text{K}^{-1}$.

Bibliografía

- ¹ J. San Román, P. Guillén, *Rev. Plast. Mod.*, **439**, 33, 1983.
- ² F.C.M. Driessens, J.A. Planell, F.J. Gil, en "*Encycopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering, Part B: Applications*", vol 2, eds. by D.L. Wise, D. J. Trantolo, D.E. Altobelli, M.J. Yaszemski, J.D. Gresser, E.R. Schwartz, 855, 1994.
- ³ P. Frayssinet, D. Mathon, A. Lerch, A. Autefage, P. Collard., N. Rouquet, *J. of Biomat. Mat. Research*, **50**, 125, 2000.
- ⁴ S. Zygmunt, S.T. Larsen, H. Saveland, U. Rydhohm, *Acta Orthop. Scand.*, **63(5)**, 545, 1992.
- ⁵ W.J. Maloney, R.J. Krushell, M. Jasty, W.H Hams, *J. Bone Joint Surg.*, **73**, 191-193, 1991.
- ⁶ S. Toksing-Larsen, H. Franzen, L. Ryd, *Acta Orthop. Scand.*, **62(2)**, 102, 1991.
- ⁷ P. Montemartini, T. Cuadrado, P. Frontini, *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.*, **10**, 309, 1999.
- ⁸ S. Downes, en "*Biosis*", eds. D. Komitowski, Laub, Elztal-Dachau, 51-58, 1992.
- ⁹ R. Zhang, P.X. Ma, *J. of Biomed. Mat. Research*, **44**, 446, 1999.
- ¹⁰ R. Turczyn, P. Weiss, M. Lapkowski, G. Daculsi, *J. of Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **11**, 217, 2000.
- ¹¹ Y. Imai, M. Nagai, M. Watanabe, *J. of Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **10**, 421, 1999.
- ¹² G. Carotenuto, G. Spagnuolo, L. Ambrosio, L. Nicolais, *J. of Mat. Sci. Mat in Med.*, **10**, 671-676, 1999.
- ¹³ H. Onishi, L.L. Hench, J. Wilson, F. Sugihara, E. Tsuji, S. Kushitani, H. Inaki, *J. of Biomed. Mat. Research*, **44**, 31, 1999.
- ¹⁴ U. Ripamonti, *J. Bone Jt. Surgery*, **73^a**, 692-703, 1991.
- ¹⁵ K. Vangervik, en "*Bone Grafts and Bone Substitutes*", eds. by M. Habal, A. Reddi, Philadelphia, P.A., 112-12, 1992.
- ¹⁶ W. Bonfield, en "*Advances in Biomaterials. Biomaterials and Clinical Applications*", eds. A. Pizzoferrato, P.G. Machetti, A. Ravaglioli, and A.J.C. Lee, Elsevier, Amsterdam, vol 7, 13-21, 1987.
- ¹⁷ W. Spahl, H. Bodzikiewics, W. Geurtsen, *J. Dent. Res.*, **26**, 137, 1998.
- ¹⁸ J.S. Young, K.D. Gonzales, K.S. Anseth, *Biomaterials*, **21**, 1181, 2000.
- ¹⁹ F. Catalina, C. Peinado, *Rev. Plast. Mod.*, **420**, 829, 1991.
- ²⁰ J. San Román, P. Guillén, *Rev. Plast. Mod.*, **438**, 674, 1992.
- ²¹ I.V. Yannas, en "*Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*", eds. B.D. Rather, A.S. Hoffman, J. Schen, J.E. Lemons, Academic Press, London, 84-94, 1996.

- ²² S.J. Peter, M.J. Miller, A.W. Yasko, M.J. Yaszemski, A.G. Mikos, *J. of Biomed. Mat. Research*, **43**, 422, 1998.
- ²³ J. Maddut, E. Perousse, M. Vert, *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 301, 1996.
- ²⁴ H. Bren, K. Walter, R. Langer, *Eur. J. Pharmacol Biopharmacol*, **3**, 2-7, 1993.
- ²⁵ M.J. Alonso, S. Cohen, T.G. Park, R. Gupta, G. Siber, R. Langer, *Pharmaceut. Res.*, **10**, 945-953, 1993.
- ²⁶ I. Esparza, T. Kissel, *Vaccine*, **10**, 714-720, 1992.
- ²⁷ I. Engelberg, J. Khon, *Biomaterials*, **12**, 292-304, 1991.
- ²⁸ R. Langer, J.P. Vacanti, *Science*, **260**, 920-926, 1993.
- ²⁹ A. Göpferich, *Biomaterials*, **17**, 103-114, 1996.
- ³⁰ M.A. Golub, *Makromol. Chem. Makromol. Symp.*, **53**, 379-391, 1992.
- ³¹ M. Vert, J. Feijen, A. Albertson, G. Scott, E. Chrellini, en "*Degradable Polymers and Plastics*", Redwood Press Ltd, 73-92, 1992.
- ³² J. Tamada, R. Langer, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **90**, 552-556, 1993.
- ³³ D.A. Chattfield, I.N. Einham, *J. Polym. Sci. Chem.*, **19**, 601-618, 1981.
- ³⁴ A. Barndwood, K.R. Noble, K. Schindhelm, *Adv. Biomater*, **10**, 413-420, 1992.
- ³⁵ A. Göpferich, R. Langer, *J. Polym. Sci.*, **31**, 2445-2458, 1993.
- ³⁶ K.M. Shakesheff, M. Davies, A. Domb, *Proc. Int. Symp. Control Rel. Bioact. Mat.*, **21**, 618-619, 1994.
- ³⁷ A.G. Mikos, A.J. Thorsen, L.A. Czerwonka, Y. Bao, R. Langer, *Polymer*, **35**, 1067-1078, 1994.
- ³⁸ R. Wada, S.H. Ikada, *J. Pharm. Pharmacol.*, **43**, 605-608, 1991.
- ³⁹ S.M. Li, M. Vert, *Macromolecules*, **27**, 1307-1310, 1994.
- ⁴⁰ T. Hayashi, *Prog. in Polym. Sci.*, **19**, 663, 1994.
- ⁴¹ J. Kohn y R. Langer, en "*Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine*", eds. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, Academic Press, London, 64-73, 1996.
- ⁴² C.C. Chu, en "*Concise Encyclopedia of Medical & Dental Materials*", eds. D. Williams, Pergamon Press, Oxford, 346-353, 1994.
- ⁴³ D. Goupil, en "*Biomaterials Science: an Introduction to Materials in Medicine*", eds. B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons, Academic Press, London, 356-360, 1996.
- ⁴⁴ A. U. Daniels, M. K. O. Chang y K.P. Andriano, *J. Appl. Biomat.*, **1**, 57, 1990.

- ⁴⁵ K.G. Marra, J.W. Szem, P.N. Kumta, P.A. DiMilla, L.E. Weiss, *J. of Biomed. Mat. Reserach*, **7**, 324, 1999.
- ⁴⁶ C.A.P. Soziane, M.D.C. Topp, H. Veenstra, D.W. Grijpma, A.J. Pennings, *Polym. Bulletin*, **34**, 599, 1994.
- ⁴⁷ K.J. Lowry, K.R. Hamson, L. Bear, Y.B. Peng, R. Calaluce, M.L. Evans, A.O. Anglen, W.C. Allen, *J. Biomed. Mater. Res.*, **36**, 536, 1997.
- ⁴⁸ H.R. Kricheldorf, L. Wahlen, K. Cheng, *Macromol. Rapid. Commun.*, **18**, 569, 1997.
- ⁴⁹ J. San Román, P. Guillén, *Biomaterials*, **12**, 236, 1991.
- ⁵⁰ J.L. Eguiburu, M.J. Fernández-Berridi, J. San Román, *Polymer*, **33**, 173, 1995.
- ⁵¹ J.L. Eguiburu, M.J. Fernández-Berridi, J. San Román, *Polymer*, **37**, 3615, 1996.
- ⁵² S. Niu, H. Kurumatani, S. Satoh, K. Kanda, T. Oka, K. Watanabe, *ASAIO Trans*, **39**, 750, 1993.
- ⁵³ C.M. Agrawal, K.F. Haas, D.A. Leopold, H.G. Clerk, *Biomaterials*, **13**, 176, 1992.
- ⁵⁴ J. San Román, J. Buján, J.M. Bellón, A. Gallardo, M.C. Escudero, E. Jorge, J. de Haro, L. Alvarez, J.L. Castillo-Olivares, *J. Biomed. Mater. Res.*, **32**, 19, 1996.
- ⁵⁵ J. San Román, M.C. Escudero, A. Gallardo, R. Santa Cruz, E. Jorge, J. de Haro, L. Alvarez, I. Millan, J. Buján, J.M. Bellón, J.L. Castillo-Olivares, *Biomaterials.*, **15**, 759, 1994.
- ⁵⁶ T. Matsuda, H. Miwa, M.J. Moghadam, F. Lida, *ASAIO Trans*, **39**, 327, 1993.
- ⁵⁷ K. Ono, Y. Saito, H. Yura, K. Ishikawa, A. Kurita, T.A. Kaike, M. Ishihara, *J. of Biomed. Mat. Research*, **49**, 289, 2000.
- ⁵⁸ M. Ito, Y. Hidaka, M. Nakajima, H. Yagasaki, A.H. Kafrawy, *J. of Biomed. Mat. Research*, **45**, 204, 1999.
- ⁵⁹ T. Matsuda, M.J. Moghadam, H. Miwa, K. Sakurai, F. Lida, *ASAIO Trans*, **38**, 154, 1992.
- ⁶⁰ A.S. Sawhney, C.P. Pathak, J.J. van Rensburg, R.C. Dunn, J.A. Hubell, *J. Biomed. Mater. Res.*, **28**, 831, 1994.
- ⁶¹ M. Koide, K. Osaki, J. Konishi, K. Oyadama, T. Katatura, A. Takahasi, *J. Biomed. Mater. Res.*, **27**, 79, 1993.
- ⁶² E.Baki, M. Odabaki, *J. of Appl. Polym. Sci.*, **76**, 1637, 2000.
- ⁶³ B. Jeong, Y.H. Bae, D.S. Lee, S.W. Kim, *Nature*, **388**, 869, 1997.
- ⁶⁴ L.R. Moses, K.J. Dileep, Ch. Shama, *J. of Appl. Polym. Sci.*, **75**, 1089, 2000.
- ⁶⁵ Y.J. Park, Y.M. Lee, S.N. Park, S.Y. Sheen, C.P. Chung, S.J. Lee, *Biomaterials*, **21**, 153, 2000.

- ⁶⁶ A. Park, B. Wu, L.G. Griffith, *J. Biomater. Sci., Polym. Edn.*, **9**, 89, 1998.
- ⁶⁷ D.K. Han, K.D. Park, G.H. Gyu, S.Y. Jeong, U.Y. Kim, B.G. Min, Y.H. Kim, *J. Biomed. Mater. Res.*, **30**, 23, 1996.
- ⁶⁸ X.P. Wang, Y. Feng, Z. Shen, *J. of Appl. Polym. Sci.*, **75**, 740, 2000.
- ⁶⁹ W.F.A. den Dunnen, P.H. Robinson, R. Van Wassl, A.J. Pennings, M.B.M. van Leeuwen, J.M. Schakenraad, *J. Biomed. Mater. Res.*, **36**, 337, 1997.
- ⁷⁰ T. Taguchi, M. Shiraogawa, A. Kishida, M. Akashi, *J. of Appl. Polym. Sci.*, **10**, 19, 1990.
- ⁷¹ S. Sun, Y.W. Wong, K. Yao, A.F.T. Mak, *J. of Appl. Polym. Sci.*, **76**, 342, 2000.
- ⁷² H. Wang, W. Li, Y. Lu, Z. Wang, Z. Wei, *J. Appl. Polym. Sci.*, **61**, 2221-2224, 1996.
- ⁷³ H. Wang, W. Li, Y. Lu, Z. Wang, *J. Appl. Polym. Sci.*, **65**, 1445-1450, 1997.
- ⁷⁴ V. Crescenzi, G. Paradossi, P. Desideri, M. Dentini, F. Cavalieri, E. Honici, R. Lisi, *Polym. Gels and Netw.*, **5**, 225-239, 1997.
- ⁷⁵ E. Tsuchida, K. Abe, *Advances in Polymers Science*, Springer-Verlag, Berlin, 1982.
- ⁷⁶ H. Hoffman, U. Kästner, R. Dönges, R. Ehrler, *Polym. Gels and Netw.*, **4**, 509-526, 1996.
- ⁷⁷ K. Kobayashi, A. Tsuchida, T. Usui, T. Akaike, *Macromolecules*, **30**, 2016-2020, 1997.
- ⁷⁸ S. Hirano, H. Seino, Y. Akiyama, I. Nonaka, *Progress in Biomedical Polymers*, New York, Plenum Press, 283-290, 1990.
- ⁷⁹ R.A.A. Muzzarelli, *Biomaterials*, **20**, 7-16, 1993.
- ⁸⁰ M.L. Lorenzo-Lamosa, C. Remuñan-López, J.L. Vila-Jato, M.J. Alonso, *J. Control. Release*, **52**, 109-118, 1998.
- ⁸¹ Yu. Ga-er, G.M. Frederick, A.R. Geoffrey, R.H. Marchessault, *Macromolecules*, **32**, 518-520, 1999.
- ⁸² W.N.E. Van-Dijk-Woultius, J.J. Kettenen-Vanden Bosch, A. Van der Kerk-van Hoof, W.E. Hennink, *Macromolecules*, **30**, 3411-3413, 1997.
- ⁸³ G. Staikos, G. Bokias, C. Tsitilianis, *J. Appl. Polym. Sci.*, **48**, 215, 1993.
- ⁸⁴ I. Iliopoulos, R. Audebert, *Macromolecules*, **24**, 2566, 1991.
- ⁸⁵ E. Loubaki, S. Sicsic, F. Le Goffic, *J. Eur. Polym.*, **25**, 379, 1989.
- ⁸⁶ Y.M. Lee, S.S. Kim, S.H. Kim, *J. Mater Sci. Mater in Medicine*, **8**, 537-541, 1997.
- ⁸⁷ K. Dusek, *TRIP*, **5**, 268-274, 1997.
- ⁸⁸ Trabajo de Biomateriales de Peniche.
- ⁸⁹ A. Hebeish, A. Wally, F.A. Abdel-Mohdy, A.S. Aly, *J. Appl. Polym. Sci.*, **66**, 1029-1037, 1997.

- ⁹⁰ P. Cerrai, G.D. Guerra, M. Tricoli, S. Maltini, N. Barbani, L. Petarca, *Macromol Chem. Phys.*, **197**, 3567-3579, 1996.
- ⁹¹ C. Peniche, C. Elvira, J. San Román, *Polymer*, **39**, 6549-6554, 1998.
- ⁹² A. Pérez-Gramatges, W. Argüelles, C. Peniche, *Polym. Bull.*, **37**, 127-134, 1996.
- ⁹³ S.Y. Nam, V.M. Lee, *J. Membr. Sci.*, **135**, 161-171, 1997.
- ⁹⁴ Q. Xin, A. Wrzyszczyński, K. Pielichowski et al., *Pure Appl. Chem.*, **A34(5)**, 881-889, 1997.
- ⁹⁵ K. Kurita, K. Tomita, T. Tada, S. Ishi, S. Nishimura and K. Shimada, *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **31**, 485, 1993.
- ⁹⁶ W. Argüelles-Monall and C. Peniche-Covas, *Makromol. Chem. Rapid. Commun.*, **14**, 735, 1993.
- ⁹⁷ K. Kurita, M. Kawata, Y. Koyama and S. Nishimura, *J. Appl. Polym. Sci.*, **42**, 2885, 1991.
- ⁹⁸ W. Geurtsen, W. Spahl, G. Leghausen, *J. of Biomed. Mat. Research*, **44**, 73, 1999.
- ⁹⁹ L.A., Lindén in: *Radiation Curing in Polymer Science and Technology*, J.P., Fouassier and F., Rabek (Eds.), Elsevier, London, **4**, 387, 1993.
- ¹⁰⁰ W.D., Cook, *Polymer*, **33**, 600, 1992.
- ¹⁰¹ H. K. No, S.P. Meyers, en "Chitin Handbook", eds. R.A.A. Muzarrelli and M.G. Peters, European Chitin Society, 473-489, 1997.
- ¹⁰² S.C. Rogovina, G.A. Vikoreva, T.A. Akopova, I.N. Gorbachenko, *J. of Appl. Polym. Sci.*, **76**, 616, 2000.
- ¹⁰³ A. Denuziere, D. Ferrier, A. Domard, *Carbohydr. Polym.*, **29**, 317, 1996.
- ¹⁰⁴ W.H. Park, *Macromol. Chem. Phys.*, **197**, 2175, 1996.
- ¹⁰⁵ Y.W. Cho, Y.N. Cho, S.H. Chung, G. Yoo, S.W. Ko, *Biomaterials*, **20**, 2139-2145, 1999.
- ¹⁰⁶ K.C. Gupta, M.N.V. Ravi, *J. of Appl. Polym. Sci.*, **76**, 672, 2000.
- ¹⁰⁷ A. B. Scranton, J. Klier, C.L. Aronson, en "ACS Symposium Series", **480**, 171, 1992.
- ¹⁰⁸ W. Pitterman, V. Horner, R. Wachter, en "Chitin Handbook", eds. R.A.A. Muzarrelli and M.G. Peters, European Chitin Society, 361-372, 1997.
- ¹⁰⁹ J. Zhang, N. Peppas, *Macromolecules*, **22**, 102, 2000.

- ¹¹⁰ M. Yao, W. Li, Y. Li., Z. Wang, *J. Appl. Polym. Sci.*, **32**, 1213, 1994.
- ¹¹¹ H. Onishi, T. Nagai, Y. Machida, en "*Chitin Handbook*", eds. R.A.A. Muzarrelli and M.G. Peters, European Chitin Society, 338-389, 1997.
- ¹¹² T. Chandy, D. L. Mooradan, H. Gondu, *J. Appl. Polym. Sci.*, **70**, 2143, 1998.
- ¹¹³ V. Zecchi, K. Aiedeh, J. Orenti, en "*Chitin Handbook*", eds. R.A.A. Muzarrelli and M.G. Peters, European Chitin Society, 423-429, 1997.
- ¹¹⁴ P.R. Hari, T. Chandy, C.P. Sharma, *J. Microencapsulation*, **13**, 319-329, 1996.
- ¹¹⁵ H. Matsuyama, Y. Kitamura, Y. Nakamura, *J. Appl. Polym. Sci.*, **72**, 397-404, 1999.
- ¹¹⁶ K. Sakurai, Y. Kitamura, en "*Chitin Handbook*", eds. R.A.A. Muzarrelli and M.G. Peters, European Chitin Society, 445-450, 1997.
- ¹¹⁷ P. Cerrai, G.D. Guerra, M. Tricoli, A. Krajewski, A. Ravaglioli, R. Martinetti, L. Dolani, M. Fini, A. Scarano, A. Pratelli, *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.*, **10**, 677-682, 1999.
- ¹¹⁸ S.Hirano, M. Zhang, M. Nakamura, T. Miyata, *Biomaterials*, **21**, 997, 2000.
- ¹¹⁹ M. Piratelli, A. Scarano, C. Mangano, R. Martinetti, A. Piratelli, en "*Proceedings of the 4th Ceramics, Cells and Tissues Meeting Seminar series on Ceramics Polymer Composites*", eds. A. Ravaglioli, A. Krajevski, Faenza, Italy, 127-133, 1998.
- ¹²⁰ M. Ito, *Biomaterials*, **12**, 41-49, 1991.
- ¹²¹ T. Kawakami, M. Antoh, H. Hasegawa, T. Yamagishi, M. Ito, S. Eda, *Med. Scien. Research*, **19**, 21, 725-727, 1991.
- ¹²² R.A.A. Muzarrelli, M.M. Belmonte, G. Biagini, C. Castaldini, M.G. Gandolfi, A. Krajevski, A. Ravaglioli, M. Fini, R. Giardino, *J. of Bioact. and Comp. Polym.*, **10**, 249, 1995.
- ¹²³ D. Knaack, M.E.D. Goad, M. Aiolova, Ch. Rey., A. Tofigui, P. Chakravarty, D. Doke, *J. of Biomed. Mat. Research*, **43**, 399, 1998.

- ¹²⁴ Y. Okada, M. Kobayashi, H. Fujita, Y. Katsura, H. Matsuoka, H. Takadama, T. Kokubo, T. Nakamura, *J. of Biomed. Mat. Research*, **45**, 277, 1999.
- ¹²⁵ K.A. Hing, S.M. Best, W. Bonfield, *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.*, **10**, 135, 1999.
- ¹²⁶ Y. Hang, K. Xu, J. Lu, , *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.*, **10**, 243, 1999.
- ¹²⁷ B.A. Hartwing, L.L. Hench, *J. Biomed. Mater. Res.*, **6**, 413, 1972.
- ¹²⁸ J.F. Osborn, Y.H. Newesely, en "*Dynamic aspects of the implant-bone interface*", eds. Carl Henser Verlag, 111-123, 1980.
- ¹²⁹
- ¹³⁰ T. Furukawa, Y. Matsubue, T. Yasunaga, Y. Shikinami, M. Okono, T. Nakamura, *Biomaterials*, **21**, 889, 2000.
- ¹³¹ M. Kivalo, V. Siren, C. Raitta, I. Imunen, *J. of Biomed. Mater. Research: Appl. Biomat.*, **53**, 76, 2000.
- ¹³² K. De Groot, R. Legueros, en "*Bioceramics Material Characteristics vs. In Vivo Behavior*", **523**, 268-277, eds. P. Ducheyne, J. Lemons, N.Y. Ann, Acad. Sci., New York.
- ¹³³ R.Z. Legueros, G. Daculsi, en "*Handbook of Bioactive Ceramics*", **vol II**, Calcium Phosphate and Hydroxyapatite Ceramics, 61-75, eds. T. Yamamuro, L. Hench, J. Wilson, CRC Press, Boca Raton FL, 1990.
- ¹³⁴ B.S. Chang, C.K. Lee, K.S. Hong, H.I. Youngs, H.S. Ryu, S.S. Chung, K.W. Park, *Biomaterials*, **21**, 1291, 2000.
- ¹³⁵
- ¹³⁶
- ¹³⁷ M. Akao, H. Aoki, K. Kato, *J. Mater. Sci.*, **17**, 343-346, 1982.
- ¹³⁸ T. Sato, M. Niwa, en "*Handbook of Bioactive Ceramics*", **vol II**, Calcium Phosphate and Hydroxyapatite Ceramics, 295-299, eds. T. Yamamuro, L. Hench, J. Wilson, CRC Press, Boca Raton FL, 1990.
- ¹³⁹ M. Gregorie, I. Orly, J. Menanteau, *J. Biomed. Mat. Res.*, **24**, 165-177, 1990,
- ¹⁴⁰ K. de Groot, C.P.A.T. Klein, J.G.C. Wolke, J. de Blieck-Hogervorst, en "*Handbook of Bioactive Ceramics*", **vol II**, Calcium Phosphate and Hydroxyapatite Ceramics, 3-15, eds. T. Yamamuro, L. Hench, J. Wilson, CRC Press, Boca Raton FL, 1990.
- ¹⁴¹ G. Guitian, R. Conde Pumpido, C. Santos, A. Pazo, J. Coudeiro, *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidr.*, **29**, 253-7, 1990.
- ¹⁴²

- ¹⁴³ C.P.A.T. Klein, K. de Groot, Y. Abe, H. Hosono, *Biomaterials*, **8**, 234-236, 1987.
- ¹⁴⁴ G.L. de Lange, en en "*Handbook of Bioactive Ceramics*", vol II, Calcium Phosphate and Hydroxyapatite Ceramics, 178-28, eds. T. Yamamuro, L. Hench, J. Wilson, CRC Press, Boca Raton FL, 1990.
- ¹⁴⁵ C.P.A.T. Klein, K. de Groot, A.A. Driessen, H.B.M. van der Lubbe, *Biomaterials*, **7**, 144-46, 1986.
- ¹⁴⁶ M. Jarcho, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **157**, 259-278, 1981.
- ¹⁴⁷ J.E. Davies, T. Matsuda, *Scanning Microsc.*, **2**, 1445, 1988.
- ¹⁴⁸ T. Li, M. Akao, M. Tagaki, , *J. of Biomed. Matr. Research: Appl. Biomat.*, **9**, 631, 1998.
- ¹⁴⁹ I. Ono, T. Tateshita, T. Nakajima, *Biomaterials*, **21**, 143, 2000.
- ¹⁵⁰ W. Rathje, *Bodenk Pflernah* , **12**, 121, 1939.
- ¹⁵¹ K.E. Tanner, C. Doyle, W. Bonfield, en "*Clinical Implant Material. Advances in Biomaterials*", **9**, Elsevier, Amsterdam, 149, 1990.
- ¹⁵² Ficha 9-432, *PDF-2 Database Sets 1-45*, International Centre for Diffraction Data, 1995.
- ¹⁵³ I. Baltay, K. Watanabe, H. Kusakari, U. Taguchi, O. Miyakawa, M. Kobayashi, N. Ito, *J. of Biomed. Mat. Research: Appl. Biomat.*, **53**, 76, 2000.
- ¹⁵⁴ Ç. Tuncer, G. Olgun, *J. of Appl. Polym. Scien.*, **70**, 891-895, 1998.
- ¹⁵⁵ B.A.M. Venhoven, A.J. de Gee, A. Werner, C.L. Davidson, *Biomaterials*, **17**, 735-740, 1996.
- ¹⁵⁶ G. Camapanile, D. Dietschi, J-M. Meyer, H. Holtz, *J. Dent Res*, **71**, 752, 1992.
- ¹⁵⁷ B.A.M Venhoven, A.J. de Gee, A. Werner, C.L. Davidson, *Biomaterials*, **15**, 1152-1156, 1994.
- ¹⁵⁸ A.J. de Gee, A.J. Feilzer, C.L. Davidson, *Dent. Mater*, **9**, 11-14, 1993.
- ¹⁵⁹ D.N. Misra, *J. Dent. Res.*, **75**, 1418-1425, 1996.
- ¹⁶⁰ J.D. Sterrett, T. Bankey, H.J. Murphy, *J. Clin. Periodontol*, **20**, 366-370, 1993.
- ¹⁶¹
- ¹⁶² C.C.P.M. Verheyen, J.R. de Wijn, C.A. Van Blitterswijk, P.M. Rozing, K. De Groot, en "*Bone*

- Bonding Biomaterials*", eds. by P. Ducheyne, T. Kokubo and C.A. Van Blitterswijk, Reed Healthcare Communications, Leiderdorp, 153, 1992.
- ¹⁶³ Z. Amjad, en "*Mineral scale formation and inhibition*", eds. Z. Amjad, New York, Plenum Press, 207-217, 1995.
- ¹⁶⁴ R.W.A. Soriano, *Tesina de Diploma*, Instituto de Ciencia de Materiales, Universidad Autónoma de Barcelona, CSIC, 1998.
- ¹⁶⁵ K.P. Andriano, T. Pohojonen, P. Tormala, *J. Appl. Biomater.*, **5**, 133, 1994.
- ¹⁶⁶ R.L. Reis, A.M. Cunha, *J. Mater. Sci.: Mater Med.*, **6**, 786, 1995.
- ¹⁶⁷ A. Okazaki, T. Koshimo, T. Saito, T. Takaen, *Biomaterials*, **21**, 483, 2000.
- ¹⁶⁸ H. Benhayoune, E. Jallot, P. Laquemic, G. Bolossier, P. Bonhomme, D. Frayssinett, *Biomaterials*, **21**, 235, 2000.
- ¹⁶⁹ P.S. Theocaris, *The Mesophase Concept in Composites*, Akademie-Verlag, Berlin, 1987.
- ¹⁷⁰ M. Alvarez, N. Davidenko, R. García, A. Alonso, R. Rodríguez, R.M. Guerra, R. Sastre, *Polym. Int.*, **48**, 699-704, 1999.
- ¹⁷¹ K. Dietliker, en "*Radiation Curing in Polymer Science and Technology*", **vol 2**, Photoinitiating System, eds. by J.P. Fouassier and J.F. Rabek, Elsevier Applied Science, London and New York, 155, 1993.
- ¹⁷² N. Davidenko, M.E. Cohen, J.M. Díaz, R. Sastre, *Rev. de Plást. Mod.*, **482**, 155, 1996.
- ¹⁷³ N. Davidenko, M.E. Cohen, J.M. Díaz, R. Sastre, *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 891-903, 1998.
- ¹⁷⁴ S.J. Peter, P. Kim, A.Y. Wasko, M.J. Yaszemski, A.G. Mikos, *J. of Biomed. Mat. Research*, **44**, 314, 1999.
- ¹⁷⁵ A. Maffezoli, P.A. Della, S. Renga, *Biomaterials*, **15**, 4221-1230, 1994.
- ¹⁷⁶
- ¹⁷⁷ Ch. Brazel, N.A. Peppas, *Polymers*, **40**, 3383-3398, 1999.

- ¹⁷⁸ G. Rossi, *TRIP*, **4**, 10, 1996.
- ¹⁷⁹ D.N. Theodoru, en “*Difusion in Polymers*”, eds. P. Neogi, 67-142, Marcel Dekker, 1996.
- ¹⁸⁰ E. Jabbari, N. A. Peppas, *Rev. Macromol. Chem. Phys.*, **C34(2)**, 205-241, 1994.
- ¹⁸¹ A.B. Argade, N.A. Peppas, *J. Appl. Polym. Sci.*, **70**, 817-829, 1998.
- ¹⁸² J. Orienti, E. Gianasi, V. Zecchi, U. Conte, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **41**, 247, 1995.
- ¹⁸³ N.A Peppas, A.R. Khare, *Adv. Drugs Deliv. Rev.*, **11**, 1, 1993.
- ¹⁸⁴ G.C. Roda, G.C. Sarti, *AIChE J.*, **36**, 851, 1991.
- ¹⁸⁵ M.E. McNeill, N.B. Graham, *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.*, **7**, 11, 937-951, 1996.
- ¹⁸⁶ H. Schott, *J. Macromol. Sci.-Phys.*, **B31(1)**, 1-9, 1992.
- ¹⁸⁷ P.A. Davis, S.J. Huang, L. Nicolais, L. Ambrosio, en “*Modified PHEMA Hydrogels in High Performance Biomaterials*”, eds. M. Szycher, Technomic Publ. Co., Lancaster, Pennsylvania, 343, 1991.
- ¹⁸⁸ C.M. Ofner III, H. Schott, *J. Pharm. Sci.*, **76**, 715, 1987.
- ¹⁸⁹ P.S. Theocaris, G.C. Papanicolau, E.P. Sideridis, *J. Reinforced Plastics and Composites*, **1**, 92, 1981.
- ¹⁹⁰ G.C. Papanicolau, P.S. Theocaris, *Colloid and Polymer Sci.*, **257**, 239, 1979.
- ¹⁹¹ P.S. Theocaris, G.C. Papanicolaou, *Fiber Sci. and Techn.*, **12**, 421, 1979.
- ¹⁹² P.S. Theocaris, G.C. Papanicolaou, G.D. Spathis, *Fiber Sci. and Techn.*, **15**, 187, 1981.
- ¹⁹³ G. Fritschy, E. Papirer, *J. Appl. Polym. Sci.*, **25**, 1867, 1980.
- ¹⁹⁴ A.R. Greenberg, *J. Mater. Sci. Lett.*, **6**, 78, 1987.
- ¹⁹⁵ S. Kaufman, W.P. Slichter, D.D. Davis, *J. Polym. Sci.*, **9**, 829, 1971.
- ¹⁹⁶ J.A. Manson, L.H. Sperling, en *Polymer Blends and Composites*”, Plenum, New York, 1976.

- ¹⁹⁷ A. Toussaint, *Prog. Org. Coat.*, **2**, 237, 1974.
- ¹⁹⁸ J. Kolarik, J. Janacek, *J. Appl. Polym. Sci.*, **20**, 841, 1976.
- ¹⁹⁹ G.J. Howard, R.A. Shanks, *J. Macromol. Sci. Chem.*, **A17**, 287, 1982.
- ²⁰⁰ Y. Yokogawa, M. Toriyama, Y. Kawamoto, T. Susuki, S. Kawamura, *J. Ceramics Soc. Japan. Int. Ed.*, **100**, 599-601, 1992.
- ²⁰¹ P.E. Wang, T.K. Chaki, *J. Mater. Sci: Mat. in Medicine*, **4**, 150-158, 1993.
- ²⁰² S. Strella, P.F. Erhardt, *J. Appl. Pol. Sci.*, **13**, 1373, 1969.
- ²⁰³ N.G. McCrom, B.E. Read, G. Williams, en "*Anelastics and dielectric effects in polymer solids*", Dover Publication, New York, 1991.
- ²⁰⁴ J.F. Mano, C.M. Vaz, S.C. Mendes, R.L. Reis, A.M. Cunha, *J. Mat. Sci: Mat. in Medicine*, **10**, 857-862, 1999.
- ²⁰⁵ J. Richards, *J. Polym. Adv. Technol.*, **7**, 784, 1996.
- ²⁰⁶ C. Maulli Agrawal, G.G. Niederawer, K.A. Athanasiou, *Tiss. Eng.*, **1**, 241, 1995.
- ²⁰⁷ R.L. Reis, I.B. Leonor, M.T. Trego, A.M. Cunha, M.H. Fernández, R. Correia, en "*Bioceramics II*", New York, USA, eds. by R.L. Legueros and J.P. Legueros, World Scientific Publication, Singapore, p. 169, 1998.
- ²⁰⁸ J.M. Yang, H.M. Li, M.Ch. Yang, Ch.H. Shin, *J. of Biomed. Mat. Research: Appl. Biomat.*, **48**, 52, 1999.
- ²⁰⁹ S.C. Mendes, R.L. Reis, A.M. Cunha, Y. P. Bovell, C.A. Van Blitterswijk, J.D. de Bruijn, en "*Proceedings of the 24th Annual Meeting of the Society for Biomaterials*", San Diego, USA, 9, 1998.
- ²¹⁰ A. Eisenberg, en "*Physical Properties of Polymers*", J.E. Mark, eds. American Chemical Society, Washington D.C., 55-95, 1984.
- ²¹¹ R.E. Wetton, en "*Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*", eds. Patrick K. Gallagher

- and Michael E. Brown, Elsevier, Amsterdam, **vol 1**, 397-398, 1998.
- ²¹² T.L. Vigo, B.J. Kinzing, en "*Composite Application: The Role of Matrix, fibre and interface*", VCH, London, 1992.
- ²¹³ F. Hindrickx, P. Dubois, R. Jerome, P. Tessye, M.G. Marti, *J. Appl. Polym. Sci.*, **33**, 439, 1997.
- ²¹⁴ E.H. Kerner, *Proc. Phys. Soc.*, **69B**, 808, 1969.
- ²¹⁵ L. Cohen, O. Ishai, *J. Comp. Mater*, **1**, 390, 1967.
- ²¹⁶ R.F. Gould, *Filler and reinforcement for Plastic*, American Chemical Society, Washintong, DC, 1974.
- ²¹⁷ Y. Ikada, en "*Polymers and Biomaterials*", eds. H. Feng, Y. Han y L. Huang, Elsevier Sci. Publi., 273-279, 1991.
- ²¹⁸ J. Heller, en "*Controlled Drugs Delivery, Fundamental and Applications, 2nd ed.*", eds. J.R. Robinson y V.H.L. Lee, New York, 180-210, 1987.
- ²¹⁹ K. Tomikaka, K. Burzaczak, K. Shiraki, Y. Ikada, *Polym. Prepar.*, **33**, 534-535, 1992.
- ²²⁰ M. K. Cox, *Biodegrad. Polym. Plastics*, **109**, 95-105, 1992.
- ²²¹ S. Li, M. Vert, *Polym. Int.*, **33**, 37-41, 1994.
- ²²² H.K. Koerten, I. van der Meulen, *J. of Biomed. Mat. Research*, **44**, 78, 1999.
- ²²³ A. Göpferich, R. Langer, *AIChE*, **41**, 2292-2299, 1995.
- ²²⁴ I.C. Kwon, Y.H. Bae, S.W. Kim, *Nature*, **354**, 291-293, 1991.
- ²²⁵ Y.Z. Wang, Y.L. Wang, H.L. Luo, G.X. Cheng, K.D. Yao, *J. of Appl. Polym. Sci.*, **75**, 987, 2000.
- ²²⁶ W. Argüelles-Monal, C. Peniche-Covas, *Makromol Chem., Rapid Commun.*, **9**, 693-697, 1988.
- ²²⁷ R. Sastre, M. Conde, F. Catalina, J.L. Mateo, *Rev. Plást. Mod.*, **393**, 375, 1989.

- ²²⁸ R. Sastre, M. Conde, J.L. Mateo, *J. Photochem. Photobiol., A: Chem*, **44**, 111, 1988.
- ²²⁹ P. Boule y J.F. Pilichowski, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem*, **71**, 51, 1993.
- ²³⁰ D.J. Liaw, K.C. Chung, *J. Chin. Inst. Chem. Eng.*, **13**, 145, 1982.
- ²³¹ G. Elsner, H.G. Zachmann, J.R. Milch, *Makromol. Chem.*, **182**, 657, 1981.
- ²³² "Developments in Polymer Photochemistry", ed. By N.S. Allen, **vol. 1-3**, Developments series, Applied Science Publisher, 1995.
- ²³³ R.D. Athey, "Emulsión Polymer Technology", eds, Marcel Dekker, N.Y., 1991.
- ²³⁴ L.A. Lindén, en "Radiation Curing in Polymer Science and Technology", **vol 4**: Practical Aspect and Applications, edited by J.P. Foussier, J.F. Rabek, 1990.
- ²³⁵ E.C. Munksgaard, *Dan. Dent. J.*, **95**, 1, 1991.
- ²³⁶ R.B. Paul, J.M. Kelly, D.C. Peppers, C. Long, *Polymer*, **38**, 2011-2014, 1997.
- ²³⁷ V.D. McGinnits, *J. Radiat. Curing*, **2**, 3, 1975.
- ²³⁸ K.S. Anseth, C.M. Wang, C.N. Bowman, *Macromolecules*, **23**, 1144, 1990.
- ²³⁹ L.A. Lindén, *Chem.Sci.*, **105**, 6, 405-409, 1993.
- ²⁴⁰ J. Ferracane, H. Berge, *J. Dent. Res.*, **74**, 1418, 1995.
- ²⁴¹ K.K. Dietliker, en "Chemistry & Technology of UV EB Formulation for coating, inks & paints", **vol 3**, eds. By P.K.T. Oldring.
- ²⁴² D.J. Broer, G.N. Mol, G. Challa, *Polymer*, **32**, 690, 1991.
- ²⁴³ J.W. Stansbury, *J. Dent. Res.*, **71**, 1408, 1992.
- ²⁴⁴ W.D. Cook, *Polymers*, **33**, 10, 2152-2161, 1992.
- ²⁴⁵ J.G. Kloosteberg, *Adv. Polym. Sci.*, **84**, 1, 1988.
- ²⁴⁶ K.S. Anseth, M.L. Kline, A.T. Walker, J.K. Anderson, *Macromolecules*, **28**, 7, 1995.

- ²⁴⁷ G.R. Tryson, A.R. Schultz, *J. Polym. Sci. Polym. Phys. Edn.*, **17**, 2059, 1979.
- ²⁴⁸ A.T. Doornkamps, Y.Y. Tan, *Polym. Commun.*, **31**, 362, 1990.
- ²⁴⁹ J.L. Ferracane, E.H. Greener, *J.Dent.Res.*, **63(8)**, 1093, 1984.
- ²⁵⁰ D. Braun, R. Gehrish, *Angew. Makromol. Chem.*, **135**, 119, 1985.
- ²⁵¹ L. Fung, S.H. Goh, *J. of Appl. Polym. Sci.*, **76**, 1785, 2000.
- ²⁵² W. Caughman, G. Caughman, R. Shiflett, *Biomaterials*, **12**, 737, 1991.
- ²⁵³ E. Samkol, J. Stannad, *Journal Endodont.*, **18**, 440, 1992.
- ²⁵⁴ C.C. Eliades, G.J. Vougiouklakis, A.A. Caputo, *J. Dent. Mat.*, **3**, 19-25, 1987.
- ²⁵⁵ D.J. Brauer, G.N. Mol, G. Challa, *Polymers*, **32**, 4, 1991.
- ²⁵⁶ D. Turner, Z. Haque, S. Kalachandra, T. Wilson, *Polym. Mater. Sci. Eng.*, **56**, 769, 1987.
- ²⁵⁷ R. Sack, G.V. Schultz, G. Meyerhoff, *Macromolecules*, **21**, 3345, 1988.
- ²⁵⁸ K.S. Anseth, C.M. Wang, C.N. Bowman, *Macromolecules*, **27**, 650, 1994.
- ²⁵⁹ K.S. Anseth, C.N. Bowman, N.A. Peppas, *J. Polym. Sci. Part A: Polym. Chem.*, **32**, 139, 1994.
- ²⁶⁰ S. Benjakul, P. Sophanodoro, *ASEAN Food J.*, **8**, 145, 1993.
- ²⁶¹ A.C.M. Wu, W.A. Bough, R.A.A Muzarrelli, Parisier ER (ed), *Proceedings of the First International Conference on Chitin/Chitosan*. MIT Sea Grant Program, Cambrigde, M.A., 88, 1978.
- ²⁶² S. Benjakul, P. Wisitwuttikul, *ASEAN Food J.*, **9**, 136, 1994.
- ²⁶³ A. Alimuniar, R. Zainudin, C.J. Brine, P.A. Sandorf, J.P. Zikakis ed., *Advances in Chitin and Chitosan*, Elsevier Applied Science, Essex, UK, 627, 1992.
- ²⁶⁴ A. Pelletier, I. Lemire, J. Sygush, E. Chornet, R.P. Overend, *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 310, 1990.
- ²⁶⁵ F. Shahidi, J. Synowiecki, *J. Agric. Food Chem.*, **39**, 1527, 1991.

- ²⁶⁶ CH. Xiao, S. Gao, H. Wang, L. Zhang, *J. of Appl. Polym. Sci.*, **76**, 509, 2000.
- ²⁶⁷ S. Mima, M. Miya, R. Iwamoto, S. Yoshikawa, *J Applied Polym. Sci.*, **28**, 1909, 1983.
- ²⁶⁸ A. Domard, M. Rinaudo, *Int. J. Biol. Macromol.*, **5**, 49, 1983.
- ²⁶⁹ A. Baxter, M. Dillon, K.D. Taylor, G.A.F. Roberts, *Int. J. Biol. Macromol*, **14**, 166-169, 1992.
- ²⁷⁰ J.F. Massan, R.S. Manley, *Macromolecules*, **24**, 6670, 1991.
- ²⁷¹ J. Brandup, E.H. Immergut, E.A. Grulke, *Polymer Handbook*, 4th edition, 1999.
- ²⁷² Y. Shigemasa, H. Matsuura, H. Sashiva, H. Saimoto, *Int. J. Biol. Macromol.*, **18**, 237-242, 1996.
- ²⁷³ Y. Inoue, *Ann. Rep. NMR Spectroscopy*, **27**, 59-101, 1993.
- ²⁷⁴ H. Struszczyk, en "*Chitin Hanbook*", eds. R.A.A. Muzarrelli and M.G. Peters, European Chitin Society, 437-440, 1997.
- ²⁷⁵ G.A.F. Roberts, *Chitin Chemistry*, Macmillan, London, 87-91, 1992.
- ²⁷⁶ J.N.S. Evans, *Biomolecular NMR Spectroscopy*, Oxford University Press, Oxford, 381-391, 1995.
- ²⁷⁷ K.M. Varum, M.W. Anthonsen, H. Grasdalen, O. Smidrod, *Carbohydr. Res.*, **217**, 19-27, 1991.
- ²⁷⁸ R.A. Young, *Coll. Int.*, **CNRS no 230**, 21-40, 1973.
- ²⁷⁹ R.Z. LeGeros, *Monographs in Oral Science*, **Vol 15**, Ed. Howard M. Myers, San Francisco, California, 1991.
- ²⁸⁰ G. Trömel, *Physik. Chem.*, **158 A**, 422, 1932.
- ²⁸¹ L.J. Brecevic, H. Füredi-Milhofer, *Calcif. Tissue. Res.*, **10**, 82, 1972.
- ²⁸² F. Betts, N.C. Blumental, A.S. Posner, *J. Crystal Growth*, **53**, 63, 1981.
- ²⁸³ E. Hayek, W. Stadlmann, *Angew. Chem.*, **67**, 1955.
- ²⁸⁴ P.W. Arnold, *Trans. Farad. Soc.*, **46**, 1061, 1950.

- ²⁸⁵ M. Jarcho, C.H Bolen, M.B. Thomas, J Bobick, J.F. Kay, R.H. Doremus, *J. Mater. Sci.*, **11**, 2027-2035, 1976.
- ²⁸⁶ H. Füredi-Milhofer, V. Hlady, F.S. Baker, R.A. Beebe, N.W. Wikholm, J.S. Kittelberg, *J. Coll. Interface Sci.*, **70(1)**, 1-9, 1979
- ²⁸⁷ F.C.M. Driessens, en *Euroceramics, Vol III*, Engeniering Ceramics, 48-52, Eds. G. De With y otros, Elsevier Applied Science, 1989.
- ²⁸⁸ A. Quinten, R. Nab, H. Schmid, Trabajo presentado en el ECER'S 92, Alemania, 1992.
- ²⁸⁹ Z. Bako, I. Kotsis, *Ceram. Inter.*, **18(6)**, 373-378, 1992.
- ²⁹⁰ A. López-Macipe, R. Rodríguez Clemente, A. Hidalgo López, *J. of Mater. Synth. and Process*, in Press.
- ²⁹¹ R. Rodríguez-Clemente, J. Gómez Morales, *J. Cryst. Growth*, **169**, 339, 1996.
- ²⁹² R. Rodríguez-Clemente, A. López-Macipe, J. Gómez Morales, J. Torrens Burgues, V. Castaño, *J. of the European Ceramic Society*, **5**, 1-6, 1998.
- ²⁹³ A. López-Macipe, J. Gómez Morales, R. Rodríguez-Clemente, *Adv. Mater.*, **10(1)**, 49-53, 1998.
- ²⁹⁴ Y. Fujishiro, H. Yabuki, K. Kawamura, T. Sato, A. Okuwaki, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **57**, 349, 1993.
- ²⁹⁵ R. González, Patente **RPI#135/88**, ONIITEM, Cuba.
- ²⁹⁶ D.S. Metser, M.R. Rieger, D.W. Foreman, *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.*, **10**, 9, 1999.
- ²⁹⁷ A. Cünet, F. Korkuzuz, M. Timucin, N. Akkas, *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.*, **8**, 91, 1997.
- ²⁹⁸ J.F. McCabe, R.W. Wassell, *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.*, **10**, 291, 1999.
- ²⁹⁹ F. Wakai, Y. Kodema, S. Sakagushi, *J. Ame. Ceram. Soc.*, **73**, 457-460, 1991.
- ³⁰⁰ M. Akao, H. Aoki, K. Kato, *J. Mat. Sci.*, **16**, 809-812, 1981.
- ³⁰¹ I. Rehman, M. Karsch, L.L. Hench, W. Bonfield, *J. of Biomed. Mat. Research*, **49**, 289, 2000.

- ³⁰² E.M. Lerze, J. Hemmerle, J.C. Voegel, M. Leize, *J. of Mat. Sci.: Mat. in Med.*, **10**, 47, 1999.
- ³⁰³ T. Kijima, M. Tsutsumi, , *J. Ame. Ceram. Soc.*, **62**, 455, 1979.
- ³⁰⁴ O. Gautier, J.M. Bouler, P. Weiss, J. Bosco, G. Daculsi, E. Aguado, *J. of Biomed. Mat. Research*, **47**, 28, 1999.
- ³⁰⁵ A. Uchida, S. Nade, E.R. McCartney, W. Ching, *J. Bone Joint Surg.*, **66**, 269, 1984.
- ³⁰⁶ K. de Grott, *Biomaterials*, **1**, 47, 1980.

