



**EPS**

Escola Politècnica

**UdG** Superior

## Projecte/Treball Fi de Carrera

**Estudi:** Enginyeria Tècn. Ind. Química Ind. Pla 2002

**Títol:** Preparació d'un ciment ossi acrílic modificat amb hidroxiapatita d'origen natural

**Document:** Memòria

**Alumne:** Alba Juan Pérez

**Director/Tutor:** Elena Franco Marquès

**Departament:** Eng. Química, Agrària i Tecn. Agroalimentària

**Àrea:** Enginyeria Química

**Convocatòria** (mes/any): Juny / 2012



## *Agraïments*

*Qui ho diria, després d'un llarg període ja ha arribat l'hora. Ha costat arribar fins aquí, però amb l'ajuda de moltes persones que tinc o he tingut al meu costat. Per fi s'acaba una altra etapa de la meua vida!!! Ara només puc dir adéu i començar a fer nous plans per un bon futur!*

*Abans de començar, primer de tot voldria agrair al grup de recerca **LEPAMAP** de la Universitat de Girona el fet d'haver-me acollit a les seves instal·lacions per poder realitzar el projecte final de carrera.*

*Cal que recalqui a totes les amistats que han estat al meu costat durant tot el període que ha durat la meua carrera professional. Agrair a les floretes: **Laura P, Laura M, Judith P i Cristina M**, amb qui he compartit més que hores a classe tot el que han fet per mi i donar gràcies a tots els moments que m'han fet passar. Sous genials!!*

*Agrair a les persones alienes a la carrera que he conegut durant aquest període i que han estat al meu costat durant tot aquest transcurs: **Miquel M i Sophie**. Gràcies per tots els moments que hem passat junts.*

*Agrair a la meua família, els meus pares **Glòria i Jaume**, que sempre han i estaran al meu costat passí el que passí i decideixi el que decideixi, us estimo! I al meu germà **Jaume** i la meua germana **Sandra** per ser com són i per tenir-los sempre al meu costat i ajudar-me en tot el que han pogut, molts petons!*

*Agrair a la persona que tinc al meu costat dia rere dia i m'ajuda sempre amb la millor opinió que sempre hem pot aportar, la meua parella, **Eduard**, gràcies per estar aquí i compartir tots els dies amb mi, gràcies per ser com ets, ets un sol! Testimo. I mencionar al meu gos, **Llamp**, que en els moments de redacció de la memòria en el sofà el tenia allà al meu costat, fent-me companyia!!! jeje*

*Com no, agrair en **José Alberto** que confies en mí a l'hora d'escollir el tema del projecte, ajudar-me a agafar confiança en mí mateixa i aconseguir que tingués molta motivació per començar a fer aquest tema.*

*I finalment, acabo amb la persona que més m'ha ajudat, agrair a la persona que he tingut al meu costat dia rere dia, mes rere mes, **Elena Franco**, la meva directora de projecte, la persona que m'ha ajudat en tot i més durant tot el transcurs del projecte, durant tot aquest llarg temps. Elena, sense la paciència que has tingut amb mí i tota la motivació que m'has fet agafar, m'hagués costat molt més arribar fins aquí! Gràcies per tot, gràcies per estar cada dia allà, per tots els problemes que hem tingut i tu sempre trobar una solució, per ajudar-me en cada moment que no sabia com continuar, per tot el que has fet, simplement, Gràcies per ser com ets, no canviïs mai!!!!!!*

**Gràcies a tots!!!!!!!**

*Alba Juan Pérez*

## ABREVIATURES

**BG:** Vidres bioactius.

**BPO:** Peròxid de benzoïl.

**BZN:** 4,4'-Bis(dimetilamino)difenil carbinol.

**DMA:** Memòria d'accés directe.

**DMT:** 4-4'-bis(N,N-dimetilamino)-4-toluidina.

**DMSO:** Dimetilsulfòxid

**EMHQ:** Èter metílic de hidroquinona.

**FT-IR/ATR:** Espectroscòpia infraroja amb transformació de Fourier per reflectància total atenuada.

$\nu_{\text{asim}}$ : Freqüència de vibració asimètrica.

$\nu_{\text{sim}}$ : Freqüència de vibració simètrica.

**HA:** Hidroxiapatita.

**HA 0%:** Proveta control.

**HA 5%:** Proveta que conté un 5% de HA en la fase sòlida.

**HA 15%:** Proveta que conté un 15% de HA en la fase sòlida.

**HA 25%:** Proveta que conté un 25% de HA en la fase sòlida.

**HDPE:** Polietilè d'alta densitat.

**HEMA:** 2-Hidroxietilmetacrilat.

$H_{\text{hid}}$ : Grau d'hidratació.

**HPLC:** Cromatografia líquida d'alta eficàcia.

**ICP:** Interruptor de control de potència.

**MER:** Microscòpia electrònica de rastreig.

**MMA:** Metacrilat de metil.

**MTT:** Assaig de la citotoxicitat.

**PA:** Poliamida.

**PBS:** Solució salina amortida per fosfats.

**PC:** Policarbonat.

**PE:** Polietilè.

**PET:** Polietilè tereftalat.

**PES:** Polièter sulfona.

**PG:** Vidres de fosfat.

**PMMA:** Polimetacrilat de metil.

**P<sub>p</sub>:** Pèrdua de pes.

**PS:** Poliestirè.

**PTFE:** Politetrafluoroetilè.

**PU:** Poliuretà.

**PVC:** Policlorur de vinil.

**RMN:** Ressonància magnètica nuclear.

**$\sigma_c$ :** Resistència a la compressió.

**SBF:** Solució que simula el fluid del plasma humà (Kokubo).

**T<sub>amb</sub>**: Temperatura ambient.

**T<sub>e</sub>**: Temperatura d'enduriment.

**T<sub>màx</sub>**: Temperatura màxima.

**T<sub>g</sub>**: Temperatura de transició vítria.

**t<sub>e</sub>**: Temps d'enduriment.

**TMX**: Poliestirè Thermanox.

**UV**: Radiació ultraviolada.

**VR**: Viabilitat cel·lular relativa.

# ÍNDEX

<b>1. INTRODUCCIÓ</b>	<b>5</b>
1.1. Antecedents	6
1.2. Objecte	6
1.3. Especificacions i abast	7
<b>2. FONAMENTS TEÒRICS</b>	<b>8</b>
2.1. Biomaterials	9
2.1.1. Definició	9
2.1.2. Classificació	11
2.1.3. Història i aplicació	15
2.1.4. Comportaments i propietats del material	18
2.2. Ciment ossi	19
2.2.1. Generalitats	19
2.2.2. Components	21
2.2.3. Caracterització dels ciments ossis acrílics	25
2.2.4. Aplicacions, efectes i precaucions	30
2.2.5. Modificacions	31
2.3. Hidroxiapatita	33
2.3.1. Característiques	33
2.3.2. Hidroxiapatita d'origen natural	34
2.3.3. Hidroxiapatita sintètica	35
2.3.4. Utilització de la hidroxiapatita	37
2.4. L'os, material biomineralitzat	37
2.4.1. Naturalesa i característiques de l'os	38
2.4.2. Recobriment de la hidroxiapatita tipus òssia	39



<b>2.5. Solució de Kokubo's (SBF)</b> .....	<b>40</b>
<b>3. MATERIALS, EQUIPS I MÈTODES EXPERIMENTALS</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1. Materials</b> .....	<b>44</b>
3.1.1. Hidroxiapatita (HA) .....	44
3.1.2. Polimetacrilat de metil (PMMA) .....	44
3.1.3. Peròxid de benzoil (BPO).....	45
3.1.4. Metanol .....	45
3.1.5. Metacrilat de metil (MMA) .....	45
3.1.6. 4-4'-bis-(dimetilamina) difenil carbinol (BZN).....	46
3.1.7. Solució de Kokubo (SBF).....	46
<b>3.2. Equips</b> .....	<b>47</b>
3.2.1. pH-metre .....	47
3.2.2. Estufa 37°C .....	47
3.2.3. Estufa 50°C .....	48
3.2.4. Màquina universal per l'assaig mecànic de compressió.....	48
3.2.5. Sistema d'avaluació dels paràmetres de curat.....	49
3.2.6. Espectroscòpia infraroja (FT-IR / ATR) .....	50
3.2.7. Microscòpia electrònica de rastreig (MER).....	51
<b>3.3. Mètodes Experimentals</b> .....	<b>52</b>
3.3.1. Recristal·lització del BPO .....	52
3.3.2. Preparació del ciment.....	52
3.3.3. Preparació de la solució Kokubo's .....	54
3.3.4. Avaluació dels paràmetres de curat .....	56
3.3.5. Estudi d'absorció d'aigua i pèrdua de pes .....	56
3.3.6. Assaig mecànic de compressió.....	57
3.3.7. Espectroscòpia infraroja (FT-IR / ATR) .....	58
3.3.8. Estudi de la biocompatibilitat "in vitro" del ciment ossi.....	58
<b>4. RESULTATS</b> .....	<b>62</b>
<b>4.1. Caracterització de la hidroxiapatita</b> .....	<b>63</b>

4.1.1.	Espectroscòpia d'infraroig .....	63
4.1.2.	Microscòpia Electrònica de Rastreig. ....	64
4.1.3.	Anàlisis Elemental (EDX) .....	64
<b>4.2.</b>	<b>Obtenció de Ciments Osis.....</b>	<b>65</b>
4.2.1.	Paràmetres de curat.....	66
4.2.2.	Absorció d'aigua i Pèrdua de pes.....	66
4.2.3.	Compressió .....	67
4.2.4.	Espectroscòpia Infraroja (FT-IR / ATR) .....	68
4.2.5.	Microscòpia electrònica de rastreig (MER).....	70
4.2.6.	Assaig MTT .....	71
4.2.7.	Assaig "Alamar Blue".....	71
4.2.8.	Anàlisis dels cultius sembrats sobre la superfície dels materials.....	72
<b>5.</b>	<b>DISCUSSIÓ .....</b>	<b>76</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>82</b>
<b>7.</b>	<b>PRESSUPOST .....</b>	<b>84</b>
<b>8.</b>	<b>PLANIFICACIÓ .....</b>	<b>90</b>
<b>9.</b>	<b>INFORMACIÓ ADDICIONAL .....</b>	<b>93</b>
9.1.	Preparació de ciments ossis.....	94
9.2.	Absorció d'aigua i pèrdua de pes.....	95
9.3.	Assaig de compressió .....	96
9.4.	Propietats de curat.....	99
9.5.	Microscòpia Electrònica de Rastreig amb Anàlisis Elemental (MER-EDX).102	

---

<b>9.6. Espectres Infrarroig .....</b>	<b>105</b>
<b>10. ÍNDEX DE FIGURES _____</b>	<b>106</b>
<b>11. ÍNDEX DE TAULES _____</b>	<b>110</b>
<b>12. BIBLIOGRAFIA _____</b>	<b>113</b>

# 1. INTRODUCCIÓ

## 1.1. ANTECEDENTS

L'aplicació dels ciments ossis acrílics en diferents tipus d'intervencions quirúrgiques dins de l'especialitat de traumatologia es remunta a inicis de la segona meitat del segle XX, quan el doctor Sir. John Charnley<sup>1,2</sup>(1911-1982) (Figura 1.1) va fer servir per primera vegada el polimetacrilat de metil (PMMA) com a matriu per a la fixació de pròtesis articulars<sup>3</sup> i per omplir els defectes ossis derivats de diferents patologies.



Figura 1.1. Dr. Sir. John Charnley

Des de llavors s'han desenvolupat modificacions en la composició química d'aquests materials per tal d'aportar-les-hi millores en les diferents propietats com per exemple: propietats mecàniques, capacitat de lliurament fàrmacs, biocompatibilitat, etc.

## 1.2. OBJECTE

Es planteja la modificació de la formulació convencional de ciment ossi acrílic amb el component inorgànic majoritari dels ossos, és a dir, la hidroxiapatita (HA) (fosfat doble de sodi i calci). La HA i particularment la d'origen mineral o de síntesi, no és un component innovador en aquesta disciplina científica, però l'ús de la HA d'origen natural (procedent d'ossos de porc) introdueix la possibilitat d'incorporar un material molt econòmic que pot millorar la resistència mecànica del material sense perjudici de millorar la biocompatibilitat amb teixit ossi viu.

### **1.3. ESPECIFICACIONS I ABAST**

Es planteja un treball de cerca d'un material que permeti la fixació de pròtesis articulades o bé pugui ser considerat com a sistema de farciment de cavitat òssies derivades de processos osteoporòtics. Per arribar a trobar aquest material amb les propietats desitjades es preparen ciments amb diferents continguts en HA natural. Posteriorment es caracteritzaran diferents propietats fisico-químiques dels materials les quals permetran prendre decisions a l'hora de determinar la viabilitat tècnica dels materials (tèrmic, mecànic i morfològic). Finalment, es realitza un estudi "in vitro" amb cultius cel·lulars per tal de determinar la biocompatibilitat del material.

## **2. FONAMENTS TEÒRICS**

## 2.1. BIOMATERIALS

### 2.1.1. Definició

Els biomaterials són productes destinats a aplicacions mèdiques que estan en contacte amb els sistemes biològics, els quals poden ser: metalls, ceràmics, polimèrics (Figura 2.1) o materials compostos<sup>4,5</sup>. Actualment des d'un punt de vista conceptual, un biomaterial es defineix com una substància dissenyada per adquirir una forma en la que sola o com a part d'un sistema complex, s'utilitza per dirigir mitjançant el control de les interaccions amb els components de sistemes vius, el curs d'un procediment terapèutic de diagnòstic en medicina humana o veterinària<sup>6</sup>.

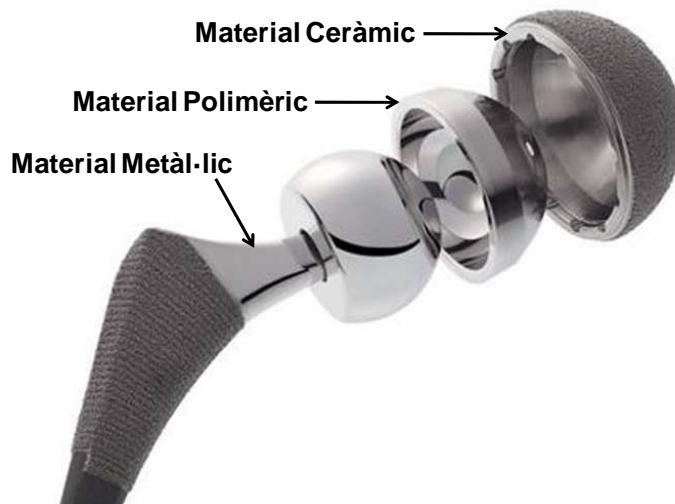


Figura 2.1. Pròtesis de cadera on s'observen simultàniament els materials metàl·lics (titani), ceràmics (hidroxiapatita) i polimèrics (HDPE).

Els biomaterials són implantats amb la finalitat de substituir i restaurar teixits vius i els seus funcionaments, el que suposa que estan exposats temporalment o permanent a fluids del cos, tot i que en realitat poden estar localitzats fora del propi cos. S'inclouen en aquesta categoria a la major part dels materials dentals que tradicionalment han estat tractats per separat.



Hi ha dues característiques importants que ha de complir un biomaterial per a que pugui desenvolupar la funció per la que ha estat dissenyat: biofuncionalitat i biocompatibilitat<sup>7</sup>.

- La *biofuncionalitat* és la capacitat que ha de presentar el material per a realitzar un funcionament específic en el teixit i/o òrgans.
- La *biocompatibilitat* està relacionada amb una acceptació biològica. La bioacceptabilitat no només està dirigida al biomaterial, sinó també als diferents productes, tant de degradació física com química procedents del biomaterial.

Segons aquests requisits, els biomaterials es poden classificar en quatre grups<sup>8</sup>.

- *Inert*: El material provoca escassa o nul·la resposta reactiva.
- *Interactiu*: El material està dissenyat per a introduir en l'ésser humà una resposta específicament beneficiosa, és a dir, bona adherència, creixement de nou teixit en la superfície, entre d'altres.
- *Viable*: El material incorpora cèl·lules vives en el moment de la seva implantació, i la persona l'accepta com si fos part del teixit normal.
- *Replantar*: El material consisteix en un cultiu "in vitro" de cèl·lules específiques prèviament obtingudes del subjecte a implantar.

Cal pensar però, que l'èxit del biomaterial o del implant depèn de tres factors principals: les propietats i biocompatibilitat del implant, les condicions de salut del receptor i finalment per la habilitat del cirurgià que realitza el implant.

Hi ha una sèrie de requisits indispensables que també ha de complir un biomaterial a més dels mencionats anteriorment, que són: Ser biocompatibles, és a dir, han de ser acceptats per propi organisme, no provocar que aquest desenvolupi sistemes de rebuig davant de la presència del biomaterial. No ser tòxics, ni cancerígens, ser químicament estables (no han de presentar degradació en el temps) i mostrar inherència química davant del teixit on s'implanta. Cal que tinguin una resistència mecànica, temps de fatiga, densitat i pes adient. Han de presentar un disseny de l'enginyeria perfecte, és a dir, les dimensions i forma del implant han de ser les indicades, i el preu ha de ser el més barat possible. Finalment, el material ha de ser reproducible i fàcil de fabricar i processar per a la seva producció en gran escala.

## 2.1.2. Classificació

Els biomaterials es poden classificar segons la seva naturalesa química en: metàl·lics, ceràmics, polimèrics i materials compostos.

### Biomaterials metàl·lics

Els biomaterials metàl·lics es poden definir com a materials inorgànics compostos d'un o més elements metàl·lics. Cal dir també, que tenen la propietat de barrejar-se o dissoldre's uns amb els altres en estat sòlid i així obtenir aliatges metàl·lics entre els que destaca l'acer.

A la dècada dels anys vint, "Reiner Erdle" i "Charles Orange", van unir els seus coneixements de metge dentista i metal·lúrgic, respectivament. Aquesta aliança va donar com a resultat l'aliatge "Vitalliu", que va ser el primer biomaterial metàl·lic. Aquest material presenta característiques mecàniques, de biocompatibilitat i resistència a la corrosió, acceptables per aplicacions en pròtesis quirúrgiques. Aquest aliatge està compost per un (65% de Cobalt, 30% de Crom i un 5% de Molibdè) i va ser el punt de partida de tota una sèrie d'investigacions multidisciplinàries en el desenvolupament de noves aplicacions ortopèdiques.

És fàcil distingir els biomaterials metàl·lics de la resta ja que algunes de les seves característiques més destacades són: la refractivitat a la llum, la transmissió de calor, la conductivitat elèctrica o la capacitat de doblar-se sense trencar-se (bona resistència i tenacitat). Aquestes propietats fan que aquest tipus de material sigui el més adequat per aplicacions estructurals com poden ser les pròtesis articulars (cadera, genoll, ombro,...), plaques de osteosíntesis, claus de fixació, implants dentals, entre d'altres.

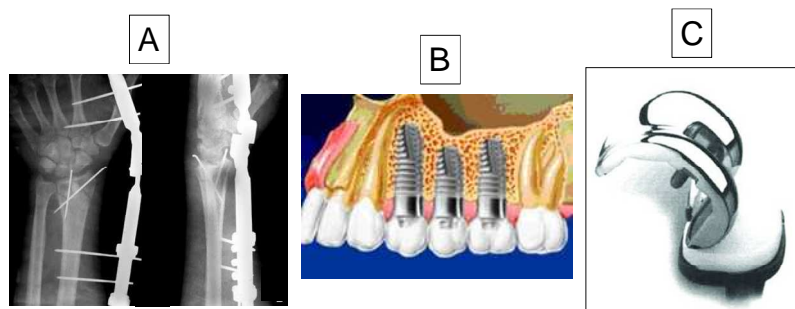


Figura 2.2. Exemples dels biomaterials en diferents utilitzacions: A) Ciment ortopèdic, B) Implant dental per la fixació de les dents, C) Pròtesis de genoll

## **Biomaterials ceràmics**

Els biomaterials ceràmics són compostos químics complexos que contenen elements metàl·lics i no metàl·lics. A causa dels seus enllaços iònics o covalents, són generalment, lleugers, durs, rígids i posseeixen bona resistència a la calor i als agents de corrosió, a més de la seva debil resistència mecànica i la seva fragilitat. També, tenen una elevada temperatura de fusió, baixa conductivitat tèrmica i elèctrica. Els ceràmics es consideren resistents al desgast i a la compressió. Els principals biomaterials ceràmics són l'alúmina, la zircònia, la hidroxiapatita, les porcellanes, els vidres bioactius, etc. Principalment s'apliquen al sistema ossi, amb diferents tipus d'implants i recobriments en pròtesis articulars. També s'utilitzen en aplicacions dentals, en vàlvules artificials, cirurgia de l'espina dorsal i reparacions del crani.

Els biomaterials ceràmics com la HA tenen com a funció la restauració i substitució del teixit ossi<sup>9</sup> i són una solució als implants artificials construïts en base amb biomaterials metàl·lics que no són bioactius. La HA és un substrat idoni sobre el qual progressa el creixement del nou teixit. La HA és el component principal del teixit ossi (ossos i dentina). Aquest material pot ser d'origen animal o mineral i pot ésser sintetitzat a partir de la síntesis de reactius químics purs. S'ha demostrat que la HA (material bioceràmic), és biocompatible, bioactiva, bioestable i osteoconductiva. S'ha trobat també que quan els fosfats de calci són porosos ofereixen una química de superfície que condueixen a la nova formació de l'os.

## **Biomaterials polimèrics**

El terme polímer deriva d'origen grec "poli" que significa molts i "mer" que vol dir unitat. Els polímers són materials que estan formats per nombroses unitats denominades monòmers que formen grans cadenes moleculars. El monòmer és la unitat bàsica repetitiva de l'estructura del polímer. La major part del polímer utilitzat en l'enginyeria es basa en els hidrocarburs, que són molècules formades principalment a partir dels àtoms d'hidrogen i carboni disposades de forma estructural.

Els polímers són materials menys densos que els metàl·lics i els ceràmics, però al mateix temps tenen bona compatibilitat amb el teixit humà. Com que posseeixen una bona resistència a la corrosió, fa que siguin bons candidats per ser implantats a l'interior del cos humà.

Els biomaterials polimèrics poden ser classificar en dos grups. El *primer grup* s'inclou tots aquells implants que han de tenir un caràcter permanent, com són els sistemes o dispositius utilitzats per a substituir parcialment o totalment a teixits o òrgans destruïts com a conseqüència d'una malaltia o trauma.

En el *segon grup* s'inclou els biomaterials d'aplicació temporal, és a dir, aquells que han de mantenir una funcionalitat adequada durant un període de temps limitat, ja que l'organisme humà pot desenvolupar mecanismes de curació i regeneració per a la reparació de la zona o el teixit afectat.

Dins la varietat de polímers biocompatibles, es pot trobar: els *polímers naturals* (cel·lulosa, glucosalina,...) i els *polímers sintètics* (polietilè d'ultra alt pes molecular (UHMWPE), PVC, nylon, silicona,...). El desenvolupament dels biopolímers en les aplicacions inclou pròtesis facials, parts de pròtesis d'oïda, aplicacions dentals, marcapassos, ronyó, fetge i pulmons.

➤ Polímers naturals:

Els polímers d'origen natural són els anomenats biopolímers. Aquests poden provenir del regne animal o vegetal. La seva complexitat estructural requereix una manipulació específica. Són biodegradables i s'utilitzen per aplicacions temporals.

Aquesta categoria engloba, entre altres, el midó el qual el seu monòmer és la glucosa, i el cotó, fet de cel·lulosa, que també té coma monòmer la glucosa. La diferència entre ambdós és la forma en que es troben els monòmers dins del polímer, així com la disposició espacial dels grups hidroxils i el tipus d'enllaç o-glucosídic.

Altres polímers naturals importants són les proteïnes, les quals els seus monòmers són els aminoàcids. Per altre costat, la llana i la seda són dos dels milers de proteïnes que existeixen en la naturalesa, les quals s'utilitzen com a fibres i teles.

➤ Polímers sintètics:

Els polímers sintètics són els que s'obtenen ala indústria o al laboratori a partir de processos de polimerització dels monòmers que els constitueix. Són creats per l'ésser humà a partir dels propis elements de la naturalesa, per a funcions específiques i posseeixen característiques per a complir aquestes mateixes.

Dins d'aquest grup es troben tots els materials plàstics, on cal destacar: el nylon, el poliestirè (PS), el policlorur de vinil (PVC) i el polietilè (PE). La gran varietat de propietats físiques i químiques d'aquests compostos permet que siguin aplicats en la construcció, embalatge, indústria d'automoció, aeronàutica, electrònica, agricultura i medicina.

Tot seguit es detallen (Figura 2.3) els diferents biomaterials polimèrics de forma esquemàtica amb algun exemple de cadascun d'ells.

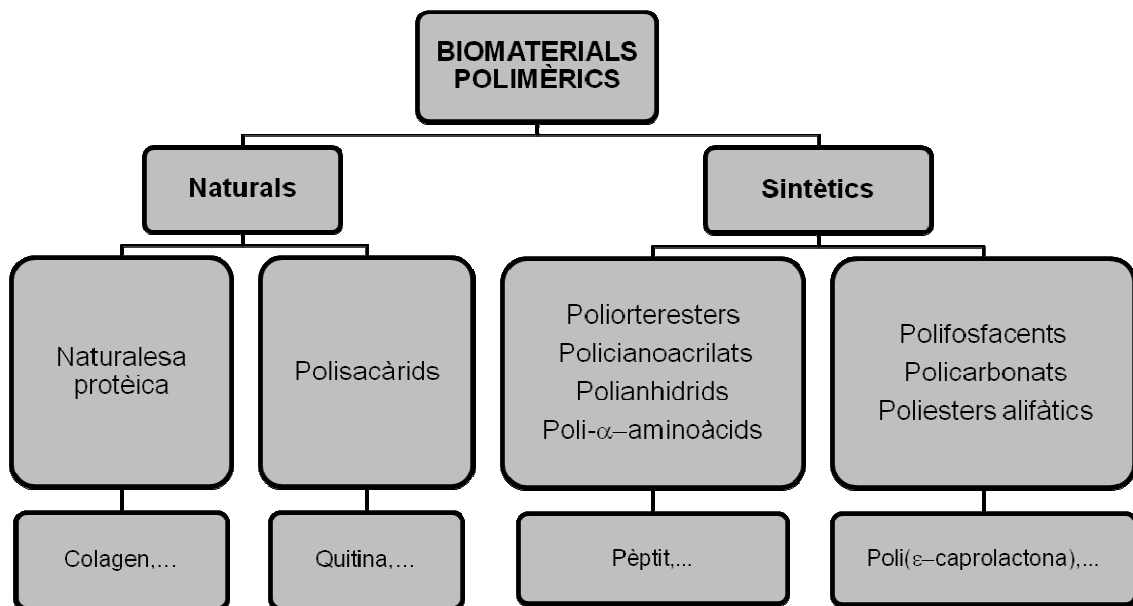


Figura 2.3. Representació esquemàtica dels diferents tipus de polímers naturals i sintètics.

### Biomaterials compostos

Els biomaterials compostos es formen a partir de la combinació dels materials anomenats anteriorment (ceràmics, metàl·lics i polimèrics). Aquesta combinació inclou fibres de metall o ceràmiques dispersades en la matriu polimèrica, fibres de ceràmica en la matriu metàl·lica, fibres polimèriques en la matriu polimèrica i partícules d'un material uniformement distribuïdes en l'altre. Aquesta classe de material mostra que encara que puguin existir moltes diferències entre ells, amb freqüència es poden unir per a produir un material nou amb propietats i comportaments únics que no mostren cada material per separat (ex: formigó, HA,...).

### 2.1.3. Història i aplicació

La primera aplicació dels biomaterials en la medicina no es va produir fins l'any 1860 amb la introducció de les tècniques quirúrgiques asèptiques. Durant els posteriors anys 60-70 va tenir lloc la primera generació de biomaterials. En aquest període de temps la meta era obtenir materials amb propietats físiques que s'adaptessin el millor possible a les del teixit a substituir, i que reaccionessin mínimament amb el teixit circumdant, és a dir, materials inerts.

A partir dels 80, va sorgir una segona generació de biomaterials. Aquesta vegada l'objectiu era crear materials que portessin una reacció controlada per part del teixit viu, és a dir, materials bioactius com els vidres bioactius de silici o la hidroxiapatita. Durant aquesta segona generació, també van tenir lloc el disseny de materials bioabsorbibles, com principalment els polímers biodegradables.

Els polímers no només reemplacen a altres materials en aplicacions mèdiques, com la substitució del catèter metàl·lic per polietilè, sinó que han obert el camp a altres noves aplicacions abans difícilment assequibles. L'any 1940 es va començar a utilitzar el PMMA en cirurgia ocular. Els ciments ossi acrílics de PMMA es van començar a utilitzar per primera vegada en els anys 50 en aplicacions de cirurgia dental<sup>10</sup>. Durant aquesta dècada l'ús del PMMA es va portar a terme per cirurgia ortopèdica, per la fixació parcial o total de les articulacions de cadera i més tard a altres com el genoll<sup>11,12</sup>. Avui en dia, els polímers continuen en ampli creixement i les seves aplicacions són cada vegada més importants dins del camp de la medicina, millorant les propietats dels materials ja existents i desenvolupant nous polímers per aplicacions específiques.

Actualment, ens trobem amb la tercera generació de biomaterials. Els materials dissenyats en aquesta generació, busquen interactuar amb el teixit de forma específica, mitjançant estímuls a nivell cel·lular i/o molecular, i combinant les propietats de bioabsorbibilitat i bioactivitat dins del material. Això sí, cada vegada els criteris es van aproximant més al que seria el biomaterial ideal.

L'enginyeria de teixits es basa en la utilització de biomaterials amb les característiques mencionades pels materials de tercera generació, és a dir, bioactius i bioabsorbibles, i capaços d'estimular la resposta cel·lular i molecular de forma controlada, perquè actuïn com a suports temporals en la reparació de defectes com per exemple els ossis. Dins d'aquesta àrea existeixen dos tipus de tendències, la primera consisteix en el desenvolupament de suports

tridimensionals cel·lulars, anomenats “scaffolds”, que serveixen per allotjar les diferents cèl·lules un cop s'ha fet el implant “in vivo”. La segona tendència consisteix en el desenvolupament de suports tridimensionals, que inicialment són colonitzats per cèl·lules progenitores sota condicions “in vitro”, i tot seguit són implantats en el pacient per reemplaçar el teixit danyat.

Tot seguit (Figura 2.4) es mostra una petita representació cronològica de l'aplicació dels polímers en la medicina.

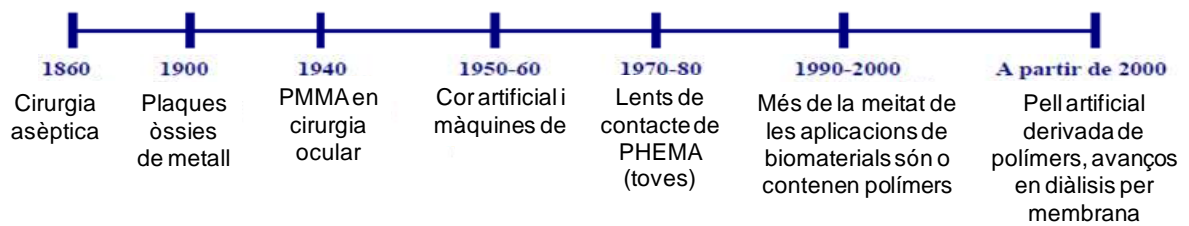


Figura 2.4. Breu cronologia de l'aplicació dels polímers en la medicina.

Posteriorment, en la (Taula 2.1) es mostren alguns exemples del cos humà on es pot trobar un biomaterial.

Taula 2.1. Alguns exemples de dispositius del biomaterial.

LOCALITZACIÓ	DISPOSITIU	MATERIAL
<b>ULL</b>	Lent intraocular, lent de contacte	Lent intraocular, lents de contacte
<b>NAS</b>	Rinoplastia	Silicona
<b>BARBETA</b>	Pròtesis de barbeta	Silicona
<b>BOCA</b>	Pròtesis mandibular	Proplast
<b>CARA</b>	Pròtesis facial	Acrílic, PVC, poliuretans
	Marcapassos	Epoxi, PTFE, A.Inox, Ti
	Pròtesis valvulars	Carbó pirolític, Ti, PTFE, silicona, teixit reprocessat
<b>COR I SISTEMA VASCULAR</b>	Bombes intra-aòrticas	Poliuretans segmentats, copolímers uretà-silicona
	Oxigenador sanguini	Policarbonat (PC), cautxú de silicona, poliacetats
	Emmagatzematge de sang i sistema de alliberació	Vinils, poliacetals
	Pròtesis arterials	Teixit de polièster o PTFE
	Sutures biodegradables	Poliuretans (PU), poli-lactides
<b>SISTEMA DIGESTIU</b>	Segments gastrointestinals	Silicona, PVC, nylon, poli-acrílats
	Segments de esòfag	PE, polipropilè (PP), PVC
	Placa corneal	Acrílic, Ti (malla)
<b>ESQUELET</b>	Articulacions de genoll, dits i altres	Compostos PE - fibra de carbó, PU, silicona
	Reparació d'ossos	Hidroxiapatita, acrílica
	Tendons artificials	Silicona, polièster
	Múscul artificial passiu	Silicona, polièster



### 2.1.4. Comportaments i propietats del material

Quan un material és sotmès a una deformació per estirament, és possible determinar dos regions ben marcades en el comportament que presenta, aquests són l'elàstica i la plàstica.

- El comportament *elàstic* pertany a la deformació proporcional a l'esforç aplicat, el material torna a la seva forma original quan la força que s'aplica sobre ell s'elimina.
- El comportament *plàstic* és el que no existeix proporcionalitat entre la força aplicada i l'estirament, en aquest cas el material no torna a la seva forma original quan s'anul·la la força que s'aplica sobre d'aquest.

Generalment, els materials sotmesos a forces petites segueixen un comportament de tipus elàstic, però quan la força comença a créixer el comportament passa a ser de tipus plàstic. Si la força continua creixent, es pot arribar a la fractura del material.

En els materials ceràmics i en el vítrics és fàcil que succeeixi la *fractura*, a més, es veu a venir quan això pot passar, perquè, tot i presentar un alt grau de biocompatibilitat, no són molt utilitzats en implants.

La *resistència a l'impacta* mesura la quantitat d'energia que el material pot absorbir a causa d'un cop, és a dir, per una força gran en magnitud aplicada durant un temps curt.

La *duresa* és una mesura de la deformació plàstica, i es defineix com la força per unitat d'àrea de penetració en el material.

Una altra propietat important és la *termofluència*, és a dir, la deformació que sofreix amb el temps al sotmetre's a una càrrega coneguda. La deformació elàstica que pateix inicialment el material davant una càrrega donada, és seguida d'una termofluència abans de que presenti la fractura.

El *desgast* d'un material d'implant té especial importància si es tracta de reemplaçar unions. El desgast del material està relacionat amb la fricció entre els dos materials. És important considerar l'àrea real de la superfície que entra en contacte amb la unió requerida, ja que en molt menys del que aparenta, aquesta pot incrementar amb el pes que s'aplica per els materials dúctils i pels elàstics.

## 2.2. CIMENT OSSI

### 2.2.1. Generalitats

El ciment ossi acrílic és el component més utilitzat en cirurgia ortopèdica per la fixació de la pròtesi articular a l'os i com a material per emplenar les cavitats òssies<sup>13</sup>. El ciment ossi es prepara barrejant dos components, un sòlid (en format de pols) i l'altre líquid. En general, en la major part de productes comercials el constituent en pols conté polimetacrilat de metil (PMMA), un agent radioopac i peròxid de benzoïl (BZN) com a activador, mentre que el component líquid conté metacrilat de metil (MMA) com a monòmer i com activador la (N,N-dimetil-p-toluïdina). Els continguts de cada constituent poden variar lleugerament d'una marca comercial a una altra. En barrejar els dos components es produeix la polimerització i té lloc l'enduriment del ciment.

Les propietats mecàniques dels ciments ossis són, sens dubte, inferiors a les de les resines acríliques comercials. Existeixen tot un seguit de factors, tant intrínsecs com extrínsecs, que permeten explicar aquest comportament deficient. Entre els factors *intrínsecs* cal remarcar la composició del monòmer i de la pols, la distribució de formes i mides de la pols i amb ells el grau de polimerització, i la relació de líquid a pols. Entre els factors *extrínsecs*, cal destacar el medi en què es porta a terme la barreja, sobretot la temperatura del quiròfan, la tècnica de barreja utilitzada i el medi en què té lloc el curat (temperatura, pressió, superfícies de contacte, etc.).

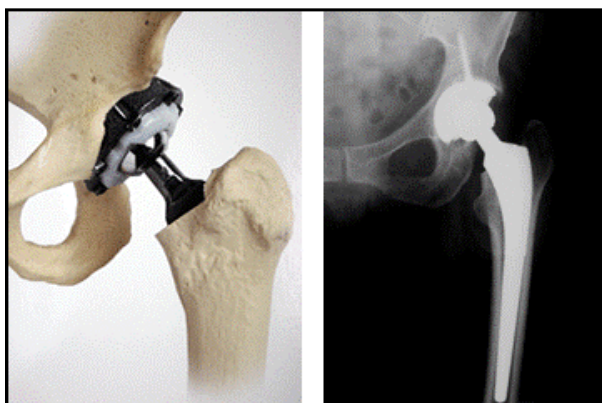


Figura 2.5. Exemple de la fixació d'una pròtesi de cadera.

La fixació de la pròtesis a l'os es porta a terme mitjançant un ciment ossi acrílic (PMMA). El ciment es fica dins la cavitat òssia quan encara està en estat pastós i a continuació s'hi col·loca la pròtesi que es vol fixar. El ciment no sols actua com a fixació inicial del implant a l'os, sinó que les seves propietats visco-elàstiques li permeten distribuir millor les càrregues des de l'os a la pròtesis, i impedeix que aquesta transferència de càrrega es faci puntualment.

Cal destacar que per a cada disseny d'implant és tant important definir la tècnica quirúrgica per a la col·locació com per a l'extracció, tant en cas d'infecció com d'afluixament o ruptura. Avui en dia es tendeix al disseny de pròtesis modulars que permeten la substitució d'elements parcials: la bola, el piu, la còtila, etc. Igualment, sembla que actualment s'està imposant l'ús de pròtesis no cimentades, sobretot en pacients joves. Encara més, les pròtesis amb recobriment porós i les recobertes amb hidroxiapatita semblen tenir una certa acceptació entre els cirurgians pel fet que indueixen al creixement ossi de la seva superfície.

Un altre punt important a destacar és la *fricció* entre la bola i la còtila. S'ha demostrat que la fricció, i amb això el desgast, és menor utilitzant bola ceràmica i còtila de polietilè que si s'utilitza còtila de polietilè i bola metàl·lica, i al seu torn aquesta última combinació és millor que si ambdues superfícies són metàl·liques. El desenvolupament i l'acceptació de les pròtesis de genoll ha estat més lent que les de cadera perquè la biomecànica del seu moviment és més complicada, si bé en realitat la incidència de degeneracions en l'articulació del genoll és superior a la de qualsevol altra articulació. En aquestes la part superior que es fixa al fèmur és totalment metàl·lica, mentre que la part inferior, que es fixa a la tibia, conté el plat tibial de polietilè d'alt pes molecular. Els pius porosos d'aquests implants es dissenyen actualment per induir el creixement ossi i obtenir una fixació millor. Altres pròtesis articulars del mercat, però d'importància molt menor, són les de turmell, espatlla, colze (Figura 2.6), canell i dit.

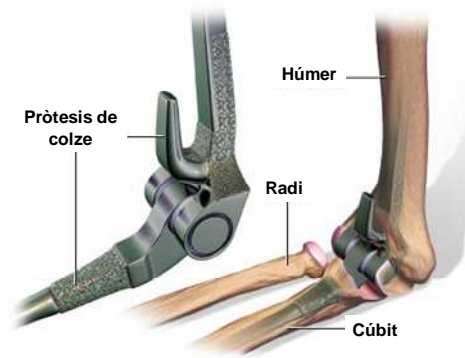


Figura 2.6. Exemple pròtesis de colze.

## 2.2.2. Components

Els ciments ossis acrílics es preparen a partir de la barreja d'una fase sòlida, de composició principalment polimèrica i una fase líquida, de naturalesa monomèrica. La (Figura 2.7) mostra un esquema dels components d'una formulació convencional de ciment ossi acrílic.

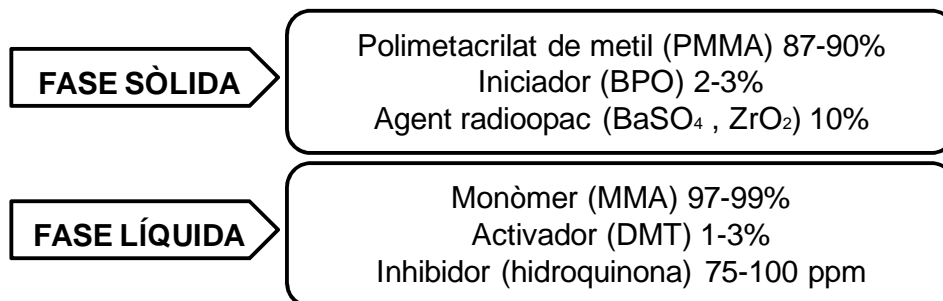


Figura 2.7. Components d'un ciment ossi acrílic convencional.

### ➤ Fase sòlida:

La fase sòlida, majoritària està constituïda principalment per micropartícules de polimetacrilat de metil (PMMA), en una proporció del 87-90% en pes de la massa total d'aquesta fase, en forma de petites perles esfèriques, preparades mitjançant la polimerització en suspensió del seu monòmer. La distribució de la dimensió de les partícules i el diàmetre de les perles influeix en la homogeneïtat del material final, sent major quan menor és la seva dimensió.

Un altre component de la fase sòlida és l'iniciador radicalari, el que portarà al inici de la reacció de polimerització. El més freqüentment utilitzat és el peròxid de benzoil (BPO), participant en un 2-3% en pes del total de la fase sòlida. No és un component d'elevada estabilitat, però és el limitant en el temps d'emmagatzematge de la fase sòlida.

El 10% en pes d'aquesta fase està constituït per un agent radioopac, un component inorgànic, inclòs en la formulació que permet el seguiment i l'evolució del ciment després de la intervenció quirúrgica, de forma radiològica. Aquest component normalment sol ser una sal o òxid de metalls pesants, com per exemple: el sulfat de bari i/o l'òxid de zirconi<sup>14</sup>.

➤ Fase líquida:

La fase líquida i minoritària, conté el monòmer, normalment sol ser el metacrilat de metil (MMA). Aquest monòmer avarca un 97-99% en pes de la massa líquida total. Per evitar el procés d'autopolimerització, en el MMA se li afegeixen 75-100 ppm d'èter metílic de hidroquinona (EMHQ), que actua com inhibidor.

Un altre component necessari per la formulació dels ciments ossis acrílics, és l'activador (1-3% en pes de la fase líquida). L'activador utilitzat és el 4-4'-bis ((N,N-dimetilamino)-4-toluidina) (DMT)<sup>15</sup>. La seva funció consisteix en induir la descomposició de l'iniciador a baixa temperatura per donar lloc a radicals lliures encarregats d'iniciar la reacció de polimerització del monòmer.

En el moment que es realitza l'addició de la fase líquida a la fase sòlida, té lloc la reacció de polimerització. Durant els 15-20 primers minuts del procés de curat la successió dels diferents fenòmens que tenen lloc a nivell molecular es reflecteixen en l'aspecte que presenta la massa reactant. La viscositat de la mescla augmenta produint una disminució progressiva de la seva fluïdesa amb el transcurs de la reacció, fins a convertir-se en una estructura sòlida-rígida, quan la seva manipulació ja no és possible. Es considera que la massa reactant està en condicions idònies per la seva aplicació quan no s'adhereix al guant quirúrgic de làtex. En aquest punt la massa ha adquirit el denominat estat pastós i es quan s'introdueix en la cavitat òssia, on el material continua la reacció de polimerització. Durant el temps que dura la reacció de curat té lloc diferents fenòmens, tant físics com químics.

➤ Fenòmens físics:

La massa polimeritzant pateix una sèrie d'etapes anomenades: sorrenca, fibrosa, pastosa i de forjat. Durant el desenvolupament d'aquestes etapes té lloc diferents fenòmens de solvatació dels components de la fase sòlida, difusió del monòmer fins a les perles del polímer, difusió del polímer en la pròpia matriu polimèrica i evaporació del monòmer de la mescla. A causa del progressiu augment de la viscositat de la mescla, el desplaçament del monòmer fins a les perles de PMMA està controlat per difusió, arribat un punt on queda atrapat dins del polímer sense poder reaccionar, romanent com a monòmer residual tot i acabada la reacció de curat.

➤ Fenòmens químics:

La reacció de curat pertany a la polimerització del monòmer, que implica una reacció de poliaddició, en cadena, de tipus radicalari que consta de tres fases (iniciació, propagació i terminació) que tenen lloc simultàniament al llarg del procés reactiu<sup>16</sup>.

*Etapa d'iniciació:* Es produeix la ruptura homolítica del iniciador en radicals lliures o radicals primaris (Eq. 2.2). Un cop obtingut el radical primari, aquest reacciona amb el monòmer, iniciant així la cadena polimèrica (Eq. 2.2).



*Etapa de propagació:* Es produeix el creixement del macro radical a través de la incorporació successiva d'unitats monomèriques (Eq. 2.3).



*Etapa de terminació:* Es produeix principalment a partir de dos mecanismes, desproporció (Eq. 2.5) i combinació (Eq. 2.5).



### Mecanisme d'iniciació

El procés de curat dels ciments ossis acrílics requereixen del curat del material "in vivo" durant el procés de substitució de la pròtesis. Això implica l'aplicació de mètodes d'iniciació de la polimerització que no precisa que s'aporti energia externa per a induir la descomposició del iniciador. El sistema iniciador més utilitzat és el redox, format per peròxid de benzoïl (BPO) i una amina terciària aromàtica, normalment sol ser N,N-dimetil-4-toluidina, a partir del qual es generen els radicals lliures que iniciaran la reacció de polimerització. Encara que aquest mecanisme no està totalment esclarit, s'admet de forma general la formació d'un complex cíclic o bé de una parella iònica entre les molècules d'amina terciària aromàtica i les molècules de l'iniciador, que posteriorment es descomponen per donar lloc a la formació de radicals benzoats. Així mateix, per espectroscòpia ultraviolada del polímer format ha destacat la formació de radicals metil-amina que té lloc per transferència d'un protó del grup N-metil. Veure la (Figura 2.8).

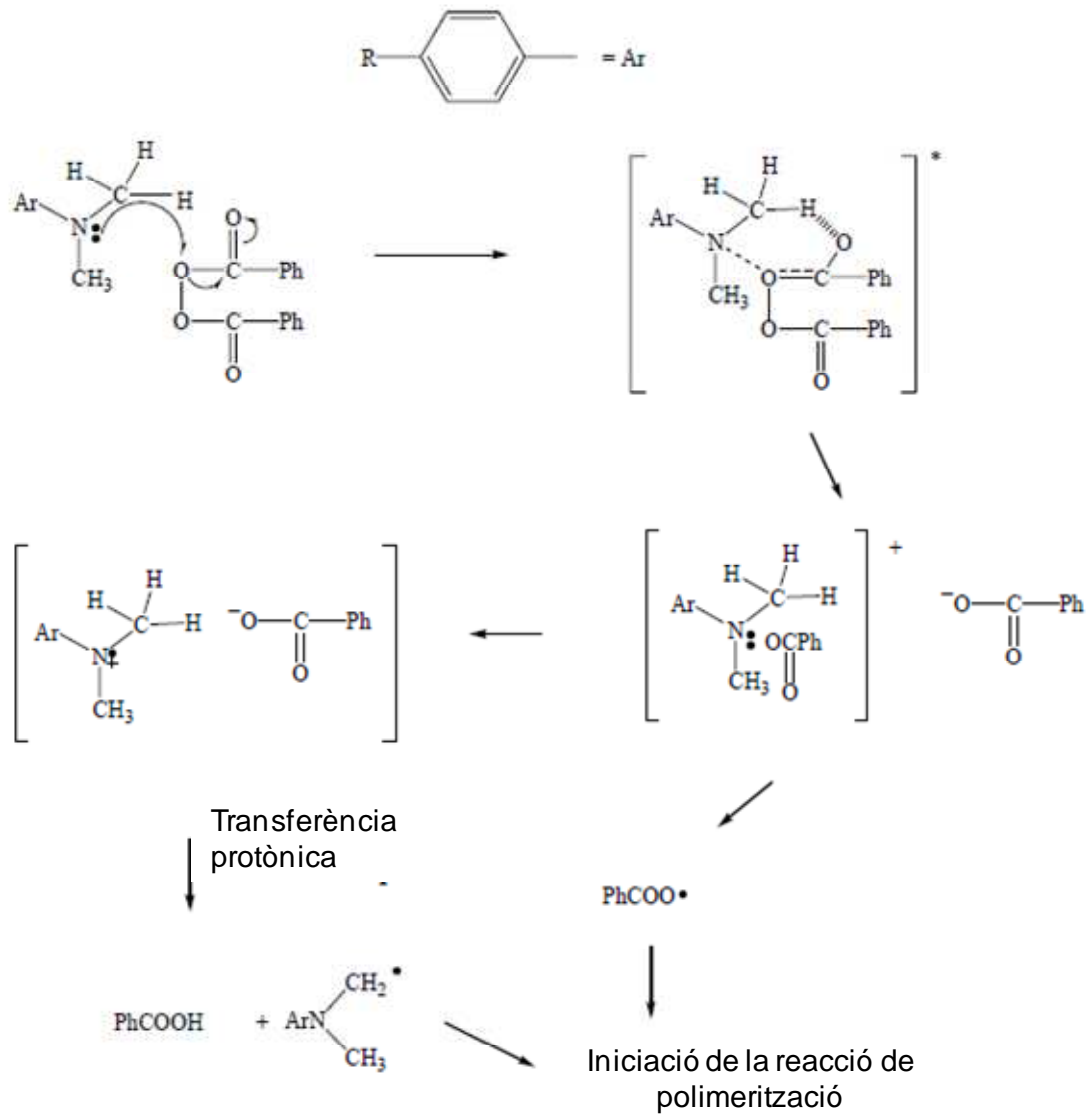


Figura 2.8. Mecanisme de formació de radicals primaris en la iniciació de la reacció de polimerització dels ciments ossis acrílics.

### 2.2.3. Caracterització dels ciments ossis acrílics

Els ciments per tal de poder ser utilitzats han de complir una sèrie de propietats que venen controlats per diferents tipus de caracteritzacions. A continuació es detallen en la (Taula 2.2).



Taula 2.2. Criteris per avaluar les propietats dels ciments ossis acrílics.

PROPIETAT	PARÀMETRE	MÈTODE D'ANÀLISI
<b>Composició química</b>	Materials Additius Puresa	RMN, FT-IR, HPLC/MS Cendres ICP/MS, GC/FT-IR/MS, valoració
<b>Pes molecular</b>	Viscositat relativa	Viscosímetre GPC (patró PS)
<b>Físiques</b>	Morfologia Porositat	Microscopi òptic, MER SAM, raig X
<b>Manipulació</b>	Envel·liment a causa de l'absorció d'aigua Temps pastós i d'enduriment Intrusió / Viscositat	ISO 5833 (flexió a ruptura) ISO 5833, ASTM F451 ISO 5833, ASTM F451
<b>Polimerització</b>	Temperatura màxima Contracció	ISO 5833, ASTM F451 Picnòmetre (ASTM D2566)
<b>Grau de polimerització</b>	Contingut i alliberació de monòmer residual	GC, HPLC/GPC, FT-IR
<b>Estabilitat</b>	Monòmer Proporció de BPO Pastós / Temps d'enduriment	ISO 5833, ASTM F451 Valoració, FT-IR ISO 5833, ASTM F451
<b>Mòdul / elàstic</b>	Flexió a quatre punts	ISO 5833
<b>Mòdul a compressió</b>	Compressió	ISO 5833
<b>Mòdul a flexió</b>	Resistència a la flexió	ASTM D638
<b>Fatiga</b>	Flexió / Compressió a fatiga Flexió / Flexió a fatiga Flexió a quatre punts	ASTM D638 ASTM E 399, Mètode Dr. Soltesz
<b>Tenacitat a la fractura</b>	Flexió amb entallat	ASTM E 647
<b>Resistència a:</b>		
Flexió	Flexió a quatre punts	ISO 5833
Compressió	Compressió uniaxial	ISO 5833, ASTM F451
Tensió	Tensió uniaxial	ASTM D638
Tensió a ruptura	Ruptura: CO-CO ; CO-fixació	ASTM D732
<b>Visco-elasticitat</b>	DMA	DMA / ASTM D 2990
<b>Temps de vida útil</b>		Propietats mecàniques

### 2.2.3.1 Paràmetres de curat

Les noves formulacions de ciments ossis acrílics han de complir una sèrie de condicions que els faci aptes per a l'ús en cirurgia ortopèdica i traumatologia. Els paràmetres que controlen la reacció de curat són:

- Temps màxim per l'obtenció de l'estat pastos (min)
- Interval del temps d'enduriment (min)
- Temperatura màxima (°C)

Segons la normativa ISO 5833<sup>17</sup>, els valors d'aquests paràmetres estan establerts de la següent forma:

- El temps màxim admès per l'estat pastos segons la normativa ISO 5833<sup>17</sup> és de 5 min.
- L'interval d'enduriment es troba entre els 5 i 10 min.
- La temperatura màxima establerta és de 90°C.

Per la determinació dels paràmetres de curat es registra la variació de la temperatura de la massa polimeritzant, segons va passant el temps de curat del material. Així s'obté el perfil de temperatura en funció del temps que es representen tot seguit a la (Figura 2.9).

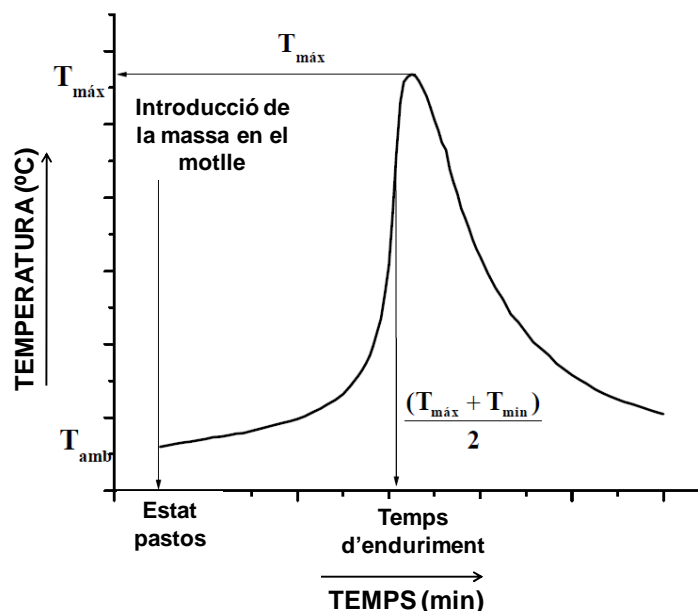


Figura 2.9. Variació de la temperatura durant l'enduriment del ciment ossi acrílic.

La temperatura màxima és la registrada en el màxim de la exoterma i el temps d'enduriment és el que pertany a la temperatura de la massa, que es calcula seguint (Eq. 2.6).

$$T_e = T_{amb} + \frac{(T_{màx} - T_{amb})}{2} \quad \text{Eq. 2.6.}$$

Essent la ( $T_e$ ) la temperatura d'enduriment, la ( $T_{amb}$ ) la temperatura ambient ( $23\pm 1^\circ\text{C}$ ) i la ( $T_{màx}$ ) la temperatura màxima assolida durant el procés de curat. A partir de la temperatura d'enduriment ( $T_e$ ) es pot saber el temps d'enduriment ( $t_e$ ) que li correspon.

### 2.2.3.2 Propietats mecàniques

Tal i com s'ha citat anteriorment, la funció principal dels ciments ossis acrílics és biomecànica, és a dir, transfereix l'esforç físic des de la pròtesis a l'os i incrementa la capacitat de distribució de càrregues de la pròtesis. Si l'esforç és més elevat que la capacitat de distribució de les càrregues, el ciment pot arribar a fracturar-se produint la fallida del implant. A través de l'estudi de les propietats mecàniques estàtiques, s'estudien els paràmetres següents: Resistència màxima, límit elàstic en tracció, en compressió, en cisalla i en flexió, així com els valors del mòdul elàstic de cada un d'ells. La seva determinació és important a l'hora d'avaluar les propietats mecàniques del ciment amb vistes a una correcta aplicació. El PMMA utilitzat en les aplicacions quirúrgiques, és relativament dèbil a tracció però resistent en compressió, amb valors de la resistència màxima en compressió entre 61-103 MPa. Tot seguit en la (Taula 2.3) es mostren els valors de les propietats mecàniques estàtiques dels ciments ossis acrílics.

Taula 2.3. Propietats mecàniques del ciment ossi acrílic.

PROPIETATS MECÀNIQUES	VALOR
Resistència a la compressió (MPa)	61-103
Resistència a la tracció (MPa)	22-48
Resistència a la flexió (MPa)	45-80
Mòdul elàstic en tracció (GPa)	2,4-3,2
Resistència al cisallament (MPa)	21-41
Tenacitat a la fractura ( $\text{MN}\cdot\text{m}^{-2}$ )	1,2-1,5

En realitat el ciment ossi acrílic no es troba realitzant la seva funció en les condicions estàtiques, però el que s'ha de determinar és el seu comportament mecànic en les condicions dinàmiques. Per la caracterització dinàmica del ciment ossi es realitzen assajos de fallada en fatiga, en els que es combinen diferents esforços que pateixen el material al llarg de la seva vida en utilitat, com per exemple els realitzats per la cadera quan l'individu es troba caminant. A través d'aquests assajos es determina la propagació d'esquerdes per fatiga (FCP) les quals és la principal responsable de la fallada dels ciments i posteriorment mouen la pròtesis. Un dels factors responsables de l'aparició d'aquestes fractures és l'existència de petits dominis d'agent radioopac a través dels quals l'esquerda pot progressar quan es sotmès al material a un gran número de cicles d'esforç.

### **2.2.3.3 Propietats tèrmiques**

El principal component dels ciments ossis acrílics és el PMMA. Aquest polímer és un material amorf i com a tal no presenta fenòmens d'orientació en la seva morfologia. Per això la temperatura característica dels ciments ossis acrílics és la temperatura de transició vítria ( $T_g$ ), la qual el material passa de ser vítric i rígid a tou i d'aspecte gomós.

A causa de que el PMMA és el component majoritari dels ciments ossis comercials, aquests presenten una temperatura de transició vítria, en sec, pròxima a la d'aquest polímer (aprox.105°C). Però quan els materials són introduïts en medis líquids per simular el comportament fisiològic, aquesta temperatura decreix de forma progressiva amb el temps d'immersió fins establir-se aproximadament al cap de varies setmanes. Aquest efecte és a causa de la inclusió de les molècules d'aigua en el centre de la matriu polimèrica que actua com agent plastificant del material. En el cas de formulacions comercials aquesta disminució de la temperatura de transició vítria és aproximadament d'uns 20°C, encara que les temperatures a les que s'arriba són superiors a la temperatura normal de treball del ciment en el medi fisiològic, 37°C.

## 2.2.4. Aplicacions, efectes i precaucions

### ➤ Aplicacions:

Tal i com s'ha dit anteriorment, les principals aplicacions del ciment ossi acrílic es centren principalment en la substitució total o parcial de les pròtesis articulars, tal i com poden ser la cadera i el genoll. Per altra banda, s'utilitzen per a emplenar els defectes ossis, tant en la zona dental com en altres estructures òssies que pateixen algun traumatisme tant físic com biològic. També existeixen referències de l'ús del ciment ossi acrílic en tractaments antitumorals utilitzant la seva elevada exoterma<sup>18</sup>.

### ➤ Efectes secundaris:

Els principals efectes secundaris al implantar el ciment ossi acrílic en la cavitat orbitària són mínims, i normalment atribuïts a la presència de monòmer residual, donat a que el ciment està completament curat.

El fabricant del ciment ossi reporta alguns efectes secundaris en la cirurgia ortopèdica, per la implantació d'aquest procés de polimerització o forjat per fixar la pròtesis. La solució del metacrilat de metil (MMA) (monòmer líquid) aïllat és un dissolvent orgànic potent, molt volàtil i inflamable, que pot produir efectes hipotensors i alteracions cardiovasculars secundàries. A més, durant la polimerització o forjat (que es dona al barrejar el monòmer líquid i el polímer en pols) hi ha alliberació tèrmica i és necessari evitar el contacte directe amb teixits sensibles (grans vasos sanguinis, nervis, entre d'altres), per evitar necrosis dels mateixos per lesió tèrmica.

### ➤ Precaucions:

Cal tenir present que en qualsevol cirurgia es pot produir infeccions i altres complicacions no relacionades amb el implant, a més, la implantació d'un cos estrany en els teixits augmenta el risc normal d'infecció i inflamació associada amb cirurgia. La feina rutinària d'un antibiòtic profilàctic i una teràpia antiinflamatòria postoperatòria apropiada sol ser important a la discreció del cirurgià. És molt important que s'utilitzi un alt nivell de cura asèptica quan es prepara o maneja el implant.

## 2.2.5. Modificacions

Les modificacions tant de la metodologia de preparació com la composició en les dues fases, sòlida i líquida (S:L), constitueixen les vies més prometedores per millorar les prestacions finals del material com poden ser les seves propietats mecàniques, modificació de la porositat, millora de la biocompatibilitat, etc.

Dins l'àmbit de la millora de les propietats físiques, els millors resultats s'aconsegueixen mitjançant l'aplicació d'un lleuger buit a la massa polimeritzant, reduint així la inclusió d'aire i evitant l'aparició de bombolles i porus, que donen lloc a una pèrdua de propietats mecàniques<sup>19</sup>. També l'aplicació de relacions (S:L) majors porten a l'obtenció de temperatures de curat més baixes, però amb una menor penetració en intersticis de la cavitat òssia<sup>20</sup>.

### 2.2.5.1 Fase sòlida

L'addició de nous components de diferent naturalesa a la fase sòlida com components biodegradables o compostos que augmenten la porositat, introdueixen millores significatives en la resposta tant mecànica com biològica d'aquest tipus de ciments<sup>21</sup>.

La preparació de formulacions òssies acríliques amb components biodegradables (carbohidrats, cel·lulosa,...), ajuda a la degradació d'aquestes mitjançant un medi fisiològic per donar lloc al creixement de teixit ossi viu<sup>22</sup>. Els polímers biodegradables també s'utilitzen des de fa varies dècades per la preparació de diferents dispositius biodegradables dins del camp biomèdic<sup>23,24</sup>. Aquests materials han sigut objecte d'estudi per sistema d'alliberació controlada de fàrmacs (antibiòtics<sup>25</sup>, antiinflamatoris<sup>26</sup>, sutures en cirurgia<sup>27</sup> i enginyeria de teixits<sup>28,29</sup>).

L'addició de perles de vidre de diferents mides de partícules provoquen augments del mòdul elàstic i provoquen una disminució en la temperatura màxima de curat i un augment en la resistència a la compressió<sup>30</sup>. La modificació d'un 25% p/p amb hidroxiapatita també dona lloc a una disminució de la temperatura màxima de curat en un 10-15%, resultant una resistència en flexió de 68 MPa i una reducció significativa de la fluència. També s'ha observat que l'addició de la hidroxiapatita estimula el creixement dels osteoblasts i la seva proliferació<sup>31</sup>.

La incorporació de precursors de HA que promouen el creixement de la HA en la superfície mineral, és un altre mètode per produir la mineralització òssia. Aquest és el cas de la incorporació de vidres bioactius (BG) i vidres de fosfat (PG), basats en SiO<sub>2</sub>, Na<sub>2</sub>O, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> i altres

òxids inorgànics, als ciments ossis acrílics. Són vidres parcialment solubles en condicions fisiològiques i promouen la recristal·lització de la HA en la superfície del material implantat<sup>32</sup>. En aquest sentit, els diferents grups d'investigació han desenvolupat materials compostos basats en PMMA i BG/PG com a ciments per la fixació de pròtesis i per emplenar els defectes ossis<sup>33,34,35</sup>.

### 2.2.5.2 Fase líquida

La fase líquida del ciment ossi també és objecte de modificacions per millorar les propietats finals del ciment ossi acrílic. Una de les modificacions amb millors resultats és la substitució de l'activador de la iniciació per altres de menor toxicitat. És una via de modificació i millora de la biocompatibilitat del ciment. Tot i que avui en dia no s'ha demostrat que la DMT és intrínsecament cancerígena, els estudis revelen que causa alteracions en els cromosomes<sup>36,37</sup>, i és un clar inhibidor de la síntesis de proteïnes, interferint en els processos de mineralització<sup>38</sup>. L'obtenció de noves amines activadores que disminueixen aquesta citotoxicitat es presenta com un camp d'investigació molt ampli. Compostos tal i com 4-(dimetilamino)fenetanol<sup>39</sup>, inclosa en formulacions comercials (Sulfix 60), N,N-dihidroxiopropil-4-toluidina (Boneloc)<sup>40</sup>, N,N-dimetilamionbencil alcohol, metacrilat de N,N-dimetilaminobencil<sup>41,42</sup>; arilaminas, disminueixen l'activitat citotòxica, respecte a la N,N-dimetilamino-4-toluidina (DMT).

D'altra banda, l'addició de nous monòmers a la fase líquida, substituint total o parcialment el MMA per altres de major pes molecular o de propietats diferents, o l'addició d'agents d'entrecreuament es troba documentada en la literatura amb resultats molt destacats en la millora de les propietats mecàniques, augments de nivell de biocompatibilitat, etc. Un exemple d'aquest, és l'addició d'eugenol<sup>43</sup> o vitamines com el  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E)<sup>44</sup> que han sigut químicament incorporades en l'estructura dels monòmers de metacrilat per induir caràcter antiinflamatori i antioxidant<sup>45</sup>, respectivament.

La substitució dels agents radioopacs orgànics comuns que s'utilitzen, tal i com el sulfat de bari o el diòxid de zirconi, han estat un altre punt d'investigació degut a la seva dolenta compatibilitat amb el PMMA, donant lloc a materials amb una baixa resistència a la tracció i duresa es recullen els monòmers sintetitzats més significatius per la seva incorporació a la formulació de ciments ossis acrílics. El material resultant permet l'evolució postoperatori per mitjà raig X, la conservació de les propietats mecàniques i la citotoxicitat cel·lular<sup>46</sup>. En aquest sentit la incorporació del monòmer amb caràcter opac ha portat al manteniment de la resistència

mecànica. Monòmers tal i com: 2,5-diiodo-8-quinolilo de metacrilat<sup>47</sup>, 2-(4-iodebenzoil)-oxo-metacrilat<sup>48</sup> i (2',3',5'-triiodobenzoil) metacrilat oxoetil<sup>49</sup> han sigut efectivament sintetitzats i incorporats al procés de curat per mitjà de la copolimerització amb MMA.

## 2.3. HIDROXIAPATITA

### 2.3.1. Característiques

La hidroxiapatita (HA), és un fosfat de calci àmpliament utilitzat com a biomaterial en cirurgia de ciment ossi, ja que és un material altament biocompatible. La seva fórmula molecular correspon a :  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , amb una relació molar (Ca/P)=1,67. El seu nom prové del grec i significa decepció o engany, a causa de la facilitat amb la que es confonia amb altres espècies minerals com el beril·li o la turmalina.

De forma general, a la HA se li atribueix simetria hexagonal, sent la fluorapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$ ) l'exemple més representatiu d'aquesta estructura. Tot i així, la HA presenta una simetria més baixa, monoclínic, a causa de la distorsió del ió hidroxil respecte al model ideal que representaria la posició del ió esfèric F en el fluorapatita.

La HA permet la substitució de molts altres ions en la seva estructura. Aquestes substitucions poden tenir lloc en les posicions dels ions calci ( $\text{Ca}^{2+}$ ) o en els grups  $(\text{PO}_4)^{3-}$  i  $(\text{OH})^-$ . La conseqüència d'aquestes substitucions és el canvi de les seves propietats (els paràmetres de la xarxa, la seva morfologia, la solubilitat,...), sense canviar la seva simetria hexagonal.

Molts altres ions poden entrar en les substitucions, afectant, a les propietats tal com: la cristal·lització, l'estabilitat tèrmica, la velocitat de dissolució, etc. Algunes substitucions simultànies poden tenir efectes sinèrgics o antagònics en la cristal·lització i les propietats de solubilitat.

Encara que en general tots els fosfats de calci són molt poc solubles en aigua, la HA és la menys soluble d'elles a pH fisiològic, exceptuant la fluorapatita. El producte de solubilitat del mateix és de l'ordre de  $10^{-59}$ , és a dir, que és pràcticament impossible tenir ions de  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{PO}_4^{3-}$  dissolts en aigua pura a pH neutre; a causa d'això, la major part de calci en l'organisme està



present en estat sòlid, emmagatzemat en el teixit ossi. La HA, en canvi, és soluble en medi aquós àcid, els quals poden donar lloc a les infeccions o en els costats dels osteoblast.

Les propietats mecàniques de la HA són similars a les dels components més resistents de l'os. Així, el seu mòdul elàstic varia entre 40-100 GPa, davant dels 74 GPa de l'esmalt dental i dels 12-18 GPa de l'os compacte. En canvi, la seva resistència mecànica, en forma de compactes densos de HA, és de l'ordre de 100 MPa davant del 300 MPa de l'os humà, disminuint dràsticament aquesta resistència en el cas de compactes porosos.

En la (Taula 2.4) es mostren les propietats físiques i mecàniques que posseeix la HA. Aquestes característiques depenen majoritàriament del procés de manufactura al qual hagi sigut sotmès el material.

Taula 2.4. Propietats físiques i mecàniques que posseeix la HA.

PROPIETAT	VALOR
Resistència a la tracció	40 – 100 MPa
Resistència a la compressió	100 – 900 MPa
Resistència a la flexió	20 – 80 MPa
Mòdul d'elasticitat	70 – 120 GPa
Densitat	3,160 Kg/m <sup>3</sup>
Capacitat tèrmica a T <sub>amb</sub>	184,07 cal/K-mol
Duresa	5 en l'escala de Mohs

### 2.3.2. Hidroxiapatita d'origen natural

La HA d'origen natural (extret d'ovella, porc,...) és una font que es va dur a terme als anys 50. La seva estructura és molt similar a la matriu mineral de l'os humà i la seva utilització és emplenar els defectes ossis ja que la seva resistència mecànica (compressió) és alta<sup>50</sup>. També es podria utilitzar l'os com a matèria primera per a l'obtenció de fosfat de calci ceràmic, però és un material poc vàlid per presentar una composició variable en la seva fase mineral i a conseqüència hi ha dificultat per extreure compostos purs a partir de l'os<sup>50</sup>.

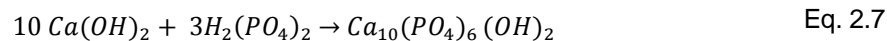
### 2.3.3. Hidroxiapatita sintètica

En el mercat es pot trobar la HA sintètica, la qual té l'avantatge de ser molt pura, i durant el procés de síntesis es pot seleccionar la dimensió i la densitat del porus, entre altres paràmetres.

Els mètodes més convencionals per l'obtenció de la HA sintètica són: la precipitació, la hidròlisis, les reaccions en estat sòlid, les reaccions hidrotermals i el procés solució - gelificació.

➤ Mètodes per precipitació

Els mètodes basats en la síntesis de la HA per precipitació consisteixen essencialment en barrejar fonts de ions calci i fosfat en un medi aquos apropiat. La font de calci pot provenir de solucions aquoses com el  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ,  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  o a partir del  $\text{CaCO}_3$  o  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sòlids. Com a font de fosfat es poden utilitzar solucions aquoses de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . També es pot utilitzar en la reacció entre el  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  i el  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (Eq. 2.7).



Aquesta reacció està modificada per l'addició d'hidròxid amònic ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ), a fi de mantenir el pH de la reacció molt alcalí i assegurar la formació de HA pura després de sintetitzar la HA precipitada.

Un mètode molt desenvolupat és el de "Hayek" i "Newesely"<sup>51</sup> consisteix en la reacció entre el  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  i el fosfat àcid d'amoni  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  en un medi amònic  $\text{NH}_4\text{OH}$ . Tot i així, es sol recomanar utilitzar acetat càlcic  $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$  en comptes de clorur o nitrat de càlcic, ja que a diferència d'aquests els ions d'acetat no s'incorporen a la xarxa de la HA.

Si es vol produir HA substituïda, tant la concentració de calci com la de fosfat es poden regular i controlar afegint-hi les sals corresponents de ions substituïbles. Tot i així, també es pot obtenir HA amb les substitucions dels ions  $\text{F}^-$  i  $\text{Cl}^-$  addicionant-los en la reacció.

Els mètodes de precipitació acostumen a donar HA amb poca quantitat de calci. Només si la reacció es dur a terme amb un medi fortament bàsic es pot obtenir una HA amb una relació molar de calci respecte fòsfor (Ca/P) de 1,67.

➤ Hidròlisis

La HA també es pot obtenir mitjançant hidròlisis de fosfats àcids de calci. Per exemple: del fosfat àcid de calci di-hidratat ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), del fosfat àcid octacàlcic pentahidratat ( $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), del fosfat àcid de calci ( $\text{CaHPO}_4$ ), del fosfat tricàlcic ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) o del pirofosfat càlcic ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ). El pH es controla durant la síntesis mitjançant un flux d'amoniac gas o afegint solucions aquoses de  $\text{NH}_4\text{OH}$ ,  $\text{NaOH}$  o  $\text{KOH}$ . Un altre mètode per obtenir la HA mitjançant la hidròlisi és amb carbonat càlcic ( $\text{CaCO}_3$ ) i pot ser també hidrolitzat en solucions de fosfat amònic o sòdic.

➤ Reaccions en estat sòlid

La HA es pot aconseguir igualment mitjançant reaccions en estat sòlid de mesclades de compostos de calci i fosfat procurant que la relació molar Ca/P sigui estequiomètrica de 1,67. El procés consisteix, principalment en una trituració conjunta dels sòlids, bé sigui en humit o sec, pel·letització i sinterització a temperatures per sobre dels  $950^\circ\text{C}$ .

La HA adquirida per reaccions en estat sòlid es caracteritzen per la seva alta cristal·linitat, estequiometria regulable i baixa solubilitat.

➤ Reaccions hidrotermals

Anàlogament, el fosfat àcid de calci o el fosfat àcid amònic poden convertir-se hidrotermalment en HA en presència de les quantitats apropiades de  $\text{CaCO}_3$ .

Una de les variants més conegudes del mètode hidrotermal és aquella que utilitza com a precursor una estructura natural amb macroporositat connectada similar a l'os humà esponjós. La primera síntesis la van realitzar "Roy" i "Linnehan" (1974)<sup>52</sup> com a precursor l'esquelet mineral del coral amb  $\text{H}_2\text{O}$  i  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , escalfant-lo al voltant de  $250^\circ\text{C}$  durant un temps de 12-48 hores.

➤ Procés solució - gelificació

El procés de solució – gelificació té l'avantatge de l'alta homogeneïtat i puresa dels productes obtinguts així com les menors temperatures de síntesis. Un mètode de guany és posant a reflux dissolucions de  $\text{P}_2\text{O}_5$  i  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  en etanol.

Aquest procediment permet als dos precursors reaccionar a causa de la reactivitat que presenten les espècies de fòsfor en dissolucions alcohòliques. La temperatura de sequedat és de 150°C i els tractaments tèrmics es porta a terme en una atmosfera d'aire a 500°C. La presència dels grups nitrats garantirà la quasi total descomposició dels residus orgànics. La descomposició contribueix a la formació de la fase de HA.

### **2.3.4. Utilització de la hidroxiapatita**

La curiositat de la HA com a biomaterial ve donada clarament per la seva semblança amb la fase mineral del teixit ossi. En principi, seria el material idoni tant per la restauració com la substitució òssia si no fos per la seva baixa resistència mecànica. Així doncs, el seu ús es basa en totes aquelles aplicacions on no es demana esforç mecànic, trobant el seu màxim camp d'aplicació actualment com a recobriment metàl·lic, per tal d'accelerar i incrementar la fixació de les pròtesis a l'os.

De les diferents tècniques de l'aplicació de la HA i del recobriment (projecció per plasma, bombardeig iònic, ablació làser, electroforesis,...), la més extensa és la projecció per plasma, sobre tot en el recobriment de pròtesis de cadenera, arribant al que s'ha denominat fixació biològica de la pròtesis<sup>53,54</sup>.

Entre altres aplicacions, es pot trobar: recobriment de pròtesis dentals i maxil·lofacials, implants dentals, otorinolaringologia, augment de la cresta alveolar, defectes dentals, reconstrucció maxil·lofacial, cirurgia espinal,...

## **2.4. L'OS, MATERIAL BIOMINERALITZAT**

L'os és segurament l'exemple més complex de material biomineralitzat. La consideració de la complexitat dels sistemes moleculars que controlen la seva síntesi biològica provoca un repte per els investigadors científics en materials, de tal forma que la reproducció de l'estructura òssia considerant les seves propietats i biofuncionalitat d'acord amb la seva elegant estructura, representa una de les màximes aspiracions en el camp dels biomaterials.

L'os es forma per processos cel·lulars en els que el teixit dur es sintetitza com un material compost, constituït per una matriu orgànica reforçada per una fase mineral. La matriu orgànica

està constituïda principalment per col·lagen (aproximadament un 90%), la proteïna més abundant en els mamífers. Les molècules de col·lagen segregades per les cèl·lules s'agrupen en fibres característiques, que són les responsables de la integritat funcional de teixits tals com els ossos, cartílags, pell o tendons. Per proporcionar un comportament físic adequat es produeixen entrecreuaments químics entre molècules de col·làgens adjacents. La fase mineral de l'os és una sal de fosfat de calci, majoritàriament en forma de HA,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , i no només conté  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  i ions  $\text{OH}^-$ , sinó que també té petites quantitats de  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  o traces d'elements tal i com  $\text{F}^-$  i  $\text{Cl}^-$ . Altres formes per exemple la substitució parcial del grup hidroxil, són possibles, i al menys un 30% del component mineralitzat de l'esquelet es troba com a fosfat de calci, tal i com el  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ . Aquesta fase mineral participa tant en funcions biomecàniques com metabòliques del teixit.

Específicament el component mineral ossi té dues funcions: Proporciona estabilitat estructural a l'esquelet (protegint i suportant òrgans vitals) i actuar com un sistema d'emmagatzematge de (calci, sodi, magnesi, carbonat i altres ions). El mineral de fosfat de calci pot proporcionar ions als fluids, mantenint els nivells de l'equilibri necessaris, i a la vegada actua com un component desintoxicant en el que es diposita ions tòxics tal i com el plom i estronci.

### 2.4.1. Naturalesa i característiques de l'os

La matriu òssia està formada aproximadament per un 25% d'aigua, un 50% d'una mescla química de sals inorgàniques, i un 25% de varies substàncies orgàniques, composició que aporta a l'os duresa i elasticitat. La duresa procedeix dels components inorgànics, essent els principals el fosfat de calci cristal·lí (hidroxiapatita) i el carbonat de calci, junt a petites quantitats de fluorurs, sulfats i clorurs. La seva elasticitat deriva de substàncies orgàniques com el col·lagen i petites quantitats d'elastina, material cel·lular i grasses. Aquestes propietats aporten al teixit ossi les seves tres principals funcions: la sostenibilitat del cos, la protecció d'alguns òrgans i la possibilitat de moviment<sup>55</sup>.

El teixit ossi segons la seva composició també es pot classificar en: teixit ossi compacte (té un aspecte massís) i teixit ossi esponjós (es caracteritza per posseir espais oberts parcialment plens). La zona externa o cortical dels ossos és aquella que està formada pel teixit ossi més compacte i dur, cobert per una membrana fibrosa vascular que rep el nom de periosti, la que protegeix l'os i alberga els nervis i els vasos sanguinis responsables de detectar el dolor i proporcionar nutrients a l'os (Figura 2.10).

Les propietats físiques i mecàniques de l'os (com estructura) depenen sobre tot de la composició molecular, microestructura i macroscòpica dels seus components. L'os presenta una gran resistència a la fatiga i una considerable habilitat vital per evitar les fractures. Quan l'os es fractura o quan s'aplica un injert per restaurar algun defecte, s'inicia un conjunt de mecanismes naturals de formació de l'os que tendeixen a restaurar la lesió *osteogènesis* (transferència de cèl·lules productores de l'os fins la regió afectada), *osteoinducció* (estimulació de les cèl·lules per provocar la seva diferenciació en les cèl·lules ostogèniques i el començament de la producció de nous ossos), i *osteoconducció* (substitució progressiva i creixement del front de l'os).

Aquests mecanismes estan relacionats amb el comportament i propietats dels implants i resulta imprescindible tenir-ho en compte per la creació de materials biocompatibles amb l'os. Els biomaterials destinats a la implantació òssia es classifiquen tenint en compte el tipus de reacció provocada en la interfase teixit viu-implant<sup>56</sup>. D'aquests biomaterials, els classificats com a bioactius provoquen una interacció i intercanvi químic entre el implant i el teixit viu donant lloc a una perfecta osteointegració.

#### **2.4.2. Recobriment de la hidroxiapatita tipus òssia**

Els fosfats de calci (coneguts com a Ca-Ps o HA) poden afectar en l'estructura i composició del component mineral ossi. Per això s'han utilitzat en aplicacions ortopèdiques i dentals molt variades, tant en empelts com en recobriments<sup>57,58</sup>. Tot i així, les propietats mecàniques dels Ca-Ps són molt diferents a les de l'os humà, el que ha implicat una gran limitació pel que fa a les seves aplicacions. De fet, els Ca-Ps sintètics resulten molt rígids i trencadissos. No obstant això, el recobriment de les superfícies de materials ortopèdics amb una capa de HA, proporciona una resposta favorable tant des de el punt de vista químic com biològic, i estimula la reproducció de les reaccions que es produeixen normalment en teixits calcificats, sense pèrdua de les propietats mecàniques del corresponent dispositiu o material<sup>58,59</sup>. Les sals de Ca-Ps tenen un comportament molt biocompatible amb la majoria dels tipus cel·lulars tal i com osteoblasts, osteoclasts, fibroblasts o cèl·lules periódentals. A més d'això, les sals Ca-Ps proporcionen propietats conductores, permetent la formació de l'os en la seva superfície per adhesió, migració, proliferació i diferenciació de les cèl·lules formadores de l'os<sup>60,61</sup>. Per tant, aquest tipus de recobriment té un interessant potencial en les aplicacions òssies i poden ser utilitzades per emplenar parts bioactives de defectes ossis, o com a suports per enginyeria

Tissular. Aquests suports poden contenir també molècules osteogèniques i poden ser utilitzades per sembrar i cultivar les cèl·lules vives que estimulen la formació de l'os<sup>59</sup>.

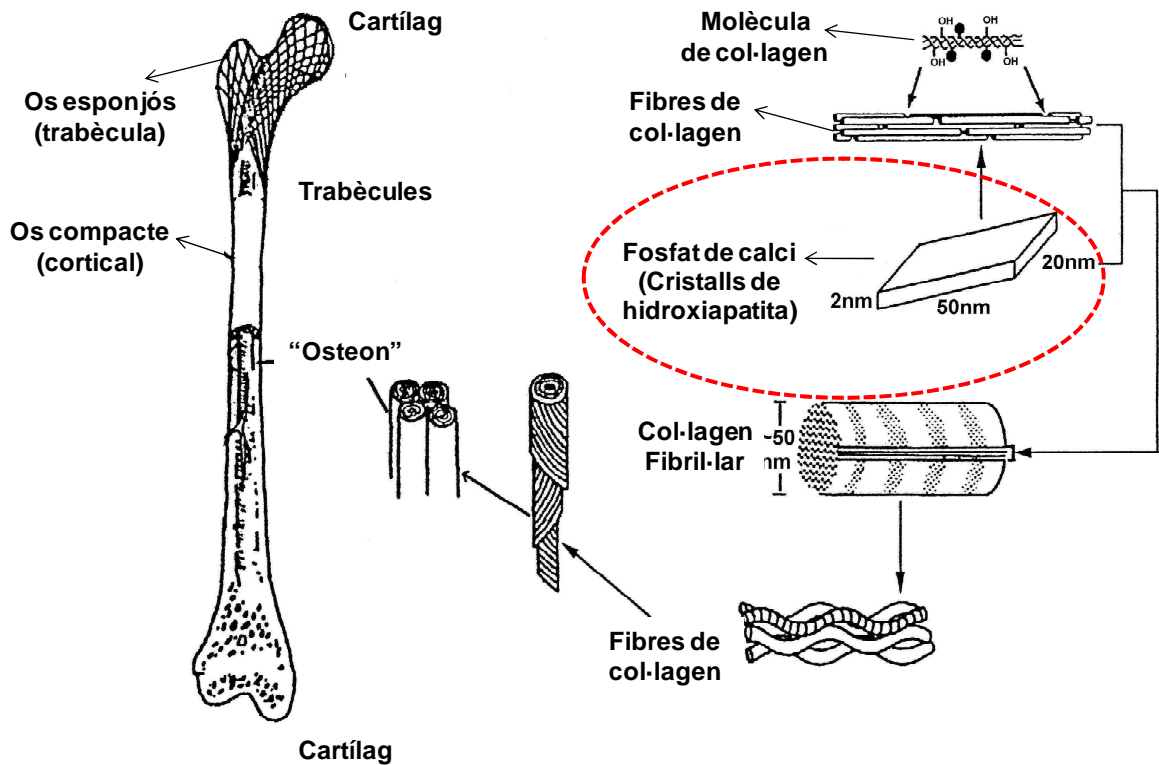


Figura 2.10. Dins l'estructura de l'os s'especifica on es troba la hidroxiapatita.

## 2.5. SOLUCIÓ DE KOKUBO'S (SBF)

En els últims anys s'ha observat interès creixent per els recobriments de fosfat de calci biomimètics, aplicats sobre implants de pròtesis. Diverses tecnologies han estat desenvolupades i resulten força apropiades pel recobriments de materials polimèrics, ja que permeten utilitzar temperatures molt pròximes a la fisiològica<sup>62,63</sup>.

L'any 1990, Kokubo i col·laboradors<sup>64</sup>, van aconseguir per primera vegada aplicar un recobriments de Ca-P en un substrat mitjançant un procés biomimètic, en el que van utilitzar un biovidre actiu basat en una composició  $\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$ . Ions silicats a partir dels grups Si-OH

s'alliberen i absorbeixen en la superfície del substrat per induir la formació de la HA. El biovidre actiu va ser utilitzat en forma de petites partícules que en contacte amb el substrat s'indueix la nucleació de la HA en un medi denominat fluid corporal simulat (SBF), que presenta una composició molt similar a la del plasma sanguini i indueix la formació de HA en la superfície del biomaterial, desenvolupat per Kokubo al 1990<sup>65</sup> i a temperatura fisiològica. Aquest mètode permet la formació del recobriment tant de metalls, ceràmiques i polímers, tal i com l'alúmina, zircònia, titani, polietilè, copolímers de etilè - alcohol vinílic, polietilè tereftalat (PET), polièter sulfona (PES), poliamides (PA), i silicones<sup>66,64</sup>. També es va comprovar que la capa de HA que es formava tenia lloc tant en superfícies planes, com en superfícies irregulars, corbades, fibres o materials teixits<sup>67,68</sup>. L'adhesió de la capa de HA a la superfície de polímers va resultar ser més dèbil per poder ser utilitzada per aplicacions clíniques<sup>70</sup>. Una alternativa utilitzada va ser la modificació de la superfície on s'aplica el recobriment incorporant grups polars abans de procedir al tractament biomimètic<sup>69</sup>. Els grups polars poden actuar com agents de nucleació per la formació de la capa de la HA en la superfície dels polímers. En aquest sentit, el grup de Kokubo va proposar diferents mètodes<sup>70</sup>, com tractament amb solució d'hidròxid sòdic o amb àcid clorhídric<sup>71</sup>, que millorava sensiblement l'adhesió i reduïa els períodes d'inducció per la nucleació. Altres tècniques utilitzades per la modificació de la superfície de polímers va ser la descàrrega elèctrica en atmosfera controlada<sup>72</sup> i aplicació de radiació UV<sup>73</sup>.

La solució utilitzada per aquests autors resultava deficient en ions de bicarbonat en comparació amb el plasma sanguini<sup>74,75</sup>. Al veure aquests resultats, el grup de Kokubo han proposat recentment una nova composició revisada per la solució del fluid corporal simulat, denominat R-SBF, amb una composició més ajustada a la del plasma humà i major concentració de ions bicarbonats que la formulació inicial SBF<sup>65</sup>.

En la (Taula 2.5) es representa les concentracions dels diferents ions que simulen el fluid del plasma humà (SBF) i indueixen la formació de HA en la superfície del biomaterial, respecte les concentracions reals del plasma humà.



Taula 2.5. Concentracions dels ions que simulen el fluid del cos humà i fluid del plasma humà.

<b>IONS</b>	<b>SBF (mmol/dm<sup>3</sup>)</b>	<b>PLASMA HUMÀ (mmol/dm<sup>3</sup>)</b>
Na <sup>+</sup>	142,0	142,0
K <sup>+</sup>	5,0	5,0
Mg <sup>2+</sup>	1,5	1,5
Ca <sup>2+</sup>	2,5	2,5
Cl <sup>-</sup>	147,8	103,0
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	4,2	27,0
HPO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	1,0	1,0
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	0,5	0,5

### **3. MATERIALS, EQUIPS I MÈTODES EXPERIMENTALS**

## 3.1. MATERIALS

Els materials que s'han utilitzat per a la realització d'aquest projecte, es descriuen a continuació:

### 3.1.1. Hidroxiapatita (HA)

S'utilitza hidroxiapatita (HA) en la formulació del ciment ossi acrílic com a material bioceràmic capaç d'estimular l'adherència cel·lular. Aquesta s'inclou a la fase sòlida del ciment substituint part del polimetacrilat de metil (PMMA). L'empresa Proteïn (Celrà) ens ha cedit una mostra de HA procedent d'ossos de porc.

### 3.1.2. Polimetacrilat de metil (PMMA)

Pertany a la fase sòlida del ciment de totes les formulacions acríliques. Com a component principal de la fase sòlida s'ha emprat el PMMA (Figura 3.1) Degacryl MW 332 (Degussa) en format de microperles esfèriques amb diàmetre de partícula de 40-45 µm. En la (Taula 3.1) es mostren les seves característiques.

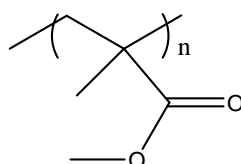


Figura 3.1. Fórmula del PMMA.

Taula 3.1. Característiques físico-químiques del PMMA.

Material	Pes molecular (g/mol)	Viscositat (ml/g)	Contingut d'aigua (%)	Peròxid residual (%)
Mw 332	200.000	80-100	0,5-1,5	0,2-0,5

### 3.1.3. Peròxid de benzoïl (BPO)

Es fa servir el peròxid de benzoïl (BPO) (Figura 3.2) (Scharlau Chemie) com iniciador radicalari en la reacció de polimerització. Aquest iniciador presenta un contingut en aigua del 25% en pes, per tant, abans del seu ús cal purificar-lo prèviament mitjançant recristal·lització amb metanol.

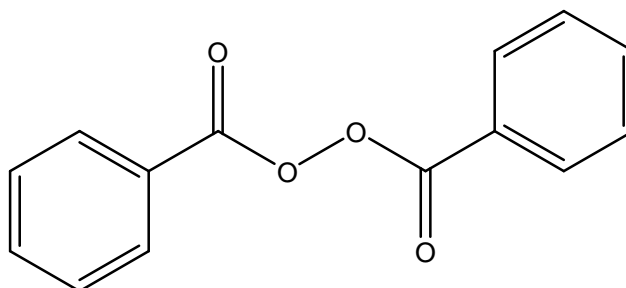


Figura 3.2. Fórmula del BPO.

### 3.1.4. Metanol

El metanol es dur a terme per la recristal·lització del BPO. Ha estat proveït per (Scharlau Chemie) amb una puresa del 99,8%.

### 3.1.5. Metacrilat de metil (MMA)

El monòmer que es fa valer en la fase líquida per a la preparació dels ciments ossis és el metacrilat de metil (MMA) (Figura 3.3) (Acros Orgànics). Aquest s'aplica sense prèvia purificació.

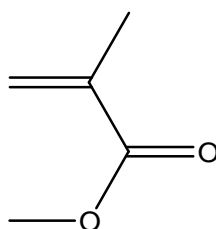


Figura 3.3. Fórmula del MMA

### 3.1.6. 4-4'-bis-(dimetilamina) difenil carbinol (BZN)

El 4-4'-bis-(dimetilamina)difenil carbinol (BZN) (Figura 3.4) (Fluka) s'usa com activador del iniciador de la reacció de polimerització tal i com ens ha estat proveït pel propi subministrador. El BZN provoca la descomposició de l'iniciador a baixa temperatura per donar lloc a radicals lliures encarregats d'iniciar la reacció de polimerització del monòmer en presència de les microesferes de PMMA.

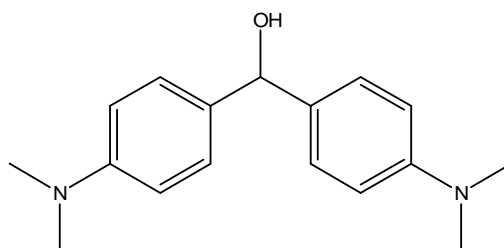


Figura 3.4. Estructura química del BZN.

### 3.1.7. Solució de Kokubo (SBF)

La solució de Kokubo és una mescla de diferents components (sals i àcids) que simula el fluid del cos humà (*Simulated Body Fluid*) (SBF). A la (Taula 3.2) es detallen els diferents reactius emprats en la seva preparació, així com també el seu proveïdor.

Taula 3.2. Reactius solució Kokubo's.

núm.	REACTIU	PROVEÏDOR
1	NaCl	Scharlau Chemies S.A (Espanya)
2	NaHCO <sub>3</sub>	PRS Panreac Barcelona (Espanya)
3	KCl	Scharlau Chemies S.A (Espanya)
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Scharlau Chemies S.A (Espanya)
5	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	Scharlau Chemies S.A (Espanya)
6	HCl	Scharlau Chemies S.A (Espanya)
7	CaCl <sub>2</sub>	Scharlau Chemies S.A (Espanya)
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Scharlau Chemies S.A (Espanya)
9	Tris buffer	PRS Panreac Barcelona (Espanya)

## 3.2. EQUIPS

Els equips necessaris per realitzar la part experimental d'aquest projecte es mostren tot seguit:

### 3.2.1. pH-metre

Per ajustar el pH de la solució Kokubo s'usa el pH-metre model (Crison 2002, Espanya).



Figura 3.5. pH-metre Crison 2002.

### 3.2.2. Estufa 37°C

Per controlar el procés de curat de les mostres es fa servir l'estufa (Memmert, Espanya) termostatitzada a 37°C. Aquesta és la temperatura desitjada durant el període de curat de les mostres perquè simula la temperatura del cos humà.



Figura 3.6. Estufa a 37°C.

### 3.2.3. Estufa 50°C

S'utilitza l'estufa model S-205 (Selecta, Espanya) termostatitzada a 50°C per poder assecat les provetes destinades a determinar l'absorció d'aigua i pèrdua de pes.



Figura 3.7. Estufa a 50°C.

### 3.2.4. Màquina universal per l'assaig mecànic de compressió

Les propietats mecàniques a compressió es determinen a la màquina d'assaig DTC-10 (IDM, Espanya). Aquesta màquina està equipada amb una cèl·lula que correspon a una càrrega de 5 KN, una deformació màxima aplicada del 30% de la longitud total de la proveta, una velocitat d'assaig de 20 mm·min<sup>-1</sup> i una temperatura de (23±1°C). L'equip està controlat a través de la connexió a un ordinador equipat amb el paquet de software Registra III. A continuació a la (Figura 3.8) es mostra l'equip i les corresponents mordasses emprades per dur a terme l'assaig de compressió.

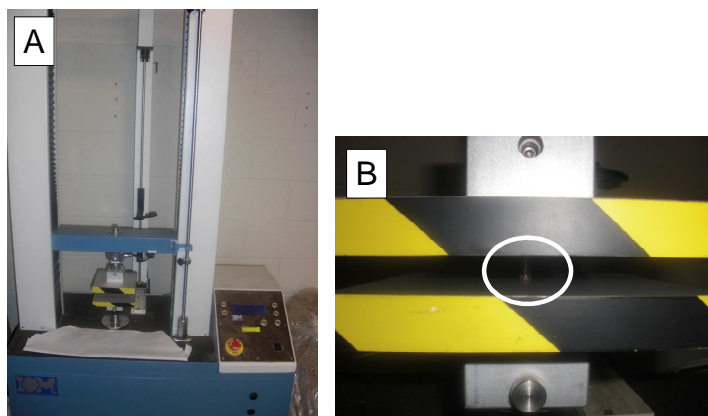


Figura 3.8. Màquina d'assaig mecànic de compressió imatge (A) i les corresponents mordasses imatge (B).

### 3.2.5. Sistema d'avaluació dels paràmetres de curat

Per l'estudi de la variació de la temperatura durant el procés de curat del ciment ossi es recorre a un motlle de tefló cilíndric temostatitzat a 25°C, amb un diàmetre de 10 mm i 15mm d'altura. Les dimensions del motlle de tefló no són les descrites en la norma ISO-5833<sup>17</sup>. Els avantatges d'aquest motlle són que la quantitat necessària de mostra per obtenir les dades requerides és molt menor i que el motlle està dotat d'una camisa que es pot temostatitzar a la temperatura desitjada. A més, les dimensions i la forma del motlle s'analitzen a través d'experiments paral·lels i la desviació de la temperatura per ambdós mètodes és menor a 2°C.

Està format per dues sondes de temperatura, una per la temperatura ambient i la del motlle, i l'altre per la temperatura de la cavitat cilíndrica del motlle de tefló per controlar la temperatura durant tot el procés de curat (Figura 3.9). Aquesta sonda està connectada a un equip informàtic equipat amb el programa (Comsoft) el qual registra el termograma de la temperatura en funció del temps. D'aquesta manera s'avalua la temperatura màxima de curat ( $T_{m\grave{a}x}$ ) i el temps d'enduriment ( $t_e$ ).

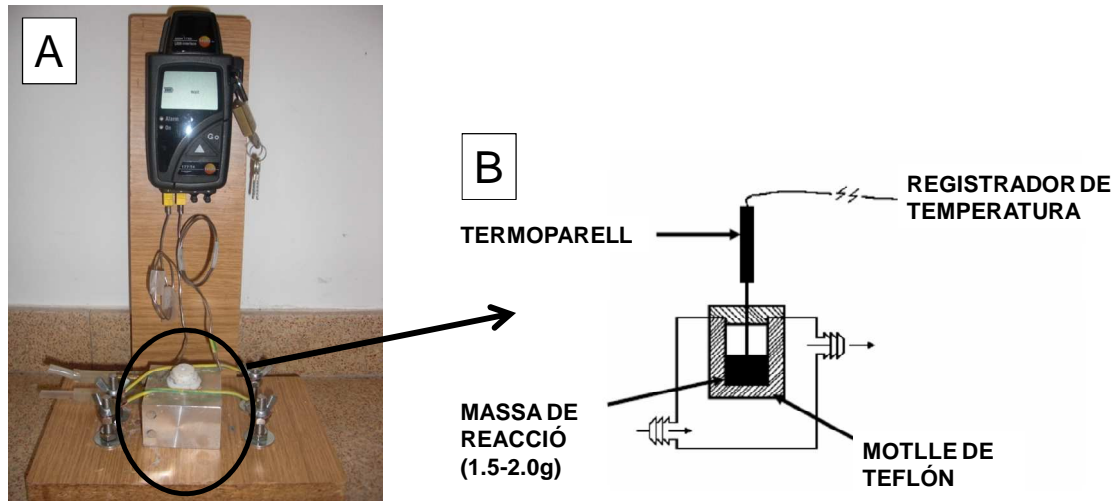


Figura 3.9. Equip per l'anàlisi de paràmetres de curat imatge (A) i motlle pel curat (B)



### 3.2.6. Espectroscòpia infraroja (FT-IR / ATR)

L'espectroscòpia infraroja es fa servir per indicar el tipus d'enllaç i determinar els grups funcionals que es troben a la mostra. S'empra l'infraroig per transformada de Fourier (Mattson-Galaxy Satellite 117, Espanya) amb un sistema de reflexió ATR Golden Gate vidre de diamant, el qual permet conservar la mostra íntegrament sense destruir-la i l'obtenció d'espectres de forma ràpida, precisa i amb relació senyal/soroll elevades.



Figura 3.10. Equip Espectroscòpia Infraroja.

### 3.2.7. Microscòpia electrònica de rastreig (MER)

La microscòpia electrònica de rastreig (MER) permet obtenir imatges d'alta resolució, elevada profunditat de camp i lliures de reflexos. És un equip útil en l'observació d'estructures petites, les quals no es poden resoldre amb microscòpia òptica. El microanàlisi de raig X associat al MER permet obtenir informació de la composició elemental d'inclusions o defectes microscòpics presents en la mostra.

L'equip de MER que s'utilitza és el model (Zeiss DSM-960A, Espanya) amb un detector de raig X per separació d'energies (EDX) Oxford Link Isis L200B, dotat de finestra ultrafina de beril·li i detector de silici. Aquest equipament permet la detecció d'elements de nombre atòmic igual o superior a 6.



Figura 3.11. Equip experimental per l'anàlisi del MER.

### 3.3. MÈTODES EXPERIMENTALS

#### 3.3.1. Recristal·lització del BPO

Es prepara una solució saturada de BPO en metanol puríssim, es posa en agitació suau i s'escalfa fins a 38°C (no es pot sobrepassar la temperatura de 40°C ja que sinó es produiria la descomposició del BPO). Seguidament es refreda la dissolució a 0°C, mai per sota, i es deixa refrigerada a aquesta temperatura durant 24 hores. A continuació es filtren al buit els cristalls obtinguts de BPO, i es deixen assecar a temperatura ambient. Es conserven en un pot de vidre per ser emprats en la preparació del ciment ossi.

#### 3.3.2. Preparació del ciment

Un ciment ossi és un material bifàsic que es prepara "in situ", barrejant la fase líquida monomèrica amb la fase sòlida polimèrica fins a obtenir la consistència adequada per ser aplicada. Un ciment ossi està constituït per dues fases, una líquida i una sòlida. La fase líquida està formada pel monòmer MMA i l'activador BZN que es troba en una proporció de l'1% en pes respecte el total de la fase líquida. La fase sòlida es compon pel polímer PMMA, el material bioceràmic HA i l'iniciador BPO, ja purificat, que representa un 1,5% en pes respecte la fase sòlida.

La base d'aquest projecte es fonamenta en substituir diferents quantitats de PMMA per HA d'origen animal per obtenir materials amb diferents resposta fisicoquímica i biològica. A la (Taula 3.3) es mostra la nomenclatura emprada per a cada ciment ossi durant la realització del treball, seguit de la quantitat en percentatge de HA en la fase sòlida i el percentatge de HA que correspon al ciment.

Taula 3.3. Representació de les diferents valoracions de HA.

<b>NOMENCLATURA</b>	<b>% HA A LA FASE SÓLIDA</b>	<b>% HA EN EL CIMENT</b>
HA 0%	0	0
HA 5%	5	3,33
HA 15%	15	10,00
HA 25%	25	16,67

Per a realitzar el ciment, primerament s'ha de determinar la relació entre el contingut de la fase sòlida i la fase líquida, el que es denomina la relació sòlid:líquid (S:L). Això es fa perquè el ciment es realitzi en unes condicions de fluïdesa que permetin la seva manipulació abans que s'incrementi la seva viscositat i a la vegada contingui la mínima quantitat de monòmer possible per tal de minimitzar els fenòmens tòxics que poden ser derivats del seu ús. La relació utilitzada en aquest projecte és de (2:1).

Per dur a terme el procés d'obtenció del ciment ossi cal començar preparant per separat cadascuna de les fases, veure exemple en (informació addicional apartat 9.1). Per a la preparació de la fase sòlida es pesen en un recipient de plàstic els diferents components: el BPO, HA (excepte pel ciment control) i el PMMA. Es barregen els diferents components per assegurar la seva homogeneïtzació. Per a l'obtenció de la fase líquida en un recipient de vidre es pesa el BZN i s'introdueix el MMA, que es troba en estat líquid. Amb una espàtula agitem suaument per tal de dissoldre completament el BZN.

Un cop es tenen les dues fases preparades, la fase líquida s'afegeix sobre la fase sòlida i es barreja la mescla manualment, amb agitació suau mitjançant una espàtula per tal d'evitar la possible inclusió de bombolles d'aire, fins que la massa de polimerització augmenta de viscositat a causa de la reacció de polimerització.

Durant el procés de mesclat, la massa de reacció va adquirint un aspecte més pastós. Aquest procés s'acaba en el moment que la massa no s'adhereix al guant de làtex. En aquest moment, la massa de polimerització ja està llesta per omplir els diferents motlles per tal d'obtenir la forma de la proveta desitjada i caracteritzar-la posteriorment (Figura 3.12).



Figura 3.12. Exemple de motlle per el ciment.

Tot seguit s'introdueixen els motlles a l'estufa de 37°C, perquè tingui lloc la reacció de curat en condicions fisiològiques durant una hora. Un cop transcorregut aquest temps es treuen les provetes del motlle (Figura 3.13), es llimen per tal de tenir una estructura simètrica i ja estan preparades per a la seva caracterització.



Figura 3.13. Exemple de les provetes sortides de l'estufa de 37°C.

### 3.3.3. Preparació de la solució Kokubo's

La solució de Kokubo's consisteix en una barreja de diferents concentracions de ions inorgànics que es realitza seguint el següent protocol de treball, el qual consta de quatre parts:

➤ *Neteja*

Primer de tot s'ha de procedir a la neteja de tot el material utilitzat (flascons, matrassos, pipetes,...) durant el procés de preparació de la solució amb una dissolució d'àcid clorhídric (HCl) diluïda, al 10% en volum, amb aigua mili-Q. A continuació, es submergeix tot el material en la solució de HCl durant un període de 24h, un cop passat aquest temps, es renta el material amb aigua mili-Q. Finalment, per assecar el material s'introdueix a l'estufa de 50°C.

➤ *Preparació de la solució*

Per a la preparació de la solució, s'utilitzen els reactius que es detallen a la (Taula 3.4). En un flascó d'1L de polietilè s'introdueixen 750mL d'aigua mili-Q. Es posa en agitació magnètica en un bany d'aigua termostatitzat a 36,5°C. A continuació s'afegeixen els vuit primers reactius de la (Taula 3.4), un a un fins a la completa dissolució de l'anterior. El (reactiu núm.9) s'addiciona

gram a gram procurant que la dissolució del gram sigui completa. Un cop que ja està tot dissolt, es pot passar al pas següent.

➤ *Ajust del pH*

Un cop calibrat el pH-metre s'introdueix l'elèctrode en la solució termostatitzada a 36,5°C. El pH de la solució preparada ha de ser aproximadament de 7,5. Per tal d'ajustar el pH a 7,4 s'afegeix gota a gota la solució d'HCl (reactiu núm.10). Un cop ajustat el pH a 7,4 es transfereix la solució a un matràs aforat d'1L, s'espera a que la solució estigui a temperatura ambient i s'enrasa amb aigua mili-Q.

➤ *Emmagatzement*

La solució s'emmagatzema en una ampolla de polietilè esbandida prèviament tres vegades amb solució Kokubo's i finalment s'hi transfereix tota la solució i s'emmagatzema en una nevera refrigerada a una temperatura entre 5-10°C. Si durant el període d'emmagatzement aparegués precipitat en les parets de l'interior de l'ampolla, s'hauria de tornar a preparar la solució ja que això voldria dir que s'ha induït la precipitació de sals en la solució.

Taula 3.4. Representació de les quantitats necessàries segons el protocol.

núm.	REACTIU	QUANTITAT
1	NaCl	7,996 g
2	NaHCO <sub>3</sub>	0,350 g
3	KCl	0,224 g
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,174 g
5	MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,305 g
6	HCl	40 mL
7	CaCl <sub>2</sub>	0,278 g
8	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,071 g
9	Tris buffer	6,057 g
10	HCl	1mol/L

### 3.3.4. Avaluació dels paràmetres de curat

Per obtenir els paràmetres de curat es prepara una mostra de 5 grams de ciment ossi seguint la metodologia detallada a (apartat 3.3.2). Un cop obtingut el ciment amb la consistència pastosa s'introdueix dins el motlle de tefló (Figura 3.9), es tapa i es connecta la sonda de temperatura (col·locada a una altura de 3 mm del fons).

Connectat al programa informàtic, ens dona la lectura de les diferents temperatures en funció del temps i així es pot calcular tot seguit, la temperatura d'enduriment ( $T_e$ ). En (l'apartat 9.4) es pot veure un exemple del càlcul dut a terme.

### 3.3.5. Estudi d'absorció d'aigua i pèrdua de pes

Mitjançant l'estudi d'absorció d'aigua o grau d'hidratació (% $H_{hid}$ ) (Eq. 3.1) i la pèrdua de pes (% $P_p$ ) (Eq. 3.2), s'avalua el comportament "in vitro" dels materials. Aquest assaig es realitza submergint les provetes amb forma de disc (15 mm de diàmetre i 1 mm d'espessor) en la solució Kokubo's (SBF) a pH=7,40 durant un període de temps determinat.

Primer de tot cal tenir les mostres estabilitzades de pes, per això, s'assequen les provetes a l'estufa de 50°C i a continuació es deixen en un dessecador perquè estiguin a temperatura ambient i s'anota el pes ( $W_1$ ).

Seguidament es submergeixen les provetes en la solució Kokubo's i s'incuben a 37°C durant el període de temps determinat. Transcorregut el temps desitjat es treuen les provetes de la solució, s'assequen amb molta cura amb paper absorbent per tal d'eliminar les gotes de solució adherides a la superfície de la proveta, es pesa la proveta ( $W_2$ ).

Novament es torna a introduir la proveta dins l'estufa a 50°C per tal d'eliminar l'aigua que puguin haver absorbit i es tornen a pesar, fins a un pes constant ( $W_3$ ). En (l'apartat 9.2) es pot veure un exemple del càlcul seguit per aquest assaig.

$$\% H_{hid} = \frac{W_2 - W_3}{W_3} \times 100 \quad \text{Eq. 3.1}$$

$$\% P_p = \frac{W_1 - W_3}{W_3} \times 100 \quad \text{Eq. 3.2}$$

### 3.3.6. Assaig mecànic de compressió

Per obtenir les propietats mecàniques sota l'esforç a compressió s'assagen les provetes que es mostren a la (Figura 3.14). Aquestes s'obtenen en un motlle de tefló dissenyat per a que compleixi les especificacions de la norma ISO-5833<sup>17</sup>. De cada formulació s'experimenten un mínim de cinc provetes per obtenir un valor promig i la seva corresponent desviació estàndard. Per aquesta prova es fan servir les provetes cilíndriques, amb un diàmetre de 6 mm i una altura de 12 mm, obtingudes en un motlle de tefló (Figura 3.14). Per això, es prepara el ciment barrejant les dues fases tal i com s'explica en (apartat 3.3.2), i quan s'arriba a un estat pastós s'omple el motlle, es pressiona per les dues cares amb dues superfícies llises de tefló i s'introdueixen a l'estufa de 37°C durant una hora. Passat aquest temps, es treuen del motlle, es descarten les provetes que contenen bombolles d'aire, es lima la part superficial de les que es troben en bon estat (cal deixar-les amb una superfície plana i paral·lela entre sí) i ja es poden assajar.

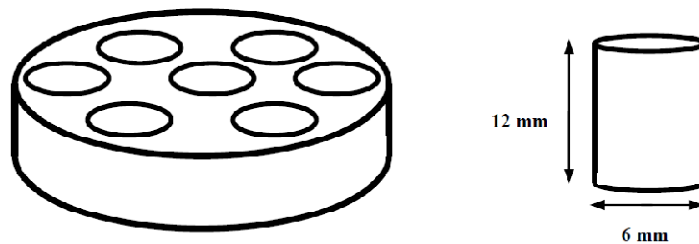


Figura 3.14. Motlle de tefló i proveta de l'assaig mecànic per compressió.

Els ciment ossis s'experimenten en sec i submergits 15 dies en la solució Kokubo's i a 37°C simulant les condicions fisiològiques, en assajos independents. La resistència a compressió ( $\sigma_c$ ) expressada en unitats de MPa, es calcula segons (Eq. 3.3) on  $F$  és la força màxima aplicada, en Newtons i  $d$  és el diàmetre de la mostra, en mil·límetres (apartat 9.3).

$$\sigma_c = \frac{4 \cdot F}{\pi \cdot d^2} \quad \text{Eq. 3.3}$$

L'anàlisi estadístic dels resultats de les propietats mecàniques es porta a terme per l'anàlisi estadístic de la variància (ANOVA). En tots els anàlisis estadístics es considera  $p > 0,05$  com estadísticament significatiu.



### 3.3.7. Espectroscòpia infraroja (FT-IR / ATR)

Es realitza l'espectre d'infraroig dels diferents ciments ossis preparats a temps 0 i 23 dies d'immersió en la solució Kokubo's. També es realitza el corresponent espectre de la HA comercial.

### 3.3.8. Estudi de la biocompatibilitat “in vitro” del ciment ossi

En l'anàlisi de biocompatibilitat “in vitro” dels diferents ciments ossis modificats amb HA i el controls realitza a partir de dos experiments: l'assaig de MTT i “l'Alamar Blue”. Els estudis de biocompatibilitat “in vitro” han estat realitzats al “Centro de *Investigación Biomédica en Red en Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina* (CIBER-BBN), de la *Universidad de Investigación* (CHA-CSIC), situat a l'Hospital Provincial de la Província d'Àvila (SACYL)”.

#### 3.3.8.1 Assaig de la citotoxicitat (MTT)

L'assaig MTT<sup>76,77</sup> s'utilitza en l'evolució de la toxicitat del material derivat de l'alliberació d'algun tipus de component citotòxic (productes de la seva degradació, monòmer residual,...)<sup>78</sup> al medi del cultiu en el que es desenvolupen les cèl·lules. En aquest cas es fa ús de la dissolució del reactiu MTT en tampó PBS en concentració 5 mg/ml. Aquesta dissolució es filtra i es dilueix al 10% en medi fresc per obtenir així la dissolució de treball que conté el MTT.

Amb l'objectiu d'analitzar l'alliberació de productes tòxics a partir de les formulacions experimentals i del control TMX es realitza un assaig MTT<sup>17,4</sup>, utilitzant el cultiu primari dels osteoblast humans. L'assaig consta de les següents fases:

- Obtenció dels eluents o lixiviats dels materials en medi del cultiu complet sense sèrum a 1, 2 i 7 dies, després de mantenir les mostres a 37°C i en agitació durant aquests dies. S'utilitzen 5 ml de medi per cada mostra.
- Sembrar de cèl·lules, utilitzant medi de cultiu complet fresc, a una concentració de 10<sup>5</sup> cèl·lules/ml, sobre plaques de 96 pouets (100 µl de concentrat de cèl·lules/pouet).
- Incubació durant 24 hores a 37°C i una atmosfera amb un 5% de CO<sub>2</sub>.
- Intercanvi del medi de cultiu per els lixiviats dels materials, prèviament recollits a 1, 2 i 7 dies (n=8).
- Incubació durant un període de 24 hores a 37°C i una atmosfera amb un 5% de CO<sub>2</sub>.
- Retirar el contingut dels pouets, afegint al seu lloc el reactiu MTT.

- Incubació 4 hores a 37°C i una atmosfera amb un 5% de CO<sub>2</sub>.
- Retirar el contingut de pouets i afegir 100 µl de DMSO/pouet.
- Lectura amb agitació de 20 segons a elevada intensitat, de densitat òptica a 570 nm, amb una longitud de referència de 630 nm.
- Els valors de l'absorbància obtinguts se'ls resta els valors mesurats pel blanc, i es relativitzen segons els valors llegits per el control TMX, obtenint la viabilitat cel·lular relativa (%VR) respecte aquest control, a partir de (Eq. 3.4):

$$VR = \frac{DO_M - DO_B}{DO_C} \times 100 \quad \text{Eq. 3.4.}$$

Essent la densitat òptica de la mostra (DO<sub>M</sub>); del blanc (medi cultiu induït en pouets sense cèl·lules) (DO<sub>B</sub>); i la del cultiu (DO<sub>C</sub>).

Tot seguit es representa a la (Figura 3.15) es representa un esquema del tipus MTT per avaluar la alliberació de components citotòxics. Els eluents recollits a 1, 2 i 7 dies s'utilitzen per cultivar cèl·lules i avaluar espectroscòpicament l'efecte sobre el cultiu. Els resultats obtinguts s'analitzen mitjançant anàlisis de la variància (ANOVA).

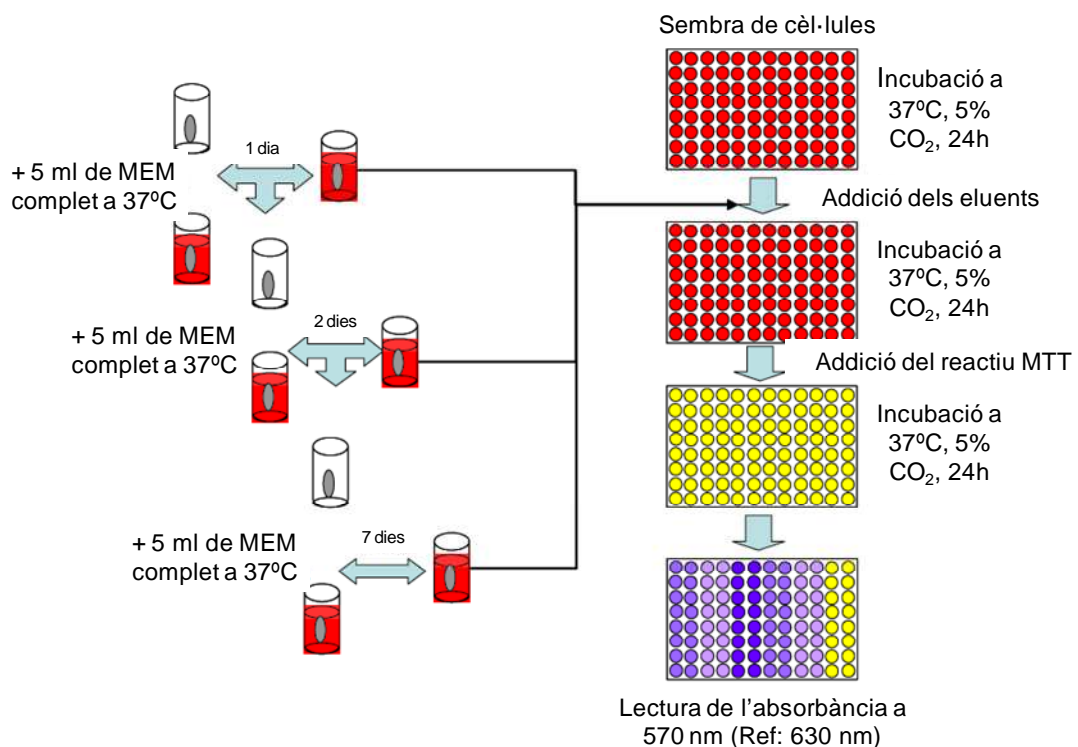


Figura 3.15. Esquema de l'assaig tipus MTT per avaluar l'alliberació de components citotòxics.

### 3.3.8.2 Assaig “Alamar Blue”

L'objectiu d'aquest assaig és estudiar l'evolució temporal de la proliferació cel·lular, durant un període de 21 dies, establerta directament sobre la superfície dels materials utilitzant el reactiu “Alamar Blue”<sup>5,6</sup>. Aquest assaig permet realitzar diferents mides de l'activitat cel·lular d'un període de temps, a causa de que el reactiu utilitzat no resulta tòxic per les cèl·lules cultivades en contacte amb el mateix. El resultat de l'activitat cel·lular és la reducció del reactiu addicionat que vira de color, propietat que es pot mesurar colorimètricament.

En una placa de 24 pouets es dipositen les mostres esterilitzades on s'hi realitza el sembrat de les cèl·lules, amb una concentració de cultius  $10^5$  cèl·lules/ml. Seguidament, s'incuben les plaques durant 24 hores a  $37^{\circ}\text{C}$  a una atmosfera amb un 5% de  $\text{CO}_2$ . A continuació es renten les mostres amb PBS, i s'hi afegeix una dissolució al 10% del reactiu “Alamar Blue” en un medi completament lliure de vermell de fenol (1 ml/pouet), que es manté en contacte amb els cultius durant 4h a  $37^{\circ}\text{C}$  a una atmosfera amb un 5% de  $\text{CO}_2$ . Passat aquest temps, es transvasa el contingut dels pouets a plaques de 96 pouets (100  $\mu\text{l}$ /pouet).

Finalment, es realitza una lectura de la densitat òptica en un espectrofotòmetre (Bitek ELX808IU) a 570 nm, amb una longitud d'ona de referència de 630 nm, de les mostres, restant els valors d'absorbància mesurats per el blanc als valors obtinguts per les diferents mostres.

El protocol descrit anteriorment s'ha repetit a 3,7,14 i 21 dies, els que permet obtenir el patró de la proliferació d'osteoblasts sobre la superfície de TMX i les formulacions experimentals durant els 21 dies que dura l'assaig.

L'evolució temporal de la proliferació cel·lular es porta a terme a partir de les mesures d'absorbància realitzades a diferents períodes de temps, els valors obtinguts es comparen amb els valors obtinguts pel control negatiu de TMX.

Tot seguit es representa en la (Figura 3.16) un esquema del procediment on primer s'introdueixen les mostres dels materials en els pouets (A) i es realitza la sembra (B) de cèl·lules. Si es volen agafar lectures de densitat òptica a diferents períodes de temps després de l'addició del reactiu AB, aquest es pot retirar (C) i reomplir els pouets amb medi completament fresc.

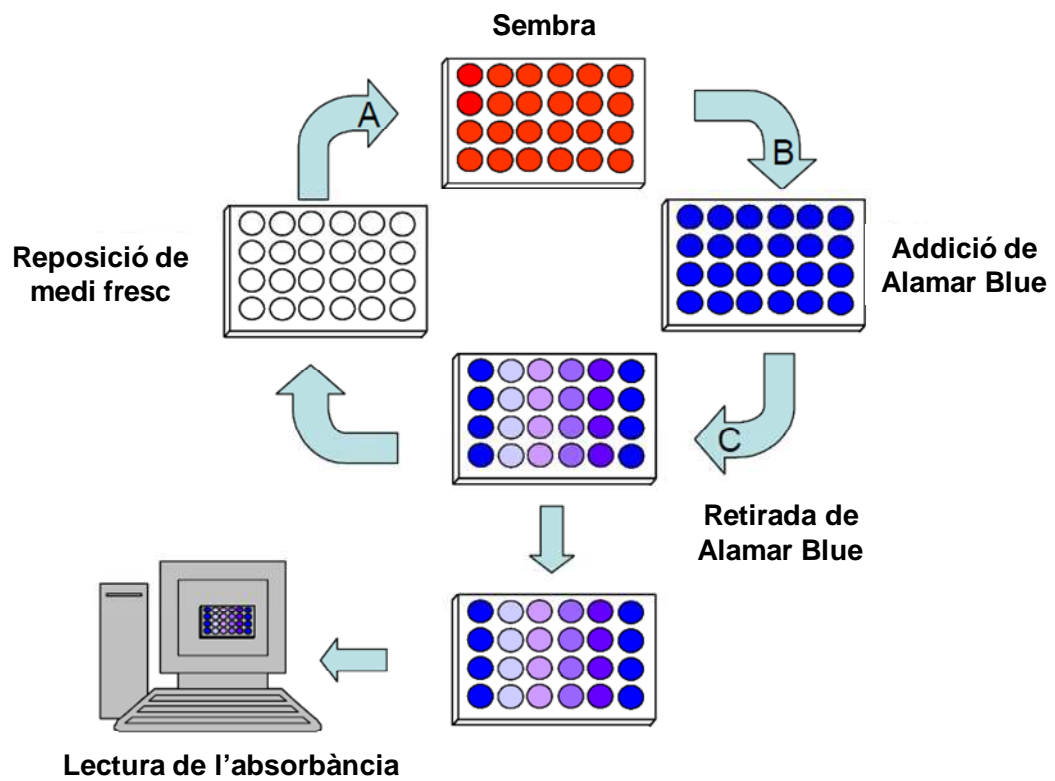


Figura 3.16. Esquema del procediment seguit en l'evolució de la proliferació cel·lular utilitzant el reactiu "Alamar Blue".

## **4. RESULTATS**

## 4.1. CARACTERITZACIÓ DE LA HIDROXIAPATITA

### 4.1.1. Espectroscòpia d'infraroig

A la (Figura 4.1) es mostra l'espectre d'infraroig obtingut per la mostra de HA comercial.

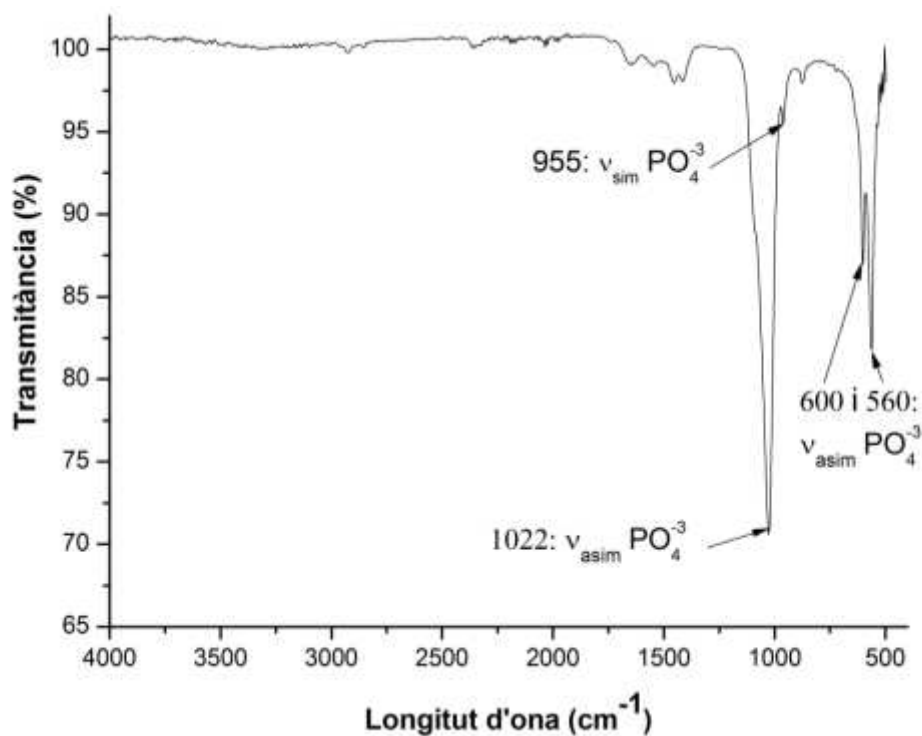


Figura 4.1. Espectre infraroig de la HA.

En aquest espectre es pot apreciar clarament la banda més important de la hidroxiapatita, és a dir, la banda de vibració del grup fosfat: 1022 cm<sup>-1</sup>. Aquesta freqüència correspon a la tensió antisimètrica del grup fosfat. A més a més també es pot identificar la banda associada a la tensió simètrica del grup fosfat: 950 cm<sup>-179</sup>.

### 4.1.2. Microscòpia Electrònica de Rastreig.

A la (Figura 4.2) es mostren dues microfotografies MER de la HA abans de ser incorporada al ciment ossi.

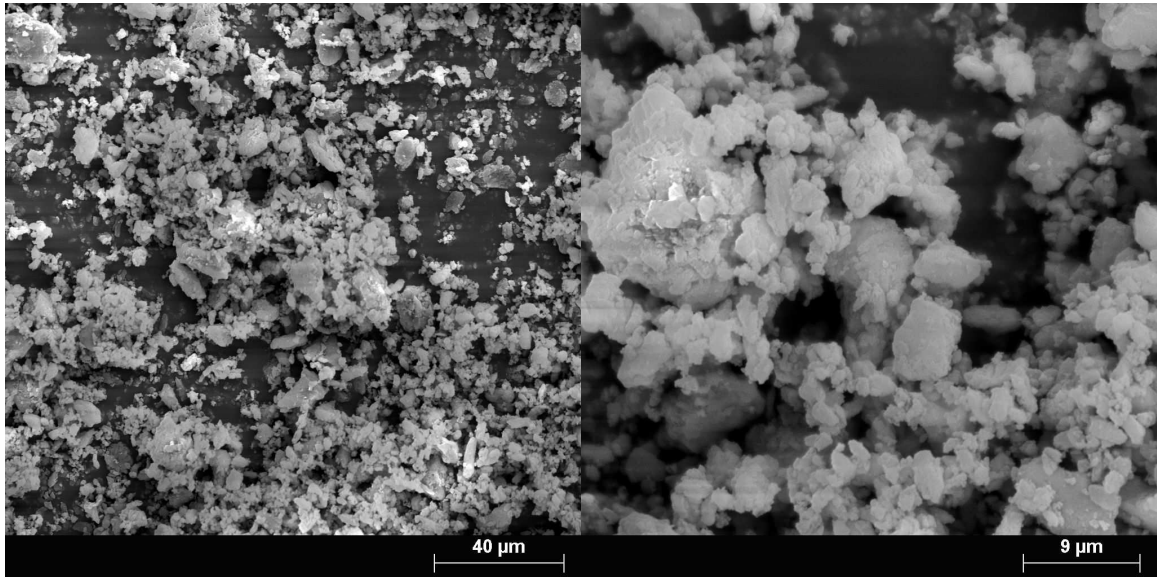


Figura 4.2. Microfotografia de HA a diferents grau d'amplitud.

Es pot evidenciar la molt petita mida que tenen les partícules de HA que frega l'escala nanomètrica.

### 4.1.3. Anàlisi Elemental (EDX)

A la (Figura 4.3) es mostra l'espectre EDX de la mostra de HA. En ell es pot observar la presència del pic de fòsfor (P) i la del calci (Ca) que justifiquen l'existència com a mínim de grups fosfat. En (l'apartat 9.5) es recullen les tres mesures preses de la HA.

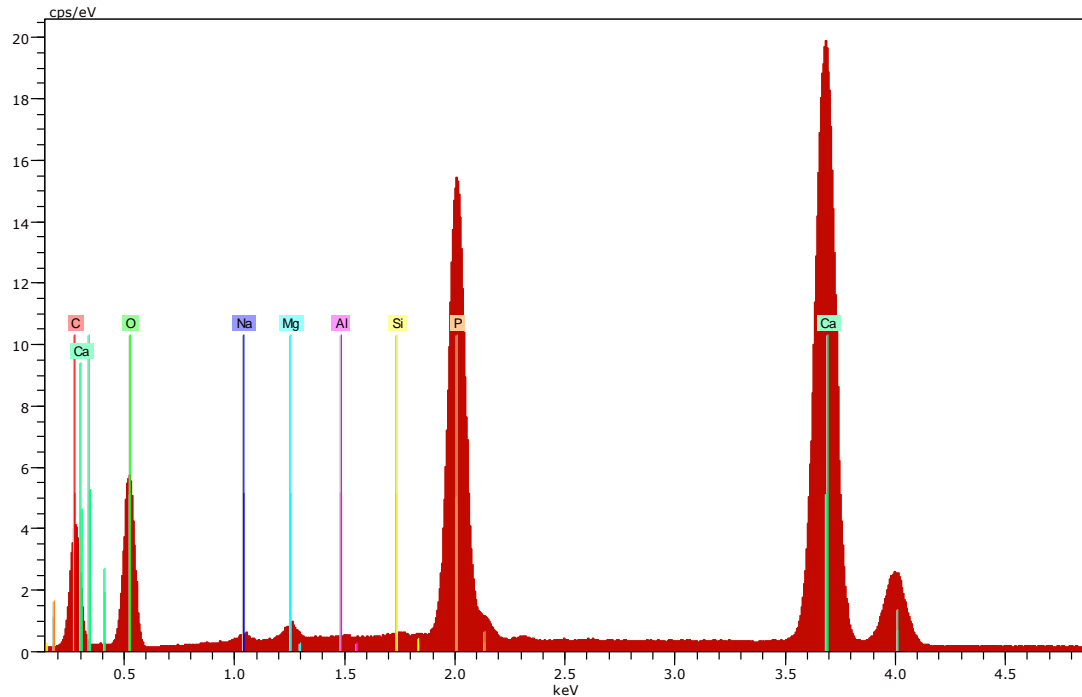


Figura 4.3. Espectre anàlisi elemental de la HA.

## 4.2. OBTENCIÓ DE CEMENTS OSSIS

Els ciments ossis preparats en aquest treball s'han obtingut aplicant una relació sòlid-líquid de 2:1 (p/p). Com a fase líquida s'ha emprat el monòmer MMA i l'activador BZN de la reacció de polimerització. En canvi, com a fase sòlida s'ha utilitzat el polímer PMMA, el biomaterial ceràmic HA i l'iniciador BPO. La finalitat d'aquest treball ha estat avaluar les propietats de curat, propietats mecàniques i de biocompatibilitat dels ciments ossis obtinguts a partir de la modificació de diferents quantitats de PMMA per HA. Amb aquestes caracteritzacions es pretén donar resposta a l'objectiu principal d'aquest projecte, que es centra en l'obtenció d'un material híbrid PMMA-HA que mantingui raonablement les propietats mecàniques del PMMA, però que incrementi la seva biocompatibilitat. Les quantitats de HA substituïdes respecte el PMMA en pes han estat un 5, 15 i 25%. La nomenclatura utilitzada per dur a terme la part experimental ja ha estat detallada en (apartat 3.3.2).



### 4.2.1. Paràmetres de curat

A la (Taula 4.1) s'especifiquen els diferents paràmetres de curat, temperatura màxima de curat ( $T_{m\grave{a}x}$ ) i el temps d'enduriment ( $t_e$ ) juntament amb el seu valor de desviació estàndard, que s'han obtingut amb les diferents formulacions. Es pot apreciar que per tots els casos modificats amb HA la temperatura màxima és inferior al valor del control de PMMA.

Taula 4.1. Resultats paràmetres de curat.

Formulació	$T_{m\grave{a}x}$ (°C)	Desviació estàndard ( $T_{m\grave{a}x}$ )	$t_e$ (min)	Desviació estàndard ( $t_e$ )
HA 0%	75,6	2,5	8,7	0,5
HA 5%	68,1	2,1	7,8	1,7
HA 15%	70,3	1,5	7,6	1,1
HA 25%	68,4	0,9	9,3	0,5

### 4.2.2. Absorció d'aigua i Pèrdua de pes

A la (Figura 4.4) s'observa l'evolució del grau d'hidratació, en tant per cent, respecte el temps immersió en solució biològica simulada (solució Kokubo's).

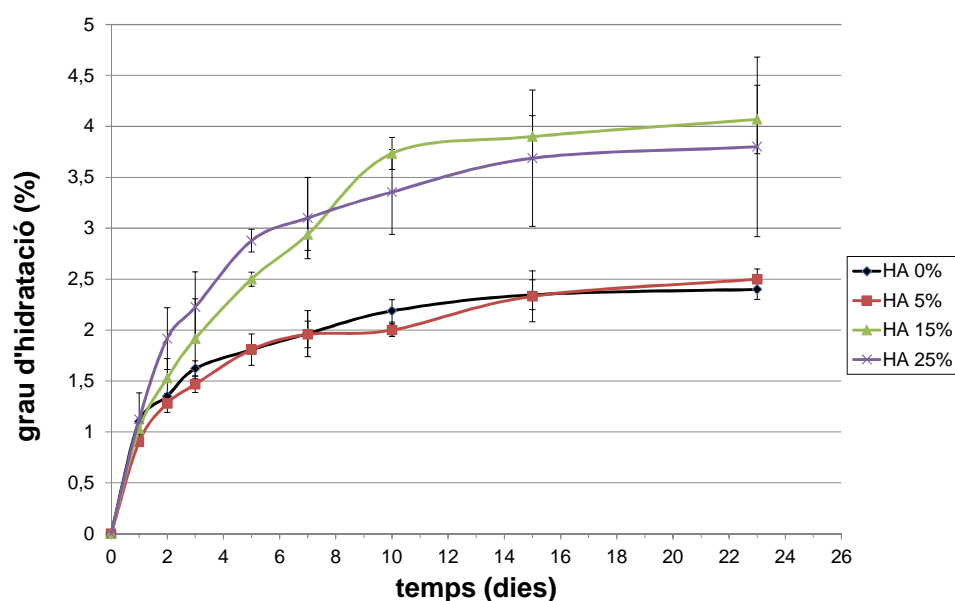


Figura 4.4. Perfil d'absorció d'aigua respecte el temps.

L'existència de majors quantitats de HA a l'estructura del ciment condiciona major capacitat d'absorció d'aigua durant el temps d'assaig.

A la (Figura 4.5) es representa la pèrdua de pes vs el temps.

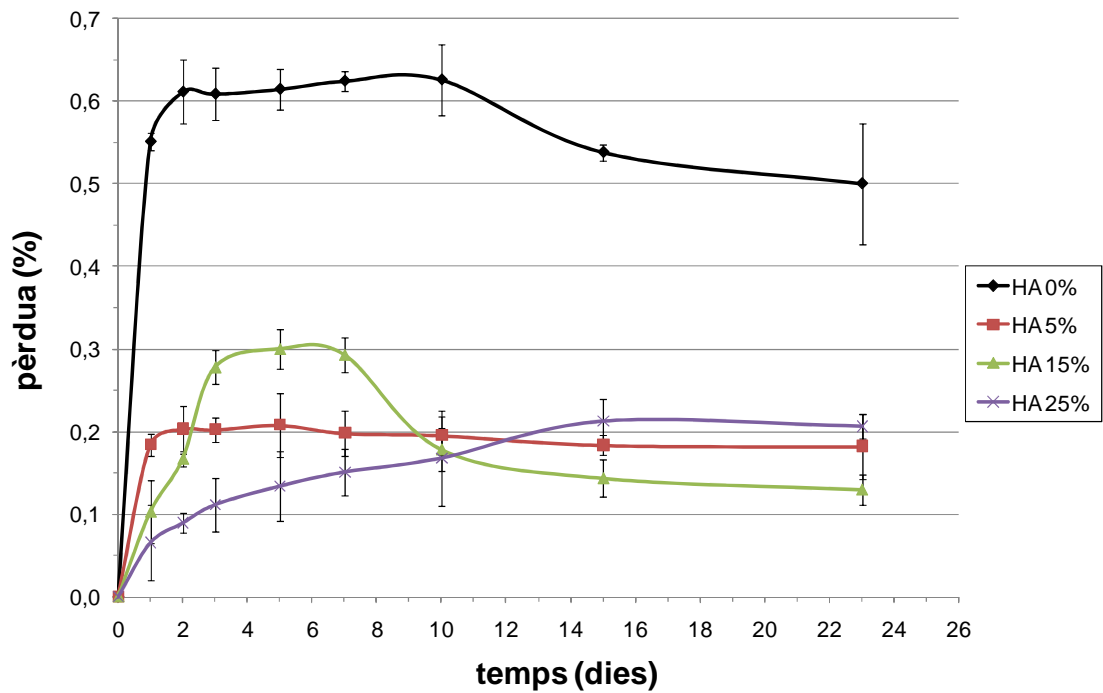


Figura 4.5. Gràfica de la pèrdua de pes respecte del temps.

Malgrat els perfils mostren una lleugera pèrdua de pes aquesta no serà considerada a causa de el limitat del seu valor nominal.

### 4.2.3. Compressió

A la (Figura 4.6) es mostren els valors obtinguts de resistència per l'assaig de compressió. En el gràfic s'hi representen els valors en sec (sense immersió en el fluid fisiològic simulat) i transcorreguts 15 dies en solució Kokubo's a 37°C i pH 7,40.

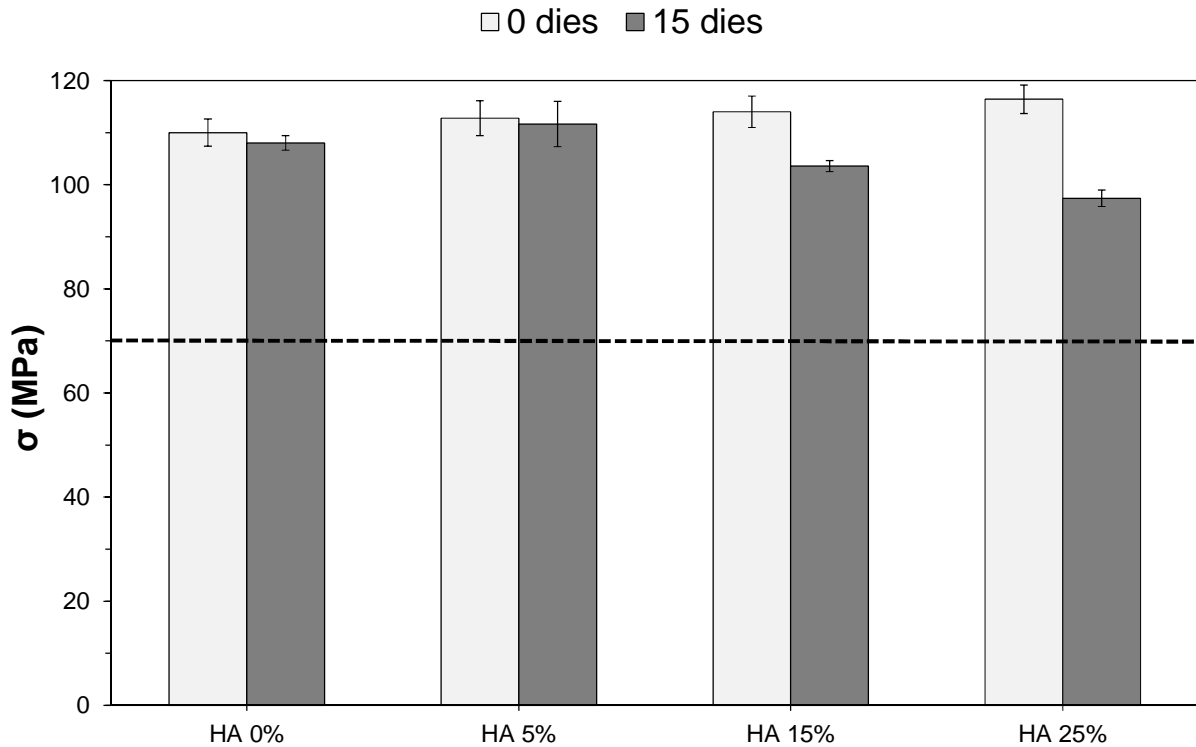


Figura 4.6. Resistència a compressió en sec i a 15 dies d'immersió.

#### 4.2.4. Espectroscòpia Infraroja (FT-IR / ATR)

A la (Figura 4.7) es representen els espectres d'espectroscòpia d'infraroig de les mostres HA 0% (proveta control feta només amb PMMA), HA 0%-23d (control en immersió durant 23 dies), HA 25% (proveta amb un 25% de HA dins la fase sòlida), HA 25%-23d (proveta amb un 25% de HA dins la fase sòlida en immersió durant 23 dies). La resta d'espectres d'infraroig de les demés formulacions es recullen a (l'apartat 9.6) del capítol d'informació addicional.

En cap moment hi ha una predominança de les bandes de HA per sobre de les de PMMA.

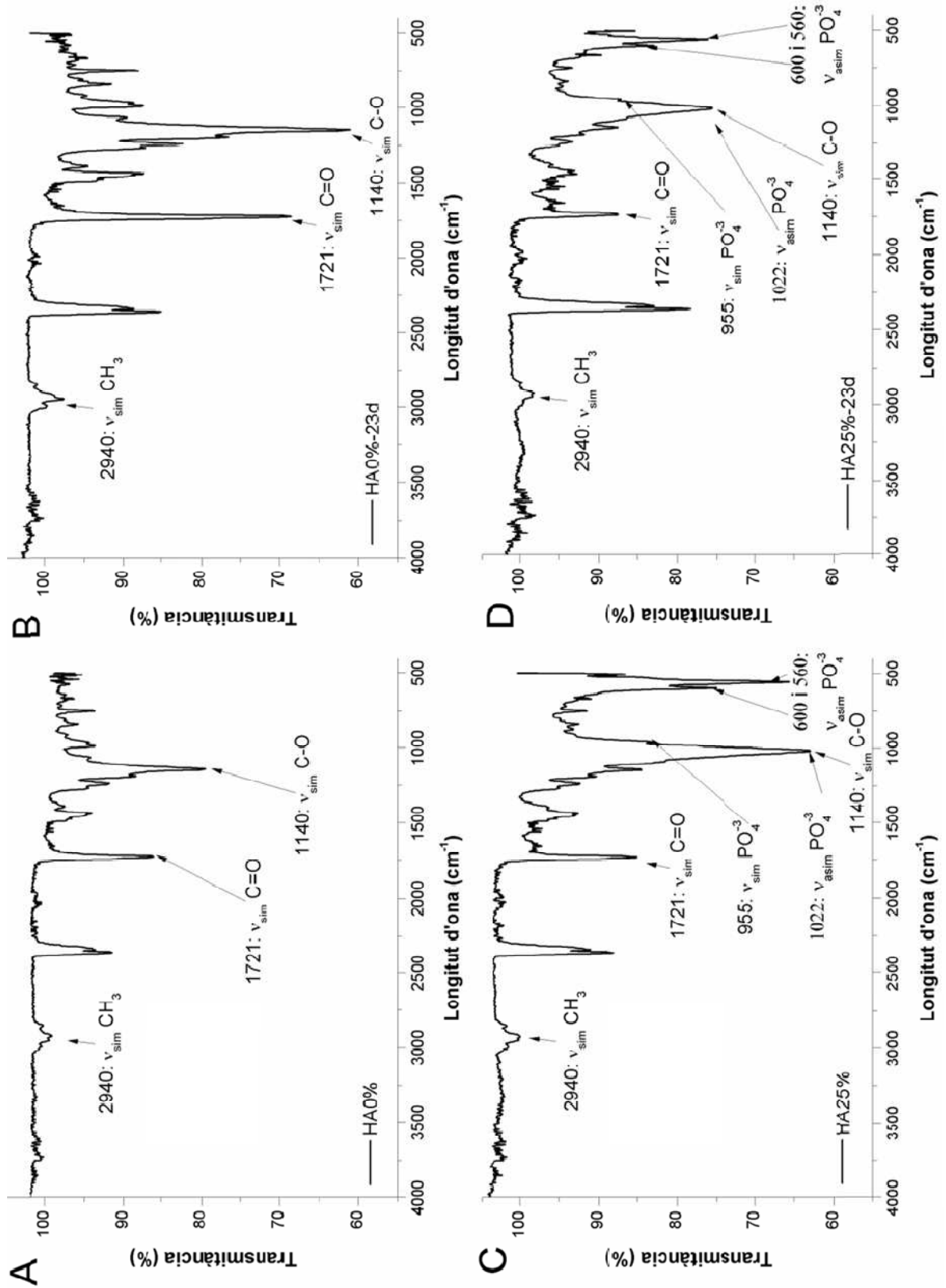


Figura 4.7. Espectres d'infraroig de diferents ciments ossis. (A)HA 0%, (B)HA 0%-23d, (C) HA 25% i (D) HA 25%-23d.

#### 4.2.5. Microscòpia electrònica de rastreig (MER)

A les figures (Figura 4.8) i (Figura 4.9) es mostren les microfotografies dels ciments ossis, HA 0% i HA 25% respectivament, sense immersió i al cap de 23 dies d'estar immersos en la solució de Kokubo's a 37°C.

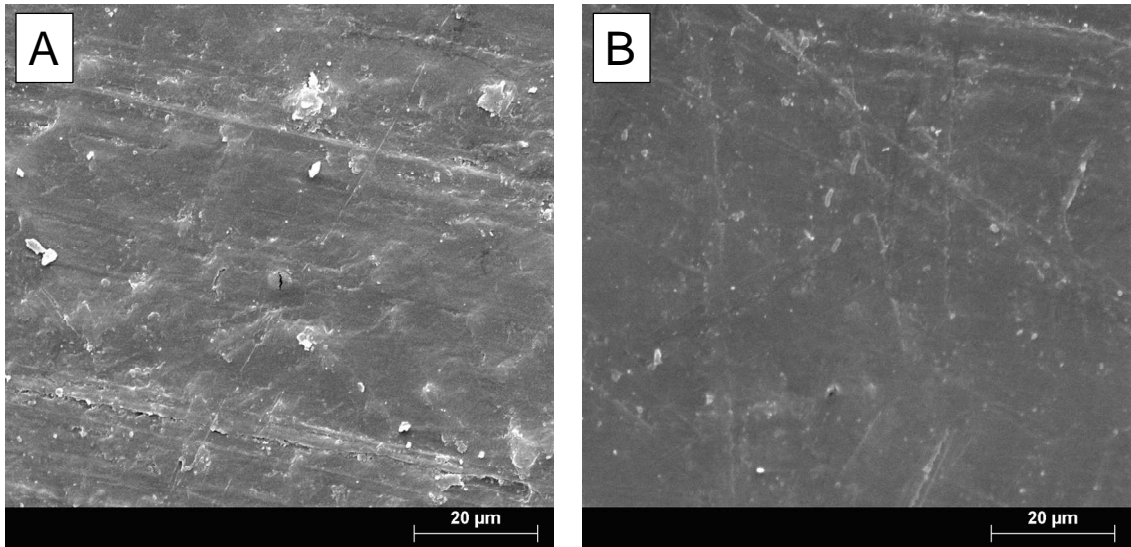


Figura 4.8. Micrografia del MER de les formulacions HA 0% (A) i HA 0%-23d (B).

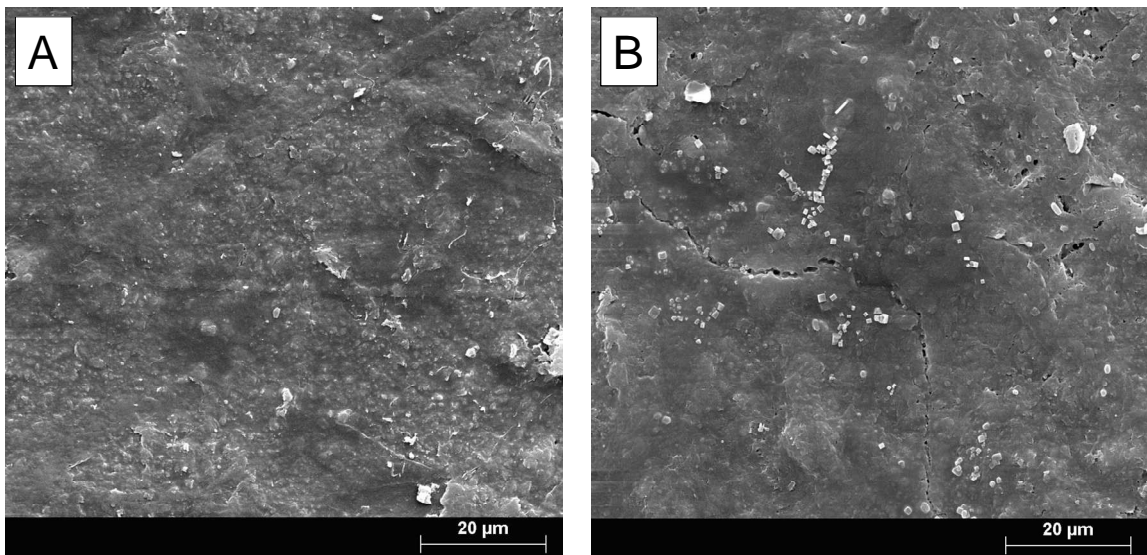


Figura 4.9. Micrografia del MER de les formulacions HA 25% (A) i HA 25%-23d (B).

#### 4.2.6. Assaig MTT

En la (Figura 4.10) es representen els resultats de l'assaig MTT per els cultius d'osteoblast humans mantinguts amb els lixiviats de 1, 2 i 7 dies obtinguts a partir de les mostres del control TMX i les formulacions experimentals. Es representa el valor mitjà de la viabilitat cel·lular relativa  $\pm$  l'interval de confiança al 95% (n=8) i el nivell de significació obtingut en l'anàlisi de la variància afectant als valors obtinguts per TMX (\*\*:p<0,01).

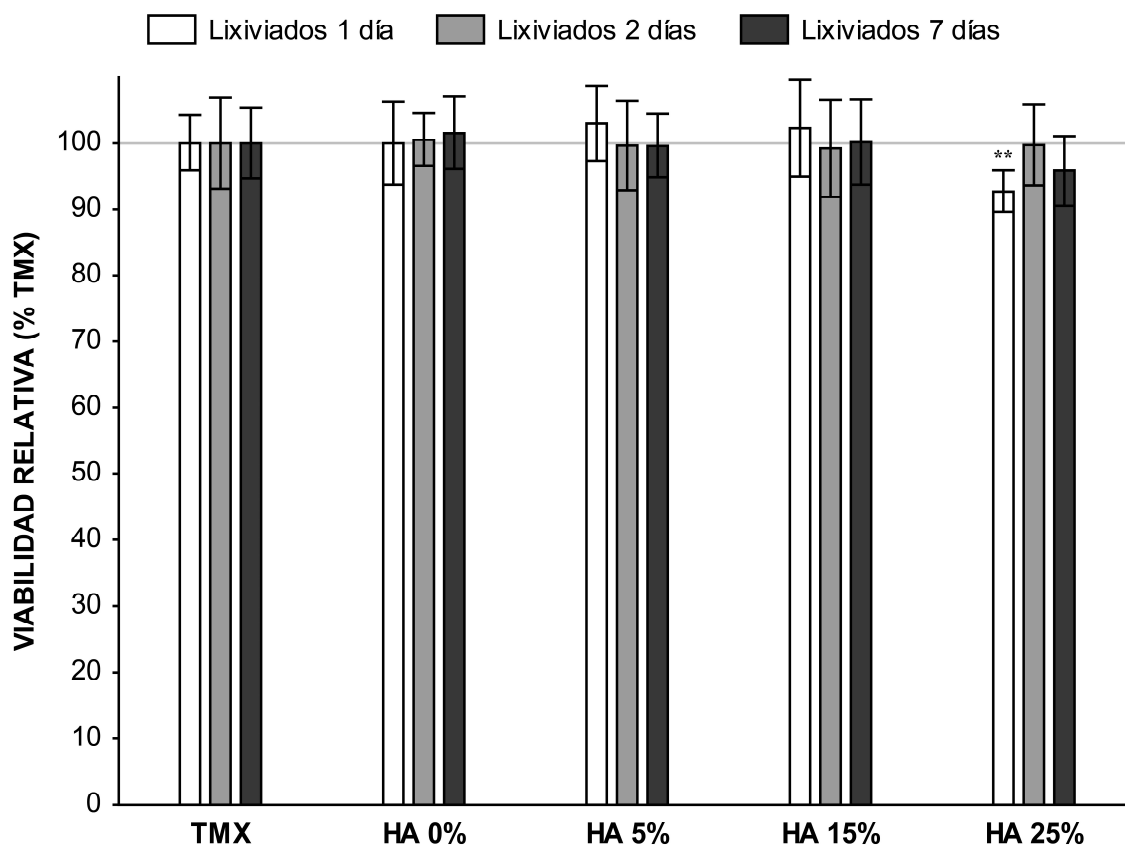


Figura 4.10. Representació gràfica dels resultats obtinguts per l'assaig MTT.

#### 4.2.7. Assaig "Alamar Blue"

En la representació gràfica (Figura 4.11) s'observen els resultats de l'assaig "Alamar Blue"<sup>TM</sup> per els cultius d'osteoblast humans sembrats sobre el control de TMX i les formulacions estudiades. Es representa la mesura  $\pm$  l'interval de confiança al 95% (n=16) i el nivell de significació obtingut en l'anàlisi de la variància efectuat comparant els valors obtinguts per els cultius

semmrats sobre les mostres de HA 5%, HA 15% i HA 25% davant als valors obtinguts per els cultius sembrats sobre HA 0% (\*:p<0,05; \*\*:p<0,01; \*\*\*:p<0,001).

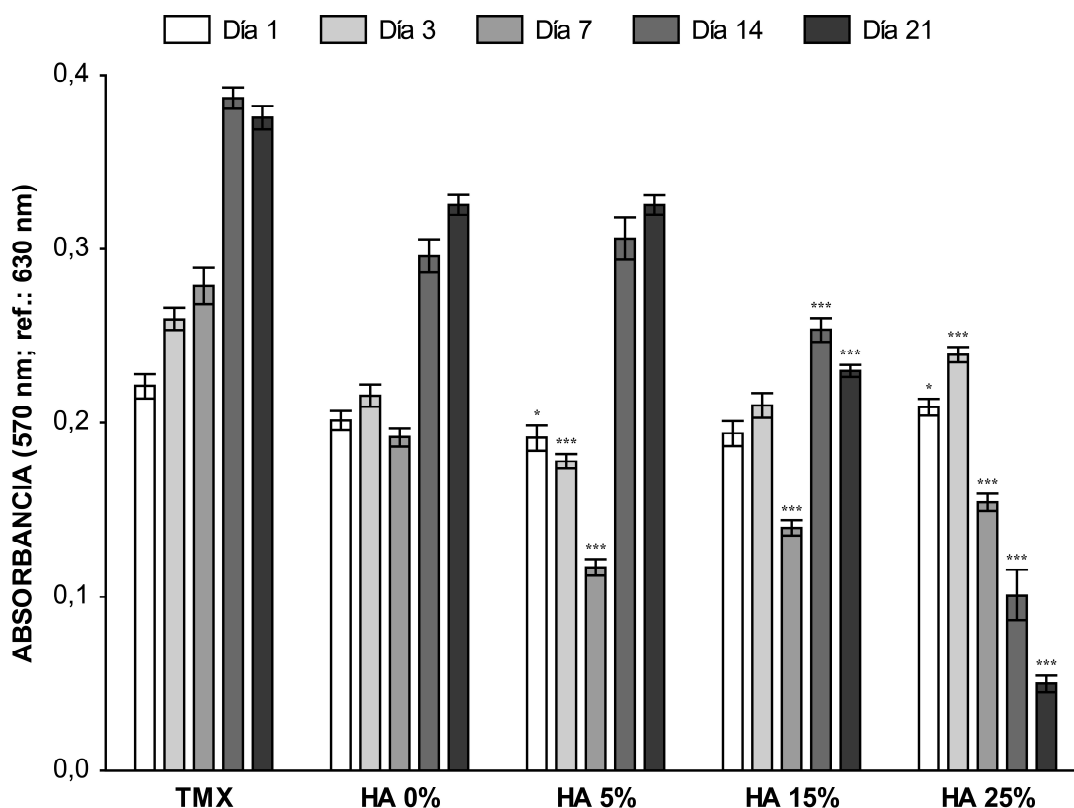


Figura 4.11. Representació gràfica dels resultats obtinguts amb l'assaig "Alamar Blue"<sup>TM</sup>.

#### 4.2.8. Anàlisi dels cultius sembrats sobre la superfície dels materials

Les superfícies dels ciments ossis sembrats amb osteoblasts han estat avaluades mitjançant la microscòpia electrònica de rastreig. En la (Figura 4.12) s'observa una microfotografia a 1000 augments d'un cultiu d'osteoblasts humans en el cultiu negatiu de Termanox®. Mentre que a la (Figura 4.13) es presenten uns resultats que concorden perfectament amb els obtinguts a l'assaig "Alamar Blue".

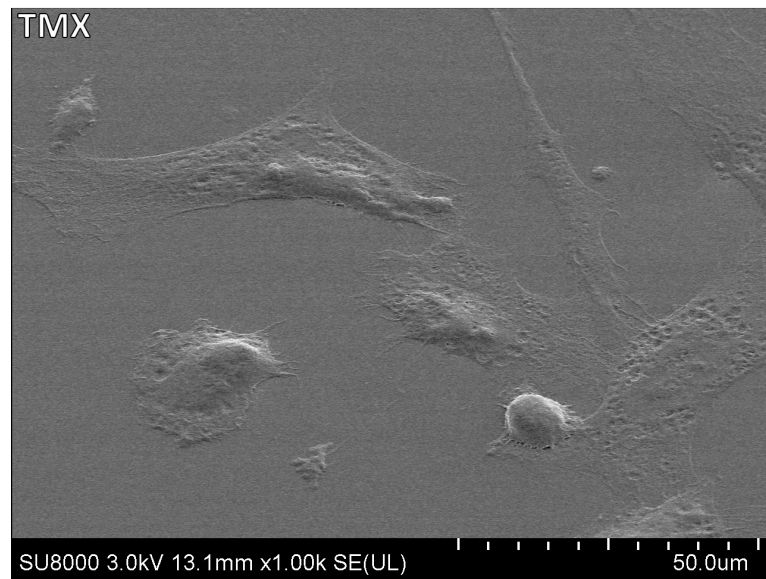


Figura 4.12. Cultiu de 24h d'osteoblasts humans sembrats sobre la superfície de TMX.

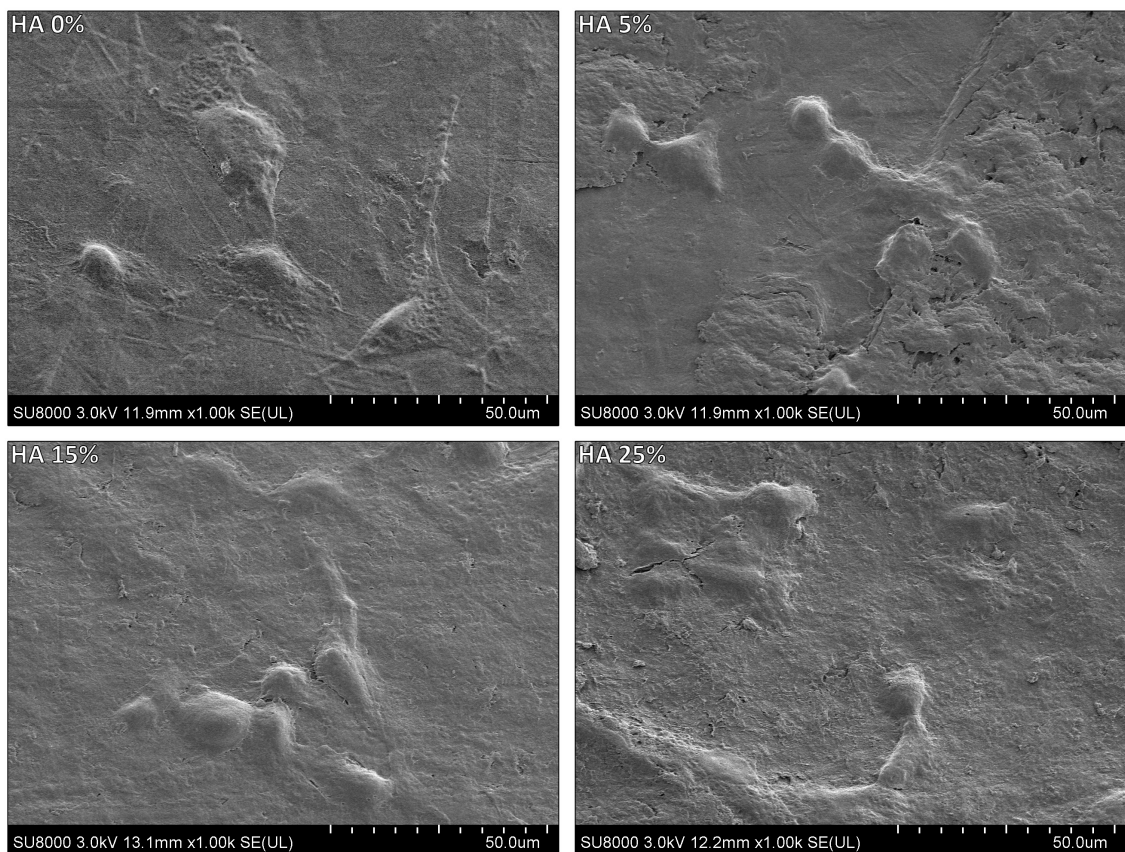


Figura 4.13. Microfotografies dels cultius d'osteoblasts humans al cap de 24h de ser sembrats sobre la superfície dels diferents ciments ossis.



A continuació a les figures: (Figura 4.14), (Figura 4.15) i (Figura 4.16) es mostren unes microfotografies ampliades de les superfícies dels ciments ossis, HA 5%, HA 15% i HA 25% respectivament, sembrats amb cèl·lules d'osteoblasts i cultivats durant un període de 24h.

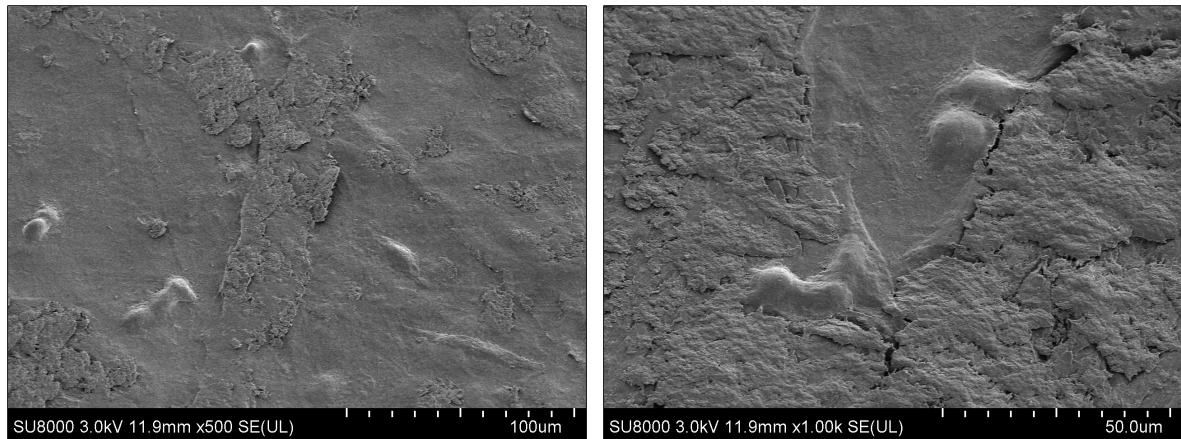


Figura 4.14. Ampliació de la superfície del ciment ossi HA 5%.

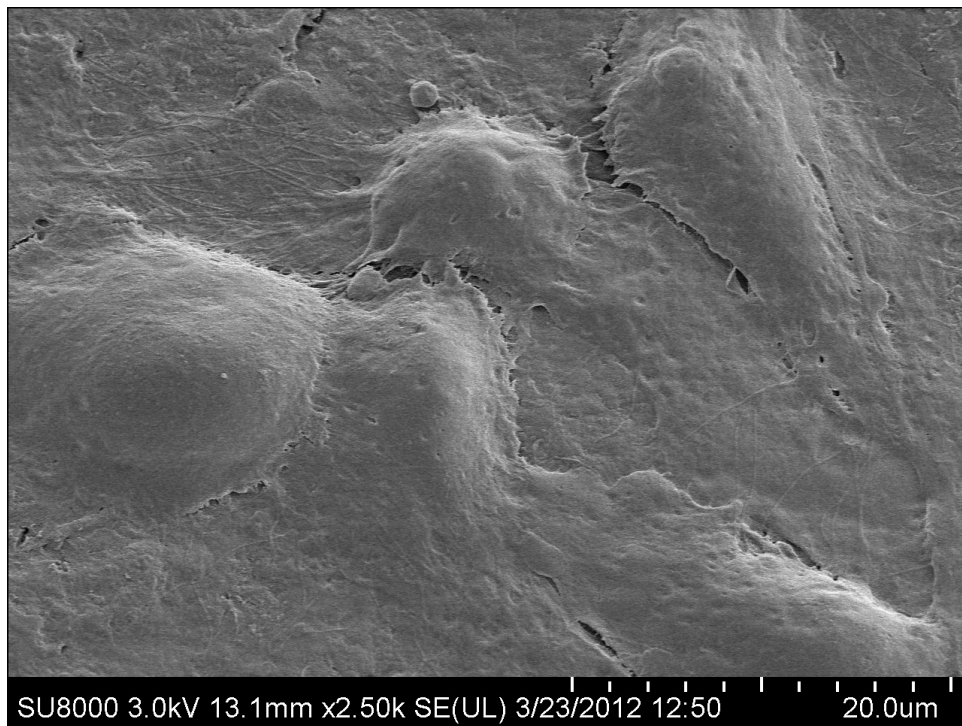


Figura 4.15. Ampliació de la superfície del ciment ossi HA 15%.

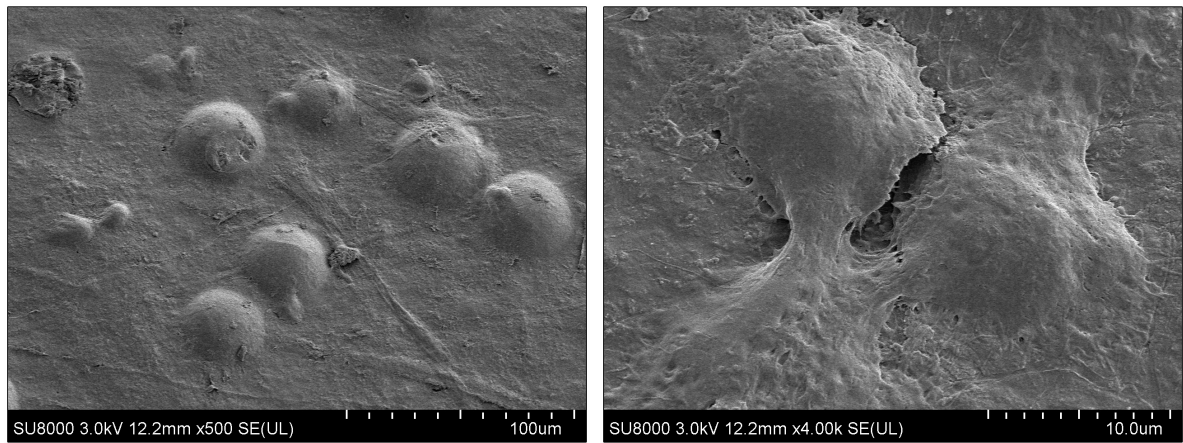


Figura 4.16. Ampliació de la superfície del ciment ossi HA 25%.

## **5. DISCUSSIÓ**

La caracterització de la HA s'ha dut a terme utilitzant diferents tècniques tant microscòpiques com espectroscòpiques. Per una altra banda els ciments ossis acrílics han estat caracteritzats mitjançant espectroscòpia d'infraroig, microscòpia electrònica de rastreig, assaig mecànic per compressió, sistema d'avaluació dels paràmetres de curat i la biocompatibilitat.

Tal i com mostren els espectres de espectroscòpia d'infraroig la hidroxiapatita d'origen animal és anàloga a la hidroxiapatita sintètica, al menys des d'un punt de vista químic. Per una altra banda, considerant el grau de cristal·linitat, no podem concloure si el material d'origen animal és més cristal·lí o no, donat que no s'ha considerat realitzar els corresponents assaigs de difracció de raig X, ja que no ens aporten més informació per assolir l'objectiu del projecte.

Una segona apreciació de la caracterització de la hidroxiapatita ens permet observar que la mida de partícula que s'afegeix al ciment és molt petita i cau dins del que podríem anomenar nanoescala. A priori cap preveure que aquesta mida ens permetrà millorar les propietats mecàniques del material o al menys no perdre-les, respecte al material control, a causa d'una hipotètica incompatibilitat fisico-química.

La tècnica de MER-EDX ens ha permès fer un anàlisi elemental de la mostra de HA procedent de la font animal. A la (Figura 4.3) es mostra l'espectre EDX de la mostra de HA. En ella es pot veure que el pic de fòsfor (P) representa un 7,71% i el de calci (Ca) un 13,85%. A partir d'aquestes dades el que se'n deriva és que la relació Ca/P és de 1,79, lleugerament superior a la de la HA "de l'os humà" que és 1,66. Aquest resultat no descarta de cap manera que la matèria primera sigui HA, ja que aquesta tècnica es considera molt qualitativa en lloc de quantitativa. En el cas que fos estrictament necessari conèixer el valor de la relació Ca/P la tècnica més adequada seria la difracció de raig X, la qual no ha estat proposada en aquest projecte. De qualsevol manera la mostra original presenta les característiques intrínseques de la HA: 1) presència de grups fosfat segons FT-IR i 2) justificació d'aquest a través de la confirmació elemental (MER-EDX).

Ja ficats a la caracterització dels ciments ossis acrílics, la normativa ISO 5833<sup>17</sup> suggereix una temperatura màxima de curat de 90°C per tal de minimitzar els efectes necròtics del teixit que envolta la zona a tractar amb dit ciment ossi<sup>80</sup>. En aquest cas, tant per la formulació control, HA 0%, com les modificades amb HA s'obtenen uns valors experimentals de temperatura màxima inferior a 90°C. Aquests valors són un resultat favorable ja que permet la utilització d'aquests materials independentment del contingut modificat amb HA. La disminució de la  $T_{màx}$ , respecte a la formulació control (HA 0%) es deu a la incorporació de partícules, no solubles durant el procés de curat, les quals actuen com una barrera a la transmissió de calor durant el procés de

polimerització, dissipant així l'energia produïda i provocant la corresponent disminució de  $T_{m\grave{a}x}$ . Aquest fet és comú al que altres autors han observat quan modificaven la formulació convencional amb partícules no solubles en el MMA durant el curat<sup>82</sup>.

El temps d'enduriment d'un ciment ossi també està regulat per la norma ISO 5833<sup>17</sup>. Aquest valor ha de ser un temps inferior a 15 minuts. Tal i com es pot observar a la (Taula 4.1) totes les formulacions tenen un  $t_e$  que oscil·len entre els 8 i 10 minuts. Aquesta disminució del temps de factors positius, però també negatius. Des del punt de vista positiu, cap esperar que el material es torni rígid més ràpidament conforme disminueix el temps d'enduriment. Això disminueix el temps d'intervenció quirúrgica. Per una altra banda, aquesta acceleració del procés de curat disminueix el temps del que disposarà el cirurgià per tal de reduir el trauma a tractar. Evidentment s'ha d'arribar a un equilibri d'actuació i aquest es més favorable cap a la reducció del temps de curat, ja que si es vol induir un temps més llarg l'actuació seria mitjançant la incorporació d'una petita quantitat superior de fase líquida, fet que ja es desenvolupa a la pràctica clínica.

La naturalesa hidrofòbica dels components dels ciments ossis convencionals, particularment la del PMMA com a matriu polimèrica, condueix a valors d'absorció d'aigua molt limitats. Aquest és el cas de la formulació HA 0% mostrada a la (Figura 4.4). Aquesta absorció d'aigua no es superior al 2,5% en pes i es atribuïda a la mancança de funcionalitat hidrofílica d'aquest polímer. Per contra, la incorporació de la HA com agent de reforç inorgànic, ha donat com ha resultat valors lleugerament superior d'absorció d'aigua atribuïts a dos efectes majoritàriament: 1) naturalesa iònica de l'enllaç a la HA i 2) la parcial incompatibilitat química d'aquest component amb el PMMA. L'existència d'un enllaç purament iònic a la HA confereix a aquest material capacitat d'interacció amb molècules polars com és el cas de l'aigua. Aquesta interacció promou l'absorció d'aquestes molècules sobre l'estructura de la HA, modificant així la polaritat del material obtingut. Per una altra banda, la diferència d'estructura química del PMMA i la HA permet l'estabilitat d'interfases no adherides entre aquests components, sent aquestes vies de percolació d'aigua, i conseqüentment d'hidratació del material. Si ens remetrem a la (Figura 4.4) podem observar que la formulació HA 5% no té prou quantitat de HA com per modificar la hidrofília del material. En canvi, valors de composició del 15 i del 25% sí condicionen majors entrades d'aigua al material i conseqüentment graus d'hidratació superiors. Atenent ara la (Figura 4.5) relacionada amb la pèrdua de pes, es pot observar que les pèrdues són mínimes en comparació altres materials constituïts per polímers biodegradables, àmpliament reportades a la bibliografia<sup>81,82</sup>. La nul·la solubilitat de la HA en medis aquosos també es veu reflectida en l'assaig de pèrdua de pes ja que les mostres tenen una pèrdua de

pes inferior al 1% (Figura 4.5). Aquest valor de pèrdua de pes es deu majoritàriament al procés de rentat superficial que pateixen les provetes al inici de ser immerses en la solució Kokubo's.

En general, els espectres d'FT-IR aclareixen la presència de HA en els ciments ossis i al mateix temps mostren que no es produeix cap reacció durant el procés de polimerització entre la HA i la matriu polimèrica. No hi ha una diferència significativa en la relació entre banda del grup carbonil del PMMA i la del grup fosfat durant el temps d'immersió en la solució Kokubo's. Aquest resultat respon a dos efectes: 1) no hi ha solubilització de la HA en el medi tamponant i 2) no hi ha creixement induït de nova hidroxiapatita al medi. Aquestes dues afirmacions van emparellades, ja que per tal que hi hagi un creixement de hidroxiapatita sobre el material, doncs primer s'ha de tenir una font dels seus ions al medi aquos. Si no hi ha solubilització d'aquest component difícilment hi haurà reprecipitació a sobre del material. Per tant, aquests materials no es poden considerar com a osteogeneradors, en contraposició a aquells modificats amb vidres bioactius, parcialment solubles en el medi, que indueixen el creixement de HA a la superfície del material<sup>26</sup>.

Normalment la capacitat osteogenerativa va associada a la solubilització dels vidres bioactius al medi per tal de reprecipitar a sobre del material com a HA. Aquest procés comporta una pèrdua substancial de propietats mecàniques, ja que hi ha pèrdua de material i conseqüentment de resistència mecànica. La principal funció d'un ciment ossi per poder ser utilitzat en cirurgia ortopèdica com a material de fixació entre la pròtesis i l'os, és la de millorar la distribució de càrregues entre ells, augmentant la superfície de contacte i evitant la concentració de tensions. Un paràmetre que està regulat per la norma ISO-5833<sup>17</sup> és el valor de resistència màxima a compressió ( $\sigma_c$ ). La norma informa que el valor mínim de  $\sigma_c$  és de 70 MPa. Tal i com es detalla a la (Figura 4.6) la incorporació de HA substituint part de PMMA ha aportat uns valors de  $\sigma_c$  superiors a la formulació control (HA 0%) i fins i tot superiors a 70 MPa. A més, cal recalcar que la immersió de les provetes, durant 15 dies en la solució Kokubo's a 37°C, no ha provocat una disminució sobtada de la resistència a compressió, ja que fins i tot en aquest cas els valors de  $\sigma_c$  són superior a 70 MPa. Aquest fet es deu a la nul·la solubilitat de la HA en el medi, fet que ja ha estat observat anteriorment mitjançant l'assaig d'absorció d'aigua.

La microscòpia MER de la superfície dels materials a diferents temps d'immersió justifica tot el ja argumentat: no hi ha una modificació substancial de la superfície del material ja que no hi ha pèrdua de matèria a aquest nivell. Evidentment el PMMA no es soluble en aigua i tal i com ja s'ha demostrat anteriorment la HA tampoc, al menys al pH assajat a aquest projecte. Tots aquest resultats permeten acceptar aquest materials com a viables tècnicament per aplicacions al cos a llarg termini.

Per últim, i una vegada confirmada la viabilitat tècnica dels materials s'ha de determinar la seva viabilitat biològica. Amb la finalitat d'avaluar la biocompatibilitat dels materials es realitzen diferents assajos. El primer de tots consisteix en avaluar la citotoxicitat dels mateixos mitjançant l'assaig de MTT. Tal i com s'observa en la (Figura 4.10), només s'obtenen diferències significatives respecte al control negatiu TMX per els lixiviats obtinguts després de 24 hores. Totes les mostres ofereixen un comportament molt semblant al del control negatiu, el que indica la nul·la toxicitat dels lixiviats procedents d'aquests materials.

Així doncs, es pot arribar a la conclusió que els lixiviats obtinguts durant un període de 7 dies (a 1, 2 i 7 dies), a partir de les mostres de tots els sistemes experimentals estudiats, no resulten tòxics per al cultiu d'osteoblasts utilitzats com a model.

El segon assaig de biocompatibilitat és l'assaig "Alamar Blue", on els resultats mostren, en primer lloc, que l'activitat cel·lular dels cultius establerts sobre la totalitat de les formulacions experimentals és significativament inferior a la obtinguda sobre les mostres del control negatiu TMX al llarg dels 21 dies que dura l'experiment. Aquest descens en l'activitat cel·lular és d'una magnitud notable únicament en els cultius mantinguts durant 14 i 21 dies sobre les mostres de la formulació més rica en hidroxiapatita (HA25%) (Figura 4.11).

Quan els resultats obtinguts per els sistemes portadors de hidroxiapatita (HA) es comparen amb els obtinguts pel ciment control, destaca en primer lloc que l'evolució en l'activitat cel·lular dels cultius estudiats depèn precisament de la proporció de la HA carregada.

Així, el sistema anomenat HA 5% mostra un descens significatiu en l'activitat cel·lular fins el setè dia respecte al ciment sense càrrega, per posteriorment arribar als 14 i 21 dies uns nivells d'activitat cel·lular que no difereixen significativament dels medis per el sistema HA 0%.

Pel contrari, per el sistema més ric en HA, HA 25%, s'han mesurat valors d'activitat cel·lular a 1 i 3 dies significativament superiors als medis per el ciment sense càrrega, i pròxims als obtinguts per el control TMX; passant a partir del setè dia a mesurar valors significativament inferiors als obtinguts per la HA 0%.

Per acabar, el sistema anomenat com HA 15% mostra un comportament entremig entre els dos anteriors (HA 5% i HA 25%), que es caracteritza per la no aparició de diferències significatives respecte al sistema sense càrrega HA 0% en les mesures realitzades a 1 i 3 dies. Diferències que si que apareixen en les mesures portades a terme al cap de 7, 14 i 21 dies; si bé el descens en l'activitat cel·lular per aquest últim sistema a 14 i 21 dies és d'una magnitud molt inferior a la observada per el sistema anomenat HA 25%.

El notable descens en l'activitat cel·lular mostrat en les mesures de tots els ciments que porten HA a 7 dies cal destacar i sembla no ser el mateix factor en els tres sistemes. Cal esperar que en la HA 5% podria ser fenomen de descens en l'activitat que s'arrossega des de el dia de la sembra (i posteriorment s'inverteix). En HA 25% suposaria el començament de l'acusat descens que es manifesta en la segona meitat del període estudiat en aquest assaig. Finalment, el comportament de la formulació HA 15% es trobaria enmig del manifestat per la HA 5% i la HA 25%, essent en aquest cas el descens mesurat a 7 dies menys acusat. Tot aquest argument podria quedar justificat de la següent manera: Les formulacions HA 15% i HA 25% presenten una elevada proliferació cel·lular significativament superior a la mostrada per HA 0% i HA 5%, argumentant que la presència de HA indueix la proliferació cel·lular. Aquesta superior proliferació pot condicionar una elevada població de cèl·lules que consumiran més ràpidament els recursos alimentaris del cultiu. Així al cap de 14 dies aquest recursos han disminuït més dràsticament que el cas de les formulacions HA 0% i HA 5% i comença a desencadenar-se una mortalitat cel·lular més aguda. Això justificaria la mortalitat associada a HA 15% i molt més acusadament a HA 25%. Evidentment en un entorn cel·lular "in vivo" aquesta mancança alimentària no es donaria i provocaria un increment progressiu de teixit que envolta el implant.

Tal i com es pot observar en les microfotografies de la (Figura 4.13) a la superfície de totes les formulacions, les cèl·lules de osteoblasts estan perfectament adherides, i amb una densitat de població molt similar a la dels cultius de Termanox® a la (Figura 4.12). A partir de només una mostra de cada formulació no ha estat possible establir diferències, entre elles, en els valors de la densitat cel·lular.

El que si es pot arribar a destacar és que sobre la superfície del ciment ossi HA 5% (Figura 4.14) s'ha observat unes "crostes" que podrien ser compatibles amb la formació de fosfat tricàlcic. En el cas de la mostra de HA 15% (Figura 4.15) i HA 25% (Figura 4.16), no s'ha localitzat amb claredat aquestes estructures, si més no en el cas de la HA 25% ha aparegut unes estructures hemisfèriques en determinades zones de la mostra analitzada.



## **6. CONCLUSIONS**

Una vegada realitzades totes les caracteritzacions dels materials modificats amb HA cal destacar les següents conclusions:

- La incorporació de HA animal, procedent d'os de porc, limita l'exotèrmia del procés de polimerització/curat del ciment ossi acrílic. Això es relaciona amb l'establiment d'una fase inorgànica no soluble en el polímer que s'oposa a la difusió d'aquesta calor al exterior.
- L'estudi mecànic a compressió posa de manifest la millora de resistència mecànica sota aquest esforç quan el material incrementa la seva composició en HA. Aquest efecte pot estar relacionat amb la molt petita grandària que presenten les partícules de HA, la qual cau a l'escala nanomètrica. Aquesta observació es comú a un gran nombre de materials compostos reforçats amb nanopartícules, on petits percentatges de reforç incrementen les propietats dels materials.
- El caràcter iònic de la HA condiona una major capacitat d'interacció amb molècules de baix pes molecular polars, com és el cas de l'aigua. Aquesta capacitat indueix un significatiu increment en la polaritat del material final i conseqüentment una major capacitat d'absorció d'aigua. Malgrat aquest efecte, l'exposició a medis aquosos (simulant les condicions fisiològiques) no provoca una pèrdua significativa de resistència mecànica, fent extremadament viable la incorporació d'aquest agent inorgànic natural a la formulació convencional de ciment ossi acrílic.
- L'estudi de biocompatibilitat informa d'una nul·la toxicitat i una elevada capacitat d'inducció al creixement cel·lular d'osteoblast a sobre dels materials amb major contingut en HA i preferentment durant els primers dies d'implantació. Posteriorment, i a causa de l'elevada proliferació s'interpreta que el cultiu ha consumit els seus recursos alimentaris i es provoca la mort cel·lular.
- Tenint en compte tots aquests arguments i tots els resultats obtinguts es considera que no es necessari elevats percentatges de modificació amb HA, ja que amb un 5-10% s'aconsegueixen millores mecàniques, nul·la toxicitat i un creixement controlat cel·lular que pot induir una major biocompatibilitat implant-teixit humà.

## **7. PRESSUPOST**

Tota la inversió que ha sigut necessària per portar a lloc la investigació realitzada en aquest projecte es detalla amb claredat a continuació.

Per realitzar el projecte es precisa una inversió inicial en maquinària, aquesta inclou tant els equips grans (ex: FT-IR) com els aparells petits (ex: ordinador), tot equip que consumeix part d'electricitat i té temps de vida.

Per especificar el temps de vida útil, al tenir una diferència d'equips tan elevat, s'agafa un promig de 10 anys. Tenint en compte que un equip gran pot tenir una vida útil d'uns 20 anys però un ordinador aproximadament de 7 anys.

En la (Taula 7.1) es representa cada equip quin és el seu valor inicial ( $V_i$ ), el valor final ( $V_f$ ) que li correspon (considerat com un 15% del valor inicial) i l'amortització que li suposa amb una vida útil ( $V_{\text{útil}}$ ) de 10 anys.

Taula 7.1. Inversió inicial maquinària.

COST MAQUINÀRIA					
Equip i maquinària	Preu unitat (€)	Unitats	Preu màquina = $V_i$ (€)	$V_f = V_i * 15\%$ (€)	Amortització anual = $(V_i - V_f) / V_{\text{útil}}$ (€)
Agitador magnètic	300,00	1	300,00	45,00	25,50
Balança	1000,00	2	2000,00	300,00	170,00
Bany termoestatitzat	350,00	1	350,00	52,50	29,75
Bomba de buit	150,00	1	150,00	22,50	12,75
Càmera de fotos	200,00	1	200,00	30,00	17,00
Campana extractora	5000,00	1	5000,00	750,00	425,00
Estufa (37,50 i 100)°C	250,00	3	750,00	112,50	63,75
FT-IR /ATR	42000,00	1	42000,00	6300,00	3570,00
Màquina a compressió	65000,00	1	65000,00	9750,00	5525,00
Nevera (5-10°C)	300,00	1	300,00	45,00	25,50
Ordinador	550,00	1	550,00	82,50	46,75
Pistola aire calent	100,00	1	100,00	15,00	8,50
Peu de rei	85,00	1	85,00	12,75	7,23
Ph-metre (solució SBF)	250,00	1	250,00	37,50	21,25
<b>TOTAL</b>			117035,00	17555,25	9947,98

En la (Taula 7.2) es mostra l'amortització en hores tenint en compte que diàriament l'equip pot ser utilitzat per altres usuaris (8 hores al dia) o bé equips que necessiten estar en connexió les 24 hores i els 365 dies de l'any (nevera, estufa,...). Tot i això, el càlcul final es realitza només amb les hores que ha sigut necessàries la seva utilització per a realitzar el projecte.

També s'especifica en la (Taula 7.2) el interès del capital invertit on el preu del diner és de ( $r=1,25\%$ ) i el manteniment.

Taula 7.2. Descripció de l'amortització de la inversió per hores.

COST AMORTITZACIÓ									
Equip i maquinària	Amort. anual	hores/dia	dies/a ny	hores/a ny	Amort. fixa	Temps ús (hores)	Total amortització (€) = Amort. fixa*Temps d'ús	Interès capital invertit (€) = ((V <sub>i</sub> +V <sub>f</sub> )/2)*r	Manteniment (€) = (V <sub>i</sub> *0,15/ temps d'ús)
Agitador magnètic	12,75	4	240	960	0,03	8	0,21	2,16	5,63
Balança	85,00	8	240	1920	0,09	180	15,94	7,19	1,67
Bany termoestatitzat	14,88	8	240	1920	0,02	5	0,08	2,52	10,50
Bomba de buit	6,38	7	240	1680	0,01	2	0,02	1,08	11,25
Càmera de fotos	8,50	1	365	365	0,05	3	0,14	1,44	10,00
Campana extractora	212,50	4	240	960	0,44	150	66,41	35,94	5,00
Estufa (37,50 i 100)°C	31,88	24	365	8760	0,01	160	1,16	1,80	0,70
FT-IR /ATR	1785,00	8	240	1920	1,86	4	7,44	301,88	1575,00
Màquina a compressió	2762,50	8	240	1920	2,88	10	28,78	467,19	975,00
Nevera (5-10°C)	12,75	24	365	8760	0,00	2160	6,29	2,16	0,02
Ordinador	23,38	8	240	1920	0,02	270	6,57	3,95	0,31
Pistola aire calent	4,25	4	240	960	0,01	4	0,04	0,72	3,75
Peu de rei	3,61	5	240	1200	0,01	9	0,05	0,61	1,42
Ph-metre (solució SBF)	10,63	8	240	1920	0,01	2	0,02	1,80	18,75
	4973,99		<b>TOTAL</b>		5,42	2967	<b>133,14</b>	<b>830,41</b>	<b>2618,99</b>

### Fórmules

Primerament cal tenir present que el valor final ( $V_f$ ) representa el valor minoritari de la màquina una vegada a transcorregut la seva vida útil ( $V_{\text{útil}}$ ) considerada de 10 anys. El valor final s'ha considerat com un 15% del valor inicial ( $V_i$ ) (Eq. 7.1).

$$V_f = V_i \times 15\% \quad \text{Eq. 7.1}$$

Per realitzar el càlcul de la amortització total, primer de tot s'ha de realitzar el càlcul de la amortització anual, cal seguir l'equació (Eq. 7.2).

$$\text{Amortització anual} = \frac{V_i - V_f}{V_{\text{útil}}} \quad \text{Eq. 7.2}$$

Tot seguit, després de realitzar una inversió en maquinària es considera una partida de costos relacionada amb la "no obtenció" dels interessos degut al capital invertit, implantat amb el número d'hores de utilització de la maquinària. Per realitzar aquest càlcul, i tenint en compte que el cost del diner és de ( $r=1,25\%$ ) cal seguir l'equació (Eq. 7.3).

$$\text{Interès capital invertit} = \frac{V_i + V_f}{2} \times r \quad \text{Eq. 7.3}$$

Tot seguit es mostra una taula (Taula 7.3) amb tot el material utilitzat durant el procés de la realització de la part experimental tenint en compte les unitats necessàries per aquest procés.

Taula 7.3. Cost del material utilitzat.

<b>MATERIAL</b>			
<b>Material</b>	<b>Preu unitat (€)</b>	<b>Unitats</b>	<b>Preu total (€)</b>
Alicates	65,00	1	65,00
Ampolla plàstic 1L (SBF)	15,00	1	15,00
Espàtula	20,00	3	60,00
Guants	0,10	300	30,00
Llima	12,00	2	24,00
Martell	25,00	1	25,00
Matràs aforat (1L)	30,00	1	30,00
Mosques	2,50	6	15,00
Motlles ciments (tot el conjunt)	20,00	8	160,00
Paper laboratori	12,00	1	12,00
Pera	5,00	1	5,00
Pinces	7,00	1	7,00
Pipeta 20 mL (HCl)	25,00	1	25,00
Pipeta aforada 20 mL (SBF)	35,00	1	35,00
Pot de plàstic (f.sòlida)	0,05	10	0,50
Pot de vidre (f.líquida)	0,55	10	5,50
Recipient de vidre (SBF+provetes)	1,50	50	75,00
Termòmetre	45,00	1	45,00
Tubs de goma	0,02	15	0,30
Suport ciment (peu)	65,70	1	65,70
Tamís	35,00	1	35,00
Vas de precipitats 100 mL	15,00	2	30,00
Xeringa 2 mL (MMA)	12,00	1	12,00
<b>TOTAL MATERIAL</b>			<b>777,00</b>

A continuació en la (Taula 7.4) es mostra la matèria primera utilitzada, tots els reactius que han sigut útils en tot el període de la part experimental.

Taula 7.4. Matèria primera, reactius utilitzats.

<b>MATÈRIA PRIMERA</b>			
<b>Reactius i material</b>	<b>Preu unitat (€)</b>	<b>Quantitat</b>	<b>Preu total (€)</b>
Acetona (L)	15,00	5	75,00
BPO (g)	195,00	1	195,00
BZN (g)	6250,00	1	6250,00
CaCl <sub>2</sub> (250 g)	22,00	1	22,00
HA (50 g)	0,00	1	0,00
HCl 37% (L)	22,00	1	22,00
H <sub>2</sub> O destil·lada (L)	0,30	40	12,00
H <sub>2</sub> O mili-Q (L)	0,50	10	5,00
MMA (L)	25,00	1	25,00
Metanol (L)	38,80	1	38,80
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (250 g)	20,00	1	20,00
NaCl (Kg)	0,40	1	0,40
NaHCO <sub>3</sub> (250 g)	11,50	1	11,50
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (250 g)	17,50	1	17,50
KCl (Kg)	30,00	1	30,00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (500 g)	19,50	1	19,50
PEG (300 g)	27,00	1	27,00
PMMA (250 g)	18,00	1	18,00
Tris buffer (200 g)	32,00	1	32,00
<b>TOTAL MATÈRIA PRIMA</b>			<b>6820,70</b>

Per a realitzar el càlcul de la mà d'obra (Taula 7.5), ha sigut necessari la presència de dos tècnics: el Tècnic A (correspon a Alba Juan Pérez), i el Tècnic D (pertany a la directora Elena Franco).

Taula 7.5. Representació del preu total de la mà d'obra.

<b>MÀ D'OBRA INTERNA</b>			
<b>Treballador</b>	<b>Preu (€/hora)</b>	<b>Nº hores</b>	<b>Total (€)</b>
Tècnic A (assaig al laboratori A.J)	20,00	450	9000,00
Tècnic A (redactat A.J)	25,00	580	14500,00
Tècnic D (assaig laboratori E.F)	40,00	15	600,00
Tècnic D (revisió projecte E.F)	45,00	40	1800,00
<b>TOTAL MÀ D'OBRA</b>			<b>25900,00</b>

Ha sigut necessari accedir a tècnics externs (Taula 7.6) per tal de realitzar alguns assaigs: el Tècnic B (correspon a l'assaig de MER), i el Tècnic C (pertany a l'assaig de biocompatibilitat).

Taula 7.6. Representació del valor dels assaigs externs.

<b>ASSAIG EXTERNS</b>			
<b>Treballador</b>	<b>Preu (€/assaig)</b>	<b>Nº assaig</b>	<b>Total (€)</b>
Tècnic B (assaig MER)	150,00	3	450,00
Tècnic C (assaig biocompatibilitat)	1200,00	1	1200,00
<b>TOTAL MÀ D'OBRA</b>			<b>1650,00</b>

Per acabar, s'obté el valor final del que correspon en el pressupost d'aquest projecte, tot seguit en la (Taula 7.7) es mostra el valor que pertany en aquesta investigació.

Taula 7.7. Cost final de la investigació.

COST TOTAL	
Descripció	Preu final (€)
Amortització	133,14
Interès capital	830,41
Mà d'obra interna	25900,00
Assaig externs	1650,00
Manteniment	2618,99
Material	777,00
Matèries primeres	6820,70
<b>COST TOTAL</b>	<b>38730,24</b>

Tot seguit, a la (Figura 7.1) es mostra la distribució de la inversió respecte el total del cost de tot el projecte.

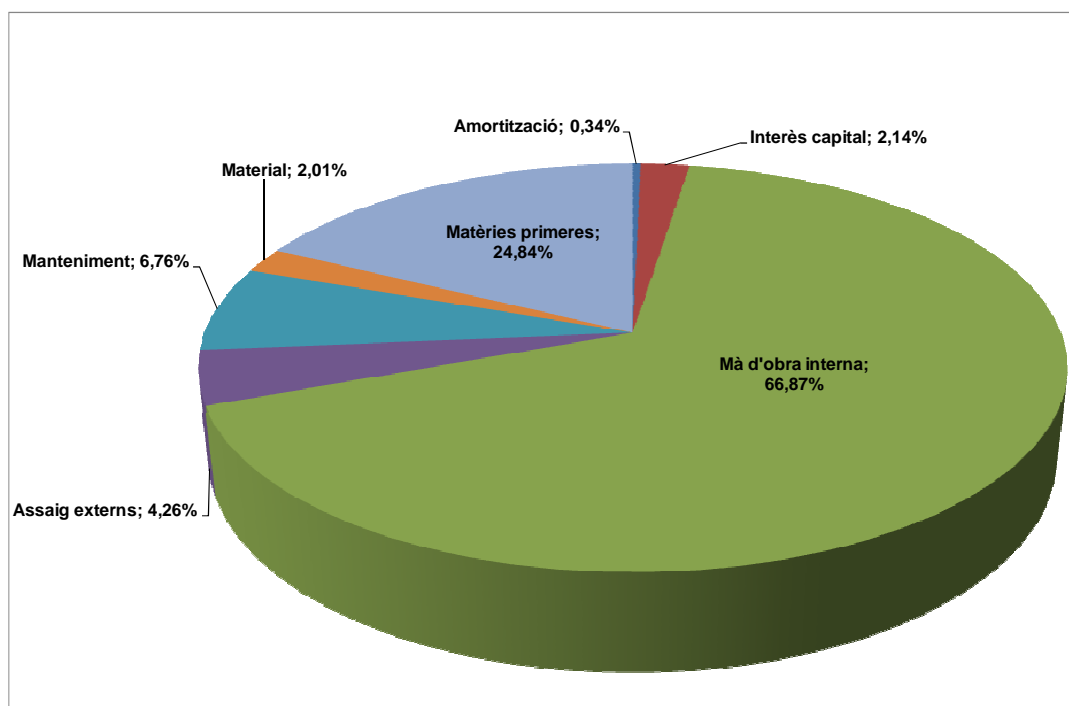


Figura 7.1. Distribució de la inversió respecte el total de costos del projecte.



## **8. PLANIFICACIÓ**

La realització de la planificació del projecte (Figura 8.1) s'ha dut a terme mitjançant el programa informàtic Microsoft Project.

Els tècnics emprats han estat:

Tècnic A: La laborant que ha realitzat el projecte i la investigació, és a dir, jo mateixa, Alba Juan Pérez.

Tècnic B: Assaig extern de la biocompatibilitat.

Tècnic C: Assaig de microscòpia electrònica de rastreig (MER).

Tècnic D: Directora del projecte, Elena Franco.

S'ha de tenir present que la jornada laboral de cada tècnic és diferent.

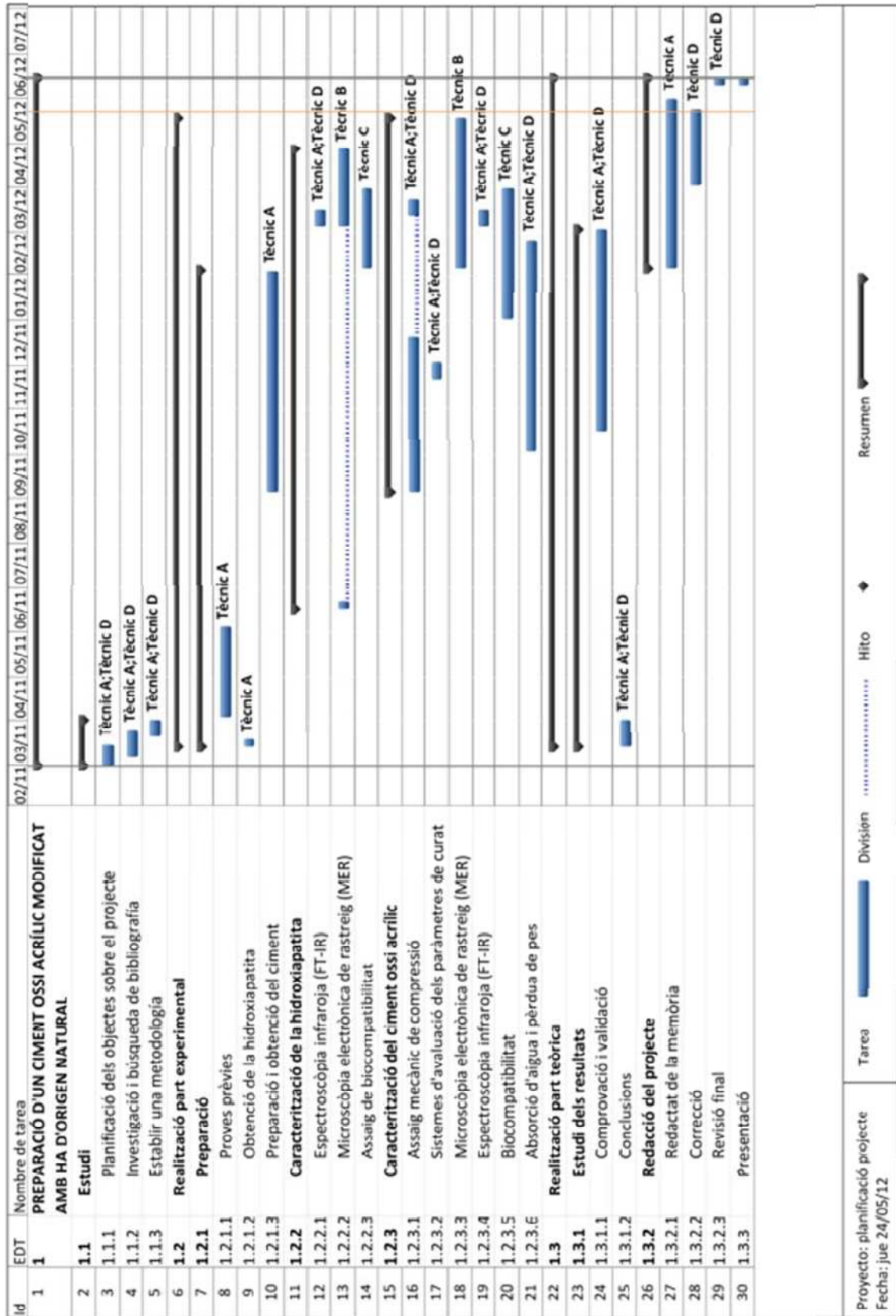


Figura 8.1. Planificació del projecte.

## **9. INFORMACIÓ ADDICIONAL**

## 9.1. PREPARACIÓ DE CEMENTS OSSIS

Tot seguit s'especifiquen dos exemples per a la formació d'un ciment de 3 grams.

- Formació d'un ciment relació (2:1) i concentració de 0% de HA.

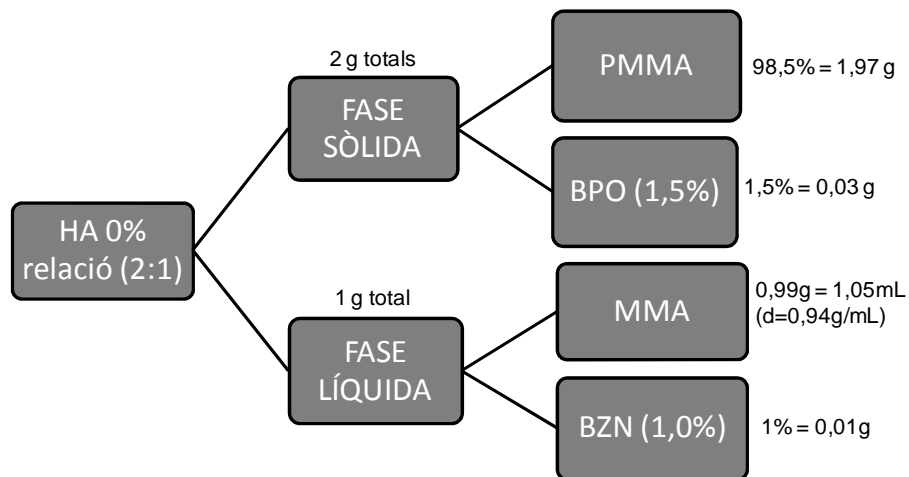


Figura 9.1. Exemple per la fabricació de la proveta control (HA 0%).

- Formació d'un ciment relació (2:1) i concentració de 16,67% de HA.

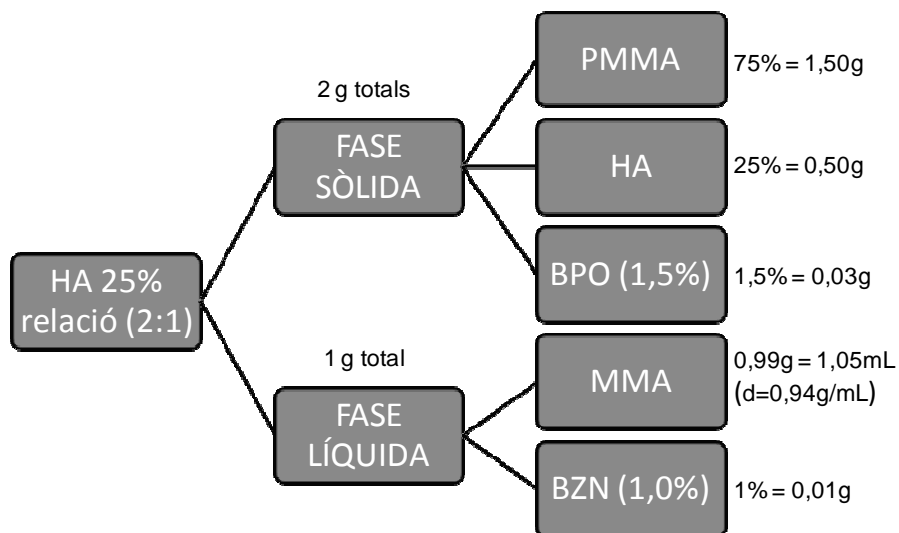


Figura 9.2. Exemple per la fabricació d'una proveta amb un 25% de HA en la fase sòlida.

## 9.2. ABSORCIÓ D'AIGUA I PÈRDUA DE PES

Els valors d'absorció d'aigua i pèrdua de pes de les diferents provetes s'ha realitzat seguint les següents equacions introduïdes en una fulla de càlcul del Excel com la que es mostra a continuació.

$$\% H_{hid} = \frac{W_2 - W_3}{W_3} \times 100$$

$$\% P_p = \frac{W_1 - W_3}{W_3} \times 100$$

Taula 9.1. Exemple de càlcul d'absorció i pèrdua de pes de la proveta HA 0%.

Núm Proveta	W1 (inicial) (g)	W2 (immersió) (g)	W3 (final sec) (g)	Absorció d'aigua			Pèrdua de pes		
				((w2-w3)/ w3)*100	promig (%)	desviació estàndard	((w1-w3)/ w1)*100	promig (%)	desviació estàndard
1.1.1	0,5696	0,5740	0,5686	0,9497	0,7483	0,1840	0,1756	0,1547	0,0982
1.1.2	0,5817	0,5844	0,5803	0,7065			0,2407		
1.1.3	0,6287	0,6321	0,6284	0,5888			0,0477		
1.2.1	0,6456	0,6522	0,6448	1,1476	0,7518	0,3646	0,1239	0,0698	0,0472
1.2.2	0,5310	0,5344	0,5308	0,6782			0,0377		
1.2.3	0,6287	0,6311	0,6284	0,4297			0,0477		
1.3.1	0,5562	0,5605	0,5549	1,0092	0,9286	0,0951	0,2337	0,1598	0,1084
1.3.2	0,5669	0,5721	0,5667	0,9529			0,0353		
1.3.3	0,5231	0,5263	0,5220	0,8238			0,2103		
1.5.1	0,5771	0,6080	0,5748	5,7759	6,8459	5,3473	0,3985	0,0992	0,2596
1.5.2	0,5430	0,6119	0,5432	12,6473			-0,0368		
1.5.3	0,6239	0,6375	0,6243	2,1144			-0,0641		
1.7.1	0,5391	0,5514	0,5387	2,3575	4,1254	1,5454	0,0742	0,0126	0,0564
1.7.2	0,5288	0,5564	0,5288	5,2194			0,0000		
1.7.3	0,5478	0,5743	0,5480	4,7993			-0,0365		
1.10.1	0,5567	0,5673	0,5564	1,9590	1,9890	0,3770	0,0539	-0,1800	0,2029
1.10.2	0,5822	0,5979	0,5840	2,3801			-0,3092		
1.10.3	0,5268	0,5369	0,5283	1,6279			-0,2847		
1.15.1	0,5739	0,6424	0,5746	11,7995	6,7168	4,5665	-0,1220	-0,0990	0,0564
1.15.2	0,5702	0,5879	0,5710	2,9597			-0,1403		
1.15.3	0,5748	0,6060	0,5750	5,3913			-0,0348		
1.23.1	0,5602	0,5697	0,5603	1,6777	2,7480	1,2845	-0,0179	0,0141	0,0732
1.23.2	0,5303	0,5432	0,5305	2,3940			-0,0377		
1.23.3	0,5110	0,5318	0,5105	4,1724			0,0978		

### 9.3. ASSAIG DE COMPRESSIÓ

Un exemple de l'assaig a compressió es mostra tot seguit amb una proveta en immersió en la solució de Kokubo. Per realitzar l'assaig és necessari prèviament haver mesurat totes les provetes una a una per saber l'alçada (mm) i el diàmetre (mm) de cada proveta. A continuació ja es poden assajar les provetes a la màquina d'assajos universals i s'obté els valors de "Fuerza" en newtons (N) i "Extensión" en mil·límetres (mm). A partir d'aquests, es pot calcular el valor de resistència a compressió (MPa) i deformació en (%) mitjançant les següents equacions.

$$\text{Resistència a compressió (MPa)} = \frac{\text{Força (N)}}{\text{Àrea (mm}^2\text{)}} = \frac{F}{\pi r^2} = \frac{F(N)}{\pi \left(\frac{D}{2}\right)^2 (\text{mm})^2} \times \frac{10^6 \text{mm}^2}{1 \text{m}^2}$$

$$\text{Deformació (\%)} = \frac{\text{Extensió (mm)}}{\text{Alçada (mm)}} \times 100$$

En aquest cas la proveta escollida per explicar el càlcul és una proveta que correspon al material HA 15% submergida en solució Kokubo amb una alçada de 12,64 mm i un diàmetre de 6,35 mm. S'obté un gràfic que dona la resistència a compressió en funció de la deformació de cada proveta com el que es mostra a continuació. El valor que es pren com a màxim és la resistència a compressió màxima.

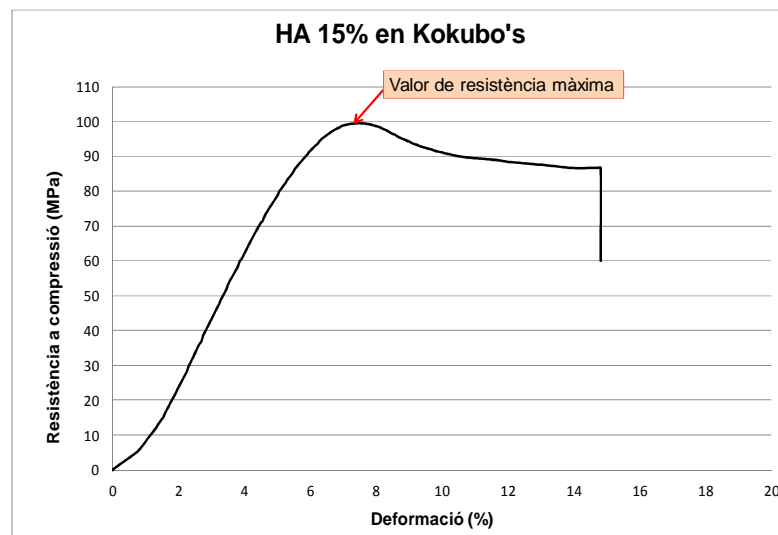


Figura 9.3. Gràfic resistència a compressió en front deformació.

Taula 9.2. Resultats obtinguts per la proveta HA 15% en Kokubo's.

Fuerza (N)	Extensión (mm)	Deformació (%)	Resistència a compressió (MPa)	Fuerza (N)	Extensión (mm)	Deformació (%)	Resistència a compressió (MPa)
0	0	0	0	2264	0,576	4,55696	71,489
4,532	0	0	0,1431	2311	0,584	4,62025	72,9731
132,9	0,076	0,60127	4,1965	2357	0,596	4,71519	74,4256
189,2	0,104	0,82278	5,97426	2403	0,608	4,81013	75,8781
289,5	0,136	1,07595	9,14137	2447	0,62	4,90506	77,2675
385,1	0,168	1,32911	12,1601	2490	0,632	5	78,6252
405,4	0,172	1,36076	12,8011	2531	0,64	5,06329	79,9199
445	0,184	1,45570	14,0515	2571	0,652	5,15823	81,1829
484,6	0,196	1,55063	15,3019	2609	0,664	5,25316	82,3828
528,6	0,204	1,61392	16,6913	2628	0,668	5,28481	82,9828
653,3	0,232	1,83544	20,6289	2664	0,68	5,37975	84,1195
704,1	0,244	1,93038	22,2329	2700	0,692	5,47468	85,2563
729,8	0,248	1,96203	23,0445	2735	0,7	5,53797	86,3615
782,7	0,26	2,05696	24,7149	2770	0,712	5,63291	87,4666
835,7	0,272	2,1519	26,3884	2803	0,724	5,72785	88,5087
889,8	0,284	2,24684	28,0967	2835	0,736	5,82278	89,5191
944,8	0,292	2,31013	29,8334	2867	0,748	5,91772	90,5295
999,9	0,304	2,40506	31,5732	2882	0,752	5,94937	91,0032
1139	0,332	2,62658	35,9655	2912	0,764	6,0443	91,9505
1166	0,34	2,68987	36,8181	2940	0,776	6,13924	92,8346
1223	0,348	2,75316	38,6179	2967	0,788	6,23418	93,6872
1279	0,36	2,8481	40,3862	2992	0,796	6,29747	94,4766
1336	0,372	2,94304	42,1861	3016	0,808	6,39241	95,2344
1392	0,384	3,03797	43,9544	3038	0,82	6,48734	95,9291
1448	0,396	3,13291	45,7226	3058	0,832	6,58228	96,5606
1503	0,408	3,22785	47,4593	3067	0,836	6,61392	96,8448
1530	0,412	3,25949	48,3119	3084	0,848	6,70886	97,3816
1584	0,424	3,35443	50,017	3100	0,86	6,8038	97,8869
1637	0,436	3,44937	51,6906	3113	0,872	6,89873	98,2973
1691	0,444	3,51266	53,3957	3125	0,88	6,96203	98,6763
1743	0,456	3,60759	55,0377	3133	0,892	7,05696	98,9289
1795	0,468	3,70253	56,6796	3139	0,904	7,1519	99,1183
1846	0,48	3,79747	58,29	3143	0,912	7,21519	99,2446
1896	0,488	3,86076	59,8689	3145	0,92	7,27848	99,3078
1921	0,496	3,92405	60,6583	3147	0,932	7,37342	99,3709
2070	0,528	4,17722	65,3632	3149	0,94	7,43671	99,4331
2193	0,556	4,39873	69,2471	<b>3149</b>	<b>0,952</b>	<b>7,53165</b>	<b>99,4341</b>



Fuerza (N)	Extensión (mm)	Deformació (%)	Resistència a compressió (MPa)	Fuerza (N)	Extensión (mm)	Deformació (%)	Resistència a compressió (MPa)
3143	0,976	7,72152	99,2446	2826	1,424	11,2658	89,2349
3138	0,988	7,81646	99,0868	2825	1,428	11,2975	89,2033
3120	1,016	8,03797	98,5184	2822	1,44	11,3924	89,1086
3110	1,028	8,13291	98,2026	2820	1,452	11,4873	89,0455
3104	1,032	8,16456	98,0132	2817	1,464	11,5823	88,9507
3091	1,044	8,25949	97,6027	2813	1,476	11,6772	88,8244
3078	1,056	8,35443	97,1922	2810	1,488	11,7722	88,7297
3065	1,064	8,41772	96,7817	2806	1,496	11,8354	88,6034
3051	1,076	8,51266	96,3396	2802	1,508	11,9304	88,4771
3044	1,084	8,57595	96,1186	2800	1,512	11,962	88,4139
3030	1,092	8,63924	95,6765	2796	1,524	12,057	88,2876
3016	1,104	8,73418	95,2344	2795	1,536	12,1519	88,256
3004	1,116	8,82911	94,8555	2792	1,548	12,2468	88,1613
2991	1,128	8,92405	94,4450	2790	1,56	12,3418	88,0982
2980	1,14	9,01899	94,0977	2788	1,568	12,4051	88,035
2968	1,148	9,08228	93,7188	2785	1,58	12,5	87,9403
2958	1,16	9,17722	93,4030	2783	1,592	12,5949	87,8771
2948	1,172	9,27215	93,0872	2782	1,6	12,6582	87,8456
2943	1,176	9,3038	92,9294	2779	1,608	12,7215	87,7508
2934	1,188	9,39873	92,6452	2777	1,62	12,8165	87,6877
2925	1,2	9,49367	92,3610	2774	1,632	12,9114	87,5929
2918	1,212	9,58861	92,1399	2772	1,644	13,0063	87,5298
2910	1,224	9,68354	91,8873	2769	1,656	13,1013	87,4351
2902	1,232	9,74684	91,6347	2766	1,668	13,1962	87,3403
2895	1,244	9,84177	91,4137	2764	1,676	13,2595	87,2772
2888	1,256	9,93671	91,1927	2762	1,684	13,3228	87,214
2885	1,264	10,0001	91,0979	2760	1,696	13,4177	87,1509
2878	1,272	10,0633	90,8769	2757	1,704	13,481	87,0561
2872	1,284	10,1582	90,6874	2754	1,716	13,5759	86,9614
2866	1,296	10,2532	90,498	2751	1,728	13,6709	86,8667
2860	1,304	10,3165	90,3085	2748	1,74	13,7658	86,772
2854	1,316	10,4114	90,1191	2745	1,748	13,8291	86,6772
2849	1,328	10,5063	89,9612	2743	1,76	13,9241	86,6141
2845	1,34	10,6013	89,8349	2743	1,768	13,9873	86,6141
2843	1,344	10,6329	89,7717	2742	1,776	14,0506	86,5825
2840	1,356	10,7278	89,677	2742	1,788	14,1456	86,5825
2837	1,368	10,8228	89,5823	2742	1,8	14,2405	86,5825
2834	1,38	10,9177	89,4875	2742	1,812	14,3354	86,5825
2831	1,392	11,0127	89,3928	2744	1,844	14,5886	60

## 9.4. PROPIETATS DE CURAT

Per dur a terme el càlcul del temps d'enduriment ( $t_e$ ) cal seguir la següent equació. A partir de la temperatura d'enduriment ( $T_e$ ) es pot trobar quin valor li correspon.

$$T_e = T_{amb} + \frac{(T_{m\grave{a}x} - T_{amb})}{2}$$

Tot seguit es mostra un exemple del càlcul realitzat per saber el temps d'enduriment: Primerament es localitza el valor màxim de la temperatura en la taula que ens mostra l'equip "Comfort" (exemple sobre la formulació HA 0%), és a dir  $T_{m\grave{a}x}=73,6^{\circ}\text{C}$ , tot seguit es realitza el càlcul segons l'equació anterior agafant com a temperatura ambient els  $T_{amb}=23^{\circ}\text{C}$ . Seguidament es calcula el valor que resulta de la temperatura d'enduriment, és a dir,  $T_e=48,3^{\circ}\text{C}$ . Aquest valor dins la taula intervé entre dos valors de temps (9,08 i 9,17)min, per tant s'agafa el promig dels dos valors i s'obté el valor corresponent al temps d'enduriment,  $t_e=9,12$  min.

Taula 9.3. Resultats del software "Comfort" de l'assaig de curat sobre la proveta HA 0%.

Temps (min)	T <sup>a</sup> motlle[°C]	T <sup>a</sup> massa[°C]	Temps (min)	T <sup>a</sup> motlle[°C]	T <sup>a</sup> massa[°C]
0,00	23	22,7	1,67	22,9	22,9
0,08	23	22,8	1,75	23,2	23,1
0,17	23	22,8	1,83	23,2	23,2
0,25	23	22,8	1,92	23,4	23,3
0,33	23,1	22,8	2,00	23,4	23,4
0,42	23	22,8	2,08	23,4	23,4
0,50	23	22,8	2,17	23,4	23,6
0,58	23	22,8	2,25	23,4	23,7
0,67	23,2	22,7	2,33	23,4	23,7
0,75	23	20,8	2,42	23,5	23,8
0,83	23	20,4	2,50	23,4	23,8
0,92	23	20,8	2,58	23,5	23,9
1,00	23	21,2	2,67	23,4	24
1,08	23	21,6	2,75	23,4	24
1,17	22,9	21,9	2,83	23,5	24,1
1,25	22,9	22,1	2,92	23,4	24,2
1,33	22,8	22,4	3,00	23,4	24,2
1,42	22,8	22,5	3,08	23,5	24,2
1,50	22,9	22,8	3,17	23,3	24,3

Temps (min)	T <sup>a</sup> motlle[°C]	T <sup>a</sup> massa[°C]
3,33	23,4	24,5
3,42	23,3	24,4
3,50	23,4	24,5
3,58	23,4	24,6
3,67	23,5	24,6
3,75	23,5	24,8
3,83	23,5	24,7
3,92	23,5	24,8
4,00	23,5	24,9
4,08	23,5	25
4,17	23,5	25
4,25	23,5	25,1
4,33	23,4	25,1
4,42	23,5	25,2
4,50	23,5	25,3
4,58	23,5	25,3
4,67	23,4	25,4
4,75	23,4	25,4
4,83	23,4	25,5
4,92	23,5	25,6
5,00	23,4	25,6
5,08	23,4	25,7
5,17	23,4	25,8
5,25	23,4	25,9
5,33	23,5	25,9
5,42	23,7	26
5,50	23,8	26
5,58	23,9	26,1
5,67	24,1	26,2
5,75	24,2	26,3
5,83	24,3	26,4
5,92	24,5	26,5
6,00	24,5	26,6
6,08	24,6	26,6
6,17	24,9	26,8
6,25	25	26,9
6,33	25,1	27
6,42	25,2	27,1
6,50	25,2	27,1
6,58	25,3	27,3

Temps (min)	T <sup>a</sup> motlle[°C]	T <sup>a</sup> massa[°C]
6,92	26	27,9
7,00	26	28
7,08	26,2	28,2
7,17	26,2	28,4
7,25	26,2	28,6
7,33	26	28,8
7,42	26,2	29
7,50	26,2	29,2
7,58	26,3	29,5
7,67	26,4	29,9
7,75	26,5	30,1
7,83	26,6	30,5
7,92	26,6	30,8
8,00	26,6	31,1
8,08	26,6	31,6
8,17	26,5	32,1
8,25	26,5	32,7
8,33	26,4	33,3
8,42	26,6	34
8,50	26,5	34,8
8,58	26,5	35,7
8,67	26,4	36,9
8,75	26,3	38
8,83	26,5	39,6
8,92	26,4	41,3
9,00	26,3	43,6
9,08	26,3	46,2
9,17	26,3	49,7
9,25	26,2	54,3
9,33	26,2	59,3
9,42	26,2	65
9,50	26,3	69,8
9,58	26,3	72,7
9,67	26,3	73,6
9,75	26,3	73,4
9,83	26,3	72,3
9,92	26,3	71,1
10,00	26,3	69,6
10,08	26,3	67,9
10,17	26,2	66,1

Temps (min)	T <sup>a</sup> motlle[°C]	T <sup>a</sup> massa[°C]	Temps (min)	T <sup>a</sup> motlle[°C]	T <sup>a</sup> massa[°C]
10,50	26,3	59,3	11,25	26,2	48
10,58	26,4	57,7	11,33	26,2	47,1
10,67	26,3	56,3	11,42	26,2	46,2
10,75	26,4	54,9	11,50	26,3	45,5
10,83	26,5	53,6	11,58	26,2	44,6
10,92	26,4	52,3	11,67	26,3	44
11,00	26,3	51	11,75	26,3	43,3
11,08	26,3	50	11,83	26,4	42,6
11,17	26,2	49	11,92	26,3	42,1

Taula 9.4. Valors obtinguts de tots els experiments.

FORMULACIÓ	HA 0%	HA 5%	HA 15%	HA 25%
T <sub>màx</sub> prova 1	73,6	66,6	71,3	69,0
t <sub>e</sub> prova 1	9,1	9,1	6,9	9,0
T <sub>màx</sub> prova 2	70,0	69,6	69,2	67,7
t <sub>e</sub> prova 2	8,4	6,6	8,4	9,7
PROMIG T <sub>màx</sub> (°C)	71,8	68,1	70,3	68,4
Desvest T <sub>màx</sub> (°C)	2,5	2,1	1,5	0,9
PROMIG t <sub>e</sub> (min)	8,7	7,8	7,6	9,3
Desvest t <sub>e</sub> (min)	0,5	1,7	1,1	0,5

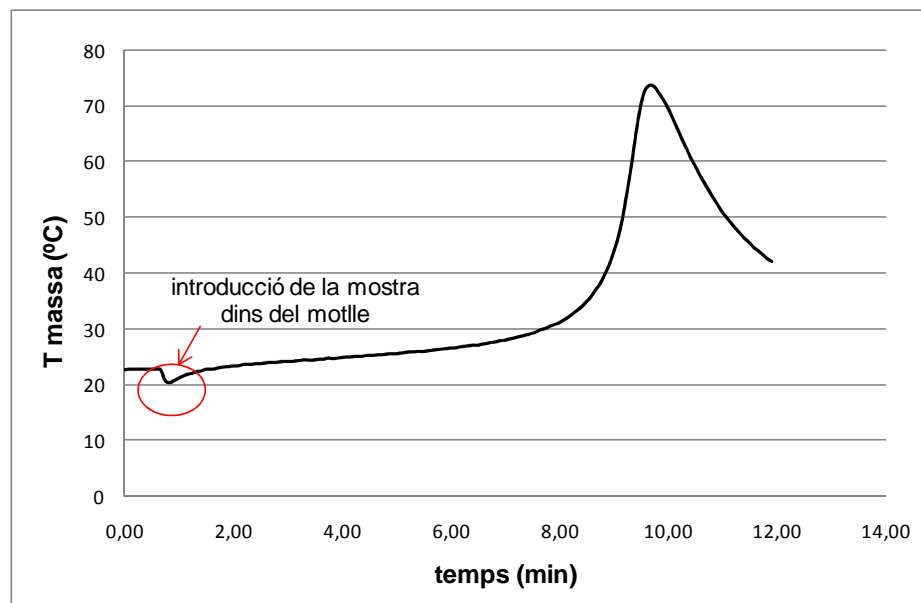
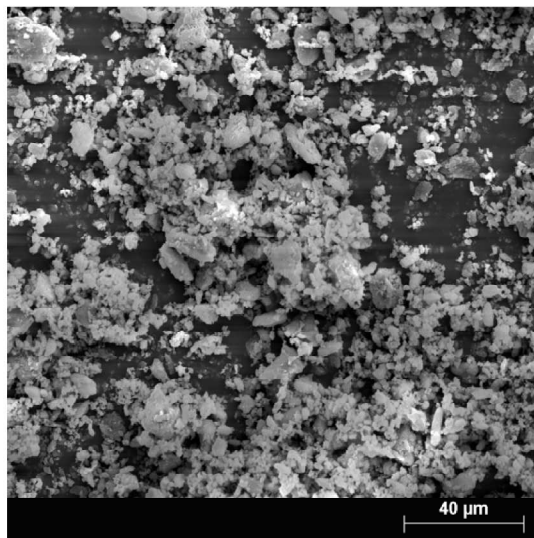


Figura 9.4. Gràfica de la temperatura de massa en funció del temps.

## 9.5. MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA DE RASTREIG AMB ANÀLISIS ELEMENTAL (MER-EDX)

Tot seguit es mostren unes microfotografies de hidroxiapatita, juntament amb el seu espectre EDX (anàlisi elemental dels àtoms d'interès) i la taula amb els valors obtinguts de màquina.



Spectrum: HA 1

Element	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]
Carbon	K-series	21,52	19,03	30,06
Oxygen	K-series	47,44	41,96	49,75
Sodium	K-series	0,32	0,28	0,23
Magnesium	K-series	0,39	0,34	0,27
Aluminium	K-series	0,00	0,00	0,00
Phosphorus	K-series	12,37	10,94	6,70
Calcium	K-series	31,03	27,45	12,99
Total:		113,06	100,00	100,00

HA 1

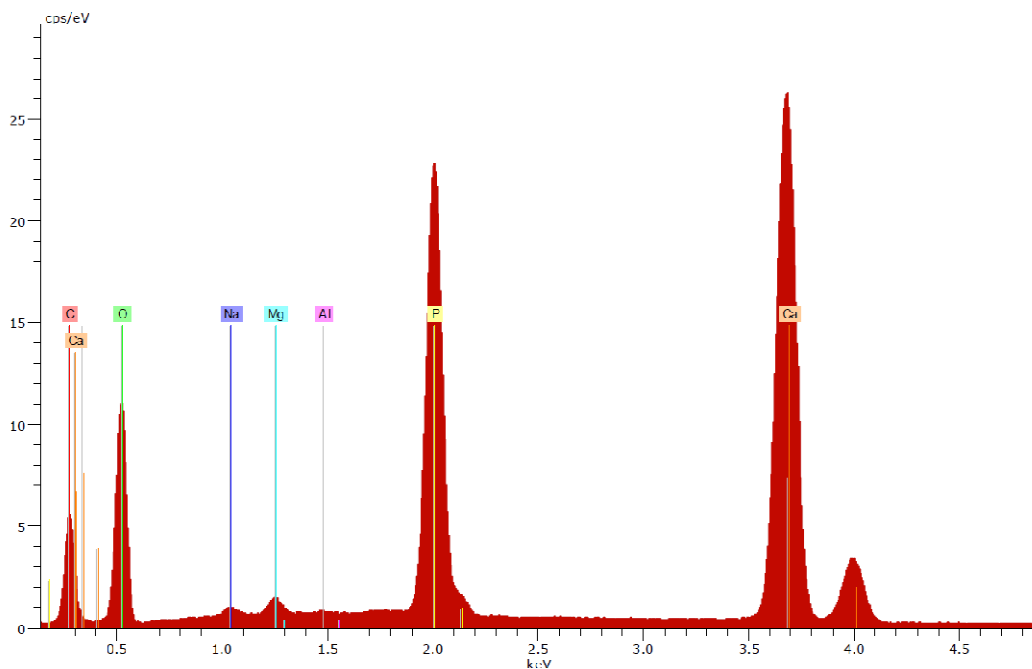
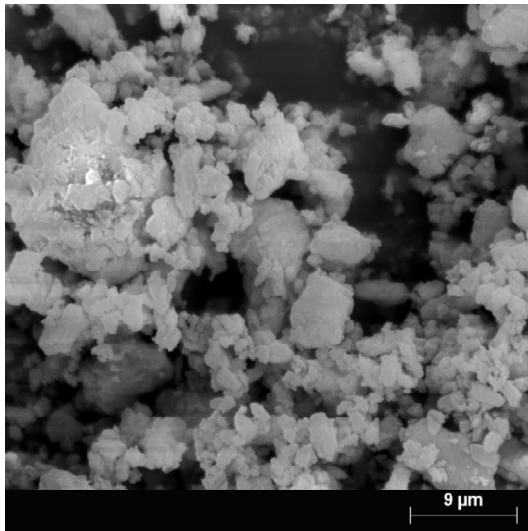


Figura 9.5. Mostra de hidroxiapatita 1.



HA 2

Spectrum: HA 2

Element	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]
Carbon	K-series	22,11	21,85	34,84
Oxygen	K-series	36,32	35,89	42,96
Sodium	K-series	0,32	0,31	0,26
Magnesium	K-series	0,43	0,43	0,34
Aluminium	K-series	0,00	0,00	0,00
Silicon	K-series	0,07	0,07	0,05
Phosphorus	K-series	12,61	12,46	7,71
Calcium	K-series	29,33	28,98	13,85
Total:		101,20	100,00	100,00

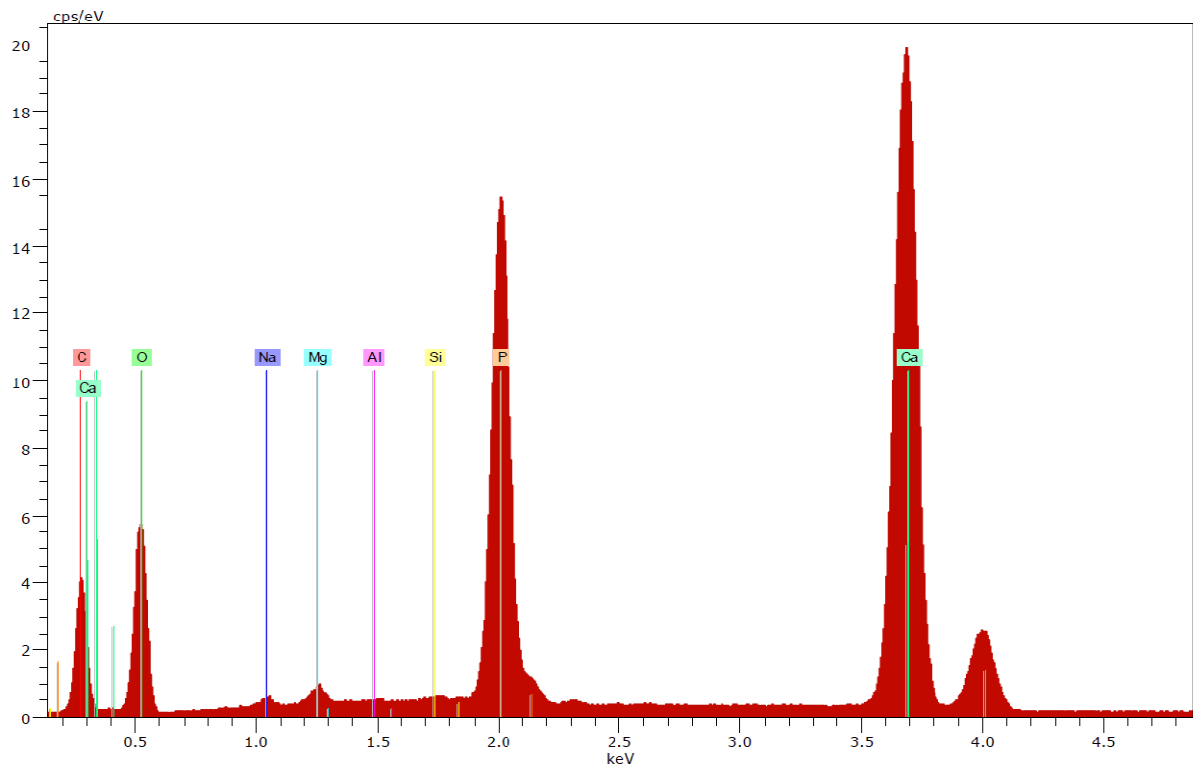
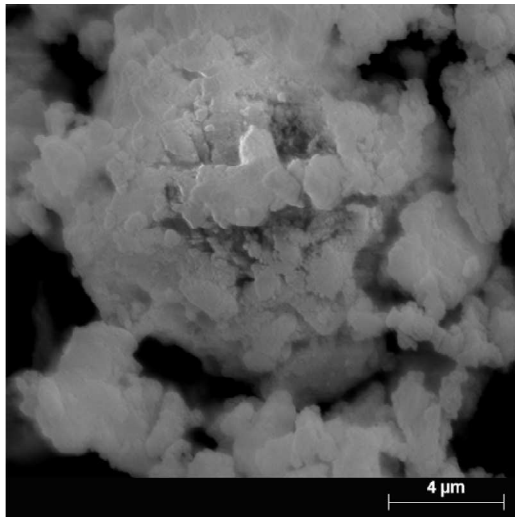


Figura 9.6. Mostra de hidroxiapatita 2.



Spectrum: HA 3

Element	Series	unn. C [wt.%]	norm. C [wt.%]	Atom. C [at.%]
Carbon	K-series	18,16	17,16	28,47
Oxygen	K-series	39,82	37,63	46,86
Sodium	K-series	0,33	0,31	0,27
Magnesium	K-series	0,42	0,40	0,33
Phosphorus	K-series	14,11	13,33	8,58
Calcium	K-series	32,98	31,16	15,49
Total:		105,82	100,00	100,00

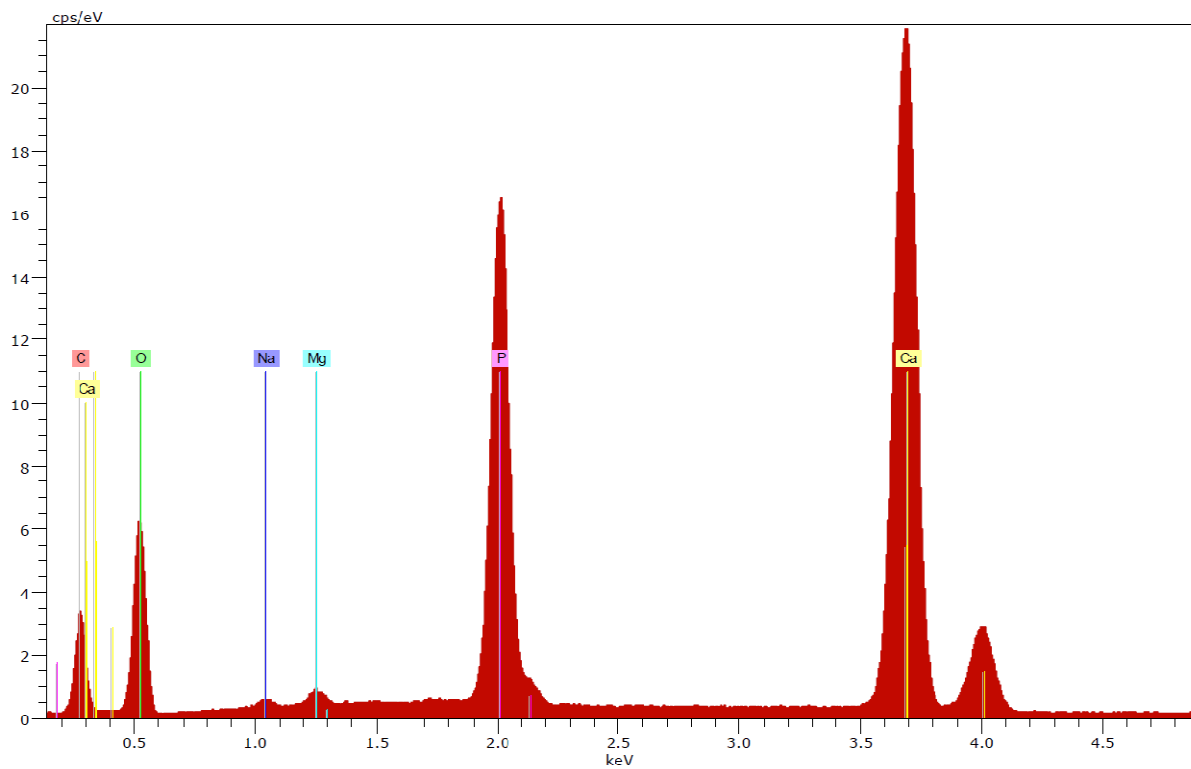


Figura 9.7. Mostra de hidroxiapatita 3.

## 9.6. ESPECTRES INFRARROIG

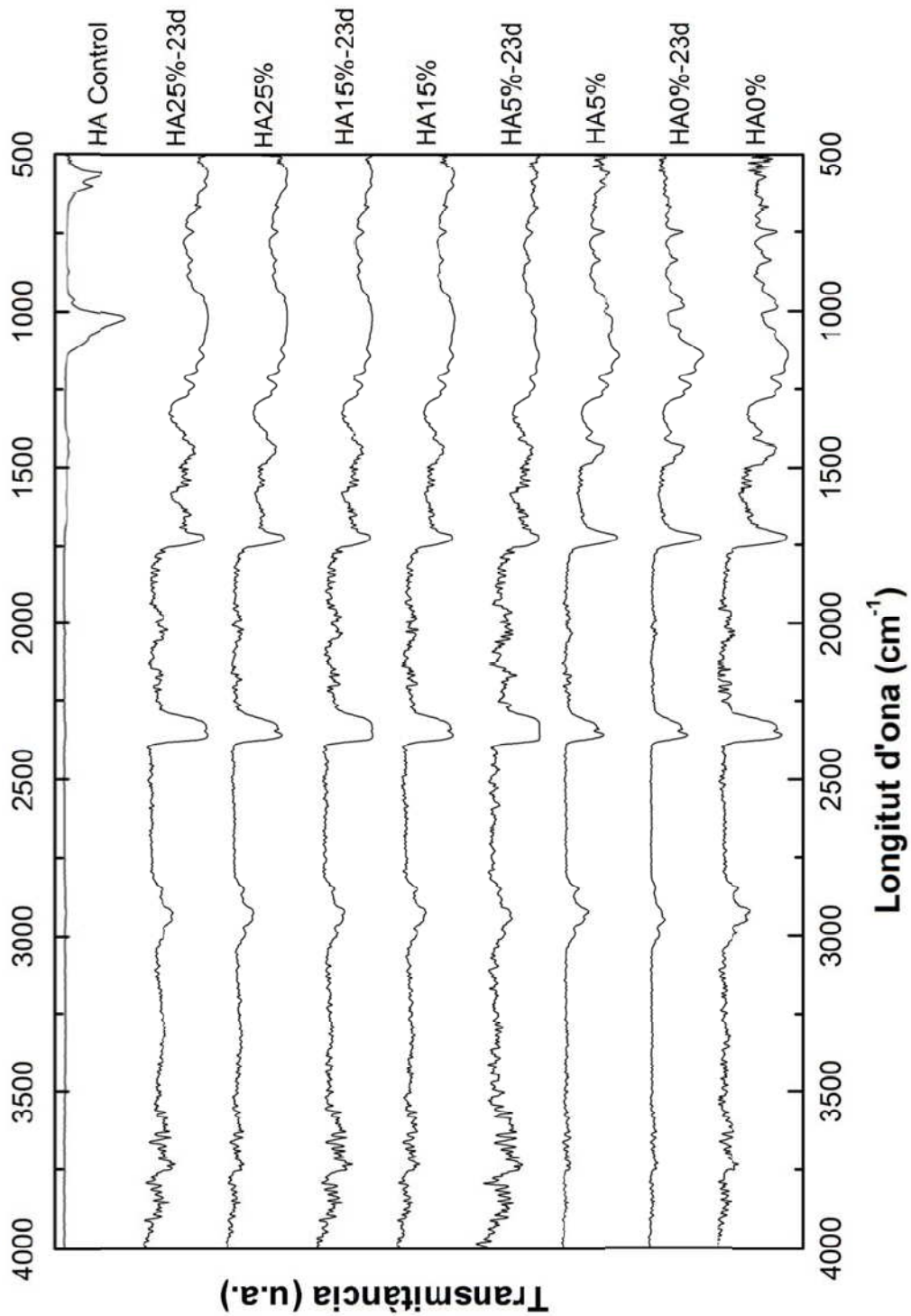


Figura 9.8. Espectres FT-IR de la HA i de tots els ciments ossis.



## **10.ÍNDEX DE FIGURES**

Figura 1.1. Dr. Sir. John Charnley .....	6
Figura 2.1. Pròtesis de cadera on s'observen simultàniament els materials metàl·lics (titani), ceràmics (hidroxiapatita) i polimèrics (HDPE).....	9
Figura 2.2. Exemples dels biomaterials en diferents utilitzacions: A) Ciment ortopèdic, B) Implant dental per la fixació de les dents, C) Pròtesis de genoll .....	11
Figura 2.3. Representació esquemàtica dels diferents tipus de polímers naturals i sintètics.....	14
Figura 2.4. Breu cronologia de l'aplicació dels polímers en la medicina. ....	16
Figura 2.5. Exemple de la fixació d'una pròtesis de cadera.....	19
Figura 2.6. Exemple pròtesis de colze.....	21
Figura 2.7. Components d'un ciment ossi acrílic convencional.....	21
Figura 2.8. Mecanisme de formació de radicals primaris en la iniciació de la reacció de polimerització dels ciments ossis acrílics.....	25
Figura 2.9. Variació de la temperatura durant l'enduriment del ciment ossi acrílic. ....	27
Figura 2.10. Dins l'estructura de l'os s'especifica on es troba la hidroxiapatita.....	40
Figura 3.1. Fórmula del PMMA.....	44
Figura 3.2. Fórmula del BPO.....	45
Figura 3.3. Fórmula del MMA .....	45
Figura 3.4. Estructura química del BZN.....	46
Figura 3.5. pH-metre Crison 2002. ....	47
Figura 3.6. Estufa a 37°C. ....	47
Figura 3.7. Estufa a 50°C. ....	48

Figura 3.8. Màquina d'assaig mecànic de compressió imatge (A) i les corresponents mordasses imatge (B). .....	48
Figura 3.9. Equip per l'anàlisi de paràmetres de curat imatge (A) i motlle pel curat (B).....	49
Figura 3.10. Equip Espectroscòpia Infraroja.....	50
Figura 3.11. Equip experimental per l'anàlisi del MER. ....	51
Figura 3.12.Exemple de motlle per el ciment.....	53
Figura 3.13. Exemple de les provetes sortides de l'estufa de 37°C.....	54
Figura 3.14. Motlle de tefló i proveta de l'assaig mecànic per compressió. ....	57
Figura 3.15. Esquema de l'assaig tipus MTT per avaluar l'alliberació de components citotòxics.....	59
Figura 3.16. Esquema del procediment seguit en l'evolució de la proliferació cel·lular utilitzant el reactiu "Alamar Blue". ....	61
Figura 4.1. Espectre infraroig de la HA.....	63
Figura 4.2. Microfotografia de HA a diferents grau d'amplitud.....	64
Figura 4.3. Espectre anàlisi elemental de la HA. ....	65
Figura 4.4. Perfil d'absorció d'aigua respecte el temps. ....	66
Figura 4.5. Gràfica de la pèrdua de pes respecte del temps. ....	67
Figura 4.6. Resistència a compressió en sec i a 15 dies d'immersió.....	68
Figura 4.7. Espectres d'infraroig de diferents ciments ossis. (A)HA 0%, (B)HA 0%-23d, (C) HA 25% i (D) HA 25%-23d. ....	69
Figura 4.8. Micrografia del MER de les formulacions HA 0% (A) i HA 0%-23d (B).....	70
Figura 4.9. Micrografia del MER de les formulacions HA 25% (A) i HA 25%-23d (B).....	70

Figura 4.10. Representació gràfica dels resultats obtinguts per l'assaig MTT. ....	71
Figura 4.11. Representació gràfica dels resultats obtinguts amb l'assaig "Alamar Blue" <sup>TM</sup> .....	72
Figura 4.12. Cultiu de 24h d'osteoblasts humans sembrats sobre la superfície de TMX.....	73
Figura 4.13. Microfotografies dels cultius d'osteoblasts humans al cap de 24h de ser sembrats sobre la superfície dels diferents ciments ossis. ....	73
Figura 4.14. Ampliació de la superfície del ciment ossi HA 5%. ....	74
Figura 4.15. Ampliació de la superfície del ciment ossi HA 15%. ....	74
Figura 4.16. Ampliació de la superfície del ciment ossi HA 25%. ....	75
Figura 7.1. Distribució de la inversió respecte el total de costos del projecte. ....	89
Figura 8.1. Planificació del projecte. ....	92
Figura 9.1. Exemple per la fabricació de la proveta control (HA 0%). ....	94
Figura 9.2. Exemple per la fabricació d'una proveta amb un 25% de HA en la fase sòlida. ....	94
Figura 9.3. Gràfic resistència a compressió en front deformació. ....	96
Figura 9.4. Gràfica de la temperatura de massa en funció del temps.....	101
Figura 9.5. Mostra de hidroxiapatita 1. ....	102
Figura 9.6. Mostra de hidroxiapatita 2. ....	103
Figura 9.7. Mostra de hidroxiapatita 3. ....	104
Figura 9.8. Espectres FT-IR de la HA i de tots els ciments ossis. ....	105

## **11.ÍNDIX DE TAULES**

Taula 2.1. Alguns exemples de dispositius del biomaterial.....	17
Taula 2.2. Criteris per avaluar les propietats dels ciments ossis acrílics.....	26
Taula 2.3. Propietats mecàniques del ciment ossi acrílic.....	28
Taula 2.4. Propietats físiques i mecàniques que posseeix la HA.....	34
Taula 2.5. Concentracions dels ions que simulen el fluid del cos humà i fluid del plasma humà. ....	42
Taula 3.1. Característiques físico-químiques del PMMA. ....	44
Taula 3.2. Reactius solució Kokubo's.....	46
Taula 3.3. Representació de les diferents valoracions de HA. ....	52
Taula 3.4. Representació de les quantitats necessàries segons el protocol.....	55
Taula 4.1. Resultats paràmetres de curat.....	66
Taula 7.1. Inversió inicial maquinària.....	85
Taula 7.2. Descripció de l'amortització de la inversió per hores. ....	86
Taula 7.3. Cost del material utilitzat.....	87
Taula 7.4. Matèria primera, reactius utilitzats. ....	88
Taula 7.5. Representació del preu total de la mà d'obra. ....	88
Taula 7.6. Representació del valor dels assaigs externs.....	88
Taula 7.7. Cost final de la investigació. ....	89
Taula 9.1. Exemple de càlcul d'absorció i pèrdua de pes de la proveta HA 0%. ....	95
Taula 9.2. Resultats obtinguts per la proveta HA 15% en Kokubo's.....	97
Taula 9.3. Resultats del software "Comfort" de l'assaig de curat sobre la proveta HA 0%. ....	99

Taula 9.4. Valors obtinguts de tots els experiments. .... 101

## **12.BIBLIOGRAFIA**



1. Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Jt Surg.* 1964; 42 (B): 28-30.
2. Charnley J. Fracture of femoral prosthesis in total hip replacement. *Clin Orthop Rel Res.* 1975; 111: 105-20.
3. K-D. Kühn. *Bone cements.* Springer. 2000.
4. Williams DF. Advanced applications form materials implanted within the human body. *Mater Sci Technol.* 1987; 3: 797-806.
5. Williams DF. *Definitions in Biomedicals. Progress in Biomedical Engineering, vol 4, New York, Elsevier.* 1987.
6. Williams DF. On the nature of biomaterials. *Biomaterials.* 2009; 30(30): 5897-909.
7. Williams, D.F *Biocompatibility of implant materials.* Sector Publishing Limited, 1976.
8. Black, J. *Biological performance of materials. Fundamentals of biocompatibility.* Dekker, 1992.
9. Vallet, María. "Biocerámicas: Inertes i bioactivas". En: *Revista de la Real Academia de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales.* Vol 90. No 4. 1996. pp. 269-273.
10. Winter H. H., Tours M. Rheology of polymers near liquid-solid transitions. *AdvPolymSci*134: 165-234. 1996.
11. Barnes H. A., Hutton J. F., Walters K. *An Introduction to Rheology.* Elsevier Capítulo 3: 37-54. 1989.
12. Schramm G. *A Practical Approach to Rheology and Rheometry.* Haake. Karlsruhe. 1994.
13. McCallum J. R. En *Comprehensive Polymer Science: the Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymers (1).* Pergamon Press. Capítulo 37: 903-936. 1989.

14. Ferry J. D. *Viscoelastic Properties of Polymers*. John Wiley & Sons. Madrid. 1980.
15. Abajo J., Gallardo A., López D. *En Ciencia y Tecnología de Materiales Poliméricos Volumen I. Capítulo 2*. Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros. Madrid. 2004.
16. M. Ogino, F. Ohuchi, L. L. Hench. Compositional dependence of the formation of calcium phosphate films on bioglass. *J. Biomed. Mater. Res.*, 14, 55-64, 1980.
17. ISO Specification 5833. Standard specification for implants in surgery-acrylic resin cement. 1992.
18. Zwolak P, Manivel JC, Jasinski P, Kirstein MN, Dudek AZ, Fisher J, et al. Cytotoxic Effect of Zoledronic Acid-Loaded Bone Cement on Giant Cell Tumor, Multiple Myeloma, and Renal Cell Carcinoma Cell Lines, *J Bone Joint Surg Am*. 2010; 92: 162-8.
19. Jacqueline I. K., Herman F. M. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. Vol 3. 3<sup>a</sup> ed. John Wiley & Sons. New Jersey. 2003.
20. Rubinstein M., Colby R. H. *Polymer Physics*. Oxford University Press. Oxford. 2003.
21. Wood-Adams P. M., Dealy J. M. Using rheological data to determine the branching level in metallocenepolyethylenes. *Macromolecules* 33: 7481-7488. 2000.
22. Pereira CS, Cunha AM, Reis RL, Vázquez B, San Román J. New starch-based thermoplastic hydrogels for use as bone cements or drug-delivery carriers. *J Mater Sci: Mater Med*. 1998; 9: 825-33.
23. Barrows TH. Degradable implant materials. A review of synthetic absorbable polymers and their applications. *Clin Mater*. 1986; 1: 233-57.
24. Middleton JC, Tipton AJ. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices. *Biomaterials*. 2000; 21: 2335-46.

25. Fernández M, Méndez JA, Vázquez B, San Román J, Ginebra MP, Gil FJ, Manero J, Planell JA. Acrylic-phosphate glasses composites as self-curing controlled delivery Systems of antibiotics. *J Mater Sci Mater Med.* 2002; 13: 1251-7.
26. Méndez JA, Fernández M, González-Corchón A, Salvado M, Collía F, de Pedro JA, Levenfeld BL, López-Bravo A, Vázquez B, San Román J. Injectable self-curing bioactive acrylic-glass composites charged with specific anti-inflammatory/analgesic agent. *Biomaterials.* 2004; 25: 2381-92.
27. Vainionpaa S, Rokkanen P, Tormala P. Surgical applications of biodegradable polymers in human tissues. *PolymSci.* 1989; 14: 679-716.
28. Lewis DH. Controlled Rrelease of Bioactive Agents from Lactide/Glycolide Polymers. En: Chasin M y Langer R, editores. *Biodegradable Polymers as Drug Delivery System.* New York: Marcel Dekker; 1990. pág 1-41.
29. Ikada Y. TissueAdhesives. En: Chu CC, von Fraunhofer LA, Greisler HP, editores. *Wound Close Biomaterials and Devices.* New York: CRC Press; 1996. pág. 317–346.
30. Henning W, Blencke BA, Bromer H, Dutscher KK, Gross A, Ege W. Investigations with bioactive polymethylmethacrylates. *J Biomed Mater Res.* 1979; 13: 89-99.
31. Moursi AM, Winnard AV, Winnard PL, Lannutti JJ, Seghi RR. Enhanced osteoblast response to a polymethylmethacrylate–hydroxyapatite composite. *Biomaterials.* 2002; 23: 133-44.
32. L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, T. K. Greenlee Jr. Bonding mechanisms at the interace of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed Mater. Res.,* 2 (1), 117-141, 1972.
33. Blanca Vázquez, María Pau Ginebra, Xavier Gil, Josep Antón Planell, Julio San Román. *Acrylic bone cements modified with b-TCP particles encapsulated with poly(ethylene glycol).* Elsevier Ltd. 2004.

34. María Aránzazu González Corchón, Manuela Salvado, Basilio José de la Torre, Francisco Collía, José Antonio de Pedro, Blanca Vázquez, Julio San Román. *Injectable and self-curing composites of acrylic/bioactive glass and drug systems. A histomorphometric analysis of the behavior in rabbits.* Elsevier Ltd. 2005.
35. M. Fernández, J.A. Méndez, B. Vázquez, J. San Román, M. P. Ginebra, F. J. Gil, J. M. Manero, J. A. Planell. *Acrylic-phosphate glasses composites as self-curing controlled delivery systems of antibiotics.* Kluwer Academic Publishers. 2002.
36. Owens D. K., Wendt R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Pol Sci*13: 1741-1747. 1969.
37. Fowkes F. M. Predicting attractive forces at interfaces. *IndEngChem*56: 40-53. 1964.
38. Nakayama G. R., Caton M. C., Nova M. P., Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J Immunol Methods* 204: 205-208. 1997.
39. Nociari M. M., Shalev A., Benias P., Russo C. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell mediated cytotoxicity. *J Immunol Methods* 213: 157-167. 1998.
40. Gloeckner H., Jonuleit T., Lemke H. D. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber biorreactor by use of the dye Alamar Blue<sup>TM</sup>. *J Immunol Methods* 252: 131-138. 2001.
41. Vázquez B, Elvira C, Levenfeld B, Pascual B, Goñi I, Gurruchaga M, Ginebra MP, Gil FX, Planell JA, Liso PA, Rebueta M, San Román J. Application of tertiary amines with reduced toxicity to the curing process of acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res.* 1997; 34: 129-36.
42. Liso PA, Vázquez B, Rebueta M, Hernaez ML, Rotger R, San Román J. Analysis of the leaching and toxicity of new amine activators for the curing of acrylic bone cements and composites. *Biomaterials.* 1997; 18: 15-20.
43. Rojo L, Vázquez B, Deb S, San Roman J. Eugenol derivatives immobilized in auto-polymerizing formulations as an approach to avoid inhibition interferences and improve biofunctionality in dental and orthopedic cements, *Acta Biomaterialia.* 2009; 5:1616–25.

44. Méndez JA, Aguilar MR, Abraham GA, Vázquez B, Dalby M, Di Silvio L, San Román J. New acrylic bone cements conjugated to vitamin E: Curing parameters, properties and Biocompatibility. *J Biomed Mater Res.* 2002; 62: 299-307.
45. Kim H. M., Lee E. H., Kim C. Y., Chung J. G., Kim S. H., Lim J. P., Shim T. Y. Antianaphylactic properties of eugenol. *Pharmacol Res* 36: 475-480. 1997.
46. Lewis G. Properties of acrylic bone cement: state of the art review. *J Biomed Mater Res.* 1997; 38: 155-82.
47. Vázquez B, Ginebra MP, Gil FJ, Planell JA, López Bravo A., San Román J. Radiopaque acrylic cements prepared with a new acrylic derivative of iodo-quinoline. *Biomaterials.* 1999; 20: 2047-53.
48. Van Hooy-Corstjens CSJ, Govaert LE, Spoelstra AB, Bulstra SK, Wetzels GMR, Koole LH. Mechanical behaviour of a new acrylic radiopaque iodine-containing bone cement. *Biomaterials.* 2004; 25: 2657-67.
49. Zaharia C, Zecheru T, Moreau MF, Pascaretti-Grizon F, Mabilieu G, Marculescu B, Filmon R, Cincu C, Staikos G, Chappard D. Chemical structure of methylmethacrylate-2-[2',3',5'-triiodobenzoyl] oxoethyl methacrylate copolymer, radio-opacity, in vitro and in vivo biocompatibility. *Acta Biomaterialia.* 2008; 4: 1762-9.
50. Jaffe i Scott, 1996 ; Pasquier et al. 1992.
51. Hayek E., Neweseley H., Pentacalcium monohydroxy orthophosphate (hydroxylapatite). *Inorganic Syntheses* 1963;7:63-65.
52. Roy D.M. Linnehan SK. Hydroxyapatite formed from colak skeletal carbonate by hidrotermal exchange *Nature* 1974; 247: 220-22.
53. Sampathkumaran U, De Guire MR, Wang R Hydroxyapatite coatings on titanium. *AdvEng Mater* 3 (6): 401-405 JUN 2001.

54. Kim HM, Miyaji F, Kokubo T, et al. Bonding strength of bonelike apatite layer to Ti metal substrate. *J Biomed Mater Res* 38 (2): 121-127, 1997.
55. Enciclopèdia.cat. Catalunya: Grup Enciclopèdia Catalana, SAU. [2<sup>a</sup> edició; citada 6 febrero 2012]. Disponible en: <http://www.enciclopedia.cat/>.
56. Heimke, G. Bone Replacements: Implant Fixation. *ArgewChem. Adv. Mater.* Vol. 101, Num. 10, 1989, p. 1461.
57. Hench, L.L (1998) *Bioceramics*, *J. Am. Ceramic. Soc.* 81, 1705.
58. Thomas K.A. (1994) Hydroxyapatite coatings, *Orthopaedics*, 17 267.
59. De Bruijn, J.D., van den Brink, I., Mendes, S., Dekker, R., Bovell, Y.P., van Blitterswijk, C.A. (1999) Bone Induction by Implants Coated with Cultures Osteogenic Bone Marrow Cells, *Advents in Dental Research*, 13, 74.
60. Ducheyne, P., Qiu, Q. (1999) Bioactive Ceramics: the Effect of Surface Reactivity on Bone Formation and Bone Cell Function, *Biomaterials*, 20, 2287.
61. Kanazawa, T. (1989) General Background on Phosphate Materials, in Kanazawa (Eds.), *Inorganic Phosphate Materials*, Elsevier, Amsterdam, 1.
62. Tanashi, M., Yao, T., Kokubo, T., Minoda, M., Miyamoto, T., Nakamura, T., Yamauro, T. (1994) Apatite Coating on Organic Polymers by Biomimetic Process, *Journal of American Ceramic Society*, 77, 2805.
63. Tanashi, M., Hata, K., Kokubo, T., Minoda, M., Miyamoto, T., Nakamura, T., Yamamuro, T. (1992) Effect of Substrate on Apatite Formation by a Biomimetic Process, in Yamamuro, T., Kokubo, T., Nakamura, T., *Bioceramics* 5, Kobunshi-Kankokai, Kyoto, 57.
64. Abe, Y., Kokubo, T., Yamauro, T. (1990) Apatite Coating on Ceramics, Metals and Polymers Utilizing a Biological Process, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 1, 233.

65. Kokubo, T., Hata, K., Nakamura, T., Yamamuro, T. (1991) Apatite Formation on Ceramics, Metals and Polymers Induced by a CaO-SiO<sub>2</sub>-Based Glass in a Simulated Body Fluid, in Bonfield, W., Hastings, G.W. and Turner, K.E. (Eds), *Bioceramics 4*, Butterworth-Heinemann, Guilford, 120.
66. Takadama, H., Miyaji, F., Kokubo, T., Nakamura, T. (1997) Bone-like Apatite Layer Formation on Organic Polymers by Biomimetic: TEM-EDX Observation of Initial Stage of Apatite Formation, in Sedel, L., and Rey C. (Eds), *Bioceramics 10*, Elsevier, Amsterdam, 257.
67. Kim, H.-M., Kishimoto, K., Miyaji, F., Kokubo, T., Yao, T., Suetsugu, T., Tanaka, J., Nakamura, T. (2000) Composition and Structure of Apatite Formed on Organic Polymer in Simulated Body Fluid with a High Content of Carbonate Ion, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 11, 421.
68. Kokubo, T., Kushitani, H., Sakka, S., Kitsugi, T., Yamamuro, T. (1990) Solution Able to Reproduce In Vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W, *Journal of Biomedical Materials Research*, 24, 721.
69. Tanashi, M., Yao, T., Kokubo, T., Minoda, M., Miyamoto, T., Nakamura, T., Yamamuro, T. (1994) Apatite Coated on Organic Polymers by Biomimetic Process: Improvement in Its Adhesion to Substrate by NaOH Treatment, *Journal of Applied Biomaterials*, 5, 339.
70. Liu, G.J., Miyaji, F., Kokubo, T., Takadama, H., Nakamura, T., Murakami, A. (1998) Apatite Organic Polymer Composites Prepared by a Biomimetic Process: Improvement in Adhesion of the Apatite Layer to the Substrate by Ultraviolet Irradiation, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 9, 285.
71. Tanashi, M., Yao, T., Kokubo, T., Minoda, M., Miyamoto, T., Nakamura, T., Yamamuro, T. (1995) Apatite Coated on Organic Polymers by Biomimetic Process: Improvement in Its Adhesion to Substrate by HCl Treatment, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 6, 319.

72. Tanashi, M., Yao, T. Kokubo, T., Minoda, M., Miyamoto, T., Nakamura, T., Yamauro, T. (1995) Apatite Coate don Organic Polymers by Biomimetic Process: Improvement in Its Adhesion to Substrate by Glow-discharge Treatment, *Jornal of Biomedical Materials Research*, 29, 349.
73. Liu, GJ, Takadama, H., Miyaji, F., Kokubo, T., Nakamura, T. (1996) Apatite Coated on Organic Polymer by Biomimetic Process: Improvement in Adhesion to substrate by Ultraviolet, in Kokubo, T., Nakamura, T., Miyaji, F. (Eds.), *Bioceramics 9*, Elsevier, Amsterdam, 407.
74. Kim, H.-M., Miyaji, F., Kokubo, T., Nakamura, T. (2000) Revised Simulated Body Fluid, in SandroGiannini and Antonio Moroni (Eds), *Bioceramics 13*, Trans Tech. Publications, Zurich, 47.
75. L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, T. K. Greenlee Jr. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials. *J. Biomed Mater. Res.*, 2 (1), 117-141, 1972.
- 76 Liu Y, Peterson DA, Kimura H, Shubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 1997;69:581-593.
77. Denizot F, Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *J Immunol Meth* 1986;89:271-277.
78. Nakayama GR, Caton MC, Nova MP, Parandoosh Z. Assessment of the Alamar Blue assay for cellular growth and viability in vitro. *J ImmunolMethods* 1997; 204: 205-208.
- 79 Guadarrama D, López M, Brizuela N. Determinación de propiedades mecánicas y temperatura máxima de polimerización de cementos óseos acrílicos modificados con micro y nanopartículas de hidroxiapatita. *Rev Latin Metal Maters* 2011; 31 (1): 91-98
80. Jensen LN, Stürup J, Kramhøft M, Jense JS. Histological evaluation of cortical bone reaction to PMMA cementation. *Acta Orthop. Belg* 1991; 57: 254-259.



81. Méndez JA, Abraham GA, Fernández MM, Vázquez B, San Román J. Self-curing acrylic formulations PMMA/PCL composites: properties and antibiotic release behavior. *J Biomed Mat Res* 2002; 61(1): 66-74.

82. Franco-Marquès E, Méndez JA, Gironès J, Ginebra MP, Pèlach MA. Evaluation of the influence of the addition of biodegradable polymer matrices in the formulation of self-curing polymer systems for biomedical purposes. *Acta Biomaterialia* 2009; 5: 2953-2962