

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica



**DERIVADOS POLIMÉRICOS DE EUGENOL PARA
APLICACIONES BIOMÉDICAS**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR**

Luis Rojo del Olmo

Bajo la dirección de los doctores

M^a Blanca Vázquez Lasa
Julio San Román del Barrio

Madrid, 2008

▪ **ISBN: 978-84-692-0117-6**

TESIS DOCTORAL

DERIVADOS POLIMÉRICOS DE EUGENOL PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

LUIS ROJO DEL OLMO



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS
Departamento de Biomateriales**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica**

MADRID 2008

TESIS DOCTORAL

DERIVADOS POLIMÉRICOS DE EUGENOL PARA APLICACIONES BIOMÉDICAS

LUIS ROJO DEL OLMO

DIRECTORES:

M^a Blanca Vázquez Lasa

Julio San Román del Barrio



**CONSEJO SUPERIOR DE
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE CIENCIA Y
TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS
Departamento de Biomateriales**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE
MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Orgánica**

MADRID 2008

El presente trabajo de investigación, titulado “Derivados poliméricos de eugenol para aplicaciones biomédicas”, ha sido realizado en el Departamento de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC, bajo la dirección de los doctores Dña. Blanca Vázquez Lasa y D. Julio San Román del Barrio, para optar al grado de Doctor en Ciencias Químicas.

*A mis padres y hermano,
a Isabel.*

AGRADECIMIENTOS

Tras meses de escritura, ésta es quizás una de las partes más difíciles de redactar. No quisiera dejar a nadie en el tintero a la hora de mostrar mis agradecimientos ya que son muchos sin duda, los que han aportado en mayor o menor medida su granito de arena y la energía necesaria para llegar a concluir este trabajo. Quisiera agradecer en primer lugar toda su dedicación y apoyo a mis directores Julio y Blanca. Ellos son sin duda los que han hecho posible la realización de esta tesis, estando siempre a mano para compartir su conocimiento así como para orientarme en el diseño experimental, convenciéndome e ilusionándome a cada momento con su perseverancia y optimismo.

No menos importante ha sido el apoyo recibido de mis padres y hermano, los cuales siempre han confiado en el buen final de estos años y que sin duda, han sabido trasmitirme la ilusión necesaria para ser siempre optimista, tanto en los mejores momentos como en aquellos bajones que muy esporádicamente han surgido. Pero si alguien ha compartido conmigo los altibajos de esta tesis, los días, semanas e incluso meses de reacciones que tardan en salir, resultados esperanzadores, viajes maravillosos, capítulos interminables y al final del todo, alegrías conseguidas a base de esfuerzo y trabajo compartido, ha sido Isabel. Suyo es sin duda el mérito de convivir y sobrevivir a esta tesis alentando con su apoyo la ilusión puesta en este proyecto. Han sido en fin todos ellos, junto con el resto de la familia, Sandra, Remedios, Ana, Raúl y Benito compañeros siempre presentes a mi lado, durante todos estos años.

Mucho hay que agradecer también a los compañeros de laboratorio que han ido compartiendo espacio y tiempo durante estos cuatro años. Ellos han sido cómplices y colaboradores en el trabajo, aprendizaje, mañanas y vivencias del día a día en el laboratorio. Es imposible nombrar a todos sin olvidar a otros muchos pero no puedo cerrar estos agradecimientos sin mencionar a los que más directamente han compartido todos estos momentos, empezando por los antiguos compañeros de la biocosa. A José Alberto que coincidimos poco pero fructíferamente. A Palo, Elena, y Nieves germen las tres del alma más alegre del grupo, y a los que resisten de entonces Mar, Curra, Gema y Luis Rodríguez, amigos, maestros y compañeros inigualables de aventuras y desventuras. A Carlos y Alberto por su ayuda y muy especialmente a Juan por su inestimable y eficiente colaboración a nivel celular. A los manchegos Luis García y Marisa que le dieron otro acento al grupo. A Diego, singular cordobés y excelente compañero, a Dani que a pesar de todo siempre fue un bio y a Joana, la fiestera incansable. A los visitantes Juan Cauich, Carlos Peniche, Luciano, Eva, Cessare, Ricardo y Paula que llegaron para contarnos historias de otros lugares y por supuesto a las últimas adquisiciones, Lucena, Felisa, Lorena y Paco (suerte con los eugenoles!!).

A mi grupo adoptivo de Policondensación, empezando por Javier, José y Ángel, que aceptaron de buen grado la invasión y se han adaptado al bio del fondo. Cómo no a mis compañeros de terraza, Vanesa sintonizando Radio Olé, Cesar... singular compañero y amigo al que aunque parezca mentira le cogí el ritmo, a Mariola que me duró poco y a Carolina que aunque no lo crea, le deseo lo mejor. A Dulce cuyo nombre es más un adjetivo y Eva auténtico ejemplo a seguir que, junto con Alberto, Yolanda, Paula, David y Ricardo compartí la locura del fondo.

Del grupo de modificación cómo no agradecer a Carmen, Daniel, Rebeca, Emiliano, Rodrigo y por supuesto a Miguel, ese gran discípulo y amigo que tanto tiene que sorprenderme todavía.

No se me pueden olvidar Mari Mar, David y Fernando que le dieron vida al otro lado del pasillo, ni tampoco David al microscopio. Por supuesto Alex y Aída allá en Química Orgánica, con los que tomando una caña un día empezó todo esto y finalmente, agradecer a Ramón González y José Barcenillas del Instituto de Fermentaciones Industriales, su paciencia y orientación en el trabajo con bacterias.

Al grupo de biomateriales del Dental Institute de Londres con Sanjukta Deb a la cabeza y muy especialmente a Kenny y Sussan que junto con Lucy, Lit, Ricard y Eleni me acogieron en aquella ciudad haciéndome sentir un auténtico Londoner. A Sussi Borzacchiello, Juliano, Maria Grazia, Maurizio, Sabatino, Geppi, Maria y Vittorio por sacarme de apuros en Nápoles.

Por último a todos los amigos que me han apoyado incluso durante mis ausencias Bruno, Antonio, Víctor, Diego, Laura, Esther, Fran, Vanesa, José Ángel y Maria.

A todos ellos, y a los que no aparecen pero sin duda merecen,

Mil Gracias!!

ABREVIATURAS

AA: Ácido acrílico.

AB: Reactivo Alamar Blue.

AIBN: Azobisisobutironitrilo.

ATR-FTIR: Espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier por reflectancia total atenuada.

BHI: Medio de cultivo de infusión de cerebro y corazón.

BPO: Peróxido de benzoilo.

BZN: 4,4' - Bis(dimetil amino) difenil carbinol.

¹³C: Carbono-13.

CIV: Cementos ionómero de vidrio.

CMR: Contenido en monómero residual.

D: Grado de disgregación, coeficiente de difusión.

DMSO: dimetil sulfóxido.

DMT: N,N-dimetilamino-4-toluidina.

DS: Desviación estándar.

DSC: Calorimetría diferencial de barrido.

Eg: Eugenol.

EEgMA: Metacrilato de etoxieugenilo.

EgMA: Metacrilato de eugenilo.

EMA: Metacrilato de etilo.

FL: Fase líquida.

FS: Fase sólida.

G': Módulo de almacenamiento.

G'': Módulo de pérdidas.

¹H: Protón.

H: Grado de hidratación.

HEMA: Metacrilato de 2-hidroxietilo.

HMQC: Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation.

IC₅₀: Concentración inhibitoria media.

INT: 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio.

LB: Medio de cultivo de Luria.

MEg: Monómero derivado de eugenol.

MEM: Medio mínimo esencial.

M_n: Peso molecular promedio en número.

MMA: Metacrilato de metilo.

MTT: [bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio].

M_w: Peso molecular promedio en peso.

PAA: Poli(ácido acrílico).

p(AA-co-EgMA): Sistema copolimérico de AA con EgMA.

PBS: Tampón fosfato salino.

PE: Polietileno.

PEEgMA: Poli(metacrilato de etoxieugenilo).

PEgMA: Poli(metacrilato de eugenilo).

PEMA: Poli(metacrilato de etilo).

p(EMA-co-EEgMA): Sistema copolimérico de EMA con EEgMA.

p(EMA-co-EgMA): Sistema copolimérico de EMA con EgMA.

PET: Poli(terftalato etilo).

PF: Punto de fusión.

HEMA: Poli(metacrilato de 2-hidroxietilo).

p(HEMA-co-EEgMA): Sistema copolimérico de HEMA con EEgMA.

p(HEMA-co-EgMA): Sistema copolimérico de HEMA con EgMA.

PMMA: Poli(metacrilato de metilo).

PP: Polipropileno.

PTFE: Poli(tetrafluoroetileno)

PU: Poliuretano.

PVA: Poli(alcohol vinílico).

PVC: Poli(cloruro de vinilo).

RMN: Resonancia magnética nuclear.

σ_C: Resistencia a la compresión.

σ_F: Resistencia a la flexión.

σ_{TD}: Resistencia a la tensión diametral.

σ_{3P}: Resistencia a la flexión en tres puntos.

σ_{4P}: Resistencia a la flexión en cuatro puntos.

SEC: Cromatografía de exclusión de tamaños.

SEM: Microscopía electrónica de barrido.

T_g: Temperatura de transición vítrea.

t_s: Tiempo de fraguado.

t_w: Tiempo de trabajo.

TGA: Análisis termogravimétrico.

TISAB: Tampón de ajuste de fuerza iónica.

TMX: Poliestireno Thermanox®.

UCF: Unidades formadoras de colonias.

VR: Viabilidad celular relativa.

ZOE: Cementos de óxido de zinc y eugenol.

	<u>PÁGINA</u>
I. INTRODUCCIÓN.	1
I.1.- BIOMATERIALES. DEFINICIÓN, TIPOS Y CLASIFICACIÓN.	3
I.2.- BIOMATERIALES POLIMÉRICOS.	5
I.3.- FUNCIONALIZACIÓN DE POLÍMEROS CON MOLÉCULAS BIOACTIVAS.	8
I.4.- EUGENOL, PROPIEDADES Y ANCLAJE A SISTEMAS POLIMÉRICOS.	11
I.5.- CEMENTOS ACRÍLICOS AUTOCURABLES EN APLICACIONES DE TEJIDO DURO.	13
I.6.- CEMENTOS AUTOCURABLES EN APLICACIONES DENTALES.	20
I.7.- BIBLIOGRAFÍA.	24
II. OBJETIVOS.	29
CAPÍTULO 1. MATERIALES Y MÉTODOS.	33
1.1.- OBTENCIÓN DE LOS MONÓMEROS DERIVADOS DE EUGENOL.	35
1.1.1.- REACTIVOS.	35
1.1.2.- SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DEL METACRILATO DE EUGENILO.	35
1.1.3.- SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DEL METACRILATO DE ETOXIEUGENILO.	36
1.1.4.- CARACTERIZACIÓN DE LOS MONÓMEROS DERIVADOS DE EUGENOL.	37
1.2.- SISTEMAS POLIMÉRICOS DERIVADOS DE EUGENOL. ...	38
1.2.1.- OBTENCIÓN DE POLÍMEROS Y COPOLÍMEROS SOLUBLES.	38

	<u>PÁGINA</u>
1.2.1.1.- REACTIVOS.	38
1.2.1.2.- REACCIONES DE POLIMERIZACIÓN Y COPOLIMERIZACIÓN.	38
1.2.1.3.- CARACTERIZACIÓN DE LOS HOMOPOLÍMEROS Y COPOLÍMEROS.	39
1.2.2.- OBTENCIÓN DE POLÍMEROS Y COPOLÍMEROS INSOLUBLES EN MASA, A ALTA CONVERSIÓN.	41
1.2.2.1.- REACTIVOS.	41
1.2.2.2.- REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN.	41
1.2.2.3.- CARACTERIZACIÓN DE LOS HOMOPOLÍMEROS Y COPOLÍMEROS.	42
1.2.2.4.- DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD.	42
1.2.2.5.- DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE. ...	42
1.2.2.6.- REOLOGÍA DE SISTEMAS ENTRECruzADOS.	43
1.2.2.7.- COMPORTAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE LOS COPOLÍMEROS A ALTA CONVERSIÓN. HUMECTABILIDAD, GRADO DE HIDRATACIÓN Y LIBERACIÓN DE EUGENOL DE LOS POLÍMEROS DERIVADOS DE EUGENOL.	44
1.3.- ESTUDIOS DE BIOCMPATIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE LOS DERIVADOS ACRÍLICOS DE EUGENOL.	46
1.3.1.- CITOTOXICIDAD DE MONÓMEROS.	48
1.3.2.- LIBERACIÓN DE COMPONENTES. ENSAYO MTT.	50
1.3.3.- MORFOLOGÍA CELULAR, PROLIFERACIÓN Y ADHESIÓN CELULAR BAJO MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE BARRIDO AMBIENTAL.	52
1.3.4.- PROLIFERACIÓN CELULAR. ENSAYO ALAMAR BLUE. ...	53
1.3.5.- MUERTE CELULAR. ENSAYO LDH.	55
1.4.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DE MONÓMEROS Y POLÍMEROS DERIVADOS DE EUGENOL.	58
1.4.1.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DE MONÓMEROS.	58
1.4.2.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DE POLÍMEROS.	60

	<u>PÁGINA</u>
1.5.- FORMULACIONES AUTOCURABLES DERIVADOS DE EUGENOL.	61
1.5.1.- CEMENTOS ACRÍLICOS DERIVADOS DE EUGENOL.	61
1.5.1.1.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS ESFÉRICAS DE POLI(METACRILATO DE ETILO).	65
1.5.1.2.- PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS CEMENTOS ACRÍLICOS.	67
1.5.2.- CEMENTOS DE IONÓMEROS DE VIDRIO DERIVADOS DE EUGENOL.	75
1.5.2.1.- SÍNTESIS DEL COPOLÍMERO DE ÁCIDO ACRÍLICO Y METACRILATO DE EUGENILO p(AA-co-EgMA).	75
1.5.2.2.- FORMULACIÓN Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS CEMENTOS IONÓMERO DE VIDRIO. ..	76
1.6.- BIBLIOGRAFÍA.	82
CAPÍTULO 2. MONÓMEROS ACRÍLICOS DERIVADOS DE EUGENOL.	85
2.1.- INTRODUCCIÓN.	87
2.2.- OBTENCIÓN DEL MONÓMERO METACRILATO DE EUGENILO (EgMA).	88
2.3.- OBTENCIÓN DEL MONÓMERO METACRILATO DE ETOXIEUGENILO (EEgMA).	89
2.4.- CARACTERIZACIÓN DE LOS MONÓMEROS DERIVADOS DE EUGENOL.	91
2.5.- EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD.	99
2.6.- ACCIÓN BACTERICIDA DE LOS MONÓMEROS.	101
2.7.- DISCUSIÓN.	104
2.8.- BIBLIOGRAFÍA.	107

	<u>PÁGINA</u>
CAPÍTULO 3. SISTEMAS POLIMÉRICOS DERIVADOS DE EUGENOL.	111
3.1.- INTRODUCCIÓN.	113
3.2.- CONCEPTOS GENERALES DE POLIMERIZACIÓN.	114
3.2.1.- HOMOPOLIMERIZACIÓN Y COPOLIMERIZACIÓN RADICAL.	114
3.2.2.- PRINCIPALES TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS.	124
3.3.- OBTENCIÓN DE POLÍMEROS Y COPOLÍMEROS SOLUBLES.	130
3.3.1.- HOMOPOLÍMEROS DE EMA, EgMA Y EEgMA.	130
3.3.2.- COPOLÍMEROS DE p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA). ..	139
3.3.2.1.- COMPOSICIÓN DE LOS COPOLÍMEROS.	142
3.3.2.2.- RELACIONES DE REACTIVIDAD.	144
3.3.2.3.- PROBABILIDADES CONDICIONALES.	148
3.3.3.- DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES.	149
3.3.4.- PROPIEDADES TÉRMICAS DE HOMO Y COPOLÍMEROS. ...	150
3.4.- HOMOPOLÍMEROS Y COPOLÍMEROS EN MASA A ALTA CONVERSIÓN.	153
3.4.1.- OBTENCIÓN DE HOMO Y COPOLÍMEROS EN MASA DE LOS DERIVADOS DE EUGENOL.	153
3.4.2.- ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE LOS COPOLÍMEROS EN MASA.	155
3.4.3.- PROPIEDADES TÉRMICAS DE HOMO Y COPOLÍMEROS. ...	158
3.4.4.- DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD.	164
3.4.5.- DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE.	164
3.4.6.- CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA.	165
3.4.7.- COMPORTAMIENTO <i>IN VITRO</i> DE LOS COPOLÍMEROS EN MASA.	169
3.4.8.- EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD <i>IN VITRO</i> DE SISTEMAS POLIMÉRICOS.	174

	<u>PÁGINA</u>
3.4.8.1.- LIBERACIÓN DE COMPONENTES, ENSAYO MTT. .	174
3.4.8.2.- MORFOLOGÍA Y PROLIFERACIÓN CELULAR BAJO MICROSCOPIA ÓPTICA.	176
3.4.8.3- PROLIFERACIÓN CELULAR. ENSAYO ALAMAR BLUE (AB).	178
3.4.8.4.- MORFOLOGÍA CELULAR, ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN BAJO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO AMBIENTAL.	181
3.4.8.5.-MUERTE CELULAR. ENSAYO LDH.	184
3.4.9.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS POLÍMEROS Y COPOLÍMEROS EN MASA.	187
3.5.- DISCUSIÓN.	189
3.6.- BIBLIOGRAFÍA.	198
CAPÍTULO 4. APLICACIONES ESPECIALES DE LOS DERIVADOS ACRÍLICOS DE EUGENOL.	205
4.1.- CEMENTOS ACRÍLICOS AUTOCURABLES DERIVADOS DE EUGENOL.	207
4.1.1.- INTRODUCCIÓN.	207
4.1.2.- OBTENCIÓN DE LAS PARTÍCULAS ESFÉRICAS DE POLI(METACRILATO DE ETILO).	209
4.1.3.- FORMULACIONES AUTOCURABLES DERIVADOS DE EUGENOL.	213
4.1.3.1.- PARÁMETROS DE CURADO.	213
4.1.3.2.- MONÓMERO RESIDUAL.	215
4.1.3.3.- PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS CEMENTOS ACRÍLICOS DERIVADOS DE EUGENOL.	216
4.1.3.4.- PROPIEDADES TÉRMICAS DE LOS CEMENTOS ACRÍLICOS DERIVADOS DE EUGENOL.	222
4.1.4.- DISCUSIÓN.	225

	<u>PÁGINA</u>
4.2.- CEMENTOS IONÓMEROS DE VIDRIO DERIVADOS DE EUGENOL.	229
4.2.1.- INTRODUCCIÓN.	229
4.2.2.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL COPOLÍMERO DERIVADO DE ÁCIDO ACRÍLICO Y EUGENOL, p(AA-co-EgMA). ..	232
4.2.3.- FORMULACIÓN Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS CEMENTOS IONÓMERO DE VIDRIO.	234
4.2.3.1.- PARÁMETROS DE CURADO.	234
4.2.3.2.- PROPIEDADES MECÁNICAS.	236
4.2.3.3.- ESTUDIO DE ABSORCIÓN DE AGUA.	237
4.2.3.4.- LIBERACIÓN DE FLUORURO Y pH SUPERFICIAL. .	239
4.2.3.5.- CARACTERIZACIÓN TOPOLÓGICA.	240
4.2.4.- DISCUSIÓN.	241
4.3.- BIBLIOGRAFÍA.	244
III. RESUMEN GENERAL Y CONCLUSIONES.	249

I.- INTRODUCCIÓN.

I. INTRODUCCIÓN.

I.1.- BIOMATERIALES. DEFINICIÓN, TIPOS Y CLASIFICACIÓN.

El uso de diversos materiales con aplicación en medicina se remonta a la antigüedad, aunque es sin embargo, durante el transcurso de los cincuenta últimos años cuando esta disciplina sufre un espectacular avance. El desarrollo de nuevas tecnologías así como el avance continuo que experimenta el conocimiento científico en este tiempo, hace posible extender la aplicabilidad de una amplia gama de materiales tanto naturales como sintéticos en todos los campos de la medicina moderna.

El término biomaterial deriva de la implantación de estos materiales en el seno de organismos vivos. No es sin embargo hasta 1986 en Chester (Reino Unido), cuando se establece una primera definición considerando como un biomaterial aquel material no vivo usado como dispositivo médico y cuya finalidad es interactuar con un sistema biológico.¹ Esta primera definición, ampliamente discutida en diversos foros científicos, se desarrolla hasta llegar a una mucho más amplia surgida del consenso entre los diferentes especialistas en 1991 de nuevo en Chester. A partir de entonces se considera como biomaterial cualquier material diseñado para actuar interfacialmente con sistemas biológicos con el fin de evaluar, aumentar o sustituir algún tejido, órgano o función del cuerpo.²

De este modo para que un biomaterial cumpla con las expectativas requeridas a su función, ha de cumplir una serie de requisitos como son poseer una biofuncionalidad específica, esto es, cumplir con la función para la que ha sido diseñado, presentando además una respuesta en términos de biocompatibilidad aceptable.³ Esta última característica afecta además tanto al material en sí como a los productos derivados de la degradación físico-química de éste. La medida de la biocompatibilidad es sin embargo algo más complejo de evaluar. Esto se debe a que la respuesta biológica puede ser tomada en cuenta a distintas escalas, por ejemplo desde las células que componen el tejido adyacente hasta la respuesta inmunológica del paciente e incluso la pura supervivencia de éste.

Por último ha de tenerse en cuenta el carácter multidisciplinar de la ciencia de los biomateriales ya que ésta engloba distintas técnicas y disciplinas, desde el diseño hasta la implantación final del material en el seno del organismo. El éxito de ésta, por consiguiente, involucra tanto a médicos como a ingenieros, químicos, biólogos y un largo etcétera de especialistas.

Existe una gran variedad de materiales aptos para su uso en aplicaciones biomédicas. La elección de uno u otro para una aplicación determinada viene condicionada por sus propiedades físico-químicas así como por la respuesta del material frente a la función para la que ha sido diseñado. Así, en unos casos se busca resistencia mecánica, como en implantes óseos, y en otros casos por ejemplo, una serie de propiedades químicas que les hacen aptos para actuar como soportes de liberación de fármacos, etc.

APLICACIÓN	TIPO DE MATERIAL
Implantes para fijación dental	Alúmina, fosfato cálcico, aleaciones Ti-Al-V, acero inoxidable, polietileno
Corazón artificial	Poliuretano
Piel artificial	Composites de silicona-colágeno
Lentes intraoculares	PMMA, hidrogeles
Cementos óseos	PMMA, hidroxiapatita
Prótesis articulares	Titanio, aleaciones Ti-Al-V, acero inoxidable
Tendones artificiales y ligamentos	PTFE, PET

Tabla. I.1 Aplicaciones de algunos biomateriales usados en medicina.

La tabla I.1 muestra algunos de los implantes más usados en el mundo cada año, en la que aparecen distintos tipos de materiales como son metales, polímeros, etc.

Dada la diversidad de estos materiales, la clasificación de los biomateriales se puede abordar desde diferentes puntos de vista. Así de manera general y atendiendo a su naturaleza química existen tres grupos principales:⁴

- Metálicos: Ti, acero inoxidable, etc.
- Cerámicos: Hidroxiapatita, alúmina, fosfatos, etc.
- Poliméricos: Polietileno, poli(metacrilato de metilo), poli(ácido láctico), etc.

Los metales son ampliamente usados como biomateriales en multitud de dispositivos, principalmente en prótesis, implantes dentales y accesorios de cementos óseos, destacando principalmente el titanio y sus aleaciones. Su uso mayoritario se centra en el campo de implantes en tejido óseo ya que poseen unos excelentes niveles de oseointegración así como propiedades mecánicas.⁵

Los biomateriales cerámicos se componen de materiales inorgánicos no metálicos.⁶ En este grupo destaca la hidroxiapatita y los biovidrios. Este tipo de materiales presenta en general buena biocompatibilidad y prestaciones mecánicas para su uso en cirugía dental y reparaciones óseas.

Por último se encuentran los biomateriales de origen polimérico, que engloban a un grupo muy amplio de materiales, enormemente desarrollado en las últimas décadas. Las propiedades finales dependen principalmente de la naturaleza química de la cadena polimérica. Su uso se remonta a mediados del siglo XX con la incorporación de poli(metacrilato de metilo) (PMMA) a formulaciones dentales. Desde entonces los materiales poliméricos se usan para un gran número de aplicaciones como son implantes dentales, obtención de prótesis y dispositivos ortopédicos, sistemas de liberación de fármacos y un largo etcétera.⁷ Su amplia difusión se debe en parte a la versatilidad de éstos así como a su relativo bajo coste.

I.2.- BIOMATERIALES POLIMÉRICOS.

Los polímeros para su aplicación como biomateriales suelen clasificarse dependiendo de su origen en dos grandes grupos, naturales y sintéticos. Los polímeros naturales, o biopolímeros, más importantes son los que se encuentran en los seres vivos y se caracterizan por presentar homogeneidad molecular, en la ordenación de las unidades que lo forman. La gran variedad de polímeros naturales como la celulosa, almidón, caucho, etc., los convierten en una fuente casi inagotable de materiales, sin

embargo muchas veces su aplicabilidad se ve reducida por algunos problemas derivados de su naturaleza, así como por la gran versatilidad y disponibilidad en el diseño de materiales sintéticos con propiedades seleccionadas casi a medida y que minimizan en muchos casos la respuesta inmunológica asociada a los polímeros de origen natural.

Los polímeros sintéticos se obtienen por dos vías principalmente.⁸ En la primera, o polimerización por adición, la cadena polimérica crece por la incorporación de las unidades estructurales mediante mecanismos radicalarios o iónicos, mientras que en el segundo tipo, o polimerización por condensación, las macromoléculas se forman mediante reacciones entre moléculas bi o multifuncionales con la eliminación de moléculas más pequeñas como agua, HCl, etc. El método de preparación del material influye decisivamente en las propiedades finales del material variando sus características fisicoquímicas como pueden ser el peso molecular, densidad, etc.

Las posibilidades de obtener macromoléculas con propiedades específicas se amplía aún más cuando se lleva a cabo la polimerización de dos o más monómeros diferentes, proceso denominado copolimerización. Las reacciones de copolimerización son muy importantes tanto desde el punto de vista teórico como práctico permitiendo profundizar en el conocimiento de reactividad de los monómeros, de los radicales, de los iones carbonio, etc. Desde el punto de vista práctico, la copolimerización permite preparar un número ilimitado de compuestos poliméricos variando la naturaleza y la cantidad relativa de los monómeros en el medio de reacción así como la distribución secuencial de las unidades a lo largo de las cadenas, lo que permite el diseño de compuestos con propiedades específicas para aplicaciones concretas.

Debido a esta gran versatilidad en su composición y propiedades se encuentran infinidad de aplicaciones clínicas en las que los biomateriales poliméricos juegan un papel principal. La figura I.1 muestra alguno de los dispositivos biomédicos más usados en la actualidad constituidos por materiales poliméricos.⁹

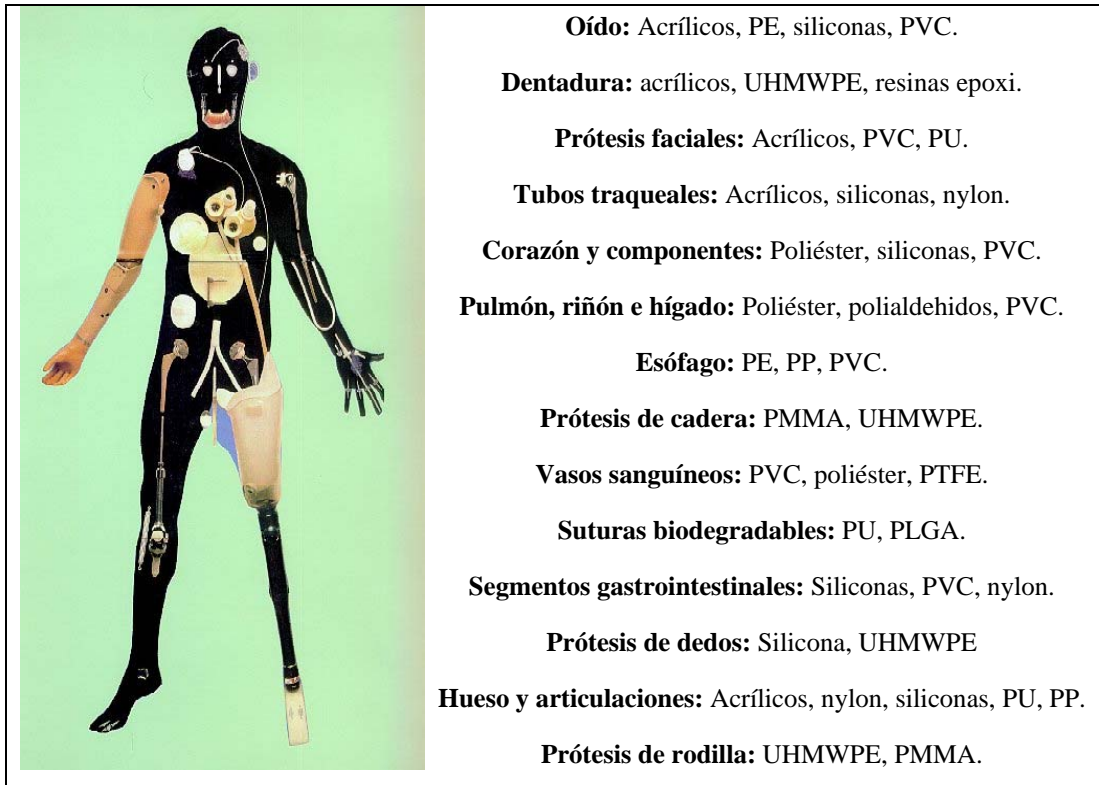


Figura I.1 Aplicaciones más comunes de los polímeros usados como biomateriales.

La selección de un polímero para su uso en aplicaciones quirúrgicas, dermatológicas, ortopédicas, oftalmológicas, farmacéuticas, etc., viene determinado principalmente por su estructura química y física. Es por eso que la caracterización de estas propiedades sea una parte muy importante en el desarrollo de estos nuevos materiales.

Los polímeros usados en el medio biológico se pueden clasificar en tres grandes grupos.¹⁰ La que podemos llamar primera generación de biomateriales consisten en sistemas bioestables con propiedades físicas similares a las del tejido a reparar o sustituir, con una respuesta a cuerpo extraño minimizada, o con la menor toxicidad posible. Este tipo de materiales está diseñado para aplicaciones a largo plazo donde la pérdida de dichas propiedades a lo largo del tiempo se produzca en muy baja extensión. Algún ejemplo de estos polímeros son el PE y el PMMA, materiales ambos totalmente aceptados y de uso normal hoy en día.

La segunda generación de biomateriales se caracteriza principalmente por su bioactividad, provocando en su entorno una reacción controlada y participando en procesos de unión con tejidos vivos. Estos polímeros son además bioabsorbibles o biodegradables. Algunos ejemplos de estos materiales son las suturas a base de poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico) y sus respectivos copolímeros utilizados para la obtención de placas, tornillos y clavos ampliamente usados en reparación ortopédica y quirúrgica de naturaleza ósea.

En la década de los 90 surge la tercera generación de biomateriales basados en la combinación de los caracteres bioactivos y bioabsorbibles de los biomateriales de segunda generación junto con el objetivo de ayudar a la regeneración de los tejidos a reparar o sustituir una vez implantados. Surge con ellos la ingeniería de tejidos¹¹ basada en la preparación de tejidos u órganos vivos en procesos de reparación y reemplazo, usando células que se multiplican en matrices extracelulares de naturaleza polimérica de origen natural o sintético. Otro ejemplo de biomaterial de tercera generación son los llamados materiales biomiméticos que combinan la química macro y supramolecular con el fin de copiar aspectos biológicos como la organización de membranas celulares, redes citoesqueléticas, etc., y aplicarlas al diseño y preparación de nuevos biomateriales.

I.3.- FUNCIONALIZACIÓN DE POLÍMEROS CON MOLÉCULAS BIOACTIVAS.

Como se ha visto, los polímeros poseen unas excelentes cualidades para su uso en dispositivos biomédicos. Además éstos pueden combinarse física y/o químicamente con otras biomoléculas tales como enzimas, anticuerpos, medicamentos o incluso células vivas y microorganismos, para proporcionar sistemas biológicamente funcionales.¹² Estos sistemas pueden presentarse tanto en disolución como en estado sólido y actúan como soportes de las biomoléculas mediante uniones covalentes o iónicas. Los soportes sólidos se presentan en muy diversas formas como fibras, membranas, sistemas porosos, etc. Cuando estos sistemas son además hinchables en medio acuoso se convierten en hidrogeles, pudiéndose utilizar como elementos de liberación controlada de las biomoléculas u organismos seleccionados.

Existen principalmente tres métodos de inmovilización de estas biomoléculas en función de las interacciones presentes entre el soporte y la sustancia a inmovilizar.^{13,14,15} En primer lugar se encuentran los métodos basados en procesos de adsorción física donde la molécula activa se encuentra adherida al sustrato mediante fuerzas de Van der Waals, electrostáticas, etc. El segundo tipo consiste en la inmovilización mediante atrapamiento físico en sistemas barrera, hidrogeles, etc. Por último, el método de anclaje químico conlleva la unión covalente a sustratos solubles o superficies sólidas que pueden prepararse mediante modificación y posterior funcionalización de las superficies, o bien mediante polimerización de moléculas biológicamente activas a través de grupos polimerizables y que dejen accesibles la parte activa para su interacción con el medio fisiológico. La figura I.2 muestra esquemáticamente algunos de los métodos más comunes para la preparación de estas matrices poliméricas con la funcionalidad unida químicamente.

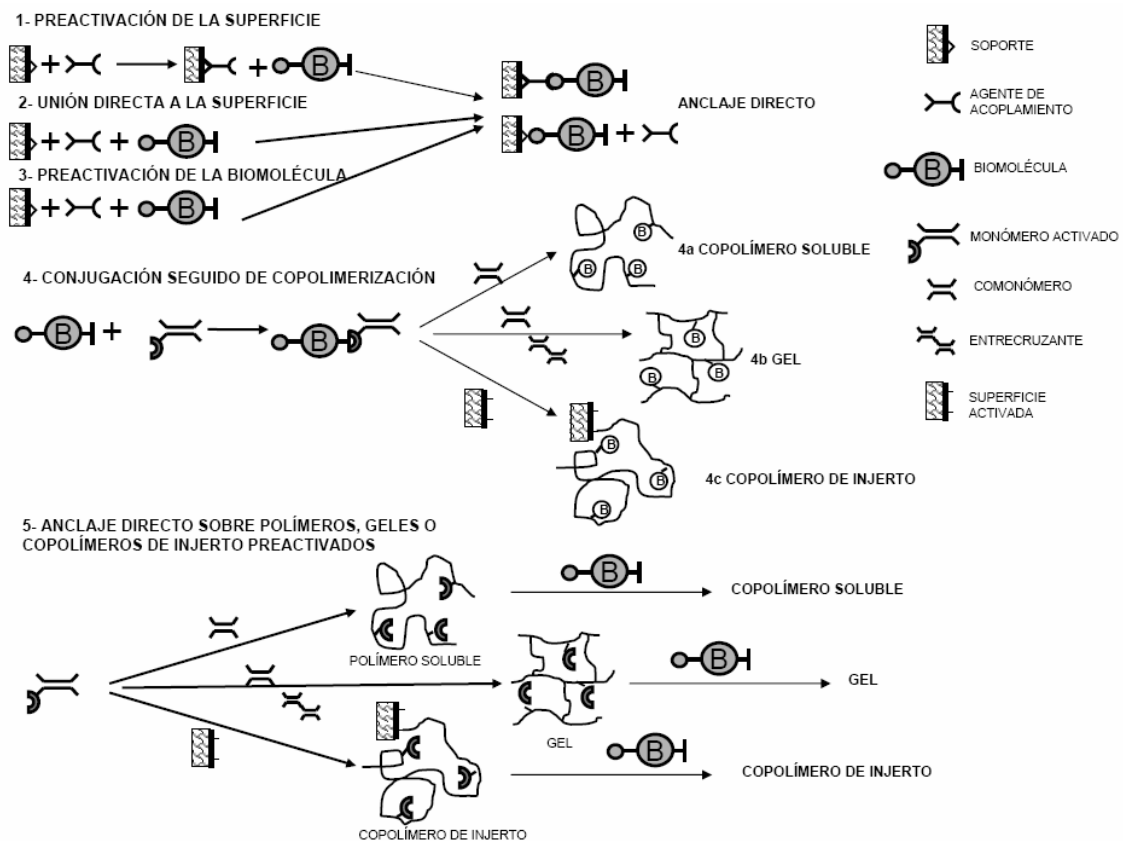
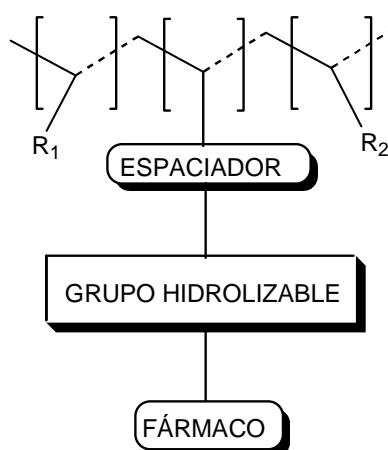


Figura I.2 Esquema representativo de los distintos métodos de inmovilización covalente de biomoléculas.

Las biomoléculas inmovilizadas pueden también unirse a las matrices poliméricas a través de un grupo espaciador¹⁶ que proporciona mayor movilidad estérica y por tanto mayor actividad, principalmente en el caso de moléculas pequeñas. Estos grupos espaciadores pueden ser también hidrolizables o biodegradables haciendo posible la liberación de la sustancia activa al medio fisiológico.¹⁷

En estos sistemas polímero-biomolécula de anclaje químico, la velocidad de liberación del fármaco o molécula activa viene controlada principalmente por la velocidad de hidrólisis del enlace fármaco-soporte. El modelo más aceptado a la hora del diseño de estos sistemas es el propuesto por Ringsdorf¹⁸ que considera que el enlace covalente que se produce entre el fármaco y el sistema polimérico debe establecerse a través de grupos funcionales que puedan ser hidrolizados en un medio fisiológico. Gracias a la gran cantidad de posibilidades ofrecidas por la química macromolecular, desde un punto de vista sintético es posible combinar propiedades como el carácter hidrófilo e hidrófobo, la reactividad hidrolítica o incluso interacciones específicas con enzimas y receptores. Como se muestra en la figura I.3, el modelo teórico sugerido por Ringsdorf presenta tres componentes importantes que se pueden incorporar a sistemas macromoleculares mediante copolimerización de los correspondientes monómeros con la composición adecuada para producir la mejor acción terapéutica.



R_1 = Grupo soluble: hidrófilo-hidrófobo
 R_2 = Grupo orientador

Figura I.3 Modelo de sistema polímero-fármaco con anclaje químico.

En general, el primer componente se diseña con el objetivo de proporcionar al sistema un carácter hidrófilo o hidrófobo adecuado para el lugar de acción. Para ello se introducen en la cadena polimérica unidades comonoméricas en composición y distribución microestructural capaces de modular el carácter hidrófilo tales como el metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), metacrilato de metilo (MMA), etc.

El segundo componente es el que soporta al agente bioactivo y que dota de funcionalidad al polímero. Consiste en unidades incorporadas a la cadena polimérica en la que la molécula bioactiva se une covalentemente bien directamente, o bien por medio de grupos separadores de cadena que aumenten la flexibilidad y la movilidad de la cadena lateral, disminuyendo el efecto estérico de los grupos vecinos, con lo que se facilita la acción farmacológica del principio anclado. En general, los grupos separadores son segmentos oxietilénicos para sistemas hidrófilos y cadenas hidrocarbonadas para sistemas hidrófobos. Si la unión de estos separadores de cadena con el polímero o con el fármaco se produce a través de grupos hidrolizables tales como anhídridos, carbonatos, ésteres, uretanos, ortoésteres y amidas,¹⁹ estos compuestos pueden ser liberados al medio circundante actuando como sistemas liberadores de fármacos.

Se puede introducir en el sistema un tercer componente para aplicaciones específicas como un elemento comonomérico que le confiera una funcionalidad extra como pueda ser un receptor de diana terapéutica, etc.²⁰

I.4.- EUGENOL, PROPIEDADES Y ANCLAJE A SISTEMAS POLIMÉRICOS.

Como se ha visto en el apartado anterior, la química macromolecular proporciona un sinnúmero de posibilidades a la hora de obtener polímeros funcionalizados dotados de propiedades específicas. Siguiendo esta filosofía ha surgido en las últimas décadas innumerables ejemplos de biopolímeros que han logrado un elevado porcentaje de aceptación y que muestran muy buenos resultados en los campos en los que se aplican. Sin embargo, en la mayoría de los casos es imposible evitar ciertos procesos asociados a su implantación en el medio fisiológico como son las reacciones adversas

de irritación, inflamación, etc. Las infecciones derivadas de su implantación son además, una de las principales causas de fallo en el implante de estos biomateriales.²¹ De hecho, la presencia de un cuerpo extraño, como es un biomaterial sintético, proporciona *a priori* un sitio preferente para el asentamiento de microorganismos.²² La dotación de propiedades analgésicas, antioxidantes y bactericidas, entre otras, a las cadenas poliméricas para su incorporación en nuevos dispositivos biomédicos supone un reto en la actualidad para la aplicación de estos materiales como implantes médicos.

En este sentido, la molécula de eugenol presenta unas características biológicas que le convierten en un candidato muy interesante para el desarrollo de este tipo de dispositivos. El eugenol (4-alil-2-metoxifenol)²³ constituye el componente principal (70 – 90 %) de los aceites esenciales de la planta del clavo *Eugenia caryophyllata Thunb*, extrayéndose mediante digestión alcalina (10% NaOH) de la planta y posterior destilación. Este compuesto viene siendo usado desde el siglo XIX como agente aromático en una gran variedad de productos farmacéuticos y alimenticios. Pero su principal aplicación es como componente de cementos dentales en combinación con óxido de zinc (cementos ZOE).²⁴

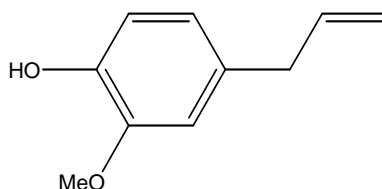


Figura I.4 Estructura química del eugenol (4-alil-2-metoxifenol).

La molécula de eugenol presenta unas propiedades muy interesantes para su uso en materiales destinados a aplicaciones en cirugía ortopédica y dental. Este compuesto, posee propiedades analgésicas y antiinflamatorias con capacidad de reducir el dolor en tejidos próximos a la dentina, a pesar de no ser un verdadero analgésico local.²⁵ Además, el eugenol presenta una potente actividad antimicrobiana frente a microorganismos típicos en procesos carióticos. Posee también cierta actividad antiagregante y antipirética.^{26,27} La literatura recoge también la capacidad antianafiláctica de esta molécula mediante la prevención de la degranulación de mastocitos causantes de reacciones de hipersensibilidad.²⁸ Por último, el eugenol actúa

como agente antioxidante previniendo los procesos típicos de peroxidación de lípidos en las primeras etapas de procesos inflamatorios²⁹ actuando como agente captador de radicales libres.

Debido a sus excelentes características biológicas, el eugenol se ha usado desde hace más de un siglo en materiales dentales.³⁰ En la actualidad su uso está ampliamente extendido en combinación con óxido de zinc como materiales de relleno de cavidades y canales dentales, en los que el eugenol al reaccionar con el óxido de zinc juega el papel de agente de obturación, a la vez de agente calmante del tejido próximo al cemento. Sin embargo, su introducción en materiales poliméricos se ha visto muy limitada debido a la presencia del grupo fenílico, el cual participa como agente captador de radicales libres,³¹ inhibiendo los procesos de polimerización radical necesarios para generar polímeros acrílicos en presencia de eugenol.³²

La modificación química de la estructura de eugenol por incorporación de restos acrílicos hace posible minimizar este efecto sin apenas alterar sus efectos beneficiosos permitiendo a los derivados de éste en de reacciones de polimerización en lugar de inhibirlas y por tanto ampliar su uso en el campo de materiales dentales y ortopédicos.

I.5.- CEMENTOS ACRÍLICOS AUTOCURABLES EN APLICACIONES DE TEJIDO DURO.

El cemento acrílico es el componente más frecuentemente utilizado en cirugía ortopédica para la fijación de prótesis articulares y como material de relleno de cavidades óseas.³³ Los cementos acrílicos de PMMA se empezaron a utilizar por primera vez en los años 50 en aplicaciones de cirugía dental,³⁴ pero no fue hasta la década de los 60 cuando su uso se extendió en cirugía ortopédica, para la fijación parcial o total de articulaciones de cadera y extendiéndose más tarde a otras como la de rodilla.^{35,36} En estos inicios, el cemento acrílico no actuaba como un agente de adhesión entre el hueso y la prótesis, sino como medio transmisor de esfuerzos entre la prótesis articular y el hueso, consiguiendo la fijación de éste al tejido óseo a través del relleno de huecos existentes entre ambas superficies. Aunque es actualmente una técnica aceptada en la implantación de prótesis de cadera y de rodilla, en muchos casos las revisiones

llevadas a cabo en pacientes en los que han sido implantadas, muestran la necesidad del reemplazo de las prótesis, produciéndose un gran coste económico y social.

La fijación de prótesis mediante cementos óseos se puede considerar como una técnica de fácil aplicación, mostrando una buena adaptación a cavidades de perfiles complejos, creando una buena fijación primaria entre el hueso y el implante, permitiendo así una rápida recuperación del paciente. Sin embargo, la falta de fijación secundaria provoca el aflojamiento a largo plazo, siendo ésta su principal desventaja. La reacción de curado del cemento además es altamente exotérmica,³⁷ lo que puede provocar necrosis celular en los tejidos circundantes. Por último, ha de considerarse la toxicidad de productos liberados al medio fisiológico como pueden ser restos de la amina terciaria usada como activador, monómero residual, etc., y que pueden inducir procesos inflamatorios y citotóxicos.

Los cementos acrílicos de curado en frío o autocurables, se preparan a partir del mezclado de sus componentes comercializados en dos fases; una sólida, de composición principalmente polimérica y otra líquida, de naturaleza monomérica.

La fase sólida está constituida principalmente por partículas de poli(metacrilato de metilo) (PMMA), en una proporción del 87-90 % p/p de la masa total de esta fase, en forma de micropartículas preparadas mediante polimerización radical en suspensión del monómero. La distribución de tamaños de partícula y diámetro de éstas influye en la homogeneidad del material final, siendo mayor cuanto menor es su tamaño. En algunos casos se introducen copolímeros en porcentajes cercanos al 5% p/p con el fin de mejorar algunas de las propiedades físicas del material final. Otro componente de la fase sólida es el iniciador radicalario que se añade en un 2-3% p/p del total de la fase sólida. Éste da lugar al inicio de la reacción de polimerización siendo el más frecuentemente usado el peróxido de benzoilo (BPO). El 10% p/p restante de la fase sólida está constituido por un compuesto de naturaleza inorgánica que actúa como agente radiopaco para permitir el posterior seguimiento radiológico del cemento y su evolución tras la intervención quirúrgica. Este componente es frecuentemente una sal u óxido metálico, como el sulfato de bario o el óxido de zirconio.³⁸

La fase líquida por su parte, contiene el monómero polimerizable que, en la mayoría de las formulaciones es el metacrilato de metilo (MMA), constituyendo el 97-99% p/p de la masa líquida total. Para evitar el proceso de autopolimerización durante el almacenamiento se le añade 75-100 ppm de éter metílico de hidroquinona (EMHQ), que actúa como inhibidor. Como último componente de la fase líquida, necesario para la formulación de los cementos óseos acrílicos, está el activador de la iniciación radical, que se añade en un 1-3% p/p de la fase líquida, siendo el más frecuentemente usado la N,N-dimetil-4-toluidina (DMT).³⁹ Su función consiste en inducir la descomposición del iniciador a baja temperatura para dar lugar a radicales libres encargados de iniciar la reacción de polimerización del monómero.

La figura I.5 muestra un esquema de los componentes de una formulación convencional de cementos acrílicos autocurables.

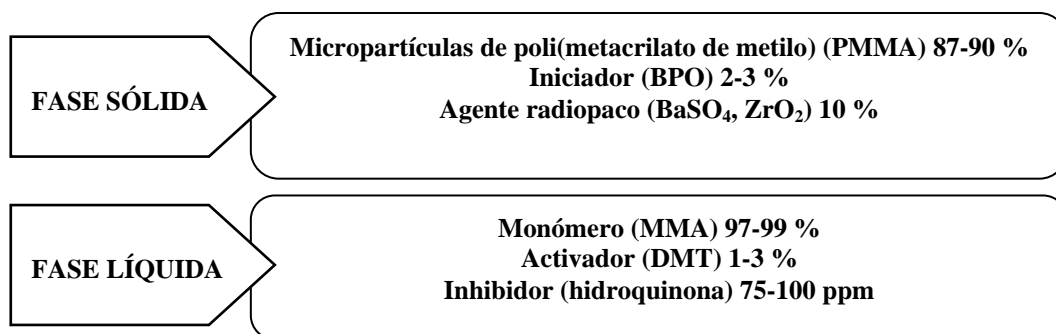


Figura I.5 Componentes de un cemento óseo acrílico convencional.

El curado de los cementos óseos acrílicos engloba tanto procesos físicos como químicos y se inicia en el momento en el que se mezclan las fases sólida y líquida. En un principio el cemento consiste en una masa viscosa que en pocos minutos pierde fluidez, observándose un importante cambio en su consistencia a lo largo de los 15-20 minutos que dura el proceso, hasta alcanzar el estado rígido.

Los procesos físicos involucrados en el curado incluyen una serie de etapas llamadas arenosa, fibrosa, pastosa y de fraguado o curado, en las que tienen lugar una serie de fenómenos como la solvatación de las partículas de PMMA por el MMA, la

difusión de éste hacia las partículas de PMMA, la disolución parcial del polímero en el monómero y la evaporación del monómero.

Los aspectos químicos del fraguado de cementos óseos acrílicos son bastante complejos como consecuencia de la simultaneidad de varias reacciones químicas. De ellas, la reacción principal es la polimerización en masa del monómero, que da lugar a la formación de un material bifásico compuesto de partículas de PMMA embebidas en una matriz de MMA polimerizado. La polimerización en masa del MMA es de tipo adición por vía radical, con iniciación activada a baja temperatura, seguida de las etapas de propagación y terminación.

El sistema iniciador más usado es el redox, formado por el peróxido de benzoilo (BPO) y una amina terciaria, normalmente la N,N-dimetil-4-toluidina. El mecanismo de activación con formación de radicales libres primarios se representa en la figura I.6. Aunque este mecanismo no está totalmente esclarecido, se admite de forma general la formación de un complejo cíclico entre las moléculas de la amina terciaria aromática y las moléculas del iniciador, que posteriormente se descompone para dar lugar a la formación de radicales benzoato. Así mismo, por espectroscopía ultravioleta del polímero formado se ha detectado la formación de radicales metil-amino que tiene lugar por transferencia de un protón del grupo N-metilo.

La elección del PMMA como componente principal de los cementos óseos acrílicos se debe principalmente a su bioestabilidad así como a las posibilidades de adaptación que ofrecen las formulaciones prepolimerizadas. Sin embargo la necesidad de dotar de distintas funcionalidades a las formulaciones de cementos óseos acrílicos ha promovido el desarrollo de nuevas modificaciones que den como resultado un mayor campo de aplicación.

La modificación tanto de la metodología de preparación como la composición en ambas fases sólida y líquida, constituyen las vías más prometedoras para mejorar las prestaciones finales del material como puedan ser sus propiedades mecánicas, modificación de la porosidad, mejora de la biocompatibilidad, etc.

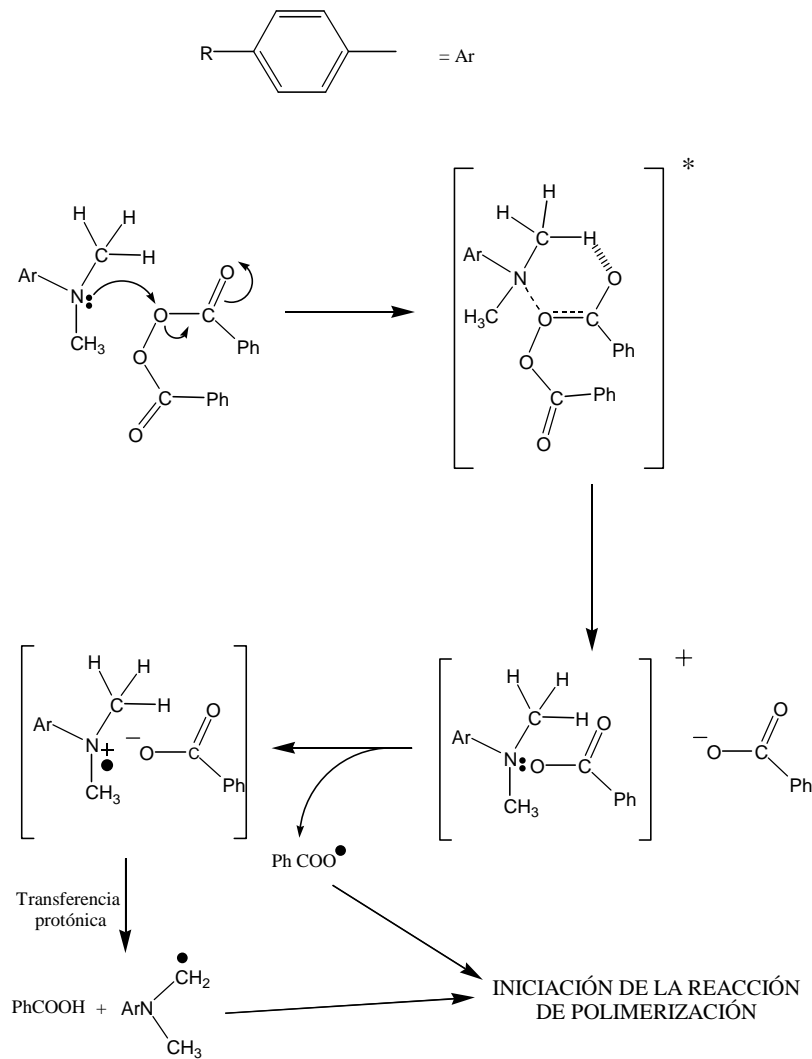


Figura I.6 Mecanismo de iniciación redox BPO/amina de la reacción de polimerización de cementos óseos acrílicos.

Dentro del ámbito de la mejora de las propiedades físicas, los mejores resultados se consiguen mediante la aplicación de un ligero vacío a la masa polimerizante, reduciendo así la inclusión de aire y evitando la aparición de burbujas y poros, que dan lugar a una pérdida de propiedades mecánicas.⁴⁰ También la aplicación de relaciones sólido:líquido mayores conducen a la obtención de temperaturas de curado más bajas, pero con una menor penetración en los intersticios de la cavidad ósea.⁴¹

La adición de nuevos componentes de distinta naturaleza a la fase sólida como componentes biodegradables o compuestos que aumenten la porosidad, introducen

avances significativos en cuanto a la mejora de respuesta tanto mecánica como biológica de este tipo de cementos.⁴²

La sustitución de las partículas de PMMA por otras de polímeros acrílicos con mayor flexibilidad de cadena mejoran, entre otras características, las propiedades mecánicas del material, la temperatura de curado y la transmisión de esfuerzos entre la prótesis y el hueso. En este sentido, la introducción de manera total o parcial de partículas de poli(metacrilato de etilo) (PEMA) conduce a la obtención de cementos con mejores propiedades mecánicas aumentando su ductilidad y la resistencia a la fatiga, presentando además menor temperatura de curado⁴³ y niveles más bajos de monómero residual⁴⁴ además de una mejor respuesta del tejido circundante en términos de niveles de necrosis, intensidad de procesos inflamatorios, etc.^{45,46}

La fase líquida por su parte también es objeto de modificaciones para mejorar las propiedades finales de los cementos acrílicos. Una de las modificaciones con mejores resultados es la sustitución del activador de la iniciación por otros de menor toxicidad. Aunque no se ha demostrado que la DMT es intrínsecamente cancerígena, los estudios revelan que causa alteraciones en los cromosomas^{47,48} y es un claro inhibidor de la síntesis de proteínas, interfiriendo en los procesos de mineralización.⁴⁹ La obtención de nuevas aminas activadoras que disminuyen dicha citotoxicidad se presenta como un campo de investigación muy amplio. Compuestos tales como 4-(dimetilamino)fenetanol,⁵⁰ incluida en formulaciones comerciales (Sulfix 60), N,N-dihidroxipropil-4-toluidina (Boneloc),⁵¹ arilaminas, N,N-dimetilaminobencil alcohol y metacrilato de N,N-dimetilaminobencilo,^{52,53} disminuyen la actividad citotóxica, con respecto a la N,N-dimetilamino-4-toluidina.

Por otra parte la adición de nuevos monómeros a la fase líquida, sustituyendo parcial o totalmente el metacrilato de metilo, por otros monómeros de mayor peso molecular o de propiedades diferentes, o la adición de agentes de entrecruzamiento se encuentra documentada en la literatura con resultados muy destacables en la mejora de las propiedades mecánicas, aumento de niveles de biocompatibilidad, etc.

Como ya se ha comentado, los cementos acrílicos se comienzan a usar clínicamente en el campo de la odontología³⁴ aplicándose fundamentalmente en el

relleno de cavidades producidas por caries, dientes artificiales y sistemas de adhesión, extendiéndose posteriormente su uso en la cirugía ortopédica, a la fijación de componentes protésicos de cadera y rodilla. Igualmente se emplea en la fijación de prótesis de articulación temporomandibular y para estabilizar el componente glenoideo en dichas prótesis. El poli(metacrilato de metilo) se utiliza también en ocasiones, en las reconstrucciones totales articulares tanto como sustancia cementante y como agente o material de relleno cuando quedan huecos entre el implante y el hueso.⁵⁴

Más recientemente, al comprobarse que la infección consistía un problema serio en la sustitución protésica de cadera se desarrolla la idea de incorporar antibióticos al cemento óseo. Así, el antibiótico se encuentra disperso en las partículas de PMMA sobre áreas óseas infectadas en la cirugía protésica de revisión o en otras áreas de osteomielitis crónica y, de esta forma, se consigue que el antibiótico se libere gradualmente manteniendo concentraciones activas durante varios meses.⁵⁵

Los cementos acrílicos además son ampliamente aplicados como material de reparación en cirugía craneofacial⁵⁶ para la osteoplastia de defectos óseos en hueso frontal y techo orbitario así como para la reconstrucción de defectos masivos cráneo-órbito-faciales⁵⁷ entre otras muchas aplicaciones reconstructivas.

Otra aplicación importante de los cementos acrílicos es su utilización para el tratamiento de algunos tumores. Esto, se basa en el hecho que durante el proceso de fraguado se alcanza una temperatura elevada, lo cual llega a producir necrosis en el tejido existente alrededor. Así, se emplea para el tratamiento de tumores como el de células gigantes yuxtaarticular, el cual, a pesar de su naturaleza esencialmente benigna, presenta el problema de que el curetaje simple de la lesión presenta un elevado índice de recurrencia a los cinco años.⁵⁸

Los cementos acrílicos se utilizan también como agente de relleno en defectos óseos y para estabilizar segmentos vertebrales, sobre todo a nivel cervical.⁵⁹ Aunque no es una fijación perfecta, resulta útil en pacientes de baja demanda que no requieren movilidad de ese segmento de la columna. Las fracturas patológicas asociadas a la osteoporosis han adquirido gran importancia en los últimos años debido a su elevada frecuencia y al coste social que suponen anualmente, tanto desde el punto de vista

económico como social. El PMMA y, más recientemente, los cementos de fosfato cálcico reabsorbibles, se muestran útiles para aumentar el poder estabilizador de los tornillos en el hueso osteoporótico. Tradicionalmente se aplica el PMMA antes de introducir el tornillo, lo cual conduce a la existencia de capas de cemento muy variables y a una pobre penetración del cemento en el hueso. Aunque el PMMA tiene propiedades adhesivas, funciona más como un material de relleno si bien, el cemento que penetra en el hueso trabecular puede incrementar la capacidad estabilizadora del tornillo. Las vertebroplastias están siendo evaluadas para el tratamiento de fracturas por compresión en la vértebra osteoporótica donde, el PMMA, se introduce en el cuerpo vertebral por vía percutánea.⁶⁰

Recientemente se ha desarrollado un nuevo uso del cemento óseo, consistente en el recubrimiento de superficies articulares para favorecer el crecimiento del hueso y cartílago allí donde existe daño articular. En estudios preliminares, se ha visto que la inyección de cemento en tales defectos facilita la formación de hueso y cartílago además de reparar la superficie articular.⁶¹

Este trabajo recoge la formulación de sistemas acrílicos autocurables con propiedades biológicas específicas obtenidas a partir de una fase sólida compuesta de partículas esféricas de PEMA y de una fase líquida compuesta por metacrilato de etilo y monómeros derivados de eugenol, así como la evaluación de sus propiedades fisicoquímicas, mecánicas y biológicas.

I.6.- CEMENTOS AUTOCURABLES EN APLICACIONES DENTALES.

La odontología moderna utiliza tres tipos fundamentales de materiales⁶² que son los destinados a la impresión, las dentaduras y los materiales restauradores. La finalidad de este último grupo es la de corregir defectos y lesiones en la superficie dental. Dentro del grupo de materiales restauradores se engloban los llamados cementos dentales que son materiales que endurecen para actuar como bases aislantes, fundas cavitarias, material de relleno o adhesivos de prótesis a la estructura dental.⁶³ Cuando el curado de estos materiales tiene lugar mediante una reacción ácido-base los cementos resultantes

se conocen como cementos AB⁶⁴ existiendo cinco tipos fundamentales clasificados según el tipo de vidrio básico utilizado (figura I.7). De ellos, sólo los cementos de policarboxilato de cinc y los cementos de ionómero de vidrio se han utilizado satisfactoriamente. Debido a su gran versatilidad, este último tipo de cementos ha sido objeto de un gran desarrollo en los últimos años convirtiéndose gradualmente en alternativa a los cementos de policarboxilato de cinc.

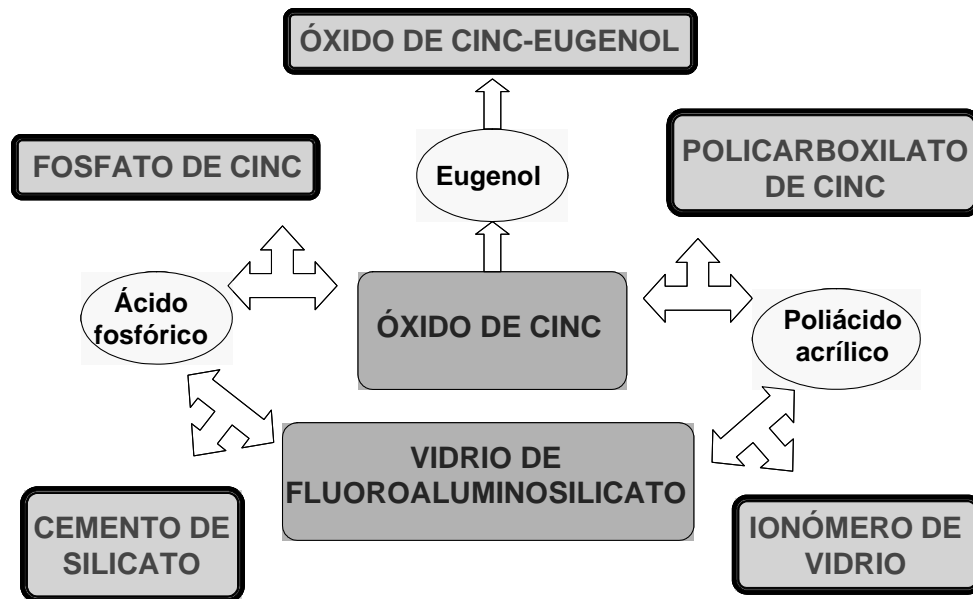


Figura I.7 Esquema de los cinco tipos principales de cementos dentales ácido-base.

Los cementos de ionómero de vidrio consisten en redes interpenetradas de compuestos inorgánicos (cristales de fluoroaluminosilicato cálcico) y orgánicos (polímeros de ácidos carboxílicos insaturados) formando una matriz con partículas de vidrio embebidas en ellas.^{63,64,65} En las formulaciones originales el componente ácido constaba únicamente de poli(ácido acrílico). En la actualidad se utilizan tanto de manera experimental como comercial, numerosas formulaciones en las que se ha variado esta composición para obtener materiales con mejores prestaciones. Algunas de estas variaciones son por ejemplo, la incorporación de homopolímeros de ácido fosfórico vinílico o de copolímeros de ácido acrílico y ácido maléico, o itacónico. Estos ácidos se añaden con el objetivo de incrementar la reactividad de la fase líquida, disminuir la viscosidad y reducir la tendencia a la gelificación, etc. La fase sólida de los cementos comerciales, se basa fundamentalmente en polvos de sílice y alúmina mezclados con iones calcio, flúor y en ocasiones iones fosfato. Además, los cementos ionómero de

vidrio pueden contener otros aditivos encargados de controlar el proceso de curado, tales como el ácido tartárico.

Estos cementos dentales se dispensan como un sólido y un líquido, o únicamente como un sólido que necesita de la mezcla con agua para iniciar la reacción. El curado de un cemento de ionómero de vidrio se produce principalmente debido a una reacción de neutralización que se inicia al mezclar cada una de las fases componentes del cemento o bien mediante la adición de agua sobre la fase sólida correspondiente. El cemento curado consiste en una aglomeración de partículas de vidrio rodeadas de un gel de sílice y una matriz amorfa entrecruzada de polisales de calcio y aluminio hidratadas. Los cementos de ionómero de vidrio presentan además la característica de unirse químicamente al esmalte y la dentina durante el proceso de curado.

Otra de las ventajas de estos cementos es su capacidad de liberación continuada de fluoruro que previene la formación de caries secundarias, además de presentar una buena biocompatibilidad. Sin embargo la resistencia de estos cementos no es muy elevada presentando otras desventajas tales como un tiempo de trabajo corto, curado inicial lento y sensibilidad a la humedad. A pesar de estos inconvenientes la combinación de propiedades hace de los cementos ionómero de vidrio un material con un gran número de aplicaciones en odontología clínica como material de relleno y restauración de piezas dentales, agente de cementación para sujeción de prótesis y aparatos de ortodoncia, sellador de fisuras, funda para cavidades producidas por caries y en general como material restaurador estético. Existen además otras aplicaciones de este tipo de cementos fuera del ámbito de la odontología, en el campo de los biomateriales⁶⁶ como material de vendaje entablillado o como cemento óseo.⁶⁷

El uso de resinas acrílicas, por su parte está muy extendido en el campo de la odontología abarcando múltiples aplicaciones de las que cabe destacar los cementos de restauración, dientes artificiales, bases para prótesis, fondos de cavidades y materiales de obturación provisional.⁶⁸

La función de los cementos tradicionales es proporcionar retención por entrelazado entre las irregularidades menores de la superficie dentaria y la superficie de la restauración. De esto se deduce que las propiedades físicas más importantes son su

resistencia compresiva y transversal además de tener baja solubilidad y en lo posible adhesión al tejido dental. Entre la amplia gama de cementos disponibles en el mercado, los basados en resinas, fundamentalmente de bis-GMA autopolimerizable, pueden usarse para cementar cualquier tipo de restauración permanente, aunque fueron pensados en un principio para fijar puentes y férulas dentales. Como solo contienen una pequeña cantidad de relleno de partícula fina y presentan baja viscosidad, permiten conseguir pequeños grosores de película de cemento.

Los dientes artificiales por su parte, pueden fabricarse de porcelana o de resinas acrílicas. Los dientes de porcelana no se unen químicamente a la base acrílica de la prótesis y requieren retención mecánica, lo que a su vez exige espacio adecuado en la base de la prótesis, que normalmente existe en las prótesis acrílicas. Los dientes de resinas acrílicas forman una asociación química adecuada con la base acrílica pero, debido al alto nivel de entrecruzamiento del componente acrílico empleado en los dientes, esta unión no es siempre fiable, por lo que a menudo se recomienda también en estos dientes, retención mecánica. Existen también dientes que emplean un agente de entrecruzamiento de elevado peso molecular como el diuretano dimetacrilato, cargado con un 27% de sílice de microrelleno y que le confiere al material una resistencia a la abrasión intermedia entre los dientes de porcelana y los dientes acrílicos convencionales.

Los materiales para bases de las prótesis pueden construirse en acrílico, aleación de cromo-cobalto, acero inoxidable y ocasionalmente en aleación de oro. En cualquiera de los casos los materiales deben ser suficientemente rígidos para transmitir las fuerzas oclusales al tejido de soporte de la forma más repartida posible, a la vez que suficientemente flexibles para soportar la concentración de cargas, presentando a su vez una buena resistencia a fatiga y al impacto, fuerzas éstas características de los procesos de masticación. Estos materiales basados en polimetacrilato autopolimerizable se utilizan en una relación sólido:líquido baja para facilitar el vaciado de la mezcla no fraguada en el molde y tener suficiente tiempo para que el monómero impregne y difunda por las partículas de polímero, produciendo una matriz más homogénea.

En el campo de las coronas y puentes, una alternativa para cavidades sin retención, especialmente cuando están contraindicados los elementos retentivos porque

la cavidad va a ser restaurada con un agente de sellado, es usar un material confeccionado a base de polimetacrilato junto con otros materiales acrílicos como diuretanos dimetacrilatos, butilmetacrilatos, etc. La fortaleza y la resistencia a la abrasión de estos materiales, a pesar de no ser la ideal, es considerablemente mejor que la de otros materiales disponibles en el mercado.

I.7.- BIBLIOGRAFÍA.

- 1 Williams D. F. Proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. *Elsevier*. 1987.
- 2 Williams D. F., Black J., Doherty P. J. Second consensus conference on definition in biomaterials. Biomaterials-Tissue Interfaces. *Elsevier*. 1992.
- 3 Williams D. F. Biocompatibility of Implant Materials. *Sector Publishing Limited*. 1976.
- 4 Vallet Regi M., Munuera L. Biomateriales: Aquí y Ahora. *Dykinson*. Madrid. 2000.
- 5 Bronzino J. D. The Biomedical Engineering Handbook. *CRC Press*. Boca Ratón. 1995.
- 6 Kingery W. D., Bowen H. K., Uhlmann D. R. Introduction to Ceramics. 2ª ed. *Wiley*. New York. 1976.
- 7 Lee H. B. Application of synthetic polymers in implants. En *Frontiers of Macromolecular Science*. *Blackwell Scientific Publications*. Oxford. 1989.
- 8 Odian G. Principles of Polymerization. 4ª ed. *Wiley Interscience*. New Jersey. 2004.
- 9 Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E. Biomaterials Science. *Academic Press*. San Diego. 1996.
- 10 Elvira, C.; Abraham, G. A.; Gallardo, A.; Vázquez, B.; San Román, J. Biomateriales poliméricos. En *Ciencia y Tecnología de Materiales Poliméricos; Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros (CSIC)*. Madrid. 2004.
- 11 San Román J., Gallardo A., Elvira C., Vázquez B., López-Bravo A., de Pedro J. A., Tomás D. Contribution of polymeric supports to the development of tissue engineering. *Macromol Symp* 168: 75-89. 2001.
- 12 Piskin E., Hoffman A. S. Polymeric Biomaterials. *M. Nijhoff*. Dordrecht. 1986.
- 13 Stara G. R. Biochemical Aspects of Reactions on Solid Supports. *Academic Press*. New York. 1971.
- 14 Zaborsky O. Immobilized Enzymes. *CRC Press*. Cleveland. 1973.

-
- 15 Dunlap B. R. Immobilized Biochemicals and Affinity Chromatography. *Plenum*. New York. 1974.
 - 16 Cutrecasa P. Anfinsen C. B. Affinity chromatography. *Ann Rev Biochem* 40: 259-278. 1971.
 - 17 Kopecek J. Soluble biomedical polymers. *Polymer Med* 7: 191-221. 1977.
 - 18 Ringsdorf H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J Polym Sci Polym Symp* 51: 135-153. 1975.
 - 19 Lewis D. H. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. *Dekker*. Nueva York. 1991.
 - 20 Sinko P., Kohn J. Polymeric drug delivery systems. En Polymeric Delivery Systems. Properties and Applications. *ACS Symposium series* 18. 1993.
 - 21 Carlson G. A., Dragoo J. L., Samimi B., Bruckner D. A., Bernard G. W., Hedrick M., Benhaim P. Bacteriostatic properties of biomatrices against common orthopaedic pathogens. *Biochem Bioph Res Co* 321: 472-478. 2004.
 - 22 Kenawy E-R., Abdel-Hay F. I., El-Magd A. A., Mahmoud Y. Synthesis and antimicrobial activity of some polymers derived from modified amino polyacrylamide by reacting it with benzoate esters and benzaldehyde derivatives. *J Appl Polym Sci* 99: 2428-2437. 2006.
 - 23 The Merck Index. 11^a ed. *Merck & Co Inc*. Rahway. 1989.
 - 24 Markowitz K., Moynihan M., Liu M. S., Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol - A clinically oriented review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 73: 729-737. 1992.
 - 25 Sticht F. D., Smith P. M. Eugenol: Some pharmacologic observations. *J Dent Res* 50: 1531-1535. 1971.
 - 26 Feng J., Lipton J. M. Eugenol: Antipyretic activity in rabbits. *Neuropharmacology* 26: 1775-1778. 1987.
 - 27 Laekeman G. M., Van Hoof L., Haemers A., Vanden Berghe D. A., Herman A. G., Vlietinck A. Eugenol a valuable compound for *in vitro* experimental research and worthwhile for further *in vivo* investigation. *J Phytother Res* 4: 90-96. 1990.
 - 28 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: 475-80. 1997.
 - 29 Tyler V. E., Brady L.R., Roberts J.E. Pharmacognosy. 7^a ed. *Lea&Febiger*. Philadelphia. 1976.

-
- 30 Yuwono M., Siswandono Hafid A. F., Poernomo A. T., Ail M., Indrayanto G., Ebel S. Eugenol en Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. USA. *Elsevier Science* 29: 149-177. 2002.
- 31 Fujisawa S., Kadoma Y. Action of eugenol as retarder against polymerisation of methyl methacrylate by benzoyl peroxide. *Biomaterials* 18: 701-703. 1997.
- 32 Hotz P., Schlatter D., Lussi A. The modification of the polymerisation of composite materials by eugenol-containing temporary fillings. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 102: 1461-1466. 1992.
- 33 Kühn K. D. Bone Cements. *Springer*. Berlin. 2000.
- 34 Sweeny W. T. Acrylic resins in prosthetic dentistry. *Dent Clin North Am* 2: 593-601. 1958.
- 35 Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Jt Surg* 42B: 28-30. 1964.
- 36 Charnley J. Fracture of femoral prosthesis in total hip replacement. *Clin Orthop Rel Res* 111: 105-120. 1975.
- 37 Kusy R. P. Characterization of self-curing acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res* 12: 271-305. 1978.
- 38 De Wijn J. R., Slooff T. J. J. M., Driessens F. C. M. Characterisation of bone cements. *Acta Orthop Scand* 46: 38-51. 1975.
- 39 Brauer G. M., Davenport R. M., Hansen W. G. Autoaccelerating effects of amines in polymerization of methylmethacrylate. *Modern Plastics* Nov: 153-256. 1956.
- 40 Wixson R. L., Lautenschlager E. P., Novak M. A. Vacuum mixing of acrylic bone cements. *J Arthroplast* 2: 141-149. 1987.
- 41 Hadjari M., Reindel E. S., Hollis J. M., Convery F. R. Proceedings of the 16th Annual Meeting of the Society for Biomaterials. *Society for Biomaterials* 105. 1990.
- 42 Deb S. A review of improvements in acrylic bone cements. *J Biomater Appl* 14: 17-47. 1999.
- 43 Weightman B., Freeman M. A. R., Revell P. A., Braden M., Albrektsson B. E. J., Carlson L. V. The mechanical properties of cement and loosening of the femoral component of hip replacements. *J Bone Joint Surg* 69B: 558-564. 1987.
- 44 Davy K. W. M., Bradem M. Residual monomer analysis in acrylic polymers. *Biomaterials* 12: 540-544. 1991.

-
- 45 Revell P. A., George M., Braden M., Freeman M. A. R., Weightman B. Experimental studies of the biological response to a new bone cement: I Toxicity of n-butylmethacrylate monomer compared with methylmethacrylate monomer. *J Mater Sci Mater Med* 3: 84-87. 1992.
- 46 Revell P. A., Braden M., Weightman B., Freeman M. A. R., Experimental studies of the biological response to a new bone cement: II Soft tissue reactions in rat. *Clin Mater* 10: 233-238. 1992.
- 47 Stea S., Granchi D., Zolezzi C., Ciapetti G., Visentin M., Cavedagua D., Pizzoferrati A. High-performance liquid chromatography assay of N,N-dimethyl-p-toluidine release from bone cements: evidence of toxicity. *Biomaterials* 18: 243-246. 1997.
- 48 Taningher M., Pasquini R., Bonatti S. Genotoxicity analysis of N,N-dimethylaniline and N,N-dimethyl-p-toluidine. *Environ Mol Mutagen* 21: 349-356. 1993.
- 49 Bigatti M. P., Lamberti L., Rizzi F. P., Cannas M., Allasia G. *In vitro* micronucleus induction by polymethyl methacrylate bone cement in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 321: 133-137. 1994.
- 50 Fritsch E. W. Static and fatigue properties of two new low-viscosity PMMA bone cements improved by vacuum mixing. *J Biomed Mater Res* 31: 451-456. 1996.
- 51 Trap B., Wolf P., Jensen J. S. Acrylic bone cements: Residual and extractability of methacrylate monomers and aromatic amines. *J Appl Biomed* 3: 51-57. 1992.
- 52 Vázquez B., Elvira C., Levenfeld B., Pascual B., Goñi I., Gurruchaga M., Ginebra M. P., Gil F. X., Planell J. A., Liso P. A., Rebuelta M., San Román J. Application of tertiary amines with reduced toxicity to the curing process of acrylic bone cements. *J Biomed Mater Res* 34: 129-136. 1997.
- 53 Liso P. A., Vázquez B., Rebuelta M., Hernaez M. L., 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* 18: 15-20. 1997.
- 54 Mercuri L. G. Measurement of the heat of reaction transmitted intracranially during polymerisation of methyl methacrylate cranial bone cement used in stabilization of the fossa component of an alloplastic temporomandibular joint prosthesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 74: 137-142. 1992.
- 55 Vecsei V., Barquet A. Treatment of chronic osteomyelitis by necrectomy and gentamicin-PMMA beads. *Clin Orthop* 159: 201-207. 1981.

-
- 56 Habal M. B., Leake D. L. Experience in reconstructive surgery of craniomaxillofacial deformities with osteomesh, eleven year experience. *Mat Res Soc Symp Proc* 55: 105-113. 1986.
- 57 Lynkins C. L., Friedman C. D., Costantino P. D., Horioglu R. Hydroxyapatite cement in craniofacial skeletal reconstruction and its effects on the developing craniofacial skeleton. *Arch Otorrinolaringol Head Neck Surg* 124: 153-159. 1998.
- 58 Person B. M., Wouters H. W. Curettage and acrylic cementation in surgery of giant cell tumors of bone. *Clin Orthop* 120: 125-133. 1976.
- 59 Mathis J. M., Barr J. D., Belkoff S. M., Barr M. S., Jensen M. E., Deramond H. Percutaneous vertebroplasty. A developing Standard of care for vertebral compression fractures. *Am J Neuroradiol* 22: 373-381. 2001.
- 60 Cotten A., Boury N., Cortet B., Assaker R., Demondion X., Leblond D., Chastanet P., Dukesnoy B., Deramond H. Percutaneous vertebroplasty: state of the art. *Radiographics* 18: 311-323. 1998.
- 61 Hardouin P. Bone cements and their uses in orthopaedics and rheumatology. *Presse Med* 25: 1860-1862. 1996.
- 62 Silver F. H. Biomaterials, Medical Devices and Tissue Engineering. An Integrated Approach. 1ª Ed. *Chapman & Hall*. Londres. 1994.
- 63 Smith D. C. En Dental Materials and Their Selection, 3ª ed. *Quintessence Publishinig Co. Inc.* Chicago. Capítulo 9: 132-155. 2002.
- 64 Combe E. C., Burke F. J. T., Douglas W. H. Dental Biomaterials, 1ª ed. *Kluwer Academia Publishers*. Capítulo 23: 191-195. 1999.
- 65 Van Noort, R. Introduction to Dental Materials. 2ª ed. *Mosby-Elsevier Science*. Capítulo 2.3. 124-132. 2002.
- 66 Nicholson J. W. Glass-ionomers in medicine and dentistry. *Proc Inst Mech Eng* 212: 121-126. 1998.
- 67 Wasson E. A., Nicholson J. W. Glass-ionomer cements in orthopaedic surgery: design of laboratory tests. *Clin Mat* 8: 125-129. 1991.
- 68 Smith B. G., Wright P. S., Brown D. Utilización Clínica de los Materiales Dentales. *Masson*. Barcelona. 1996.

II.- OBJETIVOS.

II. OBJETIVOS.

La búsqueda de materiales dotados de mejor biocompatibilidad así como acción terapéutica en el campo dental, en traumatología y cirugía ortopédica lleva a la necesidad de desarrollar nuevos sistemas que potencien estas características. La finalidad principal de esta tesis doctoral es la obtención de sistemas acrílicos derivados de eugenol con actividad terapéutica y bactericida para su posterior incorporación en formulaciones autocurables de cementos óseos y dentales. Con este fin se plantean los siguientes objetivos:

1. Modificación química de la estructura del eugenol. Síntesis y caracterización de dos nuevos derivados acrílicos del eugenol (EgMA y EEgMA) susceptibles de sufrir reacciones de polimerización radical, evitando así el carácter inhibitorio propio de la molécula de eugenol.
2. Síntesis y caracterización de nuevos polímeros obtenidos a partir de los monómeros de eugenol. Estudio de su reactividad tanto a alta como a baja conversión.
3. Preparación y caracterización de sistemas copoliméricos de los monómeros derivados de eugenol con metacrilato de etilo (EMA) y metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA), con propiedades antioxidantes y acción bactericida. Estudio de la reacción de copolimerización.
4. Evaluación de la biocompatibilidad y de la bioactividad *in vitro* de los sistemas poliméricos derivados de eugenol frente a cultivos celulares de fibroblastos humanos y microorganismos comunes causantes de diversas afecciones en el campo de la cirugía ortopédica y dental.
5. Formulación y caracterización de sistemas acrílicos autocurables que incorporen los derivados acrílicos de eugenol para su aplicación como cementos óseos acrílicos en cirugía ortopédica y como resinas autocurables en odontología con propiedades específicas.

6. Preparación de cementos dentales de ionómeros de vidrio portadores de unidades derivadas de eugenol con propiedades terapéuticas, como alternativa a las formulaciones comerciales.

CAPÍTULO 1.
MATERIALES Y MÉTODOS.

CAPÍTULO 1. MATERIALES Y MÉTODOS.

1.1.- OBTENCIÓN DE LOS MONÓMEROS DERIVADOS DE EUGENOL.

1.1.1.- REACTIVOS.

Para la síntesis de los derivados acrílicos de eugenol se usan los siguientes reactivos:

Eugenol (Acros), utilizado sin purificación previa.

2-cloroetanol (Aldrich).

Cloruro de metacrililo (Aldrich), purificado por destilación a 99 °C.

Trietilamina (Scharlau), purificada por reacción con hidróxido potásico a reflujo, durante 24 h y posterior destilación a 86-89 °C.

Las sales, hidróxido sódico (Panreac), hidróxido potásico (Panreac) e ioduro potásico (Panreac), utilizadas sin purificación previa.

Los disolventes éter dietílico (SDS), hexano (SDS) y acetato de etilo (Fluka), purificados mediante los procedimientos estándar.

1.1.2.- SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DEL METACRILATO DE EUGENILO.

La obtención del monómero metacrilato de eugenilo (EgMA) se lleva a cabo mediante reacción de esterificación del eugenol con cloruro de metacrililo.

Para ello se disuelve el eugenol en éter dietílico seco (1M) a temperatura ambiente. Seguidamente se añade a la disolución 50% de exceso de trietilamina como catalizador de la reacción y se mantiene bajo agitación constante. A continuación se añade gota a gota cloruro de metacrililo en cantidad equimolecular con respecto a la trietilamina, en atmósfera de nitrógeno. Se mantiene la agitación y se deja reaccionar la mezcla durante 48 h a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo la mezcla de reacción se filtra y se lava con una disolución acuosa de hidróxido sódico (5% p/v) y

con agua destilada hasta pH neutro. Por último, se seca la fase orgánica final usando sulfato sódico anhidro y el disolvente se evapora a presión reducida hasta pesada constante. El producto bruto obtenido se cromatografía sobre gel de sílice con mezclas hexano:acetato de etilo (9:1) como fase móvil, eluyendo en primer lugar la fracción correspondiente al metacrilato de eugenilo.

1.1.3.- SÍNTESIS Y PURIFICACIÓN DEL METACRILATO DE ETOXIEUGENILO.

La síntesis del metacrilato de etoxieugenilo (EEgMA) procede en dos pasos. En primer lugar se lleva a cabo la síntesis del 2-eugenil etanol aplicando una reacción tipo Williamson¹ por tratamiento del eugenol con 2-cloroetanol en un medio hidroalcohólico de acuerdo con el siguiente protocolo: se prepara una disolución de eugenol en etanol y se mezcla con una disolución de KOH al 50% en exceso con respecto al eugenol y un 0,5% de KI como co-catalizador. La mezcla se lleva a reflujo y se añade, bajo corriente de nitrógeno y gota a gota, una cantidad estequiométrica de 2-cloroetanol, disuelto en etanol. La mezcla se mantiene a reflujo durante 24 horas, tras las cuales el producto obtenido se filtra y se extrae con éter dietílico, secándolo finalmente con sulfato magnésico anhidro durante 24 horas. El producto se aísla por extracción del disolvente a presión reducida y se cromatografía sobre gel de sílice con mezclas hexano:acetato de etilo (7:3) como fase móvil, eluyendo en segundo lugar la fracción correspondiente al 2-eugenil etanol.

El segundo paso lleva consigo la reacción de esterificación del 2-eugenil etanol, que se realiza mediante disolución del mismo en éter dietílico (1M). Se añade a la disolución un 50% de exceso de trietilamina como catalizador de la reacción y se mantiene bajo agitación constante. A continuación se añade gota a gota cloruro de metacrililo en atmósfera de nitrógeno, en cantidad estequiométrica con respecto a la trietilamina. Se mantiene la agitación y se deja reaccionar durante 48 h a temperatura ambiente.

La mezcla de reacción se filtra para separar el clorhidrato de amina formado y se lava con una disolución acuosa de hidróxido sódico (5% p/v) y con agua destilada hasta pH neutro.

Finalmente el producto de reacción se aísla por extracción del disolvente a presión reducida y se purifica mediante columna cromatográfica con mezclas de hexano:acetato de etilo (9:1) como fase móvil, eluyendo en primer lugar la fracción correspondiente al metacrilato de etoxieugenilo.

1.1.4.- CARACTERIZACIÓN DE LOS MONÓMEROS DERIVADOS DE EUGENOL.

La estructura y pureza tanto de los reactivos, productos intermedios y monómeros se determinan a través de técnicas de Resonancia Magnética Nuclear de Protón y Carbono 13, RMN ^1H y RMN ^{13}C . Para la correcta asignación de las bandas, se lleva a cabo también experimentos de resonancia bidimensional de correlación ^1H - ^{13}C , (HMQC, Heteronuclear Multiple Quantum Correlation), en un equipo Varian XL 300. Las muestras a analizar se disuelven en cloroformo deuterado (10% p/v para ^1H y 25% p/v para ^{13}C) y se registran los espectros a 25 °C.

Paralelamente se realizan sendos análisis mediante Espectroscopia de Infrarrojo con Transformada de Fourier por Reflectancia Atenuada ATR-FTIR. Para ello se deposita una capa delgada de cada monómero sobre el dispositivo de medida del equipo y se registra el espectro. El equipo usado para realizar este análisis es un Perkin-Elmer Spectrum One.

El punto de fusión de ambos monómeros se determina mediante un calorímetro diferencial de barrido, DSC7 (Perkin Elmer) conectado a un sistema de análisis de datos térmicos TAC 7/DX, previamente calibrado mediante patrones de indio y zinc. El rango de barrido para este estudio va de -20 a 60 °C con una velocidad de calentamiento de 10 °/min.

1.2.- SISTEMAS POLIMÉRICOS DERIVADOS DE EUGENOL.

1.2.1.- OBTENCIÓN DE POLÍMEROS Y COPOLÍMEROS SOLUBLES.

1.2.1.1.- REACTIVOS.

En la obtención de los polímeros y copolímeros se utiliza:

Metacrilato de etilo (EMA) (Acros), purificado por destilación a presión reducida con el fin de eliminar el monometil éter de hidroquinona añadido como inhibidor de la polimerización.

Metacrilato de eugenilo (EgMA), monómero de síntesis (ver apartado 1.1.2).

Metacrilato de etoxieugenilo (EEgMA), monómero de síntesis (ver apartado 1.1.3).

Azobisisobutironitrilo (AIBN) (Fluka), como iniciador radicalario, purificado por recristalización en metanol.

Tolueno (Merck), como disolvente, utilizado tal y como lo suministra el proveedor.

Hexano (SDS), como medio precipitante, utilizado tal y como lo suministra el proveedor.

1.2.1.2.- REACCIONES DE POLIMERIZACIÓN Y COPOLIMERIZACIÓN.

Tanto la obtención de los polímeros poli(metacrilato de eugenilo) (PEgMA), poli(metacrilato de etoxieugenilo) (PEEgMA) y poli(metacrilato de etilo) (PEMA), como la de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) se realiza mediante polimerización radical utilizando tolueno como disolvente y AIBN como iniciador radical. Para la síntesis de los copolímeros, el intervalo elegido de fracción molar en la alimentación es de 0,2 a 0,8. Así, se disuelven en un frasco de Pirex los respectivos monómeros EMA y/o EgMA y/o EEgMA en tolueno ($1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$) y se añade un 1% p/p de AIBN, respecto al peso total del monómero. La disolución resultante se mantiene a 50 °C hasta que la conversión de la reacción no supere el 10% p/p. Paralelamente los homopolímeros se obtienen a alta conversión en estas mismas condiciones manteniendo la reacción durante un tiempo de 24 h.

Con el fin de detener la reacción se hace precipitar la mezcla de reacción sobre un exceso de hexano con agitación magnética energética. De este modo es posible separar los restos de monómero y de iniciador, que son solubles en este medio. Una vez precipitado el polímero, el producto de reacción se separa mediante filtración. En todos los casos se obtiene un sólido en forma de polvo blanco que se seca a vacío hasta pesada constante.

1.2.1.3.- CARACTERIZACIÓN DE LOS HOMOPOLÍMEROS Y COPOLÍMEROS.

La estructura y pureza de todos los polímeros obtenidos se determina mediante las técnicas de RMN ^1H y RMN ^{13}C convencional, así como de resonancia bidimensional (HMQC) de correlación ^1H - ^{13}C , en un equipo Varian XL 300. Las muestras se preparan en cloroformo deuterado (25% p/v) y se registran los espectros a 25 °C. La fracción molar de metacrilato de etilo en los respectivos copolímeros se calcula teniendo en consideración la integral de las señales de los protones oxietilénicos correspondientes a esta unidad monomérica. La fracción molar de las unidades monoméricas EgMA y EEgMA se calcula teniendo en consideración las integrales tanto de las señales correspondientes a los protones alílicos como las correspondientes a los protones aromáticos. Con los valores de dichas integrales y haciendo uso de la ecuación 1.1 se calculan las fracciones molares de EgMA o EEgMA en cada copolímero, así como las de EMA, por diferencia hasta uno.

$$f(M_1) = \frac{I_{M_1} / N^\circ H^+}{I_{M_1} / N^\circ H^+ + I_{M_2} / N^\circ H^+} \quad \text{Ec 1.1}$$

donde $f(M_1)$ es la fracción molar en el copolímero de la unidad monomérica derivada de eugenol; I_{M_1} es el valor de la integral correspondiente a las señales de la unidad monomérica derivada de eugenol; I_{M_2} es la integración de las señales asignadas a los protones de la unidad monomérica EMA; $N^\circ H^+$ el número de protones al que corresponde cada señal.

Las medidas de las propiedades térmicas se realizan en un calorímetro diferencial de barrido DSC7 (Perkin Elmer) conectado a un sistema de análisis de datos

térmicos TAC 7/DX. Para ello, se depositan 15 mg de muestra seca de los distintos materiales en el interior de cápsulas de aluminio selladas y se calientan a velocidad constante de 10 °C/min con un flujo de N₂ de 50 ml/min en el intervalo de temperaturas de -10 a 200 °C. El calibrado de temperaturas del aparato se lleva a cabo con patrones de indio y zinc. La temperatura de transición vítrea (T_g) se toma como el punto medio de la transición de la capacidad calorífica observada en el termograma correspondiente al segundo barrido.² Este estudio se realiza por duplicado para constatar la validez del método.

El estudio térmico se completa mediante el análisis termogravimétrico de los distintos materiales, con el que se evalúa la descomposición térmica de los correspondientes homo y copolímeros mediante una termobalanza TGAQ500 (TA Instruments). Para ello se registra la pérdida de peso de cada una de las muestras sometidas a un ritmo de calentamiento constante de 10 °C/min entre 40 y 600 °C, manteniendo un caudal de flujo de N₂ de 50 ml/min en el interior del horno. Este estudio se realiza por duplicado para constatar la validez del método.

A través de Cromatografía de Exclusión de Tamaños (SEC, de sus siglas en inglés) se determina el peso molecular promedio en número (\overline{M}_n), peso molecular promedio en peso (\overline{M}_w) y la polidispersidad ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) de los copolímeros (GPC Waters Alliance GPCV 2000 conectado a un detector de índice de refracción). Para eluir las muestras con una velocidad de flujo de 1 ml·min⁻¹ en cloroformo grado HPLC, se utiliza un juego de columnas de Styragel de 10⁴, 10³ y 500 Å de tamaño de poro, termostatizadas a 25 °C. El calibrado del equipo se lleva a cabo con muestras monodispersas de poliestireno y poli(metacrilato de metilo) (Polymer Laboratories). Las muestras se disuelven en cloroformo grado HPLC (10 mg·ml⁻¹) y la disolución obtenida se filtra con un filtro de teflón (Whatman) de 0,45 µm de tamaño de poro. Este estudio se realiza por duplicado para constatar la validez del método.

1.2.2.- OBTENCIÓN DE POLÍMEROS Y COPOLÍMEROS INSOLUBLES EN MASA, A ALTA CONVERSIÓN.

1.2.2.1.- REACTIVOS.

Para la obtención de estos sistemas poliméricos se usan los siguientes reactivos:

Metacrilato de etilo (EMA) (Acros), purificado por destilación a presión reducida con el fin de eliminar el monometil éter de hidroquinona añadido como inhibidor de polimerización.

Metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) (Aldrich), purificado por destilación a presión reducida con el fin de eliminar el monometil éter de hidroquinona añadido como inhibidor de polimerización.

Metacrilato de eugenilo (EgMA), monómero de síntesis (ver apartado 1.1.2).

Metacrilato de etoxieugenilo (EEgMA), monómero de síntesis (ver apartado 1.1.3).

Azobisisobutironitrilo (AIBN) (Fluka) como iniciador radicalario, purificado por recristalización en metanol.

Hexano (SDS), para el lavado de los polímeros, utilizado tal y como lo suministra el proveedor.

1.2.2.2.- REACCIÓN DE POLIMERIZACIÓN.

La obtención de los polímeros poli(metacrilato de etilo), poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), poli(metacrilato de eugenilo) y poli(metacrilato de etoxieugenilo) (PEMA, PHEMA, PEgMA y PEEgMA), así como la de los copolímeros p(EMA-co-EgMA), p(EMA-co-EEgMA), p(HEMA-co-EgMA) y p(HEMA-co-EEgMA), se lleva a cabo mediante polimerización radical en masa de los respectivos monómeros EMA, HEMA, y/o EgMA, EEgMA.

Para la síntesis de los copolímeros el intervalo de fracción molar en la alimentación de ambos monómeros es de 0,2 a 0,8. Se preparan las correspondientes mezclas de monómeros en función de la composición, se vierten en recipientes cilíndricos de polipropileno y se añade respectivamente un 1% p/p de AIBN, respecto al peso de ambos monómeros. Se satura el correspondiente medio de reacción con

nitrógeno y se cierra con un tapón. Seguidamente se calientan los recipientes a 70 °C durante 2 horas para después mantenerlos a 60 °C durante 46 horas. Una vez alcanzado este tiempo se dejan enfriar, se extraen las muestras que se lavan con hexano bajo agitación durante 24 horas y posteriormente con agua destilada. Finalmente se secan a vacío hasta pesada constante.

1.2.2.3.- CARACTERIZACIÓN DE LOS HOMOPOLÍMEROS Y COPOLÍMEROS.

La caracterización de los copolímeros derivados de eugenol sintetizados en masa a alta conversión, se realiza mediante técnicas de Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier por Reflectancia Atenuada (ATR-FTIR). Para ello se deposita una muestra del correspondiente copolímero sobre la ventana del equipo ejerciendo una presión controlada sobre éste para así asegurar un buen contacto ventana-polímero. El equipo usado para realizar este análisis es un Perkin-Elmer Spectrum One.

La determinación de las propiedades térmicas se realiza según la metodología descrita en el apartado 1.2.1.3.

1.2.2.4.- DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD.

La densidad de los polímeros se determina mediante el método de flotación y determinación picnométrica usando una disolución saturada de nitrato cálcico a $25 \pm 0,1$ °C. Para ello se colocan entre cinco y diez fragmentos de película de cada polímero en agua y se adicionan sucesivos volúmenes de una disolución saturada de nitrato cálcico hasta hacer flotar los fragmentos de película. La densidad de la mezcla final, que coincide con la densidad del polímero, se determina mediante pesada en un picnómetro.

1.2.2.5.- DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE.

Para el cálculo de la fracción soluble se preparan tres discos de cada uno de los polímeros PEgMA, PEEgMA PHEMA y PEMA así como de los copolímeros p(EMA-co-EgMA), p(EMA-co-EEgMA), p(HEMA-co-EgMA) y p(HEMA-co-EEgMA) obtenidos en masa y se someten a una extracción continua en tolueno caliente mediante un extractor Soxhlet. Tras 48 horas de tratamiento se sacan las muestras de polímero y

se secan a vacío hasta pesada constante. El tanto por ciento de fracción soluble presente en los respectivos sistemas se calcula mediante la ecuación 1.2.

$$F_{sol} = \frac{P_i - P_f}{P_i} \cdot 100 \quad \text{Ec. 1.2}$$

donde F_{sol} es la fracción soluble presente en el polímero; P_i es el peso inicial de la muestra; P_f es el peso seco de la muestra tras su tratamiento mediante extracción Soxhlet.

1.2.2.6.- REOLOGÍA DE SISTEMAS ENTRECruzADOS.

Los polímeros y copolímeros sintetizados en masa se caracterizan mediante medidas de viscoelasticidad dinámica con un reómetro rotacional de esfuerzo controlado (Gemini, Bohlin Rheology AB, Luna, Sweden), como el que se muestra en la figura 1.1. Se emplea la geometría de platos paralelos ($\phi = 15 \text{ mm}$) en modo de cizalla, que permite determinar el módulo de almacenamiento G' , el módulo de pérdidas G'' y la tangente de pérdidas $\tan \delta$, de cada material ensayado.^{3,4} Las medidas se realizan a $37 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ por triplicado sobre discos de 15 mm de diámetro y 1-2 mm de espesor de los polímeros PEMA, PEgMA, PEEgMA así como de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA), hinchados hasta el equilibrio en tert-butanol, que se determina gravimétricamente hasta alcanzar pesada constante. Cada muestra se deja equilibrar al menos en el interior del reómetro durante 10 minutos antes de cada medida. Para evitar la evaporación del tert-butanol, la celda que contiene las muestras se cierra con una trampa saturada de disolvente.

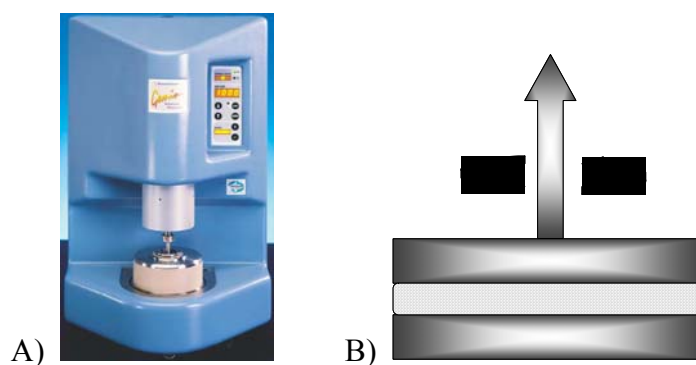


Figura 1.1 A) Reómetro BOHLIN INSTRUMENTS GEMINI usado para las medidas de viscoelasticidad lineal. B) Esquema de la geometría de platos paralelos.

Se realizan dos tipos de experimentos, primero se determina la zona de viscoelasticidad lineal con la ayuda de un barrido de momento de torsión, o barrido de amplitudes. Una vez fijado el momento de torsión se realiza un barrido de frecuencias desde 0,1 hasta 10 Hz en condiciones isoterma.

1.2.2.7.- COMPORTAMIENTO *IN VITRO* DE LOS COPOLÍMEROS A ALTA CONVERSIÓN. HUMECTABILIDAD, GRADO DE HIDRATACIÓN Y LIBERACIÓN DE EUGENOL DE LOS POLÍMEROS DERIVADOS DE EUGENOL.

Para la evaluación de la humectabilidad de los distintos copolímeros se realizan medidas del ángulo de contacto sobre la superficie de éstos mediante el método de gota en reposo (Sessile Drop), utilizando un goniómetro G10 (KRÜS). Para ello se utilizan líquidos de naturaleza polar y no polar, de tensión superficial conocida, como son el agua ($\gamma_L = 72,8 \text{ mJ/m}^2$) y el diiodometano ($\gamma_L = 51,8 \text{ mJ/m}^2$). La cantidad de líquido que se deposita sobre la superficie es de 5 μl , dosificados con una jeringa conectada a un tornillo micrométrico. Se determina el ángulo de contacto entre las superficies y el líquido correspondiente al menos en 10 zonas de las mismas, calculando posteriormente el valor promedio. La determinación de la tensión superficial se realiza aplicando el método de Owens.⁵

Con el fin de estudiar el grado de hidratación de estos copolímeros se preparan tres discos de cada uno de los distintos polímeros PEgMA, PEEgMA y de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA), obtenidos en masa, de 0,5 mm de espesor y se sumergen en una disolución tampón de fosfato, PBS, 0,1M, pH = 7,4 (Sigma). Una vez sumergidos los discos en el medio, se incuban a 37 °C para simular las condiciones fisiológicas. Se extrae la muestra a distintos tiempos, se seca su superficie cuidadosamente con papel de filtro y se pesa.

El porcentaje del grado de hidratación a cada tiempo se calcula mediante la ecuación 1.3.

$$H = \frac{P_H - P_S}{P_S} \cdot 100 \quad \text{Ec. 1.3}$$

donde H es el grado de hidratación; P_H es el peso de la muestra hinchada a tiempo t y P_S es el peso inicial de la muestra seca.

Para el ensayo de liberación de eugenol, se preparan discos por triplicado de los polímeros PEgMA, PEEgMA y de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) obtenidos en masa, de 0,5 mm de espesor sumergiéndolos en 5 ml de disoluciones tampón de pH de 7 y 10 respectivamente. La correspondiente disolución tampón se mantiene a 37 °C, renovándose completamente el medio cada 7 días. Cada alícuota de medio extraído se analiza mediante espectroscopía UV-VIS en un equipo Perkin-Elmer Lambda 16.

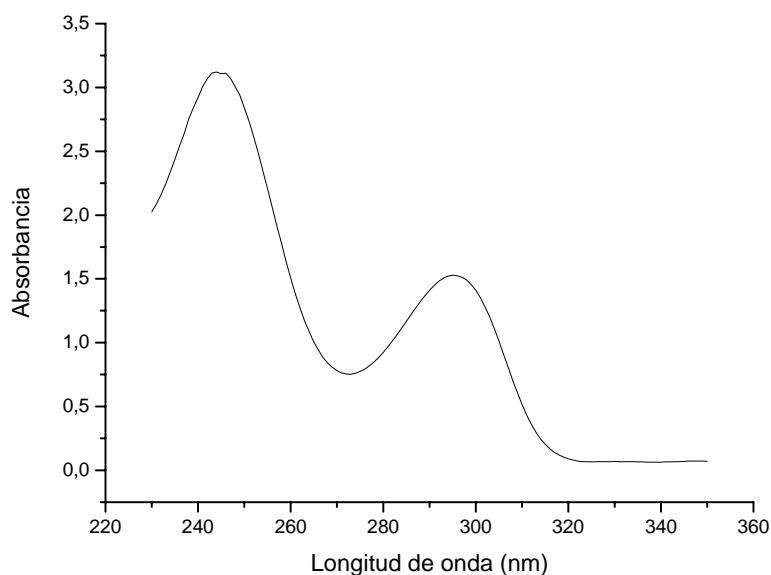


Figura 1.2 Espectro de absorción del eugenol en disolución acuosa de NaOH 0,1M.

La concentración de eugenol liberada al medio se determina por medidas de absorbancia a 294 y 245 nm, donde el eugenol presenta sus máximos de absorción (figura 1.2), aplicando la ecuación de Lambert-Beer ($A = \varepsilon \cdot l \cdot C$, siendo ε el coeficiente de extinción molar, l el camino óptico en cm y C la concentración) y utilizando una recta de calibrado previamente obtenida, a partir de disoluciones de concentración conocida (figura 1.3).

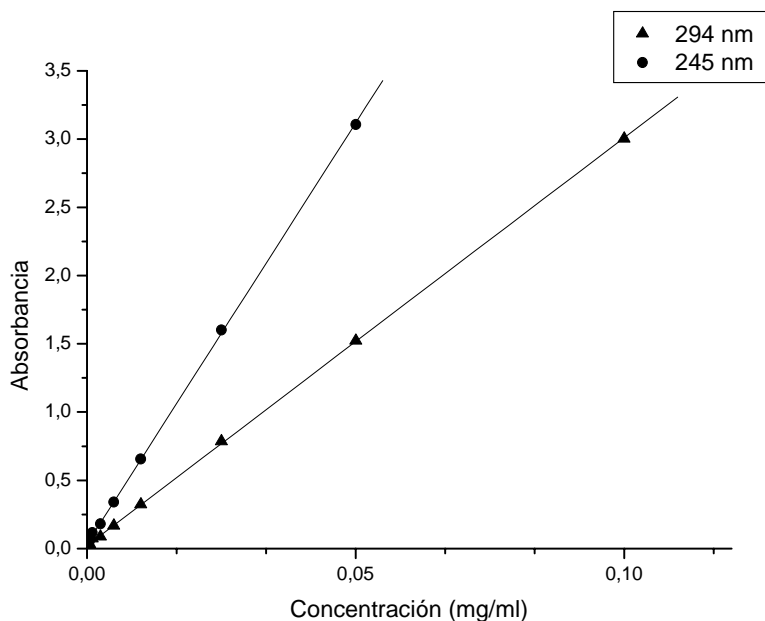


Figura 1.3 Rectas de calibrado para el eugenol obtenidas a 294 nm ($r = 0,999$) y a 245 nm ($r = 0,999$).

1.3.- ESTUDIOS DE BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO* DE LOS DERIVADOS ACRÍLICOS DE EUGENOL.

El análisis de la biocompatibilidad *in vitro* de los distintos sistemas derivados de eugenol se realiza a partir de una serie de experimentos, que pueden englobarse en tres grupos. El primero tiene por objetivo analizar la citotoxicidad de los monómeros empleados para la síntesis de los distintos sistemas poliméricos. El objetivo del segundo grupo consiste en la evaluación de la toxicidad de los propios polímeros, debido a la posible liberación de componentes tóxicos que puedan afectar cuantitativa o cualitativamente al cultivo celular. Por último, el tercer grupo de ensayos tiene como objetivo el estudio del establecimiento del cultivo, la proliferación y la muerte de las células que lo componen, cuando la siembra se realiza directamente sobre la superficie de los materiales poliméricos, obteniendo información así de la compatibilidad de las superficies de los distintos materiales, con la adhesión celular.

En los diferentes ensayos realizados se usan los monómeros EgMA y EEgMA sintetizados según el apartado 1.1. Los polímeros a su vez, se sintetizan según el

procedimiento descrito en el apartado 1.2.2 usando moldes cilíndricos para obtener un tamaño de disco, cercano a los 15 mm de diámetro, que se corresponde con el diámetro de los pocillos de una placa de cultivo de 24 pocillos, utilizada como soporte en los diversos estudios de biocompatibilidad.

En estos ensayos, se emplean discos Thermanox® (TMX) (Labclinics), como control negativo, y una disolución acuosa de tritón x-100 (Aldrich), como control positivo. Como cultivo de células adherentes se emplea un cultivo primario de fibroblastos embrionarios humanos cedido por Centro Nacional de Microbiología del Instituto de Salud Carlos III (Madrid), y cuyo mantenimiento y multiplicación se realiza empleando medio mínimo esencial de Eagle modificado con HEPES [ácido 4-(2-hidroxiethyl)-1-piperazino etanosulfónico] (MEM; Sigma) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco), con un 2% de glutamina 200 mM (Sigma) y un 1 % de una disolución de penicilina-estreptomicina (10.000 U/ml penicilina y 10 mg/ml estreptomicina; Sigma). Los cultivos se mantienen y multiplican a 37 °C y una atmósfera con un 5% de CO₂ sobre frascos de cultivo de 25, 75 y 175 cm³ suministrados al igual que el restante material plástico por Sarstedt.

Al alcanzar la confluencia en un periodo de tiempo que oscila entre 4 y 7 días desde la siembra, las muestras se subcultivan en una proporción de 1 a 3. Para completar el pase o subcultivo se emplea tampón fosfato salino de Dulbecco (PBS, Sigma), como medio de lavado, y una disolución de tripsina-EDTA (Sigma), como agente enzimático que permite despegar las células de la superficie del frasco. Posteriormente se adiciona MEM, para inactivar la tripsina, y se centrifuga el contenido de los frascos a 2000 r.p.m durante 5 minutos. El sedimento resultante de esta centrifugación se resuspende con MEM para posteriormente distribuirlo equitativamente en tres nuevos frascos.

La totalidad de los reactivos y medios de cultivo empleados en el mantenimiento y multiplicación de los cultivos celulares son filtrados previo a su uso, empleando filtros de 0,22 µm Miles-GP® (Millipore).

El recuento celular previo al subcultivo o al establecimiento de los distintos ensayos realizados se completa utilizando una disolución al 0,4% de azul tripán (Sigma)

como tinte, y una cámara de recuento celular Neubauer, que tras su observación al microscopio óptico invertido permite determinar la densidad de células de las muestras.

Todos los materiales usados se esterilizan, previo a su estudio, con óxido de etileno.

Test estadístico de significancia ANOVA: El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio de la biocompatibilidad *in vitro* de los derivados acrílicos de eugenol se lleva a cabo por un análisis de la varianza (ANOVA).

1.3.1.- CITOTOXICIDAD DE MONÓMEROS.

Este apartado describe el estudio de la toxicidad de los monómeros EMA, EgMA y EEgMA, así como del eugenol, mediante el uso del reactivo MTT (Sigma),⁶ [bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio].

Para realizar este ensayo se preparan en condiciones de esterilidad, disoluciones madre al 3% pp de cada una de las sustancias a ensayar (monómeros y eugenol) en medio de cultivo desprovisto de suero fetal bovino.⁷ Tras sucesivas diluciones se preparan de cada una de ellas, una serie de disoluciones (n = 8) hasta alcanzar el 0,0001% p/p. Dado la naturaleza hidrófoba de los compuestos EgMA, EEgMA y eugenol, las disoluciones madres se preparan añadiendo Tween 80 como agente tensioactivo, en una proporción aditivo:surfactante de 3:1. Con el fin de detectar la posible aparición de artefactos en los resultados se evalúa también la toxicidad del Tween 80 por separado considerándola como control negativo.

Paralelamente, se realiza la siembra de células, utilizando medio de cultivo completo fresco a una concentración de $1,1 \cdot 10^5$ células/ml, sobre placas de 96 pocillos. Tras adicionar 100 μ l de concentrado de células en cada uno de los pocillos y mantener estas placas durante 24 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%, se intercambia el medio de cultivo por la correspondiente disolución de monómero y/o eugenol, incubándose las placas posteriormente durante otras 24 h en las mismas condiciones.

Transcurrido este tiempo, se retira el contenido de los pocillos y se sustituye por una disolución filtrada del reactivo MTT en medio fresco al 10%, preparada a partir de otra disolución previa en PBS en concentración de 5 mg/ml. Tras la adición, la placa se mantiene de nuevo a 37 °C, durante 4 h. Tras este tiempo se extrae el contenido de los pocillos y se añaden en cada uno de ellos 100 µl de dimetil sulfóxido (DMSO), con el fin de disolver los cristales de formazán que se puedan haber formado. Tras una agitación vigorosa de 20 s se realiza la lectura de densidad óptica a 570 nm, donde el MTT presenta el máximo de absorbancia (figura 1.4), con una longitud de onda de referencia de 630 nm, en un lector de placas Biotek ELX808IU (figura 1.6).

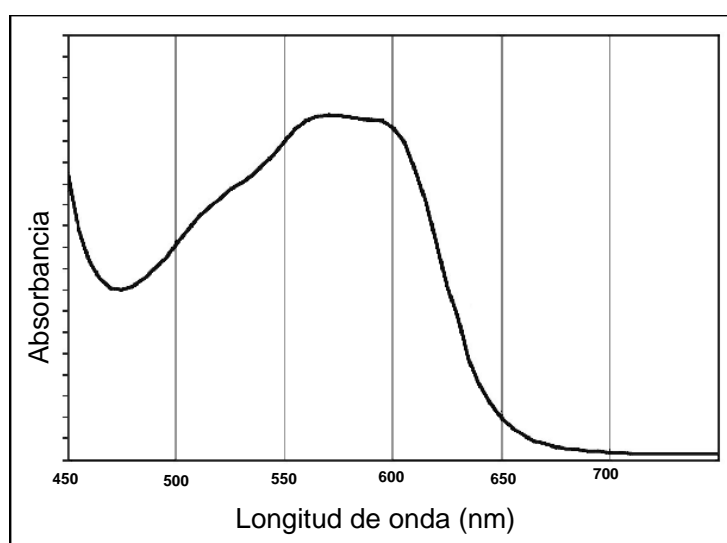


Figura 1.4 Espectro de absorbancia del reactivo MTT.

Con los datos de densidades ópticas obtenidas y aplicando la ecuación 1.4, se obtienen los valores de los porcentajes de viabilidad celular relativa (VR),

$$VR = \frac{DO_M - DO_B}{DO_C} \times 100 \quad \text{Ec. 1.4}$$

donde, DO_M , DO_B y DO_C son las medidas de densidad óptica de la muestra, el blanco (medio introducido en pocillos sin células) y el control negativo, respectivamente. Con el fin de calcular la concentración inhibitoria media IC_{50} se construye una curva de concentración de la dosis frente a viabilidad celular relativa. La concentración que produce la muerte del 50% de las células presentes en el control negativo se define

como concentración inhibitoria media, IC_{50} . Esta concentración IC_{50} es el parámetro habitualmente utilizado para cuantificar la toxicidad de un fármaco u otro tipo de aditivo.

1.3.2.- LIBERACIÓN DE COMPONENTES. ENSAYO MTT.

El ensayo MTT se emplea frecuentemente en la evaluación de la toxicidad del material derivada de la liberación de algún tipo de componente citotóxico (productos de su degradación, monómero residual, etc.)⁸ al medio de cultivo en el que se desarrollan las células. En este caso de nuevo se hace uso de una disolución del reactivo MTT en tampón PBS en concentración 5 mg/ml. Esta disolución se filtra y se diluye al 10% en medio fresco para obtener así la disolución de trabajo que contiene el MTT.

Para llevar a cabo este ensayo se utilizan en condiciones de esterilidad, cuatro discos de cada uno de los polímeros PEMA, PEgMA y PEEgMA así como de las composiciones 80:20, 60:40, 50:50, 40:60, 20:80 de los respectivos copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA). Como control negativo se usan discos de TMX. Cada uno de ellos se sumerge en 5 ml de medio de cultivo completo a 37 °C y en agitación. Transcurridos 1, 2 y 7 días en estas condiciones, se extrae dicho medio (eluyente) para su uso posterior, siendo sustituido en cada caso por otro fresco (figura 1.5). En el ensayo se incluye también como control positivo una disolución al 0,5% de tritón x-100 en MEM, y el blanco consistente en una serie de muestras de medio completo adicionadas a pocillos en los que no se sumerge ningún material. Una vez extraídos cada uno de los eluyentes se prepara un concentrado de células en medio fresco completo a una concentración de $1,1 \cdot 10^5$ células/ml y se realiza con él la siembra sobre placas de 96 pocillos. Para ello se adicionan 100 μ l de concentrado de células en cada uno de los pocillos y se cultivan a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurridas 24 h de la siembra se intercambia el medio de cultivo por los eluyentes previamente extraídos, de tal modo que por cada disolución eluyente se rellenan 4 pocillos, obteniendo así un total de 16 réplicas por material. Las placas se incuban durante otras 24 h en las mismas condiciones.

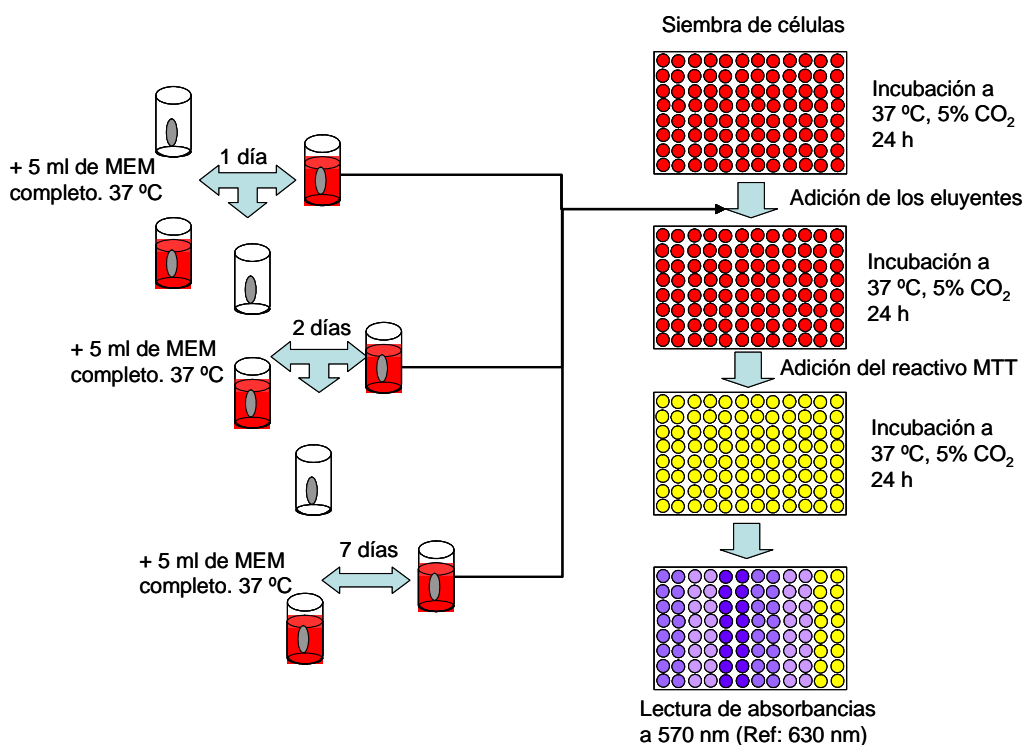


Figura 1.5 Esquema de un ensayo tipo MTT para evaluar la liberación de componentes citotóxicos. Los eluyentes recogidos a 1, 2 y 7 días se emplean para cultivar células y evaluar espectroscópicamente su efecto sobre el cultivo.

Posteriormente se retiran los eluyentes que se sustituyen por la disolución de trabajo que contiene el reactivo MTT y se mantiene de nuevo a 37 °C, durante 4 h más. Tras este tiempo se extrae el contenido de los pocillos y se añaden en cada uno de ellos 100 μ l de dimetil sulfoxido (DMSO), con el fin de disolver los cristales de formazán que se puedan haber formado. Tras una agitación vigorosa de 20 s se realiza la lectura de densidad óptica a 570 nm (figura 1.4), con una longitud de onda de referencia de 630 nm en un lector de placas Biotek ELX808IU (figura 1.6).



Figura 1.6 Lector de placas Biotek ELX808IU.

Una vez realizada la lectura de los valores de absorbancia y haciendo uso de la ecuación 1.4, se calculan los valores de viabilidad relativa de cada replica relativizándolos a los medidos para el control negativo TMX. Los resultados se analizan mediante análisis de la varianza (ANOVA).

1.3.3.- MORFOLOGÍA CELULAR, PROLIFERACIÓN Y ADHESIÓN CELULAR BAJO MICROSCOPIA ÓPTICA Y ELECTRÓNICA DE BARRIDO AMBIENTAL.

Para el estudio de la morfología y desarrollo celular mediante el microscopio óptico se utilizan los mismos eluyentes obtenidos a 1 y 2 días en el ensayo MTT (apartado 1.3.2).

La preparación de cada muestra a observar se realiza a partir de cultivos establecidos sobre cubreobjetos de vidrio, que se introducen en condiciones de esterilidad en placas de cultivo de 6 pocillos. En cada uno de estos pocillos se siembran 4 ml de un concentrado de células ($1,1 \cdot 10^5$ células/ml) en medio completo y se incuban a 37 °C, en atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 horas. Transcurrido este tiempo se intercambia el medio por los distintos eluyentes. Un primer estudio consiste en mantener incubando el cultivo durante 24 h y un segundo estudio se realiza durante 96 h con el fin de evaluar los posibles efectos de los extractos sobre las células a un mayor plazo de tiempo. Ambos estudios se realizan por duplicado.

Una vez completados ambos periodos de incubación se realiza la fijación histológica, tinción y montaje de las muestras según el siguiente protocolo:

1. Inclusión de las muestras en formol (Panreac) al 10% en agua (30 min).
2. Inmersión en hematoxilina de Harris (Carlo Erba) (15 min).
3. Lavado en agua.
4. Diferenciación en alcohol ácido (disolución al 1% de ácido clorhídrico en etanol al 70%) mediante varias inmersiones rápidas, chequeando el grado de tinción de los núcleos bajo el microscopio óptico.
5. Lavado breve en agua e inmersión en una disolución al 1% de carbonato de litio (Merck) en agua destilada hasta alcanzar un tono azul brillante.

6. Lavado en agua con oxigenación continua por goteo (20 min).
7. Inmersión en eosina alcohólica (Panreac) (1 minuto 30 s).
9. Lavado con etanol al 95% (2 lavados de 2 min) seguido de lavado con etanol absoluto (2 lavados de 2 min).
10. Inmersión en Histolemon®-Erba (Carlo Erba) (2 lavados de 2 min).
11. Montaje de las muestras en portaobjetos mediante el empleo de la solución de montaje Eukitt® (O. Zinder GMBH & Co.).

Tras su preparación, las muestras se observan en un microscopio Nikon Eclipse E600 y se fotografían con una cámara digital Nikon DXM1200 acoplada al sistema óptico.

Este estudio se completa analizando la adhesión y el desarrollo celular mediante el microscopio electrónico de barrido ambiental. Para ello se siembra por duplicado un concentrado de células en medio completo ($1,1 \cdot 10^5$ células·ml⁻¹) directamente sobre la superficie de los distintos polímeros, así como del control negativo TMX, en placas de cultivo de 24 pocillos. Tras mantenerse las muestras durante 24 y 48 h en incubación a 37 °C y bajo atmósfera de CO₂ al 5%, se fijan las muestras para estudiarlas bajo Microscopía Electrónica de Barrido.

El protocolo de fijación aplicado consiste en lavar las muestras con una disolución de glutaraldehído al 2,5% (Fluka) en agua destilada, que se mantiene en contacto con las muestras 24 h protegidas de la luz a temperatura ambiente. Tras este periodo, las muestras se conservan a 4 °C hasta el día de su estudio bajo microscopía electrónica. Para la observación de las muestras al microscopio se secan a 37 °C y se metalizan con oro para posteriormente estudiarlas en un microscopio electrónico de barrido ambiental Philips XL 30, con una aceleración de voltaje que oscila entre 15 y 25 KeV.

1.3.4.- PROLIFERACIÓN CELULAR. ENSAYO ALAMAR BLUE.

Para cuantificar la proliferación celular sobre la superficie de los polímeros, se aplica un método espectrofotométrico utilizando el reactivo Alamar Blue™ (AB; Serotec).⁹

El grado de proliferación se determina mediante la medida de la absorbancia a las longitudes de onda de 570 y 606 nm, que corresponden respectivamente con los máximos de densidad óptica de las formas reducida y oxidada del reactivo Alamar Blue (figura 1.7).

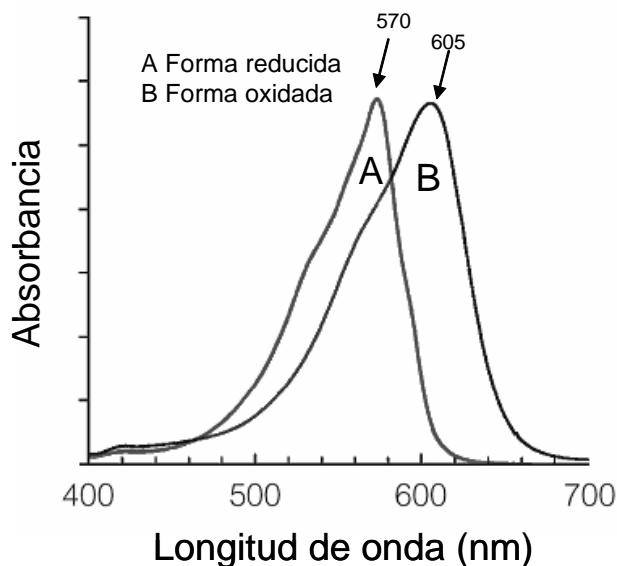


Figura 1.7 Espectro de absorbancias para las formas reducida y oxidada del reactivo Alamar Blue.

Se toman cuatro réplicas de cada material más el control y se introducen en una placa de 24 pocillos, se siembra 1 ml de concentrado de células ($1,1 \cdot 10^5$ células·ml⁻¹) por pocillo en medio completo y se incuban a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%, durante 21 días. Durante esta incubación se realizan 5 lecturas de densidad óptica a 1, 3, 7, 14 y 21 días. El protocolo de toma de muestras (figura 1.8) comienza retirando el medio de cultivo y adicionando en su lugar 1ml/pocillo de una disolución al 10% del reactivo AB en MEM completo sin el indicador de pH rojo fenol, ya que éste interfiere con el AB. Tras esta adición se incuba la placa durante 4 h más a 37 °C. Como lectura blanco, se rellenan con el reactivo cuatro pocillos no sembrados. Transcurrido este tiempo, el contenido de cada pocillo se retira para su análisis posterior pudiendo, si es preciso, adicionarse medio completo de nuevo a las placas, para mantener el cultivo en perfectas condiciones.

En cada lectura, se toman las correspondientes disoluciones de reactivo y se transfieren a placas de 96 pocillos de tal modo que se rellenan 4 pocillos de estas placas a partir de cada pocillo de las placas de 24 pocillos, y se toman las correspondientes lecturas de absorbancia a 570 nm, con una longitud de onda de referencia de 630 nm en un lector de placas Biotek ELX808IU (figura 1.6).

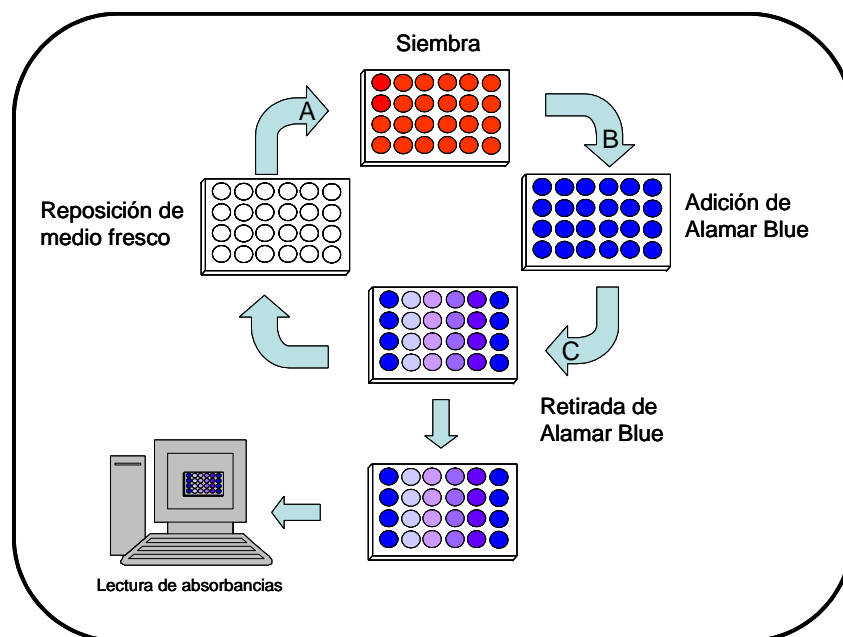


Figura 1.8 Esquema del procedimiento seguido en la evaluación de la proliferación celular empleando el reactivo Alamar Blue. Primero se introducen las muestras de los materiales en los pocillos (A) y se realiza la siembra (B) de células. Si se quieren tomar lecturas de densidad óptica a diferentes periodos de tiempo después de la adición del reactivo AB, éste se puede retirar (C) y rellenar los pocillos con medio completo fresco.

La evolución temporal de la proliferación celular se lleva a cabo a partir de las medidas realizadas a distintos periodos de tiempo contrastando las diferencias existentes con respecto al control negativo TMX, mediante un test de significancia ANOVA.

1.3.5.- MUERTE CELULAR. ENSAYO LDH.

Este ensayo se lleva a cabo con el fin de cuantificar la posible muerte celular causada por la rotura de la membrana citoplasmática al establecerse los cultivos

directamente sobre la superficie de los materiales y por tanto evaluar un posible efecto negativo sobre las células por parte de éstos. Para realizar este estudio se emplea como reactivo principal el cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio (reactivo INT, Sigma).

Los materiales que inducen mayor muerte celular, presentan mayores niveles de LDH en disolución debido a la acción de las liasas. Esta liberación de LDH produce a su vez una mayor conversión del reactivo INT en su correspondiente sal de formazán,¹⁰ aumentando de ese modo las absorbancia del medio a la longitud de onda de 490 nm, que es donde dicha sal presenta su máximo de absorbancia (figura 1.9).

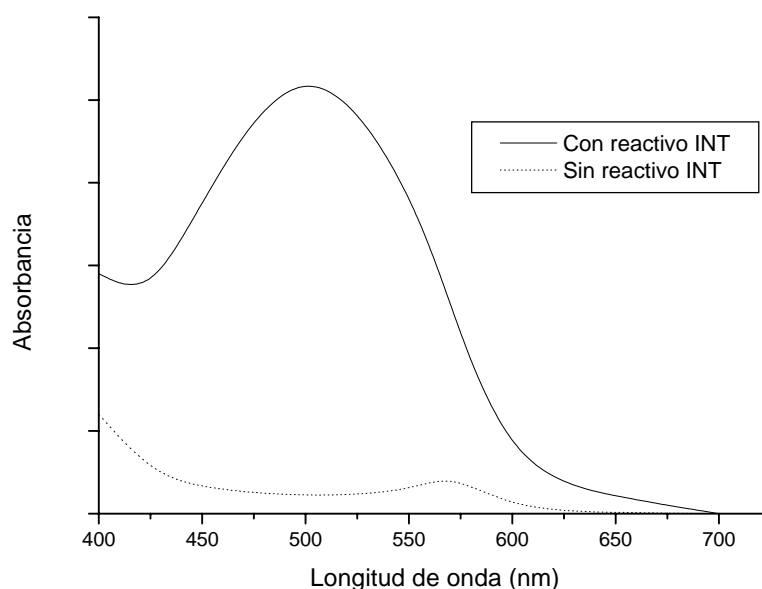


Figura 1.9 Cambio en la absorbancia del medio de cultivo tras la adición del preparado comercial de INT al medio de cultivo.

Para llevar a cabo el ensayo se introducen en condiciones de esterilidad y por duplicado, las muestras de los distintos polímeros así como del control negativo (TMX) en placas de 24 pocillos. Posteriormente se siembra 1 ml de concentrado de células en medio completo ($1,1 \cdot 10^5$ células·ml⁻¹) sobre cada uno de los pocillos, manteniéndose las placas a 37 °C y atmósfera de CO₂ al 5% durante 1, 2 y 7 días, usándose un total de 6 muestras de cada material (figura 1.10). Así mismo se adiciona medio de cultivo fresco en dos pocillos sin células de cada placa que se considera como blanco. Al cumplirse

los correspondientes tiempos de cultivo el contenido de cada pocillo se retira y se preserva a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su posterior utilización.

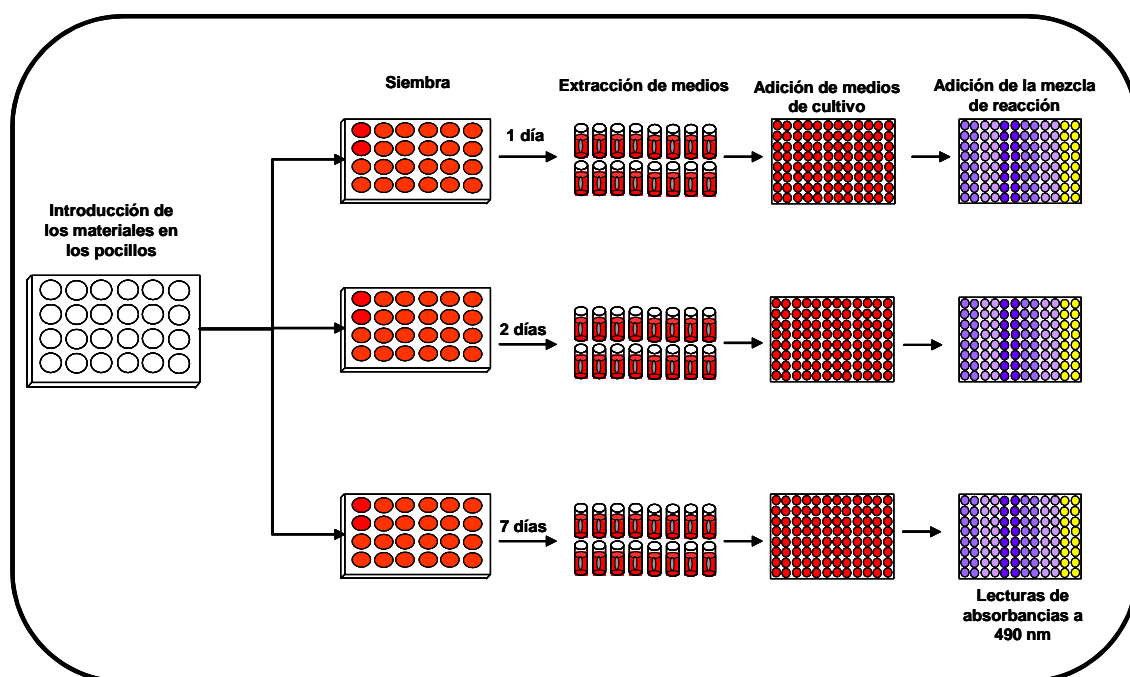


Figura 1.10 Desarrollo de un experimento para cuantificar la mortalidad celular mediante el registro de la actividad LDHasa.

Una vez recogidas todas las muestras se trasvasan a placas de 96 pocillos en los que se adicionan $25\ \mu\text{l}$ de cada uno de los extractos originales a 4 pocillos distintos ($n = 8$).

Paralelamente, se realiza la mezcla de los tres componentes de los que consta el preparado colorimétrico comercial (disolución sustrato, cofactor y disolución colorante), adicionándose posteriormente $50\ \mu\text{l}$ de esta mezcla en cada uno de los pocillos. A continuación las placas se incuban en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 min, tras los cuales se adicionan a cada pocillo $10\ \mu\text{l}$ de HCl 1M para detener la reacción y se mide la densidad óptica de las distintas muestras, a 490 nm con una longitud de onda de referencia de 630 nm, en un lector de placas Biotek ELX808IU. Una vez completada la lectura se les restan los obtenidos para el blanco a los valores de absorbancia obtenidos para las muestras y el control TMX y se contrastan las posibles diferencias

significativas entre el control y las muestras, mediante un análisis estadístico de ANOVA.

1.4.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DE MONÓMEROS Y POLÍMEROS DERIVADOS DE EUGENOL.

1.4.1.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DE MONÓMEROS.

La actividad bactericida de los distintos monómeros se determina mediante dos métodos distintos de difusión sobre agar en placa. Como cultivos modelo se usan las cepas *Escherichia coli* (DH5 α) como Gram-negativa y *Streptococcus mutans* (CECT 479), como Gram-positiva. Ambos cultivos se preservan almacenándolos a -80 °C en mezclas de glicerina agua (20% v/v).

Los monómeros a ensayar son metacrilato de etilo (EMA), metacrilato de 2-hidroxi-etilo (HEMA), metacrilato de eugenilo (EgMA) y metacrilato de etoxieugenilo (EEgMA). Se preparan disoluciones de cada uno de ellos en concentración 1M, en tres disolventes distintos: DMSO, cloroformo, y Tween 20 al 10% p/v en agua. Además, dado la conocida actividad bactericida del eugenol^{11,12,13} se preparan sendas disoluciones adicionales de éste que se usan como control positivo.

Todos los experimentos se realizan por triplicado para constatar la repetitividad del método. Los medios de cultivo que se usan para el cultivo de los microorganismos son el BHI (Caldo de corazón y cerebro, Laboratorios Difco, USA) y el medio de Luria (LB, extracto de levadura (0,5%), triptona (1%) y NaCl (1%), Difco, USA).

Para llevar a cabo los experimentos, se hacen crecer por separado ambas cepas bacterianas en 5 ml de medio de cultivo BHI durante 12 horas a 37 °C obteniéndose así un cultivo en fase estacionaria con el que se inicia los experimentos. Tras ese tiempo, mediante un colorímetro (Boecos-22 Spectrophotometer, Germany) se mide la absorbancia a 600 nm del cultivo. Para ajustar el valor del número de bacterias viables se determina el número de unidades formadoras de colonias (UCF) de suspensiones con

distintas densidades ópticas, mediante técnicas estandarizadas de conteo sobre placas de medio-agar.

El agar es un polisacárido que en presencia de agua adquiere un estado gelatinoso que se extrae de un alga marina y es usado rutinariamente como sustrato de cultivos bacterianos.¹⁴ Tiene como ventaja que una vez esterilizado a 120 °C en autoclave permanece líquido hasta enfriarse aproximadamente hasta los 50 °C. En este rango, se puede manipular fácilmente y se le puede añadir los distintos microorganismos para después dejar enfriar y obtener un sólido gelatinoso con el cultivo inmovilizado.

Para determinar el número de unidades formadoras de colonias se preparan diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000 de los cultivos estacionarios con las que se llevan a cabo los distintos ensayos. Se toman aproximadamente 1,5 ml de ellas y se añaden sobre 150 ml de una mezcla en caliente de medio de cultivo-agar (2%) previamente esterilizado en autoclave. Antes de que la mezcla solidifique, cada mezcla cultivo-agar-medio se extiende sobre tres placas petri y se dejan solidificar siempre en el interior de una cabina de flujo laminar para evitar contaminaciones.

El primer experimento se realiza mediante el llamado método placa-pocillo¹⁵ (hole-plate method). Para ello, una vez que gelifica toda la mezcla, se realiza una perforación por cada disolución a ensayar (EMA, EgMA, EEgMA, eugenol, HEMA) con un pequeño taladro esterilizado. Se toman las disoluciones preparadas en DMSO y se depositan en cada taladro 40 µl de cada disolución correspondiente. En un taladro central se introducen 40 µl de DMSO para descartar posibles efectos inhibitorios debidos a éste. El mismo experimento se realiza con las disoluciones preparadas en cloroformo y en Tween 20.

Tras inocular las disoluciones a ensayar las placas se cierran y se cultivan durante 24 horas a 37 °C. La actividad inhibitoria de cada compuesto se determina en función de la presencia de halo de inhibición en los alrededores de los taladros. La formación del halo se debe a la ausencia de formación de colonias. Los resultados de este experimento se expresan como diámetro medio del halo en milímetros.

Este experimento se realiza paralelamente con los microorganismos cultivados en medio LB.

De manera complementaria se realiza otro tipo de experimento consistente en la preparación de antibiogramas por el método de difusión sobre agar.¹⁶ Para ello se preparan placas de agar con medio de cultivo LB según se describe arriba, pero sin la adición de ninguna cepa bacteriana. Cuando las placas están frías y el agar endurecido se extienden sobre la superficie de placas diferentes para cada cultivo, con la ayuda de una espátula estéril, las diluciones 1/10 de los cultivos preparados previamente. A continuación se depositan sobre la superficie 5 discos especiales para antibiogramas (Schleicher & Schüll), empapados de las disoluciones a ensayar. Estas disoluciones son el blanco (DMSO), y las correspondientes a los monómeros HEMA, EgMA y EEgMA, así como del eugenol en DMSO en concentración 1M. Tras esto, las placas se cierran y se cultivan durante 24 horas a 37 °C. La actividad inhibitoria de cada compuesto se determina en función de la presencia de halo de inhibición en los alrededores de los discos que indican la ausencia de formación de colonias. Los resultados de este experimento se expresarán como diámetro medio del halo en milímetros.

1.4.2.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DE POLÍMEROS.

La actividad bactericida de los distintos materiales poliméricos se determina mediante la técnica de extensión de una colonia sobre placa de agar y determinación de la actividad bactericida de los materiales por inhibición por contacto. En este experimento se usan los microorganismos y medios de cultivos descritos en el apartado anterior. Los polímeros estudiados son los derivados de los metacrilatos de eugenilo, etoxieugenilo y 2-hidroxietilo, sintetizados en masa según se escribe en el apartado 1.2.2. Como control negativo se usan discos de metacrilato de 2-hidroxietilo ya que estos no poseen ningún carácter inhibitorio. Las composiciones ensayadas son las de relación molar 80:20 y 50:50 de los copolímeros p(HEMA-co-EgMA) y p(HEMA-co-EEgMA).

Para llevar a cabo el experimento se preparan suspensiones de microorganismos igual que las preparadas en el apartado 1.4.1. A continuación se preparan 9 placas agar-LB y se dejan enfriar en condiciones estériles. De este modo se disponen de tres placas

por cada suspensión de trabajo. Una vez frías se depositan sobre cada una de ellas, en posiciones distintas, cinco gotas de 2 µl de las respectivas suspensiones de trabajo de las bacterias. Se dejan absorber dichas gotas sobre el sustrato de agar durante 2 horas para después depositar sobre las gotas un disco de cada material. A continuación se deja crecer el cultivo en estufa a 37 °C durante 48 h tomándose fotografías de las placas tanto a 24 como a 48 h.

1.5.- FORMULACIONES AUTOCURABLES DERIVADAS DE EUGENOL.

1.5.1.- CEMENTOS ACRÍLICOS DERIVADOS DE EUGENOL.

En este apartado se describe la preparación de formulaciones de cementos óseos acrílicos basadas en matriz polimérica de poli(metacrilato de etilo) y de poli(metacrilato de metilo) para las formulaciones dentales. En ambos casos se introducen unidades con resto eugenilo mediante la incorporación de los derivados acrílicos de eugenol EgMA y EEgMA.

Los respectivos cementos se forman mediante el mezclado de un componente líquido y un componente sólido. La relación entre el peso de la fase sólida y el de la fase líquida (S:L) es en todos los casos 2:1.

El componente sólido consiste principalmente en partículas o perlas de poli(metacrilato de etilo) (PEMA) y/o de metilo (PMMA) sintéticas en el primer caso y comerciales (Aldrich y Plexigum) en ambos casos, cuyas características químico-físicas se describen en la tabla 1.1 A este componente polimérico se le añade un 2% p/p, respecto a la fase sólida, de peróxido de benzoilo (BPO, Merck) como iniciador de la polimerización, previamente purificado por recristalización en metanol. Con el fin de obtener cementos radiopacos, se añade sulfato de bario como agente radiopaco¹⁷ en una proporción del 8% p/p con respecto al peso de la fase sólida.

PARTÍCULAS	\overline{M}_n (Da)*	DIÁMETRO MEDIO (μM)*
PEMA (Aldrich)	850.000	45
PMMA (Plexigum)	200.000	40

Tabla 1.1 *Peso molecular promedio en número (\overline{M}_n) y diámetro medio de las partículas o perlas acrílicas comerciales usadas como referencia en este trabajo. * = Especificaciones del proveedor.*

El componente líquido por su parte, está formado principalmente por un monómero y un activador de la iniciación radical. El monómero base usado se elige en función de las propiedades mecánicas buscadas, pudiendo ser tanto metacrilato de etilo (EMA, Acros) como de metilo (MMA, Acros), ambos estabilizados con 100 ppm de monometil éter de hidroquinona, y que son usados como se reciben del proveedor. Como activador de la iniciación se añade 4,4'-bis(dimetil amino)difenil carbinol (benzidrol, Fluka) en una proporción del 2% p/p con respecto al peso de la fase líquida. El uso del benzidrol como amina terciaria se debe a su menor toxicidad, en comparación con otras usadas tradicionalmente como la N,N-dimetilamino-4-toluidina (DMT), así como a su buen rendimiento en la activación.¹⁸

En este trabajo se preparan formulaciones utilizando la fase líquida descrita anteriormente, así como otras en las que se incorporan a esta fase los monómeros EgMA y EEgMA, en distintas proporciones. La figura 1.11 muestra la estructura de los compuestos que intervienen en la formación de los cementos formulados.

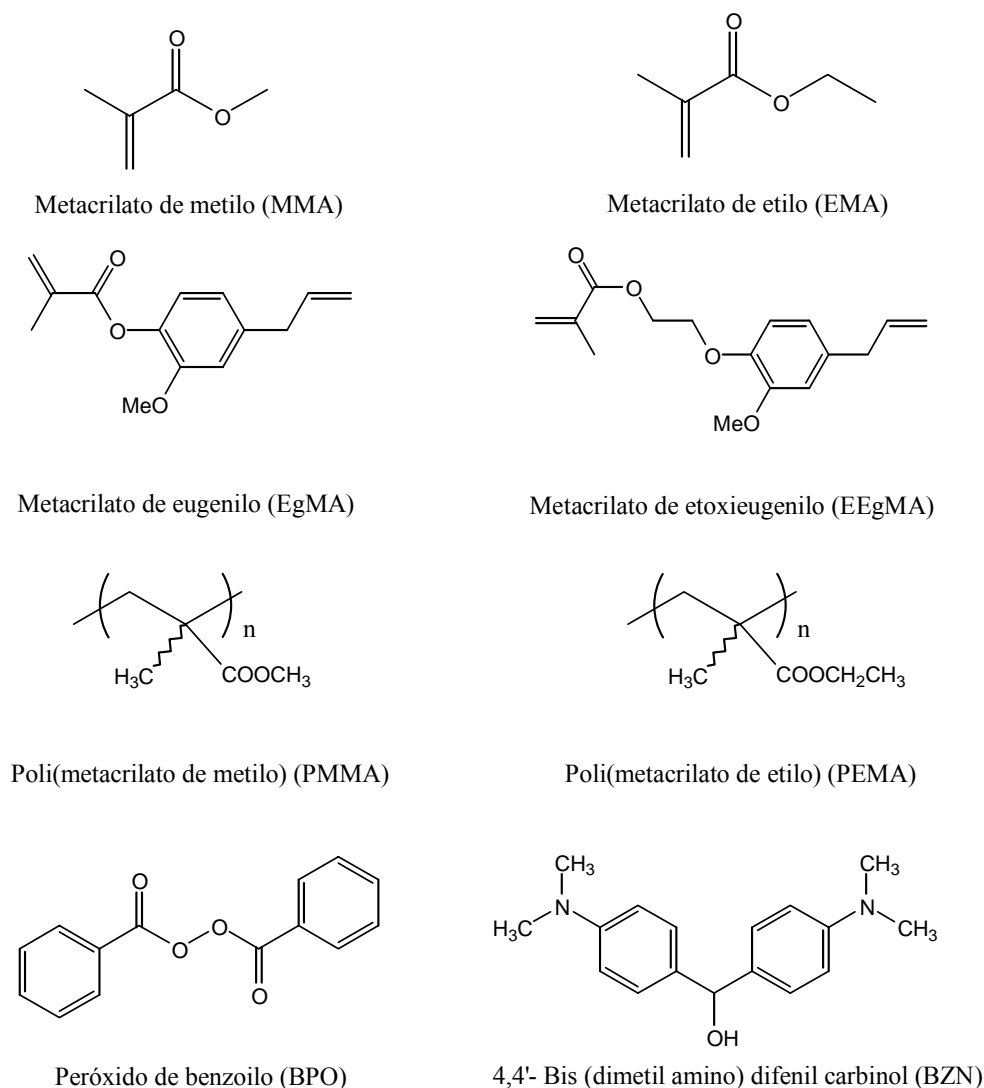


Figura 1.11 Componentes de los cementos acrílicos formulados.

Las formulaciones que incorporan los monómeros derivados de eugenol se preparan mediante la sustitución de una cierta cantidad del monómero metacrílico (MMA o EMA) por los monómeros metacrilato de eugenilo (EgMA) o metacrilato de etoxieugenilo (EEgMA). Así, se preparan formulaciones que contienen respecto del peso de la fase líquida, un 10, 15 y 30% (p/p) de EgMA, y otras tantas que contienen EEgMA en las mismas proporciones. En la tabla 1.2 se detalla la composición y el contenido de los respectivos monómeros derivados de eugenol de cada formulación ensayada. Además, como se ha indicado, se preparan dos formulaciones control de PMMA y PEMA en las cuales no se realiza ninguna adición de monómeros derivados de eugenol. Estas formulaciones se designan como PMMA y PEMA respectivamente.

FORMULACIÓN	COMPOSICIÓN DE LA FASE LÍQUIDA (% p/p)	COMPOSICIÓN DE LA FASE SÓLIDA (% p/p)	RELACIÓN SOL:LIQ	MONÓMERO DERIVADO DE EUGENOL EN EL CEMENTO (% p/p) ^b
PEMA	EMA 98% BENZIDROL 2%	PEMA 90% BaSO ₄ 8% BPO 2%	2:1	0
PEMA/Eg10	EMA 88% BENZIDROL 2%			3,3
PEMA/EEg10	MEg ^{*,a} 10%			
PEMA/Eg15	EMA 83% BENZIDROL 2%			5
PEMA/EEg15	MEg ^{*,a} 15%			
PEMA/Eg30	EMA 68% BENZIDROL 2%			10
PEMA/EEg30	MEg ^{*,a} 30%			
PMMA	MMA 98% BENZIDROL 2%	PMMA 90% BaSO ₄ 8% BPO 2%	2:1	0
PMMA/Eg10	MMA 88% BENZIDROL 2%			3,3
PMMA/EEg10	MEg ^{*,a} 10%			
PMMA/Eg15	MMA 83% BENZIDROL 2%			5
PMMA/EEg15	MEg ^{*,a} 15%			
PMMA/Eg30	MMA 68% BENZIDROL 2%			10
PMMA/EEg30	MEg ^{*,a} 30%			

a: Experimental; b: Teórico.

Tabla 1.2 Composición y contenido en EgMA o EEgMA de las distintas formulaciones de cementos acrílicos ensayados. *: MEg = Monómero derivado de eugenol (EgMA o EEgMA).

Con el fin de evaluar las propiedades físico-químicas de los cementos formulados se realizan los siguientes experimentos: determinación de los parámetros de curado, medida de propiedades térmicas, determinación del monómero residual y evaluación de las propiedades mecánicas mediante ensayos de resistencia a la

compresión y flexión, tanto a tres como a cuatro puntos, para todas las formulaciones. De manera complementaria se determina la resistencia a tensión sobre las formulaciones basadas en EgMA.

1.5.1.1.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DE PARTÍCULAS ESFÉRICAS DE POLI(METACRILATO DE ETILO).

La obtención de las partículas esféricas (perlas) de poli(metacrilato de etilo) se realiza mediante polimerización radical en suspensión del monómero EMA (Acros, purificado por destilación) en presencia de PVA (Aldrich) como agente surfactante y peróxido de benzoilo como iniciador radical (Merck, previamente cristalizado en metanol).

Para ello, se introducen en un reactor de camisa 600 ml de una disolución de PVA al 3% y se le añaden 200 ml de EMA en los que se han disuelto previamente 3,67 g (2% p/p) de BPO como iniciador radical. La mezcla se mantiene bajo agitación constante a 600 rpm bajo atmósfera de nitrógeno. Con el fin de controlar la temperatura se le hace pasar por la camisa del reactor una corriente de agua termostatzada de modo que la temperatura de reacción sea de 70 °C durante las tres primeras horas para luego aumentarla a 80 °C durante dos horas más.

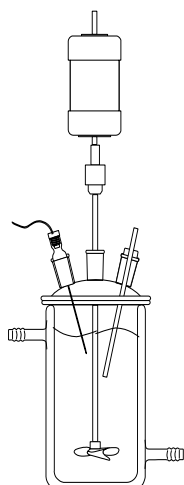


Figura 1.12 Esquema del reactor usado para la síntesis de las partículas de PEMA.

Una vez pasado este tiempo se filtra la mezcla de reacción y se lavan las partículas obtenidas con agua destilada durante tres horas con el fin de eliminar los restos de PVA adheridos a la superficie. A continuación se secan en estufa a 60 °C hasta pesada constante.

La caracterización de las partículas de PEMA se realiza mediante RMN ^1H . Además se determina el tamaño de partícula por medidas de difracción de luz. Esta medida se complementa con la observación de las partículas mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM).

Para la caracterización mediante RMN ^1H se realizan los experimentos en un equipo Varian XL 300. Para ello se disuelve una muestra en cloroformo deuterado (10% p/v) y se registra el espectro de protón a 25 °C.

La distribución de tamaños de partícula se realiza mediante un equipo Beckman Coulter LS230 el cual detecta las partículas dispersas en un fluido de densidad conocida y cuantifica su diámetro medio.¹⁹

La determinación del tamaño de partícula se basa en la medida de la difracción de un haz de luz láser con longitud de onda de 750 nm. El aparato consta de 126 detectores de fotodiodo que le permite medir partículas con un diámetro entre 50 y 2.000 μm . Un sistema detector adicional basado en la tecnología multifrecuencia PIDS (Polarization Intensity Differential Scattering) permite bajar el límite de detección a 0,04 μm . De este modo el rango completo de detección del equipo es de 0,04 a 2.000 μm .

Existen numerosos modelos ópticos para tratar los datos de difracción. El modelo de Fraunhofer es el más adecuado para materiales opacos, que producen poca difracción de luz o con un modelo inespecífico.²⁰ Sin embargo es posible aplicar un método más específico basado en las teorías de difracción de Mie que tenga en cuenta todas las propiedades específicas de cada material²¹ (índice de refracción, etc). Las diferencias encontradas en la determinación del tamaño medio de partícula, según ambos métodos se hacen significativas para aquellas partículas con diámetros inferiores

a 10 μm .²² En este trabajo, las diferencias encontradas en la determinación del tamaño de partícula mediante la aplicación del modelo general de Fraunhofer y un modelo creado *ad hoc* para el PEMA resultaron despreciables.

Para la medida del diámetro medio en volumen, las partículas se suspenden en una mezcla de etanol/agua al 50%. Bajo idénticas condiciones y a modo de comparación se analiza una muestra de PEMA comercial suministrado por Aldrich. El valor estadístico del tamaño de partícula (%volumen) viene determinado por la ecuación 1.5.

$$\bar{D}_{VOL} = \frac{\sum_i n_i D_i^3}{\sum_j n_j D_j^3} D_i \quad \text{Ec. 1.5}$$

donde \bar{D}_{VOL} indica el diámetro medio en volumen y n_i es el número de partículas de diámetro D .

Para la observación de las muestras al microscopio electrónico, éstas se secan a 37 °C y se metalizan con oro para posteriormente analizarlas en un microscopio electrónico de barrido ambiental Philips XL 30, con una aceleración de voltaje que oscila entre 15 y 25 KeV.

Por último se determinan los pesos moleculares promedio en número (\bar{M}_n), promedio en peso (\bar{M}_w) y la polidispersidad ($IP = \bar{M}_w / \bar{M}_n$) mediante Cromatografía de Exclusión de Tamaños (SEC) siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado 1.2.1.3.

1.5.1.2.- PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS CEMENTOS ACRÍLICOS.

En este apartado se detallan los ensayos realizados para determinar las propiedades fisico-químicas que afectan a las características finales de los distintos cementos acrílicos formulados.

Determinación de los parámetros de curado: En este apartado se registra la evolución que experimenta la temperatura de la masa de cemento reaccionante a medida que transcurre la reacción de polimerización. Una vez que la masa de cemento adquiere una consistencia adecuada y se alcanza el tiempo pastoso, caracterizado por su no adherencia al guante de latex,²³ se introduce en un molde cilíndrico termostatzado a 23 °C, de 10 mm de diámetro y 15 mm de altura, como se muestra en la figura 1.13.

Las dimensiones de este molde difieren del descrito en la norma ISO 5833,²⁴ recomendado para la medición de los parámetros de curado. Sin embargo, su utilización para este experimento presenta algunas ventajas con respecto al descrito en dicha norma,²⁵ como por ejemplo que la cantidad de muestra necesaria para obtener los datos requeridos es mucho menor y que el molde está dotado de una camisa que se puede termostatar a la temperatura de interés. Además, el tamaño y la forma del molde responden a la geometría de la cavidad intrafemoral. La correlación de este molde con el descrito en la citada norma analizada mediante experimentos paralelos muestra una desviación de la temperatura entre ambos métodos menor a 2 °C.

Para el seguimiento de la variación de la temperatura respecto del tiempo de curado, se introduce un termopar en el centro del molde, a una altura de 3 mm del fondo del mismo. Al comienzo del mezclado de ambas fases, se conecta un cronómetro y se efectúa la adquisición de datos de temperatura con el tiempo hasta que, tras registrarse la temperatura máxima de curado, nuevamente se alcanza la temperatura ambiente.

Con los datos de la variación de la temperatura con el tiempo se representan los perfiles temperatura-tiempo como los que se muestran en la figura 1.14 y con los que se calculan el tiempo de fraguado (T_f) y la temperatura máxima (T_{max}) alcanzada en el curado de los distintos cementos.

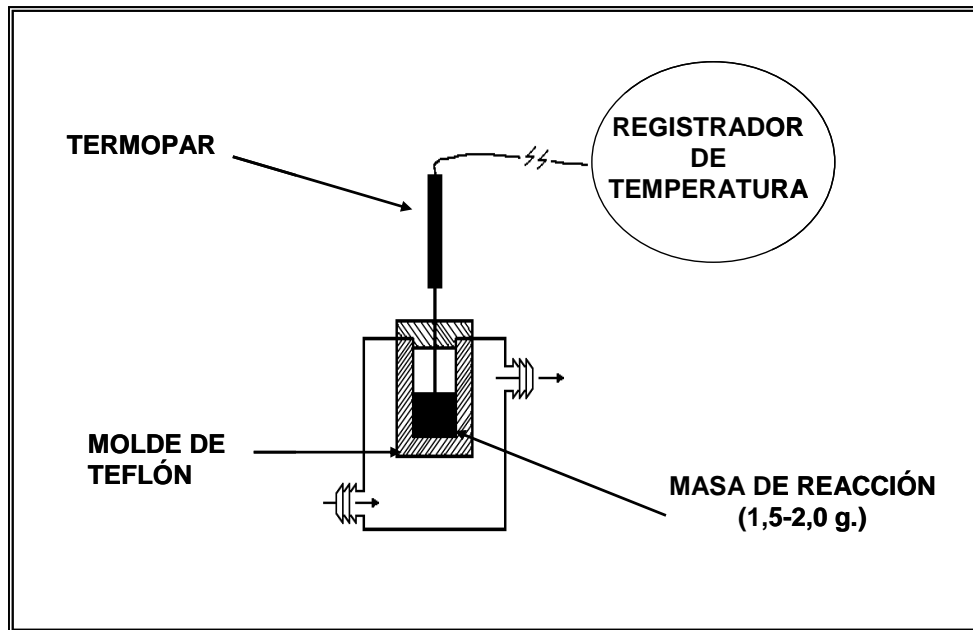


Figura 1.13 Molde de teflón para el estudio de los parámetros de curado de cementos acrílicos.

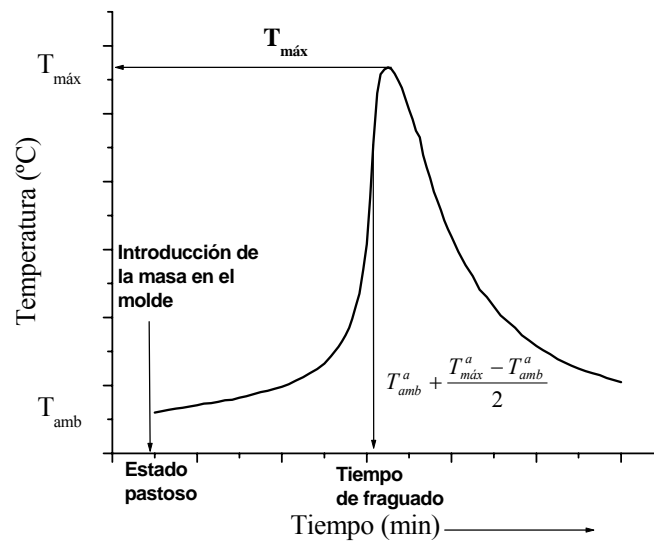


Figura 1.14 Variación de la temperatura durante el fraguado de los cementos óseos acrílicos.

Propiedades Térmicas: Las propiedades térmicas de los cementos óseos se determinan siguiendo la misma metodología que la descrita en el apartado 1.2.1.3. para los polímeros derivados de eugenol.

Determinación del monómero residual: El contenido de monómero residual (CMR) se determina por medio de RMN ^1H , comparando las integrales de las señales correspondientes a los protones del monómero residual (CH_2^β : 5,4 – 6,4 ppm) y la de los protones oxietilénicos del polímero ($\text{COO-CH}_2\text{-CH}_3$: 1,38 – 1,45) de un total de tres muestras por cada formulación de cementos estudiada. Los espectros de RMN ^1H se registran en un equipo Varian XL 300 a 25 °C en cloroformo deuterado (10%) a partir de muestras almacenadas al aire durante 7 días.

Ensayo de compresión: Para la obtención de las probetas para el ensayo de compresión se utiliza un molde de teflón como el mostrado en la figura 1.15, el cual presenta una serie de perforaciones cilíndricas de 6 mm de diámetro por 12 mm de altura y que se corresponden con las especificaciones de la anteriormente citada norma ISO 5833.

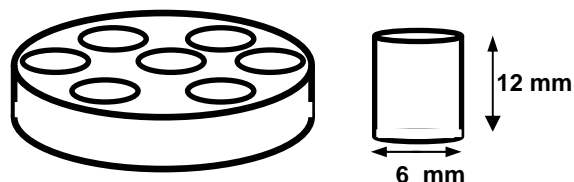


Figura 1.15 Molde y probeta de ensayo mecánico de compresión.

Cuando la mezcla alcanza el estado pastoso se llenan los moldes, se presiona por ambas caras con dos superficies metálicas y se mantienen al aire a 37 °C. Una hora después se quitan las placas y se rectifican en húmedo las superficies de los extremos planos de la muestra utilizando un papel abrasivo del grado 2. Inmediatamente después de finalizar el pulido, se retira la muestra del molde y se examinan las muestras desechando todas aquellas que presenten huecos de aire o bordes con rebabas. Cada muestra que resulte aceptable se almacena al aire a 37 °C durante 24 h. Tras este tiempo se acondicionan las probetas de nuevo durante 15 min a 23 °C antes de realizar el ensayo. Inmediatamente después de terminar el periodo de acondicionamiento, se coloca la muestra con los extremos planos entre las platinas del aparato de ensayo mecánico, de forma que la carga se aplique en el eje longitudinal de la probeta. Las probetas se ensayan en una máquina universal Instron 4301 (figura 1.16).

Se aplica una velocidad de desplazamiento de cruceta constante de $20 \pm 1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta alcanzar deformación máxima del 30% de la longitud inicial. La célula de carga usada es de 5 kN.

La resistencia a la compresión (σ_C) en MPa, se calcula aplicando la siguiente ecuación:

$$\sigma_C = 4F/\pi d^2 \quad \text{Ec. 1.6}$$

donde F es la fuerza máxima aplicada, en Newtons y d es el diámetro medio de la muestra, medido en milímetros.

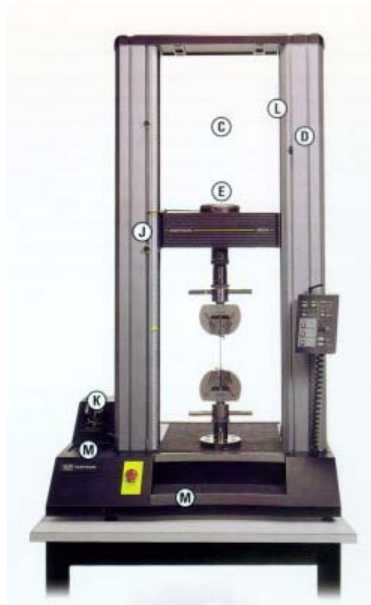


Figura 1.16 Máquina universal de ensayos mecánicos.

Ensayo de flexión a tres puntos: El ensayo de resistencia flexión a tres puntos se lleva a cabo siguiendo el procedimiento descrito en la norma ISO 4049²⁶ para cementos dentales. Para ello, se mezclan los dos componentes de la formulación correspondiente. Con la ayuda de un molde de teflón y presionando por ambas caras con dos superficies metálicas, se preparan probetas del material deseado con forma de barra de $25 \pm 2 \text{ mm}$ de largo, $2 \pm 0,1 \text{ mm}$ de ancho y $2 \pm 0,1 \text{ mm}$ de espesor, manteniéndose al aire a $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Una hora después del inicio de la mezcla se retiran las placas, se separan las muestras

del molde y se eliminan las rebabas utilizando un con papel abrasivo de los números 140 ó 320. Las muestras se almacenan en agua destilada a 37 ± 1 °C hasta el comienzo del ensayo desechando todas aquellas que presenten huecos de aire o irregularidades en los bordes. A las 24 horas después del inicio de la mezcla se miden las dimensiones de cada muestra con una precisión de $\pm 0,01$ mm y se transfiere la muestra al aparato de ensayo de flexión. Se aplica una carga sobre la muestra a velocidad constante de $0,75 \pm 0,25$ mm·min⁻¹ hasta la fractura de la muestra. El ensayo se repite con al menos 5 muestras de cada formulación en una máquina universal de ensayos Instron 4301 (figura 1.16).

Se calcula la resistencia a la flexión a tres puntos (σ_{3P}) en MPa, a partir de la ecuación 1.7.

$$\sigma_{3P} = \frac{3Fl}{2bh^2} \quad \text{Ec. 1.7}$$

donde F es la carga máxima en Newtons, ejercida sobre la muestra; l es la distancia en milímetros, entre los soportes, con exactitud de ± 0.01 mm; b es el ancho en milímetros, de la muestra medida inmediatamente antes del ensayo y h es la altura en milímetros, de la muestra medida inmediatamente antes del ensayo.

Ensayo de flexión a cuatro puntos: En este ensayo, se mide la resistencia a flexión entre cuatros puntos de apoyo siguiendo el procedimiento descrito en la norma ISO 5833 para cementos acrílicos. En este caso, también se va a emplear un molde de dimensiones algo inferiores pero cuyos valores obtenidos en ensayos comparativos son correlacionables. Se mezclan los dos componentes de la formulación correspondiente y con la ayuda de un molde de teflón y dos superficies metálicas, se preparan probetas del material deseado con forma de barra de 45 ± 2 mm de largo, $6 \pm 0,1$ mm de ancho y $4 \pm 0,1$ mm de espesor manteniéndolo al aire a 37 °C. Una hora después del inicio de la mezcla, se retiran las placas, se separan las muestras del molde y se eliminan las rebabas limando con papel abrasivo de los números 140 ó 320. Las muestras se almacenan en agua destilada a 37 ± 1 °C hasta el comienzo del ensayo desechando todas aquellas que presenten huecos de aire o irregularidades en los bordes. A las 24 horas después del inicio de la mezcla se miden las dimensiones de cada muestra con una precisión de \pm

0,01 mm y se transfiere al aparato de ensayo de flexión. La figura 1.17 esquematiza la geometría y dimensiones del utillaje correspondiente a este ensayo.

El ensayo se realiza aplicando una carga a velocidad constante de $5 \pm 0,1 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ hasta la fractura de la muestra. El ensayo se repite con al menos 5 muestras de cada formulación en una máquina universal de ensayos Instron 4301 (figura 1.16).

La resistencia a la flexión a cuatro puntos (σ_{4P}) en MPa, se calcula a partir de la ecuación 1.8.

$$\sigma_{4P} = \frac{3Fa}{bh^2} \quad \text{Ec. 1.8}$$

donde F es la fuerza máxima en Newtons ejercida sobre la muestra; l es la distancia en milímetros, entre los soportes, con exactitud de $\pm 0.01 \text{ mm}$; b es el ancho, en milímetros, de la muestra medida inmediatamente antes del ensayo; h es la altura en milímetros, de la muestra medida inmediatamente antes del ensayo y a es la distancia en milímetros, entre los apoyos interiores y exteriores.

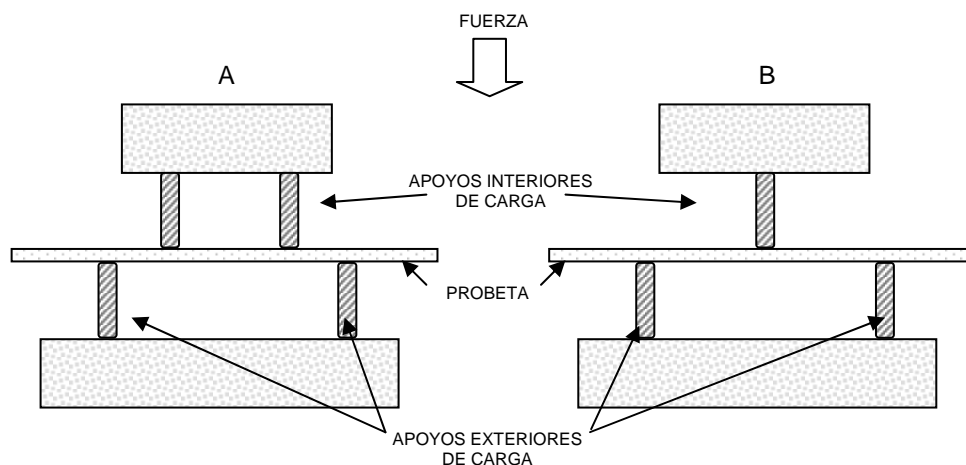


Figura 1.17 Esquema de las geometrías empleadas en los ensayos de flexión a cuatro puntos (A) y a tres puntos (B).

Ensayo de tracción: Como se ha comentado, este ensayo sólo se realiza con las formulaciones basadas en EMA que contienen el monómero metacrilato de eugenilo. Para este ensayo las probetas diseñadas son planas y presentan forma de alterio como las representadas en la figura 1.18. Para ello se mezclan los dos componentes y con la

ayuda de un molde de teflón se preparan probetas del material deseado presionando por ambas caras con dos superficies metálicas y se mantienen al aire a 37 °C. Una hora después del inicio de la mezcla se retiran las placas y se separa el molde. Se retira la muestra y se eliminan las rebabas limando con papel abrasivo de los números 140 ó 320. Se almacenan las muestras en agua destilada a 37 ± 1 °C hasta el comienzo del ensayo desechando todas aquellas que presenten huecos de aire o irregularidades en los bordes. En este caso se preparan 10 probetas por formulación, almacenándose la mitad durante 24 h y la otra mitad durante 5 semanas. Inmediatamente después de los correspondientes tiempos de almacenamiento, se miden las dimensiones de cada muestra con una precisión de $\pm 0,01$ mm y se transfiere la muestra al aparato de ensayo de tracción.

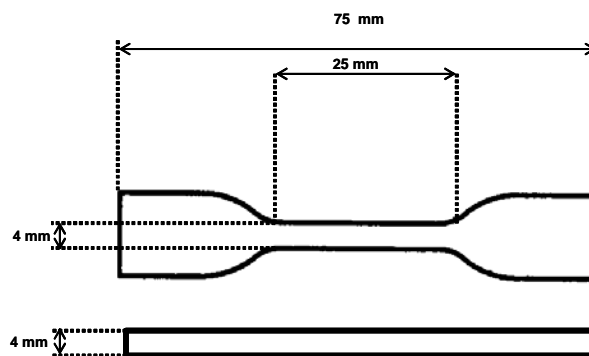


Figura 1.18 Geometría de las probetas para ensayo mecánico de tracción.

El ensayo se realiza aplicando una tensión con una velocidad constante de $5 \pm 0,1$ mm·min⁻¹ hasta la fractura de la muestra. Cada ensayo se repite con al menos 5 muestras de cada formulación en una máquina universal de ensayos Instron 4301 (figura 1.16).

La resistencia a la tracción (σ_T) en MPa, se calcula a partir de la ecuación 1.9.

$$\sigma_T = \frac{F}{bh} \quad \text{Ec. 1.9}$$

donde F es la fuerza máxima en Newtons ejercida sobre la muestra; b es el ancho en milímetros, de la muestra medida inmediatamente antes del ensayo y h es la altura en milímetros, de la muestra medida inmediatamente antes del ensayo.

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

1.5.2.- CEMENTOS DE IONÓMEROS DE VIDRIO DERIVADOS DE EUGENOL.

En este apartado se detalla la preparación de un nuevo copolímero derivado de ácido acrílico y metacrilato de eugenilo el cuál se introduce en formulaciones de cementos de ionómero de vidrio con aplicación como cementos dentales.

1.5.2.1.- SÍNTESIS DEL COPOLÍMERO DE ÁCIDO ACRÍLICO Y METACRILATO DE EUGENILO p(AA-co-EgMA).

En este apartado se detalla la preparación del copolímero p(AA-co-EgMA) derivado de ácido acrílico (AA) y metacrilato de eugenilo (EgMA), para lo cuál se utilizan los siguientes reactivos: Ácido acrílico (Aldrich) previamente purificado por destilación a presión reducida. El monómero metacrilato de eugenilo (EgMA) sintetizado según el apartado 1.1.2. Como iniciador radical se usa azobisisobutironitrilo (AIBN, Merck) recristalizado en metanol (P.f. 104 °C). Como disolventes se usan etanol (Scharlau) y acetona (SDS).

Para la síntesis del copolímero se prepara una disolución en etanol (1M con respecto a los monómeros) de ácido acrílico y metacrilato de eugenilo con una relación molar AA:EgMA de 80:20. La disolución se desoxigena burbujeándola con nitrógeno durante 15 minutos, a temperatura ambiente. A continuación se añade AIBN (1% p/p con respecto a los monómeros) como iniciador radical, y se lleva a cabo la copolimerización a 60 °C. Con el fin de obtener copolímeros solubles, la reacción se detiene a las 24 h enfriando la disolución y eliminando el disolvente en un rotavapor. A continuación el producto se lava varias veces con acetona para extraer el monómero residual, tras lo cual se disuelve en una cantidad mínima de agua y se liofiliza. El producto final consiste en un polvo de color blanquecino.

El copolímero se caracteriza mediante técnicas de RMN ^1H en un equipo Varian XL 300. Las muestras se preparan en dimetil sulfóxido (25% p/v) y se registra el espectro a 25° C. La composición del copolímero se determina mediante la ecuación 1.1 donde, para este caso, $f(M_1)$ es la fracción molar de la unidad M_1 (ácido acrílico), I_{M1} es la integral correspondiente a protón carboxílico proveniente del ácido acrílico e I_{M2} es la integración de las señales asignadas a los protones alílicos y arílicos de la unidad monomérica M_2 (EgMA).

El análisis estructural se completa con un estudio espectroscópico ATR-FTIR. Para ello se prepara una disolución al 50% del copolímero en agua y se deposita una capa delgada sobre la ventana del equipo para registrar el espectro. El equipo usado para realizar este análisis es un Perkin-Elmer Spectrum One.

Los pesos moleculares promedio en número (\overline{M}_n), promedio en peso (\overline{M}_w) y la polidispersidad ($\overline{M}_w/\overline{M}_n$) del copolímero se determinan mediante Cromatografía de Exclusión de Tamaños (SEC, de sus siglas inglés). El equipo usado es un GPC Waters 1515 Isocratic HPCL Pump, conectado con una precolumna y dos columnas Waters Ultrahidrogel 500 y 250 termostalizadas a 30 °C, que se conectan a un detector de índice de refracción, Waters 2414. Como fase móvil se usa una disolución tampón de $\text{CH}_3\text{CN}/\text{KNO}_3$ (0,1M) y se mantiene un flujo continuo de 0,5 ml/min. El equipo se calibra previamente con patrones monodispersos de poli(óxido de etileno) (POE, waters). Para la determinación del peso molecular del copolímero se prepara una disolución con concentración 10 mg/ml y se deja agitando durante 2 horas para su disolución completa. Seguidamente, la disolución se filtra haciéndola pasar por una membrana de PTFE de 0,45 μm y se inyecta en el sistema cromatográfico.

1.5.2.2.- FORMULACIÓN Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS CEMENTOS IONÓMERO DE VIDRIO.

Con el copolímero p(AA-co-EgMA) sintetizado se formulan nuevas fases líquidas para cementos ionómero de vidrio (CIV). Para ello se preparan distintas disoluciones en agua destilada del copolímero al 30% p/p (FL30), 40% p/p (FL40) y al

50% p/p (FL50) y se dejan bajo agitación hasta su total disolución a temperatura ambiente.

En todos los casos se usa la fase sólida del cemento comercial GC Fuji IX (Kent Dental, UK) para preparar los correspondientes cementos ionómero de vidrio. En la tabla 1.3 se resumen las distintas relaciones sólido:líquido usadas en este trabajo. Como formulación control se usa el cemento comercial GC Fuji IX.

Para la preparación de las muestras, se mezclan a mano las correspondientes fases líquida y sólida. Posteriormente se dejan curar durante 24 horas a 37 °C al aire, para después almacenarse en agua destilada a 37 °C durante 24 horas y 6 semanas antes de realizar los distintos ensayos.

FASE LÍQUIDA	FASE SÓLIDA	RELACIÓN SOL:LIQ
GC Fuji IX GP Líquido	GC Fuji IX GP Polvo	3:1 ^{*1, *2}
FL30	GC Fuji IX GP Polvo	2:1 ^{*1}
		3:1 ^{*1}
		4:1
FL40	GC Fuji IX GP Polvo	2:1
		3:1 ^{*1, *2}
FL50	GC Fuji IX GP Polvo	2:1 ^{*1, *2}
		3:1
		5:2

Tabla 1.3 Cementos ionómero de vidrio experimentales formulados en este trabajo. ^{*1} Formulación usada para determinación de propiedades mecánicas. ^{*2} Formulación usada para estudio de hidratación y liberación de fluoruro.

Una vez completado los correspondientes tiempos de curado, se llevan a cabo los ensayos necesarios para una caracterización físico-química de todos los cementos preparados.

Parámetros de curado: Los parámetros de curado se determinan usando un reómetro oscilante tipo Wilson.²⁷ Para ello se mezclan ambas fases depositando una pequeña cantidad del cemento en estado pastoso entre los platos del reómetro y se deja curar. El tiempo de trabajo (t_w) y el de fraguado (t_s) de cada formulación se corresponden a los tiempos que se necesitan en alcanzar el 95% y el 5% respectivamente, de la amplitud inicial de la oscilación registrada para cada muestra (figura 1.19). Cada formulación se ensaya 5 veces y se promedian los resultados.

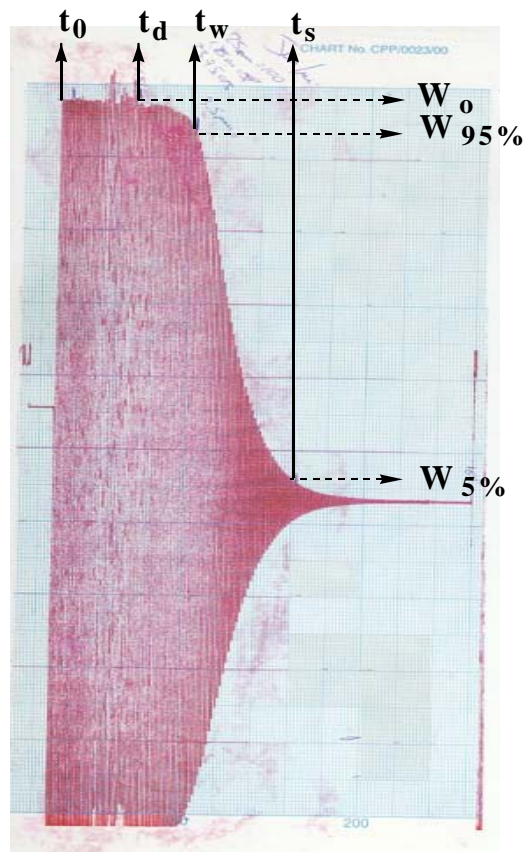


Figura 1.19 Oscilograma obtenido con un reómetro tipo Wilson, tras el curado de un cemento ionómero de vidrio. Se indican los tiempos inicial (t_0), pastoso (t_d), de trabajo (t_w) y de fraguado (t_s) calculados respectivamente al 100% (W_0), al 95% ($W_{95\%}$) y al 5% ($W_{5\%}$) de la amplitud de oscilación inicial.

Propiedades mecánicas: Las resistencias a la compresión, tensión diametral y flexión de los distintos cementos experimentales se determinan de acuerdo con la norma ISO 9917,²⁸ usando una máquina de ensayos universal Instron 1195 con una célula de carga de 500 N. Las muestras para los ensayos de resistencia a compresión y tensión

diametral, se preparan mezclando la cantidad suficiente de cemento como para llenar seis moldes cilíndricos de metal de 6 mm de altura por 4 mm de diámetro, previamente rociadas con un agente desmoldeante silicónico, para prevenir la adhesión del cemento al metal. Estos ensayos se realizan fijando una velocidad constante de cruceta de 1 mm/min. Las muestras para el ensayo de resistencia a la flexión en tres puntos se preparan siguiendo el mismo procedimiento, usando en este caso moldes con una geometría en forma de barra (1 mm de espesor por 5 mm de ancho y 50 mm de longitud) y una velocidad de cruceta de 0,1 mm/min.

La resistencia a la compresión (σ_C), a la tensión diametral (σ_{TD}) y a la flexión (σ_F), se calculan mediante la ecuaciones 1.10, 1.11 y 1.12, respectivamente.

$$\sigma_C = P/\pi r^2 \quad \text{Ec. 1.10}$$

$$\sigma_{TD} = 2P/\pi dt \quad \text{Ec 1.11}$$

$$\sigma_F = 3 Pl/2bd^2 \quad \text{Ec 1.12}$$

donde P es la carga en el momento de fractura, r el radio de la muestra cilíndrica, d es el diámetro, t es la longitud de la probeta, l es la distancia entre los dos soportes, b es el ancho y d la altura de la probetas.

Caracterización superficial: Para la caracterización microscópica de la superficie de los distintos CIV formulados, se toman las probetas provenientes del ensayo de resistencia a la tensión diametral y se tratan para su observación en el microscopio electrónico de barrido ambiental (MEBA). Para ello las muestras se secan a vacío y se recubren con una capa muy fina de oro. Una vez metalizadas las superficies de las distintas muestras, se examinan con un microscopio electrónico de barrido ambiental Philips XL 30, con una aceleración de voltaje que oscila entre 15 y 25 KeV.

Absorción de agua y disgregación: El estudio de hidratación de los cementos ionómero de vidrio se realiza mediante la inmersión de probetas con forma de discos (5 mm de diámetro por 1 mm de espesor) en agua destilada a 37 °C. A distintos tiempos se

extraen los discos, se secan cuidadosamente sus superficies con papel de filtro y se anota el peso. Este procedimiento se repite hasta que se alcanza el equilibrio en las pesadas. Todas las medidas se realizan por triplicado y se promedian los resultados.

Para calcular el porcentaje de masa disgregada se toman las muestras anteriores, una vez han alcanzado el equilibrio, y se secan en una estufa a 50 °C hasta pesada constante para posteriormente calcular el tanto por ciento de pérdida de peso, con respecto a la masa inicial.

Los porcentajes de hidratación (H) y disgregación (D) se determinan mediante las ecuaciones 1.13 y 1.14 respectivamente,

$$H = 100 \cdot (M_t - M_0) / M_0 \quad \text{Ec. 1.13}$$

$$D = 100 \cdot (M_0 - M_f) / M_0 \quad \text{Ec. 1.14}$$

donde M_t es el peso de la muestra a un tiempo determinado t , M_0 es el peso inicial y M_f es el peso final de la muestra tras su secado a 50 °C.

En las etapas iniciales de la hidratación, la difusión del agua a través de la masa de cemento viene dada por la ecuación de absorción normalizada,²⁹

$$M_t/M_\infty = 2 \{Dt/\pi l^2\}^{1/2} \quad \text{Ec 1.15}$$

donde M_t es el peso de la muestra a un tiempo dado, M_∞ es el peso en el equilibrio, $2 \cdot l$ es el espesor y D el coeficiente de difusión. Representando M_t/M_∞ frente a $t^{1/2}$ en los primeros estadios de absorción, se obtiene una línea recta de cuya pendiente (s) en la parte inicial de cada curva, se puede determinar el coeficiente de difusión (D), siempre que no se supere el 60% de la absorción total.

$$s = 2 \{D/\pi l^2\}^{1/2} \quad \text{Ec. 1.16}$$

$$D = 2 \{s^2 \pi l^2 / 4\} \quad \text{Ec. 1.17}$$

Liberación de fluoruro y medida del pH superficial: Debido a la capacidad que tiene el vidrio de liberar ciertos iones como el ión fluoruro (F^-) a las disoluciones que puedan contener, todo el material usado en los ensayos descritos en este apartado será material plástico.

Para ambos estudios se preparan tres muestras con forma de disco (5 mm de diámetro por 1 mm de espesor) de cada composición experimental de CIV. Cada disco se sumerge en 2 ml de agua destilada en el interior de un recipiente cerrado y se almacena a 37 °C. Para evitar la saturación de la muestra, el agua se recambia cada 24 h almacenándose para su posterior análisis. En cada toma de muestra, se deposita una gota sobre la superficie del disco y se mide el pH con un electrodo selectivo (BDH Glass+, Fisherbrand Hydrus 100) antes de su recolección. Inmediatamente después, la muestra se sumerge de nuevo en otros 2 ml de agua destilada fresca.

La toma de muestras y la medida de pH superficial se realizan durante 14 días consecutivos. A cada muestra de agua recolectada se le añaden 2 ml de disolución tampón TISAB (TISAB I BDH limited Poole England) y se determina el contenido de ión fluoruro mediante un electrodo selectivo de iones fluoruro (Cole Parmer 27502), conectado a un sistema analizador (OAKTON 510 ión series) calibrado previamente mediante una recta patrón construida a partir de una serie de disoluciones (1; 3; 5; 7; 10; 30; 50; 70; 100 ppm) preparadas en el momento de la medida mediante diluciones consecutivas de una disolución de NaF en concentración 1 g/l (BDH limited Poole England).

Test estadístico de significancia ANOVA: El análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio de los CIV se lleva a cabo por análisis de la varianza (ANOVA) En todos los análisis estadísticos se considera $p > 0,05$ como estadísticamente significativo. Los valores encontrados con diferencias significativas con respecto a la formulación comercial GC Fuji IX GP se marcan como * en el correspondiente resultado.

1.6.- BIBLIOGRAFÍA.

- 1 Smith B.M., March J. March's Advanced Organic Chemistry, 5^a ed. *John Wiley and Sons*. New York. 2001.
- 2 Turi E. A. Thermal Characterization of Polymeric Materials. *Academia Press*. Londres. 1985.
- 3 Schramm G. A Practical Approach to Rheology and Rheometry. *Haake*. Karlsruhe. 1994.
- 4 Lawrence E. N. Mechanical Properties of Polymers and Composites. *Mardel Dekker*. New York. 1974.
- 5 Owens D. K., Wendt R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Pol Sci* 13: 1741-1747. 1969.
- 6 Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 37: 517-524. 1997.
- 7 Issa Y., Watts D. C., Brunton D. A., Waters C. M., Duxbury A. J. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human gingival fibroblast *in vitro*. *Dent Mater* 20: 12-20. 2004.
- 8 Niu Q. X., Zhao C. Y., Jing Z. A. An evaluation of the colorimetric assays based on enzymatic reactions used in the measurement of human natural cytotoxicity. *J Immunol Methods* 251: 11-19. 2001.
- 9 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.
- 10 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 Methods* 89: 271-277. 1986.
- 11 Laekeman G. M., Van Hoof L., Haemers A., Vanden Berghe D. A., Herman A. G., Vlietinck A. Eugenol a valuable compound for *in vitro* experimental research and worthwhile for further *in vivo* investigation. *J Phytoter Res* 4: 90-96. 1990.
- 12 Walsh S. E., Maillard J. Y., Russell A. D., Catrenich C. E., Charbonneau D. L., Bartola R. G. Activity and mechanisms of action of selected biocidal agents on Gram-positive and -negative bacteria. *J Appl Microbiol* 94: 240-247. 2003.

-
- 13 Yuwono M., Siswandono Hadif A. F., Poernomo A. T., Ail M., Indrayanto G., Ebel S. Eugenol. En *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. Elsevier Science. New Jersey* 29:149-177. 2002.
- 14 Ronald M. A., James W. S. *Handbook of Media for Clinical Microbiology. 2ª Ed. CRC Press. Florida.* 2006.
- 15 Ieven M., Vanden Berghe D. A., Mertens F., Vlietinck A., Lammens E. Screening of higher plants for biological activities 1. Antibacterial activity. *Planta Med* 36: 311-321. 1979.
- 16 Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496. 1966.
- 17 Rudigier J., Kirschner P., Richter I. E., Schweikert C. H. Influence of different x-ray contrast materials on structure and strength of bone cements. En *Mechanical Properties of Biomaterials. Wiley & Sons. Chichester.*1980.
- 18 De la Torre B., Fernández M., Vázquez B., Collía F., de Pedro J. A., López-Bravo A. Biocompatibility and other properties of acrylic bone cements prepared with antiseptic activators *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 66: 502-513. 2003.
- 19 Allen T. Particle Size Measurement 5ª ed. *Chapman&Hall.* London. 1997.
- 20 Hansen J. C., Maier D., Honerkamp J., Richtering W., Horn F. M., Senf H. Size distribution out of static light scattering: inclusion of distortions from the experimental set-up, e.g. a SOFICA-type goniometer. *J Colloid Interf Sci* 215: 72-84. 1999.
- 21 Beckman-Coulter Coulter LS Series: Product Manual. *Beckman Coulter.* Miami. 1994.
- 22 de Boer G. B. J., de Weerd C., Thoenes D., Goossens H. W. J. Laser diffraction spectrometry: Fraunhofer versus Mie scattering. *Part Charact* 4: 14-19. 1987.
- 23 Meyer P. R., Lautenschlager E. P., Moore B. K. On the setting properties of acrylic bone cements *J Bone Joint Surg* 55(A): 149 -156. 1973.
- 24 ISO Specification 5833. Standard Specification for Implants in Surgery-Acrylic Resin Cement. 2002.
- 25 Pascual B., Vázquez B., Gurruchaga M., Goñi I., Ginebra M. P., Gil F. J., Planell J. A., Levenfeld B., San Román J. New aspects of the effect of size and size distribution on the setting parameters and mechanical properties of acrylic bone cements. *Biomaterials* 17: 509-516. 1996.

26 ISO Specification 4049. Standard Specification for Polymer Based Filling, Restorative and Luting Materials. 2000.

27 Larraz E., Elvira C., San Román J. Novel acrylic macromonomer with amphiphilic character derived from triton X-100: radical polymerization with methyl methacrylate and thermal properties. *J Polym Sci Polym Chem* 41: 1641–1649. 2003.

28 ISO Specification 9917. Specification for Dental Water-Based Cements. 1991.

29 Deb S., Di Silvio L., Vázquez B., San Román J. Water absorption characteristics and cytotoxic and biological evaluation of bone cements formulated with a novel activator. *J Biomed Mater Res* 48: 719-725. 1999.

CAPÍTULO 2.
MONÓMEROS ACRÍLICOS
DERIVADOS DE EUGENOL.

CAPÍTULO 2. MONÓMEROS ACRÍLICOS DERIVADOS DE EUGENOL.

2.1.- INTRODUCCIÓN.

Actualmente existe una demanda constante de nuevos materiales poliméricos dotados con una funcionalidad adaptada a las aplicaciones específicas para las que son diseñados. Una primera aproximación al desarrollo de estos materiales consiste en la modificación de un polímero a través de su funcionalización por adición o alteración de sus grupos funcionales. Esta vía presenta limitaciones a la hora de evaluar el grado de modificación, así como en su homogeneidad, ya que se trabaja con sustancias macromoleculares. Por otro parte, la modificación se puede llevar a cabo a partir de la introducción de la funcionalidad requerida en el monómero correspondiente y posteriormente desarrollar su polimerización.¹ Al igual que la metodología anterior, la funcionalización de los monómeros de partida puede estar limitada por la dificultad de obtención del monómero activo.

En este capítulo se detallan los resultados obtenidos en la obtención de dos nuevos monómeros acrílicos derivados del eugenol, así como de su caracterización físico-química.

Como ya se ha comentado en el primer capítulo, la molécula de eugenol presenta unas propiedades muy interesantes^{2,3,4,5} para su uso en el campo de los biomateriales. Sin embargo, su introducción en materiales poliméricos se ha visto muy limitada debido a la presencia del grupo fenílico, el cual participa como agente captador de radicales libres,⁶ inhibiendo los procesos de polimerización radical necesarios para generar polímeros *in situ* en presencia de eugenol.⁷

La modificación química de la estructura de eugenol por incorporación de restos acrílicos hace posible minimizar este efecto sin apenas alterar sus efectos farmacológicos más sobresalientes.

Este capítulo está dedicado a la descripción de la modificación de la estructura química del eugenol mediante la incorporación de un grupo metacrílico que se une a la molécula de eugenol bien directamente o bien mediante un separador de cadena, de acuerdo con el esquema de la figura 2.1.

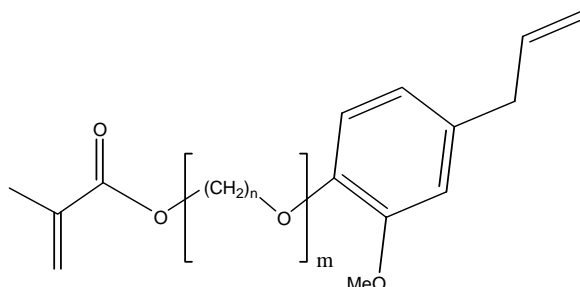


Figura 2.1 Estructura general de los derivados de eugenol. (EgMA: $m = 0$; EEgMA: $n = 2, m = 1$).

La finalidad de este tipo de compuestos es su utilización como monómeros activos que permitan preparar nuevos materiales poliméricos derivados de eugenol incorporando así una actividad intrínseca al material final.

2.2.- OBTENCIÓN DEL MONÓMERO METACRILATO DE EUGENILO (EgMA).

Siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.1.2 se sintetiza el monómero EgMA con un rendimiento del 80%. El mecanismo de la reacción corresponde al de una esterificación de Fisher⁸ en la que se hace reaccionar un cloruro de ácido con un compuesto hidroxilado. Este tipo de reacción necesita de la adición de una amina en cantidades estequiométricas con respecto al cloruro, para neutralizar el HCl formado, atrapándolo en forma del cloruro del trietilamonio correspondiente. La figura 2.2 muestra el esquema de síntesis seguido así como los cambios estructurales introducidos en la molécula del eugenol.

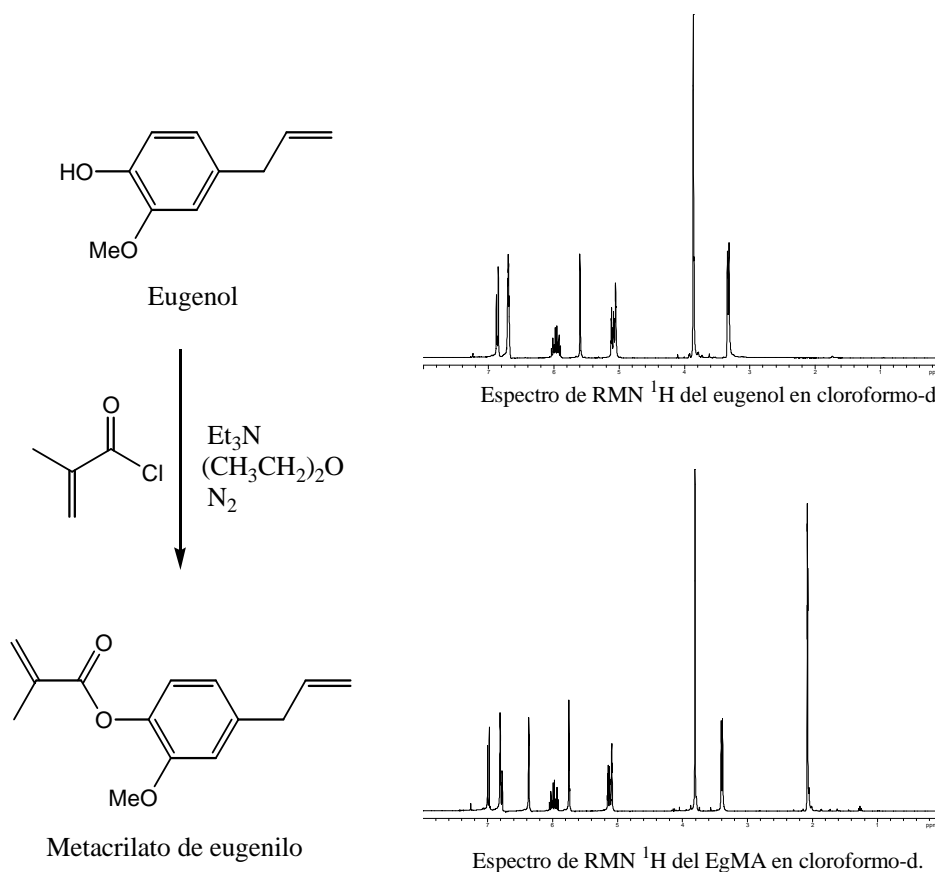


Figura 2.2 Esquema de síntesis del metacrilato de eugenilo y espectros de RMN ¹H del eugenol y metacrilato de eugenilo, en cloroformo-d.

Tras el proceso de purificación mediante cromatografía en gel de sílice y su posterior aislamiento y secado a vacío se obtiene el monómero EgMA, como un sólido blanco de bajo punto de fusión que no presenta restos del olor típico del eugenol. Este compuesto es susceptible de polimerizar a temperatura ambiente por lo que su almacenamiento se mantiene a baja temperatura (-20 °C).

2.3.- OBTENCIÓN DEL MONÓMERO METACRILATO DE ETOXIEUGENILO (EEgMA).

La síntesis del monómero metacrilato de etoxieugenilo (EEgMA) se lleva a cabo según el procedimiento descrito en el apartado 1.1.3. Su obtención se realiza en dos pasos de síntesis alcanzando un rendimiento global del 60%. En el primer paso, el eugenol reacciona con cloroetanol mediante una reacción de Williamson. Esta reacción

implica la formación del ión fenóxido derivado del eugenol, que actúa como componente nucleófilo frente al cloroetanol (electrófilo), dando lugar al éter 2-eugeniletanol mediante un mecanismo S_N2 , con un rendimiento del 75%. El siguiente paso consiste en hacer reaccionar este alcohol con el cloruro de metacriilo mediante la reacción de esterificación discutida en el apartado anterior alcanzando un rendimiento del 80%. La figura 2.3 muestra el esquema de síntesis seguido, así como los cambios estructurales introducidos en las moléculas de eugenol y 2-eugeniletanol.

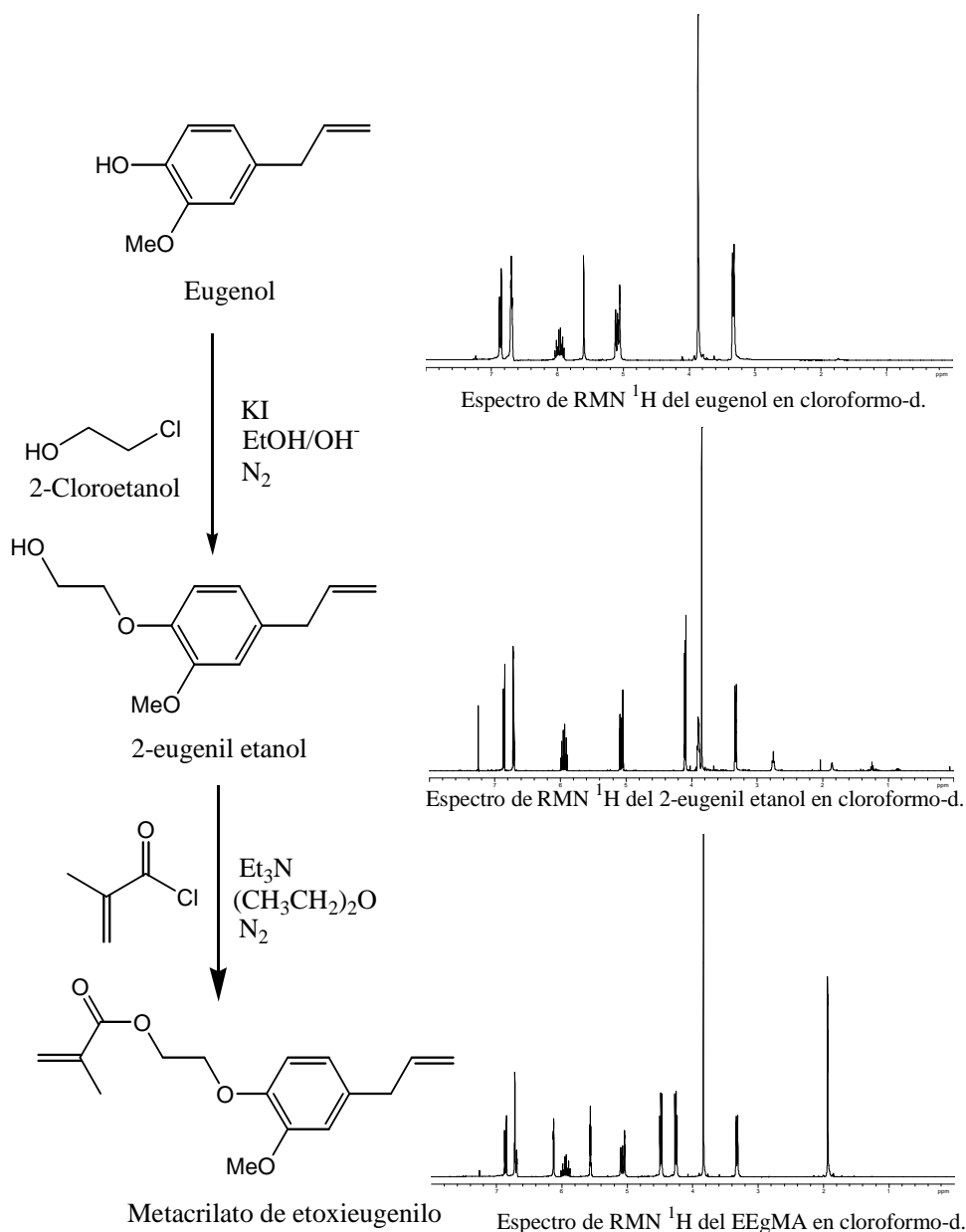


Figura 2.3 Esquema de síntesis del metacrilato de etoxieugenilo y espectros de RMN 1H del eugenol, 2-eugenil etanol y metacrilato de etoxieugenilo en cloroformo-d.

Tras el proceso de purificación mediante cromatografía en gel de sílice, su posterior aislamiento y secado a vacío se obtiene el monómero EEgMA, consistente en un líquido blanco amarillento que no presenta restos del olor típico del eugenol. Este compuesto es susceptible de polimerizar a temperatura ambiente por lo que su almacenamiento se mantiene a baja temperatura (-20 °C).

2.4.- CARACTERIZACIÓN DE LOS MONÓMEROS DERIVADOS DE EUGENOL.

La estructura y pureza de los dos monómeros derivados de eugenol se confirman a través de técnicas de Resonancia Magnética Nuclear, así como Espectroscopía de Infrarrojo con Transformada de Fourier mediante Reflectancia Atenuada ATR-FTIR.

La figura 2.4 muestra la numeración de los distintos carbonos presentes en las moléculas de EgMA y de EEgMA que se mantiene para su asignación espectroscópica.

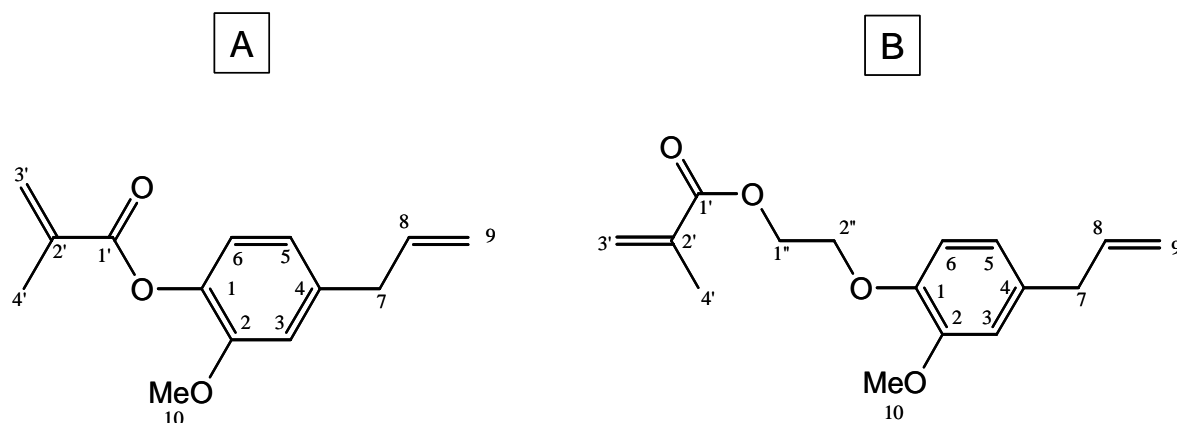


Figura 2.4 Estructura química de los monómeros derivados de eugenol y numeración de los carbonos presentes. A. Metacrilato de eugenilo. B. Metacrilato de etoxieugenilo.

Las figuras 2.5 y 2.6 muestran los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C del monómero EgMA obtenidos en cloroformo deuterado. Para la correcta asignación de las bandas se emplean los espectros bidimensionales HMQC (figura 2.7) obtenidos en las mismas condiciones. En la tabla 2.1 se recogen los desplazamientos químicos así como su asignación en función de la numeración establecida en la figura 2.4.

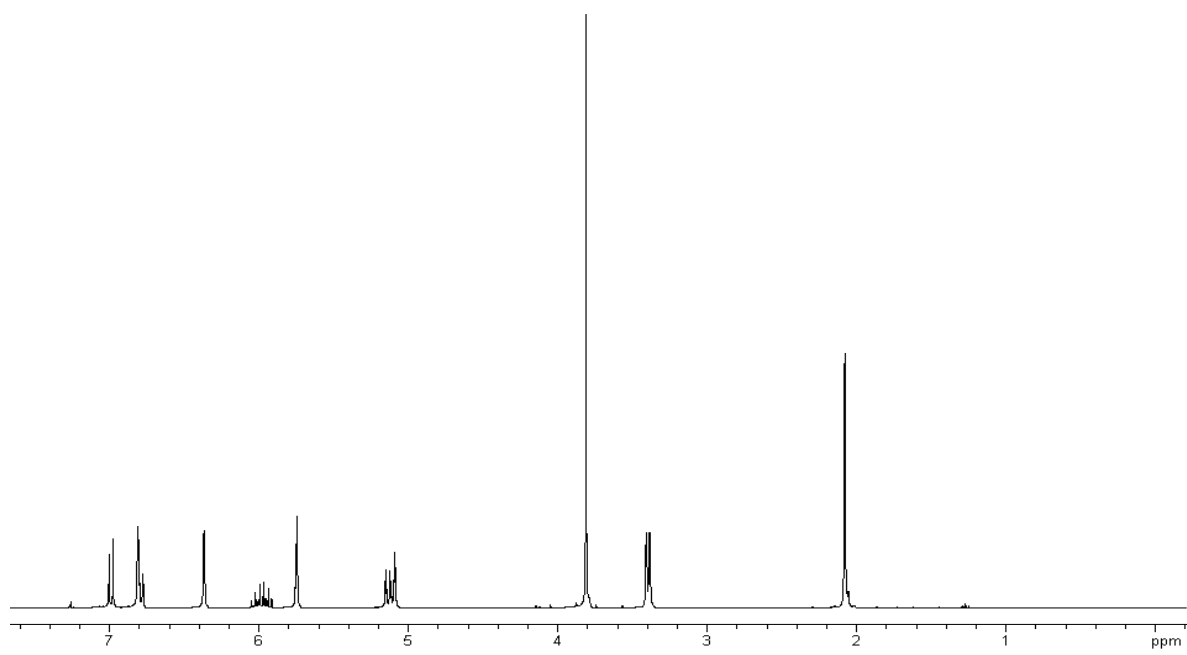


Figura 2.5 Espectro de $\text{RMN } ^1\text{H}$ del metacrilato de eugenilo en cloroformo-*d*.

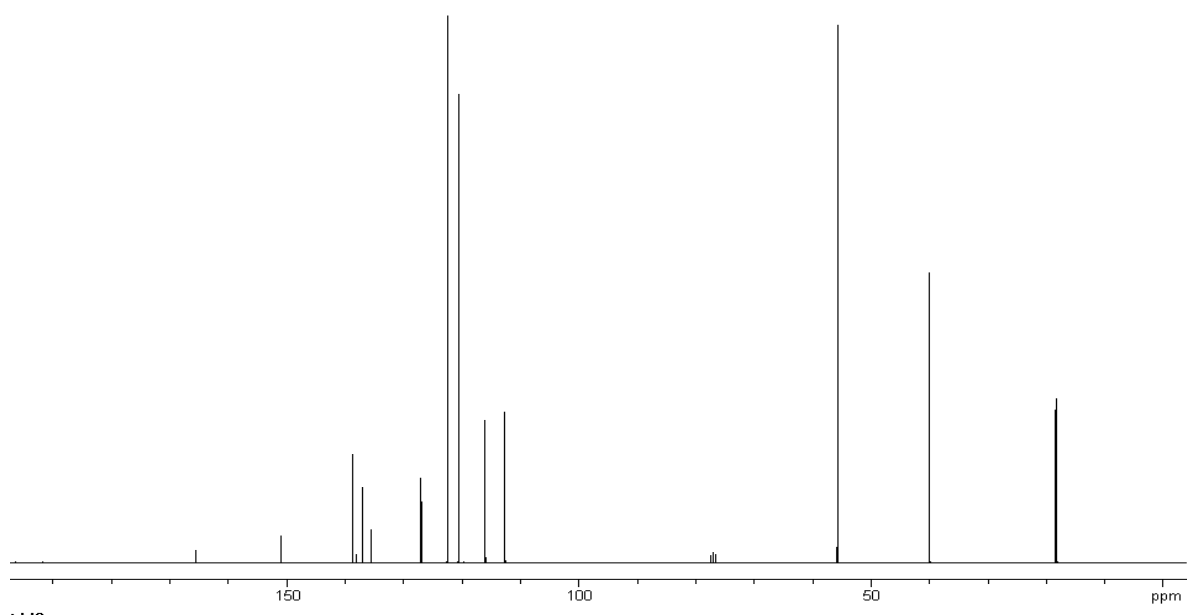


Figura 2.6 Espectro de $\text{RMN } ^{13}\text{C}$ del metacrilato de eugenilo en cloroformo-*d*.

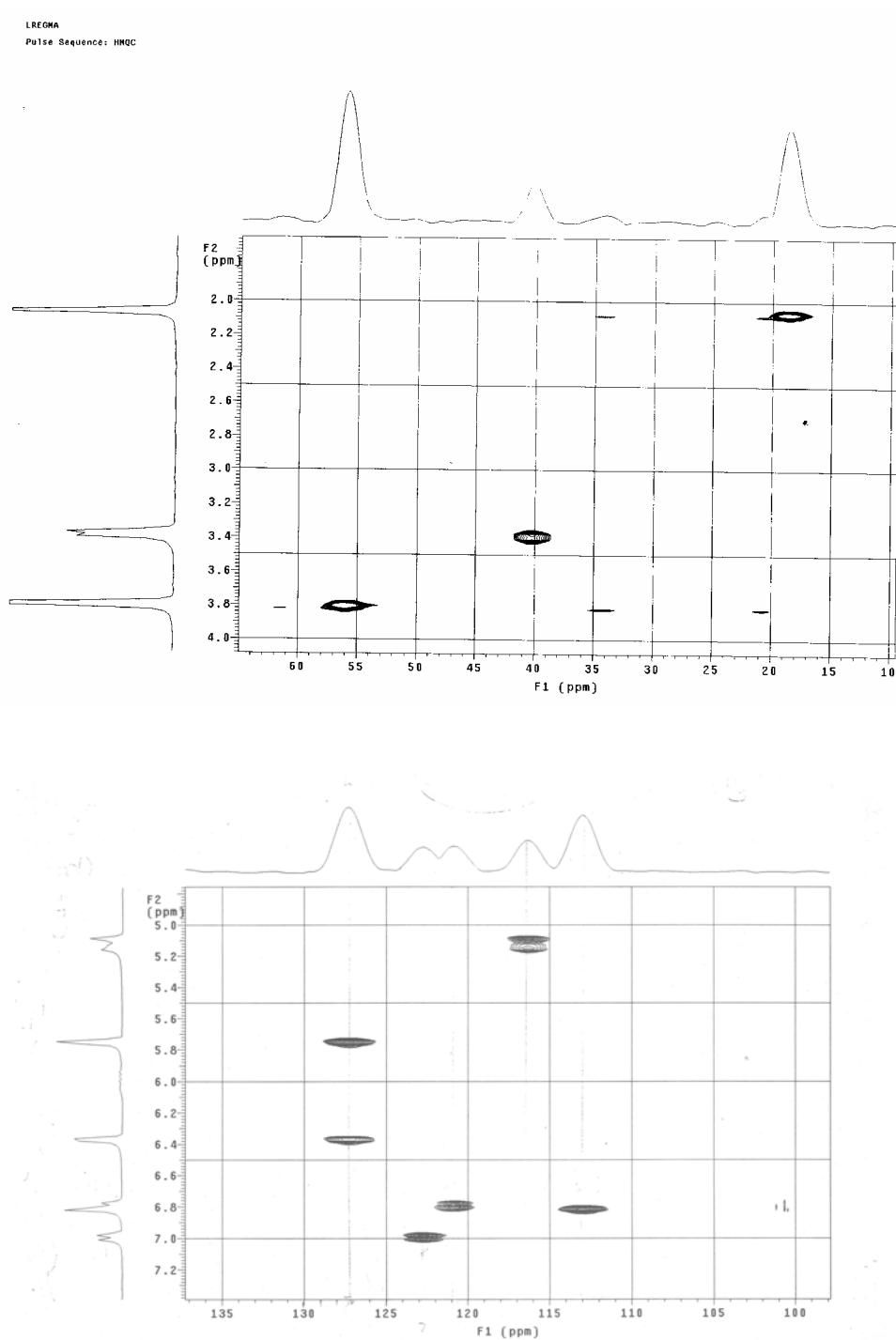


Figura 2.7 Espectro HMQC de correlación ^1H - ^{13}C del metacrilato de eugenilo en cloroformo-*d*.

Metacrilato de eugenilo, RMN ¹ H		Metacrilato de eugenilo, RMN ¹³ C	
δ (ppm) (IR)	Asignación	δ (ppm)	Asignación
7,0 (1H)	H ₅	165,7	C _{1'}
6,8 (2H)	H _{3,6}	151,0	C ₂
6,4 y 5,7 (2H)	H _{3'}	138,7	C ₁
6,0 - 5,8 (1H)	H ₈	138,1	C ₄
5,1 (2H)	H ₉	137,1	C ₈
3,8 (3H)	H ₁₀	135,6	C _{2'}
3,4 (2H)	H ₇	126,9	C _{3'}
2,1 (3H)	H _{4'}	122,5	C ₅
		120,6	C ₆
		116,1	C ₉
		112,8	C ₃
		55,8	C ₁₀
		40,0	C ₇
		18,4	C _{4'}

Tabla 2.1 Desplazamientos químicos e integración relativa (IR) de las señales RMN ¹H y RMN ¹³C del monómero metacrilato de eugenilo EgMA (referencia TMS).

Las figuras 2.8 y 2.9 muestran los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C del monómero EEgMA obtenidos en cloroformo deuterado. Para la correcta asignación de las bandas se emplean los espectros bidimensionales HMQC (figura 2.10) obtenidos en las mismas condiciones. En la tabla 2.2 se recogen los desplazamientos químicos así como su asignación en función de la numeración establecida en la figura 2.4.

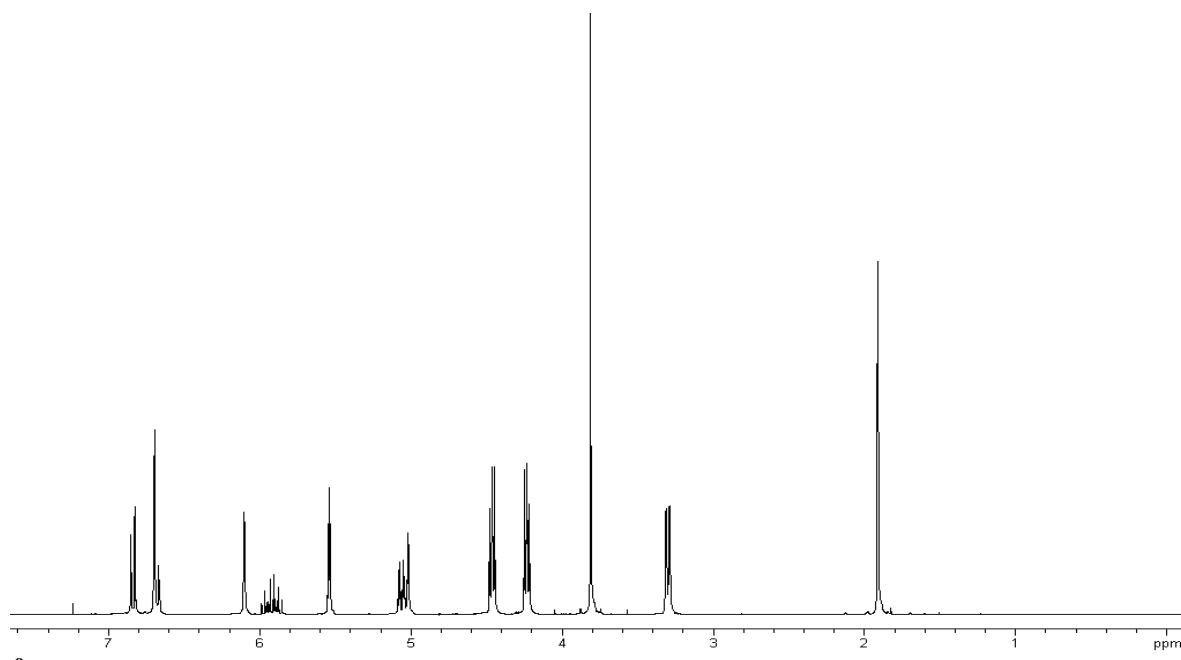


Figura 2.8 Espectro de RMN ^1H del metacrilato de etoxieugenilo en cloroformo-*d*.

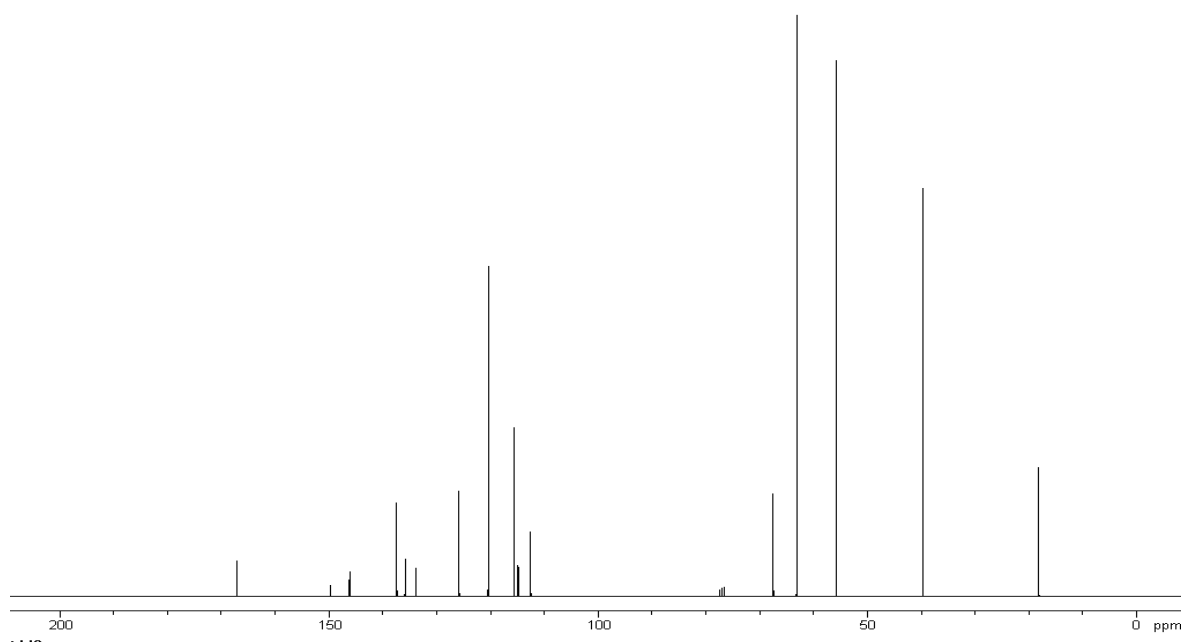


Figura 2.9 Espectro de RMN ^{13}C del metacrilato de etoxieugenilo en cloroformo-*d*.

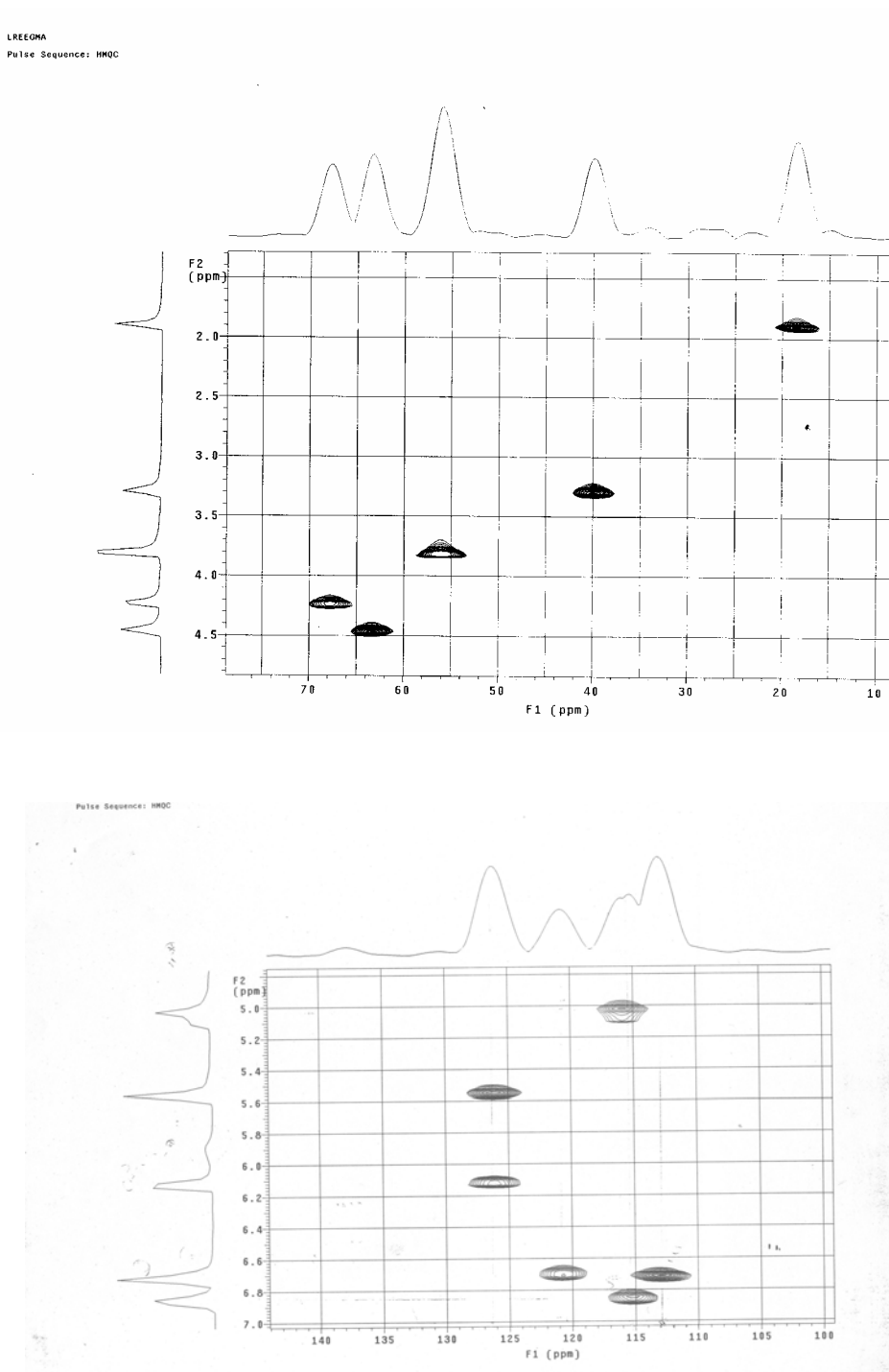


Figura 2.10 Espectro HMQC de correlación ^1H - ^{13}C del metacrilato de etoxieugenilo en cloroformo-d.

Metacrilato de etoxieugenilo RMN ¹ H		Metacrilato de etoxieugenilo RMN ¹³ C	
δ (ppm) (IR)	Asignación	δ (ppm)	Asignación
6,8 (1H)	H ₅	167,1	C _{1'}
6,6 (2H)	H _{3,6}	149,8	C ₂
6,1 y 5,6 (2H)	H _{3''}	146,3	C ₁
6,0-5,8 (1H)	H ₈	137,4	C ₈
5,1 (2H)	H ₉	136,0	C _{2'}
4,5 (2H)	H _{1''}	134,1	C ₄
4,2 (2H)	H _{2''}	126,0	C _{3'}
3,8 (3H)	H ₁₀	120,5	C ₆
3,3 (2H)	H ₇	115,7	C ₉
1,9 (3H)	H _{4'}	115,0	C ₅
		112,6	C ₃
		67,5	C _{1''}
		63,2	C _{2''}
		55,7	C ₁₀
		39,8	C ₇
		18,0	C _{4'}

Tabla 2.2 Desplazamientos químicos e integración relativa (IR) de las señales RMN ¹H y RMN ¹³C del monómero metacrilato de etoxieugenilo EEgMA (referencia TMS).

La figura 2.11 muestra los espectros de infrarrojo ATR-FTIR registrados para ambos monómeros así como para la molécula de eugenol, donde se aprecian las bandas correspondientes a los distintos grupos funcionales y cuya asignación se recoge en la tabla 2.3.

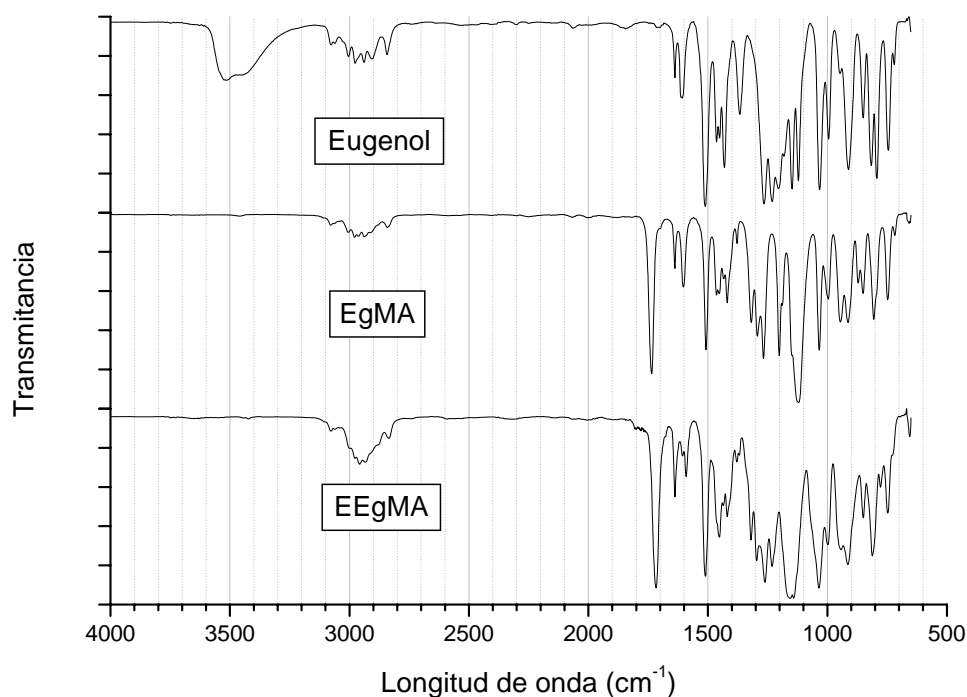


Figura 2.11 Espectros normalizados de ATR-FTIR de la molécula de eugenol así como de los monómeros EgMA y EEgMA.

Bandas características de ATR-FTIR	
Longitud de onda (cm ⁻¹)	Asignación
~3.500	-OH tensión eugenol
1.725	C=O tensión carbonilo
1.600 y 1.511	C=C tensión grupo arilo
1.640	C=C tensión éster
3.080 - 1.635 - 1.415 y 995	C=C tensión y deformaciones grupo alilo
1.360	-C-O- tensión fenol y éter
1.503	C=C tensión del esqueleto aromático
700-760	-C-H tensión aromáticos

Tabla 2.3 Asignación de las bandas características del espectro infrarrojo de los monómeros EgMA, EEgMA y del eugenol.

Por último se determina el punto de fusión de los monómeros EgMA y EEgMA mediante un calorímetro diferencial de barrido en las condiciones descritas en el apartado 1.1.4. La figura 2.12 muestra el termograma registrado para sendos monómeros sobre los que se toma el punto de fusión como la temperatura a la que se alcanza el máximo en la curva de entalpía.

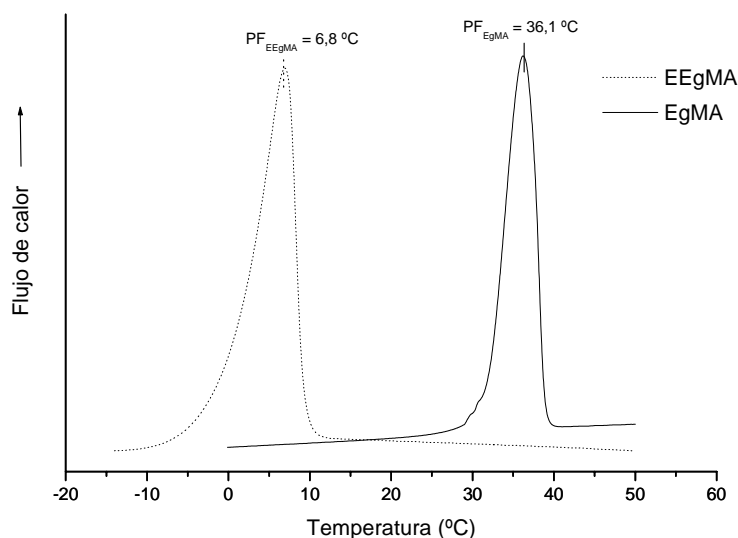


Figura 2.12 Determinación del punto de fusión para los monómeros EgMA y EEgMA.

Los puntos de fusión determinados de este modo son 36,1 °C y 6,8 °C para los monómeros EgMA y EEgMA respectivamente.

2.5.- EVALUACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD.

Para evaluar la citotoxicidad de los monómeros EgMA y EEgMA y compararla con la del propio eugenol, se determina la viabilidad celular relativa de cultivos portadores de dichas sustancias mediante un método colorimétrico basado en el uso del reactivo MTT.⁹ El reactivo MTT [bromuro de 3-(4,5 dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio] es una sal de tetrazolio insoluble en el medio de cultivo que se reduce a la sal de formazán correspondiente, al participar como co-catalizador en la transformación de lactato a piruvato, mediante la participación de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH) y el sistema catalizador $\text{NAD}^+/\text{NADH}/\text{H}^+$. La introducción del reactivo MTT al interior de la célula se produce mediante procesos endocíticos.¹⁰ Una

vez allí, el MTT se reduce en el interior del citoplasma celular, tras su inclusión y acumulación en vesículas endocíticas,¹¹ generándose cristales de formazán en forma de aguja, que tras ser excitados por la célula se acumularán en su superficie.¹²

La figura 2.13¹³ esquematiza el proceso donde se observa cómo es en el segundo paso, donde el catalizador transfiere dos protones desde NADH/H⁺ ($E^0 = -320$ mV) a la sal de tetrazolio (E^0 entre +290 y +80mV) generando la especie reducida formazán.¹⁴

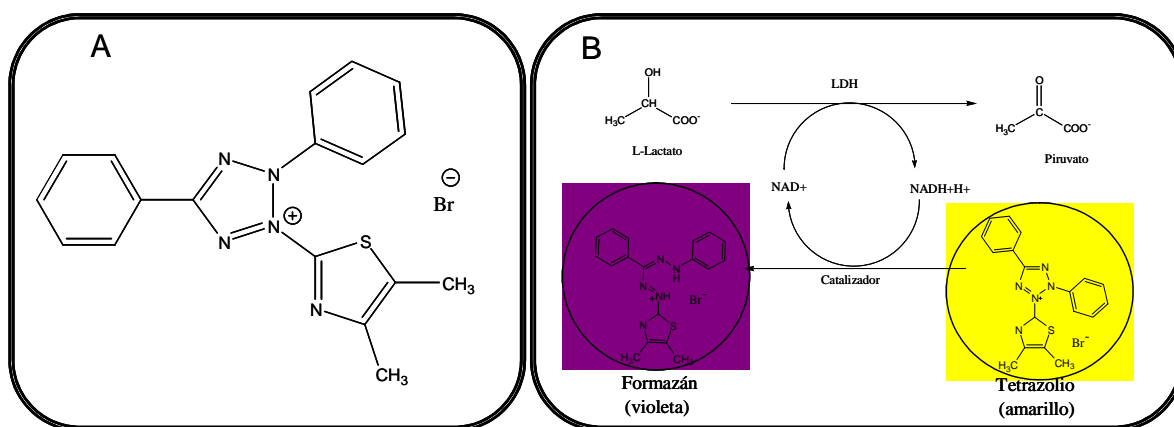


Figura 2.13 Estructura química del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT (A) y esquema de la reacción de oxido-reducción en la que el lactato se transforma en piruvato por acción de la enzima LDH (B) y la sal de tetrazolio se reduce a formazán.

Este proceso se sigue fácilmente mediante colorimetría ya que el MTT al reducirse, vira del color amarillo a rojo-azulado. Tras analizar colorimétricamente una serie de disoluciones de los respectivos analitos se representan las curvas dosis vs respuesta celular (figura 2.14) de cada sustancia. Con estas curvas y haciendo uso de la ecuación 1.4 se calculan los valores IC₅₀ de cada sustancia.

Los tres compuestos ensayados exhiben un comportamiento dependiente de la dosis, siendo los valores de la concentración inhibitoria media IC₅₀ de 3,70; 2,60 y 1,83 para el EgMA, eugenol y EegMA respectivamente. Las diferencias encontradas en la citotoxicidad de los nuevos monómeros no presentan diferencias significativas con los niveles exhibidos por el eugenol.

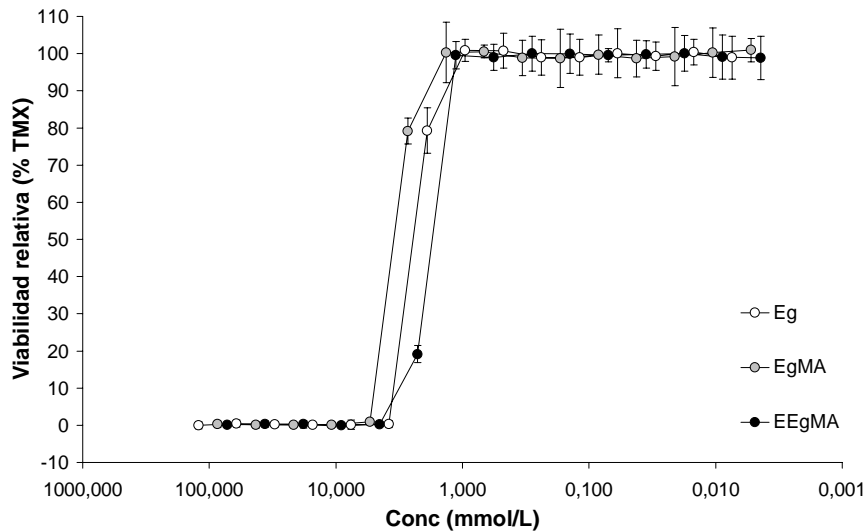


Figura 2.14 Comparación de las curvas dosis-respuesta celular obtenidas en el ensayo MTT para el EgMA, EEgMA y eugenol. Cada punto representa la media \pm desviación estándar ($n= 8$).

2.6.- ACCIÓN BACTERICIDA DE LOS MONÓMEROS.

En la figura 2.15 se observan las micrografías obtenidas mediante microscopio electrónico de barrido ambiental de las cepas *Escherichia coli* (DH5 α) y *Streptococcus mutans* (CNCT 479) empleadas en todos los experimentos.

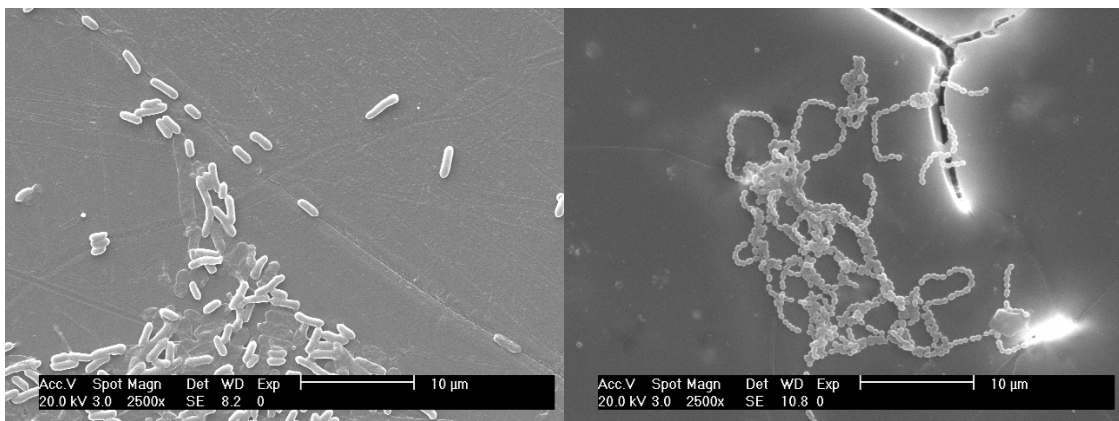


Figura 2.15 Micrografías obtenidas mediante microscopio electrónico de barrido ambiental de las cepas *E. coli* (DH5 α) (izquierda) y *S. mutans* (CNCT 479) (derecha) utilizadas para la determinación de la acción bactericida de los monómeros derivados de eugenol.

La acción bactericida de los monómeros EgMA y EEgMA se evalúa siguiendo dos metodologías distintas. En primer lugar se determina la capacidad bactericida de los monómeros EMA, EgMA y EEgMA mediante el método placa-pocillo por difusión en agar descrito en el apartado 1.4.1. Para ello se exponen directamente en sendos taladros realizados sobre la superficie de agar, las disoluciones de cada uno de los monómeros en los distintos disolventes. Un ejemplo de los resultados obtenidos se muestra en la figura 2.16 donde se aprecian los distintos halos o zonas de inhibición producidos por las disoluciones a ensayar. El tamaño de los halos medidos en milímetros se recoge en la tabla 2.4.

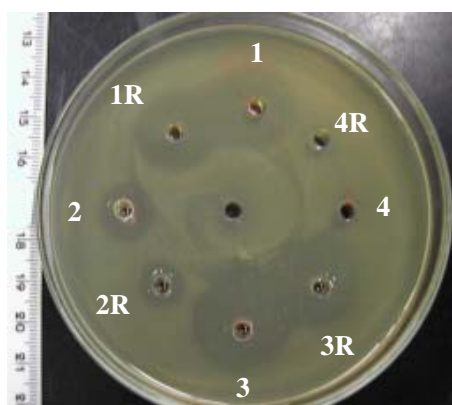


Figura 2.16 Resultados del ensayo por difusión en agar para disoluciones en DMSO (centro) de eugenol (1 y 1R), metacrilato de eugenilo (2 y 2R), metacrilato de etoxieugenilo (3 y 3R) y metacrilato de etilo (4 y 4R), todas ellas en concentración 1M, frente a *Streptococcus mutans* (CECT 479) tras 24 h de incubación a 37 °C.

HALOS DE INHIBICIÓN (mm)					
	BLANCO	EUGENOL	EMA	EgMA	EEgMA
TWEEN 20 (10%)	N.D.	10	N.D.	9	21
CLOROFORMO	N.D.	24	N.D.	3	34
DMSO	N.D.	19	N.D.	7	22

Tabla 2.4 Halos de inhibición en mm obtenidos para los monómeros EMA, EgMA, EEgMA y la molécula de eugenol en distintas disoluciones con concentración 1M frente a *Streptococcus mutans* (CECT 479) tras 24 h de incubación a 37 °C (N.D. = no se detecta halo de inhibición).

En segundo lugar, el ensayo basado en los antibiogramas se realiza siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 1.4.1, frente a las dos cepas bacterianas indicadas anteriormente. En este caso se evalúa la actividad inhibitoria de las disoluciones en DMSO (1M) de los monómeros HEMA, EgMA y EEgMA, en comparación con la observada para los controles blanco (DMSO) y positivo (disolución 1M de eugenol en DMSO).

En este caso se encuentra que el tamaño de los halos es menor en todos los casos que el observado en el experimento anterior. Como ejemplo de los resultados obtenidos, la figura 2.17 muestra dos placas con cultivos distintos sobre los que se aprecian los halos de inhibición.

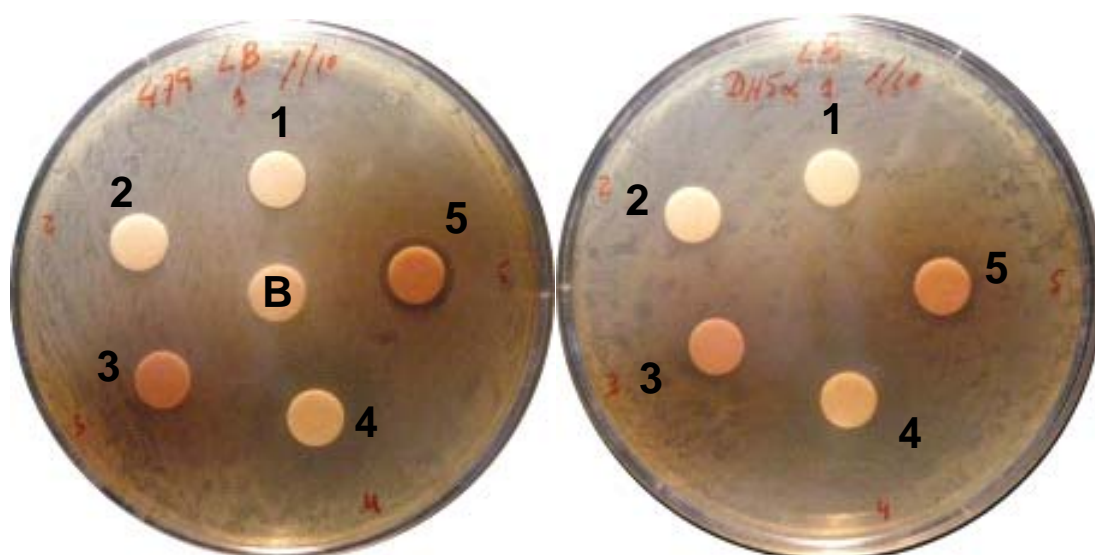


Figura 2.17 Antibiogramas realizados sobre la superficie de placas agar-LB con cultivos de *S. mutans* (izquierda) y *E. coli* (derecha) sobre las que se han depositado discos empapados en disoluciones de DMSO 1M. 1: DMSO; 2: HEMA; 3: EgMA; 4: Eugenol; 5: EEgMA; B: Blanco.

El tamaño de los halos medidos en milímetros, incluyendo los 9 mm de los discos, se recogen en la tabla 2.5

HALOS DE INHIBICIÓN (mm)					
	BLANCO	HEMA	Eugenol	EgMA	EEgMA
S. mutans (CECT 479)	N.D.	N.D.	22	10	14
E. coli (DH5α)	N.D.	N.D.	25	10	13

Tabla 2.5 Halos de inhibición en mm obtenidos para los monómeros EMA, EgMA y EEgMA y la molécula de eugenol empapados en disoluciones IM en DMSO (N.D. = no se detecta halo de inhibición).

2.7.- DISCUSIÓN.

La molécula de eugenol ha sido ampliamente estudiada debido a sus propiedades farmacológicas y en particular su acción bactericida.¹⁵ Una línea de investigación abierta en la actualidad consiste en la modificación de su estructura para mejorar sus propiedades,¹⁶ o para obtener actividades farmacológicas adicionales como en los casos del 2-acetil-oxibenzoil-eugenol¹⁷ y el dimetil dehidrodieugenol.¹⁸ En aplicaciones dentales, una de las principales desventajas de los cementos que contienen eugenol se deriva del carácter antioxidante.¹⁹ Así, una limitación en su uso se debe a que las moléculas de eugenol que quedan sin reaccionar inhiben la polimerización radical de resinas y materiales compuestos polimerizables de carácter permanente. Con el fin de paliar esta desventaja, en este trabajo se aborda la funcionalización acrílica del eugenol, sintetizándose dos metacrilatos distintos que se diferencian por la distancia de la separación entre el grupo metacrílico y el resto eugenilo: metacrilato de eugenilo (EgMA), en el cual el grupo metacrílico está unido directamente al anillo aromático del eugenol, y el metacrilato de etoxieugenilo (EEgMA), en el que los restos metacrílico y eugenilo están separados por un grupo oxietilénico.

La obtención de ambos derivados de eugenol se lleva a cabo de manera irreversible, en condiciones suaves típicas de las reacciones de esterificación de Fisher, alcanzando en ambos casos rendimientos globales altos. La caracterización espectroscópica mediante Resonancia Magnética Nuclear de ambos monómeros confirma la estructura propuesta en la que el resto eugenilo se une al grupo metacrílico directamente o a través del grupo separador, quedando los demás grupos funcionales

(doble enlace acrílico y 4-alilo) inalterados para su posterior participación en procesos de polimerización radical. La asignación de las bandas de carbono se basa en el estudio de los valores de las integrales de las señales que aparecen en los espectros de protón y su relación a las observadas en los espectros bidimensionales HMQC.

De este modo para el monómero EgMA se asignan de manera inequívoca todas las señales de carbono excepto para los carbonos 3 y 6 ya que las señales de los protones de estos carbonos aparecen muy próximas en el correspondiente espectro de protón. Sin embargo en el espectro bidimensional se aprecia claramente para la señal de protón a campo más alto, la existencia de un doblete en su correspondiente señal de protón, indicando que se trata del protón 5 que se acopla con el protón 6. Este hecho determina la asignación de la secuencia de señales a 122,4; 120,6; 116,1 y 112,8 a los carbonos C₅, C₆, C₉ y C₃, respectivamente.

Para el caso del monómero EEgMA y siguiendo el mismo razonamiento, la banda a 120,5 ppm se correlaciona con un singlete en el espectro HMQC, mientras que las bandas a 115,0 y 112,6 se correlacionan con sendos dobletes cada una en el espectro de HMQC. En este caso por tanto, la asignación de la secuencia de señales 120,5; 115,7; 115,0 y 112,6 corresponde a los carbonos C₆, C₉, C₅ y C₃, respectivamente.

En ambos casos el proceso de esterificación queda confirmado por la desaparición de la señal del hidroxilo del eugenol (5,5 ppm, ¹H) o del 2-eugenil etanol (2,4 ppm, ¹H), así como de la presencia de las bandas correspondientes a los grupos metacrílicos (p.e. H₃·(EgMA): 6,4 y 5,7; H₄·(EgMA): 2,1; H₃·(EEgMA): 6,1 y 5,6; H₄·(EEgMA): 1,9).

En el caso de los espectros ATR-FTIR, este proceso se observa por la presencia de la banda típica del carbonilo del éster a 1.725 cm⁻¹ además de la desaparición por completo de la señal de tensión debida al grupo OH (~3.500 cm⁻¹). Las demás bandas confirman la presencia del resto de grupos funcionales como el anillo aromático (tensiones C-H y esqueletales a 700, 1.510 y 1.600 cm⁻¹), observándose incluso el primer sobretono o huella del benceno entre 1.700 y 2.700 cm⁻¹. Cabe destacar también la presencia de las bandas a 1.600 y 1.640 cm⁻¹ que se corresponden a la tensión de los dobles enlaces C=C de los grupos aromáticos y éster α,β insaturado. En este intervalo

se observa también la banda característica del doble enlace alílico a 1.637 cm^{-1} que junto con las bandas a 3.080 , 1.415 y 995 cm^{-1} ,^{20,21} confirman también así la presencia del resto eugenilo.

Si bien es de suponer que la actividad biológica del eugenol se vea afectada con respecto a los nuevos derivados acrílicos, debido a la esterificación de la funcionalidad fenólica cabe esperar que los cambios en esta actividad no sean significativos, ya que tanto EgMA como EEgMA mantienen intactas la funcionalidad 4-alilo contribuyente a buena parte de su actividad.^{22, 23}

A bajas concentraciones, el eugenol actúa como agente antiinflamatorio y anestésico, sin embargo se ha demostrado que a altas concentraciones tiene un efecto citotóxico.²⁴ El estudio de la citotoxicidad de los monómeros EgMA y EEgMA junto con el eugenol, sobre células de fibroblastos humanos, indica para los tres casos un efecto tipo dosis respuesta con valores IC_{50} relativamente parecidos. El EEgMA muestra un mayor índice de tolerancia que el eugenol, y éste a su vez que el EgMA, necesitando en ese mismo orden mayores concentraciones de analito para provocar la muerte del 50% del cultivo celular. Sin embargo, como se ha dicho anteriormente, las diferencias encontradas en la citotoxicidad de los nuevos monómeros no son significativas con relación a los niveles exhibidos por el eugenol.

Estos resultados no constituyen un problema, puesto que las aplicaciones de los derivados de eugenol estudiadas implican únicamente su incorporación en cantidades relativamente reducidas, formando parte de polímeros acrílicos de alto peso molecular, o como elementos intrínsecos de redes poliméricas entrecruzadas donde cualquier resto de monómero sin reaccionar se compone predominantemente de metacrilato de etilo o de metilo, totalmente aceptados y usados actualmente en este tipo de sistemas.

El efecto bactericida de los monómeros derivados de eugenol frente a los dos tipos de bacteria usados como modelos, muestran sin embargo diferencias apreciables con respecto al eugenol. La actividad de compuestos fenólicos como el eugenol es debida a la alteración de la permeabilidad en las membranas de los microorganismos, con su consecuente bloqueo del bombeo de protones e iones fosfato y potasio.²⁵ Esta actividad es debida principalmente a la presencia del grupo hidroxilo acoplado a un

sistema de electrones deslocalizados,²⁶ estando muy determinada su actividad también, por el grado de hidrofobicidad de los compuestos.²⁷

La sustitución de un grupo alcoholico por un resto metacrílico puede originar efectos potenciadores de la actividad bactericida de ciertos compuestos.²⁸ La modificación de la molécula de eugenol para obtener los nuevos derivados metacrílicos, conlleva la sustitución de la función fenólica por la de éster α,β insaturado. A pesar de este cambio en la estructura, los nuevos derivados presentan un buen balance hidrofóbico, y una cierta capacidad de intercambio protónico unido a la estructura 4-alilo, que hace que mantengan cierta capacidad inhibitoria del crecimiento bacteriano. Además, estos compuestos pueden ser hidrolizados en el interior de los microorganismos por la acción de enzimas (esterasas),²⁹ generando eugenol en su interior. El resto acrílico por su parte no parece que tenga alguna contribución a la actividad, como indica la ausencia de halos de inhibición tanto para el metacrilato de etilo (EMA) como para el metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA). Los derivados EgMA y EEgMA al poseer carácter hidrófobo pueden introducirse en el interior de las membranas citoplasmáticas, una vez allí la capacidad inhibitoria de cada uno depende del grado de interacción con las funciones celulares. El EgMA presenta poca capacidad inhibitoria en comparación con el eugenol mostrando halos de inhibición muy reducidos. Sin embargo el EEgMA, al poseer una mayor flexibilidad molecular en su estructura presenta un mayor grado de interacción que el EgMA con la bicapa lipídica de las membranas, originando cambios en sus propiedades fisicoquímicas que producen alteraciones en el flujo pasivo de protones a través de la membrana.³⁰ Esta mayor interacción se traduce en una mayor capacidad de inhibir la proliferación bacteriana mostrando halos de inhibición mayores.

2.8.- BIBLIOGRAFÍA.

-
- 1 Yocun R. H., Nyquist E. B. Functional Monomers, their Properties, Polymerization and Application. *Dekker*. 1973.
 - 2 Sticht F. D., Smith P. M. Eugenol: Some pharmacologic observations. *J Dent Res* 50: 1531-1535. 1971.
 - 3 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.

-
- 4 Feng J., Lipton J. M. Eugenol: Antipyretic activity in rabbits. *Neuropharmacology* 26: 1775-1778. 1987.
 - 5 Laekeman G. M., Van Hoof L., Haemers A., Vanden Berghe D. A., Herman A. G., Vlietinck A. Eugenol a valuable compound for *in vitro* experimental research and worthwhile for further *in vivo* investigation. *J Phytother Res* 4: 90-96. 1990.
 - 6 Fujisawa S., Kadoma Y. Action of eugenol as retarder against polymerisation of methyl methacrylate by benzoyl peroxide. *Biomaterials* 18: 701-703. 1997.
 - 7 Hotz P., Schlatter D., Lussi A. The modification of the polymerisation of composite materials by eugenol-containing temporary fillings. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 102: 1461-1466. 1992.
 - 8 Smith B. M., March J. March's Advanced Organic Chemistry. 5^a Ed. John Wiley and Sons. New York. 2001.
 - 9 Yoshii E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: Relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J Biomed Mater Res* 37: 517-524. 1997.
 - 10 Liu Y., Peterson D. A., Kimura H., Shubert D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *J Neurochem* 69: 581-593. 1997.
 - 11 Liu Y. Understanding the biological activity of amyloid proteins *in vitro*: from inhibited cellular MTT reduction to altered cellular cholesterol homeostasis. *Prog Neuro-psychop* 23: 377-395. 1999.
 - 12 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* 89: 271-277. 1986.
 - 13 Alley M. C., Scudiero D. A., Monks A., Hursey M. L., Czerwinski M. J., Fine D. L., Abbot B. J., Mayo J. G., Shoemaker R. H., Boyd M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 48: 589-601. 1988.
 - 14 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63. 1983.
 - 15 Markowitz K., Moynihan M., Liu M. S., Kim S. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol - A clinically oriented review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 73: 729-737. 1992.

-
- 16 Atsumi T., Fujisawa S., Satoh K., Sakagami H., Iwakura I., Ueha T., Sugita Y., Yokoe I. Cytotoxicity and radical intensity of eugenol, isoeugenol or related dimers. *Anticancer Res* 20: 519-524. 2000.
- 17 Shin J. S., Kim J. H., Kim K. S., Youm J. R., Kim B. K. Properties and hair growth effect of eugenol-aspirin derivative. *Yakhak Hoechi* 41: 571-574. 1997.
- 18 Costa J. A., Oliveira R. A. G., Barbosa J. M., Souza Brito A. R. M. Synthesis and pharmacological activity of a eugenol derivative. *Rev Bras Farm* 75: 40-45. 1994.
- 19 Priyadarsini K. I., Guha S. N., Rao M. N. Physico-chemical properties and antioxidant activities of methoxy phenols. *Free Radic Biol Med* 24: 933-941. 1998.
- 20 Rahim E. A., Sanda F., Masuda T. Synthesis and properties of a novel polyacetylene containing eugenol moieties. *J Macromol Sci* 41: 133-141. 2004.
- 21 Tyagi A. K., Choudhary V., Varma I. K. Copolymerization of methyl methacrylate and a novel allyl monomer. *Eur Polym J* 28: 419-422. 1992.
- 22 Yuwono M., Siswandono Hafid A. F., Poernomo A. T., Ail M., Indrayanto G., Ebel S. Eugenol. En Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients. USA. *Elsevier Science* 29: 149-177. 2002.
- 23 Amy L. L., Kubanek J. Structure-activity relationship of chemical defenses from the freshwater plant *Micranthemum umbrosum*. *Phytochemistry* 67: 1224-1231. 2006.
- 24 Gerosa R., Borin M., Menegazzi G., Puttini M., Cavalleri G. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of pure eugenol. *J Endod* 22: 532-534. 1996.
- 25 Sikkema J., De bont J., Poolman B. Mechanism of membrana toxicity of hydrocarbons. *Microbiol Rev* 59: 201-202. 1995.
- 26 Ultee A., Bennik M. H. J., Moezelaar R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food borne pathgen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol* 68: 1561-1568. 2002.
- 27 Weber F. J., de Bont J. A. M. Adaptation mechanism of microorganisms to the toxic effects of organic solvents on membranas. *Biochimi Biophys Acta* 1286: 225-245. 1996.
- 28 Imazo S., Torii M., Tsuchitani Y., McCabe J. F., Russell R. R. B. Incorporation of bacterial inhibitor into resin composite. *J Dent Res* 73: 1437-1443. 1994.
- 29 Tamm C. Transformation of organic compounds by microbial enzymes. *FEBS letters* 48: 7-20. 1974.

30 Ben Arfa A., Combes S., Preziosi-Belloy L., Gontard N., Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett App Microbiol* 43: 149-154. 2006.

***CAPÍTULO 3. SISTEMAS
POLIMÉRICOS DERIVADOS
DE EUGENOL.***

CAPÍTULO 3. SISTEMAS POLIMÉRICOS DERIVADOS DE EUGENOL.

3.1.- INTRODUCCIÓN.

Como se ha comentado en el capítulo anterior, la generación de nuevos materiales poliméricos dotados de funcionalidades específicas se puede abordar desde distintas perspectivas sintéticas. Concretamente, el campo dental y el de la cirugía ortopédica, presentan una gran demanda de nuevos polímeros que incorporen propiedades antisépticas y analgésicas entre otras, sin prescindir de las prestaciones biomecánicas requeridas para este tipo de aplicaciones. El uso de polímeros acrílicos y metacrílicos en estas disciplinas está muy extendido siendo los materiales más frecuentemente usados los derivados de metacrilato de metilo y de etilo.^{1,2} Estos materiales presentan la ventaja de su fácil y económica obtención, así como un nivel óptimo de prestaciones mecánicas y estabilidad temporal adecuada. Sin embargo los polímeros metacrílicos derivados de estas familias no presentan una bioactividad específica, cumpliendo meramente funciones estructurales y/o de relleno. La funcionalización de estos sistemas acrílicos mediante la obtención de copolímeros portadores de eugenol se presenta como una estrategia interesante para aportar a los sistemas actividad farmacológica. Existen en la literatura ejemplos de polímeros portadores de derivados de eugenol,^{3,4} sin embargo ninguno de ellos ha sido evaluado para su uso como posible biomaterial.

Los monómeros derivados de eugenol descritos en el capítulo anterior conservan la estructura 4-alilo, unida mediante grupo éster al resto polimerizable metacrílico. Esta estructura les hace buenos candidatos para su participación en procesos de polimerización radical, evitando el carácter inhibitorio del eugenol,^{5,6} pudiéndose incorporar eficazmente a materiales compuestos en restauraciones permanentes y aportando a las cadenas macromoleculares los efectos bactericidas, antioxidantes y analgésicos característicos del eugenol.^{7,8,9,10}

En este capítulo se describe la síntesis y caracterización de los polímeros derivados de eugenol así como su copolimerización con otros monómeros acrílicos

como el metacrilato de etilo (EMA), de metilo (MMA) y de 2-hidroxietilo (HEMA), mediante procesos de polimerización radical. De ellos, el EMA proporciona un mayor grado de ductilidad al sistema polimérico proporcionando con ello mejoras desde el punto de vista mecánico¹¹ y biológico,¹² en su incorporación a formulaciones autocurables. La figura 3.1 muestra el esquema general de síntesis de estos polímeros y copolímeros

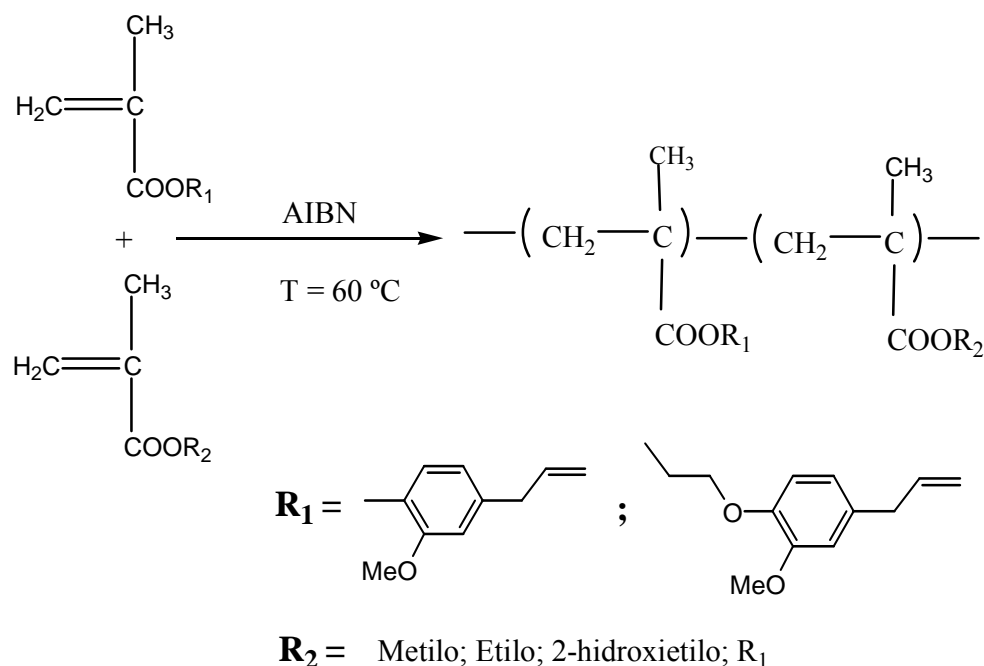
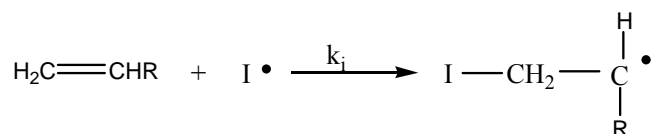
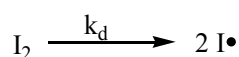


Figura 3.1 Esquema de la reacción de polimerización radical de los derivados de eugenol.

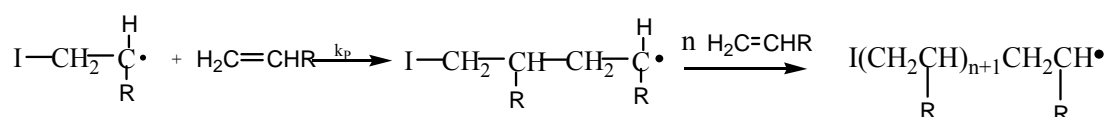
3.2.- CONCEPTOS GENERALES DE POLIMERIZACIÓN.

3.2.1.- HOMOPOLIMERIZACIÓN Y COPOLIMERIZACIÓN RADICAL.

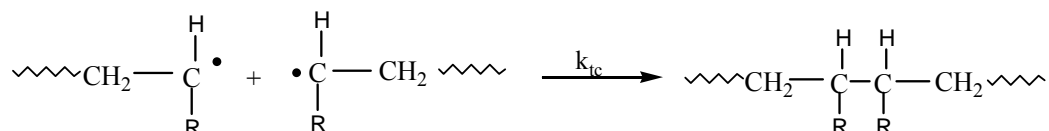
Las reacciones de polimerización vía radicalaria trascurren en tres etapas llamadas de iniciación, propagación y terminación, siguiendo el esquema cinético general que se muestra en la figura 3.2.¹³

INICIACIÓN

R = H, CH₃, COOH, COOR', etc

PROPAGACIÓN**TERMINACIÓN**

Combinación (acoplamiento radical)



Desproporción

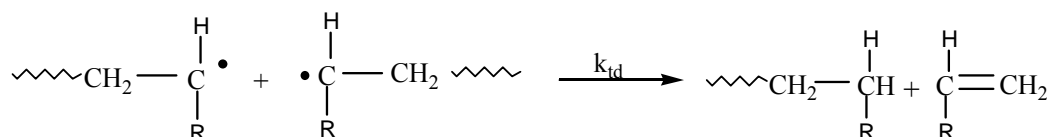


Figura 3.2 Esquema general de polimerización radical para polímeros vinílicos.

Según este esquema la etapa de iniciación comprende dos reacciones. En la primera de ellas tiene lugar la formación de radicales libres mediante la disociación homolítica de un iniciador (*I*) en la que k_d es la constante de descomposición del iniciador. Esta etapa se puede producir por vía fotoquímica, térmica o por descomposición o reacción de un iniciador, siendo las dos primeras vías las más utilizadas. En la segunda reacción se produce la adición del radical formado (*I*·) a la primera molécula de monómero, formando la especie radical activa y donde k_i es la constante cinética de esta etapa.

La etapa de propagación consiste en el ataque de la especie radical activa sobre nuevas moléculas de monómero, adicionando con cada ataque una unidad nueva y

formando en cada reacción un nuevo macrorradical, siendo k_p la constante de velocidad de propagación.

La etapa de terminación consiste en una reacción bimolecular entre radicales que da lugar a un enlace covalente. Esta terminación puede tener lugar por combinación cuando se forma una sola molécula de polímero o por desproporción, donde un hidrógeno en posición β respecto a un centro activo, se trasfiere al extremo reactivo de otro macrorradical dando lugar a dos moléculas de polímero.

Considerando que la descomposición térmica del iniciador sigue una cinética de primer orden y asumiendo primero, la irreversibilidad de las reacciones; segundo, la ausencia de reacciones secundarias; tercero, que la constante de propagación es independiente del tamaño del radical; cuarto, aceptando la aproximación del estado estacionario, se obtiene la siguiente ecuación como expresión general de la velocidad global de polimerización,

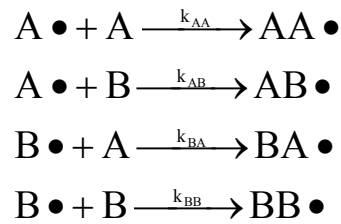
$$R_p = \frac{k_p}{k_t^{1/2}} [M] (2fk_d [I]^{1/2}) \quad \text{Ec. 3.1}$$

donde $[M]$ y $[I]$ son las concentraciones de monómero e iniciador respectivamente y f es el factor de eficacia del iniciador, definido como la fracción de radicales producidos en la homólisis que da lugar a iniciación de las cadenas poliméricas.

Los iniciadores térmicos tipo AIBN usados para este tipo de reacciones provocan la polimerización de la gran mayoría de los dobles enlaces carbono-carbono cuando se usan dentro de sus respectivos intervalos de temperaturas de máxima eficacia, que en el caso del AIBN es entre 50 y 70 °C.¹⁴

Al igual que el proceso de homopolimerización, el mecanismo de reacción de la copolimerización radical consta de las etapas de iniciación, propagación y terminación. Sin embargo en este tipo de procesos la unidad monomérica que va a adicionarse no es solo una sino que coexisten más de un tipo de unidades monoméricas con reactividades distintas. En este caso y según el modelo terminal de copolimerización, donde la

reactividad de la especie activa en crecimiento depende de la reactividad de la unidad monomérica que se encuentre en su extremo reactivo,¹⁵ el esquema cinético de la etapa de propagación se representa mediante las siguientes ecuaciones:



En este tipo de proceso, la velocidad de consumo de cada uno de los monómeros viene dada por las siguientes ecuaciones:

$$\frac{-d[A]}{dt} = k_{AA} \cdot [A \bullet] \cdot [A] + k_{BA} \cdot [B \bullet] \cdot [A] \quad \text{Ec 3.2}$$

$$\frac{-d[B]}{dt} = k_{BB} \cdot [B \bullet] \cdot [B] + k_{AB} \cdot [A \bullet] \cdot [B] \quad \text{Ec 3.3}$$

dividiendo ambas expresiones y teniendo en cuenta la hipótesis del estado estacionario, donde el número de centros activos permanece constante, se debe cumplir la ecuación 3.4.

$$k_{BA} \cdot [B \bullet] \cdot [A] = k_{AB} \cdot [A \bullet] \cdot [B] \quad \text{Ec 3.4}$$

Es decir, la conversión de una cadena activa finalizada en A en una finalizada en B, debe ser igual a la conversión del final de cadena de B en A. De este modo llegamos a:

$$\frac{d[A]}{d[B]} = \frac{[A](r_A \cdot [A] + [B])}{[B](r_B \cdot [B] + [A])} \quad \text{Ec 3.5}$$

donde r_A y r_B expresan las relaciones de reactividad, cuyos valores vienen dados por las expresiones:

$$r_A = \frac{k_{AA}}{k_{AB}} \quad \text{Ec 3.6}$$

$$r_B = \frac{k_{BB}}{k_{BA}} \quad \text{Ec 3.7}$$

La ecuación diferencial 3.5 se denomina también ecuación de composición del copolímero, y puede escribirse en términos de fracciones molares ya que la disminución infinitesimal del monómero A o B , corresponde en realidad a la incorporación infinitesimal de los mismos a las cadenas en crecimiento.

$$\frac{f_A}{f_B} = \frac{F_A (r_A \cdot F_A + F_B)}{F_B (r_B \cdot F_B + F_A)} \quad \text{Ec 3.8}$$

donde f y F representan las fracciones molares instantáneas en el copolímero y en la alimentación respectivamente ($f_A + f_B = 1$ y $F_A + F_B = 1$).

Para poder emplear la ecuación 3.8 se ha supuesto que el sistema se encuentra en estado estacionario donde la concentración de los comonómeros es constante. Para que esto se cumpla el grado de conversión debe de ser inferior al 10%. Este requisito se debe a que si la reactividad de un comonómero es superior a la del otro, la mezcla de reacción se enriquecerá en el comonómero menos reactivo, modificándose de este modo la concentración en la alimentación y por tanto alterándose la composición del copolímero.

A partir de los datos experimentales de composición de los comonómeros tanto en la alimentación como en el copolímero, se pueden obtener los valores de las relaciones de reactividad a través de la aplicación de diferentes métodos matemáticos, lineales y no lineales.

Método Fineman-Ross (lineal). A partir de la ecuación de copolimerización y definiendo las relaciones $\frac{F_A}{F_B} = F$ y $\frac{f_A}{f_B} = f$, la ecuación 3.8 se convierte en la ecuación 3.9:

$$\frac{F}{f} \cdot (f-1) = r_A \cdot \frac{F^2}{f} - r_B \quad \text{Ec 3.9}$$

obteniéndose la ecuación de una recta donde r_A es la pendiente y r_B es la ordenada en el origen.¹⁶ La aplicación de este método en ocasiones, da lugar a una acumulación de puntos en un pequeño intervalo de valores F^2/f , con lo que los valores de r_A y r_B obtenidos pueden resultar alterados.

Método Kelen-Tüdös (lineal). Este método se plantea como alternativa al método anterior para evitar sus inconvenientes.¹⁷ Para ello, Kelen y Tüdös proponen la ecuación 3.10:

$$\frac{G}{\alpha + f^*} = \left(r_A + \frac{r_B}{\alpha} \right) \cdot \frac{f^*}{\alpha + f^*} - \frac{r_B}{\alpha} \quad \text{Ec 3.10}$$

siendo G y F^* los términos $(F/f) \cdot (f-1)$ y F^2/f respectivamente y α un coeficiente arbitrario dado por la expresión $\alpha = \sqrt{f_M^* \cdot f_m^*}$. Definiendo dos nuevas variables $\eta = G / (\alpha + f^*)$ y $\xi = f^* / (\alpha + f^*)$ se obtiene la ecuación 3.11:

$$\eta = \left(r_A + \frac{r_B}{\alpha} \right) \cdot \xi - \frac{r_B}{\alpha} \quad \text{Ec 3.11}$$

que es la ecuación de una recta donde el cociente $\left(r_A + \frac{r_B}{\alpha} \right)$ es la pendiente y $\frac{r_B}{\alpha}$ es la ordenada en el origen. Con estas dos expresiones se obtienen las relaciones de reactividad para el sistema p(A-co-B). Para una representación óptima de los puntos experimentales los valores f_M^* y f_m^* toman los valores máximo y mínimo de f^* .

Un inconveniente de los métodos lineales es que los valores de las relaciones de reactividad obtenidos a partir de ellos no proporcionan información del error experimental. Una alternativa para la obtención de las relaciones de reactividad a estos

métodos lineales fue dada por Tidwell y Mortimer, mediante la aplicación del ajuste no lineal por mínimos cuadrados.

Método Tidwell-Mortimer (no lineal). Este método, al igual que los anteriores, se basa en el ajuste de la ecuación de copolimerización 3.5.¹⁸ Realizando copolimerizaciones a bajas conversiones para poder considerar la concentración inicial de comonómeros constante, la ecuación 3.5 se puede representar como la ecuación 3.12:

$$\frac{f_A}{f_B} = \frac{(r_A \cdot F_A^2 + F_A \cdot F_B)}{(r_B \cdot F_B^2 + F_A \cdot F_B)} \quad \text{Ec 3.12}$$

Para la obtención de las relaciones de reactividad, se estiman dos valores de r_A y r_B y se sustituyen en la ecuación 3.12, representándose los datos de las composiciones de la alimentación y del copolímero tanto experimentales como obtenidos matemáticamente. Este proceso se itera hasta alcanzar el valor mínimo de la suma de los cuadrados de las diferencias entre los valores observados y determinados matemáticamente. En el punto donde ambos valores convergen, los valores r_A y r_B introducidos en la ecuación son los valores de las relaciones de reactividad del sistema p(A-co-B). Este método además permite evaluar el error experimental cometido a través de la representación del diagrama del límite del 95% de confianza.¹⁹

Método algoritmo genérico de Levenberg-Marquardt (no lineal). Este método hace uso de un algoritmo numérico de ajuste no lineal por mínimos cuadrados. Para ello se busca el polinomio teórico que se adapte a los puntos experimentales mediante un ciclo iterativo hasta converger de manera óptima.²⁰

Dependiendo de los valores de las relaciones de reactividad, se obtendrán diferentes distribuciones de los comonómeros en el copolímero. En la tabla 3.1 se muestran los diferentes copolímeros obtenidos en función de los valores de r_A y r_B .

r_A	r_B	Copolímero
1	1	Azar
0	0	Alternante
>1	<1	Enriquecido en A
<1	<1	Azeotrópico

Tabla 3.1 Clasificación de los copolímeros en función de los valores de las relaciones de reactividad.

Los copolímeros al azar se caracterizan porque cumplen que $r_1 \cdot r_2 = 1$. En estos polímeros la adición de monómero en la etapa de propagación no depende de la naturaleza de ambas unidades. En el caso de copolimerizaciones alternantes ambos monómeros presentan reactividades parecidas y los macrorradicales prefieren reaccionar con tendencia a la alternancia. Cuando un comonómero presenta mayor reactividad respecto al otro, el copolímero resultante se presenta enriquecido en ese comonómero a bajas conversiones, y con una distribución poco homogénea de secuencias a conversión total. Por último, cuando ambas relaciones de reactividad son inferiores a la unidad, la curva de composición en alimentación frente a la del copolímero atraviesa en un punto la línea obtenida cuando $r_A = 1$ y $r_B = 1$. En este punto, denominado azeotrópico, la composición del copolímero se hace independiente de la conversión.

Las relaciones de reactividad además proporcionan información de la distribución instantánea de secuencias de estas cadenas. De acuerdo con la teoría estadística clásica,^{21,22} la probabilidad de que exista una diada alternante A-B viene dada por la ecuación 3.13:

$$P(AB) = P(A) \cdot P_{AB} \quad \text{Ec 3.13}$$

siendo $P(A)$ la probabilidad de existencia de la unidad A y P_{AB} la probabilidad condicional de que el monómero B se adicione a un radical polimérico cuyo extremo en crecimiento sea A*. De acuerdo con esta definición y teniendo en cuenta el esquema cinético expuesto anteriormente, las probabilidades condicionales pueden expresarse según la ecuación:

$$P_{AB} = \frac{k_{AB} \cdot [A^*] \cdot [B]}{k_{AA} \cdot [A^*] \cdot [A] + k_{AB} \cdot [A^*] \cdot [B]} \quad \text{Ec 3.14}$$

y operando

$$P_{AB} = \frac{1}{1 + r_A \cdot x} \quad \text{Ec 3.15}$$

donde $r_A = k_{pAA}/k_{pAB}$ y $x = [A]/[B]$. De forma similar pueden obtenerse las probabilidades condicionales P_{AA} , P_{BA} , y P_{BB} en función de las relaciones de reactividad y de la relación de concentraciones de monómeros en la alimentación.

$$P_{AA} = 1 - P_{AB}$$

$$P_{BA} = \frac{1}{1 + r_B/x} \quad \text{Ec 3.16}$$

$$P_{BB} = 1 - P_{BA}$$

A partir de estas expresiones es sencillo obtener los parámetros estadísticos que describen la distribución de los monómeros a lo largo de las cadenas poliméricas. Admitiendo el principio de reversibilidad de secuencias, es decir, que la probabilidad de encontrar una secuencia cualquiera formada por unidades monoméricas en un cierto orden es igual a la probabilidad de encontrar una secuencia formada por las mismas unidades pero agrupadas en orden inverso, es fácil deducir que:

$$P(A)P_{AB} = P(B) \cdot P_{BA} \quad \text{Ec 3.17}$$

Combinando la ecuación 3.17 con la ecuación 3.15 y 3.16 se deduce la ecuación de copolimerización para el modelo terminal:

$$\frac{P(A)}{P(B)} = \frac{1 + r_A \cdot x}{1 + r_B/x} \quad \text{Ec 3.18}$$

En muchas ocasiones resulta interesante conocer las fracciones de triadas centradas en una unidad determinada con objeto de poder describir adecuadamente la homogeneidad en la distribución de unidades para un sistema copolimérico definido. Las fracciones de triadas que contienen una unidad central A pueden deducirse estadísticamente en base al modelo terminal de la copolimerización radical.²³

$$\begin{aligned}
 f_{AAA} &= f_A \cdot P_{AA}^2 \\
 f_{BAA} &= f_B \cdot P_{BA} \cdot P_{AA} \\
 f_{AAB} &= f_A \cdot P_{AA} \cdot P_{AB} \\
 f_{BAB} &= f_B \cdot P_{BA} \cdot P_{AB}
 \end{aligned}
 \quad \text{Ec 3.19}$$

Otro factor a tener en cuenta en los procesos de polimerización radical en los que participen monómeros acrílicos es la formación de puntos de estereoisomerismo (configuración R o S) en el carbono terciario o cuaternario de la cadena.²⁴ En una cadena de polímero que incorpora cientos o miles de unidades, no es relevante la configuración absoluta de cada uno de los carbonos terciarios o cuaternarios, pero sí lo es la ordenación de estos sucesivos estereocentros, es decir las configuraciones relativas, da lugar al concepto de tacticidad. Hay dos tipos básicos de ordenación; isotáctica, donde los carbonos terciarios presentan la misma configuración, y sindiotáctica donde la configuración es alternante.

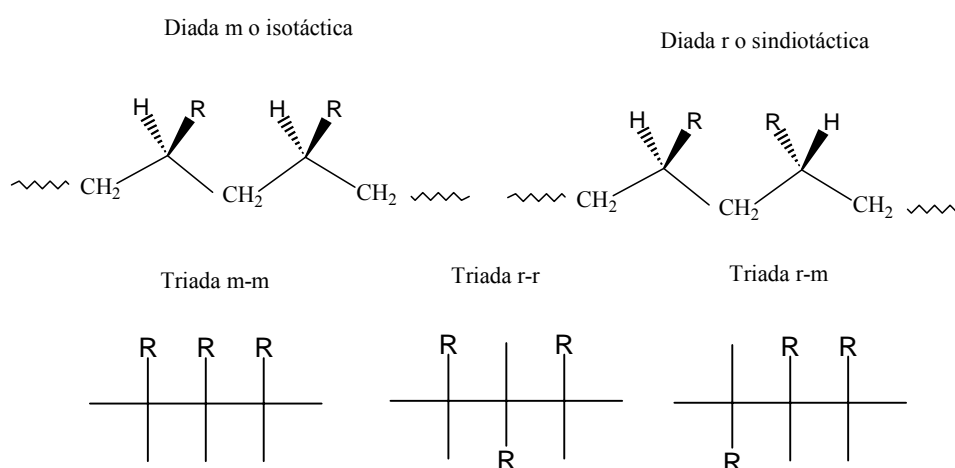


Figura 3.3 Configuración de diadas y triadas para un polímero constituido por unidades monosustituidas.

La mayoría de las macromoléculas presentan una secuencia estadística de ordenamiento iso y sindiotáctico dando lugar a diadas meso (m) o racémicas (r) respectivamente. Usando esta terminología m y r, encontramos que hay tres triadas posibles, mm (isotáctica), mr y rm (heterotáctica) y rr (sindiotáctica). Cuatro unidades forman una tetraada y así sucesivamente. La figura 3.3 muestra los dos tipos de diadas para un monómero monosustituido y un esquema simplificado de los tres tipos de triadas posibles, que podría corresponder a una proyección de Fisher girada 90°.

3.2.2.- PRINCIPALES TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE POLÍMEROS.

La caracterización de los polímeros descritos en este capítulo se realiza mediante técnicas espectroscópicas, cromatográficas, térmicas y reológicas.

Técnicas espectroscópicas:

Una de las técnicas más utilizadas en la caracterización de polímeros para determinar tanto la composición como la microestructura de las cadenas poliméricas es la Resonancia Magnética Nuclear. Además esta técnica es muy útil para el estudio de mecanismos de polimerización y análisis estructural de las macromoléculas.²⁵ La espectroscopia de carbono-13 ofrece además una información excelente y fiable acerca de la configuración estereoquímica de polímeros acrílicos y vinílicos, cuando el espectro se registra en condiciones adecuadas.^{22,26}

La espectroscopia vibracional (FTIR) por su parte proporciona información acerca de la estructura de polímeros, la presencia de grupos funcionales y de interacciones intermoleculares.²⁷ Esta versatilidad ha hecho de esta técnica una herramienta muy útil para la caracterización química de polímeros²⁸ y para el seguimiento de cambios químicos en reacciones de curado o de degradación.²⁹ La asignación de las bandas características de los polímeros se realiza de acuerdo con la bibliografía y con tablas de asignación teórica.

Determinación de pesos moleculares. Cromatografía de Exclusión de Tamaños (SEC):

Una de las características más importantes de un polímero es su peso molecular. En macromoléculas el peso molecular no es generalmente un parámetro único, sino que se presenta como un valor estadístico como resultado de una mezcla polidispersa con una distribución de pesos moleculares que pueden definirse mediante diferentes promedios, de los cuales los más característicos son el Peso Molecular Promedio en Número \bar{M}_n y el Peso Molecular Promedio en Peso \bar{M}_w . La explicación de esta polidispersidad reside en las variaciones estadísticas presentes en el propio proceso de polimerización.

El Peso Molecular Promedio en Número se define como el peso total de todas las moléculas en una muestra de polímero (w) en relación al número total de moléculas presentes y cuya expresión matemática se recoge en la ecuación 3.20:

$$\bar{M}_n = \frac{w}{\sum N_x} = \frac{\sum N_x M_x}{\sum N_x} \quad \text{Ec 3.20}$$

donde los sumatorios representan todas las especies poliméricas de diferente tamaño desde $x = 1$ hasta $x = \infty$ unidades, y N_x es el número de moléculas cuyo peso es M_x .

El Peso Molecular Promedio en Peso se puede resumir de manera análoga en la ecuación 3.21.

$$\bar{M}_w = \frac{\sum N_x M_x^2}{\sum N_x M_x} \quad \text{Ec 3.21}$$

En general se puede decir que \bar{M}_n es más sensible a las fracciones de peso molecular bajo mientras que \bar{M}_w es más sensible a las de peso molecular alto.

El cociente de ambos promedios se denomina Índice de Polidispersidad (IP), que da una idea de la amplitud de la curva de distribución de pesos moleculares y que a su vez, determina en gran medida las propiedades del polímero.

La técnica más utilizada para la determinación de la distribución de pesos moleculares en polímeros es la Cromatografía de Exclusión por Tamaños (SEC, de sus siglas en inglés),³⁰ que se basa en la separación de moléculas en función de su tamaño molecular en disolución al pasar a través de una serie de columnas rellenas de un material, normalmente geles entrecruzados de estireno/divinilbenceno o sílice, de tamaño de partícula estrecho y distribución de tamaños de poro controlada, en el rango de las moléculas que se quieren separar. Por último, mediante un sistema de detección adecuado como puede ser de índice de refracción o espectroscopia UV, se puede medir la cantidad de polímero que pasa a través de la columna en función del tiempo.

La SEC es una técnica relativa que no permite determinaciones absolutas de pesos moleculares, sino que es preciso establecer una curva de calibrado a partir de patrones monodispersos de peso molecular conocido para a partir de ella, obtener los pesos moleculares relativos de las muestras. Sin embargo, en la mayoría de los casos no existen patrones de los polímeros de estudio por lo que se suele recurrir a patrones comerciales de polímeros con volumen hidrodinámico parecido, o al menos con estructura química semejante a la muestra problema.

Análisis térmico, Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC):

La Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, de sus siglas en inglés) es una técnica de no equilibrio basada en la medida de flujo de calor entre una muestra y una referencia, en función del tiempo o la temperatura. Debido a que la mayoría de los cambios físicos o químicos tienen lugar con un cambio de entropía, entalpía y/o energía libre de Gibbs, éstos pueden ser evaluados por calorimetría detectando el calor intercambiado en cada transición.³¹ Tanto los polímeros amorfos, como las zonas amorfas de los polímeros parcialmente cristalinos, muestran una transición térmica denominada transición vítrea y una temperatura asociada a esa transición denominada Temperatura de Transición Vítrea (T_g).³² La determinación de esta transición, y la temperatura a la que se produce nos da una idea acerca de la flexibilidad de cadena. Por

debajo de la T_g los polímeros se encuentran en estado rígido y quebradizo mientras que por encima, las macrocadenas poseen suficiente energía térmica para moverse al azar. Esta transición está asociada a un fenómeno de relajación por lo que su determinación depende en gran medida de la estructura química del polímero y de las condiciones experimentales en que se realiza, entre ellas la velocidad de calentamiento.

Análisis Termogravimétrico (TGA):

El Análisis Termogravimétrico (TGA, de sus siglas en inglés) es el método más ampliamente utilizado para obtener información sobre la estabilidad térmica de polímeros.³³ Mediante esta técnica pueden determinarse numerosas propiedades del material como por ejemplo, la degradación que experimenta un material polimérico, una estimación de su composición, mecanismos de degradación, etc. Un experimento de degradación térmica típico consiste en aplicar una rampa de calentamiento definida a una muestra polimérica y registrar el porcentaje de pérdida de peso que se va alcanzando con la temperatura o el tiempo.

Determinación de la densidad:

La densidad es otra de las propiedades importantes a considerar en muchas aplicaciones posteriores de los polímeros ya que permite entre otras cosas, determinar la fracción de volumen libre o el peso molecular entre nudos de redes poliméricas. Para su determinación se sumergen en un disolvente de baja densidad partículas en forma de película muy fina, hundiéndose éstas debido a su mayor densidad. Tras la adición de pequeños volúmenes de un fluido de mayor densidad, las partículas comenzarán a flotar. La densidad de la mezcla final coincide con la densidad del polímero y se determina mediante pesada en un picnómetro.

Determinación reológica, medida de la viscoelasticidad dinámica:

Una característica de polímeros sintetizados a partir de monómeros bifuncionales es su capacidad de formar redes entrecruzadas que formen una única estructura tridimensional. El proceso de formación de estas redes no es, sin embargo, instantáneo sino que ocurre progresivamente a medida que las distintas macrocadenas

en crecimiento van uniéndose formando dominios de alta densidad de entrecruzamiento. Conforme avanza la reacción, este proceso se ve dificultado por el incremento de la viscosidad y su consecuente mayor restricción en el movimiento de los macrorradicales para formar enlaces covalentes. Este sistema alcanza un punto crítico denominado punto gel caracterizado por la formación de dominios de peso molecular tan grandes que provocan el ensanchamiento de la distribución de tamaños hasta converger en infinito.³⁴ Justo antes de que la reacción alcance el punto gel, ésta consiste en una distribución de dominios finitos. Este estado es llamado *sol* ya que es soluble en buenos disolventes, sin embargo, superado el instante de transición sólido-líquido (LST de sus siglas en inglés), el sistema se denomina *gel*. El *gel* consiste en una macromolécula de longitud infinita y que sólo puede ser hinchada, pero no disuelta en los disolventes anteriores. Este proceso de gelación nunca ocurre de manera total sino que siempre queda una fracción de bajos pesos moleculares, fracción *sol*, embebida en la matriz entrecruzada o fracción *gel*.

Existen numerosos métodos para el estudio de estos sistemas entrecruzados. Uno de ellos es el estudio de la viscoelasticidad dinámica del material mediante técnicas de reometría oscilatoria,³⁵ haciendo uso de un reómetro rotacional de esfuerzo controlado (figura 1.1). Esta geometría permite la medida de propiedades viscosas y viscoelásticas aplicando una deformación o velocidad de deformación^{36,37} y midiendo la respuesta a dicha deformación.

Al someter la muestra a un desplazamiento oscilatorio sinusoidal en cizalla, la ecuación del desplazamiento (γ) en función del tiempo es la siguiente:

$$\gamma(t) = \gamma_0 \cdot \exp(i\omega t) \quad Ec\ 3.22$$

donde γ_0 es la amplitud del desplazamiento, y ω es la frecuencia. Para un material viscoelástico, el esfuerzo correspondiente (σ) tiene amplitud σ_0 , pero estará desfasado con respecto a la deformación aplicada. Si llamamos δ al ángulo de desfase, la expresión que relaciona el esfuerzo con el tiempo es:

$$\sigma(t) = \sigma_0 \cdot \exp\{i(\omega t - \delta)\} \quad Ec\ 3.23$$

La geometría de platos paralelos nos permite obtener además otros parámetros viscoelásticos como el módulo de cizalla complejo (G^*), que se define como la relación entre el esfuerzo y la deformación

$$G^* = \frac{\sigma(t)}{\gamma(t)} = \frac{\sigma_0}{\gamma_0} (\cos \delta + i \cdot \text{sen} \delta) = G' + i \cdot G'' \quad \text{Ec. 3.24}$$

donde G' es el módulo de almacenamiento que viene determinado por el comportamiento elástico del material y G'' es el módulo de pérdidas, que es el componente correspondiente al comportamiento viscoso.

La viscosidad compleja (η^*) se define como la relación entre el esfuerzo y la velocidad de deformación ($\dot{\gamma}$), y tiene componentes real e imaginaria.

$$\eta^* = \frac{\sigma(t)}{\dot{\gamma}(t)} \quad \text{Ec 3.25}$$

La parte real o viscosidad dinámica η' está relacionada con el módulo de pérdidas G'' según la ecuación 3.26.

$$\eta' = \frac{G''}{\omega} \quad \text{Ec 3.26}$$

Por último, una de las funciones viscoelásticas dinámicas más utilizadas en la caracterización de materiales es la denominada tangente de pérdidas ($\tan \delta$), que resulta del cociente de los módulos de pérdida y de almacenamiento.

$$\tan \delta = \frac{G''}{G'} \quad \text{Ec. 3.27}$$

Con estos parámetros y aplicando la teoría de elasticidad del caucho³⁸ es posible determinar el número de cadenas elásticamente activas, y que a su vez es inversamente proporcional al peso molecular entre nudos.

$$G' = \frac{RT\rho}{Mc} \quad \text{Ec 3.28}$$

donde R es la constante de los gases, T la temperatura, ρ la densidad del polímero y Mc el peso molecular entre nudos.

3.3.- OBTENCIÓN DE POLÍMEROS Y COPOLÍMEROS SOLUBLES.

3.3.1.- HOMOPOLÍMEROS DE EMA, EgMA Y EEgMA.

La obtención de los polímeros poli(metacrilato de eugenilo) (PEgMA), poli(metacrilato de etoxieugenilo) (PEEgMA) y poli(metacrilato de etilo) (PEMA) se lleva a cabo mediante polimerización radical en disolución según la metodología descrita en el apartado 1.2.1. Cuando las reacciones se llevan a cabo alcanzando conversiones altas ($t = 24$ h) con rendimientos del 60, 62 y 70% para los polímeros PEgMA, PEEgMA y PEMA respectivamente, se obtiene PEMA soluble pero los polímeros PEgMA y PEEgMA así obtenidos resultan insolubles en los disolventes orgánicos convencionales ya que generan una red entrecruzada debido a la participación del grupo alilo de las respectivas unidades monoméricas EgMA y EEgMA.

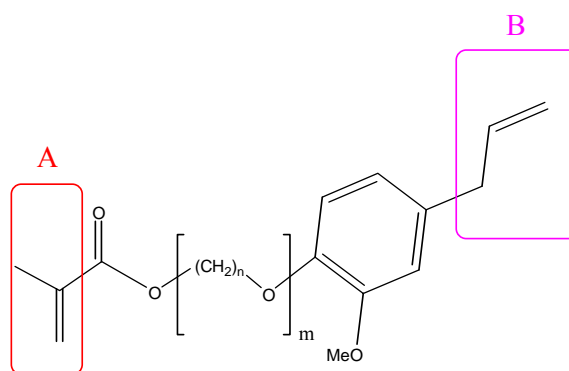


Figura 3.4 Estructura química de los derivados de eugenol (EgMA: $m = 0$; EEgMA: $n = 2$, $m = 1$) donde se recuadran los grupos susceptibles de polimerizar. A) Doble enlace metacrílico. B) Doble enlace alílico.

Por eso la polimerización de estos monómeros debe realizarse a baja conversión para obtener productos solubles, que se caracterizan mediante técnicas de Resonancia Magnética Nuclear. La reactividad del grupo acrílico es mucho mayor que la del grupo alilo, y por ello los polímeros aislados a baja conversión no son entrecruzados, siendo por lo tanto solubles.

Las figuras 3.6 y 3.7 muestran los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C del poli(metacrilato de etilo), obtenido en cloroformo deuterado. Para la correcta asignación de las bandas, se emplean los espectros bidimensionales HMQC (figura 3.8) obtenidos en las mismas condiciones. En la tabla 3.2 se recogen los desplazamientos químicos de las señales obtenidas así como la asignación de cada una de ellas en función de la numeración establecida en la figura 3.5

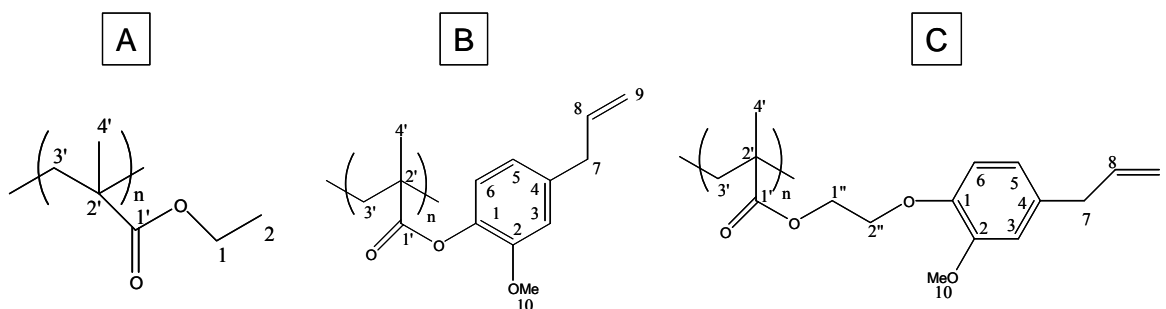


Figura 3.5 Estructura química de los homopolímeros PEMA (A), PEgMA (B), PEEgMA (C) y numeración de los carbonos presentes.

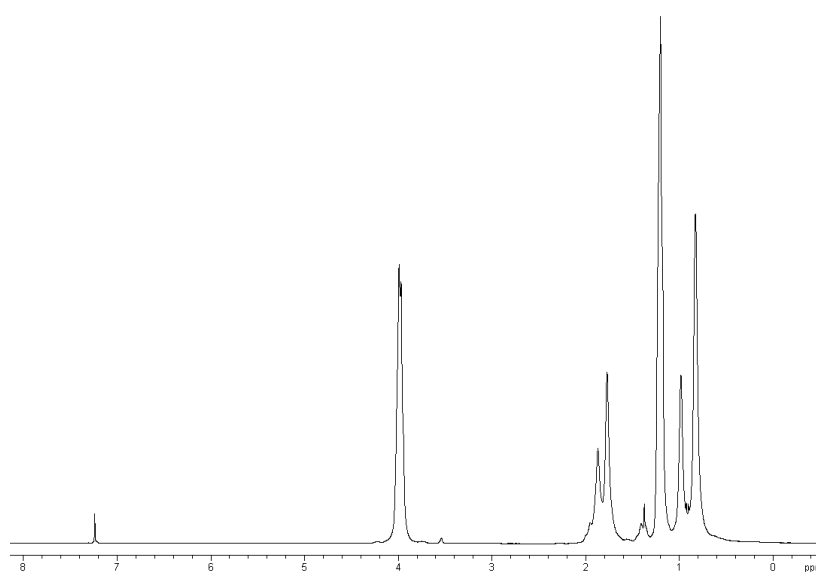


Figura 3.6 Espectro de RMN ^1H del poli(metacrilato de etilo) en cloroformo-d

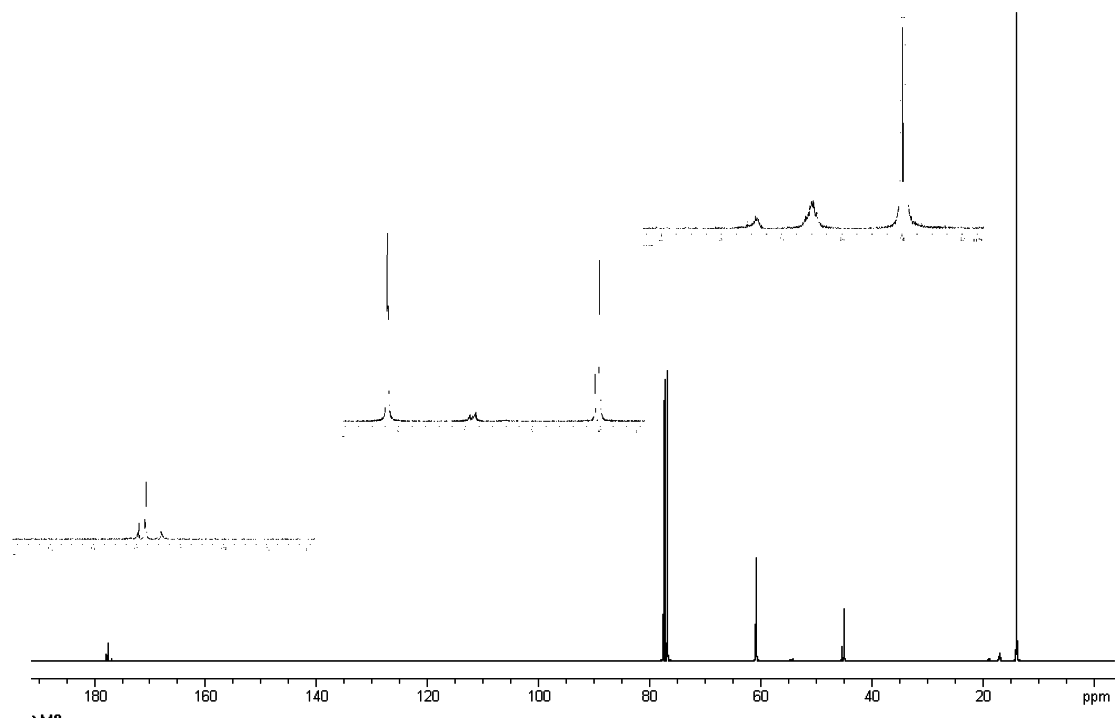


Figura 3.7 Espectro de RMN ^{13}C del poli(metacrilato de etilo) en cloroformo-d.

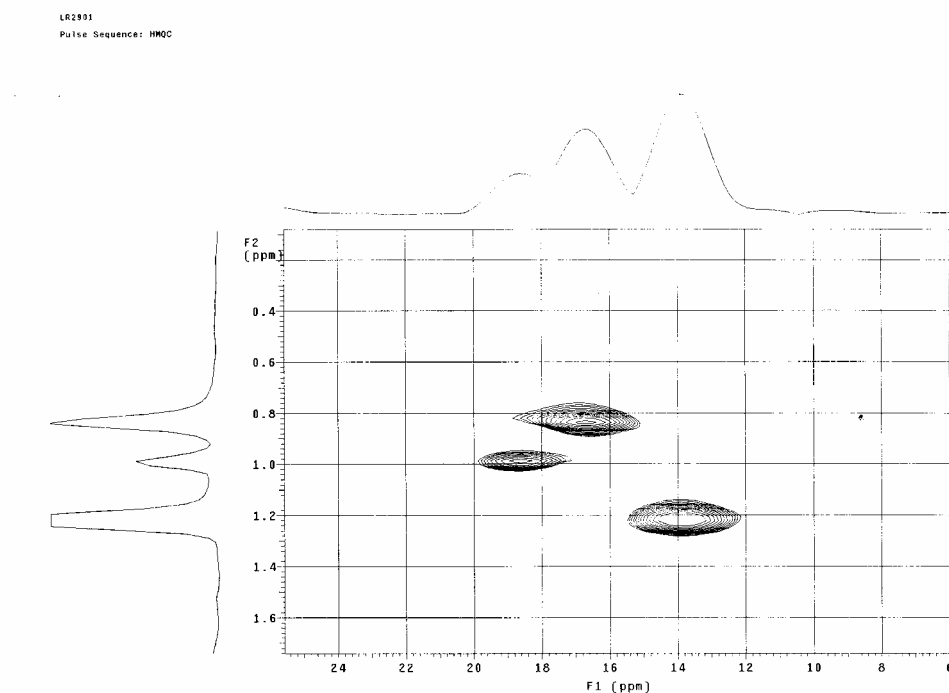


Figura 3.8 Espectro HMQC de correlación ^1H - ^{13}C del poli(metacrilato de etilo) en cloroformo-d.

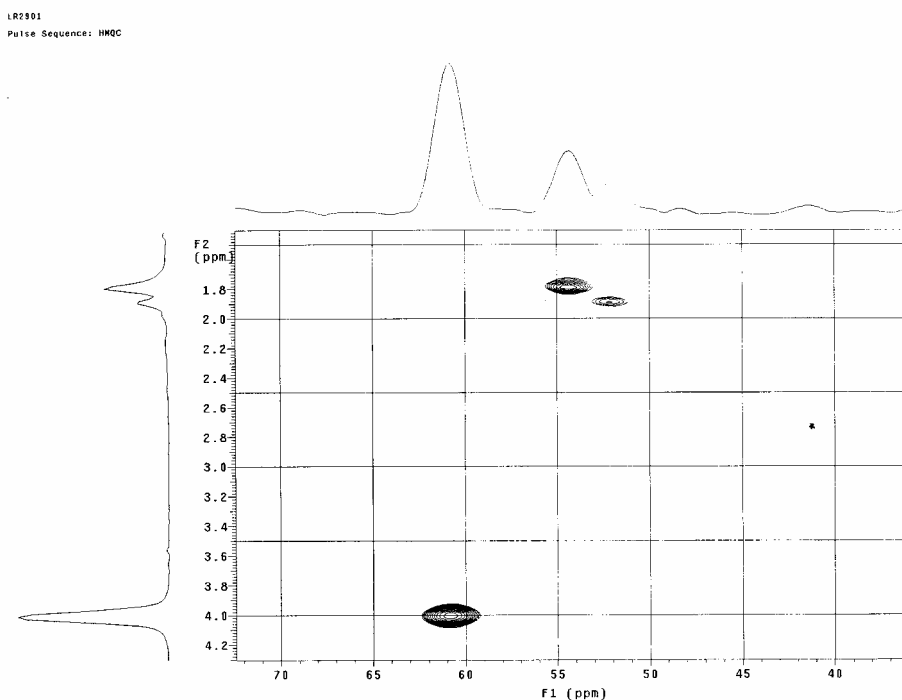


Figura 3.8 continuación. Espectro HMQC de correlación ^1H - ^{13}C del poli(metacrilato de etilo) en cloroformo-d.

PEMA RMN ^1H		PEMA RMN ^{13}C	
δ (ppm)	Asignación	δ (ppm)	Asignación
4,2 – 3,7	H ₁	178,0	C ₁
1,87	H ₃ , mrr	60,5	C ₁
1,77	H ₃ , rrr	54,1	C ₃
1,4	H ₄ , mm	44,8	C ₂
1,2	H ₂	18,4	C ₄ , mr
0,98	H ₄ , mr	16,5	C ₄ , rr
0,83	H ₄ , rr	13,7	C ₂

Tabla 3.2 Desplazamientos químicos de las señales RMN ^1H y RMN ^{13}C del poli(metacrilato de etilo) (referencia TMS).

Las figuras 3.9 y 3.10 muestran los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C del poli(metacrilato de eugenilo), obtenidos en cloroformo deuterado. Para la correcta asignación de las bandas, se emplean los espectros bidimensionales HMQC (figura 3.11) obtenidos en las mismas condiciones. En la tabla 3.3 se recogen los

desplazamientos químicos de las señales obtenidas así como la asignación de cada una de ellas en función de la numeración establecida en la figura 3.5

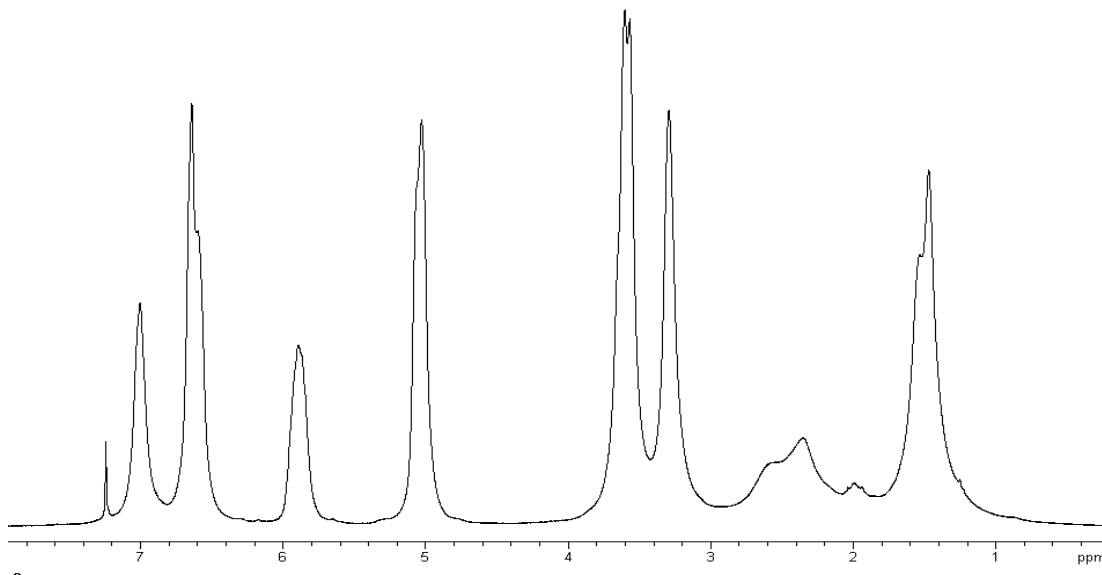


Figura 3.9 Espectro de RMN^1H del poli(metacrilato de eugenilo) en cloroformo-d

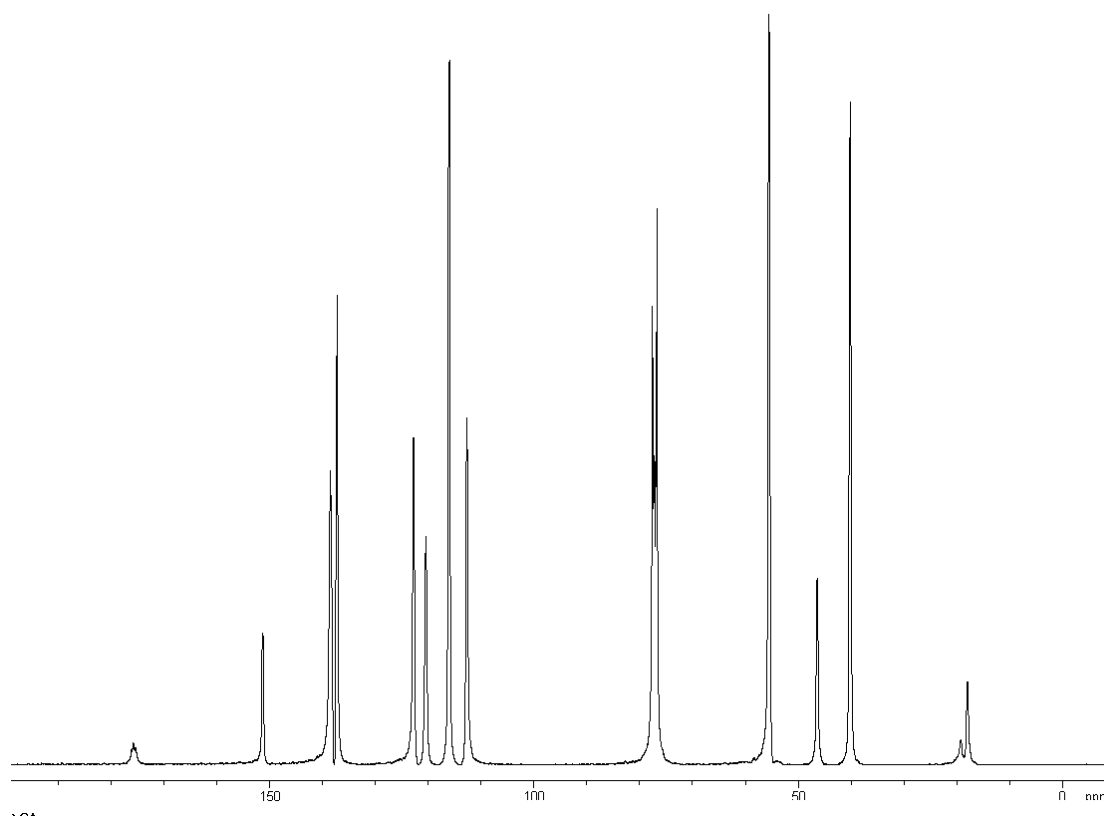


Figura 3.10 Espectro de RMN^{13}C del poli(metacrilato de eugenilo) en cloroformo-d.

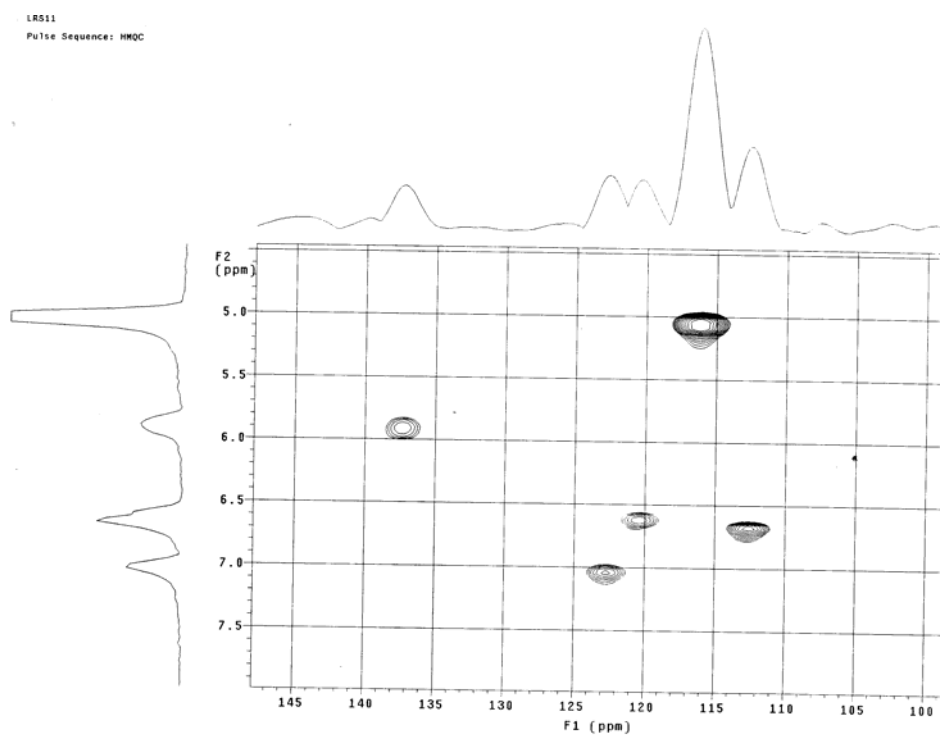
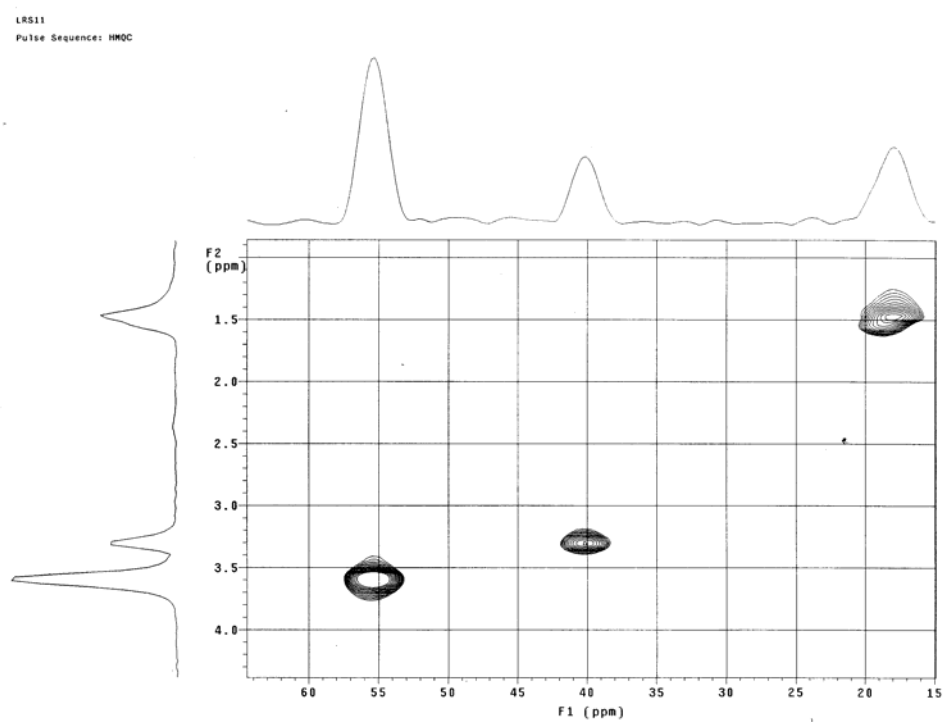


Figura 3.11 Espectro HMQC de correlación ^1H - ^{13}C del poli(metacrilato de eugenilo) en cloroformo-*d*.

PEgMA RMN ¹ H		PEgMA RMN ¹³ C	
δ (ppm)	Asignación	δ (ppm)	Asignación
7,09	H ₅	176,1	C _{1'}
6,6	H _{3,6}	151,6	C ₂
5,9	H ₈	138,7	C ₁
5,0	H ₉	138,5	C ₄
3,6	H ₁₀	137,7	C ₈
3,3	H ₇	123,0	C ₅
2,9 – 2,1	H _{3'}	120,7	C ₆
2,0	H _{4'} mm	116,4	C ₉
1,55	H _{4'} mr	113,1	C ₃
1,48	H _{4'} rr	55,8	C ₁₀
		53,7	C _{3'}
		46,5	C _{2'}
		40,3	C ₇
		18,0	C _{4'}

Tabla 3.3 Desplazamientos químicos de las señales RMN ¹H y RMN ¹³C del poli(metacrilato de eugenilo) (referencia TMS).

Las figuras 3.12 y 3.13 muestran los espectros de RMN ¹H y RMN ¹³C del poli(metacrilato de etoxieugenilo), obtenidos en cloroformo deuterado. Para la correcta asignación de las bandas, se emplean los espectros bidimensionales HMQC (figura 3.14) obtenidos en las mismas condiciones. En la tabla 3.4 se recogen los desplazamientos químicos de las señales obtenidas así como la asignación de cada una de ellas en función de la numeración establecida en la figura 3.5

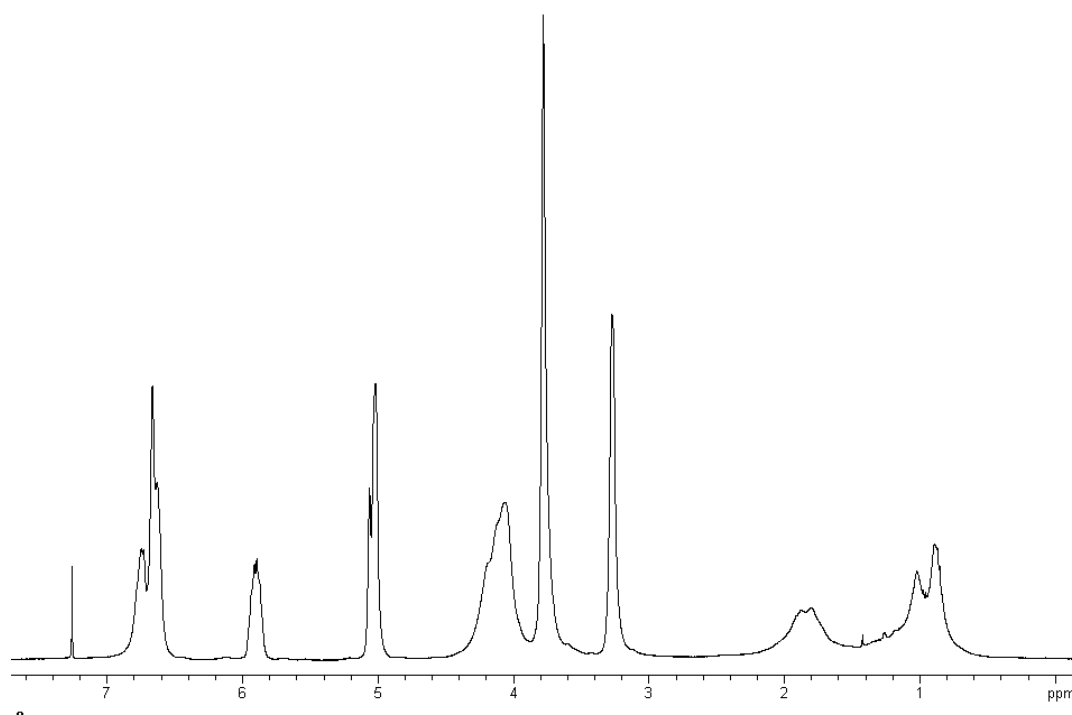


Figura 3.12 Espectro de RMN ^1H del poli(metacrilato de etoxieugenilo) en cloroformo-d.

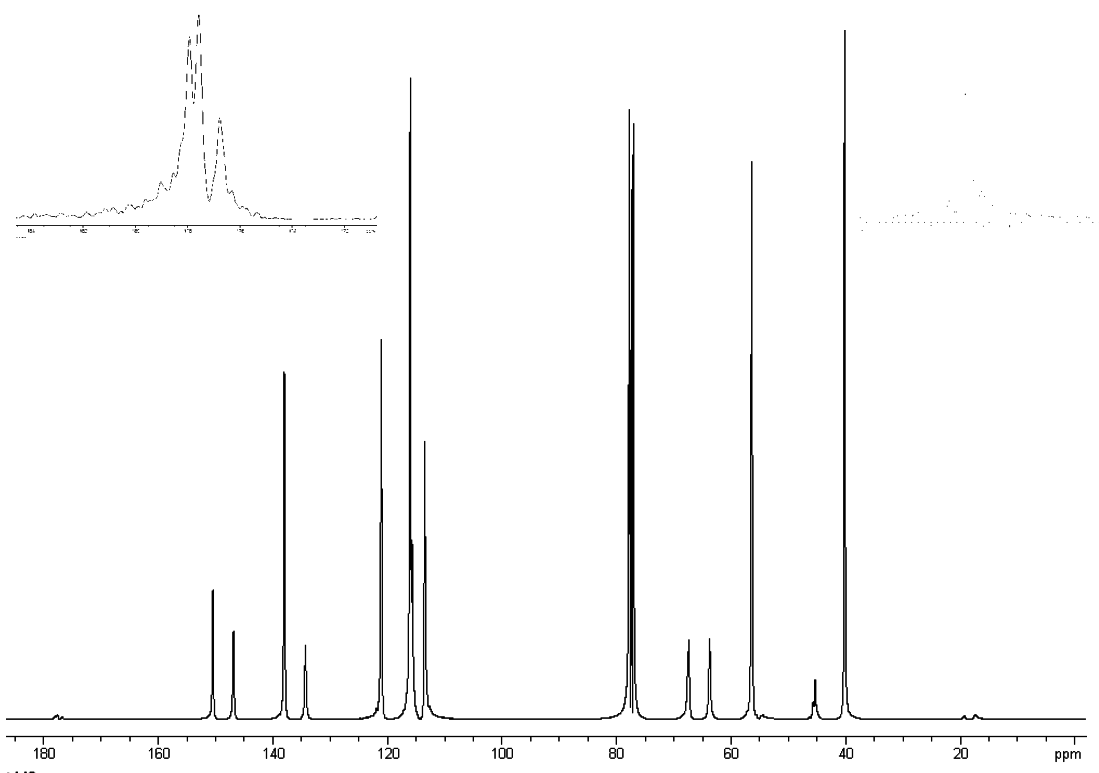
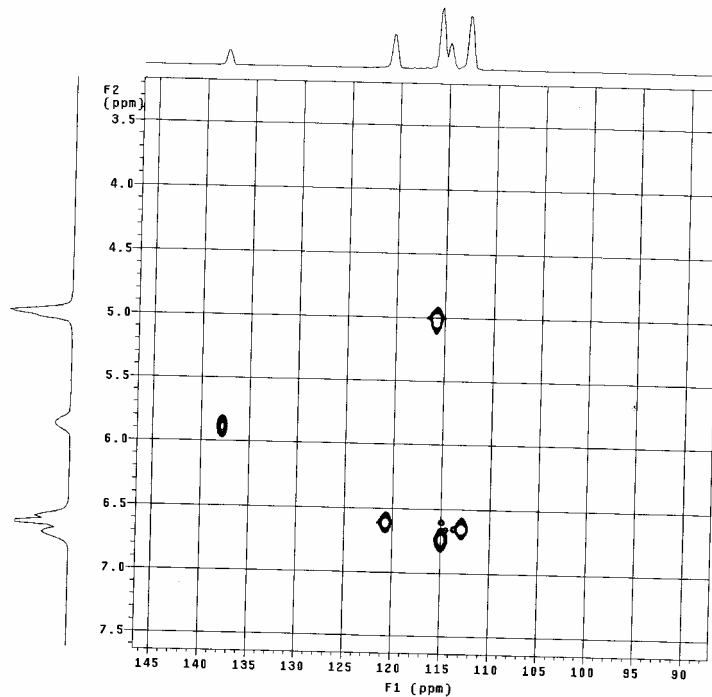


Figura 3.13 Espectro de RMN ^{13}C del poli(metacrilato de etoxieugenilo) en cloroformo-d.

1rs21
Pulse Sequence: gHSQC



1rs21
Pulse Sequence: gHSQC

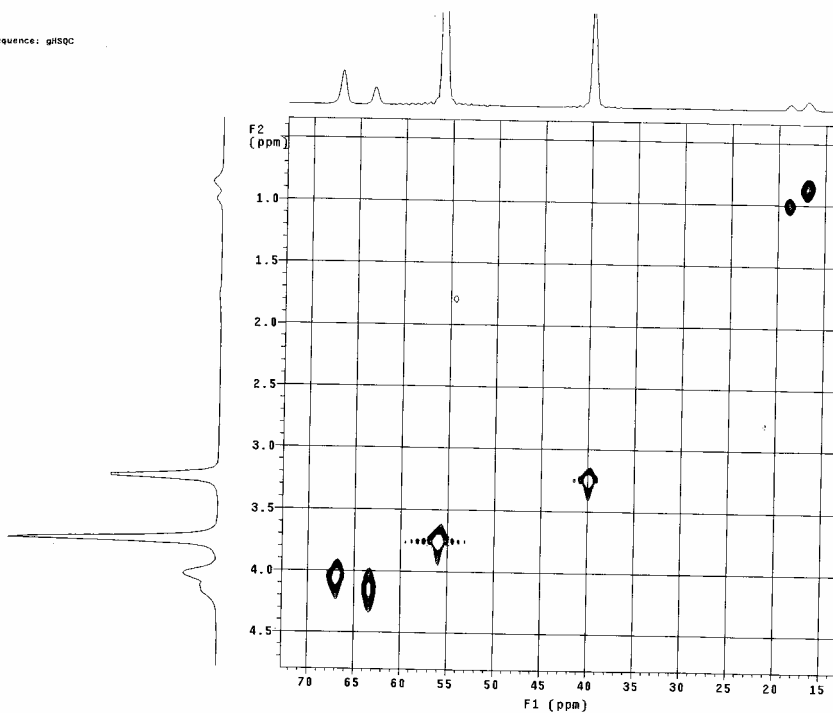


Figura 3.14 Espectro HMQC de correlación ^1H - ^{13}C del poli(metacrilato de etoxieugenilo) en cloroformo-d.

PEEgMA RMN ¹ H		PEEgMA RMN ¹³ C	
δ (ppm)	Asignación	δ (ppm)	Asignación
6,7	H ₅	177,4	C ₁ '
6,6	H ₆	149,7	C ₂
6,4	H ₃	146,4	C ₁
5,9	H ₈	137,8	C ₈
5,0	H ₉	133,8	C ₄
4,5 – 3,9	H ₁ ' ₂ '	120,4	C ₆
3,8	H ₁₀	115,7	C ₉
3,2	H ₇	114,8	C ₅
2,5 – 1,4	H ₃ , mrr, rrr	112,6	C ₃
1,4 – 0,2	H ₄ , mm, mr, rr	66,8	C ₁ '
		63,2	C ₂ '
		55,8	C ₁₀
		53,9	C ₃ '
		45,0	C ₂ '
		39,6	C ₇
		18,6	C ₄ , mr
		16,6	C ₄ , rr

Tabla 3.4 Desplazamientos químicos de las señales RMN ¹H y RMN ¹³C del poli(metacrilato de etoxieugenilo) (referencia TMS).

3.3.2.- COPOLÍMEROS DE p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA).

La obtención de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) se lleva a cabo mediante copolimerización radical de manera análoga a los respectivos homopolímeros. Como en el caso de éstos, cuando la reacción se lleva a cabo durante 24 horas se obtienen copolímeros entrecruzados que resultan parcialmente insolubles. Para evitarlo se controla el tiempo de reacción a fin de obtener productos solubles en disolventes orgánicos comunes, que en todos los casos después de su precipitación, fueron en forma de polvo blanco. La tabla 3.5 muestra los tiempos de reacción y la conversión alcanzada para cada copolímero.

COPOLÍMERO	COMPOSICIÓN	TIEMPO	CONVERSIÓN
PEMA	100 %	9 h	12 %
p(EMA-co-EgMA)	(80:20)	9 h 30 min	9 %
	(60:40)	9 h 10 min	8 %
	(50:50)	9 h 20 min	11 %
	(40:60)	8 h 30 min	11 %
	(20:80)	7 h	9 %
PEgMA	100 %	6 h 40 min	9 %
p(EMA-co-EEgMA)	(80:20)	14 h 25 min	10 %
	(60:40)	14 h 15 min	9 %
	(50:50)	14 h 20 min	12 %
	(40:60)	13 h	11 %
	(20:80)	13 h	13 %
PEEgMA	100 %	12 h 30 min	11 %

Tabla 3.5 *Tiempos de reacción necesarios para obtener copolímeros a bajas conversiones.*

En todos los casos la estructura se determinó mediante Resonancia Magnética Nuclear (RMN ^1H y RMN ^{13}C) apoyado de un estudio HMQC de cada copolímero para la correcta asignación de las bandas. La figura 3.15 muestra la estructura química de los copolímeros obtenidos con la numeración de cada carbono.

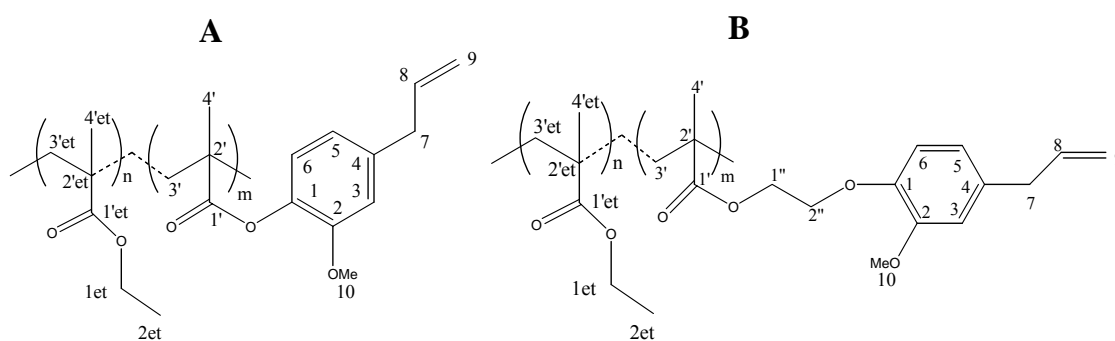


Figura 3.15 *Estructura química y numeración de los correspondientes átomos de carbono de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) (A) y p(EMA-co-EEgMA) (B).*

La tabla 3.6 recoge los desplazamientos químicos y la asignación de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) con composición al 50% en

cada uno de los respectivos comonómeros. La numeración de cada carbono corresponde a la indicada en la figura 3.15.

p(EMA-co-EgMA)				p(EMA-co-EEgMA)			
RMN ¹ H		RMN ¹³ C		RMN ¹ H		RMN ¹³ C	
δ (ppm)	Asignación	δ (ppm)	Asignación	δ (ppm)	Asignación	δ (ppm)	Asignación
7,0	H ₅	178,0	C _{1'Et}	6,8	H ₅	178,2	C _{1'Et}
6,7	H _{3,6}	176,1	C _{1'}	6,7	H _{3,6}	177,2	C _{1'}
5,9	H ₈	151,5	C ₂	5,9	H ₈	150,3	C ₂
5,0	H ₉	138,9	C ₁	5,1	H ₉	146,8	C ₁
4,0	H _{1Et}	138,5	C ₄	4,4-4,0	H _{1'',H2''}	138,0	C ₈
3,7	H ₁₀	137,6	C ₈	3,9	H _{1Et}	134,3	C ₄
3,3	H ₇	123,0	C ₅	3,8	H ₁₀	120,9	C ₆
2,8-1,8	H _{3';H3'Et}	120,7	C ₆	3,2	H ₇	116,1	C ₉
1,8-0,9	H _{4';H4'Et;} H _{2Et}	116,4	C ₉	2,1-1,68	H _{3';H3'Et}	115,5	C ₅
		113,1	C ₃	1,3-0,7	H _{4';H4'Et;} H _{2Et}	113,2	C ₃
		61,3	C _{1Et}			67,3	C _{1''}
		55,8	C ₁₀			63,8	C _{2''}
		54,9-	C _{3'}			61,1	C _{1Et}
		53,5	C _{3'Et}			56,4	C ₁₀
		46,5	C _{2'}			55,6- 54,5	C _{3';C3'Et}
		45,6	C _{2'Et}			45,6	C _{2'}
		40,5	C ₇			45,2	C _{2'Et}
		19,1	C _{4'}			40,2	C ₇
		17,8	C _{4'Et}			19,2	C _{4'}
		14,2	C _{2Et}			17,2	C _{4'Et}
						14,2	C _{2Et}

Tabla 3.6 Desplazamientos químicos de RMN ¹H y RMN ¹³C de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) con composición 50:50 (referencia TMS).

Los desplazamientos químicos y la asignación del resto de composiciones son los mismos que los recogidos en la tabla 3.6 con la diferencia de las intensidades relativas de cada comonómero.

3.3.2.1.- COMPOSICIÓN DE LOS COPOLÍMEROS.

La composición de cada copolímero se determina de los espectros RMN ^1H de ambos sistemas. Las figuras 3.16 y 3.17 muestran los espectros de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA), en donde aparecen las bandas características de cada unidad monomérica, observándose la variación en la intensidad de dichas bandas en función de la concentración de los monómeros en los respectivos copolímeros.

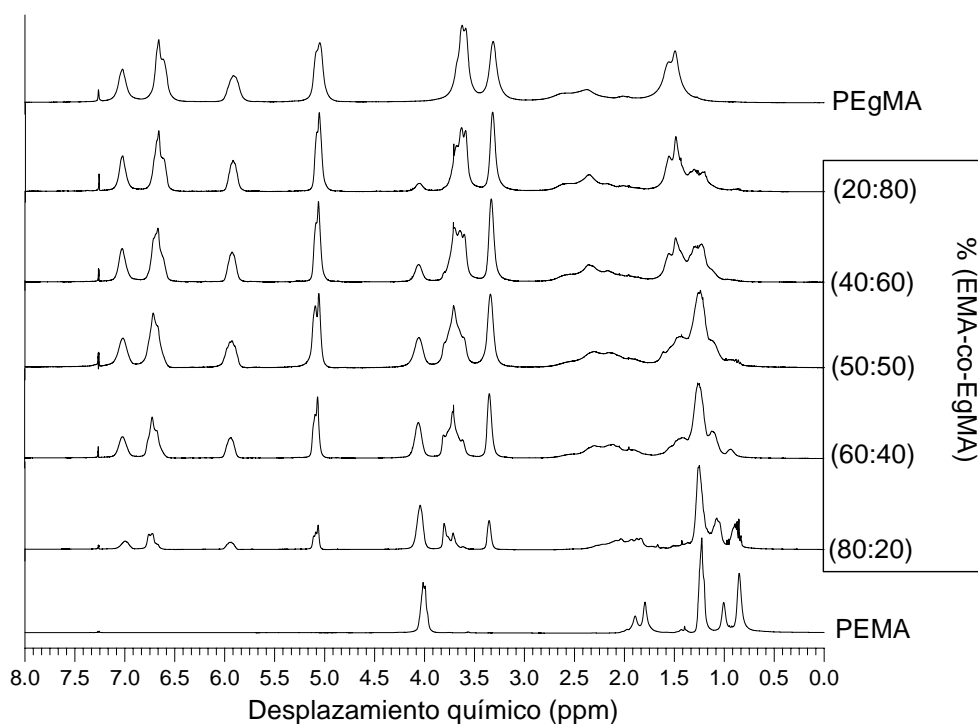


Figura 3.16 Espectros de RMN ^1H de algunos de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) con distintas composiciones registrados en CDCl_3 a 25°C .

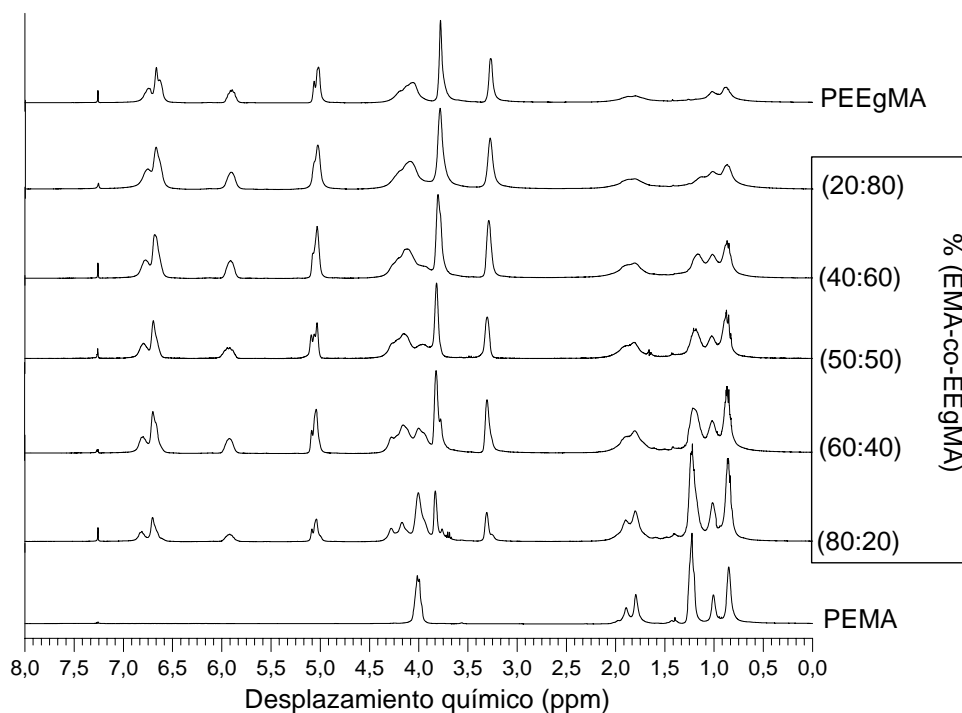


Figura 3.17 Espectros de RMN ^1H de algunos de los copolímeros $p(\text{EMA-co-EEgMA})$ con distintas composiciones registrados en CDCl_3 a 25°C .

La composición en los respectivos copolímeros se calcula teniendo en consideración la integral de la señal correspondiente a los protones OCH_2 ($\text{H}_{1\text{et}}$: 4,2 - 3,8 ppm) de la unidad de EMA y las integrales tanto de las señales correspondientes a los protones alílicos $=\text{CH}_2$ (H_9 5,3 - 4,7 ppm) como las correspondientes a los protones aromáticos (H_{3-6} y H_5 7,2 - 6,5 ppm) de las unidades de EgMA o EEgMA. Con los valores de dichas integrales y haciendo uso de la ecuación 1.1 se calculan las fracciones molares de EgMA o EEgMA en cada copolímero, así como las de EMA, por diferencia hasta uno.

Las fracciones molares obtenidas para cada composición se muestran en la tabla 3.7.

p(EMA-co-EgMA)			p(EMA-co-EEgMA)		
Alimentación	Copolímero		Alimentación	Copolímero	
F_{EgMA}	f_{EgMA}	f_{EMA}	F_{EEgMA}	f_{EEgMA}	f_{EMA}
0,90	0,92	0,08	0,80	0,82	0,18
0,70	0,80	0,20	0,70	0,74	0,26
0,60	0,69	0,31	0,60	0,72	0,28
0,50	0,61	0,29	0,50	0,64	0,36
0,40	0,53	0,47	0,40	0,50	0,50
0,30	0,42	0,58	0,30	0,44	0,56
0,10	0,16	0,84	0,20	0,32	0,68

Tabla 3.7 Composición (fracciones molares) de los sistema copoliméricos derivados de eugenol con conversiones alcanzadas en todos los casos inferiores al 10%.

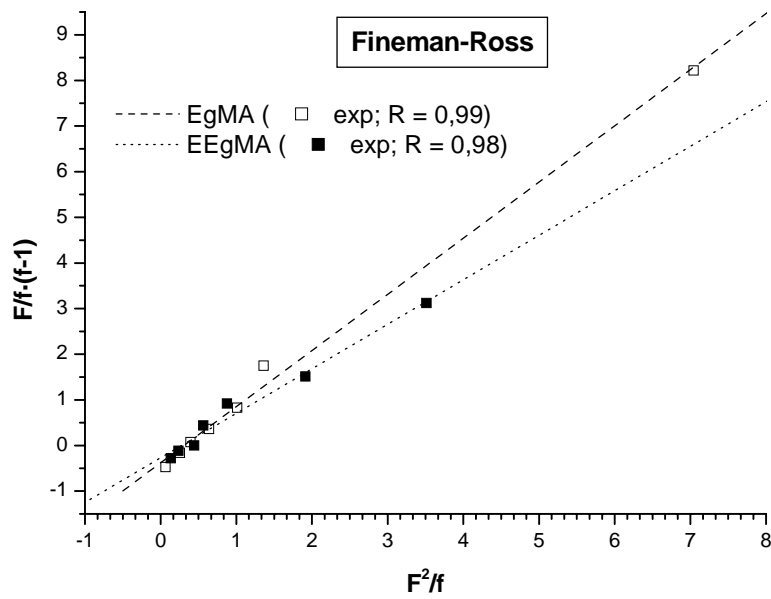
3.3.2.2.- RELACIONES DE REACTIVIDAD.

Como se ha introducido anteriormente, a partir de los datos experimentales de composiciones de los comonómeros, en la alimentación y en el copolímero se obtienen los valores de las relaciones de reactividad mediante la aplicación de diferentes métodos matemáticos.

Según los métodos propuestos por Fineman-Ross¹⁶ y Kelen-Tüdös, los datos experimentales de los sistemas p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) se ajustan a los diagramas lineales, tal como se muestran en la figura 3.18.

Los valores de las relaciones de reactividad obtenidos a partir de los métodos lineales y los no lineales antes expuestos para los sistema p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) se muestran en la tabla 3.8.

a)



b)

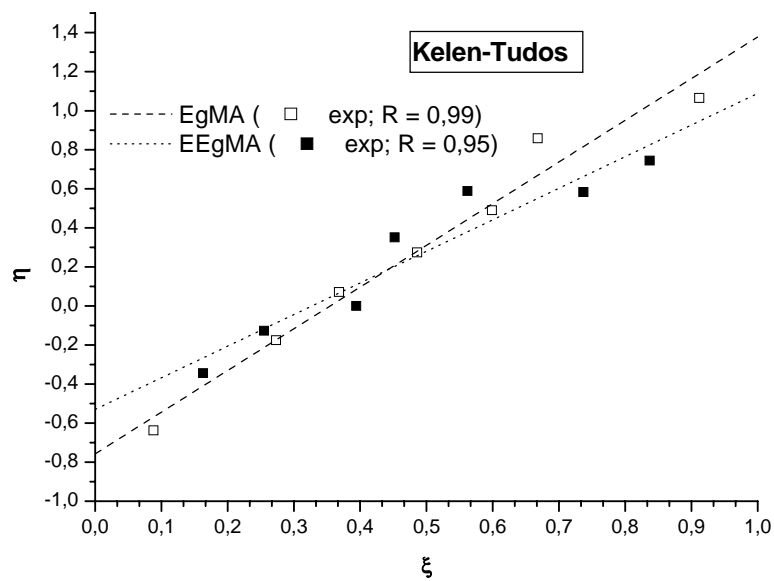


Figura 3.18 Diagramas de Fineman-Ross (a) y Kelen-Tüdös (b) para la copolimerización radical del metacrilato de eugenilo o de etoxieugenilo con metacrilato de etilo (R = grado de correlación de ajuste lineal).

MÉTODO	p(EMA-co-EgMA)			p(EMA-co-EEgMA)		
	r_1 (EgMA)	r_2 (EMA)	$r_1 \times r_2$	r_1 (EEgMA)	r_2 (EMA)	$r_1 \times r_2$
Finemann-Ross (FR)	1,23 ± 0,04	0,38 ± 0,10	0,46	0,98 ± 0,07	0,27 ± 0,1	0,26
Kelen-Tüdös (KT)	1,38 ± 0,25	0,51 ± 0,06	0,70	1,09 ± 0,36	0,36 ± 0,09	0,39
Tidwell-Mortimer (TM)	1,48	0,55	0,81	1,22	0,42	0,51
Levenber-Marquardt (LM)	1,48	0,55	0,81	1,22	0,42	0,51

Tabla 3.8 Relaciones de reactividad de los sistemas $p(EMA-co-EgMA)$ y $p(EMA-co-EEgMA)$.

Como se puede ver en la tabla 3.8 los valores de las relaciones de reactividad difieren en función del método matemático aplicado. Por ello se efectúa la determinación de error experimental obtenido, a través de los correspondientes diagramas del límite del 95% de confianza, propuesto por Tidwell-Mortimer¹⁸ y Behnken, y que se muestran en la figura 3.19.

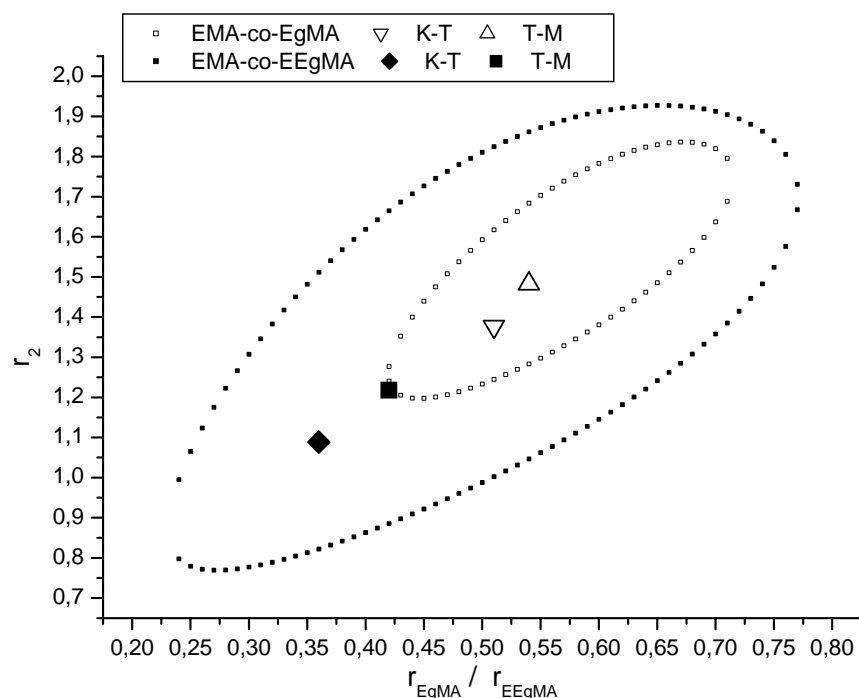


Figura 3.19: Diagrama del límite del 95% de confianza propuesto por Tidwell-Mortimer para los sistemas $p(EMA-co-EgMA)$ y $p(EMA-co-EEgMA)$.

Según este diagrama, se seleccionan los valores de las relaciones de reactividad obtenidos del método de Tidwell y Mortimer ($r_{1(EgMA)} = 1,48$; $r_{2(EMA)} = 0,55$; $r_{1(EEgMA)} = 1,22$; $r_{2(EMA)} = 0,42$) como los más adecuados, ya que éstos se centran en la elipse del 95% de confianza indicando con ello, una mayor fiabilidad del método.

Con estos valores de las relaciones de reactividad se deduce que independientemente de la naturaleza del extremo activo del macrorradical en crecimiento, éste muestra una mayor reactividad frente a la unidad EgMA y EEgMA en los sistemas $p(EMA-co-EgMA)$ y $p(EMA-co-EEgMA)$ respectivamente. El producto de las relaciones de reactividad es menor de 1 en ambos casos indicando que los copolímeros preparados con este sistema en las condiciones de reacción anteriormente señaladas presentan una distribución estadística de unidades con carácter predominantemente al azar.

Aplicando la ecuación de composición del copolímero (ecuación 3.5), se calcula el diagrama teórico de composición que se representa junto con los datos experimentales para ambos sistemas copoliméricos, observándose una buena correlación entre ambos. En la figura 3.20 se muestra este diagrama donde las líneas punteadas representan los diagramas teóricos calculados a partir de los valores de las relaciones de reactividad obtenidos por el método de Tidwell y Mortimer y los puntos corresponden a los valores obtenidos experimentalmente.

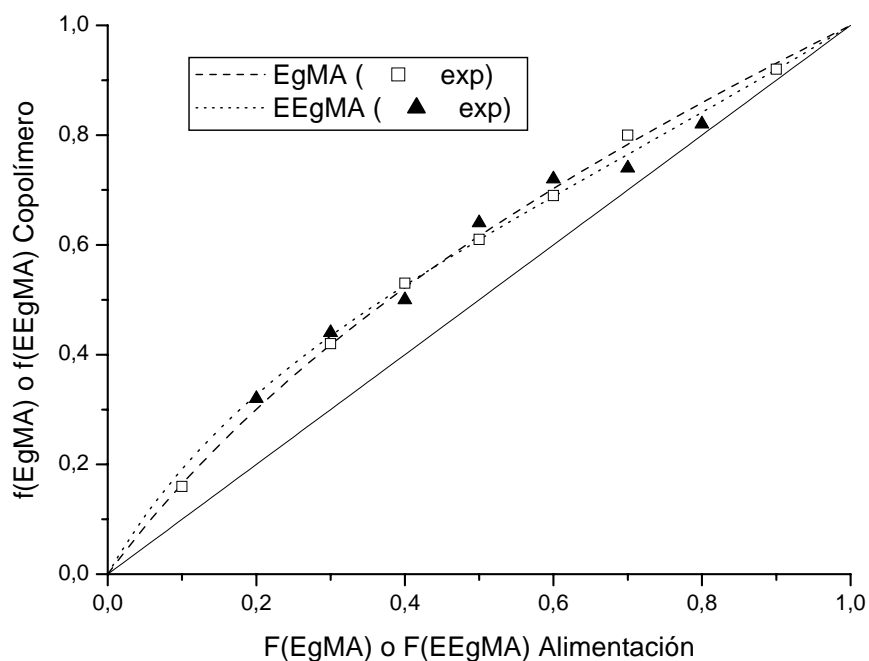


Figura 3.20 Diagrama de composición para los sistemas $p(EMA-co-EgMA)$ y $p(EMA-co-EEgMA)$.

3.3.2.3.- PROBABILIDADES CONDICIONALES.

A partir de las ecuaciones 3.15 y 3.16 y tomando los valores de las relaciones de reactividad determinadas según el método de Tidwell y Mortimer, se realiza el análisis estadístico de distribución de secuencias. La figura 3.21 muestra la distribución estadística de los monómeros en términos de triadas centradas en EgMA o EEgMA, en función de la fracción molar del correspondiente monómero en la alimentación.

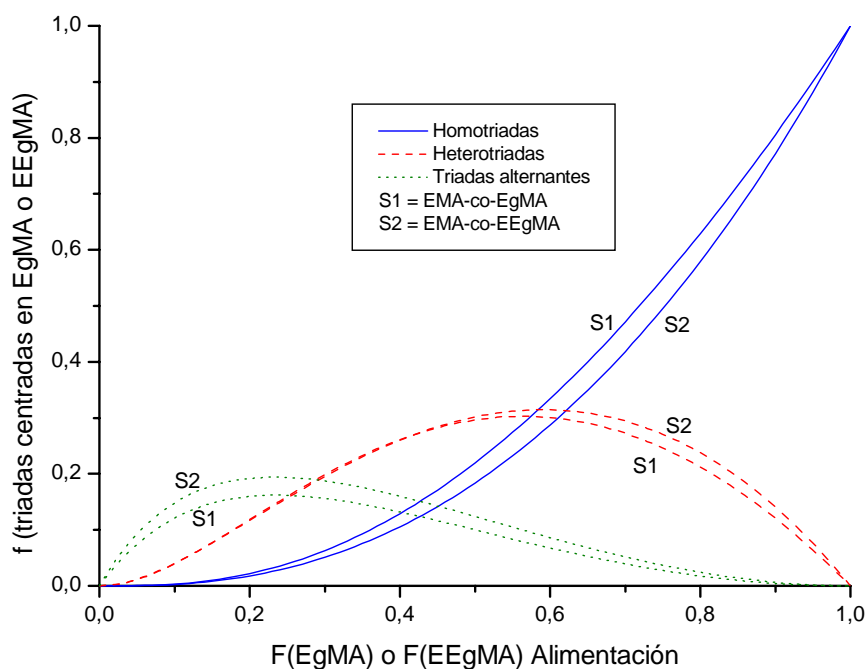


Figura 3.21 Fracciones molares de triadas teóricas centradas en el monómero EgMA o EEgMA en función del contenido de dichos monómeros en la alimentación, para los sistemas $p(\text{EMA-co-EgMA})$ y $p(\text{EMA-co-EEgMA})$.

3.3.3.- DISTRIBUCIÓN DE PESOS MOLECULARES.

Los copolímeros $p(\text{EMA-co-EgMA})$ y $p(\text{EMA-co-EEgMA})$ preparados en disolución a baja conversión (<10%) se disuelven en cloroformo y se determinan sus pesos moleculares promedio en número \bar{M}_n y promedio en peso \bar{M}_w mediante Cromatografía de Exclusión de Tamaños siguiendo el apartado 1.2.1.3. Todos los copolímeros muestran curvas típicas de distribución de pesos moleculares con una cola a tiempos cortos, o pesos moleculares altos. Tras hacer una deconvolución de estas curvas para aislar el pico gaussiano se calculan los valores de los pesos moleculares y las polidispersidades de los respectivos copolímeros, que se muestran en las tablas 3.9 y 3.10.

	PEMA	P(EMA-co-EgMA)					PEgMA
	100	80:20	60:40	50:50	40:60	20:80	100
\bar{M}_w (x 10 ⁻⁵ Da)	3,32	2,59	2,91	3,03	2,89	2,95	3,00
\bar{M}_n (x 10 ⁻⁵ Da)	1,58	0,81	0,83	0,82	0,76	0,82	0,81
IP	2,1	3,2	3,5	3,7	3,8	3,6	3,7

Tabla 3.9 Pesos moleculares promedio en peso (\bar{M}_w), en número (\bar{M}_n) y polidispersidades (IP) de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) a baja conversión (<10%).

	PEMA	P(EMA-co-EEgMA)					PEEgMA
	100	80:20	60:40	50:50	40:60	20:80	100
\bar{M}_w (x 10 ⁻⁵ Da)	3,32	5,89	9,3	7,43	19,61	28,4	15,4
\bar{M}_n (x 10 ⁻⁵ Da)	1,58	1,90	2,45	2,75	5,30	7,40	6,40
IP	2,1	3,1	3,8	2,7	3,7	3,7	3,7

Tabla 3.10 Pesos moleculares promedio en peso (\bar{M}_w), en número (\bar{M}_n) y polidispersidades (IP) de los copolímeros p(EMA-co-EEgMA) a baja conversión (<10%).

3.3.4.- PROPIEDADES TÉRMICAS DE HOMO Y COPOLÍMEROS.

Las propiedades térmicas de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) preparados en disolución a baja conversión (<10%) se estudian mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termogravimétrico (TGA).

La incorporación de los monómeros EgMA y EEgMA en polímeros metacrílicos conlleva cambios en la flexibilidad de las cadenas poliméricas. Este efecto se estudia determinando la temperatura de transición vítrea (T_g) de los homopolímeros PEMA, PEgMA y PEEgMA, así como la de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA), ambos con composición 50:50, preparados en disolución a baja conversión (<10%). La figura 3.22 muestra los termogramas registrados en las condiciones descritas en el apartado 1.2.1.3 mientras que los correspondientes valores de T_g obtenidos se muestran en la tabla 3.11. Los valores de T_g muestran como ésta aumenta al incorporarse el monómero EgMA, y disminuye cuando es el EEgMA el que se incorpora a los copolímeros con EMA.

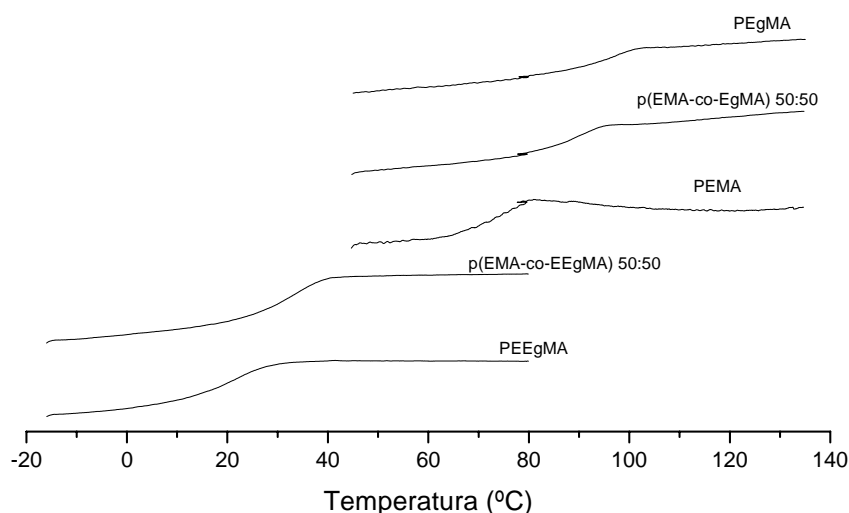


Figura 3.22 Termogramas de DSC de los homopolímeros PEMA, PEgMA, PEEgMA, y de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) con composición 50:50, preparados todos en disolución a baja conversión.

Por otra parte la estabilidad térmica de los copolímeros se evalúa mediante Análisis Termogravimétrico en atmósfera de nitrógeno en las condiciones descritas en la sección experimental. Las curvas de degradación junto con sus correspondientes derivadas se muestran en la figura 3.23 mostrando cuatro etapas de degradación (207, 274, 350 y 423 °C) para el PEMA y dos para todos los polímeros que contienen los monómeros derivados de eugenol.

La tabla 3.11 recoge los valores de T_g , la temperatura de velocidad de degradación máxima (T_{max}) y la temperatura a la que se produce el 50% de pérdida de peso ($T_{50\%}$).

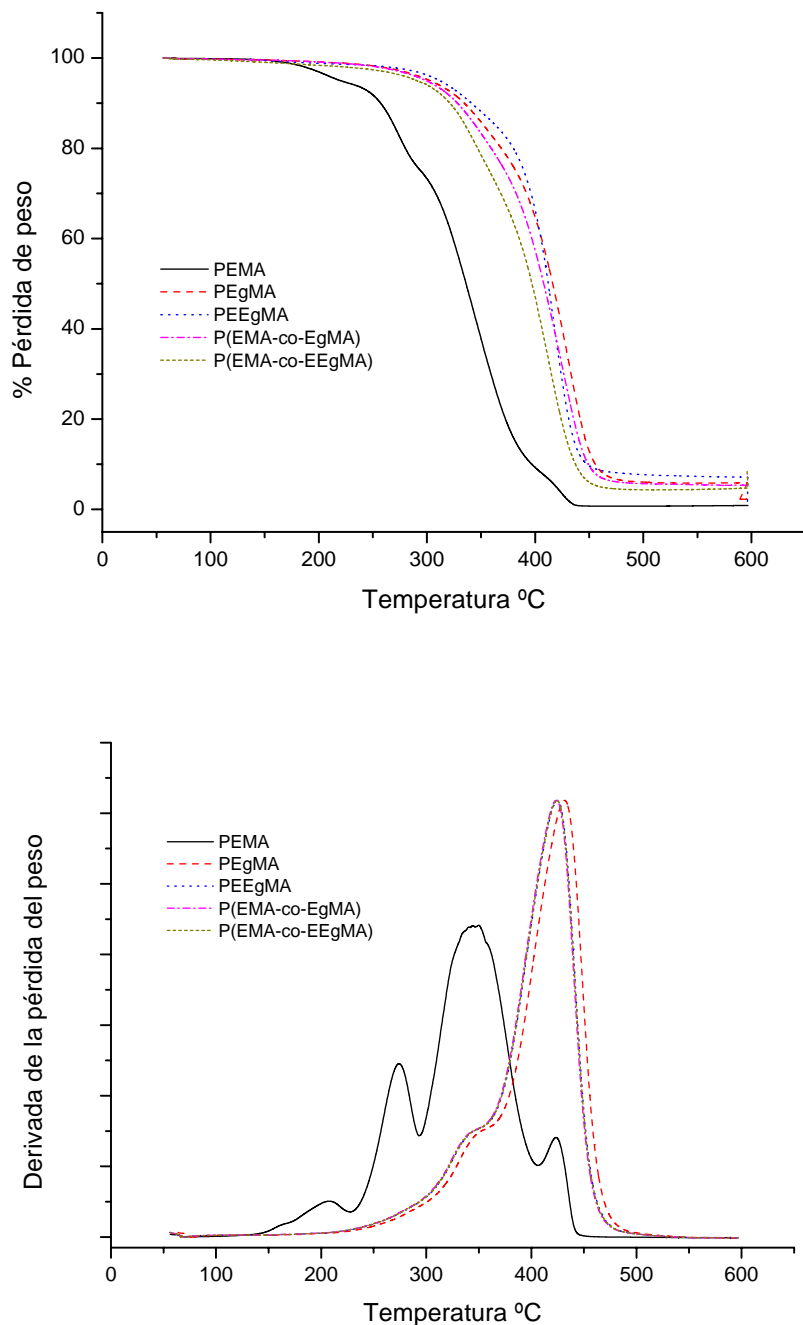


Figura 3.23 Curvas de descomposición (superior) y derivada de la pérdida de peso (inferior) de los homopolímeros PEMA, PEgMA, PEEgMA y de los copolímeros $p(EMA-co-EgMA)$ y $p(EMA-co-EEgMA)$ con composición 50:50, preparados todos en disolución a baja conversión (<10%).

Muestra	T _g (°C)	T _{max} (°C) ^a	T _{50%} (°C) ^b
PEgMA	95	432	416
p(EMA-co-EgMA)	90	425	397
p(EMA-co-EEgMA)	31	425	397
PEEgMA	20	425	397
PEMA	71	350	336

Tabla 3.11 Temperatura de transición vítrea (T_g) y datos de degradación de los homopolímeros PEMA, PEgMA y PEEgMA y de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA), ambos con composición 50:50, preparados todos en disolución a baja conversión. a: Temperatura de velocidad de degradación máxima. b: Temperatura del 50% de pérdida de peso.

3.4.- HOMOPOLÍMEROS Y COPOLÍMEROS EN MASA A ALTA CONVERSIÓN.

3.4.1.- OBTENCIÓN DE HOMO Y COPOLÍMEROS EN MASA DE LOS DERIVADOS DE EUGENOL.

La polimerización en masa difiere de la descrita en disolución en que se realiza en ausencia de disolvente. Este tipo de polimerización es un proceso muy sencillo que permite la obtención de polímeros con bajos grados de contaminación.³⁹ Sin embargo, este tipo de polimerización es difícil de controlar debido a las características del propio proceso de polimerización radical. Uno de los mayores inconvenientes que presenta este tipo de proceso es la difícil disipación del calor de reacción generado durante la polimerización, por lo que se requiere un control muy preciso de la temperatura de reacción. Otro factor a tener en cuenta es el incremento de tipo exponencial que experimenta la viscosidad del medio. Ambos efectos hacen que sea muy difícil de controlar la temperatura, de ahí que puedan producirse sobrecalentamientos locales que provocan degradaciones y decoloraciones del polímero además de un ensanchamiento de la distribución de pesos moleculares debido a transferencia de cadena al polímero.

Como se ha comentado anteriormente los monómeros derivados de eugenol presentan dos tipos de dobles enlaces susceptibles de polimerizar (figura 3.4). La polimerización vía radical de los monómeros EgMA y EEgMA da lugar a estructuras entrecruzadas a alta conversión, tanto en disolución como en masa. Estos polímeros se componen de cadenas hidrocarbonadas que presentan los restos eugenilo unidos covalentemente a éstas, aportándoles las características beneficiosas del eugenol además de proporcionar una estabilidad tridimensional adicional a la matriz polimérica.

En este apartado se describe la síntesis, caracterización y evaluación de la respuesta biológica de los homopolímeros PEMA, PEgMA y PEEgMA así como de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) obtenidos en masa a alta conversión. Adicionalmente, con el objetivo de preparar sistemas dotados de un mayor carácter hidrófilo, se preparan también copolímeros en masa de los monómeros EgMA y EEgMA con metacrilato de 2-hidroxietilo (HEMA) al 20 y al 50% de contenido en monómero derivado de eugenol.

Para la preparación de sendos homo y copolímeros se lleva a cabo las reacciones correspondientes siguiendo el procedimiento descrito en la parte experimental usando AIBN como iniciador radical. La polimerización se realiza controlando la temperatura en estufa en dos etapas. En la primera, el molde se acondiciona a una temperatura de 70 °C durante dos horas para después, en una segunda etapa, bajarla a 60 °C para mantenerse durante 46 horas más. Esta secuencia se lleva a cabo para evitar sobrecalentamientos locales y formación de burbujas en los inicios de la polimerización obteniendo con ello piezas más homogéneas.⁴⁰

Tras retirar las piezas de los moldes, éstas se lavan primero en hexano, después en agua y se secan a vacío hasta pesada constante, alcanzando rendimientos superiores al 95%. La figura 3.24 muestra una imagen de los discos de polímero obtenidos con los que posteriormente se van a realizar los ensayos biológicos de biocompatibilidad y acción bactericida.



Figura 3.24 Discos de copolímeros derivados de eugenol sintetizados en masa a alta conversión. Izquierda: $p(\text{EMA-co-EgMA})$ 50:50; derecha: $p(\text{EMA-co-EEgMA})$ 50:50.

3.4.2.- ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE LOS COPOLÍMEROS EN MASA.

Debido a la participación del grupo alilo, los polímeros y copolímeros derivados de eugenol, sintetizados a alta conversión, forman redes entrecruzadas que les hacen insolubles en disolventes orgánicos comunes. Este hecho limita en parte la posibilidad de aplicar algunas técnicas comunes de caracterización como puede ser la Resonancia Magnética Nuclear en estado líquido. Sin embargo, es posible utilizar otras técnicas espectroscópicas como la Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier mediante Reflectancia Total Atenuada (ATR-FTIR).

La figura 3.25 muestra los espectros de infrarrojo ATR-FTIR registrados para los homopolímeros derivados de eugenol PEgMA y PEEgMA, donde se aprecian las bandas correspondientes a los distintos grupos funcionales y cuya asignación se recoge en la tabla 3.12.

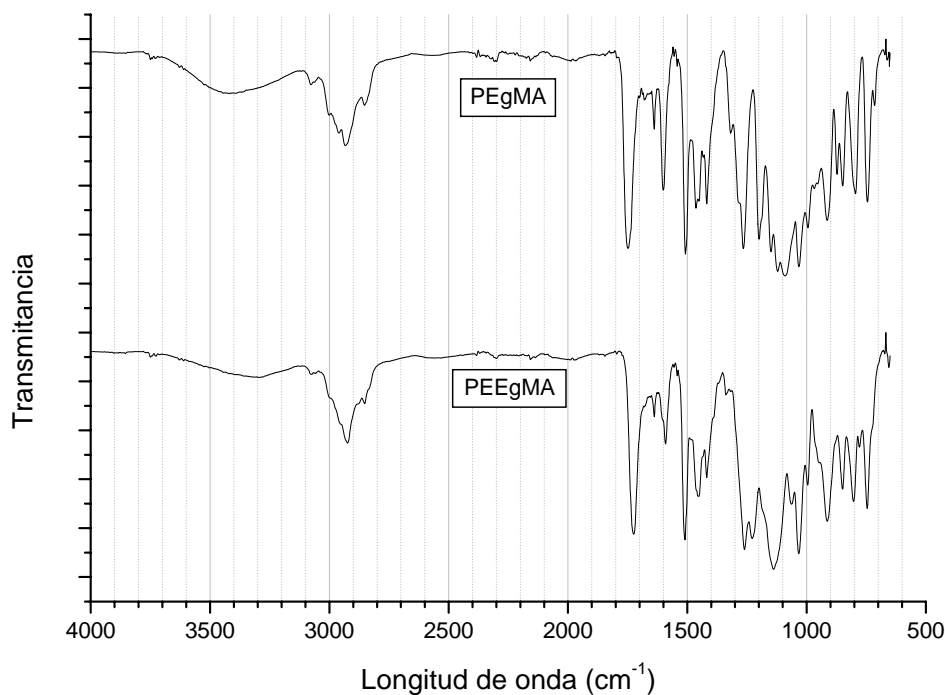


Figura 3.25 Espectros normalizados de ATR-FTIR de los homopolímeros derivados de eugenol, PEGMA y PEEGMA sintetizados en masa a alta conversión.

Bandas características de ATR-FTIR	
Longitud de onda (cm ⁻¹)	Asignación
1.725	C=O tensión carbonilo
1.550-1.650	C=C tensión grupo aril-éster
3.080 - 1.635 - 1.415 y 995	C=C tensión y deformaciones grupo alilo
1.360	-C-O- tensión fenol
1.503	C=C tensión del esqueleto aromático
700-760	-C-H tensión aromáticos

Tabla 3.12 Asignación de las bandas características de infrarrojo de los homopolímeros PEGMA y PEEGMA sintetizados en masa a alta conversión.

Así mismo, se analizan los copolímeros p(EMA-co-EgMA), p(EMA-co-EEgMA), p(HEMA-co-EgMA) y p(HEMA-co-EEgMA) obtenidos en las mismas condiciones que los homopolímeros. Las figuras 3.26, 3.27 y 3.28 muestran los

espectros de estos sistemas en los que se pueden observar las bandas más características de cada uno y que ya se han descrito anteriormente.

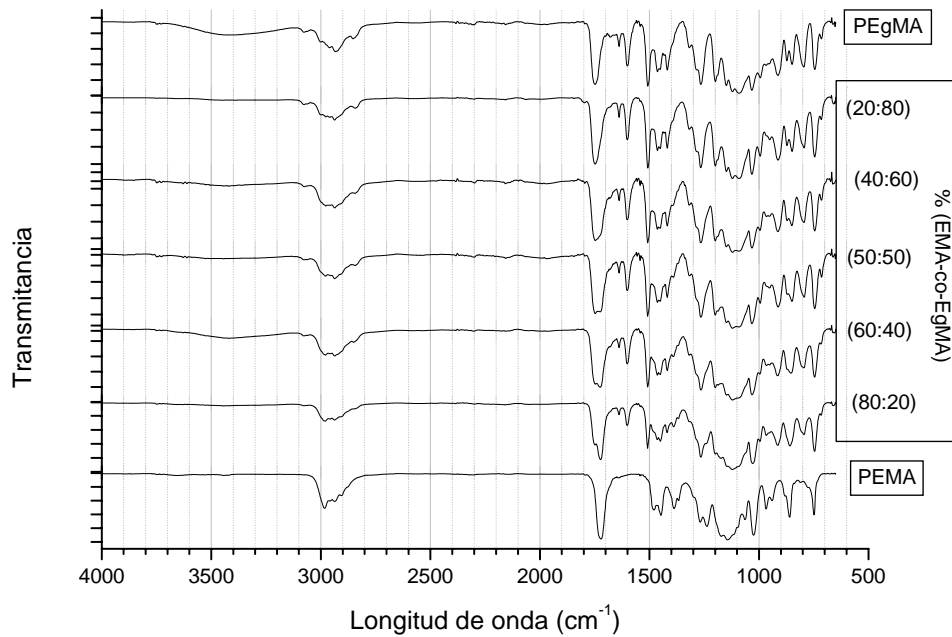


Figura 3.26 Espectros normalizados de ATR-FTIR de copolímeros derivados de EMA y de EgMA sintetizados en masa a alta conversión.

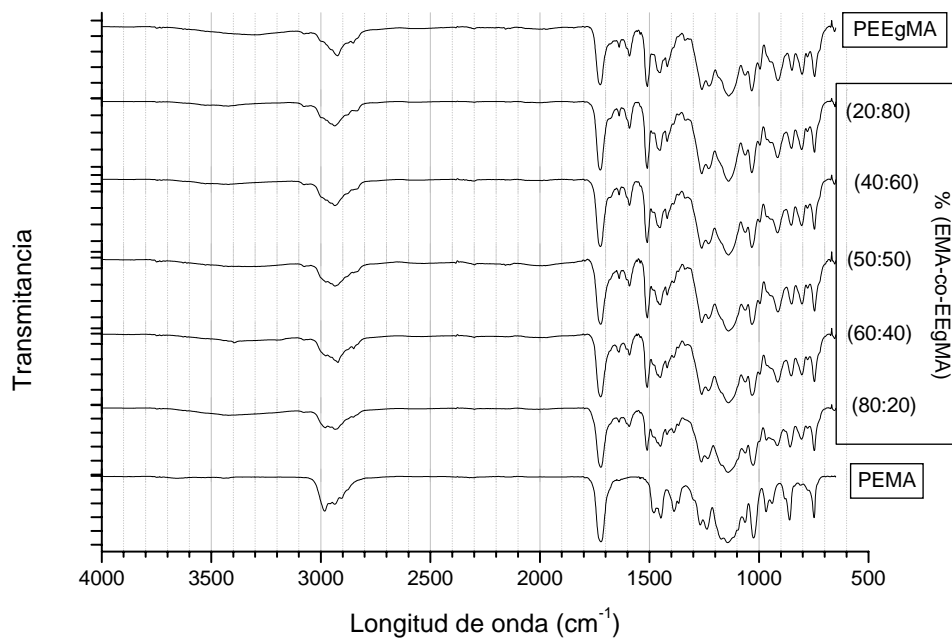


Figura 3.27 Espectros normalizados de ATR-FTIR de copolímeros derivados de EMA y de EEgMA sintetizados en masa a alta conversión.

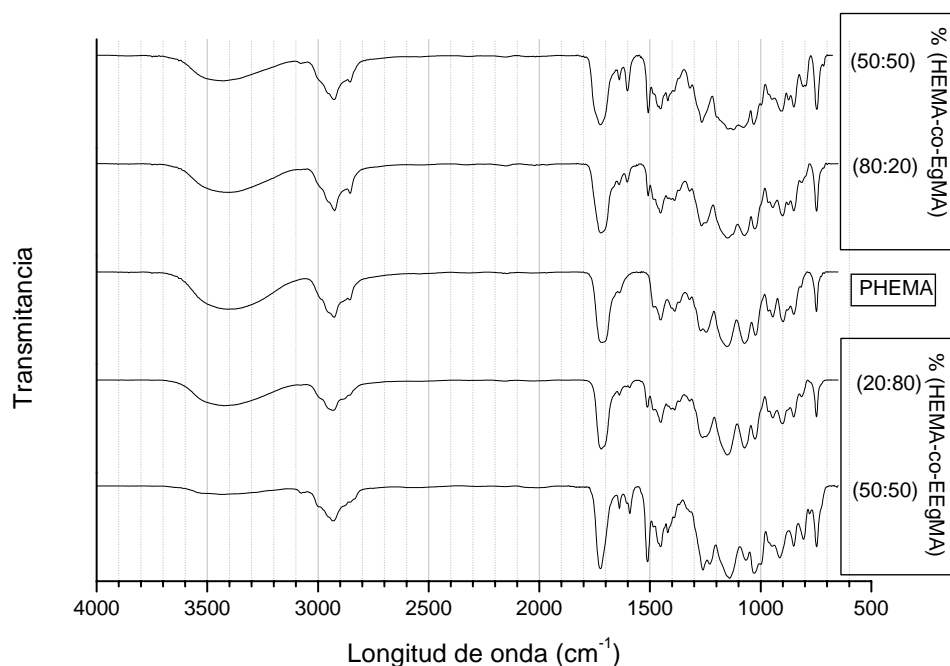


Figura 3.28 Espectros normalizados de ATR-FTIR de copolímeros derivados de HEMA y de los monómeros derivados de eugenol EgMA y EEgMA sintetizados en masa a alta conversión.

3.4.3.- PROPIEDADES TÉRMICAS DE HOMO Y COPOLÍMEROS.

Las propiedades térmicas de los copolímeros p(EMA-co-EgMA), p(EMA-co-EEgMA), p(HEMA-co-EgMA) y p(HEMA-co-EEgMA) preparados en masa a alta conversión se estudian mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termogravimétrico (TGA).

La incorporación de los monómeros EgMA y EEgMA en polímeros metacrílicos conlleva cambios en la flexibilidad de las cadenas poliméricas. Por otro lado la extensión de la reacción a altas conversiones produce una restricción en su movilidad debido al entrecruzamiento que se produce. La contribución de ambos efectos se estudia determinando la temperatura de transición vítrea de los homopolímeros PEMA, PEgMA y PEEgMA, así como la de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA). La figura 3.29 muestra los termogramas registrados en las condiciones escritas en el

apartado 1.2.1.3 donde se puede observar que la T_g aumenta gradualmente a medida que se incorpora el monómero EgMA, y disminuye a medida que es el EEgMA el que se incorpora a los copolímeros con EMA.

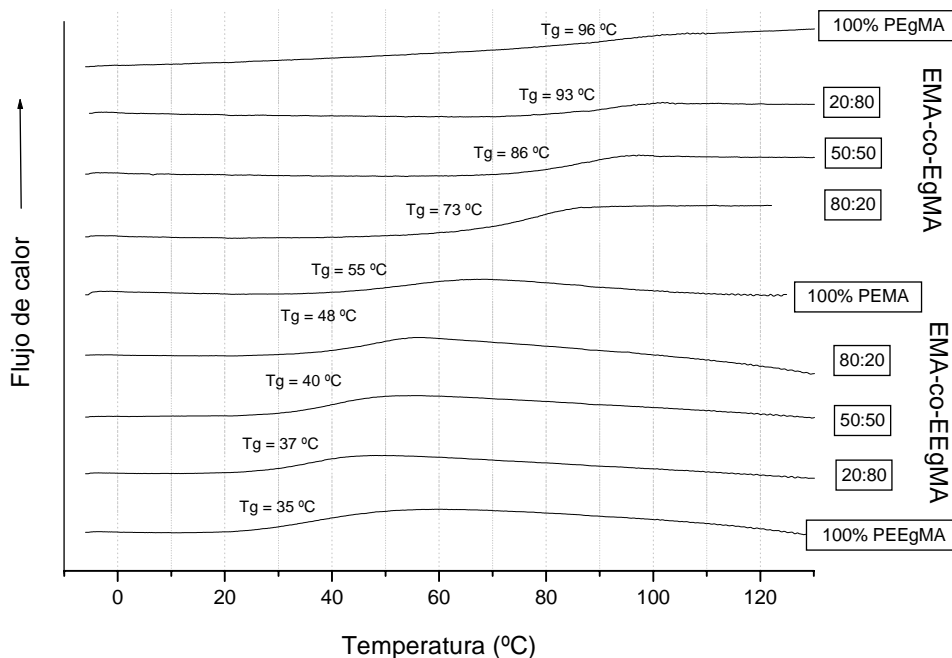


Figura 3.29 Termogramas de DSC de los homo y copolímeros $p(\text{EMA-co-EgMA})$ y $p(\text{EMA-co-EEgMA})$ preparados en masa a alta conversión.

Este mismo estudio se realiza con los copolímeros $p(\text{HEMA-co-EgMA})$ y $p(\text{HEMA-co-EEgMA})$, cuyos resultados se muestran en la figura 3.30 donde se observa una tendencia análoga a los copolímeros de EMA en los que la T_g aumenta con el contenido en EgMA y disminuye al aumentar el de EEgMA.

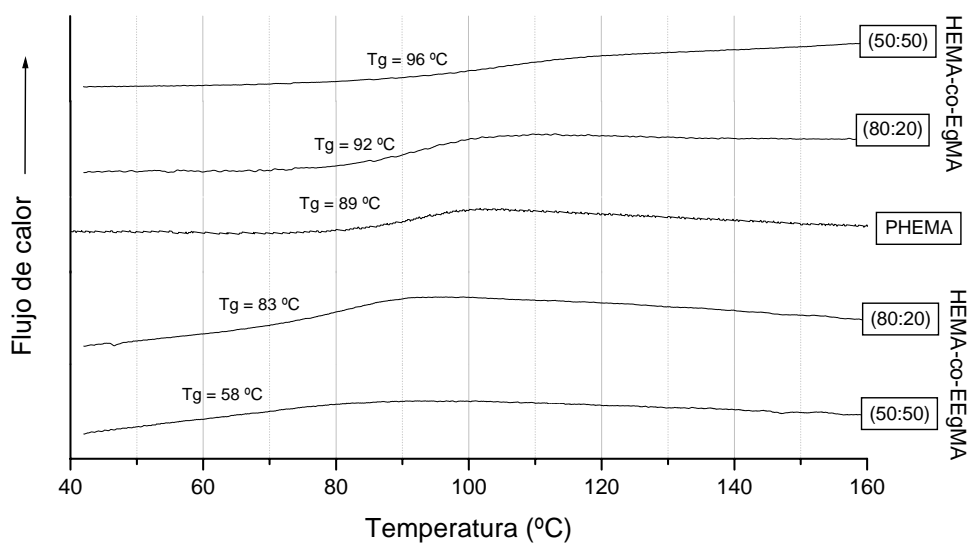


Figura 3.30 Termogramas de DSC del homopolímero PHEMA y copolímeros *p*(HEMA-co-EgMA) y *p*(HEMA-co-EEgMA) preparados en masa a alta conversión.

Por otra parte la estabilidad térmica de los copolímeros se evalúa mediante Análisis Termogravimétrico en atmósfera de nitrógeno en las condiciones descritas en la sección experimental. Las curvas de degradación junto con sus correspondientes derivadas se muestran en las figuras 3.31 y 3.32. La tablas 3.13 y 3.14 recogen por su parte, la temperatura de velocidad de degradación máxima (T_{\max}) y la temperatura a la que se produce el 50% de pérdida de peso ($T_{50\%}$) para los copolímeros derivados de EMA y HEMA.

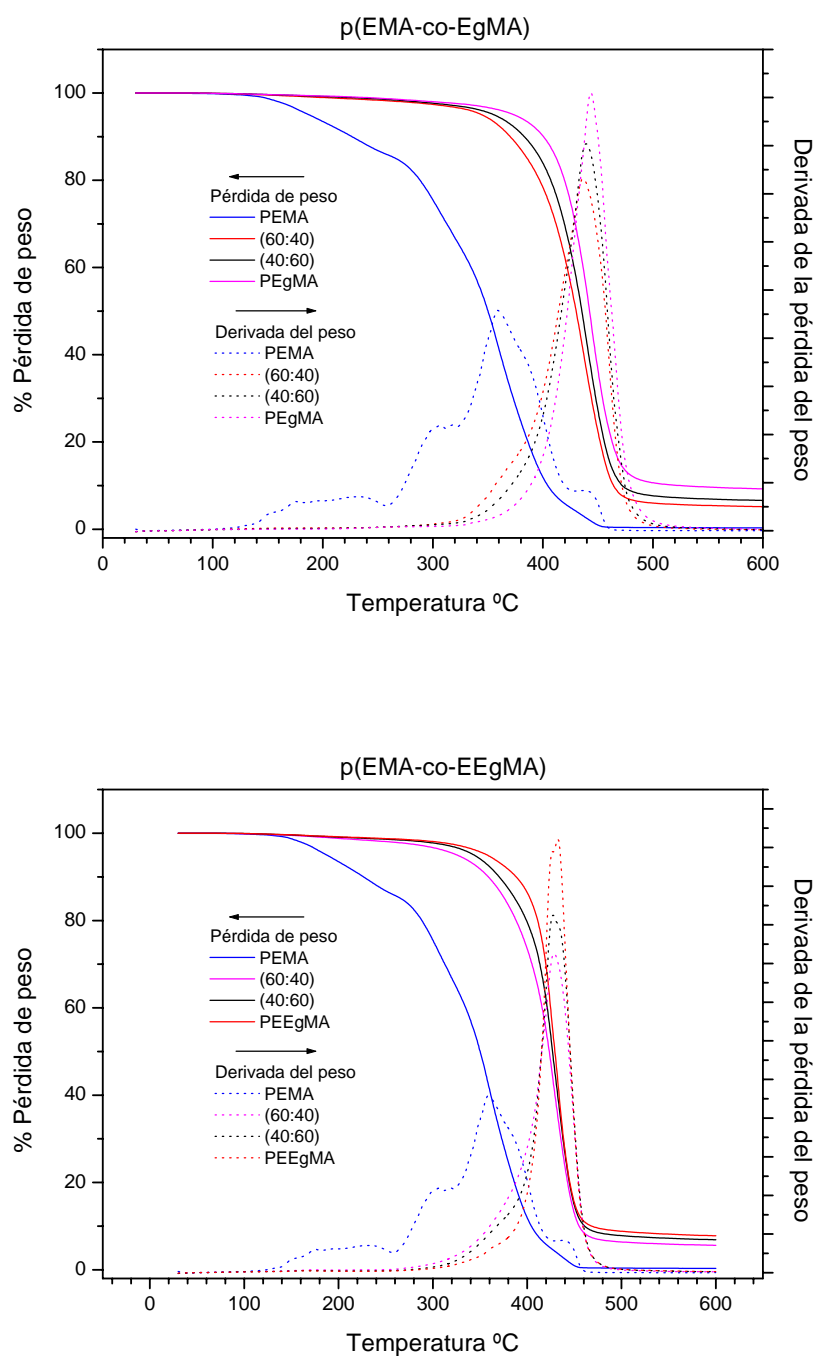


Figura 3.31 Curvas de descomposición y derivada de la pérdida de peso de los sistemas $p(\text{EMA-co-EgMA})$ (superior) y $p(\text{EMA-co-EEgMA})$ (inferior) preparados en masa a alta conversión.

Las curvas de degradación muestran cuatro etapas de degradación para el PEMA y una sola para todos los polímeros que contienen los monómeros derivados de eugenol.

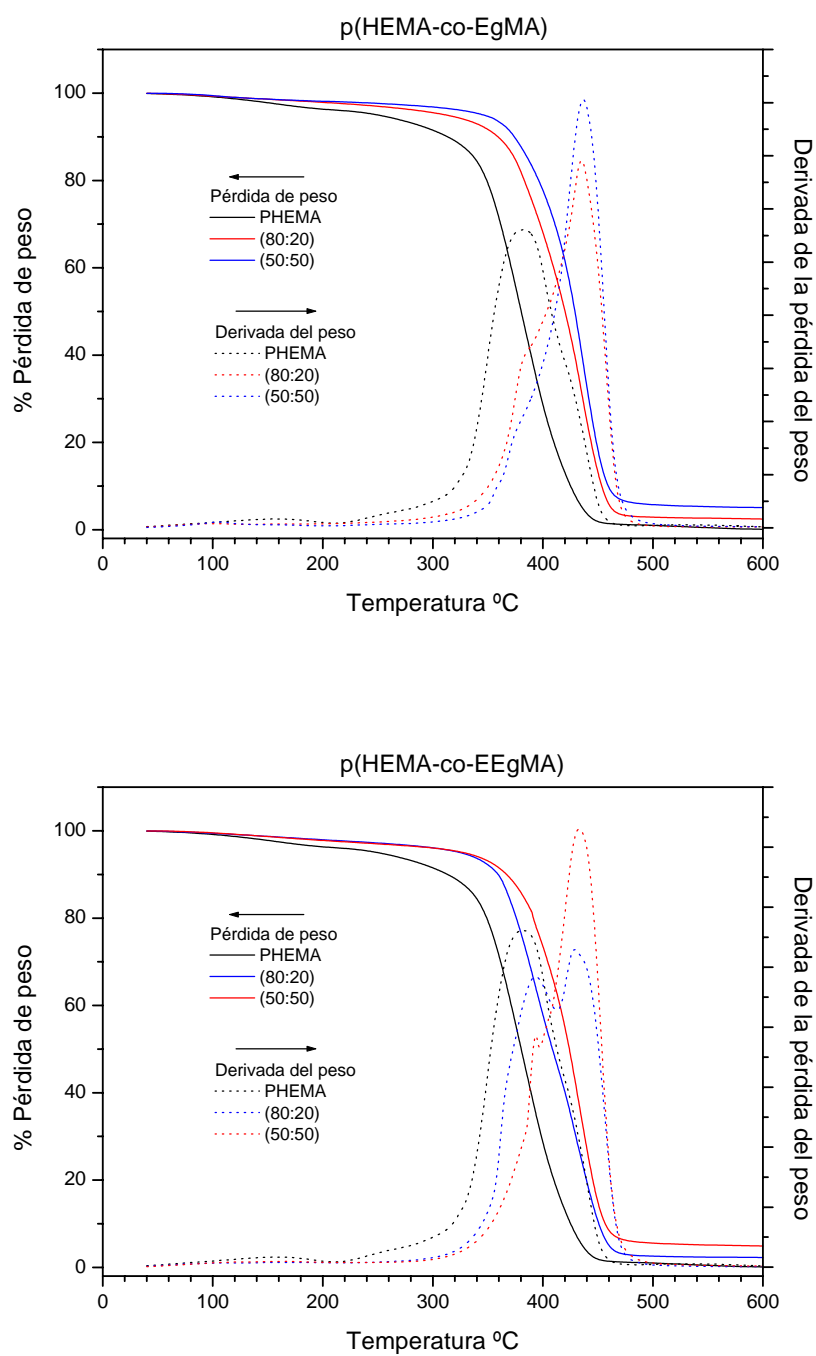


Figura 3.32 Curvas de descomposición y derivada de la pérdida de peso de los sistemas $p(\text{HEMA-co-EgMA})$ (superior) y $p(\text{HEMA-co-EEgMA})$ (inferior) así como de los respectivos homopolímeros, preparados en masa a alta conversión.

Muestra	Composición	T _{max} (°C) ^a	T _{50%} (°C) ^b
PEgMA	100%	444	442
p(EMA-co-EgMA)	40:60	439	435
	60:40	437	429
PEMA	100%	359	350
p(EMA-co-EEgMA)	60:40	427	423
	40:60	428	427
PEEgMA	100%	431	429

Tabla 3.13 Datos de degradación de los homopolímeros PEMA, PEgMA y PEEgMA y de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA), preparados en masa a alta conversión. a: Temperatura de velocidad de degradación máxima. b: Temperatura del 50% de pérdida de peso.

Existen dos etapas de degradación para el PHEMA que se mantienen, aunque en menor extensión, para todos los copolímeros que contienen HEMA y uno de los monómeros derivados de eugenol.

Tanto para los sistemas derivados de EMA como los de HEMA se aprecia un aumento de la estabilidad térmica en función del contenido de monómeros derivados de eugenol, mostrando una mayor resistencia a la degradabilidad para las composiciones con mayor contenido tanto en EgMA como en EEgMA.

Muestra	Composición	T _{max} (°C) ^a	T _{50%} (°C) ^b
p(HEMA-co-EgMA)	50:50	437	430
	80:20	434	419
PHEMA	100%	382	380
p(HEMA-co-EEgMA)	80:20	429	408
	50:50	432	424

Tabla 3.14 Datos de degradación del homopolímero PHEMA y de los copolímeros p(HEMA-co-EgMA) y p(HEMA-co-EEgMA), preparados en masa a alta conversión. a: Temperatura de velocidad de degradación máxima. b: Temperatura del 50% de pérdida de peso.

3.4.4.- DETERMINACIÓN DE LA DENSIDAD.

La densidad de los homopolímeros PEMA, PEgMA y PEEgMA se determina de acuerdo al procedimiento descrito en la parte experimental. De este modo se obtienen unas densidades para el PEMA, PEgMA y el PEEgMA de 1,186; 1,181 y 1,093 g/cc respectivamente.

3.4.5.- DETERMINACIÓN DE LA FRACCIÓN SOLUBLE.

La fracción soluble (*sol*) es la parte de las cadenas de polímero que no intervienen directamente en la red entrecruzada.⁴¹ Una fracción *sol* muy pequeña significa que la mayor parte de las cadenas del polímero formado, se han incorporado de manera efectiva a la estructura de la red.

Muestra	Composición	F <i>sol</i> (%) [D.S.]
PEMA	100	100
p(EMA-co-EgMA)	60:40	21 [3]
	40:60	3 [1]
PEgMA	100	1 [0,8]
p(EMA-co-EEgMA)	60:40	13 [4]
	40:60	2 [0,5]
PEEgMA	100	<1 [0,4]
PHEMA	100	3 [0,6]
p(HEMA-co-EgMA)	80:20	1 [0,8]
	50:50	<1 [0,3]
p(HEMA-co-EEgMA)	80:20	2 [0,4]
	50:50	1 [0,2]

Tabla 3.15 Fracción soluble determinada mediante extracción Socklhet con tolueno de los polímeros derivados de eugenol sintetizados en masa a alta conversión. [D.S.] = desviación estándar ($n = 3$).

La tabla 3.15 recoge la fracción *sol* de los polímeros estudiados en función de su contenido en monómero derivado de eugenol, donde se observa para cada sistema copolimérico, una disminución de la fracción *sol*, al aumentar el contenido en monómero derivado de eugenol.

3.4.6.- CARACTERIZACIÓN REOLÓGICA.

La caracterización reológica de los polímeros derivados de eugenol se realiza con los sistemas p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) siguiendo el procedimiento descrito en la parte experimental. Para la determinación de los parámetros reológicos más característicos del material G' , G'' , η' y $\tan\delta$ es necesario previamente localizar la zona de viscoelasticidad lineal. Para ello se toman los discos de cada muestra hinchados en tert-butanol hasta el equilibrio y se realiza un barrido de torsión a una frecuencia de 1 Hz y 37 °C. El intervalo de viscoelasticidad lineal se considera cuando: i) el desplazamiento, equivalente a la amplitud de deformación, aumenta de forma lineal con el par de torsión y ii) el módulo elástico y el módulo de pérdidas son independientes del par de torsión. La figura 3.33 muestra estos barridos realizados sobre los sistemas p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) donde se observa cómo a medida que aumenta el par de torsión, el valor del módulo elástico G' (más sensible que G'') se estabiliza hasta hacerse independiente de éste, para valores superiores a los 100 Pa. En todos los experimentos realizados posteriormente se elige un par de torsión de 350 Pa, valor que se encuentra dentro de esta zona.

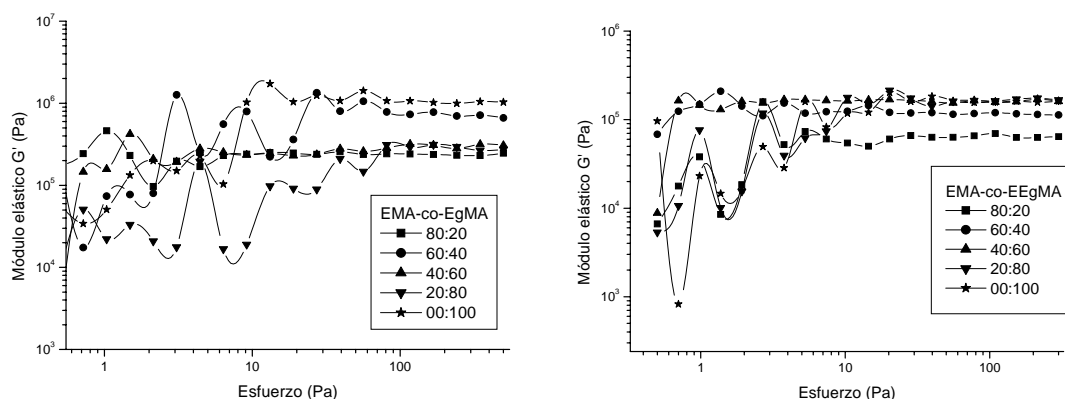


Figura 3.33 Barrido de amplitudes a la frecuencia de 1 Hz para determinar la zona de viscoelasticidad lineal de los polímeros derivados de eugenol hinchados en tert-butanol a 37 °C.

Conocido el intervalo en el que el material presenta viscoelasticidad lineal, éste se somete a un barrido de frecuencias con el fin de evaluar sus propiedades viscoelásticas. En las figuras 3.34 y 3.35 se muestran la variación del módulo elástico o de almacenamiento G' , con la frecuencia angular de cizalla para cada uno de los copolímeros estudiados.

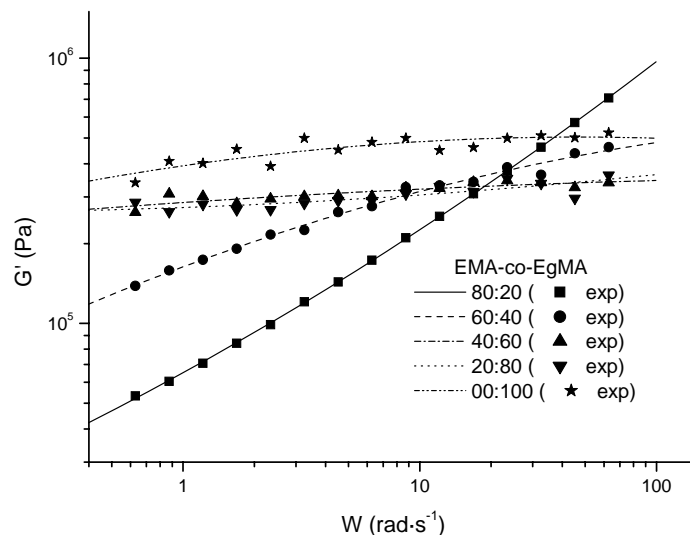


Figura 3.34 Variación del módulo de almacenamiento G' con la frecuencia de oscilación para los copolímeros $p(EMA-co-EgMA)$.

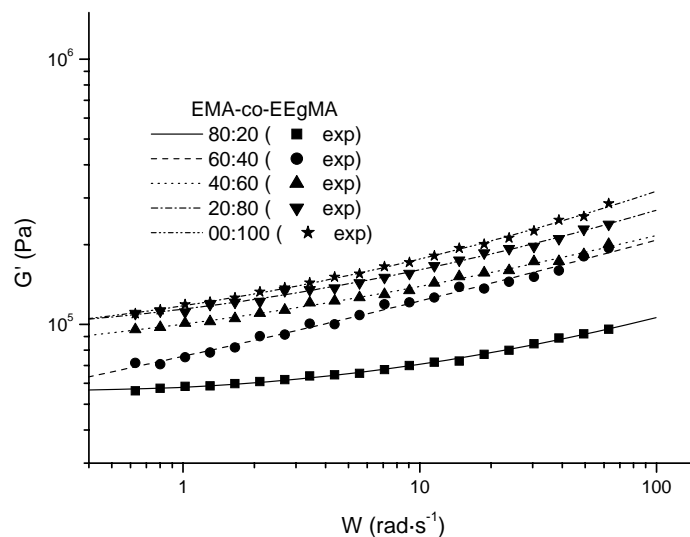


Figura 3.35 Variación del módulo de almacenamiento G' con la frecuencia de oscilación para los copolímeros $p(EMA-co-EEgMA)$.

Los valores obtenidos de los módulos de almacenamiento para los polímeros derivados de EgMA presentan valores un orden de magnitud superiores a los obtenidos para el sistema derivado de EEgMA. Este resultado indica un mayor número de uniones entre cadenas o puntos de entrecruzamiento.

Mediante estos barridos de frecuencia es posible también determinar el balance entre las componentes elástica y viscosa de los copolímeros derivados de eugenol. Las figuras 3.36 y 3.37 muestran la variación de la $\tan\delta$ en función de la frecuencia de estos sistemas. Estos resultados indican un comportamiento pseudo-sólido con valores de G' relativamente independientes de la frecuencia y muy superiores a los de G'' para los copolímeros con contenido mayor al 40% de EgMA. Para los copolímeros de EEgMA $\tan\delta$ es en todos los casos inferior a la unidad mostrando los valores de G' una ligera dependencia con la frecuencia, indicando un comportamiento típico viscoelástico de sistemas ramificados con cierto grado de entrecruzamiento.^{42,43}

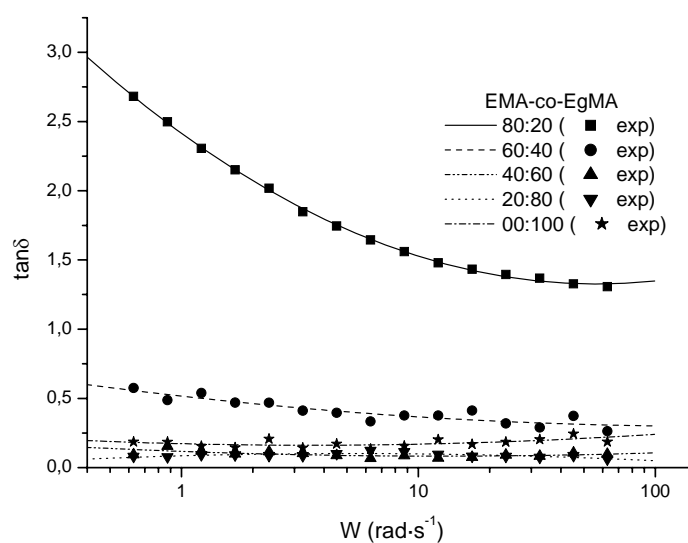


Figura 3.36 Variación de la $\tan\delta$ con la frecuencia de oscilación para el sistema $p(\text{EMA-co-EgMA})$.

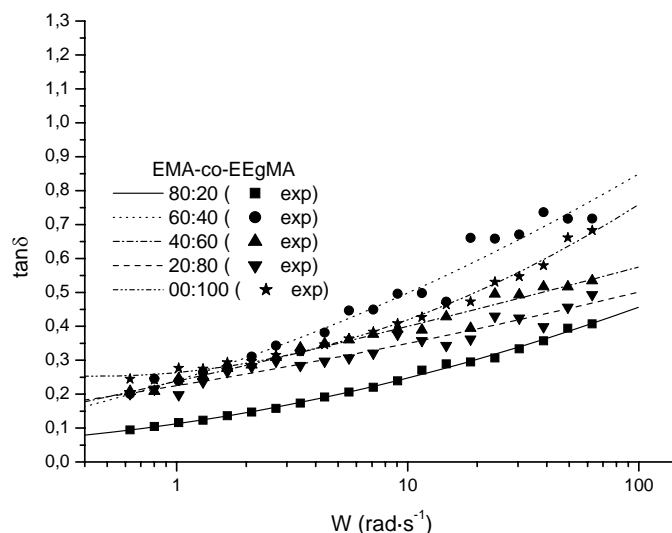


Figura 3.37 Variación de la $\tan\delta$ con la frecuencia de oscilación para el sistema $p(\text{EMA-co-EEgMA})$.

Estos resultados confirman de nuevo la ligera implicación del grupo alílico en el proceso de polimerización, proporcionando estructuras entrecruzadas que presentan zonas de mayor grado de entrecruzamiento responsables de la respuesta elástica del material, y zonas de menor grado en las que será la componente viscosa la que determine su respuesta a la deformación aplicada. Como es de suponer, la mayor presencia de monómero derivado de eugenol proporciona estructuras con mayor probabilidad de formar puntos de entrecruzamiento y por tanto la dependencia de G' con la frecuencia es menor (ver valores de la pendiente en la tabla 3.16). Además, para los materiales que presentan un valor de G' muy superior a G'' , en lugar del valor del módulo complejo, G^* , se puede emplear el valor del módulo elástico G' , para el cálculo del peso molecular entre nudos (M_c),⁴⁴ aplicando la Teoría General del Caucho (ecuación 3.28). Los valores obtenidos de M_c para los copolímeros $p(\text{EMA-co-EgMA})$ 40:60 y 20:80 así como al polímero PEgMA se muestran en la tabla 3.16 junto con el grado de hinchamiento alcanzado en el equilibrio en tert-butanol para todos los materiales ensayados.

Sistema	Composición	%hinchamiento en tert-butanol	n *	M _c (Da)
p(EMA-co-EgMA)	80:20	22,8 ± 0,8	0,52	N.A.
	60:40	3,6 ± 0,6	0,31	N.A.
	40:60	2,3 ± 0,4	0,05	1,0·10 ⁴
	20:80	1,9 ± 0,5	0,02	1,1·10 ⁴
PEgMA	100%	0,8 ± 0,8	0,09	0,6·10 ⁴
p(EMA-co-EEgMA)	80:20	26,7 ± 0,9	0,11	N.A.
	60:40	14,5 ± 0,9	0,21	N.A.
	40:60	7,8 ± 0,8	0,13	N.A.
	20:80	7,2 ± 0,9	0,14	N.A.
PEEgMA	100%	5,0 ± 0,2	0,17	N.A.

Tabla 3.16 Valores del grado de hinchamiento alcanzado en el equilibrio, pendiente de la variación del módulo G' con la frecuencia* [$\log(G') = a + n \log(w)$] y peso molecular entrenudos (M_c) calculado de acuerdo con la Teoría de la Elasticidad del Caucho a un 1 Hz y 37 °C. (N.A. = No aplicable).

3.4.7.- COMPORTAMIENTO *IN VITRO* DE LOS COPOLÍMEROS EN MASA.

Este apartado aborda el estudio de tres aspectos fundamentales relacionados con la interacción o la influencia del agua sobre los sistemas poliméricos descritos: la afinidad por el agua a partir de estudios de hinchamiento, la ruptura hidrolítica del enlace que une el resto eugenilo a la cadena polimérica y por último el grado de humectabilidad de los diferentes polímeros sintetizados.

En general, cuando un polímero no se disuelve en un medio existe una difusión del disolvente a la masa del polímero y de la matriz polimérica al medio, produciéndose el hinchamiento. El equilibrio se alcanza cuando se igualan las velocidades de difusión del disolvente al polímero y la del polímero al medio. Este proceso está íntimamente relacionado con el carácter hidrófilo de un polímero, de manera que su estudio permite valorar su naturaleza hidrófila/hidrófoba. Obviamente, el carácter hidrolítico y el hinchamiento influyen a su vez en la velocidad de degradación hidrolítica y de

liberación de eugenol, puesto que cuanto mayor es el carácter hidrófilo, mayor es la cantidad de agua que accede a la matriz y por tanto la liberación será más rápida.

El grado de hidratación de los distintos polímeros se expresa en términos de agua absorbida de acuerdo con la ecuación 1.3.

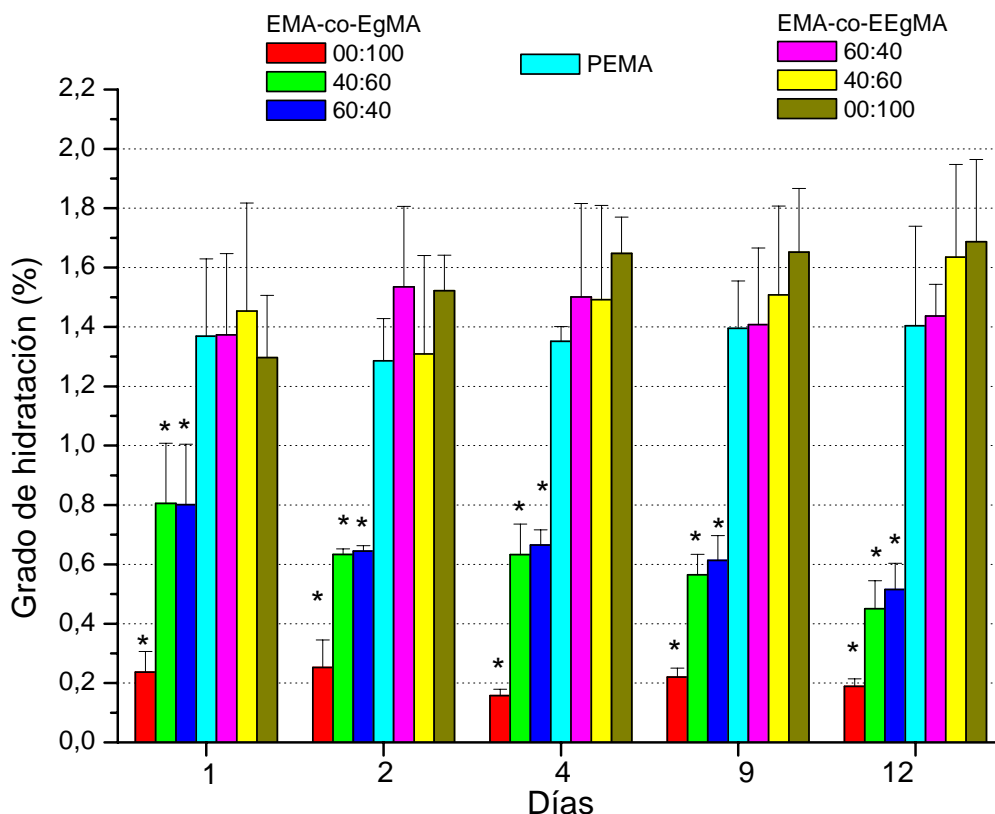


Figura 3.38 Grado de hidratación frente al tiempo para los distintos copolímeros $p(EMA-co-EgMA)$ y $p(EMA-co-EEgMA)$ en PBS a 37 °C. * = Diferencias significativas con respecto al PEMA ($p < 0,5$).

La figura 3.38 muestra el grado de hidratación promedio de los distintos copolímeros en función del tiempo así como la desviación estándar de los resultados. Se puede observar cómo existe una correlación entre la cantidad de EgMA presente en el copolímero y el grado de hidratación, siendo menor éste para los sistemas con mayor cantidad de EgMA. Para el caso del EEgMA, aunque las diferencias no son significativas, la tendencia es la contraria, mostrando una mayor cantidad de agua

absorbida para los sistemas con mayor contenido en EEgMA. Estos resultados ponen de manifiesto el mayor carácter hidrófobo de los copolímeros según presentan mayor contenido en EgMA mientras que la hidrofobicidad disminuye con el contenido en EEgMA. En cualquier caso, todos los valores de hinchamiento determinados son muy bajos, (0,2 – 1,6 %) mostrando un carácter netamente hidrófobo de los copolímeros sintetizados a partir de ambos monómeros.

Este carácter hidrófobo influye directamente en la velocidad de hidrólisis de los materiales poliméricos. El bajo grado de hidratación de la matriz polimérica dificulta el acceso de las moléculas de agua en su seno para producir la hidrólisis del material. Este hecho se pone de manifiesto en los resultados del estudio de liberación de eugenol por parte de los polímeros, tardando más de tres meses en detectarse niveles de eugenol en el medio en concentraciones de 0,01 mg/ml, indicando una gran estabilidad del enlace éster entre la cadena polimérica y el resto eugenilo en el tampón de suero simulado (PBS). No obstante es de esperar su progresiva hidrólisis con el tiempo, liberando pequeñas cantidades de eugenol al medio.

En último lugar se determinan las energías superficiales y la humectabilidad a través de medidas de ángulo de contacto. La naturaleza de la superficie de un biomaterial, en términos de humectabilidad ha demostrado ser crítica de cara a su evaluación como posible biomaterial,^{45,46} siendo la medida del ángulo de contacto el método más comúnmente empleado para determinar esta propiedad.

Uno de los métodos más utilizados para el cálculo de la energía superficial de un material fue descrito por Owens y Fowkes^{47,48} que se resume mediante las siguientes ecuaciones:

$$\gamma_s = \gamma_s^d + \gamma_s^p \quad \text{Ec 3.30}$$

$$(1 + \cos \theta) \gamma_l / 2 = (\gamma_s^d \gamma_l^d)^{1/2} + (\gamma_s^p \gamma_l^p)^{1/2} \quad \text{Ec 3.31}$$

donde θ es el valor del ángulo de contacto, γ_s y γ_l son la energía superficial del sólido y del líquido y γ_s^d , γ_s^p , γ_l^d y γ_l^p son las componentes dispersiva y polar de la energía superficial del sólido y del líquido respectivamente. Las tablas 3.17 y 3.18 muestran los

valores de los ángulos de contacto, la energía superficial y sus componentes polar y dispersiva obtenidas según el método de Owens para los distintos polímeros derivados de eugenol.

Sistema	Composición	θ (H ₂ O) [D.S.]	θ (CH ₂ I ₂) [D.S.]	γ_s (mN/m) [corr.]	γ_s^d (mN/m)	γ_s^p (mN/m)
PEMA	100:00	79,8 [0,6]	42,2 [0,5]	41,1 [99,6]	37,0	4,1
p(EMA-co-EgMA)	60:40	79,7 [1,9]	46,0 [0,5]	40,7 [98,6]	36,5	4,2
	40:60	85,3 [1,1]	43,2 [0,5]	40,2 [99,0]	38,0	2,3
PEgMA	100	86,8 [0,9]	48,2 [2,1]	35,2 [99,2]	35,2	2,2
p(EMA-co-EEgMA)	60:40	72,1 [1,5]	42,8 [1,3]	44,9 [99,7]	38,0	6,9
	40:60	72,3 [1,5]	35,7 [3,6]	46,8 [99,4]	40,6	6,2
PEEgMA	100	75,8 [2,7]	35,9 [0,7]	46,1 [98,6]	41,6	4,5

Tabla 3.17 Ángulos de contacto en agua (θ H₂O) y diiodometano (θ CH₂I₂) así como la energía superficial del sólido (γ_s) y sus componentes polar (γ_s^p) y dispersiva (γ_s^d), de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA). [D.S.] = Desviación estándar ($n = 20$).

Sistema	Composición	θ (H ₂ O) [D.S.]	θ (CH ₂ I ₂) [D.S.]	γ_s (mN/m) [corr.]	γ_s^d (mN/m)	γ_s^p (mN/m)
PHEMA	100:00	46,8 [1,1]	33,8 [3,4]	61,2 [99,6]	42,5	18,7
p(HEMA-co-EgMA)	80:20	83,4 [1,3]	38,1 [1,4]	42,8 [98,8]	40,5	2,3
	50:50	85,8 [0,9]	42,5 [1,6]	40,1 [99,5]	38,0	2,1
p(HEMA-co-EEgMA)	80:20	76,4 [1,0]	36,6 [0,2]	46,0 [99,5]	41,3	4,7
	50:50	75,9 [0,8]	39,3 [2,9]	44,1 [99,7]	39,0	5,2

Tabla 3.18 Ángulos de contacto en agua (θ_{H_2O}) y diiodometano ($\theta_{CH_2I_2}$) así como energía superficial del sólido (γ_s) y sus componentes polar (γ_s^p) y dispersiva (γ_s^d), de los copolímeros p(HEMA-co-EgMA) y p(HEMA-co-EEgMA). [D.S.] = Desviación estándar ($n = 20$).

Se puede observar cómo para los copolímeros sintetizados a partir del monómero EMA, la energía superficial disminuye con la adición de la unidad EgMA como consecuencia de la disminución de su componente polar, de acuerdo con el aumento de la hidrofobicidad de ésta. Por otra parte, en el caso de EEgMA ocurre al contrario, mostrando un menor carácter hidrófobo con respecto al EMA. Este resultado es consistente con lo observado en el estudio de hidratación donde la capacidad de absorción de agua decrece en el orden PEEgMA > p(EMA-co-EEgMA) > PEMA > p(EMA-co-EgMA) > PEgMA.

En el caso de los copolímeros sintetizados a partir del monómero HEMA, la introducción de los monómeros EgMA y EEgMA, incluso en pequeñas concentraciones, conlleva un cambio drástico en el valor de la energía superficial pasando de 61 mN/m para el PHEMA (polímero hidrófilo), a valores menores de 50 mN/m, aumentando de esta forma significativamente el carácter hidrófobo de los copolímeros. Comparando los copolímeros portadores de monómeros derivados de

eugenol entre sí, se aprecia de nuevo un mayor carácter hidrófobo de los derivados de EgMA.

3.4.8.- EVALUACIÓN DE LA BIOCOMPATIBILIDAD *IN VITRO* DE SISTEMAS POLIMÉRICOS.

La biocompatibilidad de los homopolímeros PEMA, PEgMA y PEEgMA, así como la de sus copolímeros, se evalúa mediante tres tipos de ensayos diferentes: el ensayo MTT para determinar la toxicidad de los lixiviados del material; el ensayo Alamar Blue para determinar los niveles de adhesión al material y proliferación sobre el mismo y por último, el ensayo LDH que cuantifica la muerte celular producida por contacto. Estos estudios además se completan con la observación mediante microscopio óptico y de barrido ambiental para verificar la morfología celular tras los distintos ensayos de adhesión y proliferación. La totalidad de estos ensayos se lleva a cabo empleando cultivos de fibroblastos humanos.

3.4.8.1.- LIBERACIÓN DE COMPONENTES, ENSAYO MTT.

El ensayo MTT, al igual que en el caso de los monómeros (apartado 2.5) se aplica para analizar la posible citotoxicidad de los extractos de los homopolímeros PEMA, PEgMA y PEEgMA y de los respectivos copolímeros, tomando muestras de los distintos eluyentes a 1, 2 y 7 días.

La figura 3.39 muestra la viabilidad celular relativa medida en las muestras que han estado en contacto con los eluyentes obtenidos a partir del sistema derivado del EgMA. Se observa cómo para todos los casos la viabilidad celular de cada cultivo permanece por encima del 90% de la viabilidad exhibida por el control negativo TMX, encontrándose diferencias significativas debidas al bajo valor que presenta la varianza dentro de cada grupo de datos.

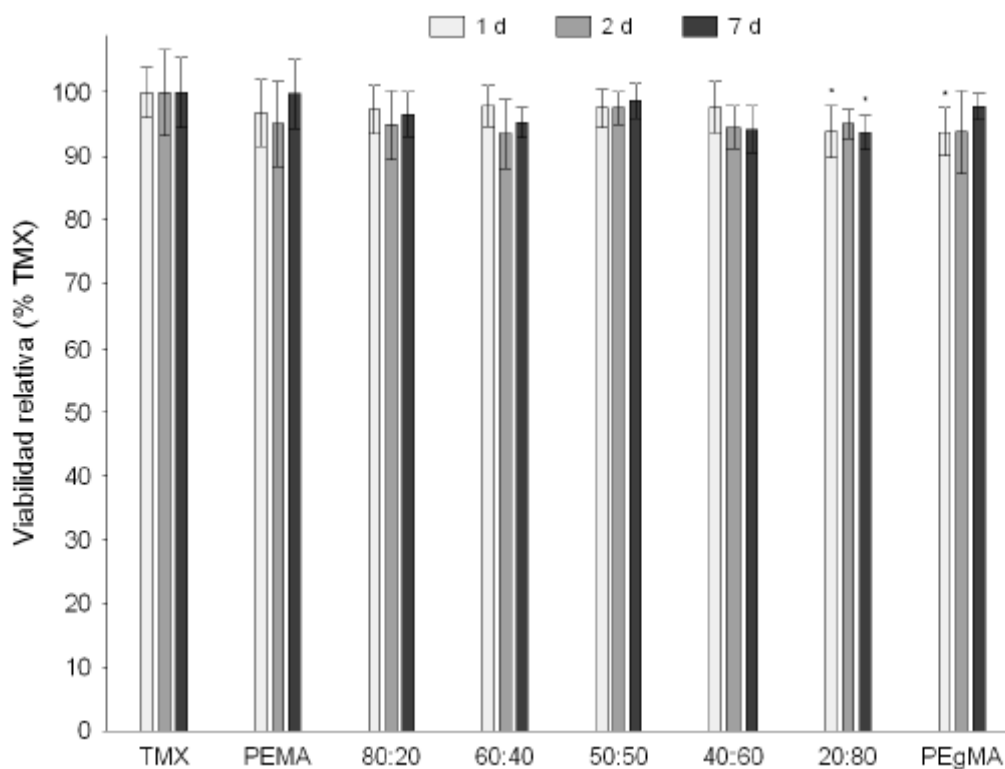


Figura 3.39 Resultados del ensayo MTT para el control TMX, PEMA, PEgMA y los copolímeros *p*(EMA-co-EgMA). Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y las diferencias significativas obtenidas en los ANOVA frente a TMX (*: $p<0,05$).

En el caso de los copolímeros obtenidos a partir del monómero EEgMA los resultados son similares (figura 3.40), obteniéndose para todas las composiciones valores de viabilidad celular superiores al 90% del control TMX. En este caso aparecen más formulaciones con diferencias significativas con respecto al control, debido fundamentalmente a la baja varianza encontrada dentro de cada grupo y no tanto a diferencias grandes en la viabilidad celular medida. Como se puede ver, ninguno de los polímeros y copolímeros estudiados libera componentes citotóxicos al medio.

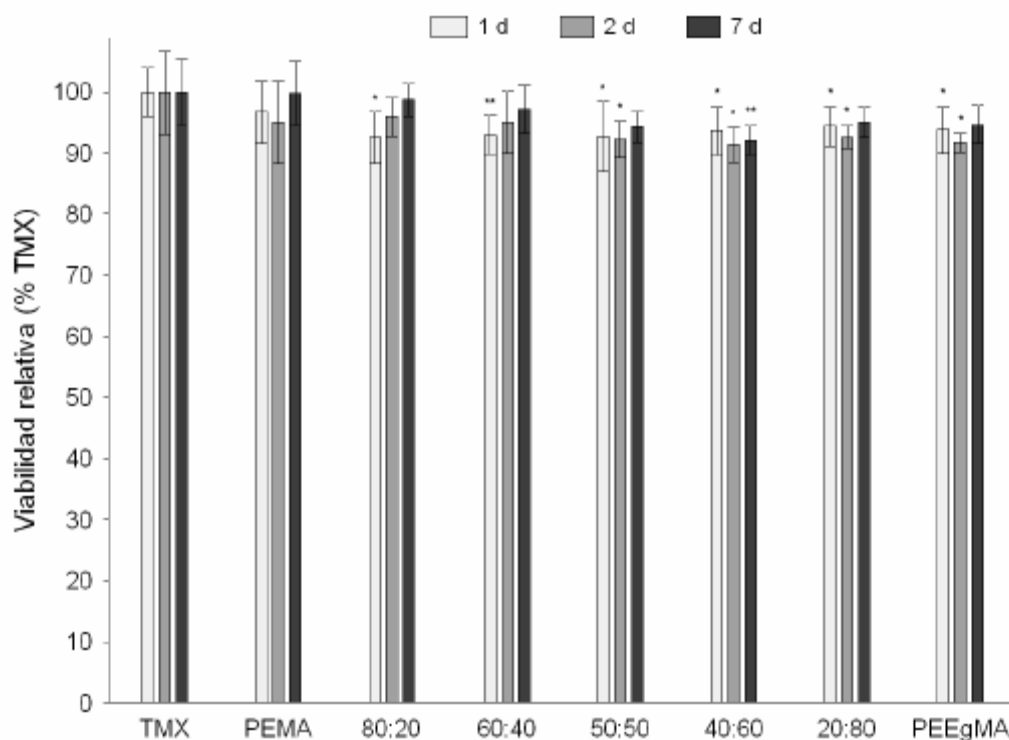


Figura 3.40 Resultados del ensayo MTT para el control TMX, PEMA, PEEgMA y los copolímeros *p*(EMA-co-EEgMA). Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y las diferencias significativas obtenidas en los ANOVA frente a TMX (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$).

3.4.8.2.- MORFOLOGÍA Y PROLIFERACIÓN CELULAR BAJO MICROSCOPIA ÓPTICA.

El estudio microscópico de los cultivos que han crecido empleando como medio de cultivo los eluyentes de los sistemas copoliméricos, previamente extraídos a 1 y 2 días, corrobora los resultados obtenidos en el ensayo MTT. La totalidad de las muestras observadas bajo microscopía óptica presenta unos niveles de proliferación celular cercanos a los exhibidos por el control TMX, presentando las células que componen estos cultivos la misma morfología que las observadas en las preparaciones control.

En la figura 3.41 se muestran las micrografías tomadas a partir de algunas de estas muestras. En esta figura se incluyen las muestras cultivadas durante 96 horas con

los lixiviados obtenidos a 1 y 2 días a partir del control TMX y de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA), ambos en composición 50:50.

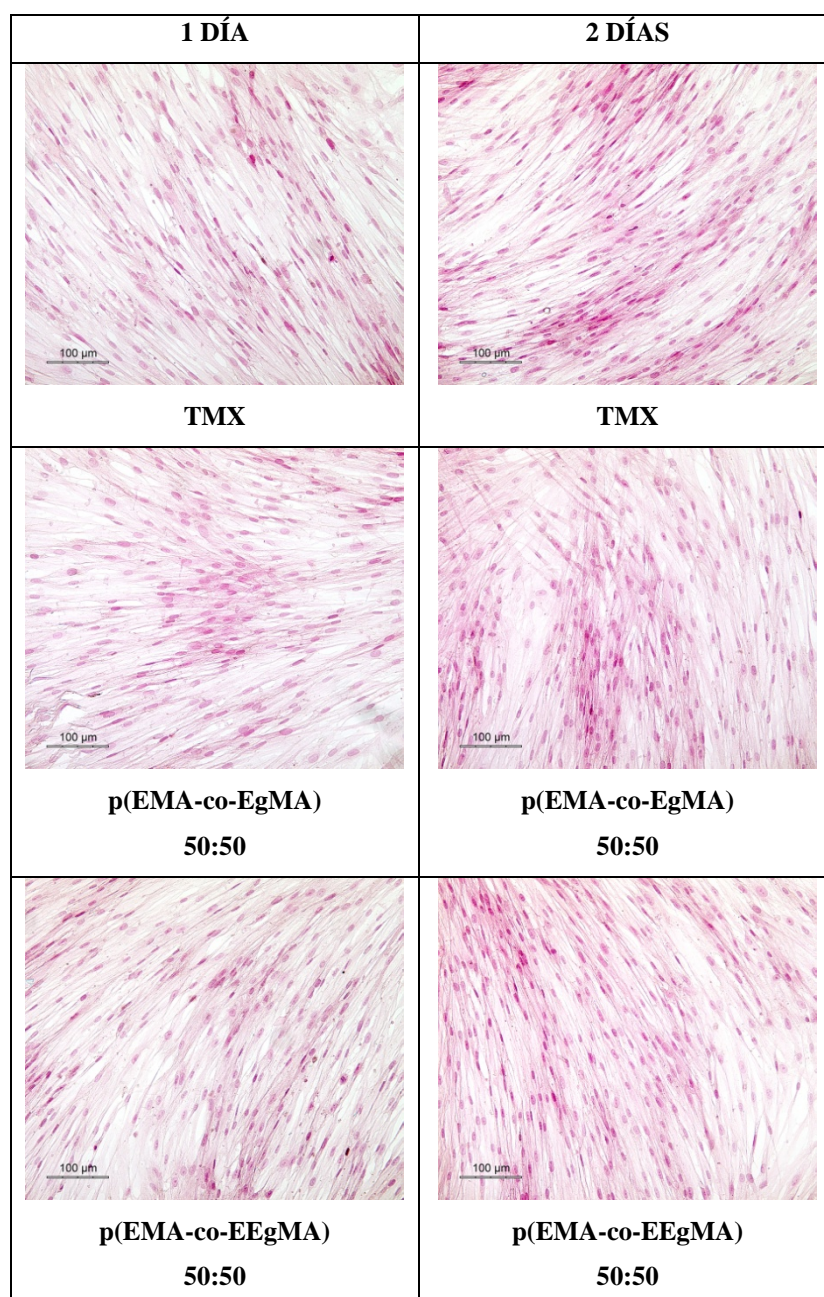


Figura 3.41 Micrografías obtenidas al microscopio óptico (x200) de los cultivos de fibroblastos humanos cultivados durante 96 horas con eluyentes obtenidos a 1 y 2 días a partir del control TMX y de los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA), ambos en composición 50:50.

3.4.8.3.- PROLIFERACIÓN CELULAR. ENSAYO ALAMAR BLUE (AB).

Para cuantificar la proliferación celular sobre la superficie de los polímeros, se aplica un método espectrofotométrico utilizando el reactivo Alamar BlueTM (AB). Al igual que los ensayos basados en el empleo de sales del tetrazolio, este método valora la reducción química del ambiente celular.⁴⁹

Este ensayo se basa en la cuantificación colorimétrica de la actividad celular. Esta actividad se relaciona con los niveles de especies reducidas presentes en el medio como son NADPH, FADH, etc., que pueden a su vez reducir diversos compuestos como las sales del tetrazolio, o el AB. Como se ha comentado, este proceso puede ser cuantificado debido al cambio de color que les acompaña⁵⁰ por lo que se pueden usar como métodos cuantitativos para estudiar la proliferación celular.

El potencial de oxidación-reducción del AB es de + 380 mV a pH 7,0 y 25 °C, por lo que este compuesto puede ser reducido, a diferencia del reactivo MTT, por acción de los citocromos ($E^0 = + 290$ a + 80 mV), sustituyendo al oxígeno molecular como captador de electrones. El reactivo en su estado oxidado (resazurin), pasa a la forma reducida (resofurin) al aceptar los electrones virando su color de azul índigo a rojo (figura 3.42).

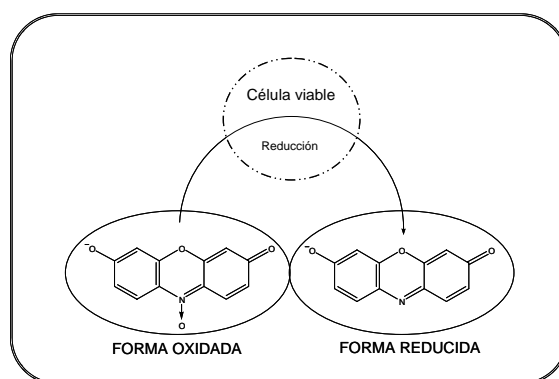


Figura 3.42 La reducción del reactivo Alamar BlueTM, desde su estado oxidado (resazurin) a su estado reducido (resofurin) conlleva un cambio en su color.

El AB es soluble y estable en el medio de cultivo, no es tóxico y no afecta ni a la viabilidad ni a la proliferación celular. Estas características permiten adicionarlo al

medio de cultivo y retirarlo repetidas veces, realizando diferentes mediciones, con el fin de modelizar temporalmente la proliferación celular.⁵¹

Siguiendo el procedimiento experimental descrito (apartado 1.3.4) se cultivan fibroblastos directamente sobre la superficie de los distintos materiales durante un periodo de 21 días adicionando reactivo AB y realizando lecturas colorimétricas a 1, 3, 7, 14 y 21 días, con el fin de estudiar la evolución temporal de cada cultivo. La figura 3.43 muestra los niveles de proliferación celular de los sistemas derivados de EgMA donde se pueden observar niveles de proliferación cercanos a los medidos para el control TMX y en la mayoría de los casos superiores, a los observados para el PEMA.

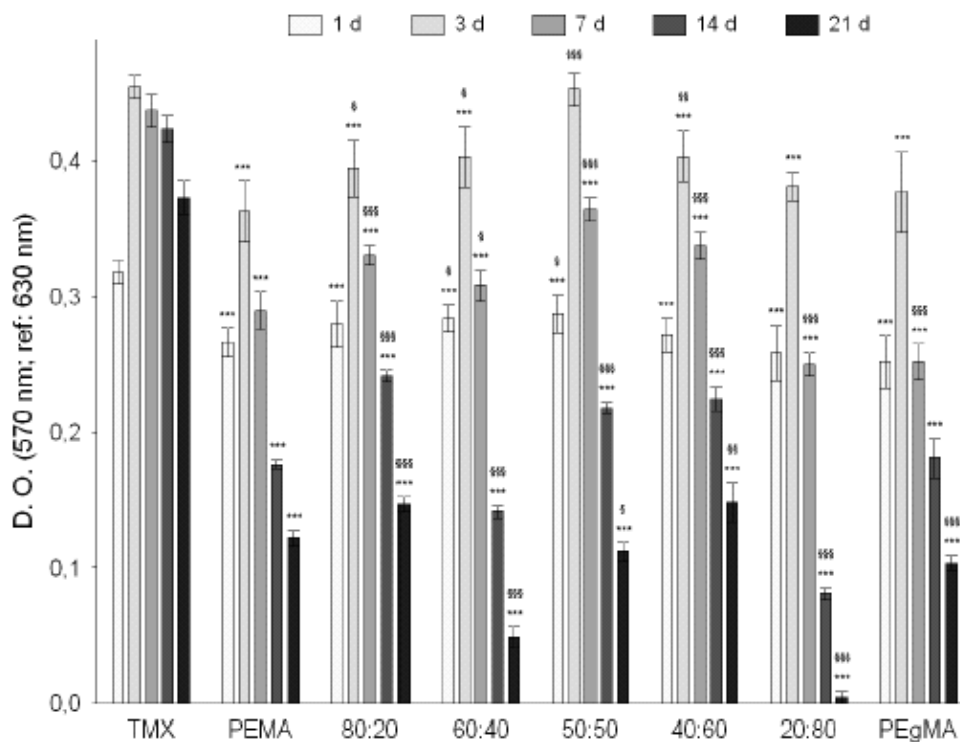


Figura 3.43 Resultados del ensayo Alamar Blue para el control TMX, PEMA, PEgMA y los copolímeros p(EMA-co-EgMA) Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y las diferencias significativas obtenidas en los ANOVA frente al TMX (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$) y frente al PEMA (§: $p<0,05$; §§: $p<0,01$; §§§: $p<0,001$).

El patrón de adhesión y proliferación de los distintos materiales que contienen EgMA (figura 3.43) muestra un incremento en el número de células entre 1 y 3 días

significativamente inferior al del control TMX, salvo para la formulación 50:50. A pesar de que en todos los casos los resultados de los copolímeros mejoran a los obtenidos para el PEMA, se aprecia un descenso significativo en el número de células en relación al observado para el control negativo, para las lecturas realizadas a 7, 14 y 21 días.

En el caso de los copolímeros derivados del EEgMA los resultados (figura 3.44) son similares a los descritos para los derivados de EgMA y claramente mejores que los obtenidos para el homopolímero PEMA, observándose un incremento en el número de células hasta el tercer día y un descenso en las siguientes lecturas. Los valores de proliferación celular mostrados a 7, 14 y 21 días son para todos los copolímeros superiores a los medidos para el PEMA y como norma general, más altos que los medidos para los copolímeros portadores de EgMA. El comportamiento exhibido por el homopolímero PEEgMA es muy similar al medido para los otros dos homopolímeros (PEMA y PEgMA).

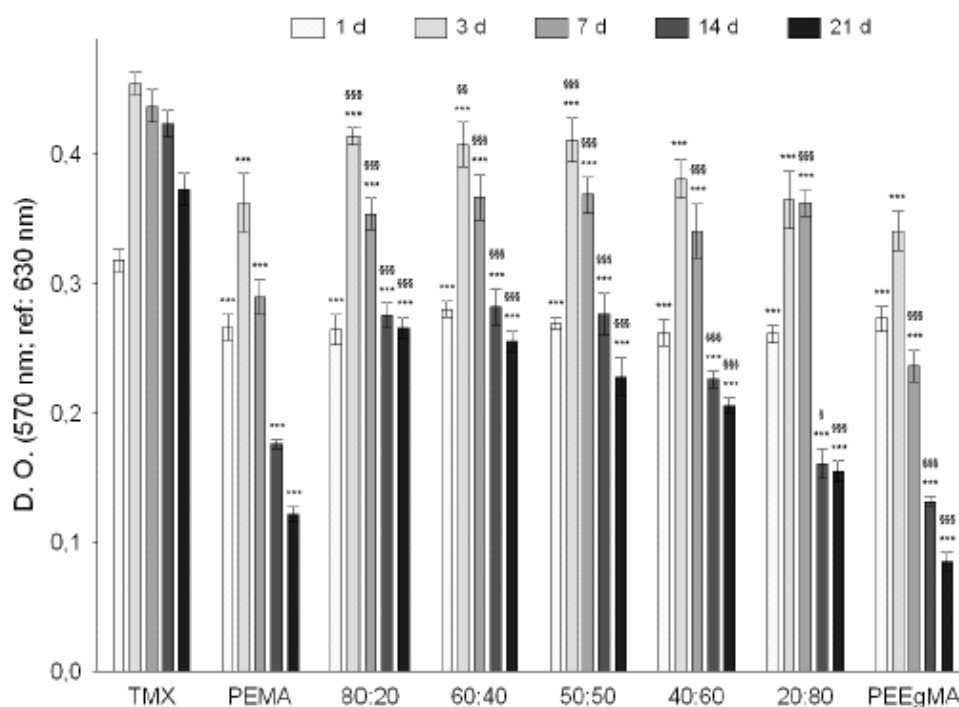


Figura 3.44 Resultados del ensayo Alamar Blue para el control TMX, PEMA, PEEgMA y los copolímeros $p(EMA-co-EEgMA)$. Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y las diferencias significativas obtenidos en los ANOVA frente al TMX (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$) y frente al PEMA (§: $p<0,05$; §§: $p<0,01$; §§§: $p<0,001$).

Los resultados obtenidos en el ensayo AB indican que los derivados del eugenol presentan una elevada biocompatibilidad y una superficie más adecuada para la adhesión y crecimiento de este tipo de células que el PEMA.

3.4.8.4.- MORFOLOGÍA CELULAR, ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN BAJO MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO AMBIENTAL.

La morfología celular y la interacción entre los fibroblastos y los distintos materiales se estudian mediante Microscopia Electrónica de Barrido Ambiental (ESEM, de sus siglas en inglés). La figura 3.45 muestra los resultados de estos análisis en los que no se observan diferencias relevantes en los cultivos establecidos sobre las muestras del control TMX, el PEMA o los polímeros derivados de eugenol, a 24 y 48 h. Las células presentan en todos los casos una morfología normal y una ocupación del sustrato creciente entre las 24 y las 48 h. Se aprecia, así mismo, una buena adhesión célula-material.

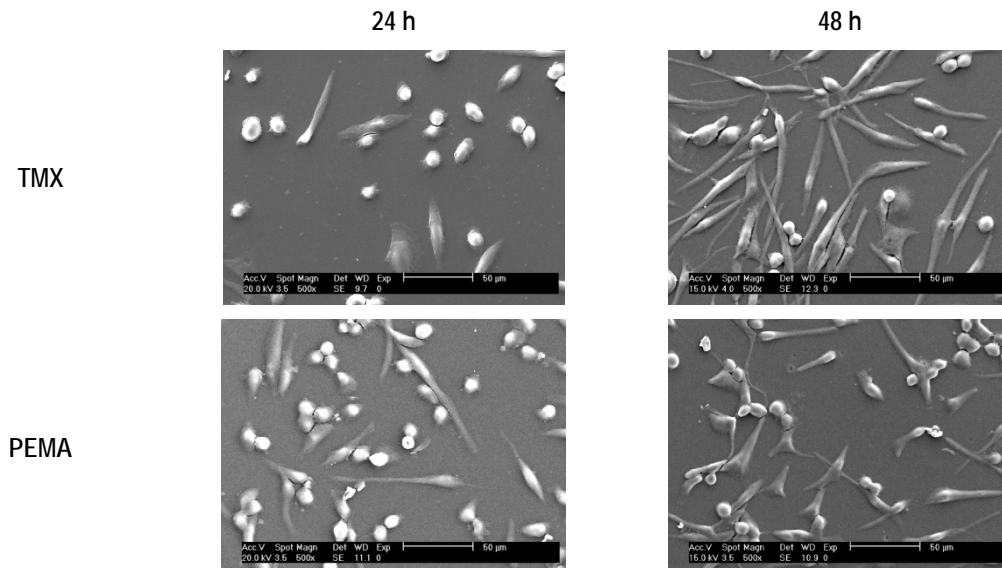
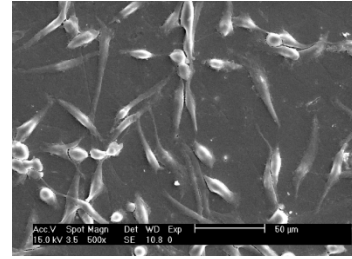
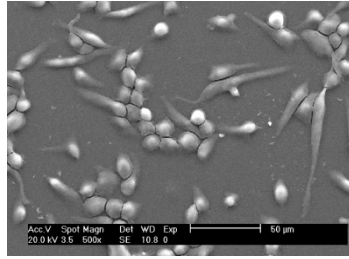
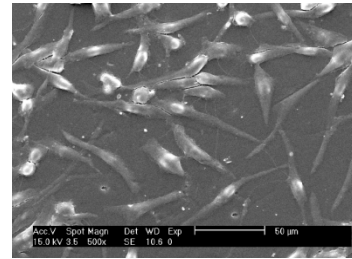
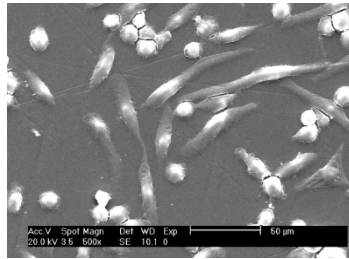


Figura 3.45 Micrografías obtenidas en ESEM (x500) de los cultivos establecidos sobre los distintos materiales estudiados tras 24 y 48 h.

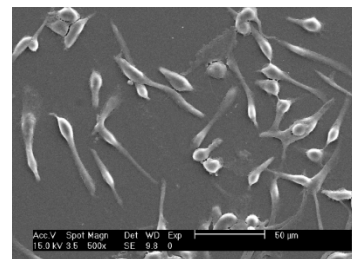
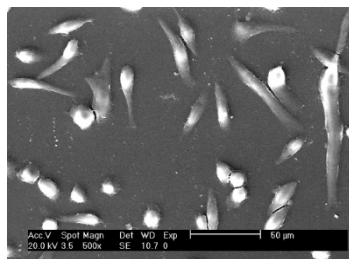
EMA-co-EgMA 80:20



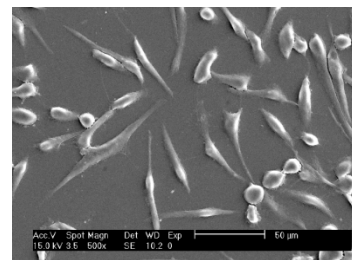
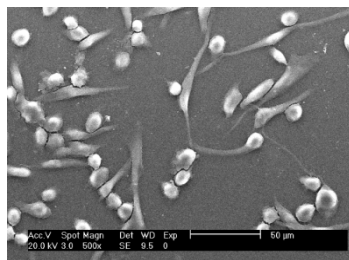
EMA-co-EgMA 60:40



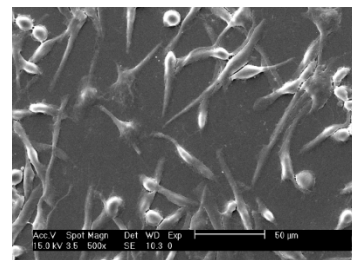
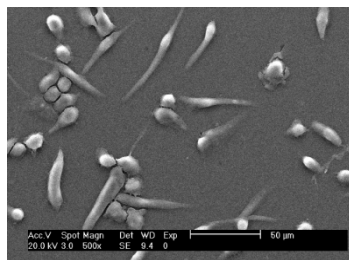
EMA-co-EgMA 50:50



EMA-co-EgMA 40:60



EMA-co-EgMA 20:80



PEgMA

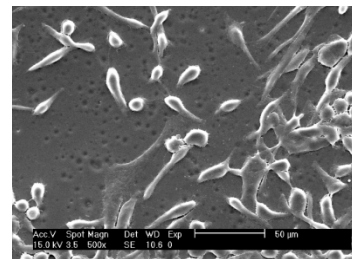
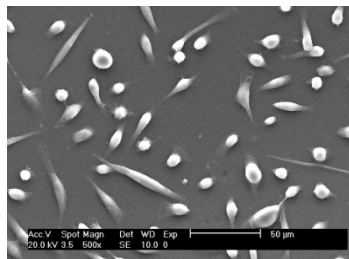


Figura 3.45 continuación Micrografías obtenidas en ESEM (x500) de los cultivos establecidos sobre los distintos materiales estudiados tras 24 y 48 h.

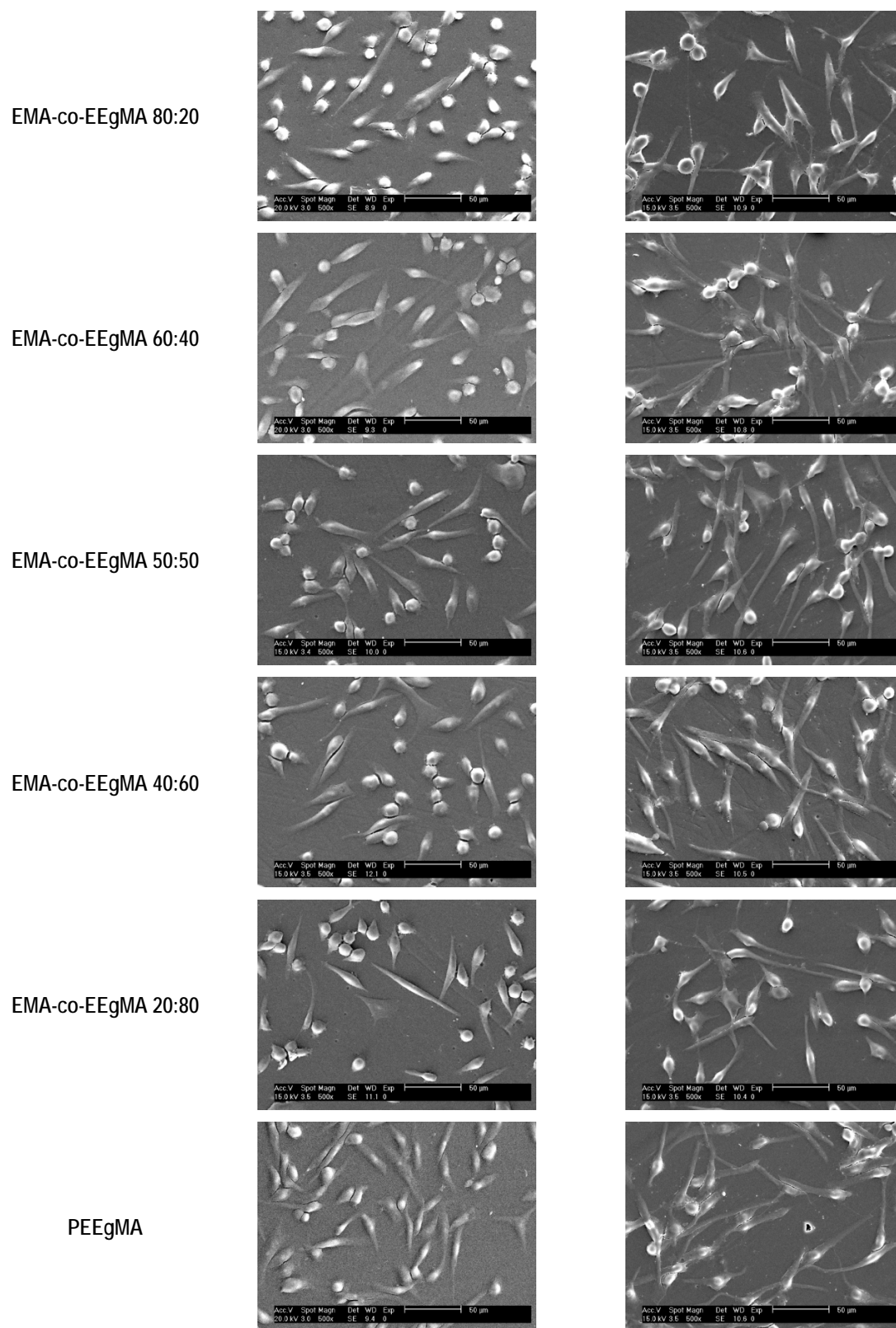


Figura 3.45 continuación Micrografías obtenidas en ESEM (x500) de los cultivos establecidos sobre los distintos materiales estudiados tras 24 y 48 h.

En la figura 3.46 se aprecia, a mayor aumento, la similitud entre las morfologías de los fibroblastos adheridos sobre el control TMX y sobre dos copolímeros derivados de eugenol.

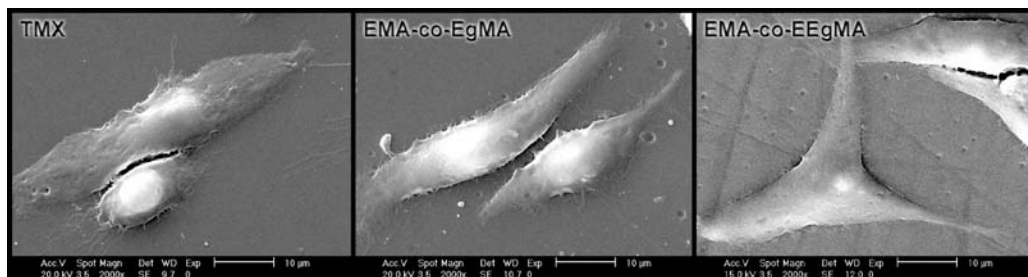


Figura 3.46 Micrografías obtenidas en ESEM (x2000) de los cultivos establecidos sobre el control TMX y sobre dos copolímeros derivados de eugenol en composición 50:50.

En resumen, los resultados de este estudio junto con los obtenidos del ensayo Alamar Blue indican un excelente grado de biocompatibilidad de los materiales derivados de eugenol, que presentan una superficie adecuada para la adhesión celular.

3.4.8.5.-MUERTE CELULAR. ENSAYO LDH.

Como ya se ha visto en los apartados anteriores, el reactivo INT (cloruro de 2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-feniltetrazolio), al igual que otras sales de tetrazolio, es susceptible de ser reducido por la LDH mediante dos reacciones acopladas (figura 3.47).⁵² La muerte celular en un cultivo lleva asociada el aumento de los niveles de enzima LDH en el medio, liberado por las células lisadas. De este modo es posible cuantificar la muerte celular midiendo espectroscópicamente la transformación de las sales de tetrazolio a formazán, añadido en el medio con este fin. Los materiales que induzcan mayor muerte celular presentarán mayores niveles de LDH, que producirán una lectura de absorbancia mayor a 490 nm, que es dónde el reactivo INT presenta su máximo de absorbancia.

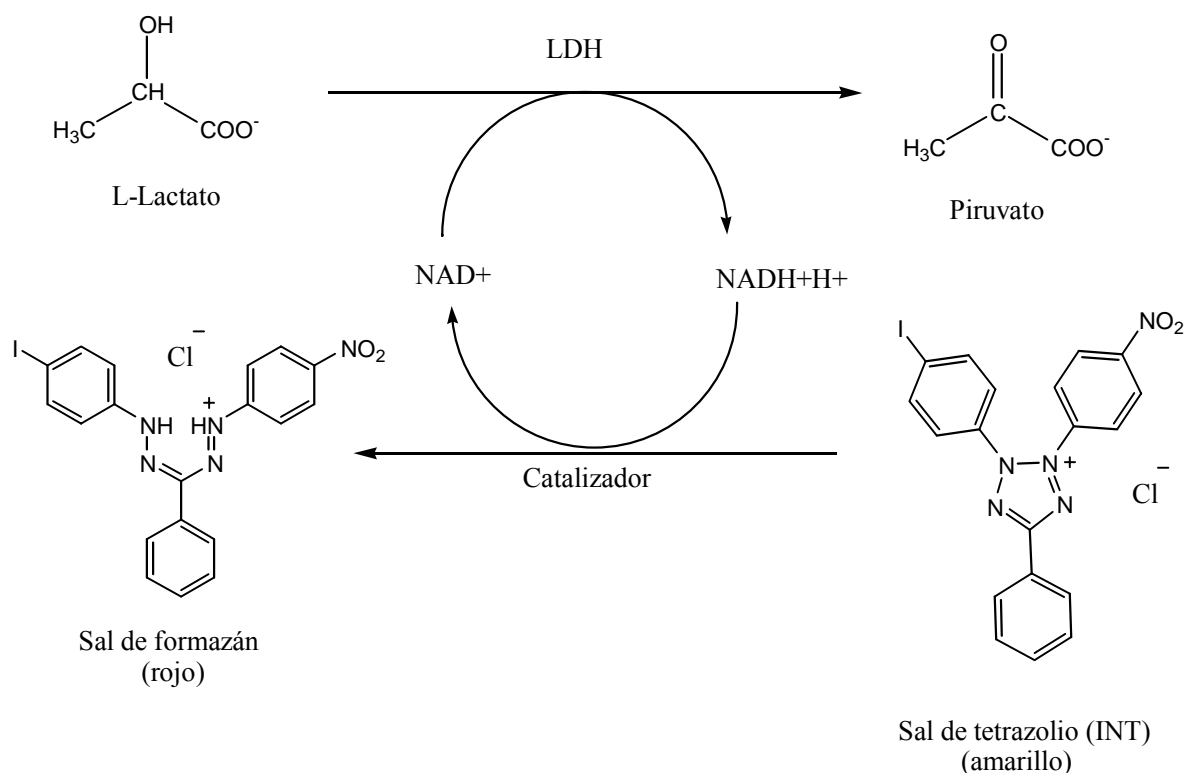


Figura 3.47 Reacción de oxido-reducción en la que el lactato se transforma en piruvato por acción de la LDH, reduciéndose el reactivo INT a formazán, virando su color.

La figura 3.48 muestra los niveles de muerte celular en cultivos establecidos directamente sobre la superficie de los materiales a 1, 2 y 7 días para los copolímeros p(EMA-co-EgMA) y para el control TMX. En todos los casos se observan niveles similares al control TMX. Para las muestras 50:50 y 40:60 se han medido unos niveles de muerte celular inferiores al PEMA y al resto de formulaciones copoliméricas. El homopolímero PEGMA ha sido la formulación en la que mayor muerte celular se ha registrado tras 7 días.

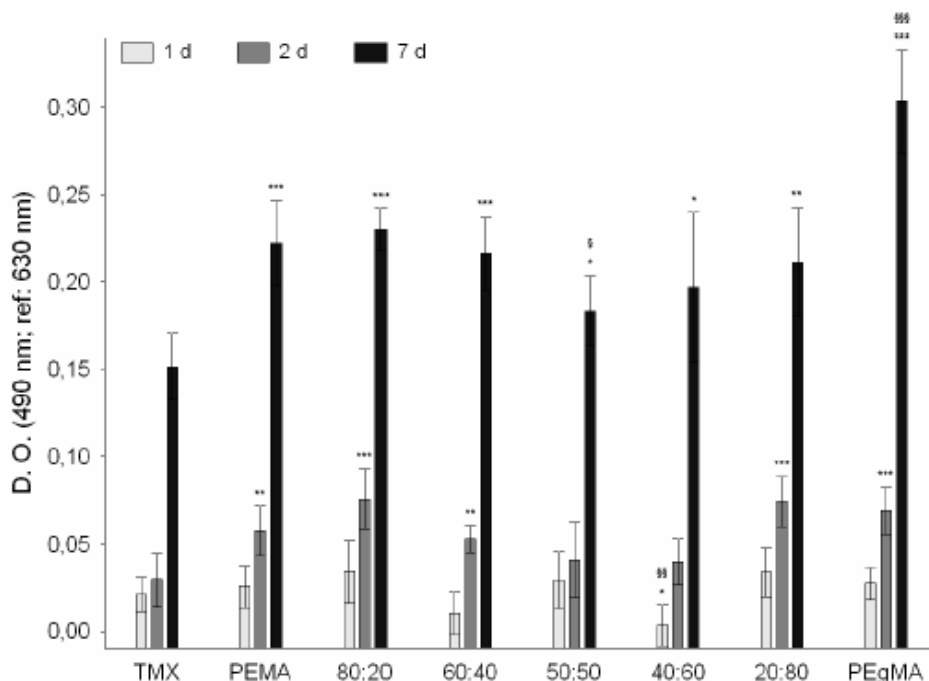


Figura 3.48 Resultados del ensayo LDH para el control TMX, PEMA, PEGMA y los copolímeros p(EMA-co-EgMA). Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y las diferencias significativas obtenidas en los ANOVA frente al TMX (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$) y frente al PEMA (§: $p<0,05$; §§: $p<0,01$; §§§: $p<0,001$).

Los niveles de muerte celular observados en el caso de los copolímeros p(EMA-co-EEgMA) (figura 3.49) son similares a los obtenidos para los copolímeros derivados del EgMA siendo los valores obtenidos a 2 días ligeramente superiores. De nuevo, en las formulaciones 50:50 y 40:60 se ha detectado una mortalidad inferior, de hecho esta última formulación a 7 días no presenta diferencias significativas con respecto al control TMX. El homopolímero PEEgMA tiene un comportamiento similar al mostrado por el PEMA, y sensiblemente mejor que el exhibido por el PEGMA.

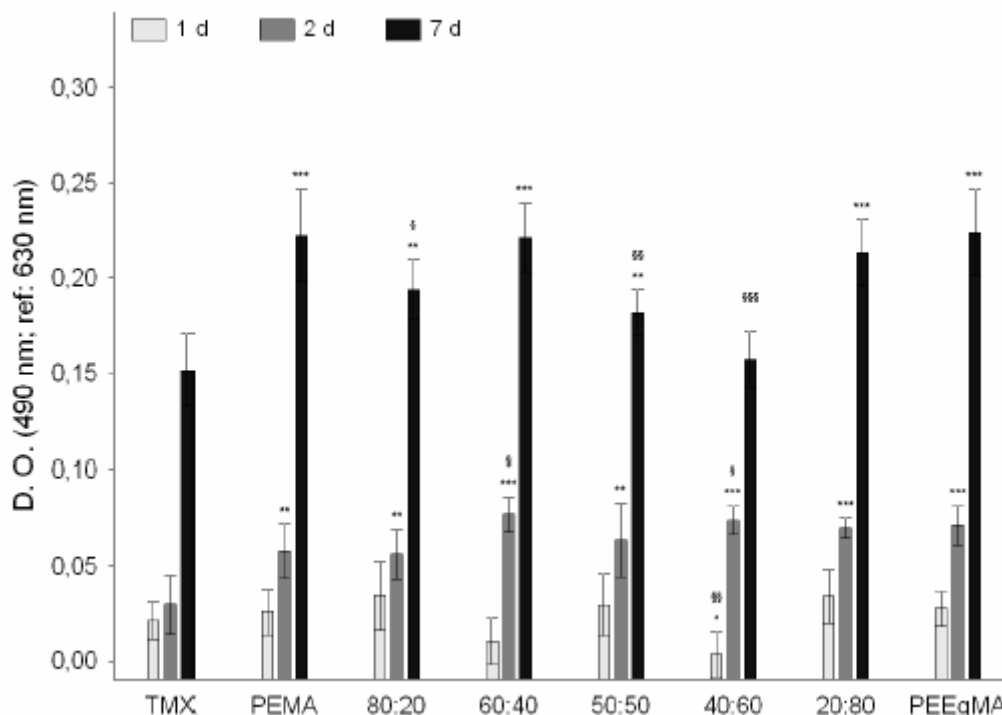


Figura 3.49 Resultados del ensayo LDH para el control TMX, PEMA, PEEgMA y los copolímeros *p*(EMA-co-EEgMA). Se representa la media \pm error estándar de la media ($n=16$) y el nivel de significación obtenido en los ANOVA frente al TMX (*: $p<0,05$; **: $p<0,01$; ***: $p<0,001$) y frente al PEMA (§: $p<0,05$; §§: $p<0,01$; §§§: $p<0,001$).

3.4.9.- ACTIVIDAD BACTERICIDA DE LOS POLÍMEROS Y COPOLÍMEROS EN MASA.

La determinación de la actividad bactericida de los polímeros derivados de eugenol se determina mediante un método basado en los estudios clásicos mediante antibiogramas por difusión en agar.⁵³ La diferencia con respecto a estos métodos clásicos es que el disco que se deposita sobre la superficie del agar es justamente un disco del material a ensayar. En este caso, a diferencia de los monómeros, se mide la actividad debida al polímero, que no libera sustancias activas formadoras de halos de inhibición. Sin embargo, la superficie directamente en contacto con el material a ensayar sí es susceptible de revelar la actividad del polímero mediante la inhibición o el retardo del desarrollo de colonias justo en las zonas donde presente contacto directo con la superficie del material.

Esta metodología requiere materiales con un cierto grado de hidrofilia para que se dé un buen contacto material-superficie y no expulse el agua de la superficie del agar. Es por esta razón que el ensayo se desarrolla sobre los copolímeros derivados de HEMA. La figura 3.50 muestra los resultados del ensayo de inhibición por contacto con los diferentes materiales ensayados.

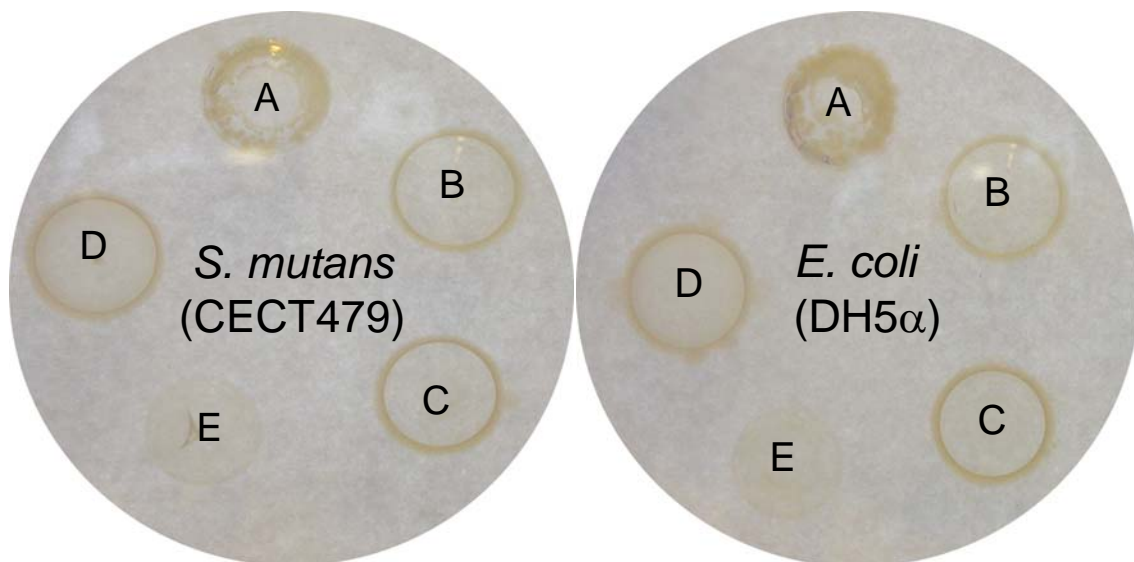


Figura 3.50 Ensayo de propiedades bactericidas por contacto para los distintos copolímeros frente a cultivos sobre agar de *Streptococcus mutans* (CECT 479) y *Escherichia coli* (DH5 α). Formación de colonias bajo la superficie de los distintos materiales después de 24 h de cultivo a 37 °C. A = PHEMA; B = *p*(HEMA-co-EgMA) 80:20; C = *p*(HEMA-co-EgMA) 50:50; D = *p*(HEMA-co-EEgMA) 80:20; E = *p*(HEMA-co-EEgMA) 50:50.

Se observa cómo alrededor y por debajo de la superficie de los discos de PHEMA se desarrollan colonias de ambos cultivos. Este desarrollo sin embargo, es cualitativamente menor para todos los copolímeros derivados de eugenol. Comparando éstos, se observa que los copolímeros portadores de EEgMA muestran un mayor carácter inhibitorio tras 24 h de cultivo que los observados para los copolímeros portadores de EgMA.

3.5.- DISCUSIÓN.

Ya se ha mencionado la gran demanda que existe de biomateriales poliméricos dotados de funcionalidad específica para las aplicaciones para las que se desarrollan. Para ello la inmovilización de sustancias biológicamente activas en el seno del material en cuestión ha sido una manera clásica de satisfacer esta demanda.⁵⁴ Una vía de inmovilización muy interesante es la unión covalente de la sustancia activa, o funcionalidad, a las cadenas poliméricas. Esta vía tiene como ventaja principal la estabilidad temporal y posibilidad de modulación de la actividad buscada mediante los mecanismos de hidrólisis y biodegradación. La incorporación de estas biomoléculas puede darse tanto mediante unión directa o mediante un grupo espaciador. Estos espaciadores de cadena proporcionan una mayor libertad estérica y por tanto una mayor actividad para las biomoléculas inmovilizadas, especialmente en el caso de biomoléculas pequeñas.⁵⁵ Por otra parte, el grupo espaciador puede ser también biodegradable y de este modo ir liberando la biomolécula inmovilizada en su degradación.⁵⁶

Siguiendo esta filosofía se desarrollan distintos polímeros a partir de los monómeros EgMA y EEgMA sintetizados previamente,⁵⁷ mediante técnicas de polimerización radical bien conocidas.⁵⁸ La presencia de dos grupos susceptibles de polimerizar en los derivados de eugenol condiciona la obtención de productos solubles solo a niveles de conversión bajos. Es en estas condiciones, cuando se obtienen productos solubles con los que poder llevar a cabo técnicas de caracterización en disolución.

La asignación de las diferentes bandas observadas en los espectros de Resonancia Magnética muestra la permanencia del grupo alilo en los primeros estadios de la reacción para los dos tipos de monómeros. Este hecho queda constatado con la comparación del valor de las integrales de la señal de resonancia del grupo alilo (5,3 - 4,7 ppm) con respecto a la de los protones aromáticos (6,5 - 7,2 ppm), ya que éstas difieren menos de un 1 % de su valor teórico, indicando la baja participación del grupo alilo que no puede ser detectada, ni siquiera mediante técnicas de Resonancia Magnética Nuclear. Estos resultados están en consonancia con estudios previos llevados a cabo

sobre la polimerización vía radical de monómeros alílicos⁵⁹ y ponen de manifiesto que la reacción de polimerización transcurre a través de los dobles enlaces metacrílicos, proporcionando cadenas macromoleculares con restos eugenilo anclados lateralmente a través del grupo éster correspondiente. Por otro lado, el hecho de obtener estructuras entrecruzadas a altas conversiones parece indicar que los dobles enlaces alílicos sólo participan de la reacción una vez han reaccionado la mayoría de los dobles enlaces metacrílicos. Esta participación se debe a que, según avanza la reacción, la viscosidad del medio aumenta progresivamente disminuyendo la movilidad de los macrorradicales y por tanto algunos de los enlaces alílicos laterales reaccionan contribuyendo a la formación de ramificaciones y puntos de entrecruzamiento. Este grado de entrecruzamiento puede modularse mediante la introducción de otros monómeros capaces de copolimerizar con los derivados de eugenol como pueden ser monómeros acrílicos tipo EMA, MMA o HEMA.

Al igual que en el caso de los homopolímeros, estos copolímeros se pueden obtener tanto en masa como en disolución y su grado de conversión se modula en función del tiempo de reacción. La desaparición completa de las bandas de resonancia de los dobles enlaces acrílicos en los copolímeros obtenidos a baja conversión indica que el proceso de polimerización radical se desarrolla principalmente a través de estos dobles enlaces, presentes en ambas unidades monoméricas. Además, comparando las señales correspondientes a los protones aromáticos con los protones alílicos se observa una pérdida de intensidad relativa menor al 1% para éstos últimos, indicando de nuevo la formación de macrocadenas lineales en las que el resto derivado de eugenol queda anclado lateralmente a través del enlace éster correspondiente.

Para el caso de los polímeros sintetizados en masa, al extender la reacción hasta altas conversiones se obtienen productos entrecruzados y por tanto insolubles, no pudiéndose realizar el estudio de la estructura mediante Resonancia Magnética Nuclear en disolución. Sin embargo los espectros de infrarrojo obtenidos sobre estos polímeros confirman la estructura propuesta, siendo el dato más significativo la permanencia de las bandas correspondientes al doble enlace alílico (3.080 - 1.635 - 1.415 y 995 cm^{-1})^{3,4,60} y que confirman su participación en el proceso de entrecruzamiento en pequeñas proporciones, generando redes poliméricas que mantienen los restos derivados de eugenol anclados lateralmente a éstas.

Los diagramas de composición obtenidos para cada sistema copolimérico soluble, a partir de la relación de intensidades entre las bandas de resonancia correspondientes a cada unidad monomérica, indican la formación de copolímeros enriquecidos en derivados de eugenol para todo el rango de composiciones. Este hecho sumado a los valores de reactividad obtenidos a partir de los parámetros de copolimerización, según el modelo terminal ($r_{EEgMA} > r_{EgMA} > r_{EMA}$), ponen de manifiesto una reactividad decreciente en el orden $EEgMA > EgMA > EMA$. Esta reactividad indica que tanto para los copolímeros $p(EMA-co-EgMA)$ como para los $p(EMA-co-EEgMA)$, los radicales macromoleculares cuyo extremo activo en crecimiento es tanto una unidad de EMA como una unidad monomérica derivada de eugenol, presentan una mayor reactividad frente al monómero derivado de eugenol que frente al EMA. En ambos sistemas copoliméricos dado que los productos $r_1 \times r_2$ son menores que la unidad, los copolímeros preparados con estos sistemas en las condiciones de reacción anteriormente señaladas, presentan una distribución de unidades estadísticas con carácter predominantemente al azar.

Los pesos moleculares determinados por Cromatografía de Exclusión de Tamaños de todos los copolímeros preparados en solución a baja conversión, muestran valores muy altos, demostrando que los monómeros $EgMA$ y $EEgMA$ no presentan ningún efecto inhibitorio frente a procesos de polimerización vía radical. Es claro sin embargo que, cuando $EgMA$ copolimeriza con EMA los pesos moleculares de los correspondientes copolímeros muestran valores ligeramente inferiores con respecto al observado para el caso de $PEMA$. Sin embargo los valores obtenidos indican que los pesos moleculares son suficientemente altos para su introducción como componentes de formulaciones autocurables con aplicabilidad en el campo dental y de cementos óseos. Hay que considerar sin embargo que los sistemas autocurables obtenidos con estos materiales presentan una estructura entrecruzada debido a la participación de los dobles enlaces alílicos presentes en los restos derivados de eugenol. Esta participación en los derivados de $EEgMA$, se plasma en la formación de estructuras ramificadas debido a la pequeña participación de los grupos alílicos en el proceso de polimerización, presentando valores de peso molecular muy superiores a los observados para $PEMA$. Es importante señalar sin embargo, que la caracterización de este tipo de polímeros

ramificados mediante SEC puede llevar a conclusiones erróneas^{61,62} debido a que el volumen hidrodinámico (parámetro que determina la retención cromatográfica en SEC) de macromoléculas muy ramificadas es muy pequeño comparado con el de los polímeros lineales homólogos de menor peso molecular. Por ello, al calcular pesos moleculares a partir de los cromatogramas y de curvas de calibrado establecidas con homopolímeros lineales, tiene lugar una subestimación de los mismos. Este hecho nos lleva a presentar y discutir los resultados con cierta prudencia sin exponer conclusiones definitivas.

Esta diferencia de comportamiento entre los derivados de EgMA y de EEgMA se debe a las diferencias en la flexibilidad de las cadenas en ambos sistemas. Para los copolímeros derivados de EgMA, las macrocadenas activas en crecimiento presentan menor movilidad para proseguir las reacciones de propagación. Este hecho hace que cuando la viscosidad del medio aumenta drásticamente, los macrorradicales no pueden orientarse para proseguir la reacción a través de los grupos acrílicos, en este punto el radical activo puede dar reacción de terminación por desproporción generando polímeros de menor peso molecular, o bien adición a un doble enlace alílico perteneciente a otra cadena, con pocas posibilidades de seguir propagando y generando así un punto de entrecruzamiento. En el caso de EEgMA, al existir el separador entre la cadena polimérica y el resto eugenilo, el sistema presenta mayor movilidad y los dobles enlaces alílicos reaccionantes pueden difundirse con mayor libertad para seguir propagando a través de otro enlace acrílico generando así un punto de ramificación.

Esta mayor movilidad, o flexibilidad en la cadena se ve reflejada en los valores de la temperatura de transición vítrea de los distintos sistemas copoliméricos donde se observa cómo la T_g aumenta con la presencia de EgMA y disminuye con el contenido en EEgMA. La T_g obtenida para el PEgMA lineal es superior a las descritas en la bibliografía para otros metacrilatos portadores de grupos aromáticos laterales,⁶³ lo que puede indicar algún otro tipo de interacción presente entre los grupos laterales de las cadenas poliméricas. El valor tan bajo obtenido sin embargo para el PEEgMA lineal ($T_g = 20$ °C) indica que efectivamente el grupo oxietilénico, separador de cadena, contribuye a la flexibilidad del grupo lateral. Esta movilidad se ve restringida cuando la

reacción se extiende a altas conversiones ya que el proceso de ramificación y entrecruzamiento disminuye la flexibilidad, induciendo un aumento de hasta 15 °C para el caso del PEEgMA. En el caso de EgMA este efecto también se observa pero de manera menos acusada o más difícilmente detectable ya que para sistemas altamente entrecruzados la transición puede incluso dejar de ser observable.⁶⁴

Estos procesos de ramificación y entrecruzamiento se ponen de manifiesto cuando se estudia el comportamiento reológico de los copolímeros derivados de eugenol sintetizados en masa a alta conversión. En los sistemas derivados de EgMA, la reacción transcurre de manera análoga a lo descrito anteriormente salvo que, en este caso, la movilidad molecular queda muy restringida debido a la ausencia de disolvente y a la poca flexibilidad molecular. Así, según avanza la reacción esta difusión se ve cada vez más restringida promoviendo o favoreciendo los procesos de terminación y formación de puntos de entrecruzamiento. Este proceso genera redes tridimensionales con dominios segregados de alto grado de entrecruzamiento embebidos en zonas de entrecruzamiento menor que van creciendo mediante percolación hasta el punto donde la movilidad es prácticamente nula, produciéndose la gelificación. Transcurrido este punto la respuesta viscoelástica del sistema responde a un modelo tipo elástico con valor de G' superior a G'' e independiente de la frecuencia de torsión o torque aplicado. Este efecto es más acusado cuanto mayor es la cantidad de EgMA presente ya que el mayor número de grupos alilo favorecerá un mayor grado de entrecruzamiento, aumentando éste, como se ha visto, con el contenido de EgMA. Una fracción soluble elevada indica que existe un alto porcentaje de cadenas que no participan en el proceso de entrecruzamiento o ramificación. Por ello, y como indican los resultados, una mayor cantidad de EgMA produce dominios de un mayor número de entrecruzamiento presentando, de este modo, menor fracción soluble cuanto mayor es la cantidad de EgMA.

Como se ha comentado, la mayor movilidad de los grupos laterales en los copolímeros derivados de EEgMA favorece los procesos de ramificación en lugar de los de entrecruzamiento. Este efecto hace que la respuesta elástica de estos materiales sea menor que la observada en los derivados de EgMA y por tanto la componente viscosa

juegue un cierto papel en la respuesta del material frente a la deformación por torsión, presentando una ligera, aunque constante, dependencia en el valor del módulo G' en todo el rango de frecuencias. Además, estas pequeñas diferencias de movilidad molecular favorecen la homogeneidad de la muestra obteniéndose redes con menor fracción soluble para los sistemas derivados de EEgMA con respecto a los de EgMA.

A su vez la presencia de estos grupos laterales en las cadenas poliméricas determina el valor de la densidad del material en función del volumen hidrodinámico de éste. De este modo, es esperable el resultado obtenido en el cálculo de las densidades que decrece en el orden $\rho_{\text{PEMA}} > \rho_{\text{PEgMA}} > \rho_{\text{PEEgMA}}$ ya que justo en ese orden aumenta respectivamente, el volumen de los restos etilo, eugenilo y etoxieugenilo.

Los estudios de degradación térmica muestran un aumento de la estabilidad frente a la degradación para los polímeros derivados de eugenol. Este hecho queda patente en todos los sistemas en que estos monómeros están presentes, bien aumentando la temperatura de inicio de degradación, bien disminuyendo las etapas en las que se produce. En ausencia de los monómeros derivados de eugenol, el homopolímero PEMA presenta un proceso de degradación en cuatro etapas de manera similar al descrito para PMMA.^{65,66} La primera etapa de degradación (~ 207 °C) es consecuencia de la ruptura de cadena por los centros estéricamente más impedidos formados a partir de uniones cabeza-cabeza en el proceso de polimerización. La segunda etapa (~ 274 °C) es debida a la descomposición de los finales de cadena vinilidenos formados por desproporción y las dos últimas etapas (~ 350 y ~ 430 °C) son debidas a la escisión aleatoria de la cadena que produce la despolimerización de los polímeros acrílicos. Por su parte, el homopolímero PHEMA obtenido en masa a alta conversión presenta únicamente estas dos últimas etapas degradativas.

Los homopolímeros y copolímeros derivados de eugenol presentan sin embargo una sola etapa degradativa atribuible a la escisión aleatoria de la cadena polimérica. Además los polímeros obtenidos en masa a alta conversión presentan una estabilidad adicional, aumentando en hasta 12 y 6 °C las temperaturas a las que se producen estas degradaciones en los casos del PEgMA y PEEgMA, respectivamente. Este hecho es

atribuible a la estabilidad adicional que presentan estos sistemas debido al proceso de entrecruzamiento, que de manera general produce este tipo de estabilización.

Todos estos resultados indican un marcado carácter antioxidante por parte del resto eugenilo en los distintos copolímeros, presentando una gran actividad como captador de los radicales libres generados durante el tratamiento térmico a temperaturas superiores a 250 °C. En este sentido, y al igual que en otros materiales ya descritos, esta actividad antioxidante puede jugar un papel importante en la estabilización e inhibición de la formación de radicales libres producidos por la descomposición de compuestos hidroperóxidos, asociados a procesos inflamatorios en el medio fisiológico.⁶⁷

En este sentido, los resultados de los experimentos llevados a cabo para el estudio *in vitro* de los polímeros derivados de eugenol muestran un excelente comportamiento tanto en niveles de humectabilidad e hidratación como de biocompatibilidad frente a los cultivos celulares ensayados. El comportamiento en hidratación de los distintos copolímeros en masa muestra unos niveles de absorción de agua muy similares a los requeridos para su incorporación en formulaciones autocurables.⁶⁸ Este ensayo de hidratación se lleva a cabo en medio tamponado ya que éste simula mejor las condiciones fisiológicas, a pesar de que este medio disminuye la capacidad de absorción de agua.⁶⁹ El aumento de la hidrofobicidad y del grado de entrecruzamiento con el contenido en EgMA produce en los copolímeros p(EMA-co-EgMA) una disminución gradual del contenido en agua máximo alcanzado al aumentar la cantidad de EgMA. Para el caso de los polímeros p(EMA-co-EEgMA) sin embargo, la cantidad de agua absorbida aumenta al aumentar el contenido en EEgMA debido a la menor hidrofobicidad de este monómero. La diferencia en absorción de agua entre el PEEgMA y el PEMA no es tan acusada como con respecto al PEgMA, debido a que el entrecruzamiento en el caso de PEEgMA, contrarresta el efecto de la menor hidrofobicidad mientras que para el PEgMA ambos efectos se suman.

Estos resultados están en consonancia con los obtenidos en la determinación de la energía superficial del sólido (SES) donde se observa que ésta disminuye con el

contenido en EgMA, de acuerdo con la disminución de la hidrofilia y aumenta con el contenido en EEgMA, según aumenta su hidrofilia.

Ya se ha comentado en capítulos anteriores alguna de las propiedades del eugenol que le hacen un buen candidato para su incorporación en formulaciones autocurables. Sin embargo es sabido su efecto citotóxico e irritante cuando se alcanzan ciertos niveles en los tejidos.⁷⁰ Los polímeros derivados de eugenol presentan como ventaja que al mantener inmovilizada químicamente la molécula de eugenol, se impide su liberación al medio, evitando los efectos citotóxicos de éste. Los estudios de biocompatibilidad llevados a cabo muestran la ausencia de lixiviados por parte del material capaces de dañar los cultivos celulares además de permitir una muy buena adhesión sobre ellos.

Por último los experimentos llevados a cabo con cepas bacterianas indican la presencia de actividad bacteriostática debida al resto eugenilo en los copolímeros sintetizados en masa. Es conocida la existencia de materiales con actividad frente a cepas bacterianas, debida a la presencia de agentes bactericidas inmovilizados químicamente, que al no ser lixiviables, no producen halo de inhibición.⁷¹ Del mismo modo, en este estudio los copolímeros derivados de eugenol presentan un claro efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano frente a *E. coli* y *S. mutans* sin que produzcan halos alrededor de los discos de polímero indicando que el efecto bacteriostático se produce por agentes inmovilizados. Es de señalar que el efecto observado consiste en la disminución del crecimiento de colonias en la superficie del agar sobre la que se ha depositado el material. De acuerdo con esto, los materiales de restauración y resinas portadoras de los derivados acrílicos de eugenol pueden contribuir a la inhibición o reducción del desarrollo bacteriano en las zonas de contacto entre el material y el tejido sobre las que se aplique como en los procesos de formación de caries secundarias entre la superficie de la dentina y la del material de restauración.

Estos materiales con sustancias bactericidas inmovilizadas muestran su actividad únicamente frente a las bacterias con las cuales entran en contacto directo por lo que su efecto no puede extenderse a zonas lejanas del material. De este modo el efecto del componente bactericida inmovilizado es principalmente bacteriostático ya que el agente activo no puede penetrar al interior de la pared o de las membranas celulares de modo

similar a como actúan los antibióticos y sustancias bactericidas en condiciones normales.⁷² Los polímeros derivados de eugenol deben su actividad al grupo eugenilo lateral presente en las cadenas poliméricas, sin embargo su efectividad dependerá de que este resto entre en contacto con las bacterias y por tanto presente una actividad razonable. La intensidad de este contacto, depende a su vez de otros muchos factores como la existencia de interacciones de distinta naturaleza (iónicas, Van der Waals, etc.) que se produzcan entre la superficie del material y las capas más externas de la pared bacteriana.⁷³ Este tipo de interacciones están relacionadas con la humectabilidad del polímero y por tanto con la energía superficial de éste. Los distintos estudios llevados a cabo con el objetivo de relacionar la energía superficial de un sólido con su grado de interacción con bacterias estiman una menor adhesión para las superficies con mayor energía superficial (mayor hidrofilia) mientras que un cierto carácter hidrófobo favorece las interacciones polímero-bacteria.^{74,75} Sin embargo un carácter hidrófobo demasiado alto impide por su parte la adhesión celular. Diversos estudios llevados a cabo sobre copolímeros derivados de HEMA indican un rango óptimo de adhesión bacteriana sobre sus superficies, con ángulos de contacto comprendidos entre 65° y 90° mostrando menores niveles de adhesión cuanto mayor contenido en HEMA esté presente en los distintos copolímeros.^{76,77} Como consecuencia de estos efectos, en los estudios realizados en este trabajo se observa cómo los polímeros portadores de eugenilo presentan un mayor carácter inhibitorio cuanto mayor es el contenido en monómero derivado de eugenol. El mayor carácter hidrófobo de estos polímeros favorece una mayor interacción con las bacterias y por tanto una mayor accesibilidad a los restos eugenilo laterales que proporcionan el carácter bacteriostático.

Por otra parte como en el caso de los monómeros, los polímeros derivados de EEgMA al presentar el grupo espaciador entre la cadena polimérica y el resto eugenilo, presenta mayor libertad de movimiento a la vez que una mejor humectabilidad, creando un contacto más efectivo entre la superficie del polímero y de la bacteria y por tanto mostrando un mayor carácter inhibitorio de la formación de colonias bacterianas como muestran los resultados recogidos en este trabajo.

3.6.- BIBLIOGRAFÍA.

- 1 Kühn K-D. Bone Cements. *Springer*. Berlín. 2000.
- 2 Sweeny W. T. Acrylic resins in prosthetic dentistry. *Dent Clin North Am* 2: 593-601. 1958.
- 3 Tyagi A. K., Choundary V., Varma I. K. Copolymerization of methyl methacrylate and a novel allyl monomer. *Eur Polym J* 28: 419-422. 1992.
- 4 Rahim E. A., Sanda F., Masuda T. Synthesis and properties of a novel polyacetylene containing eugenol moieties. *J Macromol Sci A*41: 133-141. 2004.
- 5 Hotz P., Schlatter D., Lussi, A. The modification of the polymerisation of composite materials by eugenol-containing temporary fillings. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 102: 1461-1466. 1992.
- 6 Millstein P. L., Nathanson D. Effect of eugenol and eugenol cements on cured composite resin. *J Prosthet Dent* 50: 211-215. 1983.
- 7 Sticht F. D., Smith P. M. Eugenol: Some pharmacologic observations. *J Dent Res* 50: 1531-1535. 1971.
- 8 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.
- 9 Feng J., Lipton J. M. Eugenol: Antipyretic activity in rabbits. *Neuropharmacology* 26: 1775-1778. 1987.
- 10 Laekeman G. M., Van Hoof L., Haemers A., Vanden Berghe D. A., Herman A. G., Vlietinck A. Eugenol a valuable compound for *in vitro* experimental research and worthwhile for further *in vivo* investigation. *J Phytother Res* 4: 90-96. 1990.
- 11 Weightman B., Freeman M. A. R., Revell P. A., Braden M., Albrektsson B. E. J., Carlson L. V. The mechanical-properties of cement and loosening of the femoral component of hip replacements. *J Bone Joint Surg* 69B: 558-564. 1987.
- 12 Revell P. A., Braden M., Freeman M. A. R. Review of the biological response to a novel bone cement containing poly(ethyl methacrylate) and n-butyl methacrylate. *Biomaterials* 19: 1579-1586. 1998.
- 13 Odian G. Principles of Polymerization. 4^a ed. *Wiley Interscience*. New Jersey. 2004.
- 14 Brandrup J., Immergut E. H., Grulke E. A., Polymer Handbook. 4^a ed. *Wiley Interscience*. New York. 1999.

-
- 15 Mayo F. R., Lewis F. M. Copolymerization. I. A basis for comparing the behaviour of monomers in copolymerization. The copolymerization of styrene and methylmethacrylate. *J Am Chem Soc* 66: 1594-1601. 1944.
- 16 Fineman M., Ross S. D. Linear method for determining monomer reactivity ratios in copolymerization. *J Polym Sci* 5: 259-265. 1950.
- 17 Kelen T., Tüdös F. Analysis of linear methods for determining copolymerisation reactivity ratios I. A new improved linear graphic method. *J Macromol Sci A9*: 1-27. 1975.
- 18 Tidwell P. W., Mortimer G. A. An improved method of calculating copolymerization reactivity ratios. *J Polym Sci* 3(A): 369-387. 1965.
- 19 Behnken D. W. Estimation of copolymer reactivity ratios: an example of nonlinear estimation. *J Polym Sci* 2(A): 645-668. 1964.
- 20 Moré J. J. The Levenberg-Marquardt algorithm: implementation and theory. *Lect Notes Math* 630: 105-116. 1978.
- 21 Randall J. C. Polymer Sequence Determination. *Academic Press*. New York. 1977.
- 22 Bovey F. A. Polymer Conformation and Configuration. *Academic Press*. New York-London. 1969.
- 23 Alfrey J., Bohrer J. J., Mark H. F. Copolymerization. *Interscience*. New York. 1952.
- 24 Gallardo A., Lozano A. E. Ciencia y Tecnología de Materiales poliméricos, Volumen I. Capítulo 2.1. *Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros*. Madrid. 2004.
- 25 Bovey F. A., Heatley F., McBrierty V. J. En *Comprehensive Polymer Science: The Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymers* (1). *Pergamon Press*. Capítulos 17-19: 339-428. 1989.
- 26 Bovey F. A. High Resolution NMR of Macromolecules. 1ª ed. *Academic Press Inc*. New York. 1972.
- 27 Jasse B. Developments in polymer characterization. *Macromolecular Symposia* 4: 91-129. 1983.
- 28 Hsu S. L. En *Comprehensive Polymer Science: The Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymers* (1). *Pergamon Press*. Capítulo 20: 429-468. 1989.
- 29 Cerrada M. L. Tendencias actuales en la caracterización de polímeros. *Rev Plast Mod* 83: 501-509. 2002.

-
- 30 Dawkins J. V. En *Comprehensive Polymer Science: The Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymers (1)*. *Pergamon Press*. Capítulo 12: 231-258. 1984.
- 31 Barrall E. M., Jonson J. F. *Techniques and Methods of Polymer Evaluation*. *Marcel Dekker, Inc.* Nueva York. 1970.
- 32 Richardson M. J. En *Comprehensive Polymer Science: the Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymers (1)*. *Pergamon Press*. Capítulos 36: 867-902. 1989.
- 33 McCallum J. R. En *Comprehensive Polymer Science: the Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymers (1)*. *Pergamon Press*. Capítulo 37: 903-936. 1989.
- 34 Winter H. H., Tours M. Rheology of polymers near liquid-solid transitions. *Adv Polym Sci* 134: 165-234. 1996.
- 35 Barnes H. A., Hutton J. F., Walters K. *An Introduction to Rheology*. *Elsevier* Capítulo 3: 37-54. 1989.
- 36 Schramm G. *A Practical Approach to Rheology and Rheometry*. *Haake*. Karlsruhe. 1994.
- 37 Lawrence E. N. *Mechanical Properties of Polymers and Composites*. *Mardel Dekker*. New York. 1974.
- 38 Ferry J. D. *Viscoelastic Properties of Polymers*. *John Wiley & Sons*. Madrid. 1980.
- 39 de 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.
- 40 Jacqueline I. K., Herman F. M. *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*. Vol 3. 3ª ed. *John Wiley & Sons*. New Jersey. 2003.
- 41 Rubinstein M., Colby R. H. *Polymer Physics*. *Oxford University Press*. Oxford. 2003.
- 42 Wood-Adams P. M., Dealy J. M. Using rheological data to determine the branching level in metallocene polyethylenes. *Macromolecules* 33: 7481-7488. 2000.
- 43 Wood-Adams P. M., Dealy J. M. Effect of molecular structure on the linear viscoelastic behaviour of polyethylene. *Macromolecules* 33: 7489-7499. 2000.

-
- 44 Fernández E., López D., López-Cabarcos E., Mijangos C. Viscoelastic and swelling properties of glucose oxidase loaded polyacrylamide hydrogels and the evaluation of their properties as glucose sensors. *Polymer* 46: 2211-2217. 2005.
- 45 Baier R. E., Meyer A. E., Natiella J. R., Natiella R. R., Carter J. M. Surface properties of determine bioadhesive outcomes: methods and results. *J Biomed Mater Res* 18: 337-335. 1984.
- 46 Tamada Y., Ikada Y. Cell attachment to various polymer surfaces. En *Polymers in Medicine II: Biomedical and Pharmaceutical Applications*. E. Chiellini. New-York-London. 1986.
- 47 Owens D. K., Wendt R. C. Estimation of the surface free energy of polymers. *J Appl Pol Sci* 13: 1741-1747. 1969.
- 48 Fowkes F. M. Predicting attractive forces at interfaces. *Ind Eng Chem* 56: 40-53. 1964.
- 49 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.
- 50 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.
- 51 Gloeckner H., Jonuleit T., Lemke H. D. Monitoring of cell viability and cell growth in a hollow-fiber bioreactor by use of the dye Alamar BlueTM. *J Immunol Methods* 252: 131-138. 2001.
- 52 Denizot F., Lang R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure living improved sensitivity and reability. *J Immunol Methods* 89: 271- 277. 1986.
- 53 Bauer A. W., Kirby W. M., Sherris J. C., Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol* 45: 493-496. 1966.
- 54 Hoffman A. S. Biologically functional materials. En *Biomaterials Science*. Academia Press. San Diego. 1996.
- 55 Cutrecasa P., Anfinsen C. B. Affinity chromatography. *Ann Rev Biochem* 40: 259-278. 1971.
- 56 Kopecek J. Soluble biomedical polymers. *Polymer Med* 7: 191-221. 1977.

- 57 Rojo L., Vázquez B., Parra J., López-Bravo S., Deb S., San Román J. From natural products to polymeric derivatives of eugenol. A new approach of dental composites and orthopaedic bone cements. *Biomacromolecules* 7: 2751-2761. 2006.
- 58 Elias H. G. Chemical Structures and Synthesis. En *Macromolecules*. Volumen 1. *Wiley-VCH*. Weinheim. 2005.
- 59 Heatley F., Lovell P. A. NMR studies of free-radical polymerization of monomers and polymers containing allyl groups. *Eur Polym J* 29: 255-268. 1993.
- 60 Simon W., Clerc T. Elucidación Estructural de Compuestos Orgánicos por Métodos Espectroscópicos. Tomo I. *Ed. Alambra*. Madrid. 1970.
- 61 Rempp P. F., Franta E. Macromonomers: synthesis, characterization and applications. *Adv Polym Sci* 58: 1-53. 1984.
- 62 Meijs G. F., Rizzardo E. Reactivity of macromonomers in free radical polymerization. *J Macromol Sci R.M.C.P.* C30: 305-377. 1990.
- 63 Vázquez B., Gurruchaga M., Goñi I., Narvarte E., San Román J. pH-sensitive hydrogen based on poly(ethoxy triethylene glycol monomethacrylate) *Polymer* 36: 3327-3333. 1995.
- 64 Prime R. B. Thermal Characterization of Polymeric Materials. Capítulo 6. 1379-1776. 2ª ed. *Academia Press*. New York. 1997.
- 65 Smith S. D., Long T. E., McGrath J. E. Thermogravimetric analysis of poly(alkyl methacrylates) and poly(methylmethacrylate-g-dimethyl siloxane) graft copolymers. *J Polym Sci Part A: Polym Chem* 32: 1747-1753. 1994.
- 66 Kashiwagi T., Inaba A., Brown J. E., Hatada K., Kitayama T., Masuda E. Effects of weak linkages on the thermal and oxidative degradation of poly(methyl methacrylates). *Macromolecules* 19: 2160-2168. 1986.
- 67 Ortiz C., Vázquez B., San Román J. Hydrophilic acrylic biomaterials derived from vitamin E with antioxidant properties. *J Biomed Mater Res* 45: 184-191. 1999.
- 68 Burrow M. F., Inokoshi S. T. Water sorption of several bonding resins. *Am J Dent* 12: 295-298. 1999.
- 69 Hutcheon G. A., Messiou C., Wyre R. M., Davies M. C., Downes S. Water absorption and surface properties of novel poly(ethylmethacrylate) polymer systems for use in bone and cartilage repair. *Biomaterials* 22: 667-676. 2001.
- 70 Gerosa R., Borin M., Menegazzi G., Puttini M., Cavalleri G. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of pure eugenol. *J Endod* 22: 532-534. 1996.

-
- 71 Isquith A. J., Abbot E. A., Walters P. A. Surface-bonded antimicrobial activity of an organosilicon quaternary ammonium chloride. *App Microbiol* 24: 859-863. 1972.
- 72 Imazato S. Antibacterial properties of resin composites and dentin bonding system. *Dent mater* 19: 449-457. 2003.
- 73 Berkeley R. C. W. Microbial Adhesion to Surfaces. *R.C.W.* London. 1980.
- 74 Good R. J., Islam M., Baier R. E., Meyer A. E. The effect of surface hydrogen bonding (acid-base interactions) on the hydrophobicity and hydrophilicity of copolymers: variation of contact angles and cell adhesion and growth with composition. *J Disper Sci Technol* 19: 1163-1173. 1998.
- 75 Absolom D. R., Lamberti F. V., Policova Z., Zingg W., Van Oss C. J., Neumann A. W. Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Appl Envir Microbiol* 46: 90-97. 1983.
- 76 Harkes G., Feijen J., Dankert J. Adhesion of escherichia coli on to a series of poly(methacrylates) differing in charge and hydrophobicity. *Biomaterials* 12: 853-860. 1991.
- 77 Hogt A. H., Dankert J., Feijen J. Adhesion of coagulase-negative staphylococci to methacrylate polymers and copolymers. *J Biomed Mater Res* 20: 533-545. 1986.

CAPÍTULO 4.
APLICACIONES ESPECIALES
DE LOS DERIVADOS
ACRÍLICOS DE EUGENOL.

CAPÍTULO 4. APLICACIONES ESPECIALES DE LOS DERIVADOS ACRÍLICOS DE EUGENOL.

4.1.- CEMENTOS ACRÍLICOS AUTOCURABLES DERIVADOS DE EUGENOL.

4.1.1.- INTRODUCCIÓN.

Los distintos materiales empleados en odontología y ortopedia han ido evolucionando de forma más o menos paralela a otros campos como la química, la física o la ingeniería. Sin embargo, el gran desarrollo que ha tenido la ciencia de los biomateriales en las últimas décadas ha supuesto un gran avance en su uso e implantación como materiales de restauración ortopédica y dental. Como se ha comentado ampliamente en la introducción, las aplicaciones de los sistemas acrílicos autocurables se encuentran por un lado, en la reparación y sustitución de tejidos duros y por otro lado, en la implantación de éstos como componentes dentales.

Dentro de las aplicaciones en tejido duro, una de las más importantes a destacar desde el punto de vista histórico, es su utilización como material de fijación de diversos tipos de prótesis como son la de cadera¹ o rodilla,² donde el cemento actúa como material de relleno entre el hueso y la prótesis. Sin embargo, debido a las ventajas que presentan estos sistemas en cuanto a su gran capacidad de adaptación a cavidades de perfiles complejos e irregulares, su uso se ha ido extendiendo con los años a otras aplicaciones como son la reparación de defectos óseos en cirugía craneofacial y maxilofacial,³ así como al tratamiento de tumoraciones.⁴ Por otra parte, y aprovechado la inyectabilidad de estos sistemas, si bien con necesidad de adaptaciones apropiadas de las formulaciones comerciales, desde los comienzos de los años 80, estos sistemas se vienen empleando en las técnicas de vertebroplastia percutánea y desde 1999 se aplica en la técnica de cifoplastia, que es una variante de la vertebroplastia. Estas técnicas denominadas también de cirugía de mínima invasión, tienen por objeto la estabilización del cuerpo vertebral mediante inyección del cemento evitando el progreso del colapso y con gran alivio del dolor. Actualmente esta técnica se aplica en tres cuadros

principalmente: angiomas vertebrales agresivos, metástasis óseas y sobre todo en fracturas osteoporóticas vertebrales por compresión, que es su uso mayoritario hoy en día. Además, recientemente el empleo de los cementos acrílicos inyectables se va ampliando hacia el tratamiento de fracturas traumáticas, es decir, fracturas debidas a accidentes o caídas y sin ninguna enfermedad asociada, cuando los tratamientos médicos u ortopédicos fracasan.^{5,6}

Las resinas acrílicas son sistemas muy utilizados en odontología restauradora gracias a su fácil manipulación, bajo coste y excelente biocompatibilidad. Así, el uso de resinas acrílicas abarca múltiples aplicaciones de las que cabe hacer mención algunas de las más relevantes como son la fabricación de dientes artificiales, los cementos de restauración, bases para prótesis, fondos de cavidades y materiales de obturación provisional.⁷ En el caso de los dientes artificiales, en sus comienzos, la materia prima básica empleada en la fabricación de los mismos era el poli(metacrilato de metilo) pero en la actualidad, a pesar de que estas composiciones iniciales todavía se mantienen denominándose convencionales, se han desarrollado sistemas a base de resinas acrílicas con cadenas poliméricas interpenetradas así como sistemas compuestos con rellenos inorgánicos como partículas de cuarzo, que mejoran las propiedades mecánicas. Hoy en día, sin embargo, sigue siendo tema de debate qué tipo de material o resina acrílica se debe usar en su fabricación⁸ ya que aun se requiere mejorar propiedades como dureza, resistencia a compresión y módulo de elasticidad, entre otras.

En cuanto a los cementos de restauración, bases para prótesis, fondos de cavidades y materiales de obturación provisional, en este caso se lleva a cabo la formación del polímero *in situ*, es decir en el propio lugar de la aplicación, utilizándose formulaciones similares a las descritas para los sistemas acrílicos autocurables para aplicación en tejido duro, por tanto las formulaciones no solo incluyen polímeros sino también los monómeros, iniciadores y catalizadores necesarios. En los sistemas que se emplean para bases de prótesis, se modifica la relación sólido:líquido con el fin de aumentar el tiempo de manipulación y permitir una mejor difusión e impregnación del polímero, consiguiendo una interfaz más homogénea. En cuanto al resto de las aplicaciones, a veces se suelen añadir pigmentos en la fase sólida, como sales de cadmio o hierro o bien pigmentos orgánicos, fibras con fines estéticos, y plastificantes para mejoran la ductilidad en aquellos casos que fuera necesario. También se puede

conseguir una plastificación intrínseca del sistema utilizando otros polimetacrilatos cuyos grupos laterales presenten un mayor grado de libertad como el poli(metacrilato de butilo), así como copolímeros de composición adecuada.

4.1.2.- OBTENCIÓN DE LAS PARTÍCULAS ESFÉRICAS DE POLI(METACRILATO DE ETILO).

La obtención de las partículas esféricas (perlas) de poli(metacrilato de etilo) se realiza mediante polimerización radical en suspensión del monómero EMA en presencia de PVA como agente surfactante.

En este tipo de polimerización en suspensión, el monómero EMA se dispersa mediante agitación en un medio acuoso continuo. La emulsión del monómero se estabiliza mediante el PVA que actúa como agente de suspensión. El BPO usado como iniciador es soluble en el monómero y muy poco en el agua por lo que la polimerización tiene lugar en el interior de las gotas de monómero.⁹ En realidad, se puede considerar cada una de las gotas como un pequeño reactor independiente donde tiene lugar la polimerización en masa.

En el esquema básico de la polimerización en suspensión estándar, en cada gota va a darse el proceso completo de polimerización: iniciación, propagación y terminación.¹⁰

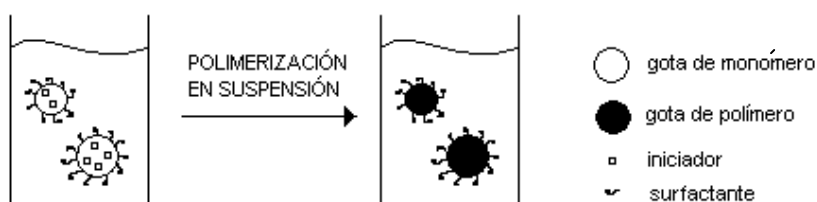


Figura 4.1 Esquema de la polimerización en suspensión.

El producto final de la reacción son unas partículas esféricas cuyo tamaño depende de numerosos factores como son la temperatura, el diseño del reactor, la velocidad de agitación, etc. En general se obtienen menores tamaños de partícula al

aumentar la agitación, la relación agua/monómero o la concentración del estabilizante. El diseño del reactor es también un factor muy importante en el rendimiento final del proceso.

El PEMA obtenido a partir de la polimerización en suspensión del monómero EMA consiste en unas partículas esféricas blancas. El rendimiento global de la reacción tras el lavado, secado y tamizado con un filtro de 250 μm , es del 60%.

La figura 4.2 muestra el espectro de RMN ^1H de las perlas de PEMA obtenido en cloroformo deuterado. En la tabla 4.1 se recogen los desplazamientos químicos de las señales obtenidas así como la asignación de cada una de ellas en función de la numeración establecida en la figura 4.2.

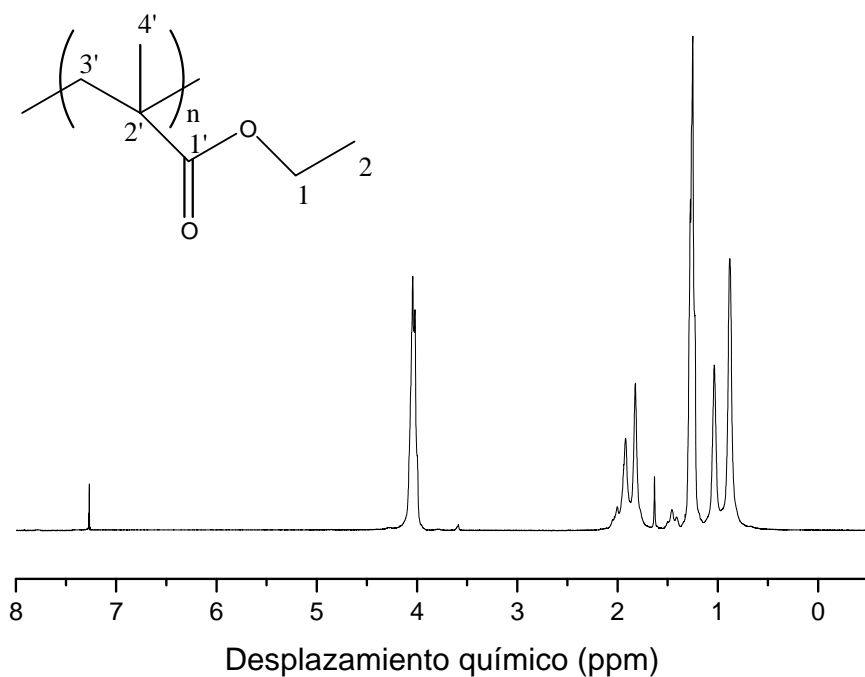


Figura 4.2 Espectro de RMN ^1H de las partículas de poli(metacrilato de etilo) en cloroformo-d.

Partículas de PEMA RMN ¹ H	
δ (ppm)	Asignación
4,0	H ₁
1,9	H ₃ , rmr
1,8	H ₃ , rrr
1,45	H ₄ , mm
1,25	H ₂
1,05	H ₄ , mr
0,88	H ₄ , rr

Tabla 4.1 Desplazamientos químicos de las señales RMN ¹H de las partículas de poli(metacrilato de etilo) (referencia TMS).

El tamaño de las partículas obtenidas se analiza mediante técnicas de difracción de luz según el procedimiento descrito en la sección experimental (apartado 1.5.1.1). La figura 4.3 muestra la distribución del diámetro de partícula en volumen para el PEMA tanto sintetizado como el comercial.

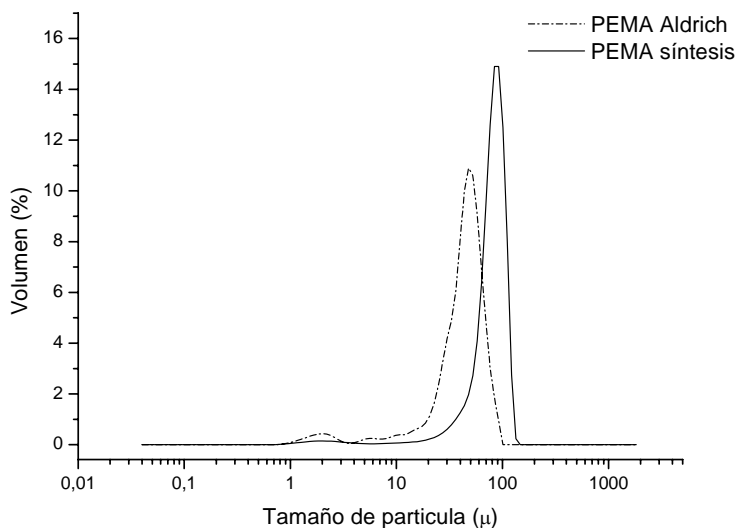
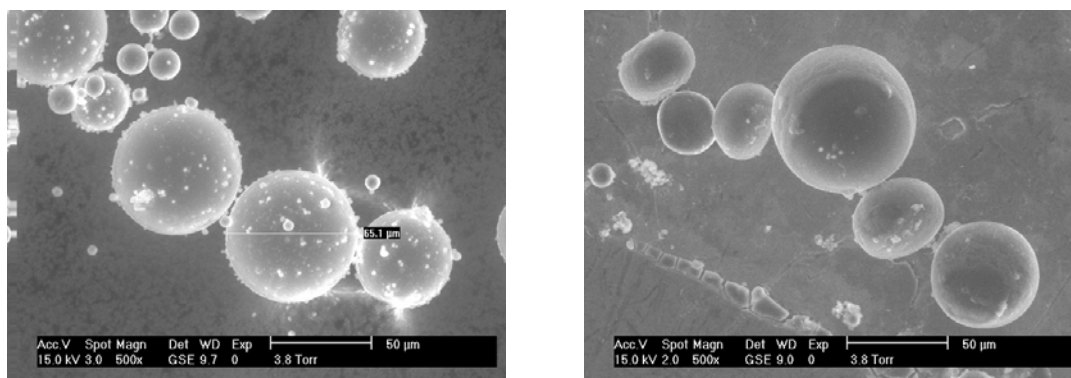


Figura 4.3 Diagrama de la distribución de tamaños para las partículas de PEMA comerciales (Aldrich) y sintetizadas en este trabajo mediante polimerización radical en suspensión.

Los diámetros medios obtenidos son 82,1 μm para el PEMA de síntesis y 46,2 μm para la muestra comercial de Aldrich.

Así mismo, las partículas se caracterizan por Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental (MEBA). En las micrografías tomadas se observa cómo las partículas obtenidas de síntesis presentan una geometría esférica con un tamaño de partícula homogéneo así como la ausencia de restos de PVA adherido a la superficie. En la figura 4.4 se observa este resultado y se compara con las micrografías tomadas del PEMA suministrado por Aldrich en las cuales se puede comprobar una mayor polidispersidad en el tamaño de partícula así como una mayor adhesión de impurezas sobre su superficie a la vez que irregularidades en la forma.

A:



B:

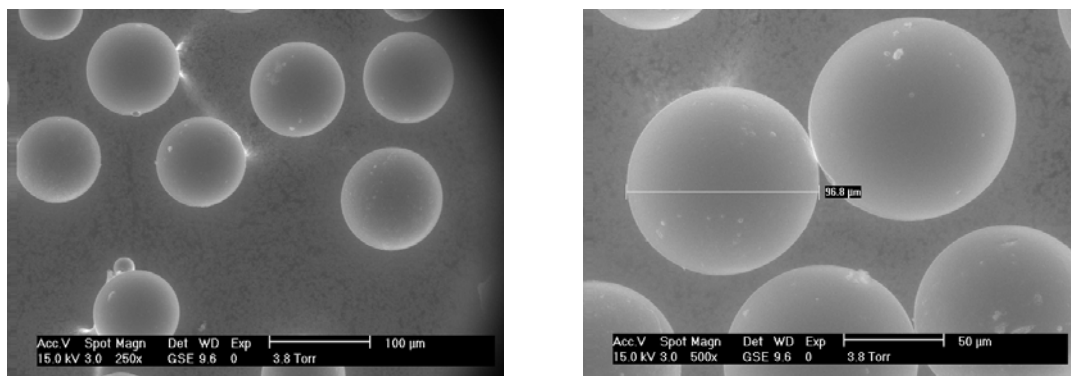


Figura 4.4 A: Partículas de PEMA suministradas por Aldrich. B: Partículas de PEMA sintetizadas mediante polimerización radical en suspensión.

Por último, se determina el peso molecular promedio en número \overline{M}_n y promedio en peso \overline{M}_w de las partículas de PEMA mediante Cromatografía de Exclusión de Tamaños (SEC) siguiendo el apartado 1.2.1.3. El cromatograma registrado muestra una

curva típica de distribución de pesos moleculares para este tipo de polímeros acrílicos, de la que se obtienen los pesos moleculares y el índice de polidispersidad IP, que se muestran en la tabla 4.2.

\bar{M}_w (x 10 ⁻⁵ Da)	\bar{M}_n (x 10 ⁻⁵ Da)	IP
6,65	1,69	3,9

Tabla 4.2 Pesos moleculares promedio en peso (\bar{M}_w) y en número (\bar{M}_n), y polidispersidades (IP) de las partículas de PEMA sintetizadas mediante polimerización radical en suspensión.

4.1.3.- FORMULACIONES AUTOCURABLES DERIVADAS DE EUGENOL.

En este apartado se recogen los resultados de los experimentos realizados para la caracterización de las formulaciones autocurables preparadas según el procedimiento descrito en la sección experimental y sobre las que se incorporan bien las partículas de poli(metacrilato de etilo) descritas anteriormente sobre la fase sólida, o bien otras partículas comerciales basadas en PMMA, además de distintas proporciones de los monómeros derivados de eugenol EgMA y EEgMA como componentes de la fase líquida. En todos los casos se añade un 8% p/p de BaSO₄ sobre la fase sólida.

4.1.3.1.- PARÁMETROS DE CURADO.

Para la determinación de los parámetros de curado se registra la variación de la temperatura de la masa polimerizante conforme transcurre el tiempo de curado del material. Así se obtienen los perfiles temperatura-tiempo como los que se representa en la figuras 1.14. La temperatura máxima (T_{max}) es la registrada en el máximo de la exoterma y el tiempo de fraguado (t_f) es el tiempo donde la temperatura de la masa es:

$$T_{amb} + \frac{T_{máx} - T_{amb}}{2} \quad Ec 4.1$$

siendo T_{amb} la temperatura ambiente (23 ± 1 °C). Los valores obtenidos de T_{max} y t_f de las distintas formulaciones ensayadas en este trabajo se recogen en la tabla 4.3.

Las figura 4.5 y 4.6 muestran las exotermas de polimerización de las distintas formulaciones de cementos acrílicos portadores de los monómeros EgMA y EEgMA respectivamente, preparadas en este trabajo.

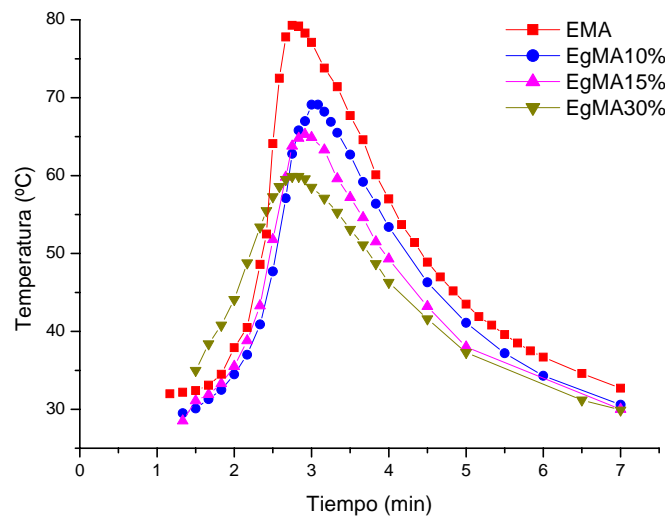


Figura 4.5 Variación de la temperatura con el tiempo de curado de las formulaciones modificadas con EgMA y preparadas con PEMA.

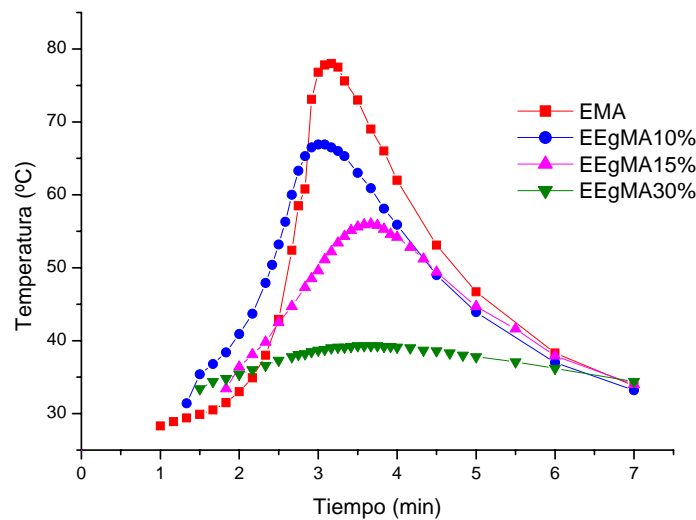


Figura 4.6 Variación de la temperatura con el tiempo de curado de las formulaciones modificadas con EEgMA y preparadas con PEMA.

Formulación	% MEg* (fase líquida)	T^a_{max} (°C) [D.S.]	t_f (min) [D.S.]
PEMA/EMA	0	76,8 [2,7]	2,5 [0,3]
PEMA/EMA/EgMA	10	66,8 [1,8]	2,5 [0,2]
	15	65,3 [1,5]	2,5 [0,1]
	30	63,0 [1,9]	2,0 [0,1]
PEMA/EMA/EEgMA	10	63,2 [2,3]	2,5 [0,3]
	15	55,2 [1,0]	2,5 [0,2]
	30	39,0 [0,4]	1,5 [0,2]

Tabla 4.3 Temperaturas máximas y tiempos de fraguado medios ($n = 4$) de los distintos cementos acrílicos derivados de eugenol y formulados con partículas de PEMA en relación sólido líquido 2:1. * % MEg = Monómero derivado de eugenol, EgMA o EEgMA, presente en la fase líquida. [D.S.] = Desviación estándar.

En ambas figuras se observa una tendencia similar, disminuyendo la temperatura máxima a medida que aumenta el contenido de monómero derivado de eugenol. El efecto es mucho más acusado en las formulaciones derivadas de EEgMA que en las de EgMA llegando incluso a bajar hasta los 39° C para la formulación al 30% en EEgMA, temperatura ésta muy similar a la corporal.

4.1.3.2.- MONÓMERO RESIDUAL.

Los distintos contenidos en monómero residual (CMR) total (metacrilato de etilo + metacrilato derivado de eugenol, EgMA o EEgMA en cada caso) determinados mediante RMN ¹H se muestran en la tabla 4.4.

Formulación	% MEg* (fase líquida)	CMR (%p/p) [D.S.]
PEMA/EMA	0	3,9 [0,1]
PEMA/EMA/EgMA	10	4,7 [0,1]
	15	4,8 [0,3]
	30	4,9 [0,5]
PEMA/EMA/EEgMA	10	5,5 [0,6]
	15	5,9 [0,7]
	30	5,3 [0,8]

Tabla 4.4 Contenido medio ($n = 3$) de monómero residual (CMR) después del almacenamiento de las muestras en aire durante 7 días a 37 °C. * % MEg = Monómero derivado de eugenol, EgMA o EEgMA presente en la fase líquida. [D.S.] = Desviación estándar.

Los valores obtenidos se encuentran dentro del intervalo normal recogido en la bibliografía¹¹ presentando un ligero aumento en la cantidad de monómero residual cuando las formulaciones incluyen monómeros derivados de eugenol comparado con la que no presenta.

4.1.3.3.- PROPIEDADES MECÁNICAS DE LOS CEMENTOS ACRÍLICOS DERIVADOS DE EUGENOL.

Las propiedades mecánicas de las formulaciones autocurables derivadas de eugenol se evalúan mediante ensayos estáticos de tracción, compresión y flexión a tres y cuatro puntos. Los ensayos de compresión y flexión a cuatro puntos se determinan siguiendo la norma de cementos óseos ISO 5833¹² sobre las formulaciones basadas en

poli(metacrilato de etilo)/metacrilato de etilo. Debido a la naturaleza frágil de los cementos de base acrílica resulta de interés llevar a cabo también el ensayo de tracción, a pesar de que no se contempla en esta norma.

Por otra parte el ensayo de flexión a cuatro puntos se realiza siguiendo las especificaciones de la norma de cementos dentales ISO 4049¹³ sobre formulaciones basadas en poli(metacrilato de metilo)/metacrilato de metilo. Para ello se utilizan las partículas de PMMA suministradas por Plexigum® descritas en la tabla 1.1.

La tabla 4.5 recoge los valores de resistencia a la compresión (σ_c) y módulo de Young (E_c), obtenidos para los cementos basados en PEMA. En ellos se observa un refuerzo de hasta un 8% en resistencia a la compresión para los cementos que incorporan un 15% de EgMA perdiendo este refuerzo al aumentar la cantidad de monómero derivado de eugenol. Para el caso del monómero EEgMA aunque también se produce este refuerzo es sensiblemente menor, alcanzando su máximo para un 10% de monómero EEgMA presente en la fase líquida.

Formulación	% MEg* (fase líquida)	σ_c [D.S.] (MPa)	E_c [D.S.] (GPa)
PEMA/EMA	0	50 [2]	0,7 [0,1]
PEMA/EMA/EgMA	10	52 [2]	0,9 [0,03]
	15	54 [3]	0,8 [0,1]
	30	51 [2]	0,8 [0,1]
PEMA/EMA/EEgMA	10	53 [3]	0,9 [0,1]
	15	51 [2]	0,8 [0,1]
	30	49 [3]	0,8 [0,1]

Tabla 4.5 Propiedades mecánicas en compresión de formulaciones basadas en el sistema PEMA/EMA/MEg. * % MEg = Monómero derivado de eugenol, EgMA o EEgMA. [D.S.] = Desviación estándar ($n = 5$).

Los resultados de los ensayos de resistencia a la flexión tanto en tres como en cuatro puntos para las distintas formulaciones derivadas de eugenol se recogen en la tabla 4.6.

% MEg* (fase líquida)	σ_{3P} [D.S.]** (MPa)	σ_{4P} [D.S.]*** (GPa)
0	49 [3]	56 [8]
10	64 [5]	60 [4]
15	56 [6]	67 [1]
30	33 [6]	45 [5]
10	53 [9]	78 [6]
15	61 [9]	64 [2]
30	48 [3]	61 [6]

Tabla 4.6 Propiedades mecánicas de flexión. * = Monómero derivado de eugenol, EgMA o EEgMA. ** = Ensayo realizado sobre las formulaciones PMMA/MMA/MEg. *** = Ensayo realizado sobre las formulaciones PEMA/EMA/MEg. [D.S.] = Desviación estándar ($n = 5$).

En este tipo de ensayos, el refuerzo conseguido mediante la adición de los monómeros derivados de eugenol es sensiblemente superior en ambos casos alcanzando niveles de refuerzo del 30% y del 24% con la adición de los monómeros EgMA y EEgMA respectivamente, frente a la flexión a tres puntos. Los ensayos de resistencia a la flexión en cuatro puntos muestran un refuerzo máximo del 20% para el monómero EgMA y del 39% para el monómero EEgMA. En todos los casos, tras alcanzar los niveles máximos de refuerzo la adición de una mayor cantidad de monómero derivado de eugenol conlleva una pérdida gradual de los niveles de refuerzo.

Las probetas sometidas a los ensayos de flexión a cuatro puntos se estudian mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental. Las micrografías obtenidas (figuras 4.7, 4.8, 4.9 y 4.10) muestran la presencia de una matriz polimérica (zonas oscuras) formada durante el curado, sobre la que se distribuyen las partículas y agregados de BaSO₄, así como las partículas esféricas prepolimerizadas de PEMA y/o PMMA en cada caso. Este modelo de estructura para cementos acrílicos es consistente con los descritos en trabajos anteriores.¹⁴ Es observable también la presencia de huecos y poros distribuidos aleatoriamente en el interior de la masa polimérica que actúan como puntos de propagación de las microgrietas.¹⁵ Por otro lado se observa la presencia de mayor cantidad de partículas prepolimerizadas desprendidas en el cemento

formulado con PMMA en comparación con el de PEMA y en éste a su vez, la cantidad es mayor en comparación con los que contienen derivados de eugenol, lo que sugiere una mayor adhesión entre la matriz y las partículas¹⁶ en los cementos formulados con los derivados de eugenol, sobre los cuales en el proceso de formación del frente de rotura, las partículas de PEMA se quedan adheridas a la matriz polimérica.

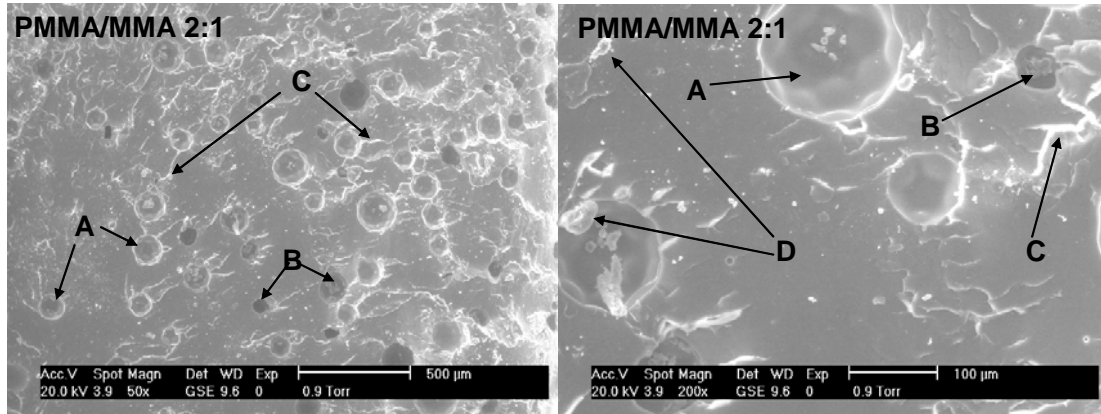


Figura 4.7 Micrografías de las superficies de fractura tomadas de las probetas sometidas al ensayo de resistencia a flexión en cuatro puntos de los cementos formulados basados en PMMA/MMA. Se observa la presencia de partículas esféricas de PMMA (A), así como la presencia de micro y macroporos (B), formación de microgrietas (C) y presencia de agregados de $BaSO_4$ en el interior de la matriz de polímero PMMA (D).

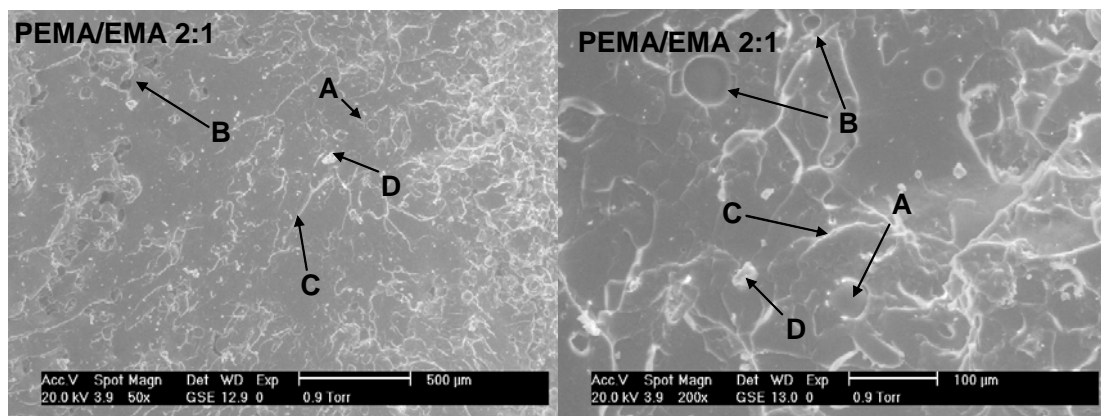


Figura 4.8 Micrografías de las superficies de fractura tomadas de las probetas sometidas al ensayo de resistencia a flexión en cuatro puntos de los cementos formulados basados en PEMA/EMA. Se observa la presencia de partículas esféricas de PEMA (A), así como la presencia de micro y macroporos (B), formación de microgrietas (C) y presencia de agregados de $BaSO_4$ en el interior de la matriz de polímero PEMA (D).

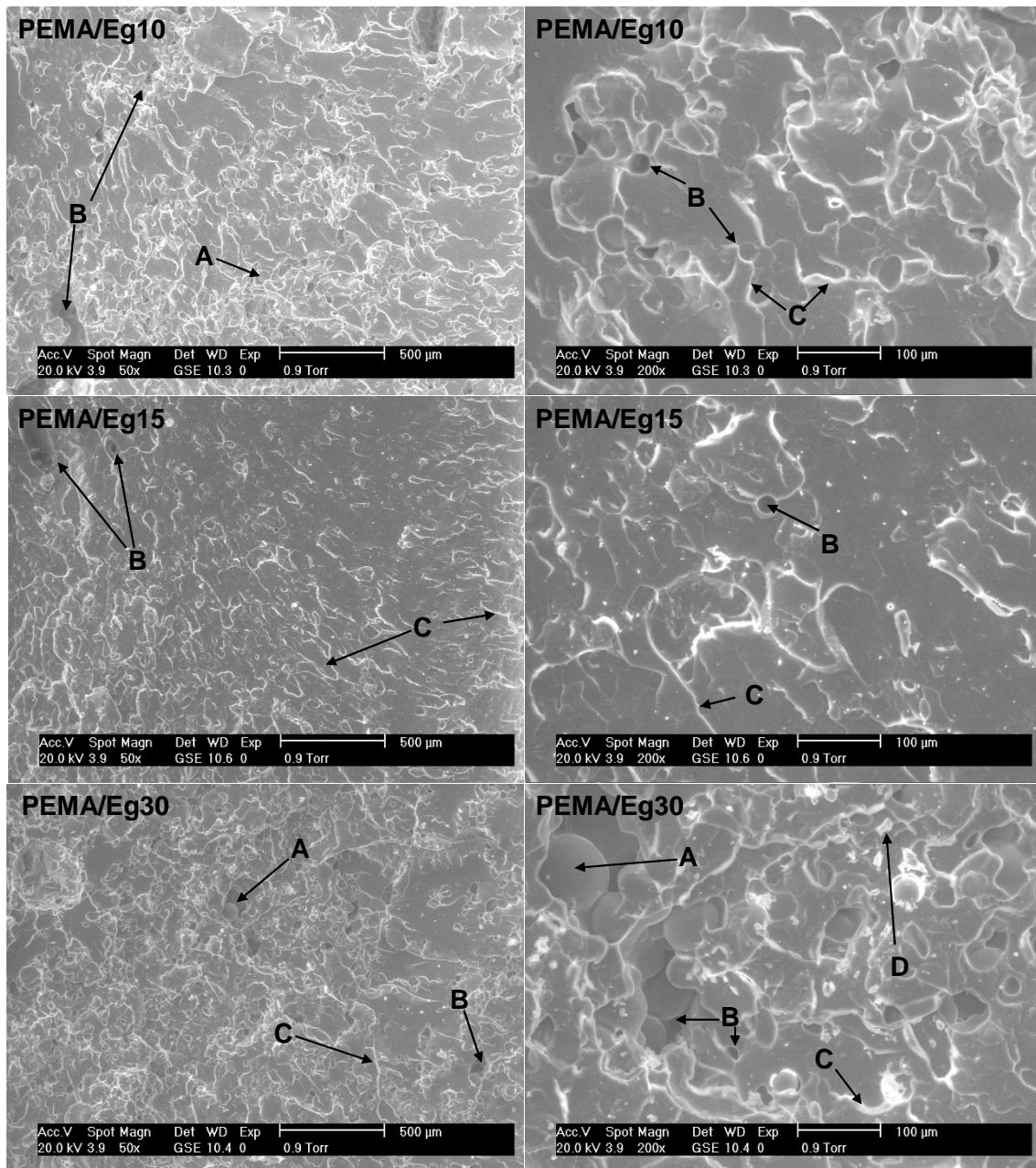


Figura 4.9 Micrografías de las superficies de fractura tomadas de las probetas sometidas al ensayo de resistencia a flexión en cuatro puntos de los distintos cementos basados en PEMA/EMA/EgMA. Se observa la presencia de partículas esféricas de PEMA (A), así como la presencia de micro y macroporos (B), formación de microgrietas (C) y presencia de agregados de BaSO₄ en el interior de la matriz de copolímero p(EMA-co-EgMA) (D).

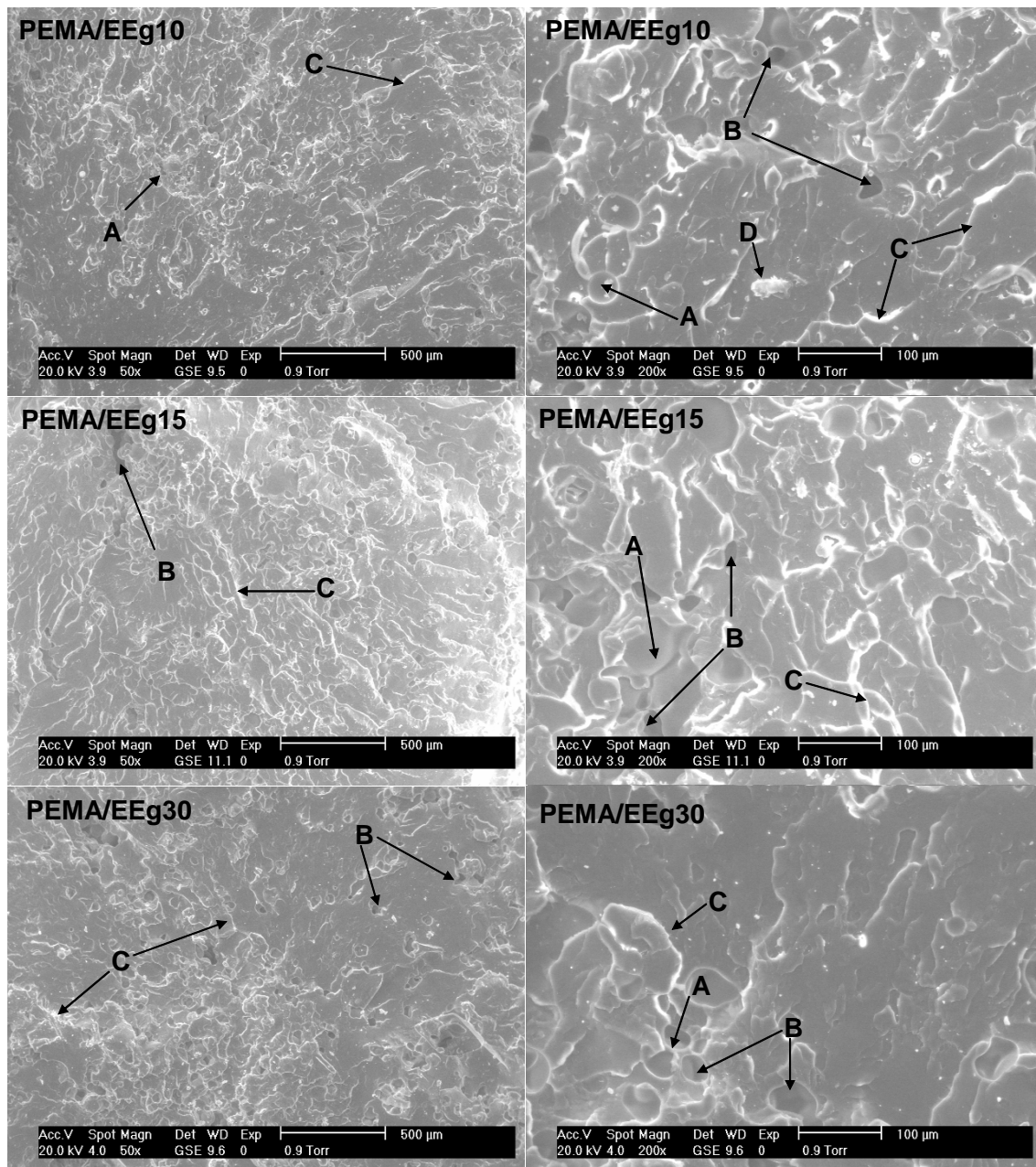


Figura 4.10 Micrográficas de las superficies de fractura tomadas de las probetas sometidas al ensayo de resistencia a flexión en cuatro puntos de los distintos cementos basados en PEMA/EMA/EEgMA.. Se observa la presencia de partículas esféricas de PEMA (A), así como la presencia de micro y macroporos (B), formación de microgrietas (C) y presencia de agregados de BaSO₄ en el interior de la matriz de copolímero p(EMA-co-EEgMA) (D).

Como se recoge en la parte experimental, los ensayos de resistencia a la tracción (σ_T) sólo se realizan sobre las formulaciones basadas en el sistema PEMA/EMA/EgMA cuyos resultados se muestran en la tabla 4.7. En este tipo de ensayo se observa una mejora en la respuesta de las formulaciones que presentan los derivados de eugenol llegando a niveles de refuerzo del 42% de resistencia a la tracción para los cementos formulados con un 10% de EgMA en la fase líquida. Estos niveles de refuerzo aunque menores, se mantienen un 10% por encima de los cementos formulados sin este monómero tras el almacenamiento en SBF durante 6 semanas.

% EgMA (fase líquida)	24 h		6 semanas	
	Carga Máxima (kN) [D.S.]	σ_T (MPa) [D.S.]	Carga Máxima (kN) [D.S.]	σ_T (MPa) [D.S.]
0	0,28 [0,02]	20,7 [1,0]	0,33 [0,05]	24,5 [3,0]
10	0,40 [0,04]	29,4 [1,9]	0,37 [0,07]	26,9 [1,9]
15	0,36 [0,05]	25,8 [3,2]	0,36 [0,06]	26,8 [2,7]
30	0,39 [0,06]	23,7 [11,1]	0,38 [0,08]	25,5 [4,9]

Tabla 4.7 Propiedades mecánicas en tracción de los cementos formulados con EgMA. [D.S.] = Desviación estándar ($n = 5$).

4.1.3.4.- PROPIEDADES TÉRMICAS DE LOS CEMENTOS ACRÍLICOS DERIVADOS DE EUGENOL.

Las propiedades térmicas de los cementos acrílicos formulados con los derivados de eugenol PEMA; Eg10; Eg15; Eg30; EEg10; EEg15 y EEg30 se estudian mediante Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC) y Análisis Termogravimétrico (TGA).

Como se ha discutido en el capítulo anterior, la incorporación de los monómeros EgMA y EEgMA en polímeros metacrílicos conlleva un cambio en la flexibilidad de las cadenas poliméricas. Por otro lado la reacción de copolimerización de estos monómeros produce una restricción en su movilidad debido al entrecruzamiento que se produce

durante el curado de los mismos. La contribución de ambos efectos sobre los cementos acrílicos formulados en este trabajo se estudia determinando la temperatura de transición vítrea de todos ellos. La figura 4.11 muestra los termogramas registrados en las mismas condiciones que las utilizadas en el apartado 1.2.1.3 donde se puede observar que la T_g aumenta gradualmente a medida que se incorpora el monómero EgMA y disminuye a medida que el EegMA se incorpora a los cementos con EMA.

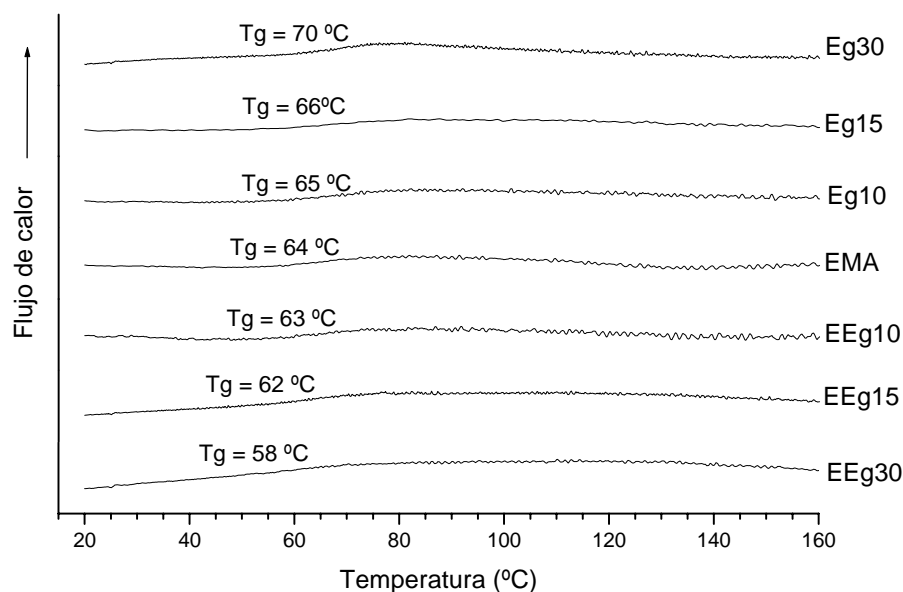


Figura 4.11 Termogramas de DSC de los cementos acrílicos formulados con los monómeros EgMA y EegMA al 10, 15 y 30% p/p en la fase líquida.

Por otra parte la estabilidad térmica de los distintos cementos se evalúa mediante Análisis Termogravimétrico (TGA) en atmósfera de nitrógeno en las mismas condiciones que las descritas en el apartado 1.2.1.3 y cuyas curvas de degradación junto con sus correspondientes derivadas se muestran en las figuras 4.12 y 4.13. La tabla 4.8 recoge por su parte, la temperatura de velocidad de degradación máxima (T_{max}) y la temperatura a la que se produce el 50% de pérdida de peso ($T_{50\%}$) para los cementos ensayados en este trabajo.

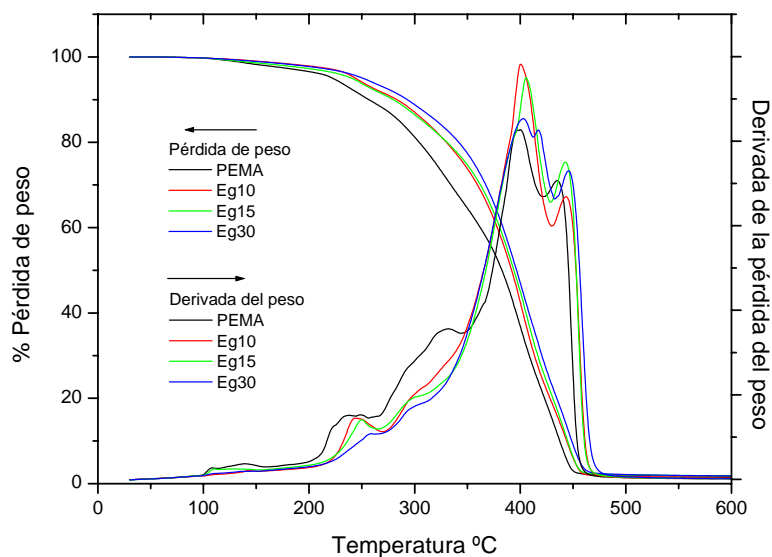


Figura 4.12 Curvas de descomposición y derivada de la pérdida de peso de los cementos acrílicos formulados con los monómeros EgMA al 10, 15 y 30% p/p en la fase líquida.

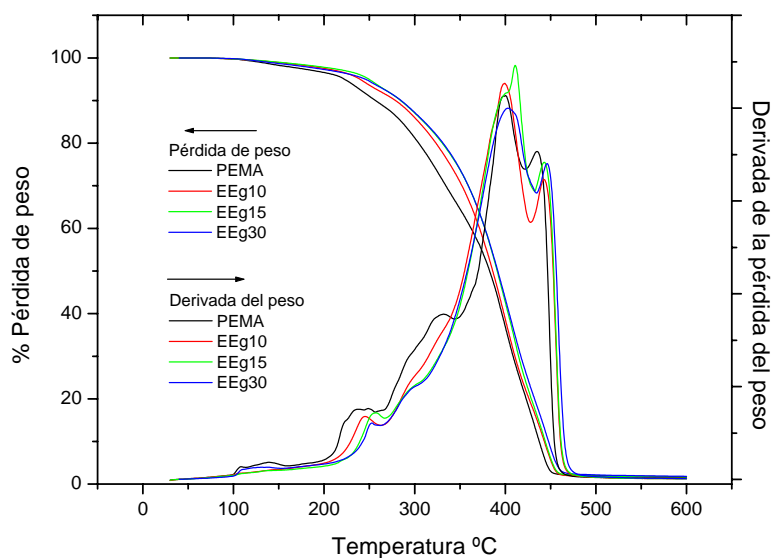


Figura 4.13 Curvas de descomposición y derivada de la pérdida de peso de los cementos acrílicos formulados con los monómeros EEgMA al 10, 15 y 30% p/p en la fase líquida.

En ambos termogramas se aprecian las cuatro etapas de degradación características del PEMA¹⁷ mientras que en los cementos que incorporan los derivados de eugenol las dos primeras etapas se atenúan, llegando casi, a desaparecer para los

cementos formulados con un 30% de monómeros derivados de eugenol en la fase líquida. Tanto en los cementos formulados con EgMA como los de EEgMA se observa una mejora de la estabilidad térmica en función del contenido de monómeros derivados de eugenol, mostrando una mayor resistencia a la degradabilidad para las composiciones con mayor contenido tanto en EgMA como en EEgMA.

Muestra	T _{max} (°C) ^a	T _{50%} (°C) ^b
Eg30	403	395
Eg15	405	393
Eg10	400	390
EMA	398	381
EEg10	400	387
EEg15	410	390
EEg30	404	391

Tabla 4.8 Datos de degradación de cementos formulados con los monómeros EgMA y EEgMA al 10, 15 y 30% p/p en la fase líquida. a: Temperatura de velocidad de degradación máxima. b: Temperatura del 50% de pérdida de peso.

4.1.4.- DISCUSIÓN.

La formulación de nuevos cementos óseos dotados de mejores prestaciones para su aplicabilidad en el campo de la cirugía ortopédica y dental, ha supuesto y continúa siendo un reto en el ámbito científico y tecnológico. En este sentido, la modificación de la composición de las formulaciones de cementos acrílicos en ambas fases ha supuesto un campo de investigación que ha dado como resultado el desarrollo de cementos comerciales con mejores propiedades fisico-químicas y farmacológicas.¹⁸ Así, el estudio realizado en este trabajo muestra los resultados obtenidos en el desarrollo de nuevas formulaciones en las que han sido modificadas ambas fases y cuyos resultados mejoran apreciablemente la respuesta físico-química de los cementos comerciales, basados en formulaciones clásicas de polimetacrilato de metilo, en cuanto a sus propiedades tanto mecánicas como biológicas.

Una de las modificaciones llevadas a cabo sobre los cementos basados en PMMA, con mejores resultados obtenidos consiste en el refuerzo de la matriz polimérica obteniendo materiales con mayor ductilidad y que permitan una mejor transmisión de esfuerzos de la prótesis al hueso.¹⁹ La sustitución de la matriz polimérica de PMMA por su homólogo PEMA permite este tipo de refuerzo generando materiales con excelentes propiedades mecánicas y menor temperatura de polimerización, reduciendo a su vez el riesgo de necrosis en los tejidos circundantes.^{20,21} Las partículas de PEMA sintetizadas en este trabajo, se incorporan a las formulaciones de cementos acrílicos sustituyendo totalmente la fase sólida convencional, además tanto el peso molecular como el tamaño medio obtenido en las partículas de PEMA y su homogeneidad, proporciona materiales fácilmente manejables con un buen grado de mojabilidad por la fase líquida y que presentan una temperatura de curado por debajo de los cementos convencionales de PMMA y dentro de los valores límite exigidos por la norma ISO 5833.

Está ampliamente descrito en la bibliografía el carácter antioxidante que presenta el eugenol.²² Sin embargo, como se ha descrito en capítulos anteriores, la eliminación del grupo fenólico de su estructura, al introducir el sustituyente metacrílico, no sólo evita la inhibición de la reacción de curado radicalaria, sino que además permite que el eugenol quede incorporado en el seno de la matriz polimérica a través de enlaces covalentes impidiendo su migración y pérdida de éste, manteniendo, de este modo, sus efectos farmacológicos en largos periodos de tiempo.

La modificación de la fase líquida se lleva a cabo mediante la sustitución del monómero metacrílico MMA por el EMA, además de la adición de distintas cantidades de los monómeros derivados de eugenol EgMA y EEgMA. Las formulaciones comerciales de cementos óseos acrílicos presentan una relación en peso fase sólida:fase líquida (S:L) próxima a 2:1. Dicha relación puede ser modificada en función de la mayor o menor solubilidad que presente la fase sólida en la fase líquida. Una relación S:L excesivamente alta da lugar a una masa donde el sólido no se dispersa correctamente en el líquido, lo que provoca una disminución en las propiedades mecánicas debido a una falta de homogeneidad entre las partículas de polímero y la matriz generada durante la reacción de polimerización. La interfaz de estos dos dominios es precursora de fracturas que darán lugar a la degradación física del material.

Por otro lado, si el valor de la relación S:L es demasiado bajo, el cemento fraguado presenta una mayor cantidad de monómero residual, con el consiguiente efecto citotóxico así como un aumento en los parámetros de curado, temperatura máxima y tiempo de fraguado. En los cementos acrílicos desarrollados en este trabajo se ha usado la relación S:L 2:1 como referencia para poder ser comparados con la mayoría de los cementos comerciales disponibles.

A través del estudio de la exotermia de la reacción de curado se obtiene que las formulaciones que contienen los derivados acrílicos de eugenol presentan valores de la temperatura máxima alcanzada durante el proceso de fraguado inferiores al presentado por la formulación que lleva solo EMA en la fase líquida. Los valores alcanzados están comprendidos entre los 67 y los 39 °C sin que afecte con ello significativamente al tiempo de curado. Esta disminución de las temperaturas máximas de curado es atribuida a la diferencia de pesos moleculares existentes entre los respectivos comonómeros ya que como la exotermia de la reacción es dependiente del número de grupos acrílicos susceptibles de polimerizar, la adición de una especie de mayor peso molecular provoca la generación de menor cantidad de energía por unidad de masa ($\text{kJ}\cdot\text{g}^{-1}$) contribuyendo de este modo, a disminuir los efectos necróticos derivados de las altas temperaturas alcanzadas durante el fraguado.

El monómero residual (EMA + monómero derivado de eugenol) atrapado en la matriz polimérica, derivado de la alta viscosidad alcanzada durante el proceso de curado y posterior vitrificación del material, se encuentra en el intervalo de los valores aportados por la literatura (inferiores al 6% p/p). Los bajos contenidos de monómero sin reaccionar en el seno de la matriz polimérica demuestran que la adición de los monómeros derivados de eugenol a las formulaciones de cementos óseos no supone una disminución en la conversión máxima alcanzada.

Los cementos óseos, cuando se encuentran realizando la función de relleno y fijación de la prótesis articular experimentan cargas estáticas o cuasiestáticas tanto en tensión como en compresión. La aparición de estas fuerzas en diferentes puntos de una artroplastia está provocada por la morfología y la topología del hueso. Estas tensiones pueden suponer puntos de microfracturas y por consiguiente zonas de inicio de fallo en la cementación de la prótesis. Una manera de evitar la formación de estos puntos es la

introducción de agentes entrecruzantes en la matriz polimérica aumentando su resistencia mecánica sin comprometer el mezclado inicial.²³ Este efecto es observable a la vista de los resultados obtenidos en todos los ensayos de resistencia mecánica realizados en este trabajo. Estos ensayos muestran un refuerzo de hasta el 8% en los cementos que incorporan un 15 % del monómero EgMA en la fase líquida. Este refuerzo se consigue aunque en menor medida cuando se adiciona el monómero EEgMA. Estos refuerzos se ponen de manifiesto más señaladamente cuando el esfuerzo se realiza en flexión llegando incluso a superar el 30% para el caso de los cementos formulados con un 10% EEgMA. Estos niveles de refuerzo se deben a la participación de los monómeros derivados de eugenol que generan redes tridimensionales entrecruzadas y que proporcionan una mayor estabilidad a la matriz polimérica. Además, la difusión inicial de los monómeros en el interior de las partículas prepolimerizadas de polímero acrílico provoca que el posterior entrecruzamiento genere una mejor compatibilización y adhesión entre la matriz del cemento y las partículas de polímero acrílico. Esta compatibilización se pone de manifiesto al estudiar la superficie de fractura de las muestras ensayadas a flexión donde se observa que las formulaciones que incorporan los monómeros de eugenol presentan menor cantidad de partículas desprendidas de PEMA prepolimerizado.

Los estudios calorimétricos llevados a cabo sobre las formulaciones portadoras de los derivados de eugenol muestran la misma tendencia que la observada en los distintos copolímeros estudiados en el capítulo anterior, donde se observa cómo la T_g aumenta con la presencia de EgMA en el copolímero con respecto al PEMA, y disminuye con el contenido en EEgMA.

Los estudios de degradación térmica muestran una vez más, un aumento de la estabilidad frente a la degradación para las formulaciones portadoras de los derivados de eugenol. Este hecho queda patente en todos los sistemas en que estos monómeros están presentes, bien aumentando la temperatura de inicio de degradación, bien minimizando el número de las etapas en las que se produce. En ausencia de los monómeros derivados de eugenol, el cemento basado en EMA presenta un proceso de degradación en cuatro etapas, de manera similar al descrito en los copolímeros (apartados 3.3.4 y 3.4.3), alrededor de 207, 270, 350 y 430 °C, como consecuencia de los procesos de ruptura de

cadena por los centros estéricamente más impedidos, la descomposición de los finales de cadena vinilidenos y la escisión aleatoria de la cadena respectivamente. Los cementos portadores de eugenol sin embargo, presentan estas etapas pero de manera más atenuada a medida que aumenta el contenido en monómero derivado de eugenol. Además, estos cementos presentan una estabilidad adicional, aumentando en hasta 10 y 14 °C las temperaturas a las que se producen estas degradaciones en los casos de las formulaciones con un contenido del 30% en EEgMA y EgMA respectivamente, atribuible a la estabilidad adicional que presentan estos sistemas debido al proceso de entrecruzamiento, que de manera general produce este tipo de estabilización.²⁴ Todos estos resultados indican nuevamente un marcado carácter antioxidante por parte del resto eugenilo presente en los distintos cementos presentando actividad como captador de los radicales libres generados durante el tratamiento térmico a temperaturas superiores a 250 °C. En este sentido, y al igual que otros materiales ya descritos,²⁵ esta actividad antioxidante puede ser mantenida de una forma similar en los cementos portadores de estos monómeros, y actuar frente a la estabilización e inhibición de la formación de radicales libres producidos por la descomposición de compuestos hidroperóxidos, asociados a procesos inflamatorios en el medio fisiológico. Este hecho, unido a la actividad bactericida aportada por los copolímeros derivados de eugenol, que presumiblemente se mantiene en los cementos, confieren unas propiedades muy interesantes a los cementos formulados mediante la adición de estos monómeros en la fase líquida.

4.2.- CEMENTOS IONÓMEROS DE VIDRIO DERIVADOS DE EUGENOL.

4.2.1.- INTRODUCCIÓN.

Como ya se ha comentado anteriormente, los cementos de ionómero de vidrio (CIV, o GIC en sus siglas en inglés) consisten en redes interpenetradas de compuestos inorgánicos de fluoroaluminosilicato cálcico y orgánicos, de polímeros de ácidos carboxílicos como el poli(ácido acrílico), formando una matriz con partículas de vidrio embebidas en ellas.^{26,27,28} El curado de un cemento de ionómero de vidrio se produce principalmente debido a una reacción de neutralización que se inicia al mezclar cada

una de las fases componentes del cemento, y en la que el ácido polialquenoico presente ataca al vidrio de fluoroaluminosilicato cálcico liberando iones metálicos y ácido silícico. Este ataque no es uniforme y se da preferentemente en las zonas ricas en calcio. Consecuentemente, el curado inicial de los cementos se asocia con la formación de poliacrilato cálcico produciéndose el curado más adelante, con la intervención de los iones aluminio. La porción de partículas de vidrio sin reaccionar queda embebida en una matriz de sílice formada durante la liberación de los cationes desde la superficie de las partículas.²⁹

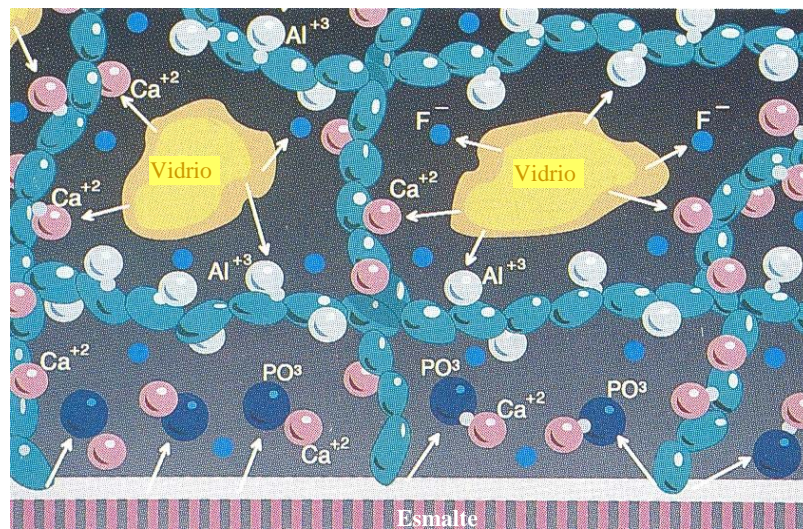


Figura 4.14 Diagrama de la estructura de un cemento de ionómero de vidrio. Las partículas sólidas representan las partículas de vidrio sin reaccionar. Éstas se encuentran rodeadas del gel formado por los iones Al^{3+} y Ca^{2+} liberados desde el vidrio como resultado del ataque del poli(ácido acrílico) (PAA). Los iones Al^{3+} y Ca^{2+} forman polisales con los grupos COO^- del PAA dando lugar a estructuras entrecruzadas.

Estos cementos presentan la característica de unirse químicamente al esmalte y la dentina durante el proceso de curado. El mecanismo de esta unión se cree que puede ser debido a una reacción irreversible de los iones de poliacrilato con la superficie de la hidroxiapatita³⁰ y supone una ventaja única en este tipo de materiales dentales proporcionándoles un enlace efectivo diente-cemento y cemento-prótesis (figura 4.15).

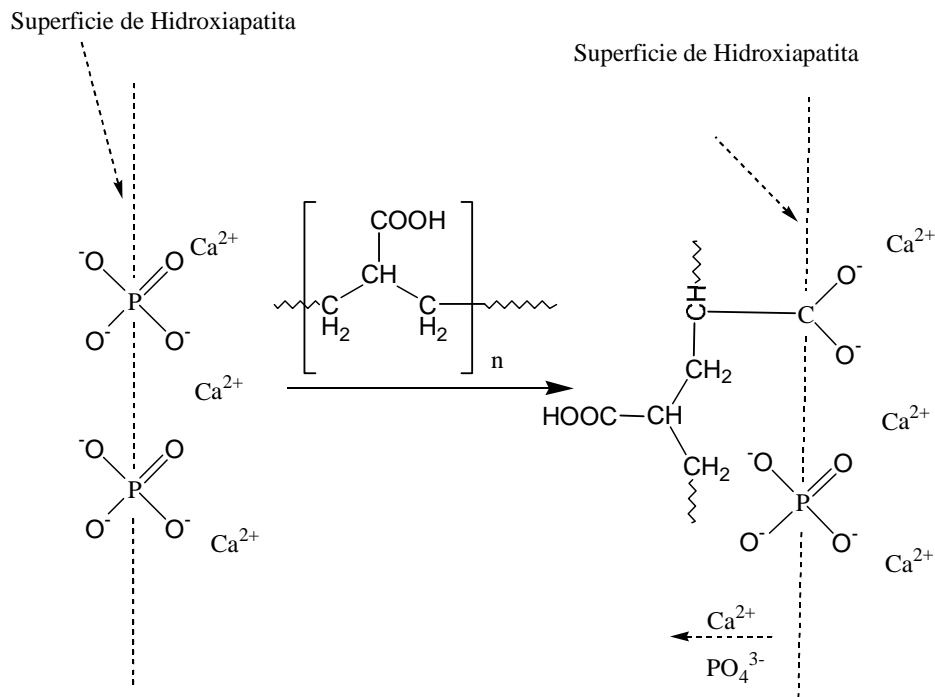


Figura 4.15 Esquema del mecanismo de adhesión propuesto por Wilson y col, entre la superficie de la hidroxiapatita y las cadenas de poli(ácido acrílico) presente en los cementos ionómero de vidrio.

En las últimas décadas se ha llevado a cabo una amplia investigación destinada a la mejora de ciertos aspectos de los cementos de ionómero de vidrio. Una de las modificaciones más significativas consiste en la adición de ácido tartárico a las formulaciones consiguiendo con ello mejorar tanto los parámetros de curado como las propiedades mecánicas. En este sentido, se investiga también el efecto que provoca sobre estas propiedades los cambios de la composición o la concentración del poliácido. El aumento de la resistencia del cemento se consigue de forma más directa mediante la incorporación de vidrios de fases dispersas, rellenos reforzantes (como fibras, metales, alúmina) o resinas. En los CIV modificados para su uso como resinas, también llamados híbridos de ionómero, parte del poli(ácido acrílico) se sustituye por monómeros hidrófilos con el fin de promover en el cemento procesos adicionales de curado mediante la foto o autopolimerización de los monómeros. Esto permite superar las desventajas asociadas al curado lento tales como sensibilidad a la humedad o baja resistencia.

Dentro de las investigaciones de los cementos de ionómero de vidrio convencionales se ha hecho especial énfasis en mejorar la liberación de iones fluoruro o

las propiedades mecánicas mediante la alteración de la composición del vidrio. En esta parte del trabajo que se presenta, se describe la síntesis y caracterización de un copolímero de ácido acrílico (AA) y metacrilato de eugenol (EgMA) con el objetivo de investigar su capacidad para formar un cemento ionómero de vidrio mejorando alguna de las propiedades de estos materiales al combinarlas con las propiedades biológicas aportadas por los derivados acrílicos de eugenol.

4.2.2.- SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN DEL COPOLÍMERO DERIVADO DE ÁCIDO ACRÍLICO Y EUGENOL, p(AA-co-EgMA).

La polimerización del ácido acrílico (AA) y metacrilato de eugenilo (EgMA) se lleva a cabo de acuerdo con las condiciones del apartado 1.5.2.1, obteniendo tras el proceso de purificación un producto blanco amorfo. El espectro de RMN ^1H del copolímero p(AA-co-EgMA) se muestra en la figura 4.16 donde se observan las señales correspondientes a cada unidad monomérica.

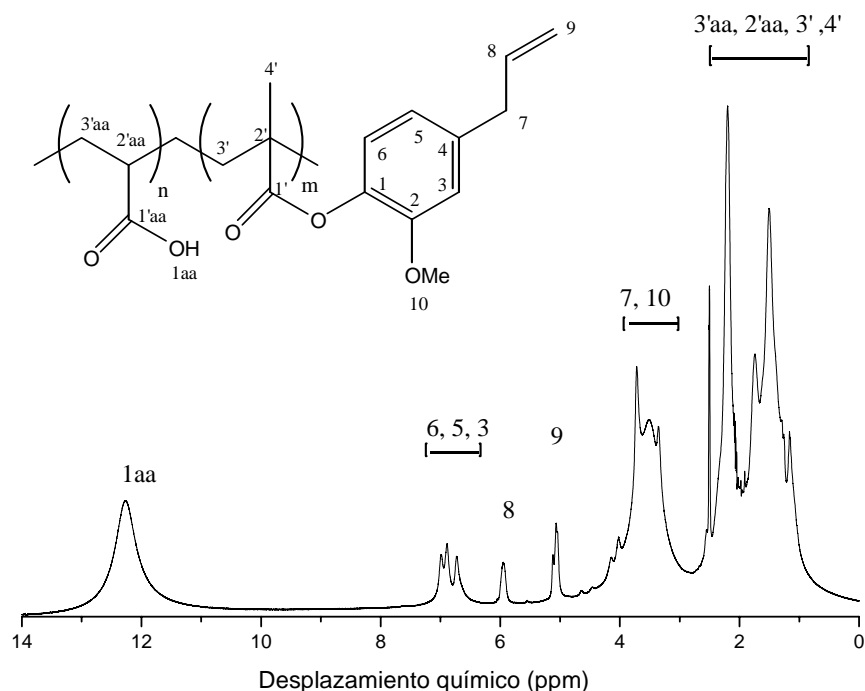


Figura 4.16 Estructura química y espectro de RMN ^1H registrado en DMSO-d_6 del copolímero p(AA-co-EgMA).

El espectro confirma que la polimerización transcurre a través de los grupos acrílico y metacrílico de las unidades monoméricas AA y EgMA respectivamente.

La fracción molar de cada unidad monomérica en el copolímero se calcula considerando la señal de resonancia correspondiente al protón carboxílico (1H; 11,5 - 13,5 ppm) de la unidad AA, y las señales asignadas tanto a los protones de los anillos aromáticos (3H; 6,5 - 7,5 ppm) como de los alílicos (3H; 4,8 - 6,4 ppm) de la unidad EgMA. Aplicando la ecuación 1.1, la fracción molar de EgMA calculada en la cadena copolimérica es de 0,13. Este hecho indica que las cadenas macromoleculares consisten principalmente en unidades de ácido acrílico con sus correspondientes protones carboxílicos disponibles para la participación en la reacción ácido-base característica en la formación de los cementos ionómero de vidrio, con un 13% de unidades eugenilo laterales.

Con el copolímero p(AA-co-EgMA) se preparan diferentes disoluciones acuosas y se registran sus espectros de infrarrojo ATR-FTIR para compararlos con el registrado sobre la fase líquida del cemento comercial GC Fuji IX.

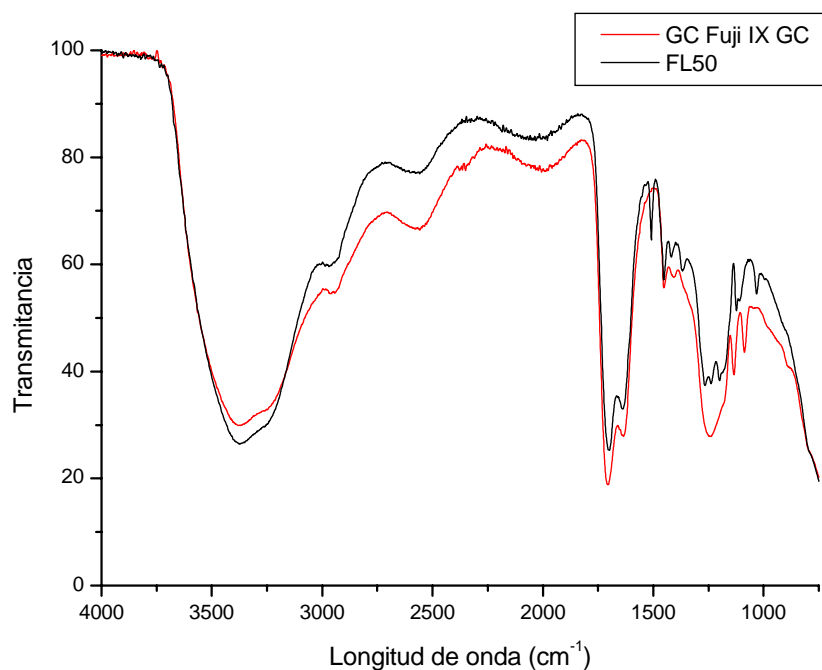


Figura 4.17 Espectros normalizados de ATR-FTIR de la fase líquida del cemento comercial GC Fuji IX y de la disolución de copolímero p(AA-co-EgMA) al 50% en agua (FL50).

La figura 4.17 muestra los espectros de la disolución al 50% en agua de del copolímero p(AA-co-EgMA), y de la fase líquida comercial, donde se pueden observar las bandas más representativas correspondientes a los distintos grupos funcionales OH (tensión a 3.300 cm^{-1} , banda ancha, AA), C=O (tensión a 1.700 cm^{-1} , AA), C=C (tensión arílo, 1.500 cm^{-1}), C-O (tensión, 1.230 cm^{-1} , AA).

Los pesos moleculares promedio en número \bar{M}_n y promedio en peso \bar{M}_w del copolímero p(AA-co-EgMA) se determinan mediante Cromatografía de Exclusión de Tamaños (SEC) usando un detector de índice de refracción. Los distintos pesos moleculares se determinan calculando la media de varios pases a través del sistema cromatográfico obteniendo unos valores de $\bar{M}_w = 156.000\text{ Da}$ y $\bar{M}_n = 138.000\text{ Da}$ ($\bar{M}_w / \bar{M}_n = 1,1$). Se observa un aumento progresivo del peso molecular para los últimos ciclos que puede ser debido al bloqueo de los sitios activos de la columna produciendo por consiguiente una disminución en la absorción. Este hecho indica una posible sobreestimación de los pesos moleculares determinados.

4.2.3.- FORMULACIÓN Y PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS CEMENTOS IONÓMERO DE VIDRIO.

Las distintas formulaciones experimentales de cementos ionómero de vidrio ensayados en este trabajo (tabla 1.3) se preparan usando como componente líquido las distintas disoluciones acuosas del copolímero p(AA-co-EgMA) mezclándolas con el polvo de la fase sólida de la formulación comercial Fuji IX.

4.2.3.1.- PARÁMETROS DE CURADO.

Los distintos cementos ionómeros de vidrio ensayados se preparan mediante técnicas de mezclado manual convencionales y sus parámetros de curado se determinan mediante un reómetro oscilante tipo Wilson.³¹ La figura 4.18 muestra los tiempos de fraguado (t_s) y de trabajo (t_w) de las formulaciones FL30, FL40 y FL50 con relaciones sólido:líquido 2:1 y 3:1 respectivamente, donde se observan que los tiempos de fraguado de los cementos experimentales aumentan al aumentar la concentración de la

disolución de la fase líquida. Sin embargo, los distintos tiempos de trabajo se mantienen dentro del rango de las determinadas para las formulaciones comerciales.

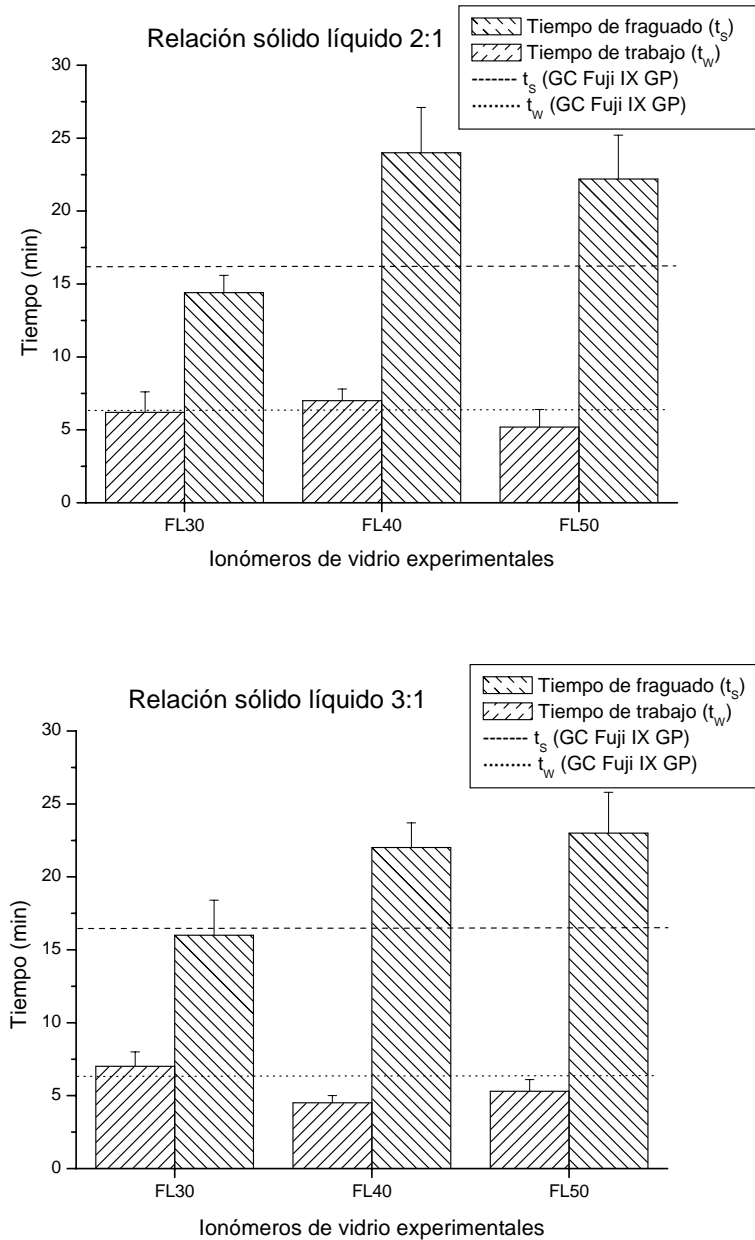


Figura 4.18 *Tiempos de fraguado, de trabajo y desviaciones estándar ($n = 6$) determinados a partir de los oscilogramas registrados mediante un reómetro tipo Wilson, de las formulaciones experimentales FL30, FL40 y FL50 con relaciones sólido:líquido 2:1 (superior) y 3:1 (inferior).*

4.2.3.2.- PROPIEDADES MECÁNICAS.

La tabla 4.9 recoge los valores medios y sus desviaciones estándar de la resistencia a la compresión (σ_C), resistencia a la tensión diametral (σ_{TD}) y resistencia a la flexión (σ_F) obtenidos tras la realización de los respectivos ensayos realizados sobre distintas probetas tras su almacenamiento en agua durante 24 horas y 6 semanas.

FASE LÍQUIDA	SOL:LIQ	24 horas			6 semanas		
		σ_C (MPa)	σ_{TD} (MPa)	σ_F (MPa)	σ_C (MPa)	σ_{TD} (MPa)	σ_F (MPa)
		[D.S.]	[D.S.]	[D.S.]	[D.S.]	[D.S.]	[D.S.]
GC FUJI IX GP	3:1 (comercial)	165,6 [10]	18,2 [2,5]	1,6 [0,5]	223,6 [0,7]	15,1 [1,2]	0,8 [0,14]
FL50	2:1	136,4* [6,2]	14,6* [3,5]	1,9 [0,6]	140,1* [7,8]	14,0 [1,3]	1,8* [0,2]
FL40	3:1	135,7* [14]	12,3* [2,5]	4,2* [1,0]	130,1* [9,6]	13,9 [1,7]	2,3* [0,3]

Tabla 4.9 Valores medios de la resistencia a la compresión (σ_C), tensión diametral (σ_{TD}) y resistencia a la flexión (σ_F), junto con sus desviaciones estándar [D.S.] ($n = 6$) obtenidos para los distintos cementos ionómeros de vidrio ensayados tras su almacenamiento en agua tras 24 horas y 6 semanas. * Diferencias significativas con respecto al cemento comercial GC Fuji IX GP ($p < 0,5$).

Los cementos FL40 y FL50 presentan valores de resistencia a la compresión por encima de los 130 MPa requeridos por la norma ISO 9917³² incluso tras 6 semanas de almacenamiento en agua, a pesar de ser significativamente inferiores a los obtenidos para la formulación comercial Fuji IX. La resistencia a la tensión diametral de los cementos experimentales FL40 y FL50 presenta por su parte valores inferiores, aunque no estadísticamente significativos, a los observados para el cemento comercial. Es en la resistencia a la flexión donde se consigue un refuerzo estadísticamente significativo con respecto a la formulación comercial, que se mantiene tras 24 horas y 6 semanas de almacenamiento en agua.

4.2.3.3.- ESTUDIO DE ABSORCIÓN DE AGUA.

El estudio de la capacidad de absorción de agua (H) de los distintos cementos ionómero de vidrio ensayados se realiza registrando el grado de hidratación de distintas probetas a diferentes periodos de tiempo durante un total de 5 semanas, según el procedimiento descrito en la sección experimental, y cuyos resultados se recogen en la figura 4.19.

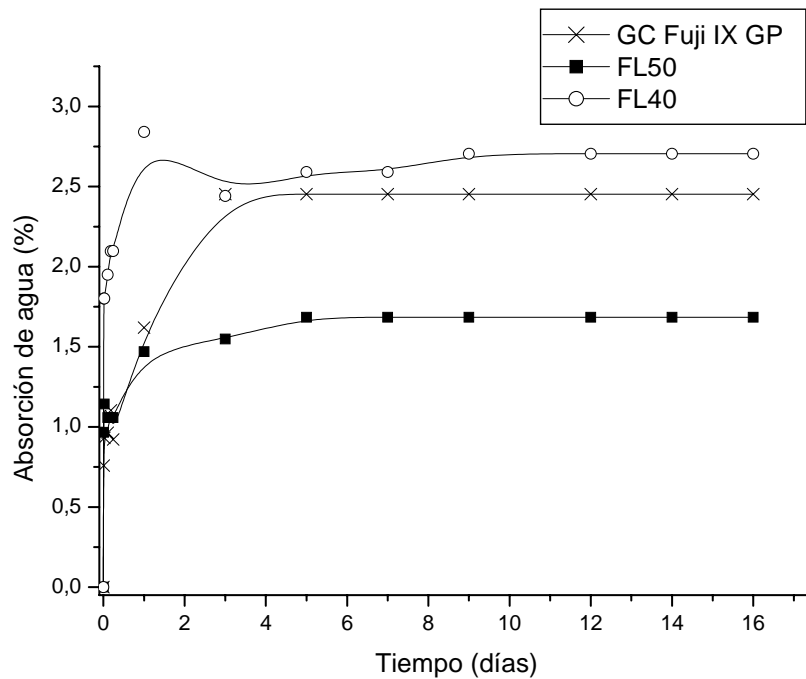


Figura 4.19 Absorción de agua de los distintos cementos ionómero de vidrio ensayados en función del tiempo.

Como se observa en la figura 4.19, el equilibrio se alcanza tras 6 días de inmersión, tras los cuales la cantidad de agua absorbida se puede considerar constante. A este tiempo el cemento comercial Fuji IX muestra un comportamiento similar al observado para el cemento experimental FL40 con valores de absorción de agua del 2,4 y 2,7% respectivamente. Estos valores son muy superiores a los alcanzados para la formulación FL50 ($H = 1,7\%$). La hidratación de los distintos cementos ensayados en función del tiempo se puede considerar lineal hasta el 60% de hidratación. La tabla 4.10 recoge los valores del grado de hidratación alcanzado tras el equilibrio y la

disgregación, así como las pendientes registradas de las curvas de hidratación normalizadas (figura 4.20) en las primeras etapas de la hidratación.

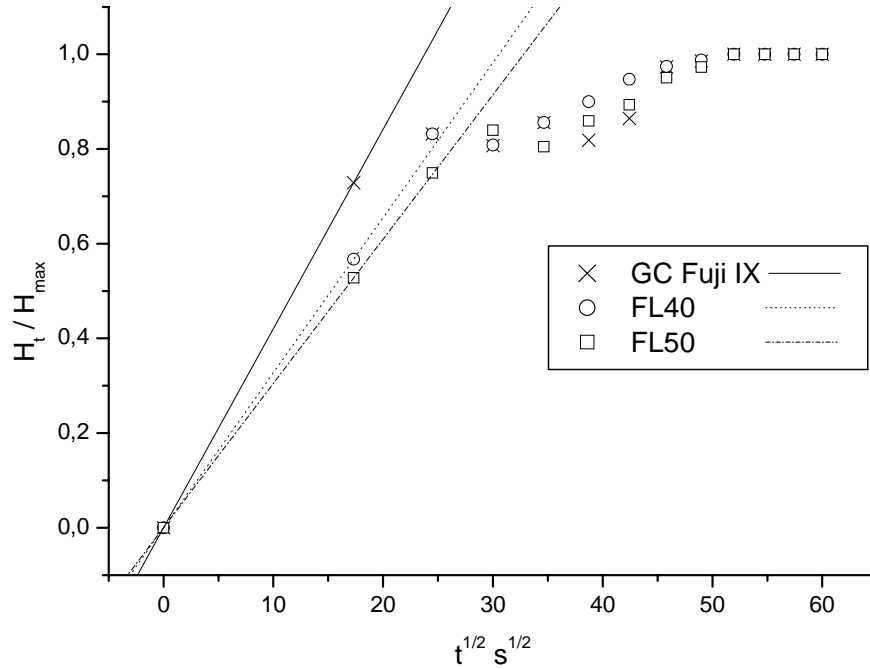


Figura 4.20 Curvas de absorción normalizadas de los distintos cementos ionómero de vidrio ensayados.

FORMULACIÓN CIV ENSAYADA		H (%) [D.S.]	D (%) [D.S.]	s (s ^{-1/2})
GC Fuji IX GP Líquido	GC Fuji IX GP Polvo	2,4 [0,1]	4,3 [0,3]	0,042
FL40	GC Fuji IX GP Polvo	2,7 [0,5]	6,0 [1,0]	0,033
FL50	GC Fuji IX GP Polvo	1,7 [0,1]	9,0 [0,7]	0,030

Tabla 4.10 Porcentajes de absorción de agua en el equilibrio (H), disgregación (D) media y pendientes calculadas (s) a partir de las curvas reducidas de hidratación del cemento comercial Fuji IX y de los cementos experimentales FL40 y FL50. [D.S.] = Desviación estándar (n = 3).

4.2.3.4.- LIBERACIÓN DE FLUORURO Y pH SUPERFICIAL.

Todos los cementos ensayados muestran un comportamiento similar en la liberación de iones fluoruro. La figura 4.21 muestra este comportamiento, donde se puede observar una fuerte liberación inicial en los dos primeros días, tras lo cual la velocidad de liberación disminuye hasta alcanzar un valor asintótico en el equilibrio tras la primera semana de estudio.

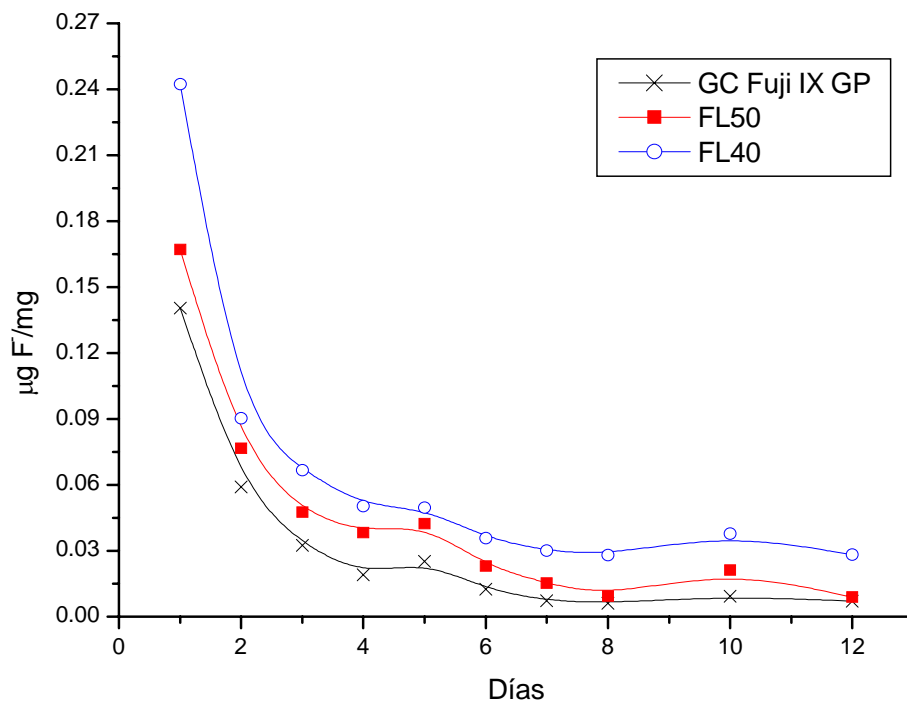


Figura 4.21 Liberación de fluoruro registrada para los distintos cementos ionómeros de vidrio tras 12 días de ensayo.

Los valores de pH superficial medido sobre cada uno de los cementos ensayados muestran un valor relativamente constante en el transcurso de los 12 días de ensayo. En la figura 4.22 se puede observar cómo los valores de pH superficial registrados para los cementos experimentales FL40 y FL50 son significativamente superiores a los registrados para el cemento comercial Fuji IX.

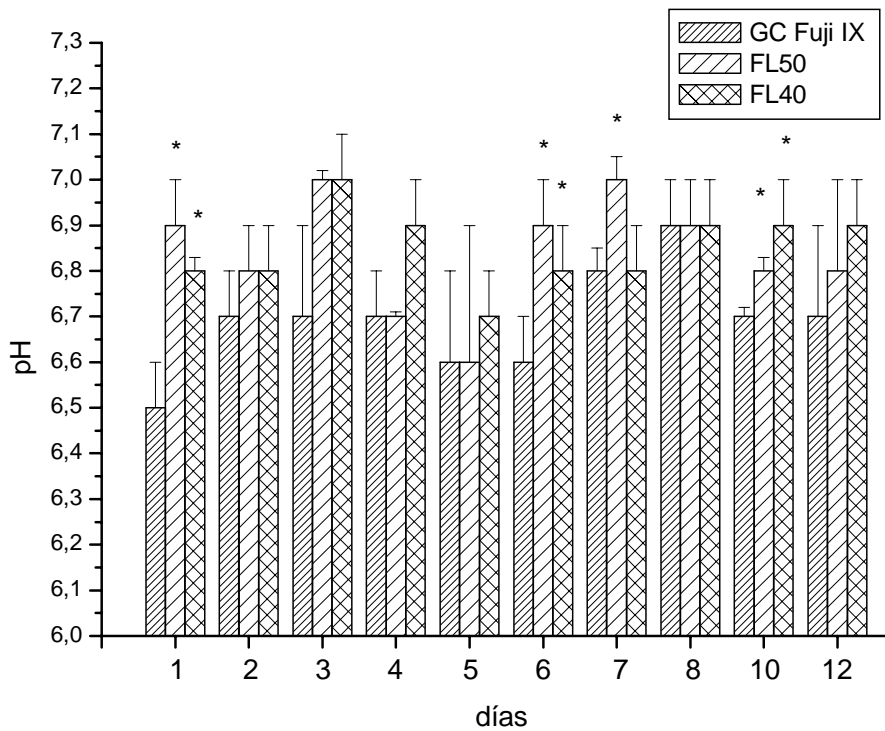


Figura 4.22 Valores medios del pH superficial y sus desviaciones estándar ($n = 3$) registrados en función del tiempo para el cemento comercial Fuji IX y los cementos experimentales FL40 y FL50. * = Diferencias significativas con respecto al cemento comercial GC Fuji IX GP ($p < 0,5$).

4.2.3.5.- CARACTERIZACIÓN TOPOLÓGICA.

La figura 4.23 muestra las micrografías de las superficies de fractura, obtenidas mediante Microscopía Electrónica de Barrido Ambiental, de los cementos Fuji IX, FL40 y FL50 en las que se observan pequeñas diferencias entre ellas. Las partículas de vidrio de la matriz pueden distinguirse por la presencia de bordes angulares más luminosos en el interior de la matriz formada por la reacción ácido-base.

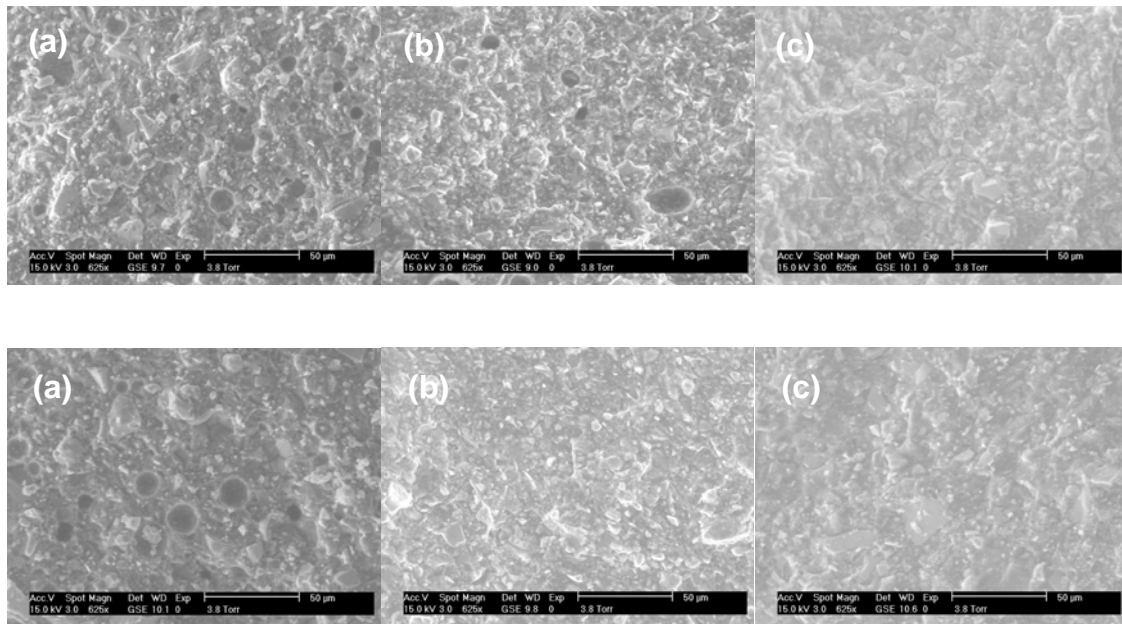


Figura 4.23 Micrografías de las superficies de fractura de las probetas sometidas a los ensayos de resistencia a la compresión (superior) y tensión diametral (inferior) para los cementos Fuji IX (a), FL40 (b) y FL50 (c).

4.2.4.- DISCUSIÓN.

Los cementos ionómeros de vidrio disponibles en la actualidad han ayudado a solventar con éxito numerosas demandas en el campo de la odontología tales como la adhesión del implante al tejido dental y durabilidad, acompañado de una estética muy satisfactoria. Por otra parte, la liberación de fluoruro que se da en este tipo de materiales ha sido ampliamente documentada, dotándolos de una capacidad anticariogénica afectando al metabolismo de las bacterias promotoras de procesos formadores de caries. Sin embargo, la reducción de la formación de caries secundarias como resultado directo de esta liberación por parte de los CIV tiene todavía que ser probada mediante estudios clínicos.³³ En este trabajo se describe el desarrollo de nuevas formulaciones ionómero de vidrio sobre las que se introduce la molécula de eugenol, la cual contribuye a mejorar las propiedades terapéuticas de estos cementos. Ya se han comentado las propiedades farmacológicas de la molécula de eugenol^{34,35} cuya incorporación sobre las nuevas formulaciones de cementos ionómero de vidrio pueden aumentar su capacidad bacteriostática, analgésica y antiinflamatoria sin detrimento de las principales propiedades tanto químico-físicas, como biológicas. El resto eugenilo presente en los

cementos experimentales se presenta unido químicamente a las cadenas poliméricas formadoras de la matriz, sin que presente los efectos inhibitorios característicos de los derivados fenólicos y siendo por tanto estos cementos compatibles con la polimerización posterior de otras resinas dentales.³⁶ El análisis mediante Resonancia Magnética Nuclear confirma la unión covalente de los restos eugenilo con la cadena polimérica a través del grupo éster siendo por tanto susceptibles de ser hidrolizados, provocando la liberación al medio de moléculas de eugenol en cantidades por debajo de los límites citotóxicos.³⁷ Como se ha documentado anteriormente, en este trabajo los derivados metacrílicos de eugenol dan lugar a materiales entrecruzados debido a la participación de los dobles enlaces alílicos en la reacción de polimerización. Sin embargo, bajo las condiciones experimentales descritas para la copolimerización con ácido acrílico, estos grupos alílicos no participan, permaneciendo disponibles para posteriores reacciones de entrecruzamiento que pueden ser inducidas por ejemplo, mediante activación radiativa, promoviendo así una estabilización estructural añadida y generando además una interfaz continua y homogénea con otros materiales de restauración dental.

Los resultados expuestos en este trabajo muestran que los cementos experimentales FL40 3:1 y FL50 2:1 presentan parámetros de curado acordes con la normativa y muy similares a los registrados para otros cementos comerciales. La primera etapa de la reacción de curado corresponde al periodo de endurecimiento y transcurre en los 15 minutos primeros, transcurrido este tiempo se dan una serie de reacciones más complicadas en las que se produce el curado propiamente dicho. Los procesos que ocurren en estos primeros momentos del curado son muy sensibles a la hidratación del sistema mientras que las últimas etapas son más susceptibles a los procesos de deshidratación, comprometiendo ambos procesos las propiedades finales y el potencial de los cementos ionómero de vidrio formados.³⁸ En este sentido, la modificación de la matriz polimérica mediante la inclusión de unidades hidrófobas derivadas de eugenol afecta por tanto a ambos procesos de hidratación y deshidratación. Además, la modificación tanto en el peso molecular como en la composición de dicha matriz incide claramente en los parámetros de curado del sistema. De este modo los cementos formulados con el copolímero derivado de eugenol experimentan una reactividad más lenta con las partículas básicas de vidrio, debido al menor número de unidades de ácido acrílico presentes en las cadenas poliméricas. Es interesante destacar

sin embargo, cómo a pesar del alto peso molecular determinado para el copolímero p(AA-co-EgMA), los tiempos de curado son ligeramente superiores a los medidos para las formulaciones comerciales. Este hecho implica que los polímeros de alto peso molecular puedan también utilizarse sin que esto suponga una alteración drástica en los parámetros de curado tal y como recogen otros autores.³⁹

Tanto la concentración del copolímero como la viscosidad final de la fase líquida influyen también en la velocidad de la reacción, requiriendo a la hora de su formulación un balance óptimo en el ajuste de ambas propiedades. En general, mayores concentraciones de polímero acrílico proporcionan cementos mas resistentes pero debido a su mayor viscosidad presentan menor tiempo de trabajo y son más difícilmente manejables en el mezclado manual, tal y como se ha observado en los resultados obtenidos con los cementos experimentales derivados de eugenol.

Las curvas normalizadas de hidratación muestran una tendencia lineal en las primeras etapas de la reacción. Las pendientes de estas rectas así como el grado de hidratación en el equilibrio indican que el agua se absorbe más rápidamente y en mayores cantidades en los cementos comerciales que en los experimentales FL40 y FL50 respectivamente, produciendo así el agua absorbida un mayor efecto plastificante en este orden, en el interior de la estructura polimérica.⁴⁰ Por otra parte el resto eugenilo aumenta la fracción de volumen libre alrededor de las macromoléculas proporcionando materiales más flexibles.⁴¹ Este balance entre la flexibilidad de la cadena polimérica y su capacidad de absorción de agua hace de los cementos experimentales unos materiales con mayor resistencia a la flexión manteniendo el resto de propiedades mecánicas por encima de los valores exigidos por la norma. Por otro lado, las menor cantidad de agua absorbida por estos materiales provocará menores niveles de contracción volumétrica de la red⁴² y por consiguiente menor riesgo de fallo para los cementos experimentales iónómero de vidrio derivados de eugenol.

La incorporación de las unidades portadoras de eugenol en la secuencia de unidades del copolímero p(AA-co-EgMA) conlleva como se ha comentado, una disminución en el número de grupos $-\text{COOH}$ presentes en la matriz que son responsables de la retención de los iones fluoruro. La liberación de este ión está controlada por la hidratación de la matriz, el pH de los lixiviados y la cantidad de

grupos -COOH presentes en la matriz. Debido a esta complejidad en el número de variables, es muy difícil hacer una comparación directa de los valores de iones F⁻ liberados por parte de los cementos ensayados. A pesar de ello, los resultados obtenidos en estos estudios muestran una tendencia muy similar en la liberación de este ión para los cementos experimentales con cantidades de ión liberado ligeramente superiores a los observados para el cemento control Fuji IX confiriéndoles un mayor efecto anticariogénico.⁴³ La liberación de iones F⁻ al medio junto con la presencia de las unidades inmovilizadas derivadas de eugenol, suponen un aumento en las propiedades bacteriostáticas globales de este tipo de cementos.

Los valores de pH superficial de los cementos experimentales muestran valores superiores a los registrados para el control Fuji IX en todo el periodo de evaluación, debido nuevamente al menor número de grupos -COOH presentes en el copolímero y que son neutralizados en los primeros días del curado provocando un incremento gradual del pH a lo largo del tiempo. Este incremento del pH es más evidente para el control Fuji IX, mientras que los registrados para los cementos experimentales permanecen aproximadamente constantes. Los mayores valores de pH resultan menos agresivos y por tanto inducen menores niveles de irritación de la pulpa.

Las micrográficas obtenidas sobre las superficies de fractura de los distintos materiales muestran la presencia de partículas de vidrio claramente distinguibles por la presencia de bordes angulares más luminosos. Estas partículas, parcialmente degradadas como consecuencia de la reacción ácido-base, se encuentran embebidas en una matriz polimérica de polialquenoatos de calcio y aluminio y cubiertas por una capa de gel de sílice formada en los márgenes de la partícula. Este modelo de estructura para cementos de ionómero de vidrio es consistente con el propuesto por Hatton y Brook.^{44,45}

4.3.- BIBLIOGRAFÍA.

-
- 1 Charnley J. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *J Bone Jt Surg* 42B: 28-30. 1964.
 - 2 Charnley J. Fracture of femoral prosthesis in total hip replacement. *Clin Orthop Rel Res* 111: 105-120. 1975.

- 3 Habal M. B., Leake D. L. Experience in reconstructive surgery of craniomaxillofacial deformities with osteomesh, eleven year experience. *Mat Res Soc Symp Proc* 55: 105-113. 1986.
- 4 Person B. M., Wouters H. W. Curettage and acrylic cementation in surgery of giant cell tumors of bone. *Clin Orthop* 120: 125-133. 1976.
- 5 Amoretti N., Hovorka E., Marcy P., Lamase C., Brunner P., Roux C., Chevallier P., Boileau P. Bursa fracture of the spine involving vertebrae presenting on other lesions: The role of vertebroplasty. *Clin Imag* 29: 379-384. 2005.
- 6 Chen J. F., Wu C. T., Lee S. T. Percutaneous vertebroplasty for the treatment of Bursa fractures. *J Neurosurg-Spine* 1: 228 - 231. 2004.
- 7 Smith B. G., Wright P. S., Brown D. Utilización Clínica de los Materiales Dentales. *Masson*. Barcelona. 1996.
- 8 Murphy A., Hill R. Fracture toughness of tooth acrylics. *J Mater Sci Mater Med* 14: 1011-1015. 2003.
- 9 Odian G. Principles of Polymerization. 4^a ed. *Wiley Interscience*. New Jersey. 2004.
- 10 de Abajo J., Gallardo A., López D. Ciencia y Tecnología de Materiales Poliméricos, Volumen I. Capítulo 2.2. *Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros*. Madrid. 2004.
- 11 Schoenfeld C. M., Conard G. J., Lautenschlager E. P. Monomer release from methacrylate bone cements during simulated “in vivo” polymerization. *J Biomed Mater Res* 13: 135-147. 1979.
- 12 ISO Specifications 5833. Standard Specification for Implants for Surgery-Acrylic Resin Cements. 2002.
- 13 ISO Specification 4049. Standard Specification for Polymer Based Filling, Restorative and Luting Materials. 2000.
- 14 Sinnott-jones P. E., Browne M., Ludwig W., Buffière J. Y., Sinclair I. Microtomography assesment of failure in acrylic bone cements. *Biomaterials* 26: 6460-6466. 2005.
- 15 Topoleski L. D. T., Ducheyne P., Cuckler J. M. Microstructural pathway of fracture in poly(methyl methacrylate) bone cement. *Biomaterials* 14: 1165-1172. 1993.
- 16 Shafranska O., Kokott A., Sülthaus D., Ziegler G. Effect of surface modification of polymer beads on the mechanical properties of acrylic bone cements. *J Biomater Sci Polymer Edn* 18: 439-451. 2007.

-
- 17 Rojo L., Vázquez B., Parra J., López-Bravo S., Deb S., San Román J. From natural products to polymeric derivatives of eugenol. A new approach of dental composites and orthopaedic bone cements. *Biomacromolecules* 7: 2751-2761. 2006.
- 18 Lewis G. Properties of acrylic bone cements: State of the art review. *J Biomed Mater Res Appl Biomater* 38: 155-182. 1997.
- 19 Litsky A. S., Rose R. M., Rubin C. T. Reduced modulus acrylic bone cement. *Materials Research Society Symposia Proceedings* 55: 171-179. 1986.
- 20 Weightman B., Freeman M. A. R., Revell P. A., Braden M., Albrektsson B. E. J., Carlson L. V. The mechanical properties of cement and loosening of the femoral component of hip replacements. *J Bone Joint Surg* 69B: 558-564. 1987.
- 21 Bradem M. Composites for use in making bone cements. US Patent. 4, 791, 150. 1988.
- 22 Fujisawa S., Kadoma Y. Action of eugenol as retarder against polymerisation of methyl methacrylate by benzoyl peroxide. *Biomaterials* 18: 701-703. 1997.
- 23 Deb S., Vázquez V., Bonfield W. Effect of crosslinking agents on acrylic bone cements based on poly(methylmethacrylate). *J Biomed Mater Res* 37: 465-473. 1997.
- 24 Prime R. B. Thermal Characterization of Polymeric Materials. Capítulo 6. 1379-1776. 2ª ed. *Academia Press*. New York. 1997.
- 25 Ortiz C., Vázquez B., San Román J. Hydrophilic acrylic biomaterials derived from vitamin E with antioxidant properties. *J Biomed Mater Res* 45: 184-191. 1999.
- 26 Smith D. C. Dental Materials and Their Selection. 3ª ed. *Quintessence Publishing Co. Inc.* Capítulo 9: 132-155. 2002.
- 27 Combe E. C., Burke F. J. T., Douglas W. H. Dental Biomaterials. 1ª ed. *Kluwer Academia Publishers*. Capítulo 26: 221-232. 1999.
- 28 Van Noort, R. Introduction to Dental Materials. 2ª ed. *Mosby-Elsevier Science*. Capítulo 2.3: 124-132. 2002.
- 29 Macorra J. C. Nuevos materiales a base de vidrio ionomero: vidrios ionomeros híbridos y resinas compuestas modificadas. *Rev Eur Odon Est* VII: 259-272. 1995.
- 30 Wilson A. D., Prosser H. J., Powis D. M. Mechanism of adhesion of polyelectrolyte cements to hydroxyapatite. *J Dent Res* 62: 590-592. 1983.
- 31 Larraz E., Elvira C., San Roman J. Novel acrylic macromonomer with amphiphilic character derived from triton X-100: radical polymerization with methyl methacrylate and thermal properties. *J Polym Sci Polym Chem* 41: 1641-1649. 2003.

-
- 32 ISO Specifications 9917. Standard Specification for Dental Water-Based Cements. 1991.
- 33 Wiegand A., Buchalla W., Attin T. Review on fluoride-releasing restorative materials-Fluoride release and uptake characteristics, antibacterial activity and influence on caries formation. *Dent Mater* 23: 343-362. 2007.
- 34 Sticht F. D., Smith P. M. Eugenol: Some pharmacologic observations. *J Dent Res* 50: 1531-1535. 1971.
- 35 Laekeman G. M., Van Hoof L., Haemers A., Vanden Berghe D. A., Herman A. G., Vlietinck A. J. Eugenol a valuable compound for *in vitro* experimental research and worthwhile for further *in vivo* investigation. *Phytother Res* 4: 90-96. 1990.
- 36 Millstein P. L., Nathanson D. Effects of eugenol and eugenol cements on cured composite resin. *J Prosthet Dent* 50: 211-215. 1983.
- 37 Gerosa R., Borin M., Menegazzi G., Puttini M., Cavalleri G. In vitro evaluation of the cytotoxicity of pure eugenol. *J Endod* 22: 532-534. 1996.
- 38 Nicholson J. W. Chemistry of glass-ionomer cements: a review. *Biomaterials* 19: 485-494. 1998.
- 39 Deb S., Shah P., Vázquez B., San Roman J. A novel Acrylic copolymer for a poly(alkenoate) glass-ionomer cement. *J Mater Sci. Mater Med.* 14: 575-581. 2003.
- 40 Nicholson J. W. Polyelectrolyte materials - reflections on a highly charged topic. *Chem Soc Rev* 23: 53-58. 1994.
- 41 Litsky A. S., Rose R. M., Rubin C. T., Thrasher E. L. A reduced modulus acrylic bone cements: Preliminary results. *J Orthop Res* 8: 623-626. 1990.
- 42 Cattani-lorente M. A., Dupuis V., Payan J., Moya F., Meyer J. M. Effect of water on the physical properties of resin-modified glass ionomer cements. *Dent Mater* 15: 71-78. 1999.
- 43 Forsten L. Fluor release and uptake by glass-ionomers and related materials and its clinical effects. *Biomaterials* 19: 503-508. 1998.
- 44 Brook I. M., Hatton P. V. Glass-ionomers: bioactive implant materials. *Biomaterials* 19: 565-571, 1998.
- 45 Hatton P. V., Brook I. M. Characterisation of the ultrastructure of glass ionomer (poly-alkenoate) cement. *Br Dent J* 173: 275-277. 1992.

***III.- RESUMEN GENERAL
Y CONCLUSIONES.***

III. RESUMEN GENERAL Y CONCLUSIONES.

En el presente trabajo se ha abordado la preparación de materiales con aplicabilidad en el campo de la cirugía dental y ortopédica con mayor funcionalidad que las formulaciones tradicionales. Por un lado se han desarrollado formulaciones autocurables de cementos óseos y dentales basados en poli(metacrilato de etilo) o de metilo, que incorporan los nuevos monómeros derivados de eugenol, introduciendo así nuevas propiedades terapéuticas a dichos sistemas y evitando el carácter inhibitorio de la molécula de eugenol frente a reacciones de polimerización radical. Por otra parte se han desarrollado nuevos sistemas portadores de eugenol como cementos ionómeros de vidrio. La preparación de estos sistemas se ha llevado siguiendo un esquema de trabajo que incluye la síntesis y caracterización de los sistemas portadores de eugenol, la evaluación de su biocompatibilidad y actividad frente a cultivos celulares humanos y distintos microorganismos patológicos, y la preparación de distintas formulaciones autocurables para su posterior evaluación como componentes de cementos óseos acrílicos, resinas dentales y cementos ionómero de vidrio.

Se han sintetizado dos nuevos monómeros derivados de eugenol mediante la incorporación de un grupo polimerizable acrílico que se une directamente (EgMA) o mediante un espaciador de cadena (EEgMA) a la molécula de eugenol a través de la funcionalidad fenólica sin que se modifique el resto de grupos funcionales presentes. La estructura química de estos nuevos monómeros se ve confirmada mediante su caracterización con diferentes técnicas espectroscópicas y térmicas. La evaluación de la citotoxicidad de ambos monómeros sobre cultivos celulares muestra niveles de mortalidad comparables a los observados para el eugenol. Además, se ha probado la actividad bactericida de estos monómeros frente a microorganismos patógenos demostrando el papel de los grupos para-alil-metoxi como inhibidores del desarrollo bacteriano, mostrando una mayor actividad el monómero que incorpora el grupo espaciador oxietilénico, siendo incluso mayor que la del propio eugenol.

Se han sintetizado los polímeros derivados de eugenol PEgMA y PEEgMA, mediante polimerización radical y se han copolimerizado los nuevos monómeros con otros monómeros acrílicos para la obtención de sistemas tanto solubles como

entrecruzados. La determinación de las relaciones de reactividad de estos monómeros frente al metacrilato de etilo indican la formación de copolímeros con una distribución de secuencias monoméricas estadística a lo largo de la cadena macromolecular, enriquecidas en unidades derivadas de eugenol EgMA y EEgMA respectivamente.

La extensión de la reacción a altas conversiones tanto en masa como en disolución, conlleva la formación de sistemas entrecruzados mediante la participación de los dobles enlaces alílicos en etapas avanzadas del proceso de polimerización, proporcionando estructuras macromoleculares con grupos eugenilo laterales, responsables de la actividad terapéutica y que forman redes tridimensionales mediante la unión de las macrocadenas a través de una pequeña porción de los dobles enlaces alílicos. Esta estructura se confirma mediante la caracterización físico-química de los distintos polímeros mostrando la presencia de las unidades laterales derivadas de eugenol que confieren al material propiedades antioxidantes y estabilizadoras adicionales, tanto térmica como estructuralmente. La evaluación de la biocompatibilidad de estos homopolímeros y copolímeros derivados de eugenol frente a cultivos celulares de fibroblastos humanos muestra niveles de citotoxicidad muy bajos y comparables con otros polímeros de baja toxicidad como el poliestireno o el poli(metacrilato de etilo), empleados como controles negativos en este tipo de ensayos. Por otra parte, la evaluación de la capacidad bacteriostática de estos copolímeros muestra la permanencia de la actividad bacteriostática de los grupos eugenilo anclados lateralmente a las cadenas poliméricas. Los polímeros que presentan mayores niveles de inhibición son los que incorporan la función eugenilo unida a través del grupo espaciador que le permite mayor movilidad y por tanto mayor grado de interacción con los microorganismos.

Se han preparado formulaciones autocurables que incorporan los derivados acrílicos de eugenol en su estructura proporcionándoles importantes mejoras en cuanto a la estabilidad dimensional aumentando tanto su resistencia mecánica, como su resistencia a la degradabilidad frente a procesos oxidativos.

Como conclusiones de este trabajo cabe destacar:

1. La sustitución de la funcionalidad fenólica de la molécula de eugenol por otras derivadas de éster α,β insaturada, evita el carácter inhibitorio de éste frente a procesos de polimerización radical. Estos monómeros además mantienen inalteradas la estructura 2-metoxi, 4-alilo responsable de buena parte de la actividad terapéutica de estas moléculas, mostrando niveles comparables de citotoxicidad a la vez que una capacidad inhibitoria de la proliferación bacteriana.
2. La polimerización de estos monómeros proporciona polímeros solubles a baja conversión mientras que a alta conversión da lugar a polímeros entrecruzados.
3. La copolimerización de los sistemas p(EMA-co-EgMA) y p(EMA-co-EEgMA) presenta una distribución estadística de secuencias monoméricas a lo largo de las cadenas macromoleculares enriquecidas en unidades derivadas de eugenol, EgMA y EEgMA respectivamente.
4. La copolimerización de los monómeros EgMA y EEgMA en masa a alta conversión, da lugar a estructuras entrecruzadas cuyo grado de entrecruzamiento y peso molecular entre nudos se modula en función de la cantidad de comonómero presente en el sistema.
5. Los estudios del comportamiento *in vitro* de los copolímeros derivados de eugenol muestran la incidencia que tiene la presencia del grupo oxietilénico en la estructura de los copolímeros, aumentando la hidrofobicidad a medida que se introduce el monómero EgMA pero disminuyendo a medida que lo hace el monómero EEgMA en el copolímero
6. Los estudios de degradación térmica muestran una estabilización clara frente a la degradación por procesos oxidativos en los copolímeros derivados de eugenol.
7. Los cultivos celulares con fibroblastos humanos realizados sobre los distintos copolímeros, revelan un bajo grado de citotoxicidad para los sistemas portadores de eugenol, además de una buena adhesión de los fibroblastos sobre las superficies de los distintos copolímeros, convirtiéndolos en buenos candidatos

- para el desarrollo de nuevos cementos óseos y dentales, dotados de mayor funcionalidad que los existentes comerciales.
8. Los estudios realizados con microorganismos patógenos sobre los distintos copolímeros, indican la presencia de actividad bacteriostática frente al desarrollo de colonias sobre substratos en contacto con el propio material, siendo más intensos en los sistemas derivados del monómero EEgMA.
 9. La obtención de poli(metacrilato de etilo) mediante polimerización radical en suspensión del monómero EMA en presencia de PVA, bajo condiciones controladas de temperatura y velocidad de agitación produce partículas esféricas de PEMA de tamaño y distribución de tamaños uniforme. Estas partículas pueden ser introducidas como componentes de la fase sólida en formulaciones autocurables basadas en resinas de PEMA.
 10. La introducción de los monómeros derivados de eugenol en dichas formulaciones da como resultado la obtención de materiales vítreos, que al fraguar originan un menor riesgo de necrosis en los tejidos adyacentes y muestran niveles de resistencia mecánica significativamente superiores a las formulaciones clásicas, indicando una mayor estabilidad estructural frente a las tensiones producidas sobre el cemento. Además, estos cementos presentan propiedades bactericidas así como antioxidantes, que les confieren unas propiedades terapéuticas adicionales frente a las formulaciones clásicas.
 11. Se ha comprobado la formación de cementos dentales de ionómero de vidrio a partir de formulaciones comerciales modificadas con copolímeros portadores de unidades de ácido acrílico y de EgMA. Estos cementos proporcionan una mejora en los valores de pH y de liberación de fluoruro con respecto al cemento comercial. Estos resultados son beneficiosos porque permite reducir la sensibilidad pulpal postoperatoria y prevenir la aparición de caries secundarias mediante la liberación de fluoruro, manteniéndose esta actividad en el tiempo como consecuencia de la presencia de los grupos eugenilo presentes en la estructura de los cementos.

