

Capítulo 6

Estudio de la degradación *in vitro* del material compuesto PLA50

6.1. INTRODUCCIÓN

En el capítulo 3, se comentó la gran importancia del estudio de la degradación *in vitro* de los materiales desarrollados en la presente Tesis. Debido a que el objetivo final de dichos materiales es, en forma general, actuar como substitutos temporales, siendo reemplazados de forma gradual por el tejido neoformado, es de gran relevancia el estudio de la evolución de las diferentes propiedades del material a lo largo de su degradación.

El mecanismo de degradación del ácido poliláctico ha sido ampliamente estudiado por diferentes autores (1-3). En cuanto al vidrio G5, en el capítulo 3 se ha presentado un estudio del comportamiento de este tipo de vidrios de fosfato durante su degradación. Sin embargo, la presencia de partículas de vidrio dentro de la matriz polimérica, podría modificar tanto el mecanismo de degradación del polímero como el de las partículas de vidrio. Asimismo, es interesante estudiar los cambios morfológicos y mecánicos del nuevo material así como su potencial bioactividad.

Objetivo

En el capítulo anterior se elaboraron compuestos con distintos porcentajes de vidrio. Estos compuestos fueron caracterizados en términos de sus propiedades mecánicas y térmicas principalmente. Entre los diferentes compuestos estudiados, el PLA50 resultó

ser el material con mejores propiedades mecánicas. Debido a esto, el PLA50 fue el material seleccionado para realizar los estudios de degradación.

El presente capítulo estudia la degradación *in vitro*, es decir, simulando condiciones fisiológicas, del PLA50 durante un período de 6 semanas. Además, se utilizó el PLA como material control o de referencia para así comparar el efecto de la incorporación de las partículas de vidrio en la matriz polimérica. La evolución de ambos materiales durante el período de degradación se evaluó en función de los cambios físico-químicos experimentados por ambos materiales.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Materiales

En este capítulo se han utilizado como matriz polimérica y como refuerzo, ácido poli 95L/5DL láctico y partículas de vidrio G5 con las mismas características descritas en el capítulo 5, apartados 5.2.1.1 y 5.2.1.2.

6.2.2. Métodos

6.2.2.1. Preparación del material compuesto

El método de elaboración fue idéntico al utilizado en el capítulo anterior, y está descrito con detalle en el apartado 5.2.2.1 del capítulo 5. En este caso sólo se prepararon muestras de PLA y del compuesto PLA50 ya que éste fue el material que presentó mejores propiedades mecánicas entre los diferentes compuestos desarrollados como se describe en los resultados del capítulo 5, apartado 5.3.6.

6.2.2.2. Pérdida de peso en medio fisiológico simulado del material compuesto

El ensayo de degradación se realizó por un período de seis semanas, siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para la degradación de los vidrios de fosfato (apartado 3.2.2.1, capítulo 3). Al igual que en el caso de los vidrios, se utilizó SBF (*Simulated Body Fluid*) a 37°C como medio de inmersión del material y una relación superficie/volumen de 1 cm² / 10 ml de fluido.

La degradación del compuesto fue evaluada mediante mediciones semanales de pérdida de peso, utilizando la ecuación [2.6]. Se utilizaron 3 muestras de compuesto PLA50 de 1x1x0.15cm y 3 muestras de PLA con dimensiones similares. El PLA actuó como control para comparar el efecto de la incorporación del vidrio dentro de la matriz

polimérica. Cada semana las muestras fueron extraídas del líquido, lavadas con agua destilada y secadas en una estufa a 37°C hasta la estabilización de su peso.

A pesar de que el método utilizado para la determinación de la pérdida de peso de los materiales estudiados es una metodología estándar, se verificó la cantidad de agua presente en el material compuesto después del protocolo de secado. Para esto se llevó la cabo la calcinación del compuesto PLA50. Finalmente, se recalcularon los valores de pérdida de peso teniendo en cuenta los valores de contenido en agua obtenidos a partir de la calcinación del material.

6.2.2.3. Determinación del porcentaje de cenizas del material compuesto durante la degradación

Con el fin de analizar la evolución de la fase de refuerzo durante el período completo de degradación, se procedió a realizar un ensayo de cenizas cada dos semanas, es decir, después de 2, 4 y 6 semanas de inmersión en el SBF. Se siguió el método descrito en la sección 5.2.2.3.1 del capítulo anterior. Para cada período de tiempo se utilizaron 3 muestras de 1x1x 0.15 cm aproximadamente.

6.2.2.4. Determinación de las temperaturas características y cristalinidad mediante DSC

Las temperaturas características y la cristalinidad del material fueron evaluadas al inicio del estudio de degradación y después de 2, 4 y 6 semanas de inmersión en SBF a 37°C. Se analizaron 3 muestras de PLA y 3 de PLA50 siguiendo las condiciones descritas en la sección 5.2.2.3.4 del capítulo 5, con el fin de determinar las diferentes temperaturas características (T_g , T_c , T_m) y la cristalinidad ($\%X_c$). Al igual que en el capítulo anterior, el porcentaje de cristalinidad ($\%X_c$) de los materiales fue calculado usando el valor de ΔH_{mcorr} según el porcentaje de vidrio presente en cada intervalo de tiempo y como referencia el calor de entalpía teórico del PLA supuesto 100% cristalino y monodisperso ($\Delta H_m=93.1 \text{ J/g}$) (4).

6.2.2.5. Evaluación del peso molecular (M_w) mediante GPC

La evolución de la estructura molecular del polímero a lo largo de la degradación fue determinada utilizando la técnica del GPC. Para esto, se utilizaron dos diferentes muestras de PLA y PLA50 y se siguió el procedimiento descrito en el capítulo anterior. El análisis se realizó después de 0, 2, 4 y 6 semanas de degradación.

Los resultados fueron expresados en forma de porcentaje de pérdida de peso molecular. Para ello se utilizó una relación similar a la utilizada para la pérdida de peso (ecuación 2.6). En este caso la ecuación fue la siguiente:

$$\% M_{w0} = \frac{M_{w0} - M_{wt}}{M_{w0}} \quad [6.1]$$

donde M_{w0} es el peso molecular inicial del material y M_{wt} es el peso molecular del material después de cada intervalo de tiempo durante el periodo de degradación.

6.2.2.6. Caracterización superficial del material compuesto

La evolución de la superficie de los materiales (PLA y PLA50) fue evaluada mediante microscopía electrónica de barrido, difracción de rayos X, espectroscopía Raman y espectroscopía infrarroja (FTIR, *Fourier Transformed Infrared Spectroscopy*).

Después de 2, 4 y 6 semanas de degradación en SBF, los materiales fueron extraídos del fluido y lavados con agua destilada para eliminar cualquier tipo de contaminación de la superficie del material. Una vez lavados, los materiales fueron secados en una estufa a 37°C durante 24 horas aproximadamente. Finalmente, la superficie exterior y la superficie de fractura de los materiales fue cubierta con oro para su observación en el microscopio electrónico de barrido (MEB), se utilizó un equipo *Jeol JSM-6400*. Además de la observación de la superficie de los materiales, se efectuó el análisis químico elemental de la misma mediante Energía Dispersiva de Rayos X (EDX), usando un equipo *Link® LZ-5*.

Para la caracterización de la superficie del material compuesto mediante difracción de rayos X, se utilizó un difractómetro de geometría Bragg-Brentano $\theta/2\theta$ Siemens D-500, utilizando la radiación K_{α} del cobre ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) a un voltaje de trabajo de 40 KV y una intensidad de corriente de 30 mA. Los ensayos se realizaron en un rango angular 2θ entre 4 y 70°, efectuando mediciones cada 0.05° y aplicando un tiempo de medida de 3 segundos por cada una de ellas.

Para la espectroscopía Raman se siguió un procedimiento similar al utilizado para los vidrios, es decir, se utilizó una fuente de excitación láser de iones de argón con una longitud de onda de 414.5 nm. Se analizó la superficie del material compuesto después de 2, 4 y 6 semanas de degradación enfocando el área de interés mediante un microscopio óptico con un objetivo de 50 aumentos, obteniéndose así espectros microraman.

La espectroscopía infrarroja es una técnica complementaria a la espectroscopía Raman, que permite el estudio de las vibraciones moleculares cuando se produce la interacción de la radiación electromagnética con la materia. La información que aporta el espectro infrarrojo es característica de cada sustancia, por lo tanto permite caracterizar moléculas con un alto grado de especificidad. En nuestro caso, el análisis se llevó a cabo utilizando un espectrómetro de infrarrojos por transformada de Fourier, *Bomem MB-120*, en un rango de longitudes de onda entre 400-4000 cm^{-1} . Las muestras fueron

obtenidas raspando la superficie del material compuesto después de diferentes tiempos de degradación. Posteriormente, pequeñas cantidades de los precipitados de fosfato de calcio extraídos de la superficie, fueron mezcladas con bromuro de potasio y prensadas para obtener tabletas del material muy delgadas. Las tabletas fueron colocadas en el espectrómetro para su análisis.

6.2.2.7. Ensayos mecánicos

Se llevaron a cabo ensayos de flexión en 3 puntos antes de sumergir las muestras en SBF y después de 2, 4 y 6 semanas de degradación para observar el efecto del fluido en el comportamiento mecánico del material. El ensayo mecánico se llevó a cabo siguiendo el método descrito en el apartado 5.2.2.3.5 del capítulo anterior. Para cada período de tiempo, se ensayaron 3 muestras de cada material (PLA y PLA50) de las siguientes dimensiones, 50.8x12.7x1.5 mm según la norma ASTM D790-02.

6.3. RESULTADOS

6.3.1 Pérdida de peso

La Figura 6.1 muestra la variación de peso del PLA y del compuesto PLA50 y del vidrio G5 durante el período de degradación. En dicha gráfica se observa que la variación de peso correspondiente a las muestras de PLA y de G5, mantuvieron una tendencia creciente y continua a lo largo del período estudiado. Sin embargo, el PLA50, experimentó un comportamiento más complejo en el porcentaje de pérdida de peso durante las 6 semanas de inmersión en SBF a 37°C. Se observó que después de 3 semanas de degradación, el material compuesto sufrió una pérdida de peso del 25%. Después de este intervalo de tiempo, hubo una disminución en el porcentaje de pérdida de peso, lo cual indica que hubo un aumento de peso por parte del material.

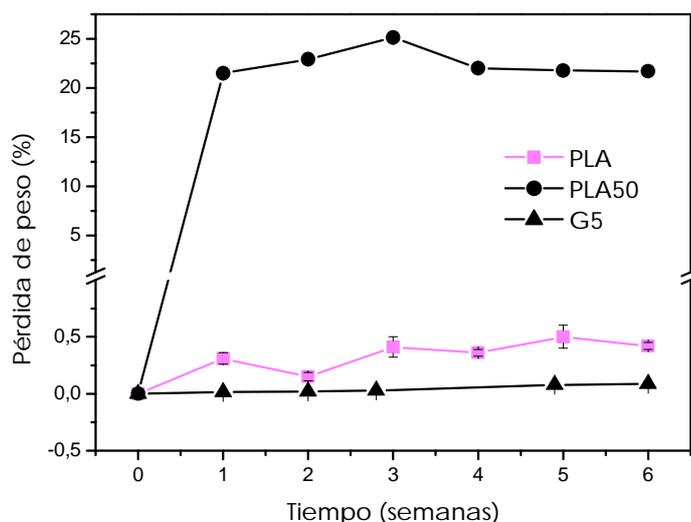


Figura 6. 1. Evolución del porcentaje de pérdida de peso del PLA, del vidrio G5 y del PLA50 a lo largo del período de degradación. Cuando las barras de error no aparecen es porque son más pequeñas que los símbolos.

6.3.2. Ensayo de Cenizas

Los resultados obtenidos a partir del ensayo de cenizas realizado al material compuesto después de varias semanas de degradación se encuentran tabulados en la Tabla 6.1.

Se observa claramente que hubo una pérdida progresiva del porcentaje de fase inorgánica en el material compuesto, llegando a perder hasta un 17.5% en peso respecto al porcentaje de vidrio inicial después de 6 semanas de degradación. También se puede ver un pequeño aumento a las 4 semanas.

Tabla 6.1

Variación del porcentaje en peso de la fase de refuerzo del PLA50, después de diferentes períodos de degradación (Media \pm Desviación Estándar, n=3).

Tiempo (semanas)	Cantidad de fase inorgánica (%)
0	47.99 \pm 1.71
2	40.98 \pm 1.70
4	41.27 \pm 4.78
6	39.57 \pm 1.89

6.3.3. Evolución del peso molecular

La evolución del porcentaje de pérdida de peso molecular tanto para las muestras de PLA50 como para las de PLA se encuentra en la Figura 6.2 y los valores absolutos de los pesos moleculares se recogen en la Tabla 6.2. Ambos materiales presentaron un comportamiento similar después de 6 semanas de degradación. No obstante, los resultados obtenidos a través de la técnica de GPC, indicaron que el material compuesto experimentó al inicio del período de inmersión, una pérdida de peso molecular dos veces mayor que la del PLA puro. Por otro lado, después de 4 y 6 semanas de degradación, el porcentaje de pérdida de peso molecular para las muestras de PLA fue ligeramente mayor que para el compuesto PLA50.

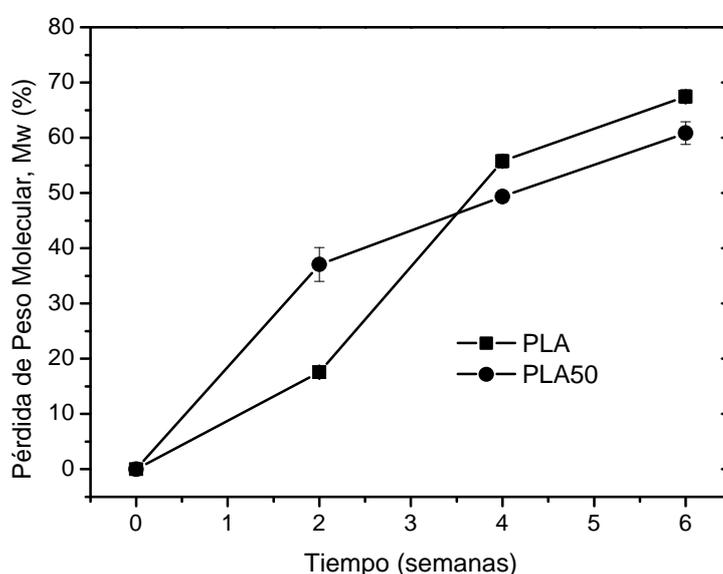


Figura 6. 2. Evolución del M_w de la matriz polimérica con el tiempo de degradación. Cuando las barras de error no aparecen es porque son más pequeñas que los símbolos.

Tabla 6.2

Peso molecular (M_w) del PLA y del PLA50 después de diferentes períodos de degradación. (Media \pm Desviación Estándar, $n=2$).

Material	M_w (10^5)
PLA _{presado} (0 semanas)	2.10 ± 0.05
PLA, 2 semanas	1.72 ± 0.02
PLA, 4 semanas	0.92 ± 0.04
PLA, 6 semanas	0.68 ± 0.04
PLA50	1.95 ± 0.03
PLA50 ,2 semanas	1.27 ± 0.04
PLA50 ,4 semanas	1.07 ± 0.04
PLA50 ,6 semanas	0.76 ± 0.03

6.3.4. Evolución de las temperaturas características y la cristalinidad

La Figura 6.3 muestra los termogramas correspondientes al PLA y el PLA50 a diferentes períodos de degradación.

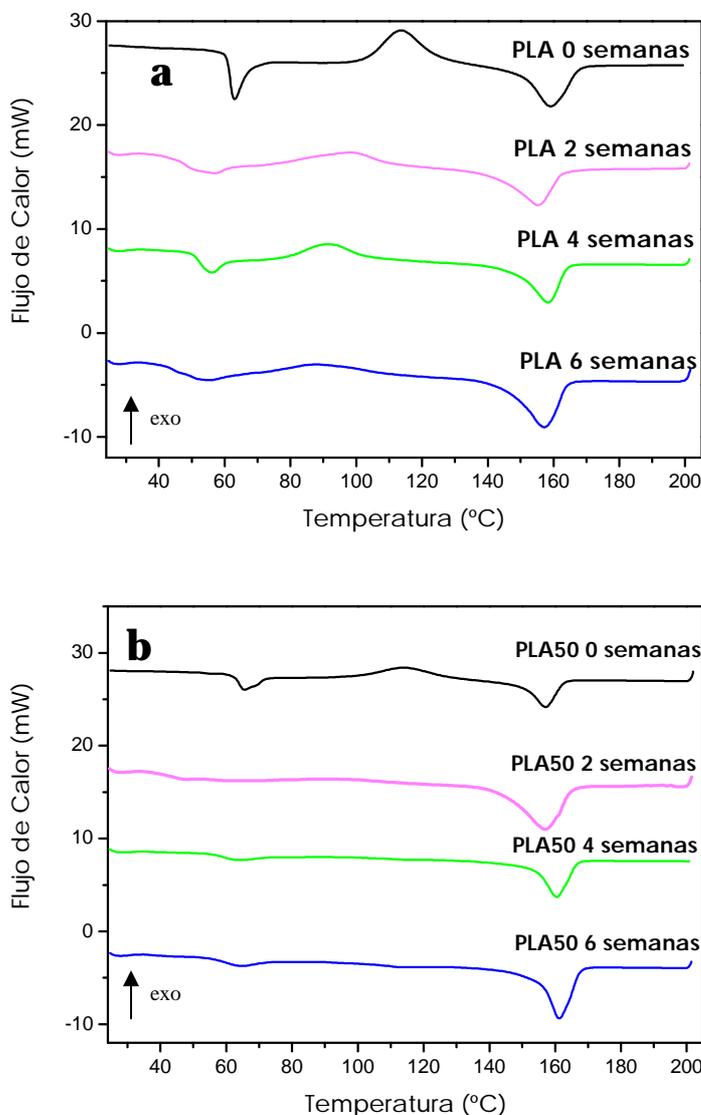


Figura 6.3. Termogramas DSC obtenidos a partir del primer calentamiento del PLA (a) y del PLA50 (b) después de diferentes períodos de degradación.

Los termogramas de la Figura 6.3a correspondientes al PLA muestran un aumento progresivo del pico de fusión al mismo tiempo que el pico de cristalización disminuye. Los termogramas de la Figura 6.3b muestran la evolución de las transiciones térmicas del PLA50 a lo largo del período de degradación en SBF. En este caso se ve claramente como después de las 2 primeras semanas de degradación, el pico correspondiente a la cristalización desapareció.

En la Tabla 6.3 se encuentran los valores obtenidos mediante DSC para los dos materiales, PLA y PLA50 a lo largo del período de degradación. Los valores correspondientes a la temperatura de transición vítrea (T_g) medidos en el segundo calentamiento del material, mostraron una disminución progresiva a lo largo de las 6 semanas de inmersión en el fluido. En el caso del PLA, el porcentaje de cristalinidad ($\%X_c$), aumentó gradualmente durante las 6 semanas de degradación mientras que el material compuesto tuvo una variación muy drástica en su cristalinidad después de 2 semanas.

Tabla 6.3
Evolución de la transiciones térmicas y cristalinidad del PLA y PLA50 a lo largo del período de degradación en SBF a 37°C. (Media \pm Desviación Estándar, n=3)

PLA	0 semanas	2 semanas	4 semanas	6 semanas
T_g (°C)	58.61 \pm 0.58	56.53 \pm 1.86	56.43 \pm 1.42	54.03 \pm 2.40
T_c (°C)	114.01 \pm 0.44	98.83 \pm 0.82	91.22 \pm 0.56	87.39 \pm 0.85
T_m (°C)	154.26 \pm 1.25	155.13 \pm 0.80	157.05 \pm 0.06	158.38 \pm 0.42
DH_c (J/g)	11.95 \pm 1.05	17.13 \pm 1.24	16.51 \pm 0.89	22.47 \pm 1.36
DH_m (J/g)	-14.38 \pm 1.32	-23.54 \pm 0.99	-24.84 \pm 0.28	-30.76 \pm 1.15
% X_c	2.41 \pm 1.63	6.88 \pm 1.42	8.95 \pm 1.58	9.68 \pm 2.93
PLA50				
T_g (°C)	57.95 \pm 0.09	57.89 \pm 0.05	57.85 \pm 0.12	56.82 \pm 0.01
T_c (°C)	114.33 \pm 0.12	--	--	--
T_m (°C)	157.04 \pm 1.39	158.04 \pm 0.05	160.47 \pm 0.69	161.11 \pm 0.43
DH_c (J/g)	14.40 \pm 0.95	--	--	--
DH_{corr} (J/g)	27.68 \pm 1.73	--	--	--
DH_m (J/g)	-16.19 \pm 0.89	-20.22 \pm 1.43	-21.47 \pm 0.25	-22.15 \pm 0.78
DH_{mcorr} (J/g)	-31.13 \pm 1.52	-33.99 \pm 2.77	-36.55 \pm 9.1	-36.65 \pm 4.73
% X_c	3.71 \pm 1.32	33.56 \pm 3.45	38.1 \pm 3.01	38.56 \pm 2.62

6.3.5. Análisis morfológico de la superficie del material

El análisis por microscopía electrónica de barrido mostró interesantes cambios en la morfología de la superficie del material compuesto durante el período de degradación en SBF en comparación con la superficie del PLA que se mantuvo sin cambios durante las 6 semanas de degradación (ver Figura 6.3).

La evolución de la superficie del material se puede observar en las Figuras 6.4. Inicialmente (Figura 6.4a), se observó la superficie plana del polímero interrumpida sólo por algunas protuberancias o discontinuidades debidas a la presencia de las partículas de vidrio. Sin embargo, después de 2 semanas de inmersión en SBF a 37°C, la superficie de las partículas de vidrio comenzó a emerger en la superficie polimérica, y en algunos casos se vio el rompimiento del polímero dando paso a las partículas de vidrio y a una nueva sustancia (Figura 6.4b). Después de tres semanas de degradación se formó sobre la superficie del material compuesto, una serie de precipitados dispersos por toda la superficie del mismo (Figura 6.4c). Los precipitados mostraron una estructura de forma globular cubiertos por cristales muy pequeños como se observa en la Figura 6.5. Esta estructura globular evolucionó hacia una estructura esférica e interconectada a modo de esqueleto poroso, después de seis semanas en SBF (Figuras 6.4d y 6.5).

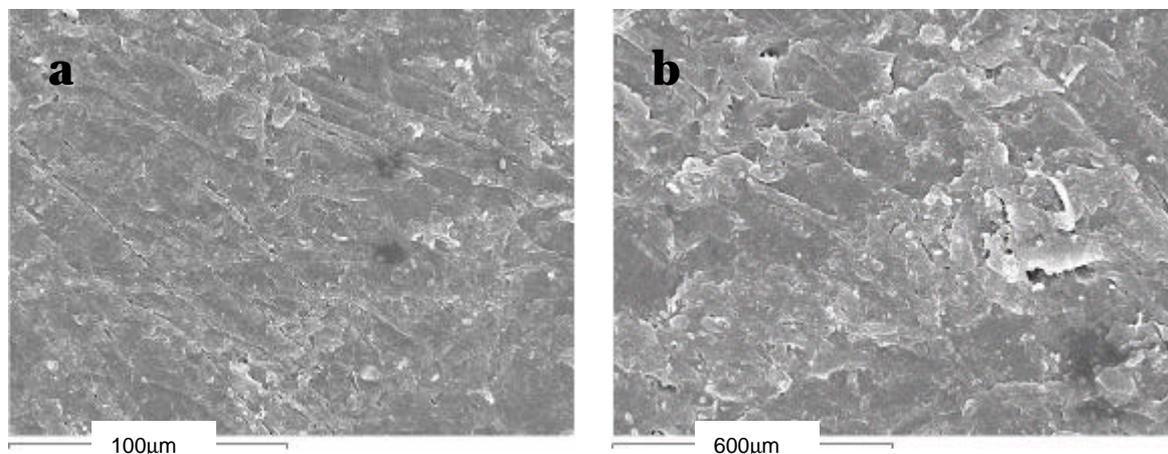


Figura 6.3. Micrografía de MEB de la superficie del PLA después de diferentes tiempos de degradación:
(a) $t=0$; (b) $t= 6$ semanas.

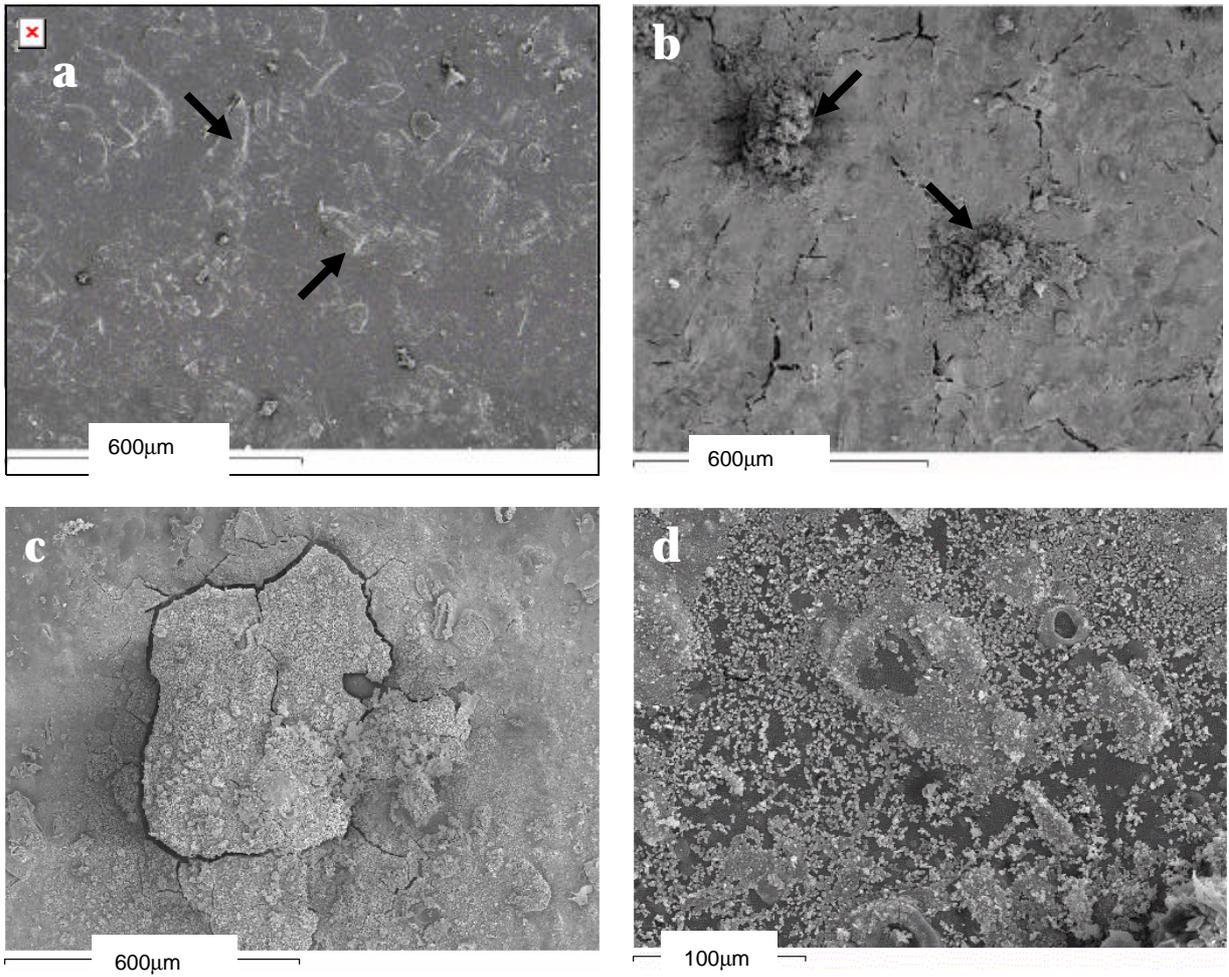


Figura 6.4. Micrografía de MEB de la superficie del material compuesto y microestructura del precipitado de fosfato de calcio formado en la superficie del material después de diferentes tiempos de degradación: (a) $t=0$; (b) $t= 2$ semanas; (c) $t=3$ semanas y (d) $t=6$ semanas. Las flechas negras muestran las partículas de vidrio y los precipitados.

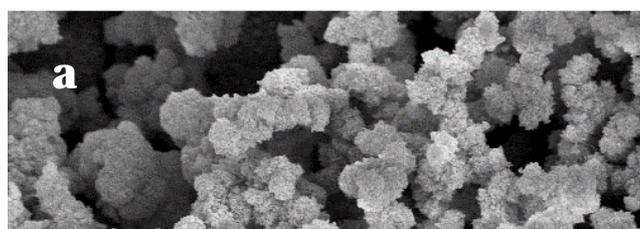


Figura 6.5. Micrografía de MEB de la microestructura del fosfato de calcio precipitado en la superficie del material compuesto después de 6 semanas de inmersión en SBF.

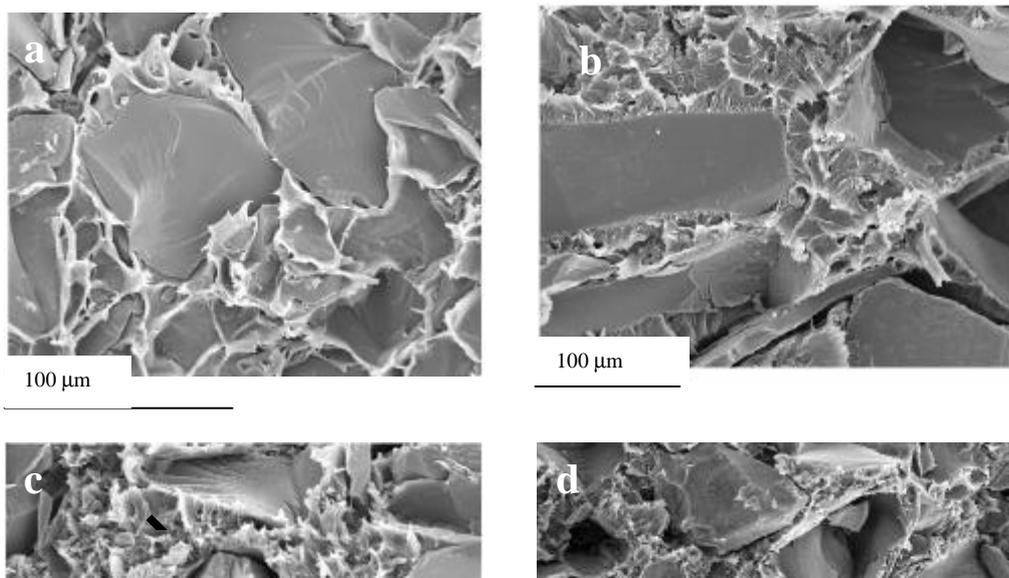


Figura 6.6. Micrografías de MEB de la superficie de fractura del material compuesto PLA50 después de: (a) $t=0$; (b) $t= 2$ semanas; (c) $t=4$ semanas y (d) $t= 6$ semanas. Las flechas negras indican algunos de los puntos de descohesión.

En cuanto a la superficie de fractura, se observó una distribución homogénea de las partículas de vidrio en la matriz de PLA. En algunos casos (Figura 6.6b) se observaron partículas bien adheridas a la matriz, otras parecen bastante desunidas. No se observaron cambios morfológicos relevantes a través del tiempo de degradación en las partículas de vidrio. Sin embargo, si se observó la descohesión progresiva entre las partículas y el polímero (Figura 6.6 c y d).

6.3.6. Evolución de la relación Ca/P en la superficie del material compuesto

Los cambios en la relación molar Ca/P de los precipitados formados en la superficie del material a lo largo de la degradación se muestran en la Tabla 6.3. Los resultados obtenidos a través de EDX indicaron que la relación molar aumentó aproximadamente de 0.54 (la cual corresponde a la relación Ca/P inicial del vidrio G5), hasta 1.39 después de 4 semanas de degradación. Finalmente después de seis semanas de degradación, el precipitado presentó una relación de 1.5.

Tabla 6.3

Relación molar Ca/P del vidrio G5 y del precipitado formado en la superficie del compuesto después de diferentes períodos de tiempo (Media \pm Desviación Estándar, $n=3$).

Tiempo (semanas)	Relación Ca/P
0	0.53 ± 0.04
2	0.91 ± 0.09
4	1.39 ± 0.12
6	1.5 ± 0.15

6.3.7. Cambios estructurales

Los difractogramas del precipitado después de 4 y 6 semanas (ver Figura 6.7) presentaron un solo máximo bastante ancho entre 19.72° y 38.5° , centrado en 29.2° , indicando la presencia de una fase amorfa.

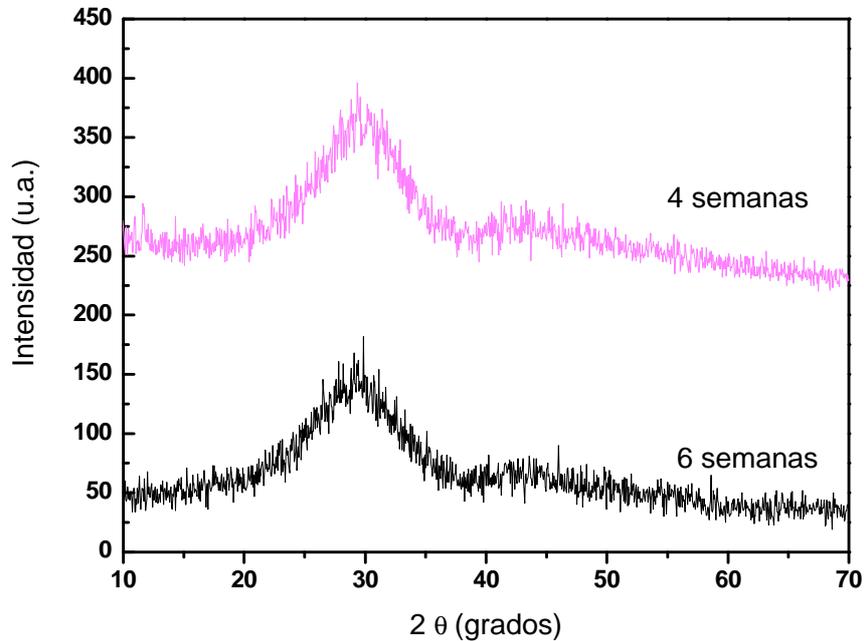


Figura 6.7. Difractograma del compuesto precipitado sobre el compuesto PLA50 después de 4 y 6 semanas.

Los espectros Raman mostrados en la Figura 6.8, corresponden a las partículas de vidrio G5 en su estado inicial ($t=0$) y al precipitado formado durante el período de degradación. El espectro Raman del vidrio G5 presentó las bandas correspondientes a un vidrio de metafosfato como ya se comentó en el capítulo 2 (apartado 2.3.5) (5-8). Sin embargo, el espectro de los precipitados, muestra grandes diferencias con respecto al del vidrio inicial. La mayoría de las bandas correspondientes a los grupos Q^2 o metafosfato, disminuyeron notablemente en intensidad o desaparecieron, mientras que nuevas bandas correspondientes a grupos Q^1 o pirofosfato, formadas cerca de los 1040 y 745 cm^{-1} y a los grupos Q^0 o ortofosfato cerca de los 960 cm^{-1} aparecieron o aumentaron en intensidad (ver Tabla 6.6).

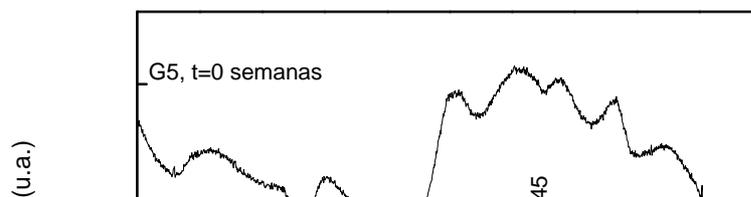


Figura 6.8. Espectros Raman del vidrio G5 (t=0) y del precipitado de fosfato de calcio formado en la superficie después de 6 semanas de inmersión en SBF.

Tabla 6.6

Modos de vibración Raman para los vidrios de fosfato (5;8-10)

Modo de vibración	Frecuencia(cm⁻¹)
Tensión (POP) _{sim} (Q ¹)	740-765
Tensión (POP) _{sim} (Q ²)	690-700
Tensión (P=O) _{sim} (Q ³)	1280-1390
Tensión (PO ₂) _{sim} (Q ²)	1130-1220
Tensión (PO ₂) _{asim} (Q ²)	1240-1278
Tensión (PO ₃) _{sim} (Q ¹)	1020-1050
Tensión (PO ₃) _{asim} (Q ¹)	1055-1074
Tensión (PO ₄) _{sim} (Q ⁰)	950-960

En las Figuras 6.9 y 6.10 se encuentran los espectros infrarrojos del precipitado de fosfato de calcio después de 6 semanas de inmersión en SBF. El espectro obtenido a las 4 semanas fue idéntico. Las bandas principales del espectro se observaron entre 400 y 1250 cm⁻¹ como se ve en la Figura 6.9, seguidos de una banda a 1650 cm⁻¹ y una ancha banda hacia 3000-3500 cm⁻¹. Las dos últimas bandas son atribuidas a la presencia de moléculas de agua. La Figura 6.10, muestra con más detalle las bandas debidas a las diferentes vibraciones P-O.

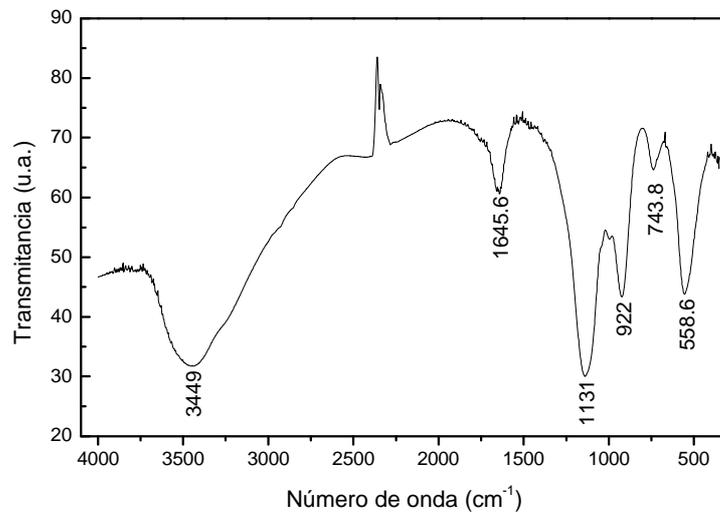


Figura 6.9. Espectro infrarrojo del compuesto de fosfato de calcio precipitado en la superficie del PLA50 después de 6 semanas de inmersión en SBF.

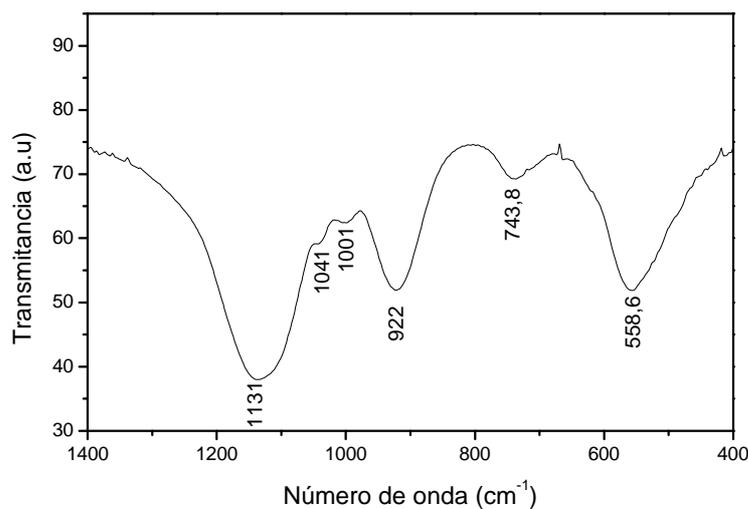


Figura 6.10. Espectro infrarrojo del compuesto de fosfato de calcio precipitado en la superficie del PLA50 después de 6 semanas de inmersión en SBF. Magnificación de la zona de interés, entre 1200-400 cm^{-1} .

Las Tabla 6.7 y 6.8 recogen los modos de vibración FTIR y Raman correspondientes a los grupos pirofosfato y al fosfato de calcio amorfo (ACP).

Tabla 6.7

Modos de vibración de FTIR y Raman para los grupos pirofosfato ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$)(6;7;9)

Modo de Vibración	IR (cm^{-1})	Raman (cm^{-1})
Tensión (PO_3) _{asim} (Q^1)	1121-1141	1055-1074

	1002-1004	
Tensión (PO₃)_{sim} (Q¹)	1041-1049	1020-1050
Tensión (POP)_{asim} (Q¹)	725-728	740-765

Tabla 6.8

Posición de las bandas Raman y FTIR del fosfato de calcio amorfo (ACP) (11-13)

Modos del grupo PO₄ (Raman) (cm⁻¹)				Modos del grupo PO₄ (FTIR) (cm⁻¹)			
V ₁	V ₂	V ₃	V ₄	V ₁	V ₂	V ₃	V ₄
952	435	1045	590	940	450	1050	560
960		1075					

Las bandas presentes en el espectro FTIR (Figura 6.10) podrían ser atribuidas a algunos de los modos de vibración de los grupos pirofosfato debidos a la precipitación de algún complejo de pirofosfato de calcio, y a los grupos ortofosfatos correspondientes al fosfato de calcio amorfo (ACP), por ejemplo: las bandas situadas a 1131, 1041, 1001 y 743 cm⁻¹ pueden ser atribuidas a los diferentes grupos pirofosfato. Las bandas situadas a 1041, 558.5 y 922cm⁻¹ podrían ser asignados al ACP (11).

6.3.8. Propiedades mecánicas

En la Figura 6.11 se muestra la evolución del módulo elástico tanto del PLA como del PLA50 durante el periodo de inmersión en SBF. Se puede observar que el PLA mantuvo el valor del módulo casi constante durante las 6 semanas, mientras que el compuesto con 50% de partículas de vidrio, experimentó una brusca caída del módulo de Young después de 48 horas de contacto con el fluido y este valor se mantuvo más o menos constante después de 4 y 6 semanas de degradación, presentando un valor cercano al del PLA sin refuerzo.

En cuanto a la resistencia a la flexión (Figura 6.12), el PLA mostró una disminución progresiva de la resistencia a flexión durante las 6 semanas de degradación en SBF al igual que el compuesto PLA50. Después de 6 semanas, la resistencia a flexión del PLA50 disminuyó aproximadamente un 44%. Mientras que la del PLA disminuyó aproximadamente un 31%.

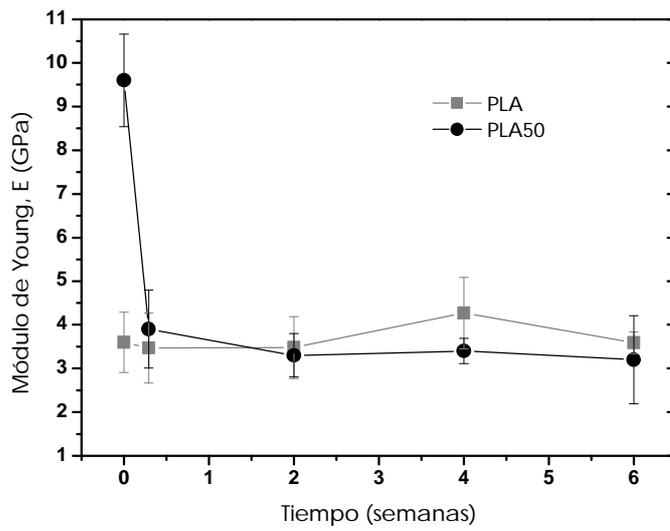


Figura 6.11. Evolución del módulo de Young del PLA y del PLA50 durante el tiempo de degradación in vitro.

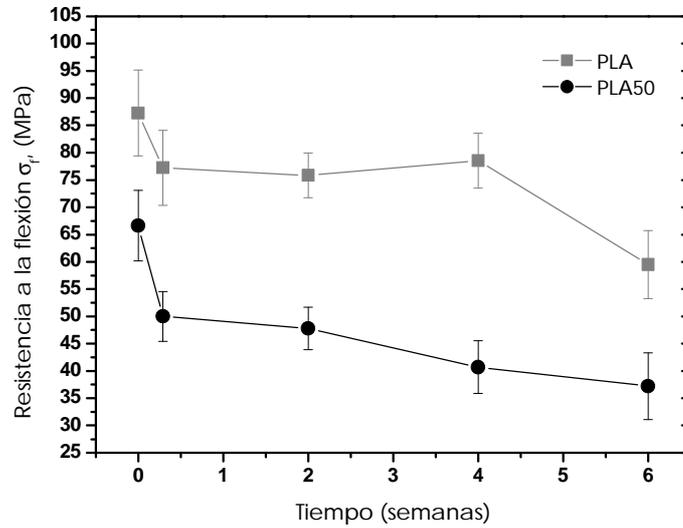


Figura 6.12. Evolución de la resistencia a flexión del PLA y el PLA50 durante el período de degradación in vitro.

6.4. DISCUSIÓN

En este estudio se ha analizado la evolución de la degradación del material compuesto PLA50, formado por PLA y 50% en peso de partículas de vidrio. La finalidad de este estudio fue caracterizar el proceso de degradación de este material bajo condiciones *in vitro*. Dicho material fue analizado en función de su pérdida de masa y peso molecular, cambios morfológicos en la superficie y variaciones físico-químicas de la matriz polimérica y del vidrio, así como también en función de su comportamiento mecánico. Ya que el patrón de degradación del PLA ha sido ampliamente estudiado (1;2;14), se utilizaron muestras de PLA con el fin de evaluar el efecto de las partículas de vidrio en la matriz polimérica durante el período de degradación.

En general, los resultados obtenidos a lo largo del estudio indicaron que la incorporación de las partículas de vidrio G5 en el polímero, modificó notablemente el proceso de degradación del PLA e indujo cambios significativos en la morfología de la superficie del material.

Las muestras de PLA experimentaron una pérdida de peso creciente pero gradual durante el período completo, hasta alcanzar una pérdida del 0.5% después de 6 semanas. Estudios previos realizados por diferentes autores han reportado resultados similares. Li *et al* (15) reportaron una pérdida de peso menor del 3 % después de 70 días de degradación para el PLA (50L/50DL) en una solución tamponada a pH 3.7 y 37°C. En un estudio previo, Li *et al* (1;16) estudió la influencia de la cristalinidad en la velocidad de degradación del PLA y reportó que el PLA semicristalino no sufrió pérdidas de peso significativas antes de 7 semanas de degradación. A las 7 semanas el polímero mostró una pérdida de peso menor al 1 %. El PLA amorfo no experimentó pérdidas significativas durante las primeras 18 semanas de degradación. Este estudio fue realizado sumergiendo el PLA en una solución tamponada a 7,4 y 37°C.

Según el estudio realizado por Li *et al* (16) el PLA semicristalino comienza a perder peso de forma significativa a partir de las 7 semanas de degradación. A partir de este momento experimenta una pérdida de peso creciente hasta llegar a perder un 26% después de 110 semanas de degradación. En el caso del PLA amorfo, no se observa pérdida de peso alguna hasta 18 semanas de inmersión en el fluido, es decir, comienza a perder peso más tarde que el material cristalino. Sin embargo, la velocidad de degradación es más rápida y llega a perder un 50% del peso inicial en 110 semanas. Por lo que la cristalinidad reduce de forma general la velocidad de degradación del PLA en términos de pérdida de peso.

En nuestro caso, el PLA utilizado es muy poco cristalino (2,41%) como se observó en los resultados de los ensayos de DSC. Por lo tanto, se podría ajustar al patrón de degradación para el PLA amorfo descrito por Li *et al* . Según este patrón, a las 6 semanas el material aún no ha entrado en la fase crítica de pérdida de peso y por lo tanto no se observó un aumento marcado en el mismo.

Las muestras de compuesto experimentaron un aumento creciente en el porcentaje de pérdida de peso durante las 3 primeras semanas y después de este período de tiempo, sufrieron un incremento de peso. El complejo comportamiento mostrado por el PLA50 se debe a la presencia de vidrio dentro de la matriz polimérica. Por una parte, el tamaño y la elevada área superficial de las partículas, así como la presencia de grietas en las partículas debidas al proceso de molido, promovieron una degradación acelerada de las mismas. Por otra parte, la presencia de las partículas vítreas permitió la penetración de fluido en el interior de la matriz polimérica, acelerando su degradación como se comentará más adelante. Este hecho conlleva a su vez dos consecuencias, la primera implica la aceleración de la degradación del vidrio debido a la generación de un medio ácido, y la segunda se trata de la liberación al medio de cadenas de polímero degradado a través de las desuniones vidrio/PLA, ya que como hemos visto en la Figura 6.2, el PLA pierde M_w desde las primeras semanas de degradación. En el caso del PLA, las cadenas se quedan en el interior del material.

Después de la tercera semana de degradación, el PLA50 mostró un aumento en el peso de las muestras como se puede observar en la Figura 6.1. Este aumento de peso en las muestras de compuesto puede ser debido a la formación de los precipitados de fosfato de calcio en la superficie del material como puede observarse a través de la microscopia electrónica

Los resultados de GPC mostraron tendencias similares para ambos materiales (PLA y PLA50). En ambos casos, los valores de peso molecular (M_w) sufrieron una disminución progresiva indicando que el proceso de degradación tuvo lugar desde el inicio del período de inmersión, lo cual está de acuerdo con estudios realizados por otros autores que han reportado pérdidas del 37% después de 2 semanas de degradación (1).

El hecho de que el material compuesto haya perdido el doble del peso molecular que el PLA después de 2 semanas de degradación, significa que las discontinuidades en la matriz polimérica debidas a la presencia de las partículas de vidrio conllevaron a la penetración del fluido en la interfase PLA-vidrio y por lo tanto el proceso de degradación fue acelerado. Esta pérdida de M_w en el material compuesto durante las 2 primeras semanas de degradación concuerda con los resultados de pérdida de peso y indica que las cadenas degradadas fueron liberadas al medio.

Después de 4 semanas, la velocidad de la pérdida de peso molecular disminuyó levemente en el caso del material compuesto y los valores de M_w fueron similares para ambos materiales. Este comportamiento puede ser atribuido al efecto tampón causado por los productos de degradación del vidrio de fosfato de calcio (17). A pesar de que los productos de degradación generados por la degradación del vidrio G5 poseen un carácter ligeramente ácido (ver apartado 3.3.2), son menos ácidos que los productos de

degradación del PLA, por lo que es posible que actúen como tampón, atenuando el proceso de degradación.

Es un hecho conocido, que el mecanismo de degradación del PLA es un mecanismo de degradación en bloque, autocatalizado por grupos terminales carboxilo formados por la ruptura de las cadenas poliméricas (3;18). Por lo tanto, es posible que los productos de degradación liberados de las partículas de vidrio actúen como un agente controlador del pH que obstaculiza el proceso autocatalítico y consecuentemente, tanto la velocidad de degradación como los valores de pérdida de peso molecular hayan disminuido.

Los termogramas del análisis de DSC de los dos materiales, mostraron la evolución de sus transiciones térmicas en función del tiempo de degradación (Tabla 6.3). Los valores de la temperatura de transición vítrea (T_g) mostraron una tendencia decreciente a lo largo del período de degradación. Esta disminución en los valores de la T_g fue más marcada en el caso del PLA solo que en el compuesto PLA50, y está de acuerdo con los resultados de peso molecular obtenidos.

Por otro lado, el porcentaje de cristalinidad de las muestras de PLA sufrió un aumento progresivo después de los diferentes períodos de inmersión en SBF, mientras que el porcentaje de cristalinidad de la matriz polimérica del material compuesto experimentó un aumento muy drástico después de las 2 primeras semanas de degradación. Este hecho podría estar relacionado con la gran pérdida de peso observada en las primeras semanas. Como es sabido, el aumento de cristalinidad durante la degradación del PLA se debe al hecho de que la degradación del material afecta preferencialmente a la fase amorfa del mismo. Por lo tanto, a mayor pérdida de peso, mayor aumento de cristalinidad es de esperar en el material. Por otra parte, también concuerda con la elevada pérdida de peso molecular experimentada por el compuesto PLA50 después de dos semanas de degradación. Debido a la penetración del fluido en la intercara PLA/vidrio, el proceso de hidrólisis que conlleva a la ruptura de las cadenas es acelerado, siendo las regiones amorfas las más afectadas (19) y consecuentemente tanto el peso molecular del material como su cristalinidad se ven afectados (2). Luego de estas primeras dos semanas de aumentos abruptos en la cristalinidad del material compuesto, el %Xc se estabilizó ya que la fase amorfa restante se redujo progresivamente.

Con respecto a los cambios morfológicos, las observaciones hechas a través del microscopio de barrido revelaron la formación de precipitados de fosfato de calcio en la superficie del PLA50. Las Figuras 6.4 y 6.5 muestran la evolución de la superficie del material compuesto después de diferentes períodos de tiempo. Las partículas de G5 incorporadas en la matriz de PLA reaccionaron con el fluido, originando una estructura globular que emergió hacia la superficie del material.

El vidrio G5 es un vidrio soluble que se degrada mediante un mecanismo de degradación superficial. Este mecanismo de disolución es altamente dependiente del pH del medio circundante, siendo más sensible a los medios acidificados. La degradación del PLA genera una disminución del pH que estimularía la degradación del vidrio. Este vidrio de fosfato está formado principalmente por grupos Q^2 correspondientes a grupos metafosfato. Cuando el vidrio se degrada, se liberan al medio tanto grupos Q^2 como grupos Q^1 y Q^0 (pirofosfato y ortofosfato respectivamente). Las unidades Q^0 y Q^1 son capaces de formar enlaces con los iones Ca^{2+} que se encuentran dispersos en el SBF, generando de esta manera los precipitados de fosfato de calcio.

De acuerdo con Van Wazer (20), la degradación de vidrios de metafosfato de calcio en medio acuoso puede conllevar la formación de coacervados, es decir, agregados de moléculas mantenidas unidas por fuerzas electrostáticas, que se liberan al medio formando complejos de pirofosfato de calcio que precipitan en el medio. Según Van Wazer, cuando una sal metálica se une con $Na_4P_2O_7$ en solución, se forman precipitados predominantemente amorfos los cuales persisten por largos períodos de tiempo sin cristalizar. Es posible que tanto los iones Na como los iones Ca y las cadenas de fosfato liberadas al medio se hayan combinado con los iones y sales del SBF formando un precipitado de pirofosfato de calcio amorfo. Esto concuerda con los resultados reportados por Basset *et al.*(21) quienes llevaron a cabo un extenso estudio referente a diferentes sales hidratadas de pirofosfato y observaron que la mayoría de los pirofosfatos formados en solución, incluyendo el $Ca_2P_2O_7$, eran amorfos o muy poco cristalinos. También reportaron que a temperaturas fisiológicas, como es el caso del estudio presentado en este capítulo, los pirofosfatos en medio acuoso son estables por largos períodos de tiempo (semanas).

Por otra parte, según Van Wazer (20), la hidrólisis de los coacervados formados a partir de los productos de degradación del vidrio de metafosfato de calcio puede formar dos pirofosfatos cristalinos. El primero tiene la fórmula $Ca_3H_2(P_2O_7)_2 \cdot 4H_2O$ y el segundo con fórmula $Ca_2P_2O_7 \cdot 2H_2O$ (20).

Sin embargo, en los difractogramas obtenidos a partir del análisis de rayos X no se detectó la presencia de fases cristalina sino que mostraron la presencia de un compuesto amorfo, tanto después de 4 semanas como después de 6 semanas de inmersión en SBF a 37°C. Por lo tanto podrían existir dos posibilidades, la primera posibilidad es que el precipitado formado corresponda a un precipitado amorfo formado por la formación de coacervados debidos a la presencia de iones Na, Ca y grupos piro (P_2O_4). La segunda posibilidad sería que se hayan formado los compuestos cristalinos hidratados mencionados en el párrafo anterior, y los cristales formados hayan sido de tamaño tan pequeño que el ensayo de difracción de rayos X no haya sido capaz de detectarlo.

El análisis por espectroscopía Raman mostró la formación de bandas relativas a los grupos Q^1 y Q^0 (ver Tabla 6.6), correspondientes a pirofosfatos y ortofosfatos como ya se ha dicho. Los grupos Q^1 pueden ser atribuidos a la presencia de pirofosfatos de calcio formados según el proceso de precipitación antes descrito. Uno de los ortofosfatos de calcio capaces de precipitar bajo las condiciones de este ensayo (37°C y un pH ligeramente ácido debido a la degradación del ácido poliláctico) y con una estructura amorfa, es el fosfato de calcio amorfo (ACP, *amorphous calcium phosphate*). Las bandas correspondientes a los grupos Q^0 en el espectro Raman coincidieron con algunas de las bandas características de este fosfato de calcio. Sin embargo, hay que mencionar que la banda más intensa del ACP que se encuentra alrededor de 960 cm^{-1} apareció con baja intensidad en el espectro del precipitado.

El análisis por FTIR de la formación de los precipitados mostró que en general los espectros estaban constituidos por amplias bandas lo cual es de esperar en la presencia de una fase amorfa. Las bandas mostradas en el espectro indicaron nuevamente la presencia de grupos pirofosfato. Además, al igual que en el caso del espectro Raman, algunas bandas coincidieron con las bandas características del ACP, aunque con menor intensidad.

Según Fleisch *et al* y Francis (22;23), los precipitados de ACP pueden contener pirofosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$). En nuestro caso particular, parece que los grupos pirofosfato son atribuidos a pirofosfatos de calcio son los grupos mayoritarios y el ACP se encuentra de forma minoritaria dentro del precipitado. Por lo que es probable que el precipitado encontrado sea una combinación de pirofosfatos de calcio y ACP.

Adicionalmente, la relación molar Ca/P obtenida para el precipitado después de 4 y 6 semanas de exposición al fluido, mostró un incremento de la relación Ca/P respecto al vidrio G5 lo cual es coherente con la formación de una combinación pirofosfatos de calcio y ortofosfato de calcio (ACP).

En el cuerpo humano, los pirofosfatos de calcio se pueden encontrar en los tejidos en forma de pirofosfato de calcio dihidratado (CPPD, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Los cristales de pirofosfato de calcio dihidratado se forman únicamente en los tejidos articulares y están relacionados con la aparición de patologías como la artritis. Otro tipo de pirofosfato que está presente en el organismo, es el pirofosfato inorgánico (PPi) que se encuentra en el plasma sanguíneo en una concentración entre $1\text{-}5\ \mu\text{M}$. Este pirofosfato inorgánico es producido por los condrocitos y es liberado al torrente sanguíneo (24). Parte del PPi liberado se queda atrapado en la matriz extracelular del cartílago (25). Cuando la concentración de este pirofosfato inorgánico es suficientemente alta ($40\ \mu\text{M}$), se lleva a cabo la nucleación con los iones Ca^{2+} y tiene lugar la formación del pirofosfato de calcio dihidratado, el cual se agrega en la matriz cartilaginosa.

La formación de los cristales de CPPD depende directamente de la relación fosfato inorgánico (Pi)/pirofosfato inorgánico (26). A relaciones Pi/PPi < 3 precipitan cristales de CPPD. Si $3 < \text{Pi/PPi} < 100$, se formarán pirofosfato de calcio amorfo y fosfato de calcio amorfo. Cuando $\text{Pi/PPi} > 100$, precipitan cristales de apatita de calcio.

El fosfato de calcio amorfo por su parte representa entre el 30 y 40% de la fase mineral ósea (27) y usualmente es una fase de transición hacia la formación del fosfato octacálcico (OCP, *octacalcium phosphate*, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4$) fosfato dicálcico dihidratado (DCPD, *dicalcium phosphate dihydrate*, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) o hidroxiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) bajo distintas condiciones de estequiometría y pH (28-30).

El hecho de que el ACP formado no evolucionó a alguna de las fases cristalinas mencionadas durante el período de degradación estudiado, puede estar relacionado con la presencia de iones pirofosfato (Q^1 , $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) como se pudo constatar por medio del análisis por espectroscopía Raman e infrarroja ya que la presencia de este tipo de iones puede incrementar la estabilidad de esta fase amorfa (22;31).

Por otro lado, en un estudio previo (32), en el cual se desarrolló un material compuesto similar pero con 40% en peso de G0, es decir, el vidrio más soluble (ver capítulo 2), se observó que después de 2 semanas de degradación, se formó un precipitado de fosfato de calcio bastante cristalino con morfología de agujas, correspondiente a brushita (DCPD). Además, se vio que las partículas de vidrio se ahuecaban después de 2 semanas, dando paso a la formación del mismo fosfato de calcio en el interior del material.

Como se ha podido observar a partir de los resultados mostrados en este capítulo, la presencia del vidrio G5, que es un vidrio 10 veces menos soluble que el G0, en el material compuesto, también conllevó la formación de precipitados de fosfato de calcio después de 2 semanas y las fases formadas fueron pirofosfatos de calcio y un fosfato de calcio amorfo o ACP. Además, durante las 6 semanas del estudio de degradación *in vitro*, no se observó la formación de ningún fosfato de calcio en el interior del material ni el ahuecamiento de las partículas. Por lo que a partir de los resultados obtenidos en dichos estudios, se ve una clara diferencia debida al efecto de la velocidad de degradación de ambos vidrios. La incorporación de TiO_2 dentro del sistema vítreo mejoró la estabilidad química del material (ver capítulo 3) y por lo tanto, las partículas no llegaron a ahuecarse, además el fosfato de calcio detectado fue diferente.

En el capítulo 3 se estudió la degradación *in vitro* del vidrio G5, en este estudio se utilizó bloques de vidrio para analizar el mecanismo de degradación del mismo y no se observó la formación de ningún tipo de precipitado en la superficie del vidrio después de 16 semanas de inmersión en SBF a 37°C. Sin embargo, en el presente capítulo hemos visto que sí se formó un precipitado de calcio en la superficie del material compuesto. El hecho de que se haya formado un precipitado en el caso del material compuesto y

no en el bloque de vidrio puede atribuirse principalmente a que en el compuesto, el vidrio se encuentra en forma de partículas. Las partículas de vidrio tienen una mayor superficie de contacto con el fluido que los bloques de vidrio y por lo tanto aumenta su velocidad de degradación. Al aumentar la reactividad de las partículas con el medio acuoso se libera una mayor concentración de iones y de productos de degradación al medio que en el caso del bloque de vidrio, por lo que es más factible que las partículas de vidrio conlleven la formación de precipitados.

En cuanto a la evolución de las propiedades mecánicas, se observó que la introducción de las partículas de vidrio dentro de la matriz polimérica tuvo un efecto negativo, ya que mientras que el PLA mantuvo sus propiedades en un rango casi constante durante las seis semanas de degradación, el PLA50, sufrió una abrupta disminución del módulo elástico después de 48 horas. Este hecho se debe principalmente al efecto degradativo del medio acuoso en la interfaz entre la matriz y la fase de refuerzo, debido a la penetración del fluido en la interfaz. Este hecho conlleva la desunión entre ambas fases. Una vez que se han desunido las partículas de la matriz, éstas ya no proveen el efecto reforzante inicial. De hecho, después de 48 horas, el compuesto PLA50 presentó un módulo similar al del polímero.

El objetivo principal de este capítulo era analizar el comportamiento del material compuesto PLA50 durante su degradación en condiciones similares a las fisiológicas. Una de las posibles aplicaciones mencionadas en el capítulo anterior para este material era como dispositivo de fijación ósea. Los resultados obtenidos en este capítulo indican que el material estudiado no presenta la estabilidad mecánica requerida por un dispositivo de fijación ósea, ya que después de 48 horas de contacto con el fluido, el PLA50 pierde el efecto reforzante introducido por las partículas de vidrio e iguala a la PLA. Por lo que sería necesario introducir una serie de modificaciones para aumentar la unión entre el vidrio y el PLA y así evitar la penetración de líquido en el interior del material compuesto.

Dos de las posibles modificaciones para incrementar la unión entre la matriz y la fase de refuerzo y evitar el paso del fluido al interior del material compuesto son la utilización de agentes de acoplamiento y el recubrimiento del material con una fina capa polimérica.

Los agentes de acoplamiento funcionan como un puente entre la fase orgánica y la fase inorgánica creando una unión de tipo químico entre ellas. Sin embargo, actualmente no existen en el mercado agentes de acoplamiento que se ajusten al sistema PLA/G5, ya que ninguno está diseñado para poliésteres como el PLA. Además, la biocompatibilidad de los agentes no ha sido comprobada, lo cual es otra limitación.

La otra posibilidad consiste en recubrir las piezas de material compuesto con una capa de PLA. De esta forma se retardaría la penetración del fluido en la interfaz PLA/G5 y

por lo tanto el material mantendría sus prestaciones mecánicas por un período de tiempo más prolongado.

Por otra parte, la formación del precipitado de fosfato de calcio en la superficie del material compuesto podría estimular y mejorar la interacción célula-material y por lo tanto su respuesta biológica. Por lo que, los resultados obtenidos sugieren que el material podría utilizarse como relleno de defectos óseos donde se requiera la regeneración del hueso. El carácter biodegradable del material compuesto podría aprovecharse también en aplicaciones de liberación de fármacos.

Finalmente, un aspecto interesante sería analizar el comportamiento biológico *in vitro* de este material compuesto PLA50 ya que como se ha dicho en capítulos anteriores los ensayos *in vitro* son el primer acercamiento para el análisis de la interacción substrato-célula y la biocompatibilidad de los materiales. La respuesta celular del material PLA50 será estudiada en el próximo capítulo mediante ensayos de adhesión, proliferación y diferenciación de células osteoblásticas.

6.5. REFERENCIAS

- (1) Li SM. Hydrolytic degradation characteristics of aliphatic polyesters derived from lactic and glycolic acids. *Journal of Biomedical Materials Research* 1999; 48(3):342-353.
- (2) Burg KJL, Shalaby SW. Physicochemical changes in degrading polylactide films. *Journal of Biomaterials Science Polymers* 1997; 9(1):15-29.
- (3) Vert M, Li SM, Spenlehauer G, Guerin P. Bioresorbability and Biocompatibility of Aliphatic Polyesters. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine* 1992; 3(6):432-446.
- (4) Fischer EW, Sterzel HJ, Wegner G. Investigation of the structure of solution grown crystals of lactide copolymers by means of chemical reactions. *Kolloid-Zeitschrift and Zeitschrift fur Polymere* 1973; 251:978-990.
- (5) Cornilsen BC, Condrate RA. Vibrational Spectra of α -Alkaline Earth Pyrophosphates. *Journal of Solid State Chemistry* 1978; 23:375-382.
- (6) Cornilsen BC, Condrate RA. The vibrational spectra of β - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ and γ - $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$. *Journal of Inorganic Nuclear Chemistry* 1979; 41:602-605.
- (7) de Fátima Gimenez I, Mazali IO, Alves OL. Application of Raman spectroscopy to the study of the phase composition of phosphate based glass-ceramics. *Journal of Physics and Chemistry of Solids* 2001; 62:1251-1255.
- (8) Kasuga T, Abe Y. Calcium phosphate invert glasses with soda and titania. *Journal of Non-Crystalline Solids* 1999; 243:70-74.
- (9) Brow RK, Tallant DR, Warren WL, McIntyre A, Day DE. Spectroscopy studies of the structure of titanophosphate and calcium titanophosphate glasses. *Physics and Chemistry of Glasses* 1997; 38(6):300-306.
- (10) Fang XY, Ray CS, Marasinghe GK, Day DE. Properties of mixed Na_2O and K_2O iron phosphate glasses. *Journal of Non-Crystalline Solids* 2000; 263(1-4):293-298.
- (11) Elliot JC. General chemistry of the calcium orthophosphates. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates. Amsterdam: Elsevier, 1994: 1-61.
- (12) Termine JD, Eanes ED. Comparative Chemistry of Amorphous and Apatitic Calcium Phosphate Preparations. *Calcified Tissue Research* 1972; 10(3):171-&.
- (13) Sauer GR, Zunic WB, Durig JR, Wuthier RE. Fourier Transform Raman Spectroscopy of Synthetic and Biological Calcium Phosphates. *Calcified Tissue International* 1994; 54:414-420.

- (14) Li SM, Vert M. Morphological-Changes Resulting from the Hydrolytic Degradation of Stereocopolymers Derived from L-Lactides and DL-Lactides. *Macromolecules* 1994; 27(11):3107-3110.
- (15) Li SM, McCarthy S. Further investigations on the hydrolytic degradation of poly(DL-lactide). *Biomaterials* 1999; 20(1):35-44.
- (16) Li SM, Garreau H, Vert M. Structure-property relationships in the case of the degradation of massive poly(alpha-hydroxy acids) in aqueous media Part 2: Degradation of lactide-glycolide copolymers. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1990; 1:131-139.
- (17) Li SM, Vert M. Hydrolytic degradation of coral/poly(DL-lactic acid) bioresorbable material. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* 1996; 7(9):817-827.
- (18) Huffman KR, Casey DJ. Effect of Carboxyl End Groups on Hydrolysis of Polyglycolic Acid. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry* 1985; 23(7):1939-1954.
- (19) Vert M, Christel P, Chabot F. Bioresorbable plastic materials for bone surgery. In: Hastings GW, Ducheyne P, editors. *Macromolecular Biomaterials*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1984: 119-142.
- (20) Van Wazer JR. *Phosphorous and its compounds*. New York: Interscience Publishers, Inc, 1958.
- (21) Bassett H, Bedwell WL, Hutchinson JB. Studies of phosphates. Part IV. Pyrophosphates of some divalent metals and their double salts, and solid solutions with sodium pyrophosphate. *Journal of the American Chemistry Society* 1936;1412-1429.
- (22) Fleisch H, Russell RGG, Bisaz S, Termine JD, Posner AS. Influence of Pyrophosphate on Transformation of Amorphous to Crystalline Calcium Phosphate. *Calcified Tissue Research* 1968; 2(1):49-&.
- (23) Francis MD. Inhibition of Calcium Hydroxyapatite Crystal Growth by Polyphosphonates and Polyphosphates. *Calcified Tissue Research* 1969; 3(2):151-&.
- (24) Ryan LM, Mccarty DJ. Understanding Inorganic Pyrophosphate Metabolism - Toward Prevention of Calcium Pyrophosphate Dihydrate Crystal Deposition. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1995; 54(12):939-941.
- (25) Pritzker KPH. Calcium Pyrophosphate Crystal Arthropathy - A Biomineralization Disorder. *Human Pathology* 1986; 17(6):543-545.
- (26) Chen PT, Pritzker KPH. Pyrophosphate, phosphate ion interaction: Effects on calcium pyrophosphate and calcium hydroxyapatite crystal formation in aqueous solutions. *Journal of Rheumatology* 1983; 10:769-777.
- (27) Zahidi E, Lebugle A, Bonel G. On A New Class of Biomaterials for Osseous Or Dental Prosthesis. *Bulletin de la Societe Chimique de France* 1985;(4):523-527.

- (28) Meyer JL, Eanes ED. Thermodynamic Analysis of Secondary Transition in Spontaneous Precipitation of Calcium-Phosphate. *Calcified Tissue Research* 1978; 25(3):209-216.
- (29) Tung MS, Brown WE. An Intermediate State in Hydrolysis of Amorphous Calcium-Phosphate. *Calcified Tissue International* 1983; 35(6):783-790.
- (30) Wuthier RE, Rice GS, Wallace JEB, Weaver RL, Legeros RZ, Eanes ED. Invitro Precipitation of Calcium-Phosphate Under Intracellular Conditions - Formation of Brushite from An Amorphous Precursor in the Absence of Atp. *Calcified Tissue International* 1985; 37(4):401-410.
- (31) Root MJ. Inhibition of the Amorphous Calcium-Phosphate Phase-Transformation Reaction by Polyphosphates and Metal-Ions. *Calcified Tissue International* 1990; 47(2):112-116.
- (32) Clement J. Desarrollo y Caracterización de un Material Compuesto Totalmente Biodegradable para Aplicaciones Quirúrgicas. Universitat Politècnica de Catalunya, Barcelona, España, 2001.