METODOLOGIA ANALITICA PARA LA DETERMINACION POR CG-EM DE LAS SUSTANCIAS MIGRABLES DE LOS BIOMATERIALES A BASE DE PMM

R. M. Guerra, L. Morejón y L. Agüero.

Centro de Biomateriales, Universidad de la Habana, Calzada de Zapata y calle G, Plaza de la Revolución, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 20 de septiembre de 1995.

RESUMEN. El PMM se utiliza en la obtención de múltiples dispositivos y materiales empleados en la práctica médica, como son: prótesis dentales, oculares, auditivas y cementos óseos, entre otros. Se desarrolló una metodología analítica para la determinación por CG-EM de las sustancias extractables de los biomateriales a base de PMM. La técnica ha sido debidamente implementada en cuanto a sus parámetros metrológicos (linealidad, reproducibilidad, especificidad) y utilizada en los ensayos preclínicos del cemento óseo acrílico BONACRYL.

ABSTRACT. PMM is useful in the manufacturing of medical devices and materials as dental and ocular prosthesis, bone cements, and others. An analytical methodology for the GC-MS determination of extractable substances from PMMA-based biomaterials was developed. The technique was well implemented related to its statistical parameters (linearity, reproducibility, specificity) and was utilized in preclinical assays of the bone cement BONACRYL.

INTRODUCCION

Los polímeros y copolímeros a partir de metacrilato de metilo tienen una amplia utilidad en la fabricación de múltiples dispositivos y materiales empleados en la práctica médica, como son las prótesis dentales, oculares, auditivas y los materiales para implantes y reconstrucción total o parcial de articulaciones, tales como, los cementos óseos.[1-3]

La migración de sustancias tóxicas residuales del proceso de polimerización a los tejidos adyacentes al implante es una de las causas que originan los efectos tóxicos observados en algunos pacientes.[4]

Los metacrilatos y las aminas aromáticas son citotóxicos y pueden tener una limitada actividad mutagénica.[5] Es por ello, que se necesita la implementación de técnicas para la realización de los ensayos toxicológicos, tanto *in vivo* como *in vitro*.[6-9] Muchos de estos ensayos se realizan no directamente poniendo en contacto las células con el material a probar, sino de forma indirecta empleando sus extractos.

Un paso importante en la realización de los ensayos toxicológicos es la determinación cuali y cuantitativa de las sustancias extraidas. La Cromatografía Gaseosa (CG) es una técnica muy apropiada para determinar las sustancias orgánicas de volatilidad media, que migran de los biomateriales una vez polimerizados. Por otra parte, el acoplamiento de este sistema a un Espectrómetro de Masas (EM) permite la identificación fehacientede los compuestospresentesen el extracto.

El objetivo de este estudio fue implementar una metodología analítica por CG-EM para la determinación de las sustancias migrables de los biomateriales a base de polimetacrilato de metilo (PMM) para su utilización en el país, específicamente, en la caracterización de los extractos empleados en los estudios toxicológicos del cemento óseo cubano BONACRYL.

MATERIALES Y METODOS

Equipo

Se utilizó un sistema acoplado CG-EM JMS DX-300 (JEOL). Se empleó una columna capilar de sílice fundida DB-1 de 30m de largoy0, 25m md .i.

Se utilizó un régimen de temperatura programada desde 50ha sta 250 °C, con 2 min isotérmicos iniciales y un gradiente de 8 °C/min . La temperatura en el inyector fue de 285 °C.

Los espectros de masas fueron registrados en condiciones de baja resolución con ionización por impacto electrónico (70 eV), barriendo un intervalo de 30-500 uma.

Preparación de los extractos para los ensayos

Se mezclaron los componentes del cemento (partes sólida y líquida) según las instrucciones del fabricante y se prepararon piezas cilíndricas de 6,5 mm de diámetro y 4,0mm de altura, empleando para ello moldes adecuados. Después de2hd ep olimerizadasl as muestras, se colocarond urante 72 h a 37 °C en una mezcla agua-alcohol (95:5; v:v), en un recipiente adecuado, con el mínimo de líquido posible para cubrir las piezas. De esta forma, se logran extractos de alta concentración. La proporción área/volumen empleada fue de 10 cm^2/mL .

Se analizaron muestras del cemento cubano BONACRYL (dos lotes) y de los comerciales SUBITON (un lote) y PALACOS R (un lote). Se realizaron cuatro réplicas de cada extracto.

Preparación de las muestras para su estudio por CG-EM

Se tomaron 2 mL del extracto hidroalcohólico, se adicionaron2m Ld eé tere tílico,s ea gitó durante5m inyl uego, se separó la fase orgánica para su posterior análisis por CG-EM. Si se forman emulsiones, se agrega 20mg aproximadamente de cloruro de sodio antes de separar la fase orgánica.

Teniendo en cuenta la gran diferencia existente entre el metacrilato de metilo (MM) y la N,N-dimetl-p-toluidina (DMPT) en cuanto a volatilidad y concentración en las muestras a analizar, el MM se determinó directamente en el extracto etéreo, mientras que para detectar la amina fue necesario concentrar las muestras con una débil corriente de nitrógeno hasta 0,2 mL aproximadamente. En este proceso, se pierde gran parte del monómero debido a su alta volatilidad.

Análisis cualitativo

La especificidad del método analítico viene dada por la posibilidad de identificar los componentes en la mezcla, una vez separados en la columna cromatográfica, basado en sus espectros de masas por comparación con los patrones de fragmentación conocidos.

Análisis cuantitativo

La determinación cuantitativa se realiza por el método del patrón interno el cual se le adicionó a la muestra en el propio medio de extracción. Tanto en las muestras sintéticas como en las reales, se determinó la concentración experimental según:

$$C_i = A_i \, F_i \, \frac{C_p}{A_p} \qquad (1)$$

donde:

A_i y A_p áreas de los picos cromatográficos del compuesto y del patrón interno respectivamente

C_i y C_p concentraciones del compuesto y del patrón interno respectivamente

F_i factor de respuesta relativo

Calibración del método

Se determinaron previamente los factores de respuesta relativos al patrón interno, los cuales se calcularon mediante la expresión:

$$F_i = \frac{A_p/C_p}{A_i/C_i} \qquad (2)$$

donde:

Ci, Cp, Ai, y Ap significado descrito ecuación 1.

Se prepararon muestras sintéticas en el intervalo de concentraciones esperado y se les realizó el mismo proceso de extracción que a las muestras reales. De esta forma, se determinaron los factores de respuesta, haciendo tres réplicas en cada punto. La linealidad de la respuesta del sistema en el intervalo estudiado se comprobó por el método de los mínimos cuadrados.

Las concentraciones analizadas fueron las siguientes:

Compuesto	Concentraciones (ppm)				
	12		3	4	5
MM	450	750	900	1 125	1 500
DMPT	3050		60	75	100

Reproducibilidad y exactitud del método

Se determinó con una muestra modelo de concentración 1 000 ppm de MM y 50 ppm de DMPT. Se tomaron cinco réplicas de2m Lc adau nays el es realizóe lp roceso de extracción descrito. Se calcularon los valores promedio y se valoró la corrección del análisis calculando el intervalo en que se encuentra el valor real (Ci ± Error). El error se calculó según:

$$Error = \frac{t_{[0,95;\,(n-1)]}\, S}{(n)^{1/2}}$$

donde:

S desviación estándar

n número de réplicas

t[α,(n-1)] valor de t en las tablas de distribución t de Student para un nivel de significación dado (α =9 5%).

RESULTADOS Y DISCUSION

Calibración del método

Para realizar la calibración del método (Tabla I) se tomó como variable X la concentración nominal Ci en las muestras; Y representó la magnitud Cp · (Ai/Ap) y la pendiente de la recta X *vs.* Y (X y Y intercambiadas) el valor del factor de respuesta Fi.

TABLA I
Resultados en la calibración de la técnica analítica

Compuestos	Parámetros		
	Coeficiente correlación lineal	Pendiente (F_i)	Intervalo de confianza de la pendiente
MM	0,995	1,20	0,02
DMPT	0,985	0,55	0,06

Reproducibilidad y exactitud

Del análisis cuantitativo del cromatograma se obtuvieron los valores de las Y y se calculó la concentración experimental C_i =X(Tablal I) porl ae cuaciónd el ar ecta.

TABLA II
Valores experimentales obtenidos para las cinco réplicas de la muestra sintética de concentración nominal 100 0 ppm de MM y 50 ppm de DMPT

	MM				
X (ppm)	805	869	800	825	853
Y (ppm)	970	1 047	964	994	1 028
$\bar{X}$ = 1 000 ppm; S = 36; Error = 45 ppm; Intervalo = 955-1 045 ppm					
	DMPT				
X (ppm)	66	79	89	7075	
Y (ppm)	45	52	58	47	50
$\bar{X}$ = 50 ppm; S = 5; Error = 6 ppm; Intervalo = 44-56 ppm					

Determinación de las sustancias migrables de los cementos óseos

En los cromatogramas de las muestras analizadas (Figuras 1 y 2) se detectaron como compuestos mayoritarios el metacrilato de metilo, y dos aminas: la N,N-dimetil-p-toluidina y la N-metil-p-toluidina (MPT) como producto de descomposición de la anterior.

Se realizó un estudio cualitativo de los productos de reacción del peróxido de benzoílo (PB) con la DMPT detectándose los compuestos siguientes: N,N-dimetil anilina, N-metil-p-toluidina, ácido benzoico, bifenilo y benzoato de fenilo. Se detectaron además, dos compuestos minoritarios de masa molecular 225 y 253, cuyas posibles estructuras (Fig. 3), no pudieron ser corroboradas por no contar con los espectros de referencia.

Es conocido que durante el proceso de fraguado del material, el monómero polimeriza por vía radicálicayam edida que se va formando el polímero, la velocidad de difusión de los radicales responsables de la propagación de la polimerización se reduce drásticamente por lo que ésta no se completa. El monómero residual puede migrar entonces desde el implante a los tejidos adyacentes.

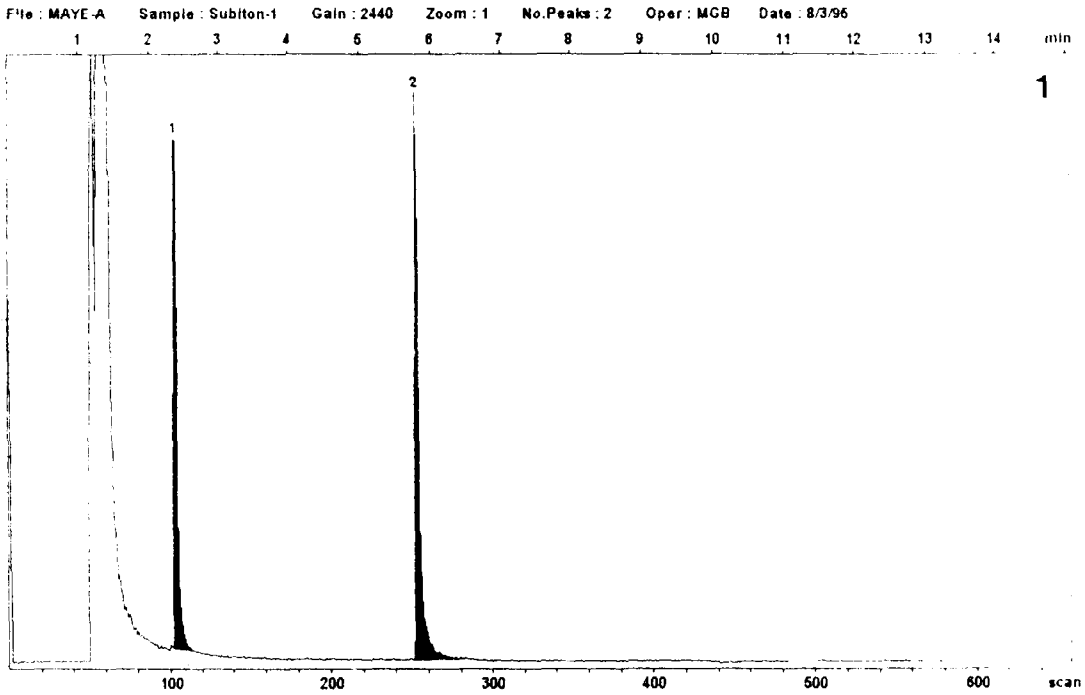


Fig. 1. Cromatograma gaseoso correspondiente al extracto del cemento SUBITON.
1. MM 2. Patrón interno.

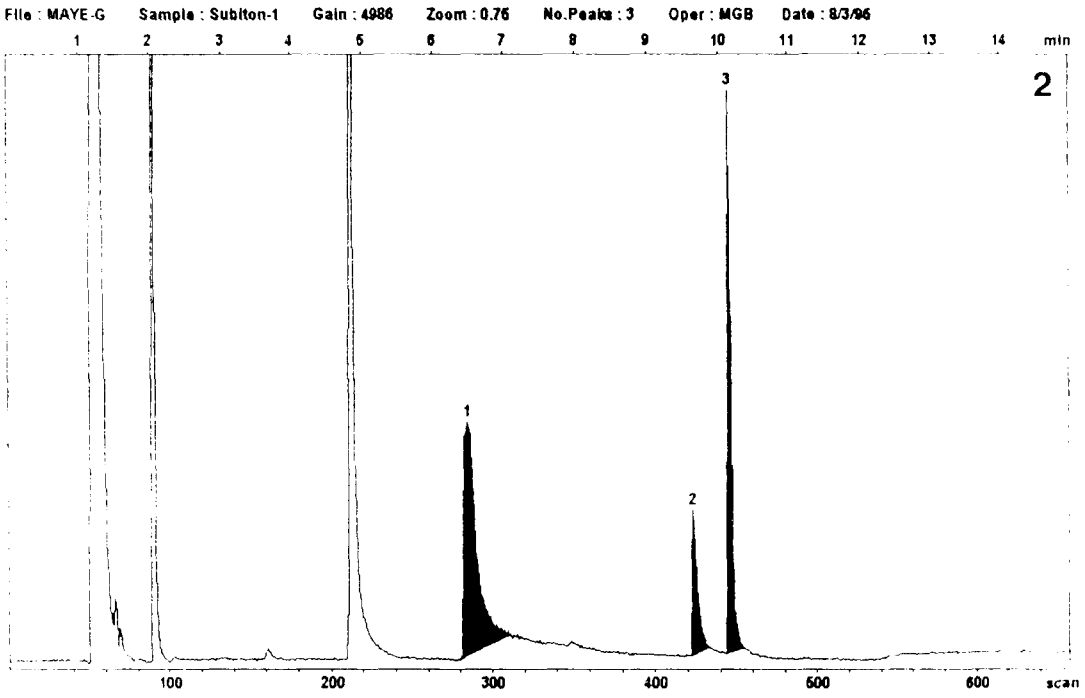


Fig. 2. Cromatograma gaseoso correspondiente al extracto concentrado del cemento SUBITON.
1. Patrón interno 2. MPT 3. DMPT.

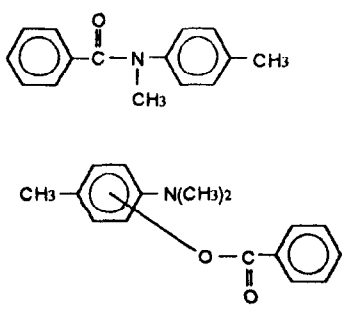
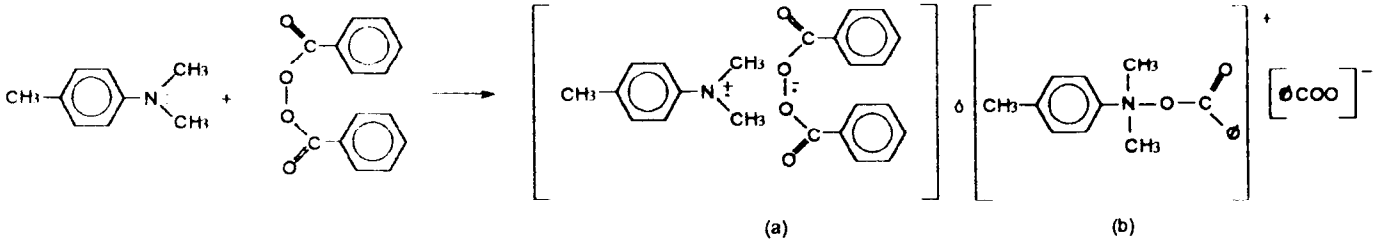


Fig. 3. Posible estructura de los compuestos colaterales minoritarios.

La DMPT participa en el proceso de iniciación de la polimerización, pero posteriormente, se estabiliza como un par iónico con el anión benzoílo quedando ocluida en el polímero, por lo que puede eluir en concentraciones apreciables. Se ha demostrado que la DMPT se encuentra presente en los cementos implantados hasta 10 años después de colocada la prótesis.[4] El peróxido de benzoílo, que es el segundo componente del par redox, se descompone en el proceso dando lugar a los radicales que inician la polimerización y se incluyen en la cadena polimérica.

Los compuestos minoritarios que aparecen como subproductos del proceso de polimerización, se originan en la re-

acción primaria entre la amina y el peróxido de benzoílo, para la cual se han propuesto dos mecanismos. El primero, involucra una interacción de transferencia de carga (Fig. 4a) y el segundo considera la formación de una sal de amonio como intermediario (Fig. 4b). Algunos autores plantean que ambos mecanismos ocurren simultáneamente, mientras que otros consideran que el de transferencia de carga es el predominante.[4]



(a) (b)

Fig. 4. Mecanismos propuestos de la reacción primaria entre la amina y el peróxido.

A partir de estos intermediarios inestables se forman los radicales primarios que inducen el proceso de polimerización (Fig. 5) y que a su vez, pueden recombinarse entre ellos para dar lugar a especies inertes que eluyen desde el cemento en pequeñas concentraciones.

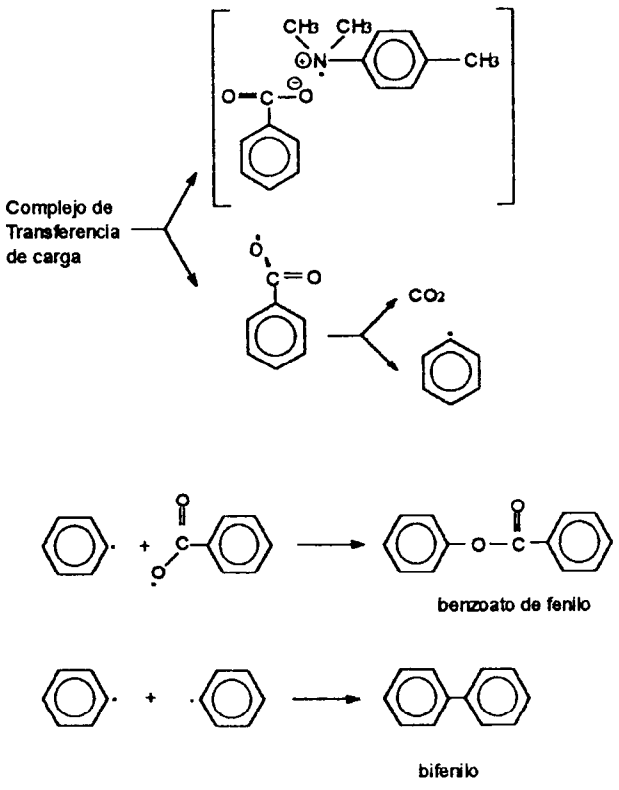


Fig. 5. Formación de productos colaterales.

Se realizó un estudio comparativo entre los resultados de este trabajo y los referidos por otros autores para diferentes cementos comerciales (Tabla III) tales como: PALACOS R, SIMPLEX RO Y BONELOC.[5,7]

Los productos SIMPLEX RO, PALACOS R, SUBITON y BONACRYL son cementos convencionales que contienen en su parte líquida MM y en el polvo PMM o mezclas de PMM con el copolímero MM/estireno. El BONELOC es un cemento de nueva generación, donde en la parte líquida la mitad del monómero MM ha sido reemplazado por MD (metacrilato de n-decilo) e MIB (metacrilato de isobornilo). El sistema acelerador fue variado también por una mezcla compuesta por 0,5 % DMPT y 1 % DHPPT (N,N-dihidroxipropil-p-toluidina). El polvo está compuesto por un copolímero de MM/MB (metacrilato de butilo) en una proporción de 60/40 % .

TABLA III

Concentraciones de los constituyentes de los cementos óseos en extractos agua-etanol

Cemento	MM	DMPT
	($\mu g/cm^2$)	
	Literatura	
PALACOS R	79	3,8
Intervalo	58-88	2,5-5,4
SIMPLEX RO	53	3,0
Intervalo	45-97	2,2-5,0
BONELOC	4,2	0,7*
Intervalo	0,4-22	0,2-1,2
	Experimental	
PALACOS R	52	2,2
Intervalo	49-55	1,9-2,5
SUBITON	120	2
Intervalo	100-130	1,5-2,5
BONACRYL	90	3
Intervalo	60-130	2-5

* En este caso, se considera la suma de las concentraciones de DMPT y DHPPT utilizadas ambas como catalizadores de la polimerización en este cemento.

Según los resultados no existen diferencias significativas entre la cantidad de monómero que migra del SUBITON y el BONACRYL. Es notable que existe una gran dispersion de los valores entre lotes, lo que se refleja en el amplio intervalo de concentraciones, tanto el experimental, como lo reflejado en la literatura. Sin embargo, queda claro que los valores más bajos corresponden al BONELOC en el cual, como puede verse, el proceso de polimerización es más completo. Segun los fabricantes del producto, esto es debido a que la utilización de metacrilatos de larga cadena disminuye la temperatura de transición vítrea del polímero, lo que permite efectuar la polimerización a una temperatura mayor que la Tg reduciendo drásticamente el contenido de componentes residuales no polimerizados.

CONCLUSIONES

Se implementó una técnica analítica que cumple los requisitos de linealidad, reproducibilidad y exactitud requeridos para la determinación por CG-EM de las sustancias migrables de los biomateriales a base de PMM.

Las concentraciones en que migran los constituyentes del cemento óseo BONACRYL de producción nacional, se en-

cuentran dentro de los intervalos de valores determinados para los cementos convencionales similares como son PALACOS R, SIMPLEX RO y SUBITON.

AGRADECIMIENTOS

A los colegas del Laboratorio de Espectrometría de Masas del Centro Nacional de Investigaciones Científicas sin cuya valiosa colaboración no hubiera sido posible su ejecución.

BIBLIOGRAFIA

1. Dumitriu S. (Ed.) Polymeric Biomaterials. Marcel Dekker, Inc. New York, 1994.
2. Gepelein C.G. and Koblitz F.F. (Ed.) Biomedical and Dental Applications of Polymers. Plenum Press, New York, 492, 1981.
3. Jonn B., Park I. and Lakes R.S. Biomaterials. An introduction 2nd Ed. Plenum Press, New York, 1992.
4. Bosch P., Harms H. and Lintner F. **Arch. Toxicol., 51,** 157, 1982.
5. Trap B., Wolff P. and Jensen J.S. **J. of Applied Biomaterials, 3**, 51, 1992.
6. ISO 10993 Biological Testing of Medical and Dental Materials and Devices. 1991.
7. Jensen J.S., Sylvest A., Trap B. and Jensen J.C. **Pharmacology & Toxicology, 69**, 38, 1991.
8. Marzin D. In: Proc. Biological testing of materials and medical devices. 28-29 May, 1991, Il Ciocco, Lucca, Italy, 33-34, 1991.
9. Kindt-Larsen T., Smith D.B. and Jensen J.S. **J. of Applied Biometerials, 6**, 75, 1995.