

Cemento de β -Silicato Dicálcico para Aplicaciones Biomédicas

Daniel Correa¹, Amisel Almirall¹, Lázaro Brito², Raúl García³, Luis Alberto dos Santos⁴,
Antonio de Aza³, Juan Parra³ y José Ángel Delgado¹

¹Centro de Biomateriales-Universidad de La Habana, La Habana, Cuba - Ave. Universidad e/ G y Ronda (10400), dan@biomat.uh.cu

²EdUTecNe, Buenos Aires, Argentina

³Instituto de Cerámica y Vidrio-CSIC, Madrid, España

⁴Universidad Federal de Río Grande del Sur, Porto Alegre, Brasil

Resumen - El β -silicato dicálcico (β -Ca₂SiO₄, β -C₂S) es uno de los principales constituyentes del cemento Portland y de muchos materiales refractarios. Es un cemento hidráulico que fragua formando una fase hidratada del tipo C-S-H que ofrece resistencia mecánica al material final. El β -C₂S se sintetizó vía sol-gel empleado como fase sólida en la preparación de un cemento denominado CSC. Además se realizaron estudios de biodegradación y citotoxicidad al cemento. La síntesis sol-gel resultó ser una alternativa viable frente a las tradicionales síntesis al estado sólido obteniéndose el polvo de β -C₂S con excelente pureza y sin el empleo de estabilizadores químicos. Luego de la inmersión en SBF la superficie de CSC quedó recubierta por una capa de hidroxiapatita deficiente en calcio presentando el material una resistencia a la compresión comparable a la del hueso trabecular. El cemento mostró un comportamiento no citotóxico frente al cultivo celular y presentó elevados valores de viabilidad celular.

Palabras clave: cemento, biodegradación, citotoxicidad, silicato dicálcico

β -Dicalcium Silicate Cement for Biomedical Applications

Abstract - β -dicalcium silicate (β -Ca₂SiO₄, β -C₂S) is one of the main constituents in Portland cement clinker and many refractory materials, itself is a hydraulic cement that reacts with water or aqueous solution at room/body temperature to form a hydrated phase (C-S-H), which provides mechanical strength to the end product. In the present investigation β -C₂S was synthesized by sol-gel process and it was used as powder to cement preparation, named CSC. Biodegradation and cytotoxicity studies were assessed to cement samples. Sol-gel process is an available synthesis method in order to obtain a pure powder of β -C₂S at relatively low temperatures without chemical stabilizers. A bone-like apatite layer covered the material surface after soaking in SBF and its compressive strength (CSC cement) was comparable with that of the trabecular bone. The cement showed a non cytotoxic response against cells culture and presented high values of cellular viability.

Keywords: cement, biodegradation, cytotoxicity, dicalcium silicate

INTRODUCCIÓN

Numerosos estudios han sido dirigidos a la preparación de materiales sustitutos o reparadores del tejido óseo para su empleo en cirugía ortopédica y maxilofacial; aquí juegan un importante papel las cerámicas de fosfatos de calcio por su similitud química

con la fase mineral del hueso (Van der Vreken et al., 2010). Por otra parte los materiales a base de CaO-SiO₂ han demostrado excelentes resultados de bioactividad y biocompatibilidad en dichas aplicaciones siendo los vidrios bioactivos, las cerámicas y vitrocerámicas de apatita-wollastonita los materiales más empleados de los cuales se ha reportado

además su capacidad de enlazarse directamente al hueso (Gou et al., 2004; Kokubo, 1997). Este mecanismo de enlace implante-tejido ha sido muy bien estudiado y se establece como producto de una serie de intercambios iónicos y reacciones de disolución/precipitación que conlleva a la formación de una capa de apatita biológicamente activa (osteoconductiva) sobre la superficie del material responsable de la unión química implante-hueso (Jones et al., 2001).

El β -silicato dicálcico (β -Ca₂SiO₄, β -C₂S) es uno de los principales constituyentes del cemento de construcción Portland (15-30%) y de muchos materiales refractarios (Huang et al., 2008; Taylor, 1990). Además en tiempos recientes se ha empleado como componente de algunos cementos óseos y dentales como en el caso del Agregado Trióxido Mineral (MTA, siglas en inglés) que ha demostrado excelentes propiedades físicas y biológicas en determinadas restauraciones dentales (Liu et al., 2011; Wang et al., 2007). El β -C₂S, en sí mismo, es un cemento hidráulico que puede reaccionar con agua o solución acuosa a temperatura ambiente y fisiológica formando una pasta moldeable que al fraguar forma una fase hidratada del tipo C-S-H que aporta resistencia mecánica al material final (Gou et al., 2004; Taylor, 1990; Liu et al., 2011).

El silicato dicálcico es un sólido que presenta diferentes fases polimórficas (α , α'_H , α'_L , β y γ) siendo γ la fase estable a temperatura ambiente. Sin embargo, a diferencia de la fase β , ésta es mucho menos reactiva frente a soluciones acuosas (Taylor, 1990). El método tradicional de síntesis del β -C₂S son las reacciones al estado sólido que requieren de polvos de partida muy finos (generalmente CaCO₃ y SiO₂) y elevadas temperaturas de sinterización (por encima de 1400°C) con moliendas intermedias, además de la utilización de agentes químicos que estabilicen la fase β y así evitar la reconversión a la fase γ (Chrysafi et al., 2007). El proceso sol-gel podría considerarse una vía alternativa de síntesis pues el mismo ha sido empleado para la preparación de diferentes tipos de vidrios y cerámicas que se obtienen a temperaturas inferiores a las empleadas en el método tradicional además de obtenerse un producto final mucho más homogéneo y con menor tamaño de partículas, incluso en el orden nanométrico (Gou, 2004).

El propósito de nuestro trabajo es preparar un cemento de β -silicato dicálcico y evaluar su comportamiento bioadegradativo “in vitro” para su posible empleo en reparaciones óseas y dentales. La síntesis del polvo de β -C₂S por metodología sol-gel vía alcóxido, sin la utilización de estabilizadores químicos, también forma parte de los objetivos de esta investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Síntesis del β -C₂S

El polvo de β -C₂S se preparó por metodología sol-gel vía alcóxido. En un primer momento se realiza la hidrólisis del alcóxido (C₂H₅O)₄Si (TEOS), luego se adiciona Ca(NO₃)₂·4H₂O en cantidades estequiométricas (relación molar Ca/Si=2), la reacción se mantiene 6 h con agitación constante a 60°C. Posteriormente se deja reposar (gelificar) a temperatura ambiente durante 24 h y por último se calcina el gel formado a 800°C por 3 h. El sólido obtenido fue molido en húmedo (isopropanol) en molino de atrición durante 2 h. El análisis químico del sólido obtenido se realizó por fluorescencia de rayos X (FRX) en un espectrofotómetro Phillips MagiX empleando la curva de calibrado de materiales sílico-aluminosos. Las muestras se prepararon en forma de perlas (Fusión de 0.3000 g de muestra y 5.5 g de Li₂B₄O₇). La identificación de las fases cristalinas presentes en el material sintetizado así como en los posteriores productos obtenidos se realizó por difracción de rayos X (DRX) para lo cual se utilizó un difractómetro Siemens D5000 con radiación CuK α ($\lambda = 1.5484 \text{ \AA}$), en el intervalo de 10-70° y paso angular 0.05°. También se empleó la espectroscopía ATR-FTIR (equipo PerkinElmer Spectrum 100) como técnica de caracterización.

Preparación del cemento

El cemento se obtiene al mezclarse, en determinadas proporciones, una fase sólida y otra líquida que fragua y endurece con el tiempo. En este caso la fase sólida correspondió al polvo de β -C₂S y la fase líquida a una solución de Na₂HPO₄ (2.5% masa), la relación líquido/polvo (R (L/P)) empleada fue 0.8 ml/g. El fraguado del cemento se realizó a 37°C y una hu-

medad por encima del 98%.

Tiempo y temperatura de fraguado

El estudio del tiempo de fraguado se realizó con un aparato de Vicat según el procedimiento descrito en la norma española Métodos de Ensayos de Cementos (Parte 3)-Determinación del tiempo de fraguado y de la estabilidad de volumen (UNE-EN 196-3, ICS 91.100.10-10). El tiempo inicial de fraguado (t_i) se definió en el momento que la aguja penetró la muestra 4 ± 1 [mm]. Luego se colocó la muestra por la cara opuesta anotándose como tiempo final (t_f) el momento que la aguja penetró 0.5 ± 0.1 [mm]. Las muestras se encontraban a 37°C y más del 98% de humedad. Este ensayo se realizó por triplicado y los resultados fueron reportados como la media \pm desviación estándar (SD).

Para la medición de la temperatura de fraguado (in situ) se empleó un equipo TESTO 177-T4 dotado de dos termopares tipo J (Cu-CuNi) de bajas temperaturas. En este caso el fraguado del cemento ocurrió en el interior de una cámara adiabática colocada dentro de un baño termostático a 37°C .

Estudios de biodegradación in vitro

Las muestras de cemento preparadas se sumergieron en fluido biológico simulado (SBF, siglas en inglés) durante 21 días a 37°C . El SBF, que tiene una composición química similar al fluido sanguíneo humano, fue preparado según la técnica descrita por Kokubo (Kokubo, 2006) y simula hasta cierto punto el ambiente fisiológico al que estaría sometido el material en el momento de su aplicación. Los cambios superficiales y microestructurales ocurridos en el cemento fueron analizados en un microscopio electrónico de barrido ambiental (Hitachi Tabletop Microscope TM-1000) y de emisión de campo (Hitachi S-4700) que tiene acoplado un espectrómetro de energías dispersivas de rayos X (EDS). Los cambios de pH que ocurren en la solución (SBF) al estar en contacto con las muestras de cemento se midieron en un pHmetro MPA-210, mientras que la variación en las concentraciones de Ca, P y Si en dicha solución se determinó por espectrometría de plasma ICP-OES en un equipo Thermo Jarrell Ash (Irish Advantage).

Determinación de la resistencia a la compresión

Para los ensayos mecánicos de resistencia a la compresión se prepararon probetas de 6 mm de diámetro x 12 mm de altura y se empleó una máquina universal de ensayos INSTRON con una célula de carga de 5 kN y una velocidad de ensayo de 0.5 mm min^{-1} . Se realizaron 6 réplicas y los resultados fueron reportados como la media \pm desviación estándar (SD).

Estudios de citotoxicidad y viabilidad celular

El comportamiento biológico in vitro de los sistemas analizados se ha evaluado aplicando un ensayo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio) (Denizot et al., 1986; Van Kooten et al., 1997) usando un cultivo de HOB (subcultivos 4) y los lixiviados extraídos en medio de cultivo a partir de las muestras de las formulaciones experimentales y el control negativo TMX. Para determinar la toxicidad de los lixiviados las muestras fueron introducidas en 5 ml de medio de cultivo libre de FBS y se mantuvieron en rotación a 37°C . En estas condiciones el medio de extracción se retiró y criopreservó a diferentes periodos de tiempo (1, 3 y 7 días) siendo reemplazado por otros 5 ml de medio de extracción fresco a 1 y 3 días. Todos los lixiviados fueron obtenidos en condiciones de esterilidad. Los osteoblastos suspendidos en medio de cultivo completo se sembraron sobre placas de cultivo estériles de 96 pocillos (Sarstedt) a una densidad de 1×10^5 células/ml ($100 \mu\text{l/pocillo}$) y fueron incubados durante 24 h a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 . Transcurrida esta incubación el medio de cultivo fue retirado reemplazándolo con el correspondiente lixiviado ($n = 6$) y los cultivos fueron nuevamente incubados en las mismas condiciones durante otras 24 h. A continuación se preparó una disolución de MTT en tampón fosfato salino (PBS; Sigma) templado (5 mg/ml) que a su vez se utilizó para constituir una disolución de MTT en medio de cultivo completo ($0,5 \text{ mg/ml}$) la cual fue adicionada, tras retirar los lixiviados de los materiales, a los cultivos ($100 \mu\text{l/pocillo}$). Posteriormente las placas fueron incubadas a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 durante 4 h. El exceso de medio y reactivo MTT de los pocillos se retiró añadiendo en su lugar dimetil sulfóxido (Scharlau; $100 \mu\text{l/pocillo}$) con

el objetivo de disolver el formazán resultante de la reducción del MTT por parte de las células viables presentes en los diferentes cultivos. Posteriormente las placas se mantuvieron en agitación durante 10 minutos transcurridos los cuales se procedió a medir absorbancia con un detector Biotek ELX808IU a una longitud de onda de 570 nm y una longitud de onda de referencia de 630 nm. La viabilidad celular relativa se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Viabilidad Celular Relativa (\% TMX)} = [(OD_S - OD_B) / (OD_C - OD_B)] \times 100 \quad (1)$$

donde OD_S , OD_B y OD_C se corresponden con la densidad óptica derivada de la producción de formazán para la muestra, el blanco (medio de cultivo sin células sembradas) y el control negativo TMX, respectivamente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El β -C₂S se obtuvo por síntesis sol-gel vía alcóxido como puede comprobarse en el difractograma de la Fig. 1. Todas las señales coincidieron con los picos característicos del mencionado compuesto y no se detectaron señales correspondientes a impurezas de otros silicatos de calcio ni a la fase polimórfica γ lo que demuestra que no ocurrió la transición $\beta \rightarrow \gamma$ permaneciendo estable la fase β durante el enfriamiento a temperatura ambiente.

Este método (sol-gel) es válido para la obtención de polvos de β -C₂S con excelente pureza (Tabla 1) sintetizados a temperaturas relativamente bajas (800°C) comparadas con las empleadas en las síntesis al estado sólido (>1400°C) y sin la adición de estabilizadores químicos. El tamaño medio de partículas del sólido fue de 2.55 μ m.

El polvo de β -C₂S se empleó como fase sólida para la preparación del cemento (denominado CSC), la relación líquido/polvo quedó fijada en 0.8 ml/g con la cual la pasta mostró una consistencia adecuada para su manipulación. La hidratación del β -C₂S es un proceso relativamente lento en contraste con muchos aluminatos cálcicos (Ej: Ca₃Al₂O₆) que reaccionan rápidamente con el agua y sus cementos presentan un fraguado rápido y muy exotérmico (Taylor, 1990; Liuet al., 2011; Black et al., 2006).

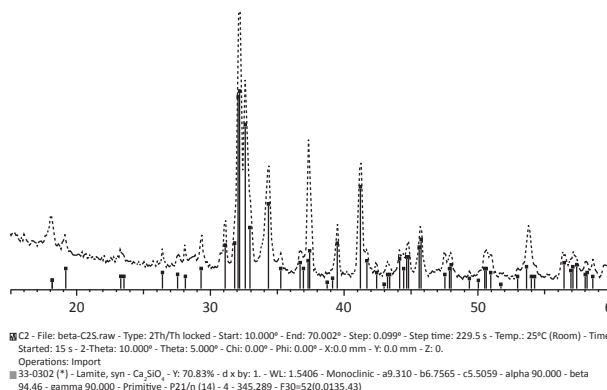


Figura 1 - Patrón de difracción de β -Ca₂SiO₄

Óxidos	Teórico (%)	Experimental (%)
CaO	65.1	64.4
SiO ₂	34.9	34.1
Al ₂ O ₃	-	-
Na ₂ O	-	-
P ₂ O ₅	-	0.01
MgO	-	-
Pérdida Calcinación	-	1.2

Tabla 1 - Análisis químico por FRX

En la Fig. 2 se muestran los elevados tiempos de fraguado ($t_{inicial}$ -178 min y t_{final} -230 min) obtenidos para el cemento CSC debido a la lenta hidratación que sufre el β -C₂S que se ha llegado a plantear que podría extenderse hasta 28 días (Liu et al., 2011; Pina et al., 2010). Por su parte el fraguado de CSC es ligeramente exotérmico alcanzando una temperatura máxima (35.4°C) inferior a la temperatura corporal (36.5°C) lo cual resulta favorable desde el punto de vista clínico.

Los estudios de biodegradación in vitro no pueden ser considerados determinantes para predecir el comportamiento in vivo de un material de implante puesto que el organismo es un sistema extremadamente complejo en el cual se suceden simultáneamente procesos químicos y biológicos (Pina et al., 2010). Sin embargo en la actualidad estos estudios aún son ampliamente desarrollados por numerosos

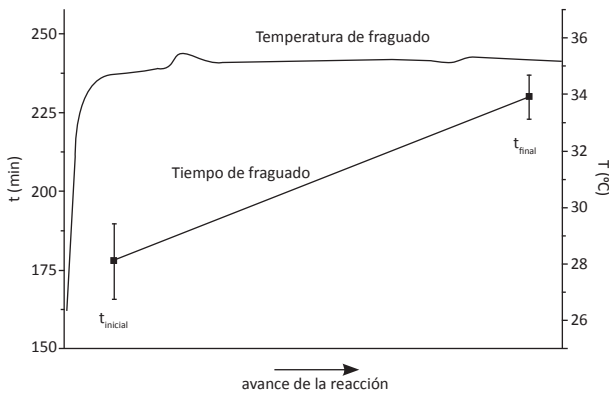


Figura 2 - Tiempo (t) y temperatura de fraguado (T) del cemento CSC

investigadores (Pan et al., 2010) debido a que permiten determinar aquellos materiales capaces de formar capa de hidroxiapatita sobre su superficie la cual es esencial en la posterior unión o integración del material al organismo a la vez que estimula la regeneración del tejido óseo (Pan et al., 2010; Weir et al., 2010).

En las micrografías presentadas en la Fig. 3 (a, b, c) se observa que la superficie de CSC, luego de 21 días de interacción con SBF, está cubierta por una capa de aglomerados cristalinos correspondiente a una hidroxiapatita deficiente en calcio ($\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$, CDHA). Según DRX Fig. 4 la formación de este tipo de estructuras es característica en los materiales bioactivos (Kokubo, 1997). El espectro EDS muestra señales correspondientes al fósforo (P) corroborando la formación superficial de una capa de fosfato de calcio tipo apatita. Las señales pertenecientes a la plata (Ag) se deben al método de preparación de la muestra para la realización del ensayo. Además se ha reportado que esta CDHA es similar en composición y estructura química (deficiente en calcio y de baja cristalinidad) a la apatita que compone la fase mineral del tejido óseo (Ginebra et al., 2010; Gallego et al., 2008).

A las 48 horas de fraguado el CSC (37°C , $>98\%$ humedad) aparecen picos pertenecientes a un silicato de calcio hidratado ($\text{Ca}_5\text{Si}_2\text{O}_9\cdot\text{H}_2\text{O}$) y al hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), Fig. 4, siendo ambos productos de la reacción de hidratación que está sufriendo el $\beta\text{-C}_2\text{S}$ que aún no ha terminado de reaccionar.

Los silicatos de calcio hidratados del tipo

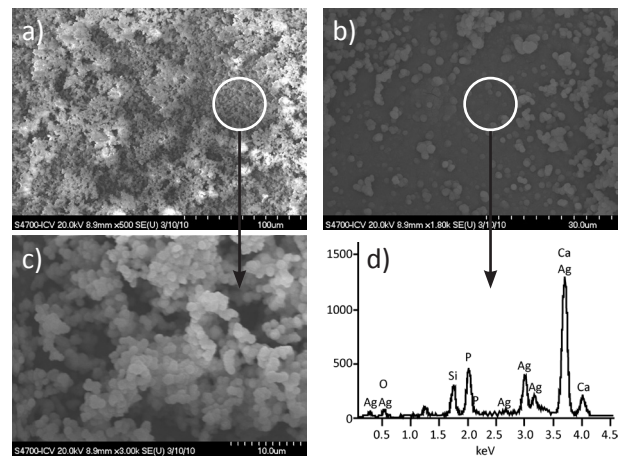


Figura 3 - Micrografías de la superficie de CSC luego de 21 días sumergido en SBF (a, b, c). Espectro EDS de la zona señalada en (b)

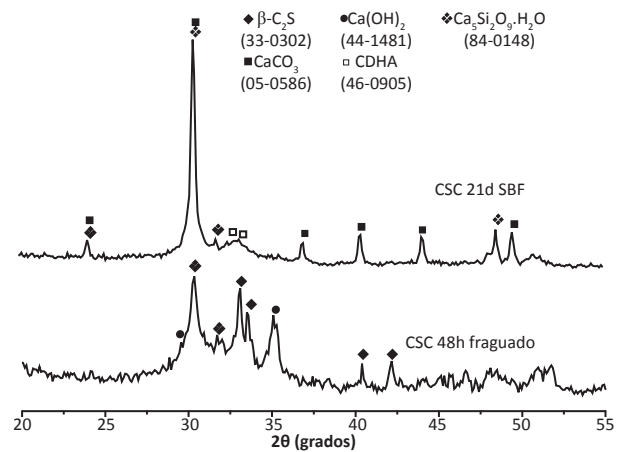


Figura 4 - Difractogramas del cemento CSC 48 horas de fraguado y en SBF

C-S-H han sido reportados como los principales productos de fraguado del cemento Portland como consecuencia de las reacciones de hidratación del silicato tricálcico (C_3S) y el beta-silicato dicálcico ($\beta\text{-C}_2\text{S}$) que entre ambos representan el 70-80% de los componentes de dicho cemento (Renaudin et al., 2009). Sin embargo la composición y estructura químicas de las C-S-H han sido objeto de numerosos estudios, aún sin conseguir definirlos de manera exacta, debido fundamentalmente a la baja cristalinidad que presentan dichas estructuras. Según Taylor pueden definirse dos grupos a partir de la relación

Ca/Si presente en los compuestos. Así para $Ca/Si < 1$ se define C-S-H (I) siguiendo como modelo la estructura de la tobermorita y C-S-H (II) para $Ca/Si > 1$ tomando como modelo la jennita (Taylor, 1990; Renaudin et al., 2009). En nuestro caso hemos obtenido un silicato cálcico hidratado ($Ca_5Si_2O_9 \cdot H_2O$) con relación $Ca/Si > 1$ que podríamos definir del tipo C-S-H (II).

Luego de 21 días de inmersión de la muestra en SBF aparecen en el difractograma señales correspondientes a la CDHA lo que resulta un indicativo de la capacidad bioactiva de este material (Kokubo, 1997). Adicionalmente a las señales presentes del $Ca_5Si_2O_9 \cdot H_2O$ se unen otras pertenecientes al carbonato de calcio ($CaCO_3$). Esto se debe a que el $Ca(OH)_2$, producto de la reacción de hidratación del β -C₂S, se ha ido carbonatando debido al $CO_2(g)$ del aire y al intercambio iónico que se produce entre los iones OH^- del $Ca(OH)_2$ y los iones HCO_3^- de la solución de SBF.

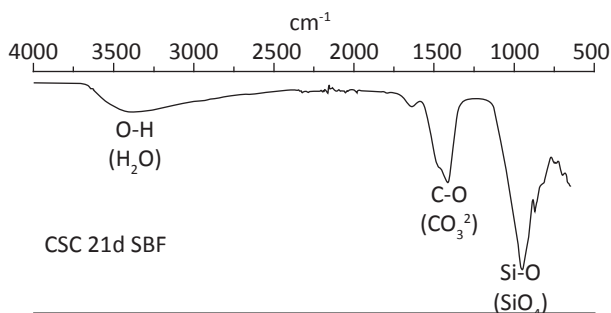


Figura 5 - Espectro IR del cemento CSC luego de 21 días sumergido en SBF

El espectro ATR-FTIR (Fig. 5) confirma los resultados obtenidos hasta el momento: a los 3400 cm^{-1} se muestra una banda ancha que se corresponde con la vibración O-H de agua absorbida (silicato cálcico hidratado). También se observan bandas alrededor de 1490 cm^{-1} que se asignan a los grupos CO_3^{2-} (vibraciones C-O) del carbonato cálcico y entre $800\text{--}1000\text{ cm}^{-1}$ pertenecientes a los modos vibracionales “stretching” del Si-O en el tetraedro SiO_4 (Gou et al., 2004; Chrysafi et al., 2007).

Los cambios de pH y la variación en las concentraciones de Ca, Si y P en el SBF a diferentes períodos de tiempo se muestran en la Fig. 6. Se observa

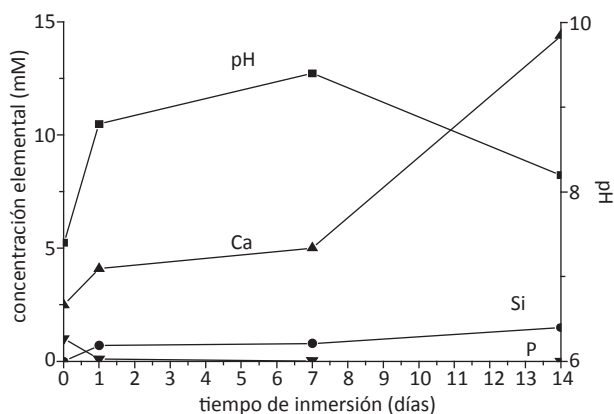


Figura 6 - Variación de pH y de la concentración de Ca, Si y P del SBF en contacto con la muestra

que las concentraciones de Ca y Si aumentan en el tiempo debido a la continua reacción de hidratación que va ocurriendo en el cemento y que conduce a la formación de una fase hidratada del tipo C-S-H, sin embargo la concentración de P en la solución (SBF) disminuye como consecuencia de la deposición de hidroxiapatita (CDHA) sobre la superficie del material. Por otra parte, los iones OH^- liberados a la solución producto de la reacción de hidratación que sufre el cemento explican el progresivo aumento de pH del medio los primeros días de interacción con la muestra, aunque a partir de los 7 días comienza a descender (pH) por el consumo de estos iones en la formación de CDHA. El pH a los 14 días (8.1) se encuentra dentro del intervalo permisible (6.5-8.5) reportado en la literatura (Santos, 2002) para el uso clínico de los biomateriales.

Las micrografías de la superficie de fractura del cemento CSC antes (48 horas de fraguado) y después de permanecer sumergido en SBF durante 21 días se muestran en la Fig. 7. Podemos apreciar que a las 48 horas de fraguado la microestructura interna del cemento CSC se muestra mucho más porosa y menos compacta en comparación con la microestructura del propio material luego de 21 días sumergidas en SBF. De ahí que los resultados de resistencia a la compresión en este caso sean significativamente superiores a los primeros.

Después de 21 días de interacción del material con SBF se han sucedido diferentes cambios químicos en éste, ha reaccionado prácticamente todo el

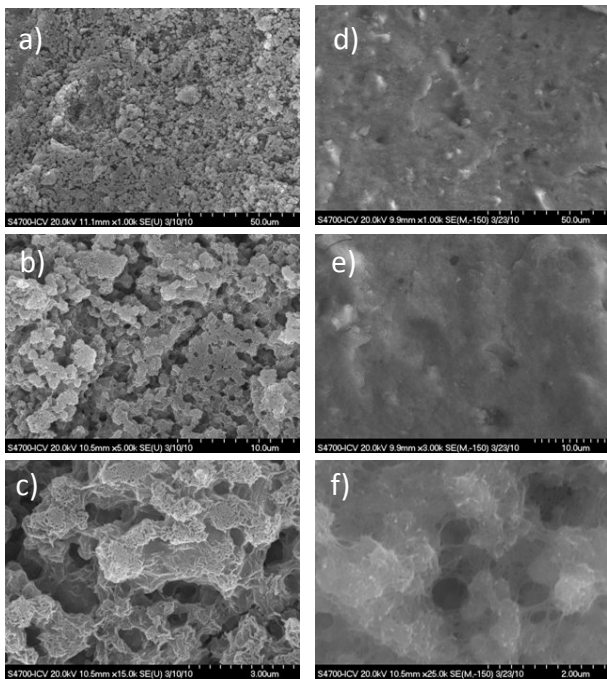


Figura 7 - Micrografías de la superficie de fractura del cemento CSC a las 48 horas de fraguado (a, b, c), después de 21 días en SBF (d, e, f)

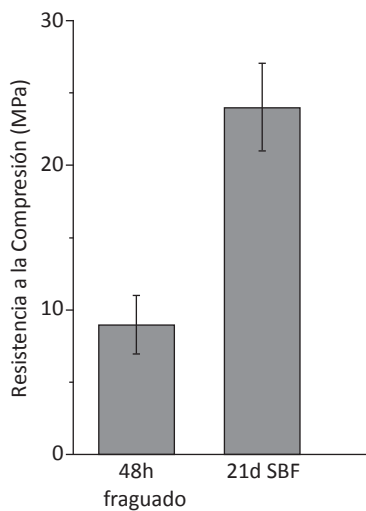


Figura 8 - Resistencia a la compresión de CSC a las 48 horas de fraguado y en SBF

β -C₂S, que a las 48 horas aún se detectaron señales del mismo por DRX, se ha formado una hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA) y un silicato cálcico hidratado del tipo C-S-H que conforman una es-

tructura interna mucho más interconectada y menos porosa capaz de brindar al material una resistencia a la compresión (Fig. 8, 24 ± 3 MPa) significativamente superior a la resistencia de éste luego de 48 horas de fraguado (9 ± 2 MPa). Estos valores de resistencia a la compresión (después de 21 días en SBF) son comparables con los del hueso trabecular (10-30 MPa) limitando las aplicaciones clínicas del cemento a zonas que no requieran grandes esfuerzos mecánicos (Santos, 2002; Roemhildt et al., 2003).

Los resultados obtenidos en el ensayo MTT (Fig. 9) demuestran que los lixiviados de las muestras de cemento no resultan citotóxicos para el cultivo de HOB después de 1 y 3 días de incubación mientras que a los 7 días los valores de viabilidad celular son significativamente inferiores respecto al control negativo TMX lo cual puede estar relacionado con los relativamente altos valores de pH (~9) medidos al SBF en contacto con la muestra en igual período de tiempo (Fig. 6). Sin embargo todos los valores de viabilidad celular obtenidos para los lixiviados de CSC fueron elevados y superaron en todo momento el 75% a los obtenidos para TMX lo que sugiere que éste es un material biocompatible y que estimula el crecimiento celular. Unido a esto, diferentes estudios (Liu et al., 2011) plantean que la disolución de iones silicato podría estimular la síntesis de colágeno tipo I y la diferenciación osteoblástica.

Las micrografías de la Fig. 10 muestran las superficies del control negativo TMX y del cemento CSC donde aparecen las células cultivadas (osteoblastos) adheridas a las mismas. Estos resultados indican que la superficie del material resulta un medio adecuado para la adhesión y proliferación celular.

CONCLUSIONES

La obtención del β -Ca₂SiO₄ sintetizado por metodología sol-gel resulta ser una vía adecuada para obtener dicho compuesto a temperaturas relativamente bajas (800°C) y sin la utilización de estabilizadores químicos.

El tiempo de fraguado de su cemento (CSC) es relativamente alto debido al lento proceso de hidratación que experimenta el β -C₂S. El cemento CSC al interactuar con SBF mostró un excelente comportamiento bioactivo in vitro pues su superficie fue re-

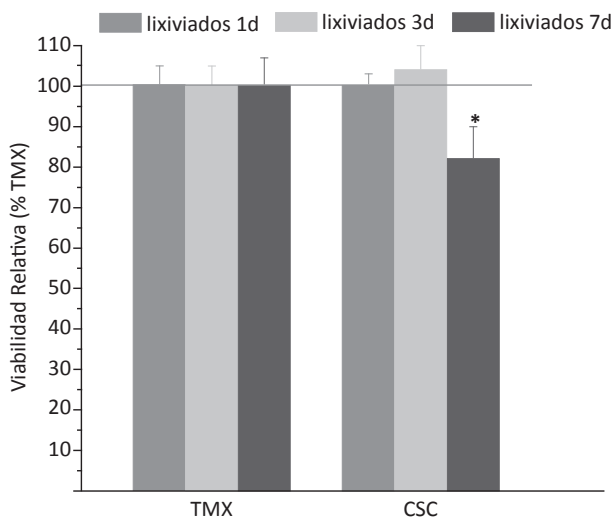


Figura 9 - Resultados del ensayo MTT para el control TMX y las formulaciones estudiadas. * Denota diferencias significativas respecto al TMX, $p < 0.05$

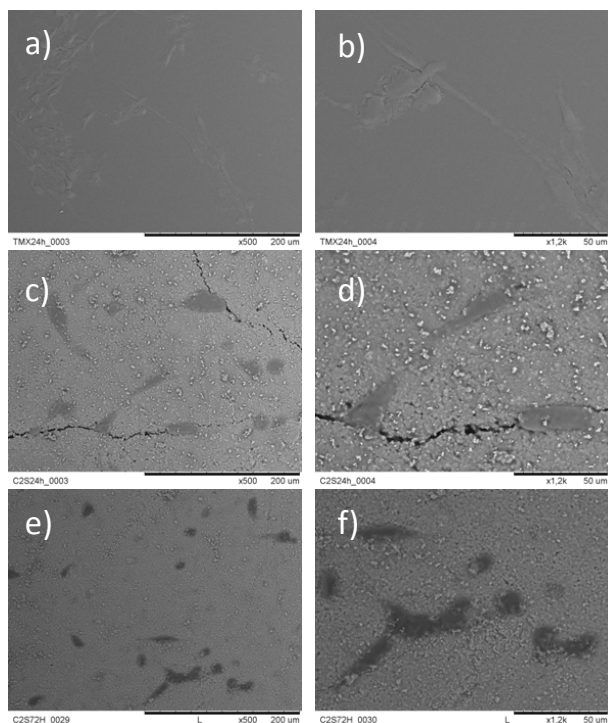


Figura 10 - Cultivos de HOb sembrados y mantenidos 24 horas sobre las superficies de TMX (a y b) y CSC (c y d) y 72 horas sobre CSC (e y f)

cubierta por una capa de hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA) similar química y estructuralmente a la apatita biológica. Los resultados de resistencia a la compresión en igual período de tiempo (21 días en SBF) fueron significativamente superiores a los obtenidos a las 48 horas de fraguado el material. El cemento CSC mostró un comportamiento no citotóxico frente al cultivo de HOB presentando elevados valores de viabilidad celular, los cuales fueron superiores al 75% a los obtenidos para TMX.

Por los resultados hasta aquí obtenidos el cemento de $\beta\text{-Ca}_2\text{SiO}_4$ puede ser considerado un candidato potencial para su empleo en determinadas aplicaciones biomédicas.

REFERENCIAS

Van der Vreken, Pieters, Declercq, Cornelissen and Verbeeck, "Characterization of calcium phosphate cements modified by addition of amorphous calcium phosphate", *Acta Biomaterialia*, 6, 617-25, (2010).

Gou and Chang, "Synthesis and in vitro bioactivity of dicalcium silicate powders" *2004 J. Europ. Ceram. Soc.*, 24, 93-99, (2004).

Kokubo, "Novel bioactive materials", *Anales de Química*; 93, 49-55, (1997).

Jones and Hench, "Biomedical materials for new millenium: perspective on the future", *Materials Science and Technology*; 8, 891-900, (2001).

Huan, Chan and Huang, "Self-Setting Properties and In Vitro Bioactivity of $\text{Ca}_2\text{SiO}_4/\text{CaSO}_4\cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ Composite Bone Cement", *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, 2, 387-94, (2008).

Taylor, "Cement Chemistry", *ACADEMIC PRESS INC. San Diego, CA 92101, ISBN 0- 12-683900-X, United States*, (1990).

Liu, Chan, Zhu and Zhang, "Effect of tricalcium aluminate on the properties of tricalcium silicate-tricalcium aluminate mixtures: setting time, mechanical strength and biocompatibility", *International Endodontic Journal*, 44, 41-50, (2011).

Wang, Ye, Wang and Chen, "Self-setting properties of a -dicalcium silicate reinforced calcium phosphate cement", *J. Biomed. Mater. Res. B: Appl. Biomater.*, 82, 93-99, (2007).

Chrysafi, Perraki and Kakali, "Sol-gel preparation of $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$ ", *J. Europ. Ceram. Soc.*, 27, 1707-10, (2007).

Kokubo and Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?", *Biomaterials*; 27, 2907-2915, (2006).

Denizot and Lang, "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).

Van Kooten, Klein, Köhler, Kirkpatrick, Williams and Eloy, "From cytotoxicity to biocompatibility testing in vitro: Cell adhesion molecule expression defines a new set of parameters", *J. Mater. Sci.*, 1997;8, 835-841, (1997).

Black, Breen, Yarwood, Deng, Phipps and Maitland, "Hydration of tricalcium aluminate (C3A) in the presence and absence of gypsum—studied by Raman spectroscopy and X-ray diffraction", *J. Mater. Chem.*, 16, 1263-72, (2006).

Pina, Torres, Goetz-Neunhoffer, Neubauer and Ferreira, "Newly developed Sr-substituted α -TCP bone cements", *Acta Biomaterialia* 6 928-35, (2010).

Pan, Zhao, Darvell and Lu, "Apatite-formation ability – Predictor of "bioactivity"?", *Acta Biomaterialia*, 6, 4181-88, (2010).

Weir and Xu, "Human bone marrow stem cell-encapsulating calcium phosphate scaffolds

for bone repair", *Acta Biomaterialia*, 6, 4118-26, (2010).

Ginebra, Espanol, Montufar, Pérez and Mes- tres, "New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine", *Acta Biomaterialia*, 6, 2863-73, (2010).

Gallego, Higueta, García, Ferrel and Hans- ford, "Bioactive coatings on Portland cement sub- strates: Surface precipitation of apatite-like crys- tals", *Materials Science and Engineering C*, 28, 347-52, (2008).

Renaudin, Russias, Leroux, Frizon and Cou- mes, "Structural characterization of C-S-H and C-A-S-H samples Part II: Local environment inves- tigated by spectroscopic analyses", *Journal of Solid State Chemistry*, 182, 3320-29, (2009).

Santos, "Desenvolvimento de Cimento de Fos- fato de Calcio Reforçado por Fibras para Uso na Area Médico-Odontológica", *Tesis (Doctorado en Ingeniería Mecánica)*, Brasil, (2002).

Roemhildt, McGee and Wagner, "Novel cal- cium phosphate composite bone cement: streng- th and bonding properties", *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, 14, 137-41, (2003).