

Estudios In Vitro de Cementos de α -Fosfato Tricálcico Modificados con β -Silicato Dicálcico

INVESTIGADORES INVITADOS: D. Correa^a, L. Brito, A. Almirall^a, J.A. Delgado^a, R. Carrodegua^b, L.A. Santos^c
^aCentro de Biomateriales, Universidad de La Habana, Cuba, ^bInstituto de Cerámicas y Vidrios, España, ^cLabiomat, Universidade Federal de Río Grande do Sul, Brasil

RESUMEN - La capacidad que presentan los cementos de fosfato de calcio de fraguar en condiciones fisiológicas, así como su excelente biocompatibilidad, hacen estos materiales factibles para diferentes aplicaciones clínicas. Sin embargo sus bajas propiedades mecánicas limitan dichas aplicaciones a zonas de menores esfuerzos físicos. El β -silicato dicálcico (β -C₂S) es un componente del cemento Portland, que reacciona con agua formando una fase hidratada de elevada resistencia mecánica. Diferentes autores han demostrado la capacidad bioactiva de este compuesto. En el presente trabajo fueron preparados cementos de α -fosfato tricálcico (α -TCP) modificados con β -C₂S. El polvo de α -TCP fue obtenido por reacción ácido-base y el β -C₂S vía sol-gel. Los materiales fueron caracterizados físico-químicamente, además de estudiar la biodegradación de los mismos a través de su inmersión en solución fisiológica simulada. Los mayores valores de resistencia a la compresión y pH correspondieron al cemento con 20% de β -C₂S (19,8 MPa and 8,09 respectivamente)

Palabras clave: fosfato tricálcico, hidroxiapatita, bioactividad

IN VITRO STUDIES OF α -TRICALCIUM PHOSPHATE CEMENT MODIFIED WITH β -DICALCIUM SILICATE

ABSTRACT - The combination of in situ self-setting and biocompatibility, makes calcium phosphate cements highly promising materials for a wide range of clinical applications. However, its low strength limits their use only to low-stress applications. β -Dicalcium silicate (β -C₂S) is a Portland cement component, able to react with water to form a hydrated phase that enhance mechanical strength of material. Different authors reported the bioactive capacity of this compound. In this investigation, α -TCP cements modified with β -C₂S were prepared. The α -tricalcium phosphate (α -TCP) powder was prepared through acid-base method, and β -C₂S was synthesized by sol-gel method. Materials were characterized both chemically and physically. Biodegradability was studied by soaking the materials in simulated body fluid for various time periods. The results showed that a cement with 20 % of β -C₂S exhibited greater compressive strength and pH values (19,8 MPa and 8,09 respectively).

Keywords: tricalcium phosphate cements, hydroxiapatite, bioactivity

INTRODUCCIÓN

Los primeros cementos de fosfatos de calcio fueron desarrollados por Brown y Chow en la década del 80 del pasado siglo. Ellos demostraron que mezclas de sales de fosfato tetracálcico (TTCP) y fosfato dicálcico dihidratado (DCPD) al reaccionar con agua fraguaban debido a su disolución y posterior precipitación de cristales de hidroxiapatita, cuyo entrecruzamiento proporcionaba resistencia mecánica al material resultante. Iniciándose de esta manera el desarrollo de materiales a base de sales de fosfatos de calcio para ser empleados en la regeneración del tejido óseo (1,2).

Entre las formulaciones de CFC que aparecen reportadas en la literatura sobresale la basada en un polvo de α -TCP (α -Ca₃(PO₄)₂) que al fraguar en presencia de una solución acuosa forma la hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA, Ca₉(HPO₄)(PO₄)₅OH), similar a la hidroxiapatita biológica. El entramado de cristales de CDHA es el responsable de proporcionar resistencia mecánica al biomaterial (1,3). Además la CDHA es un material biocompatible y osteoinductivo, es decir, que estimula la regeneración del tejido óseo, facilitando la recuperación del sitio de implantación. Por otra parte, estos materiales se caracterizan por su posibilidad de fraguar en condiciones fisiológicas por lo que pueden moldearse y adaptarse perfectamente a la forma del defecto óseo (4,5). Esta propiedad también ha permitido preparar materiales inyectables. Sin embargo, presentan el inconveniente de poseer baja resistencia mecánica, alcanzándose, en el mejor de los casos,

valores similares a la del hueso trabecular o un 20 % a la del hueso cortical, limitando sus aplicaciones a lugares que no soporten grandes esfuerzos mecánicos (6,7).

En la actualidad se han reportado diferentes formulaciones de cementos de aluminatos y silicatos de calcio que se destacan por su elevada resistencia mecánica al fraguar en presencia de soluciones acuosas. Estos cementos son empleados en determinadas aplicaciones clínicas como recubrimiento pulpar y relleno del canal apical. Si bien estos materiales han demostrado una buena biocompatibilidad con el tejido óseo, así como un alto potencial bioactivo, a diferencia de los CFC no son osteotransductivos, es decir no son colonizados por el tejido óseo (9).

El silicato dicálcico (C_2S) es un constituyente del cemento de construcción Pórtland, que al estar en contacto con agua o una solución acuosa reacciona desarrollando resistencia a partir de su producto de hidratación ($Ca_3Si_2O_7 \cdot 2H_2O$).

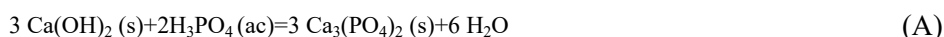
Estudios recientes han mostrado este material (C_2S) como un candidato potencial para la preparación de cementos óseos inyectables, debido a sus excelentes propiedades mecánicas y bioactividad, aunque algunos estudios *in vivo* han demostrado que sus productos de hidratación no son reabsorbibles (10, 11, 12).

En el presente trabajo se propone la preparación de cementos de α -fosfato tricálcico (α -TCP) modificados con β -silicato dicálcico (β - C_2S), obtenido por metodología sol-gel, con el objetivo de mejorar las propiedades mecánicas de los materiales finales, así como el estudio de degradación *in vitro* de los cementos al interactuar con solución fisiológica simulada (SBF).

MATERIALES Y MÉTODOS

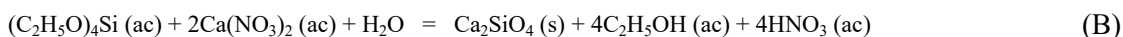
Síntesis del α -fosfato tricálcico (α -TCP) por vía húmeda

Se ponen a reaccionar $Ca(OH)_2$ y H_3PO_4 (0,5mol/L) en cantidades estequiométricas. El sólido obtenido se somete a un tratamiento térmico (horno eléctrico SANCHIS) de 1200°C por 6 horas, luego se realiza el *quenchi* (enfriamiento brusco) para obtener la fase cristalina deseada (fase α).



Síntesis de β - Ca_2SiO_4 (β - C_2S) vía sol-gel

Primeramente se realiza la hidrosilisis del alcóxido $(C_2H_5O)_4Si$ (TEOS), luego se combinan el TEOS y el $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ (relación molar Ca/Si = 2), la reacción se mantiene durante 6 horas y a 60°C. Finalmente se deja gelificar y se somete a tratamiento térmico de 800 °C durante 3 horas.



Preparación de los cementos

En la tabla I se muestra la composición de los cementos preparados, en todos los casos como fase líquida se empleó una solución acuosa de $(NH_4)_2HPO_4$ al 2,5% en masa. Para cada formulación se adicionó la cantidad mínima de líquido aceptada por la fase sólida (polvo).

Formulaciones	Composición Química	R(L/P)
T	100% α -TCP	0,40
TS10	10% β - C_2S	0,45
	90% α -TCP	
TS20	20% β - C_2S	0,50
	80% α -TCP	

R (L/P): relación líquido-polvo [ml/g]

Tabla I - Formulaciones estudiadas

	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	147,8	4,2	1,0	0,5
Plasma Sanguíneo	142,0	5,0	2,5	1,5	103,0	27,0	1,0	0,5

Tabla II - Composición de SBF [mmol/L]

Determinación de la porosidad aparente

Para el cálculo de la porosidad aparente (P_{AP}) fue utilizado el procedimiento descrito en la norma ASTM C 20-00 (2005) basada en el principio de Arquímedes. Se determinaron las masas de las muestras seca (m_s), húmeda (m_h) e inmersa (m_i), el líquido empleado fue etanol.

$$P_{AP} = \frac{(m_h - m_s)}{(m_h - m_i)} \times 100 \quad [\%] \quad (C)$$

Análisis de difracción de rayos X

Se empleó un difractómetro PHILLIPS® modelo X'Pert MPD con radiación CuK α 1 y límite de detección 4 %. Los difractogramas fueron obtenidos en un intervalo de 5-75° y paso angular 0,05°.

Estudios de degradación "in vitro"- Preparación de Solución Fisiológica Simulada (SBF, siglas en inglés)

La preparación del SBF se realizó según el procedimiento descrito por Kokubo y colaboradores (13).

Microscopía electrónica de barrido (MEB)

La interacción del material con el medio fisiológico se llevó a cabo colocando las formulaciones preparadas en SBF durante diferentes períodos de tiempo (7,15 y 21 días) a 36,5°C. Los cambios superficiales, así como en las superficies de fracturas, ocurridos en las muestras fueron analizados por MEB, empleando un microscopio electrónico del tipo JEOL - JSM 5800.

Ensayos mecánicos

Los ensayos mecánicos se realizaron en una máquina universal servohidráulica MTS 810 utilizando una célula de carga de 5 kN y una velocidad de ensayo de 1mm/min.

Variación de pH

La variación de pH que se produce en SBF, al estar en contacto con las muestras de cementos preparadas, fue estudiada con el empleo de un pHmetro modelo MPA210.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

α -fosfato tricálcico (α -TCP)

El fosfato tricálcico ($Ca_3(PO_4)_2$) presenta dos fases polimórficas, α y β , siendo la primera mucho más reactiva en contacto con solución acuosa a temperaturas ambiente y fisiológica (14,15). Para la obtención de esta fase (α) empleamos la vía ácido-base, pues es posible obtener dicho compuesto a menores temperaturas de síntesis y menor dependencia de la morfología de los materiales de partida como ocurre con las reacciones en estado sólido (16,17).

En la figura 1 se muestran los difractogramas del fosfato tricálcico (TCP) amorfo y luego del tratamiento térmico, puede apreciarse en el primer caso la presencia de bandas difusas, característico de los materiales amorfos, que carecen del ordenamiento estructural que presentan los sólidos cristalinos. Luego del tratamiento térmico, se observan señales correspondientes a la fase β . A pesar de no realizarse un estudio cuantitativo de las fases presentes, puede notarse que la fase α es mayoritaria. Diversos autores (18) reportan la presencia de fase β (hasta 15 %) en compuestos de α -TCP.

β -Silicato dicálcico (β -C₂S)

El C₂S presenta varias fases polimórficas, siendo γ la fase estable a temperatura ambiente. La fase β es la

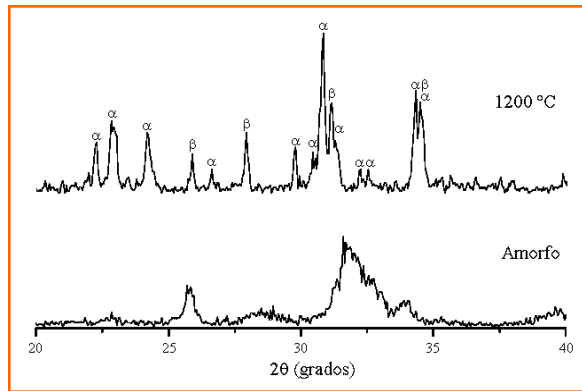


Fig. 1 - Difractogramas del TCP antes y después del tratamiento térmico

más reactiva y la empleada en los cementos Portland por su facilidad de hidratarse y aportar resistencia mecánica al material, sin embargo, puede transformarse con relativa facilidad a la fase γ . En nuestro trabajo empleamos una variante del método sol-gel propuesto por Chang (19) para la obtención de β - C_2S sin el empleo de estabilizadores químicos (20). En el difractograma que aparece en la figura 2 puede notarse que no se detectaron señales correspondientes a la fase γ , lo que resulta positivo desde el punto de vista de reactividad del material.

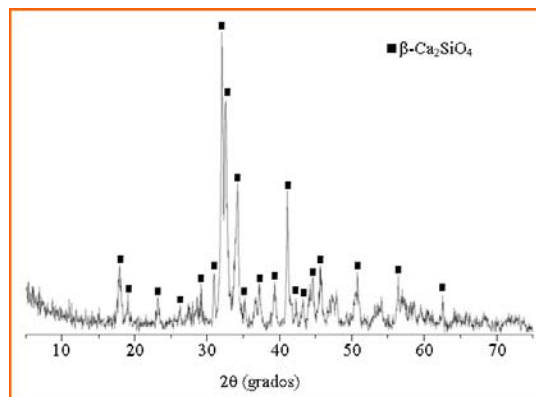


Fig. 2 - Patrón de difracción del β - C_2S

Degradación “in vitro” de los cementos

Las formulaciones estudiadas, así como sus composiciones están especificadas en la tabla I correspondiente a la parte experimental. La figura 3 muestra las micrografías de la superficie del cemento T (100% α -TCP), antes (0 días) y después de estar en contacto con SBF por diferentes períodos de tiempo.

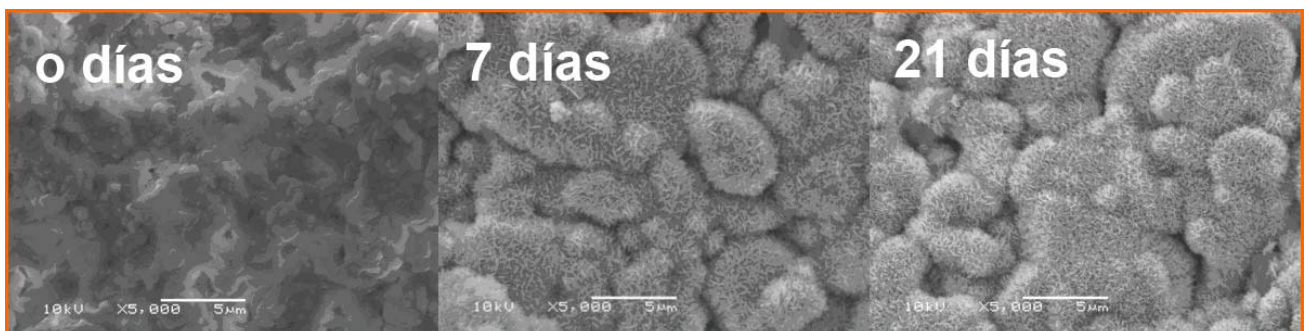


Fig.3 - Micrografías de la superficie del cemento T.

Puede apreciarse la formación de aglomerados formados por pequeños cristales en forma de agujas correspondientes a la hidroxiapatita (comprobado por DRX). Este tipo de estructuras coincide con las reportadas en la literatura para los materiales bioactivos (3,21).

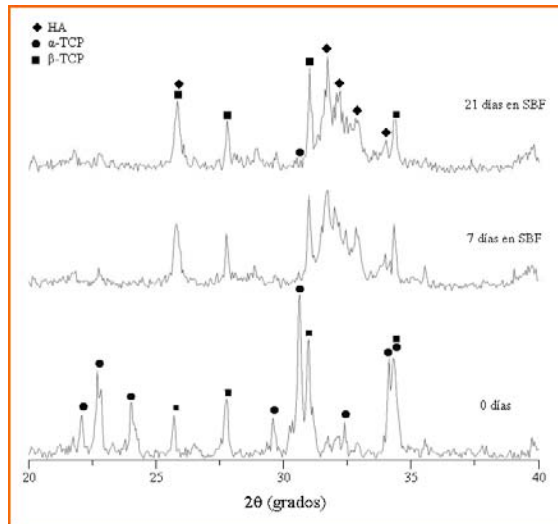


Fig. 4 - Difractogramas de T antes y después de estar en contacto con SBF

Los patrones de difracción muestran las señales características de la HA, en este caso correspondientes a una hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA). Se observa que a los 7 días de interacción del cemento con SBF ha reaccionado prácticamente todo el α -TCP, permaneciendo la fase β , aún a los 21 días, debido a la poca reactividad de la misma.

Los cementos de α -TCP modificados con β -C₂S (TS10 y TS20) mostraron comportamientos similares entre sí. Las figuras 5 y 6 muestran las microfografías y patrones de difracción de TS10 (10% de β -C₂S) respectivamente. En las microfografías se observan a los 7 días estructuras globulares bien desarrolladas, correspondientes a cristales de CDHA (según DRX figura 6).

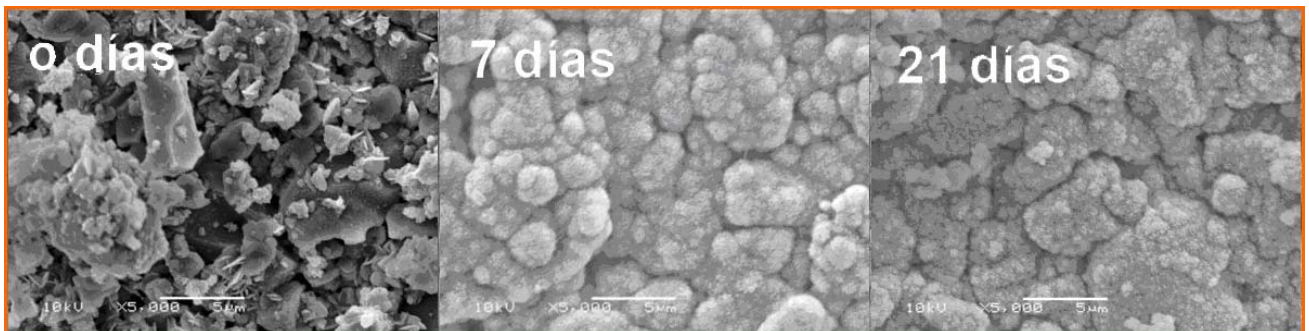


Fig. 5 - Micrografías de la superficie de TS10 a diferentes tiempos de interacción con SBF

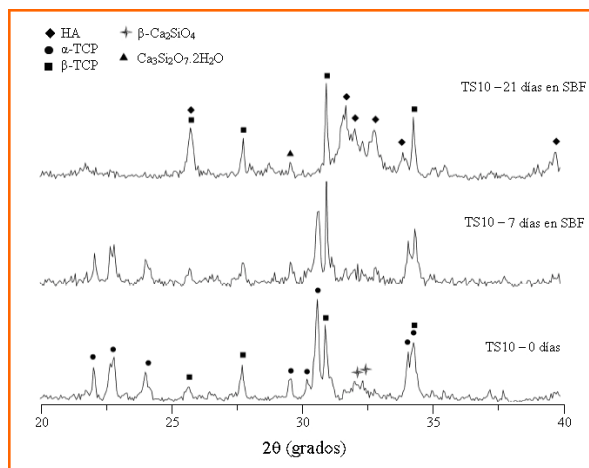


Fig. 6 - Difractogramas de TS10 a diferentes tiempos de interacción con SBF.

En los difractogramas de la figura 6 y 8 (7 y 21 días) aparecen además señales características de la fase hidratada $\text{Ca}_3\text{Si}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ que se forma como resultado de la reacción de hidratación que sufre el β -silicato dicálcico.

En el cemento TS20 (20% de $\beta\text{-C}_2\text{S}$) se aprecia la presencia de cristales en forma de crestas (señalados en la figura 7) antes de ponerse en contacto con SBF, pertenecientes a $\text{Ca}_3\text{Si}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; demostrando lo planteado en la literatura (12,19) respecto a la facilidad de hidratación del β -silicato dicálcico y la rápida formación de esta fase.

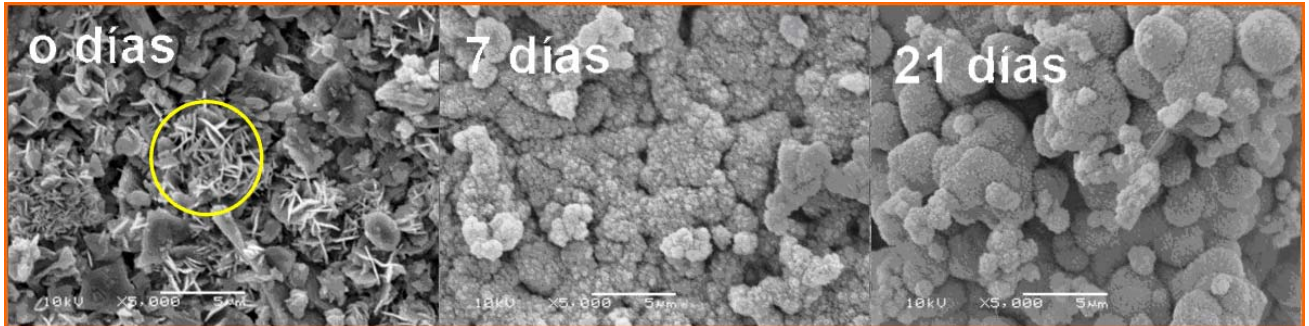


Fig. 7 - Micrografías de la superficie de TS20

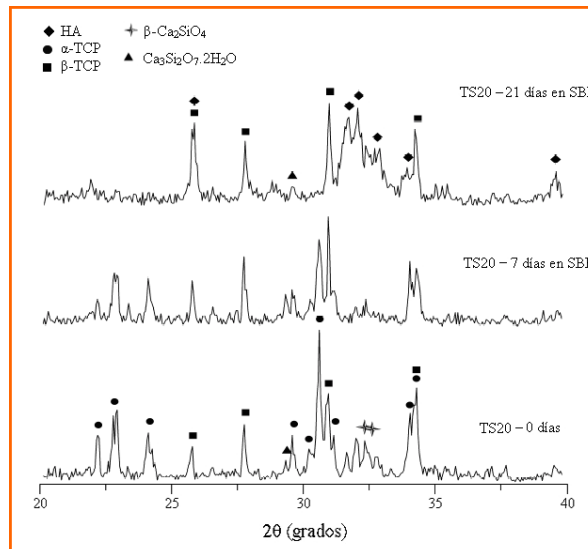


Fig. 8 - Patrones de difracción de TS20 antes y después de estar en contacto con SBF

En ambos casos (cementos TS10 y TS20) se aprecia la formación de las estructuras apatíticas que cubren completamente la superficie de estos materiales, luego de 21 días de interacción con SBF. Este hecho está relacionado con la ya demostrada capacidad bioactiva que presenta el $\beta\text{-C}_2\text{S}$, debido a la presencia de iones SiO_4^{4-} en su estructura, capaces de formar grupos silanoles (Si-OH) que actúan como sitios específicos que activan la nucleación de la hidroxiapatita (22).

Ensayos mecánicos. Resistencia a la compresión

Entre los factores que influyen en estas propiedades se destacan, además de la composición química de los materiales, la relación líquido-polvo ($R(L/P)$), tamaño de partículas del polvo y porosidad del cemento, entre otras (18). Por otra parte hay que tener en cuenta que la porosidad, a pesar de tener un papel negativo en las propiedades mecánicas, es un factor positivo en cuanto al comportamiento biológico del material, pues materiales con poros de tamaños inferiores a $100\mu\text{m}$ no permiten crecimiento de tejido óseo en sus intersticios (1,18).

En la tabla III se muestran los resultados de porosidad aparente de los cementos antes y después ($P_{AP}\text{-SBF}$) de interactuar con SBF. Todos los cementos experimentaron un aumento de su porosidad después de su

inmersión en SBF, lo que indica que estos materiales reaccionaron con la solución, disolviéndose parte de sus componentes más solubles.

Formulaciones	R (L/P) (ml/g)	P _{AP} (%)±SD	P _{AP} -SBF(%)±SD
T	0,40	19±3	31±1
TS10	0,45	18±2	30,1±0,8
TS20	0,50	17±2	30±2

Tabla.III - Porosidad aparente de los cementos preparados

En la figura 9 se muestran los resultados de resistencia a la compresión de las diferentes formulaciones estudiadas luego de estar en contacto con SBF durante 30 días.

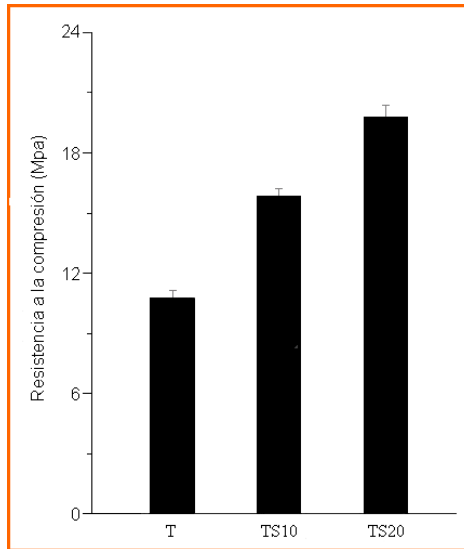


Fig. 9 - Resistencia a la compresión de los cementos estudiados

Se puede apreciar que el menor valor (10,8 MPa) corresponde al cemento T, pues solo presenta en su composición α -TCP, aunque este valor se encuentra alejado de los resultados reportados en la literatura para este tipo de materiales (18, 22, 23). Esta situación se repite para el resto de las formulaciones, pues en el caso de cementos de α -TCP modificados con β -C₂S (8 %) preparados por Wang y colaboradores, se reportan resultados de resistencias a la compresión superiores a 45 MPa (11). Las bajas propiedades mecánicas de estos cementos pueden estar relacionadas con la formación de pequeños cristales de HA en su interior (observados en las micrografías de la figura 10), incapaces de formar un entramado cristalino resistente que es el máximo responsable de la resistencia mecánica de estos materiales. También debe tenerse en consideración el relativamente elevado porcentaje de porosidad aparente presentado por estos cementos.

Los mayores valores de resistencias obtenidos corresponden al cemento TS20 (19,8 MPa), pues las micrografías de superficie de fractura muestran una estructura interna más compacta, debido a la existencia de cristales Ca₃Si₂O₇·2H₂O que refuerzan de manera significativa la resistencia mecánica del cemento.



Fig. 10 - Micrografías de la superficie de fractura de T (a), TS10 (b) y TS20 (c), luego de 30 días inmersos en SBF

Variación de pH

Los cementos estudiados permanecieron inmersos en SBF durante diferentes períodos de tiempo con el objetivo de evaluar el comportamiento del pH de la solución (figura 11) en presencia de estos materiales.

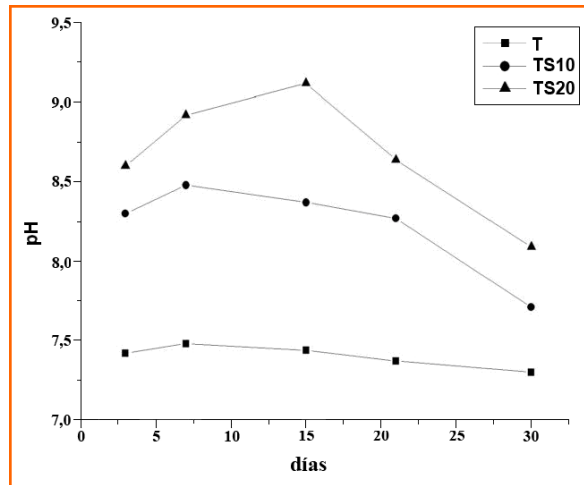


Fig. 11. Variación de PH de las muestras en estudio a 36,5°C.

En todos los casos se observa un aumento inicial, hasta los 7 días, en los valores de pH, con la excepción del cemento TS20 que mostró su mayor valor a los 15 días. El cemento T presenta los menores valores de pH, e incluso cercanos al pH neutro, debido a que en su reacción de fraguado consume iones OH^- de la solución para convertirse en hidroxiapatita.

En el caso de los cementos preparados con $\beta\text{-C}_2\text{S}$ el aumento del pH está justificado por las reacciones de hidratación que ocurren en los mismos. Se ha planteado que este compuesto se disuelve en agua liberando iones SiO_4^{4-} , sufriendo reacciones de condensación para formar iones diméricos $\text{Si}_2\text{O}_7^{6-}$ e incrementándose el pH de la solución (19), la reacción puede ser planteada de la manera siguiente:



Los valores de pH finales de todos los cementos se encuentran dentro del intervalo permisible (6.5-8.5) planteado por diversos autores para el uso clínico de estos materiales (18).

CONCLUSIONES

Se logró obtener un polvo de $\alpha\text{-TCP}$ a partir de un fosfato de calcio amorfo obtenido por vía húmeda (reacción ácido-base). Así como el compuesto $\beta\text{-C}_2\text{S}$ mediante metodología sol-gel, empleado como modificador del cemento de $\alpha\text{-TCP}$. El cemento de $\alpha\text{-TCP}$ (T), así como sus modificaciones (TS10 y TS20) fraguaron formando hidroxiapatita deficiente en calcio (CDHA). En todos los casos después de 21 días de interacción con SBF, la superficie de los mismos presentaba aglomerados cristalinos bien desarrollados correspondientes a CDHA. Los valores de resistencia a la compresión aumentaron en el siguiente orden $\text{T} < \text{TS10} < \text{TS20}$, pues los cristales de $\text{Ca}_3\text{Si}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ refuerzan las propiedades mecánicas del material final. A pesar que se consiguió aumentar la resistencia mecánica con el empleo de $\beta\text{-C}_2\text{S}$, los resultados obtenidos no fueron del todo satisfactorios, pues en la literatura se reportan materiales similares con resultados de resistencia a la compresión superiores a los aquí obtenidos. En los estudios de pH, el cemento T presentó la menor variación y menores valores de pH, debido que en el resto de las formulaciones las reacciones de hidratación forman productos con propiedades básicas, aumentando el pH del sistema. En todos los casos los valores de pH, después de 30 días, se encuentran dentro del intervalo aceptado por diferentes autores para el uso clínico de estos materiales.

REFERENCIAS

1. FERNANDEZ E., GIL J, GINEBRA M. P., DRIESSENS S F., PLANELL J. A., Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO_4 a- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: pH, workability and setting times,

- Journal of materials science: Materials in medicine, v.10, p.223-230, 1999.
2. GINEBRA M. P. et.al., Setting Reaction and Hardening of an Apatitic Calcium Phosphate Cement, *J Dent Res*, v.76, p.905-912, 1997.
 3. KOMATH M. AND VARMA H. K., Development of a fully injectable calcium phosphate cement for orthopedic and dental applications, *Bull. Mater. Sci*, v.4, p.415-422, 2003.
 4. TADIC D., PETERS F., EPPLE M., Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites, *Biomaterials*, v.23, p.2553-2559, 2002.
 5. SUJIN K., In situ observation of hydroxyapatite nanocrystal formation from amorphous calcium phosphate in calcium-rich solutions, *Materials Chemistry and Physics*, v.91, p.500-506, 2005.
 6. GBURECK U., et.al., Amorphous α -Tricalcium aluminate Phosphate: Preparation and Aqueous Setting Reaction, *J. Am. Ceram Soc.*, v.87, p.1126-1132, 2004.
 7. DOS SANTOS, et. al., Dual-setting calcium phosphate cement modified with ammonium polyacrylate, Blackwell Publishing, v.27, p.412-418, 2003.
 8. CUNEY T A., Chemical preparation of the binary compounds in the calcia-alumina system by Self-Propagating Combustion Synthesis, *J. Am. Ceram. Soc.*, v.81, p.2853-63, 1998.
 9. HENCH L. L., Theory of bioactivity: the potential for skeletal regeneration, *Anales de Química*, v.93, p.44-48, 1997.
 10. WANG X. et. al., Self-setting properties of β -dicalcium silicate reinforced calcium phosphate cement, *J. Biomed. Mat. Res.*, 2006.
 11. CHANG J., Low-temperature synthesis of nanocrystalline β -dicalcium silicate with high specific surface area, *Journal of Nanoparticle Research*, v.9, p.1195-1200, 2007.
 12. KOKUBO T., TAKADAMA H., How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials*, v.27, p.2907-2915, 2006.
 13. YANBAO L., WENJIAN W., KIM CH. T., Novel highly biodegradable biphasic tricalcium phosphates composed of a-tricalcium phosphate and b-tricalcium phosphate, *Acta Biomaterialia*, v.3, p.251-254, 2007.
 14. BOHNER M., MALSY A., CAMIRE' CH., GBURECK U., Combining particle size distribution and isothermal calorimetry data to determine the reaction kinetics of a-tricalcium phosphate-water mixtures, *Acta Biomaterialia*, v.2, p.343-348, 2006.
 15. GBURECK U., et.al., Amorphous α -Tricalcium aluminate Phosphate: Preparation and Aqueous Setting Reaction, *J. Am. Ceram Soc.*, v.87, p.1126-1132, 2004.
 16. SANDI CAROLINA RUIZ S. C, DELGADO E., Propuesta y evaluación de una síntesis rápida y selectiva de algunos fosfatos de calcio por el método ácido-base, 2005. Trabajo de grado, Facultad de Ciencias, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia.
 17. DOS SANTOS L. A., Desenvolvimento de Cimento de Fosfato de Calcio Reforçado por Fibras para Uso na Area Médico-Odontológica, 2002. Tesis (Doctorado en Ingeniería Mecánica), Universidade Estadual de Campinas, Brasil.
 18. GOU Z., CHANG J., Synthesis and in vitro bioactivity of dicalcium silicate powders, *Journal of the European Ceramic Society*, v.24, p.93-99, 2004.
 19. CHRYSAFI R., PERRAKI TH., KAKALI G., Sol-gel preparation of $2\text{CaO}\cdot\text{SiO}_2$, *Journal of the European Ceramic Society*, v.27, p.1707-1710, 2007.
 20. VALLET-REGÍ M., GONZÁLEZ-CALBET J. M., Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Progress in Solid State Chemistry*, v.32, p.21-31, 2004.
 21. KOKUBO T., Novel bioactive materials, *Anales de Química*, v.93, p.49-55, 1997.
 22. ROEMHILDT M., MCGEE T., WAGNER S. D., Novel calcium phosphate composite bone cement: strength and bonding properties, *J. Mater. Sci.: Materials in Medicine*, v.14, p.137-141, 2003.
 23. SANG-HWAN CH., et.al., Mechanical properties and workability of self hardening calcium phosphate cement as function of particle size distribution, *Journal Ceramic Processing Research*, v.1, p.57-62, 2004.