

Síntesis, caracterización y aplicación en regeneración ósea de  
cementos de brushita fraguados con ácidos orgánicos, geles y  
coloides.

*Faleh Tamimi Mariño*

Dirigido por:

*Prof. Enrique López Cabarcos      Y      Prof. Luis Blanco Jerez*

*A mis padres Ahmad y Fermina, y a mis hermanos Iskandar, Hakim y Karim.*

### Agradecimientos:

A mis compañeros de laboratorio Joëlle, Silvia, Marta, Juan Pablo, Jesús, Francesca y Jorge. A los profesores del Departamento de Físico Química II de la Facultad de Farmacia por sus consejos útiles y constructivos: Carmen Rueda, Mariam Elorza, Begoña Elorza, Conchita Civera, Conchita Arias, Paz Sevilla, Francisco García Blanco y Pedro Galera, así como al Dr Álvaro López Ruiz. Al CAI de difracción de rayos X y, en especial, al Dr. Fernando Conde López por su consejo y ayuda. Al Departamento de Galénica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, especialmente a los profesores Manuel Córdoba y Juan Torrado. A mi tutor en la Universidad de Parma, el profesor Ruggero Bettini. También doy las gracias a la profesora Carmen Gasco y al Decano Prof. Mariano Sanz por haberme orientado en la Facultad de Odontología. A los profesores de Odontología Isabel Fernandez-Tresguerres y Rafael Baca. Y por ultimo, a mis directores de tesis, los profesores Enrique López Cabarcos y Luis Blanco Jerez, por su apoyo incondicional durante estos años.

Esta tesis fue subvencionada por una beca F.P.I. (BES-2004-6210) asociada al proyecto de investigación (MAT2003-03051-C03-03) del antiguo Ministerio de Ciencia y Tecnología (ahora anexionado al Ministerio de Educación y Ciencia), por el proyecto de la Comunidad de Madrid (GR/MAT/0501/2004), y por el proyecto de la UCM (PR45/05/14177).

## **Prólogo:**

Esta Tesis esta enfocada al desarrollo de nuevos biomateriales aptos para ser aplicados en la regeneración ósea en cirugía dental. En la mayoría de los estudios en biomateriales, se abarca un amplio espectro de especialidades, y áreas del conocimiento, como la Química, la Física, la Farmacia, la Odontología, la Medicina, cada una de ellas con su propio lenguaje especializado. Para facilitar la lectura de la Tesis por expertos de los distintos campos se ha incluido un apéndice en el que se definen los términos que considero más relevantes y que no se han definido en el texto de la tesis.

# Índice:

<b>1. Abstract y Resumen</b>	<b>11</b>
1.1. Abstract (English)	12
1.2. Resumen (Español)	15
<b>2. Introducción:</b>	<b>19</b>
2.1. Estado actual de las investigaciones en cementos cálcicos.	20
2.2. Descripción de los minerales que constituyen los cementos cálcicos	27
2.2.1. Brushita	27
2.2.2. Monetita	29
2.2.3. Fosfato tricálcico beta	30
2.2.4. Mono fosfato cálcico	31
2.3. Definición del material ideal para regeneración ósea	32
2.4. Efecto de aditivos añadidos a la fase líquida del cemento de brushita	34
2.4.1. Efecto de los ácidos carboxi	34
2.4.2. Efecto del gel de sílice	36
2.4.3. Efecto del condroitin sulfato	37
2.5. Tratamiento del cemento con fluidos supercríticos	43
2.6. Regeneración ósea con granulado de cemento de brushita	49
<b>3. Hipótesis y Objetivos</b>	<b>54</b>
3.1. Hipótesis de trabajo	55
3.2. Objetivos de Tesis	55
<b>4. Materiales y métodos</b>	<b>57</b>
4.1. Materiales	58

4.1.1.	Preparación de la fase sólida del cemento	58
4.1.1.1.	Síntesis del fosfato tricálcico- $\beta$	58
4.1.1.2.	Síntesis del polvo de cemento	59
4.1.2.	Preparación de la fase líquida del cemento	59
4.1.2.1.	Soluciones de ácidos carboxi	59
4.1.2.2.	Síntesis de geles y soluciones de sílice y C4S	61
4.1.3.	Tratamiento de los cementos con fluidos supercríticos	63
4.1.4.	Preparación de los cementos de brushita	63
<b>4.2.</b>	<b>Métodos</b>	<b>65</b>
4.2.1.	Métodos de análisis y caracterización físico-química	65
4.2.1.1.	Calorimetría diferencial de Barrido (DSC)	65
4.2.1.2.	Análisis de pérdidas de peso por temperatura	67
4.2.1.3.	Difracción de rayos-X	67
4.2.1.4.	Microscopía electrónica de barrido	69
4.2.1.5.	Fuerza de tensión diametral	70
4.2.1.6.	Tiempo de fraguado final	71
4.2.1.7.	Espectroscopia de rayos infrarrojos (FT-IR)	71
4.2.1.8.	Dispersión de Luz (Light scattering)	73
4.2.2.	Estudios <i>In vivo</i>	75
4.2.2.1.	Preparación de injertos óseos granulados	75
4.2.2.2.	Regeneración ósea con el nuevo biomaterial: Técnica quirúrgica	76
4.2.2.3.	Análisis de las muestras biológicas de hueso regenerado	77
4.2.2.3.1.	Densitometría mineral ósea	78
4.2.2.3.2.	Histología	78
4.2.2.3.3.	Histomorfometría	79

<b>4.3. Análisis estadístico</b>	<b>79</b>
<b>5. Resultados</b>	<b>81</b>
<b>5.1. Efecto de los grupos carboxi sobre el fraguado de los cementos de brushita</b>	<b>82</b>
5.1.1. Efecto de los ácidos carboxi sobre el tiempo de fraguado del cemento	83
5.1.2. Fuerza de tensión diametral de los cementos	86
5.1.3. Microestructura de los cementos	89
5.1.3.1. Difracción de rayos X	89
5.1.3.2. Calorimetría diferencial de barrido	92
5.1.3.3. Pérdida de peso en relación al incremento de la temperatura	93
5.1.3.4. Microscopía electrónica de barrido	99
5.1.4. Discusión del efecto de la adición de ácidos carboxi en la reacción del fraguado del cemento	101
<b>5.2. Cementos fraguados con geles de sílice</b>	<b>108</b>
5.2.1. Fuerza de tensión diametral	108
5.2.2. Tiempo final de fraguado	111
5.2.3. Microestructura de los cementos	112
5.2.3.1. Difracción de rayos X	112
5.2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido de las muestras de cemento	114
5.2.3.3. Microscopía electrónica de barrido	117
5.2.4. Discusión del efecto del gel de sílice sobre el cemento de brushita	120
<b>5.3. Cementos fraguados con moléculas que estimulan la regeneración ósea:</b>	
<b>Condroitin sulfato</b>	<b>122</b>
5.3.1. Influencia del C4S sobre el tiempo de fraguado	123
5.3.2. Propiedades mecánicas de los cementos con C4S	124

5.3.3.	Difracción de rayos X en cementos con C4S	126
5.3.4.	Análisis con DSC	127
5.3.5.	Discusión del efecto del C4S	129
<b>5.4.</b>	<b>Tratamiento de los cementos con SC-CO<sub>2</sub></b>	<b>134</b>
5.4.1.	Cemento de brushita	134
5.4.2.	Componentes del cemento de brushita por separado	136
5.4.2.1.	Fosfato tricálcico $\beta$ ( $\beta$ -TCP)	137
5.4.2.2.	Pero fosfato sódico ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ )	140
5.4.2.3.	Fosfato Monocálcico (MCP)	142
5.4.3.	Análisis mecánico antes y después del tratamiento con SC-CO <sub>2</sub>	146
5.4.4.	Cementos de PMMA (M=120kD)	147
5.4.5.	Discusión de la utilización de los fluidos supercríticos en esterilización de cementos	148
<b>5.5.</b>	<b>Estudio piloto de regeneración ósea con un granulado de cemento fraguado con ácido glicólico</b>	<b>150</b>
5.5.1.	Caracterización del cemento seleccionado para los estudios <i>in vivo</i>	151
5.5.1.1.	Propiedades mecánicas	151
5.5.1.2.	Microestructura	153
5.5.1.3.	Morfología del cemento por SEM	153
5.5.2.	Estudios <i>in vivo</i>	154
5.5.2.1.	Densitometría	154
5.5.2.2.	Estudios histológicos e histomorfométricos	158
5.5.3.	Discusión de la utilización de los gránulos de brushita para regeneración ósea	161
<b>6.</b>	<b>Conclusiones</b>	<b>166</b>

<b>6.1.</b>	<b>Conclusiones (Español)</b>	<b>167</b>
<b>6.2.</b>	<b>Conclusions (English)</b>	<b>168</b>
<b>7.</b>	<b>Bibliografía</b>	<b>169</b>
	<b>Apéndice:</b>	<b>190</b>
	<b>Anexo I (términos de ciencias de la salud)</b>	<b>190</b>
	<b>Anexo II (términos físico químicos)</b>	<b>195</b>

# 1. Abstract y Resumen

---

## 1. Abstract (English)

Brushite based cements are emerging as promising biomaterials for bone treatments because they are biocompatible, resorbable and have acceptable mechanical properties.

Brushite cements are prepared by mixing a solid phase with a liquid phase to form a workable paste that will set into a hard material. The aim of our work was focused on the improvement and development of new brushite cements by changing the composition of the liquid phase while the solid phase was always a mixture of  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP), monocalcium phosphate and sodium pyrophosphate. The possible applications of brushite cements are mainly surgical, that's why we have explored a new cement sterilization method based on supercritical CO<sub>2</sub>. Finally we have performed *in vivo* experiments using a rabbit animal model for evaluating the bone regeneration capacity of the synthesized materials.

In the first part of the thesis we investigated the effect of carboxy acids on the brushite cement setting reaction. We incorporated different carboxy acid solutions in the cement liquid phase: acetic acid, glycolic acid and citric acid. The acid solutions were prepared at different concentrations ranging between 0.5 to 3.5 M and subsequently mixed with the cement solid phase in the powder liquid ratios (P/L) = 1.28; 1.72 and 2.56. Cements set with P/L=2.56 had the best diametric tensile strength regardless the acid type or concentration. The best mechanical properties were obtained using glycolic acid, followed by citric and acetic acid. The setting time was directly related to the acid normality in the cement liquid phase and it was longer for cements set with citric acid, followed by glycolic and acetic acid. Moreover, we have observed that the OH groups

of the organic acid play an important role on the cement setting time and mechanical properties.

In the second part of our study, we analyzed the effect of silica ( $\text{SiO}_2$ ) gels on the setting reaction of brushite cements. The cements were prepared by mixing the cement solid phase with different silica solutions while cements set with distilled water were used as controls. The cements that set using a concentration of  $\text{SiO}_2$  of 15 g/L had 3.82 MPa diametral tensile strength while cements set with distilled water at the same pH produced a diametral tensile strength of 3.05 MPa. However, the mechanical properties of the silica set cements kept at 37 °C in 100 % humidity environment were similar to those of the cements set with distilled water in the same conditions. Furthermore, samples set with silica gel and cements set with distilled water had the same final setting time ( $3 \pm 1$  min). The use of silica gels on brushite-based cements improves the diametral tensile strength in dry environments and increases the water inside its structure, but has no significant effect on the setting time.

In the third part of the thesis, we studied the use of osteoinductive additives, such as chondroitin 4 sulfate, on the cement setting reaction. Different cement liquid phases were prepared by mixing 0.5 M citric acid solutions with several concentrations of C4S and silica gel (15g/L). Adding C4S to the cement liquid phase increased the cement final setting time when used at concentrations below 8 %, and increased slightly the cement diametral tensile strength when used at concentrations below 6 %. Calorimetric analysis showed that the cements set with C4S alone or in combination with silica gel had greater hydrophilicity. We concluded that the addition of C4S in small amounts prolongs the cement setting time without affecting its mechanical properties and improves its water affinity.

The sterilization of brushite cements is necessary for their surgical use but only the gamma irradiation technique is able to accomplish sterilization without damaging its properties. However this technique is expensive and needs special security regarding possible hazardous radiations. In the fourth part of our study we evaluated a new technique for sterilizing brushite cements based on supercritical CO<sub>2</sub>. The treatment with supercritical CO<sub>2</sub> did not alter the microstructure, composition and mechanical properties of brushite cements. We conclude that this technique could be considered for sterilizing this biomaterial.

In the fifth part of our thesis we synthesized and characterized a new cement composed of a mixture of monocalcium phosphate and  $\beta$ -TCP that sets using glycolic acid. After setting, the cement had a diametral tensile strength of  $2.9 \pm 0.7$  MPa, and its composition, was 83 wt% brushite and 17 wt %  $\beta$ -TCP, with an average brushite crystal size of *ca*  $2.6 \pm 1.4$   $\mu\text{m}$ . Granules with size range between 200 and 1000  $\mu\text{m}$  were prepared from the set cement and used as graft material in bone defects on rabbit calvaria for evaluating its *in vivo* regeneration capacity. Considerable cement resorption, improvement in the bone mineral density, and bone neoformation was observed 4 weeks after the granulate implantation. The results suggest that this novel biomaterial could be considered for clinical use as an alternative to other bone graft materials.

**Key words:** brushite, dicalcium phosphate dihydrate,  $\beta$ -tricalcium phosphate, acetic acid, glycolic acid, citric acid, calcium phosphate cements, silica gel, chondroitin sulfate, set cement granules, bone regeneration, rabbits, titanium bone chamber.

## 2. Resumen (Español)

Los cementos de brushita están emergiendo como biomateriales prometedores para tratamientos óseos gracias a su biocompatibilidad, reabsorción *in vivo* y aceptables propiedades mecánicas.

Los cementos de brushita se preparan mezclando una fase líquida con otra sólida para formar una pasta manejable que fragua produciendo un material duro. El objetivo de nuestro trabajo está enfocado a mejorar y desarrollar nuevos cementos de brushita cambiando la composición de la fase líquida, mientras que la fase sólida se mantiene siempre como una mezcla de fosfato tricálcico  $\beta$  ( $\beta$ -TCP), monofosfato cálcico y pirofosfato cálcico. Las posibles aplicaciones de los cementos de brushita son fundamentalmente quirúrgicas, por ello hemos explorado un nuevo método para esterilizar los cementos basado en los fluidos supercríticos de  $\text{CO}_2$ . Finalmente, hemos realizado un estudio en un modelo experimental animal para evaluar la capacidad que tienen los materiales sintetizados para regenerar hueso.

En la primera parte de la tesis hemos investigado el efecto que tienen los ácidos carboxi sobre la reacción de fraguado de los cementos de brushita. Para ello hemos incorporado a la fase líquida del cemento diferentes soluciones de ácidos carboxi que comprendían el ácido acético, glicólico y cítrico. Las soluciones ácidas fueron empleadas en concentraciones entre 0,5 y 3,5 M, que eran posteriormente mezcladas con la fase sólida del cemento en unas proporciones polvo a líquido de  $(P/L) = 1,28$ ; 1,72 y 2,56. Los cementos fraguados con  $P/L = 2,56$  tuvieron la mayor fuerza de tensión diametral, independientemente del tipo o concentración de ácido empleado. Las mejores propiedades mecánicas eran obtenidas utilizando ácido glicólico en la reacción

de fraguado del cemento, seguido por el ácido cítrico y por el acético. El tiempo de fraguado estaba directamente relacionado con la normalidad del ácido presente en la fase líquida del cemento y era más prolongado para los cementos fraguados con ácido cítrico seguido por el glicólico y el acético. Además hemos observado que la presencia de grupos OH en la molécula del ácido orgánico juega un papel importante sobre el tiempo de fraguado y las propiedades mecánicas del cemento.

En la segunda parte de nuestro estudio, hemos analizado el efecto del gel de sílice ( $\text{SiO}_2$ ) sobre la reacción de fraguado de los cementos de brushita. Se prepararon distintas muestras de cementos mezclando la fase sólida del cemento con diferentes soluciones de sílice y se usaron cementos fraguados con agua destilada como controles. Los cementos que fraguaron con  $[\text{SiO}_2]$  de 15 g/L tuvieron una fuerza de tensión diametral de 3,82 MPa mientras que los fraguados con agua destilada obtuvieron una fuerza de tensión diametral de 3,05 MPa. No obstante, estas diferencias desaparecían cuando los cementos eran almacenados a 37 °C en un medio de humedad 100 %. Además los cementos fraguados con gel de sílice tenían el mismo tiempo de fraguado que los cementos fraguados con agua destilada ( $3 \pm 1$  min). El uso del gel de sílice mejora la fuerza de tensión diametral del cemento en ambientes secos, y aumenta la cantidad de agua almacenada en la estructura del mismo sin afectar a su tiempo de fraguado.

En la tercera parte de la tesis, hemos estudiado el uso de aditivos osteoinductivos, como el condroitin 4 sulfato (C4S), en la reacción de fraguado del cemento. Se prepararon distintas fases líquidas mezclando soluciones de ácido cítrico 0,5 M con varias concentraciones de C4S y gel de sílice (15g/L). Al añadir C4S a la fase líquida del cemento en concentraciones inferiores al 8 %, se consiguió un aumento del tiempo de fraguado y cuando se uso en concentraciones inferiores al 6 % aumento ligeramente

la fuerza de tensión diametral. Los estudios calorimétricos demuestran que los cementos fraguados con C4S, solo o con gel de sílice, son más hidrófilos. Concluimos que al añadir C4S mejora la afinidad por el agua del cemento y se consigue una prolongación del tiempo de fraguado sin afectar a las propiedades mecánicas.

La esterilización de los cementos de brushita es necesaria para su aplicación clínica, pero solamente la técnica de irradiación gamma es capaz de esterilizarlos sin dañar sus propiedades. No obstante, esta técnica es costosa y necesita medidas de seguridad especiales para controlar las radiaciones nocivas. En la cuarta parte de nuestro trabajo, hemos evaluado una nueva técnica para esterilizar los cementos de brushita basada en los fluidos supercríticos de CO<sub>2</sub>. El tratamiento con fluidos supercríticos no alteró la microestructura, composición y propiedades mecánicas de los cementos de brushita. Concluimos que esta técnica puede ser utilizada para esterilizar los cementos óseo de brushita y de metacrilato.

En la quinta parte de nuestra tesis, hemos sintetizado y caracterizado un nuevo cemento que se compone de una mezcla de fosfato monocálcico y  $\beta$ -TCP que fragua con ácido glicólico. Una vez fraguado, el cemento tenía una fuerza de tensión diametral de  $2,9 \pm 0,7$  MPa, su composición era de brushita 83 % y  $\beta$ -TCP 17 %, y la media de tamaño de los cristales de brushita era de *ca*  $2,6 \pm 1,4$   $\mu$ m. Con el cemento ya fraguado se fabricaron gránulos con un tamaño entre 200 y 1000  $\mu$ m que fueron aplicados en defectos óseos en la calota de un grupo de conejos para evaluar *in vivo* la capacidad de regeneración ósea de este material. Cuatro semanas después de su implantación el material produjo un notable aumento de volumen óseo, aparte de mejorar la densidad mineral ósea y además se pudieron observar signos de reabsorción en el granulado. Los resultados demuestran que este nuevo biomaterial puede ser considerado para el uso

clínico en regeneración ósea como una alternativa a otros materiales no reabsorbibles.

**Palabras clave:** brushita, fosfato dicálcico dihidrato, fosfato tricálcico  $\beta$ , ácido acético, ácido glicólico, ácido cítrico, cementos de fosfato cálcico, gel de sílice, condroitin sulfato, gránulos de cemento fraguado, regeneración ósea, conejos, cámaras óseas de titanio.

## **2. Introducción:**

---

## **2.1 Estado actual de las investigaciones en cementos cálcicos**

Las distintas formas de los minerales basados en fosfato cálcico son de gran utilidad en odontología y cirugía ortopédica. Estos materiales están compuestos de los mismos elementos que se encuentran en el hueso y por ello son bien tolerados por el organismo mostrando gran capacidad osteoconductora y osteoinductora. Los materiales con base de fosfato cálcico pueden ser de origen natural, como el hueso humano, el coral, y el hueso animal, o sintéticos como las cerámicas y cementos.

Las cerámicas son productos inorgánicos, vidriosos e iónicos que se preparan a altas temperaturas, suelen poseer excelentes propiedades mecánicas pero carecen de la posibilidad de ser moldeadas o adaptadas al lugar de aplicación quirúrgica y su estructura suele consistir en cristales grandes. Los cementos se preparan a partir de una mezcla de polvo y líquido que carece de propiedades mecánicas interesantes, pero una vez inducida la reacción de fraguado, se convierten en una pasta moldeable que al endurecer adquiere propiedades mecánicas de un sólido y puede adaptarse a la forma necesaria durante la intervención quirúrgica u odontológica. Además su estructura microcristalina les otorga una gran área superficial, facilitando su uso como vehiculizantes de liberación controlada de fármacos [13]. Estas cualidades de los cementos de fosfato cálcico están provocando un creciente interés por los mismos reflejado en el aumento exponencial del número de artículos publicados en los últimos años, que ya supera al de cerámicas de fosfato cálcico [13].

Los cementos óseos están divididos en dos familias: cementos poliméricos de metacrilato de metilo, y cementos de fosfato cálcico.

Los cementos de fosfato cálcico son materiales biocompatibles y biodegradables que pueden inyectarse y ser utilizados en procedimientos quirúrgicos tan variados como (ver la Tabla 2.1-I):

- 1) Fijaciones de fracturas, dando estabilidad a las mismas y reduciendo la necesidad de injertos [75].
- 2) Vertebroplastias y kifoplastias [54].
- 3) Reparaciones craneales y reconstrucciones óseas [146].
- 4) Endodoncia como sellador pulpar, siendo una alternativa a los irritantes selladores de ZnO-E [44, 115].
- 5) Recubrimiento de pulpa dental, como alternativa a los citotóxicos cementos de zinc, composites y ionómeros de vidrio [42, 124].

Los cementos de metacrilato son materiales poliméricos, fáciles de manejar, radiopacos y tienen buenas propiedades mecánicas, tiempos de fraguado, e inyectabilidad [55]. No obstante, el metacrilato es menos biocompatible que el fosfato cálcico, fragua en una reacción exotérmica irritante, y no puede ser reabsorbido por el organismo [56]. Además el residuo que liberan estos cementos aumenta la reabsorción ósea ya que provoca la producción de sustancias como la interleukina-1, el factor de necrosis tumoral, la prostaglandina E2, la Interleukina-6 y la calcitonina relacionadas con la reabsorción ósea [57,156, 157, 165]. Por estas razones los cementos de fosfato

cálcico están siendo investigados como alternativa a los cementos de metacrilato y a las cerámicas óseas abriendo muchas puertas en el horizonte de los materiales para regeneración ósea tanto en traumatología y odontología, como en endodoncia, cirugía oral, odontología conservadora e implantología [136].

TABLA 2.1.I

Resumen de las propiedades y utilidades de los cementos óseos

Cemento	Fuerza de compresión	Osteo-conducción	Reabsorción	Tratamientos	
				Dentales	Médicos
Hidroxiapatita	180 MPa [7]	Si	Muy lenta	Tratamientos de canal [43] [71] Fijación de implantes [79] Recubrimiento pulpar [20] Defectos perimplantarios [24] Defectos periodontales [24]	Fijación de fractura [75], Vertebroplastia [54], Reconstrucción ósea Fijación de tornillos [79], Craneoplastia [125] [82][146], Aumentación nasal [103] Fracturas de la tibia[84], Quiste óseo[26] Defectos craneofaciales[87]
Brushita	30 MPa [6]	Si	Rápida	<b>Todavía no se han estudiado</b>	Fijación de tornillos [148], Craneoplastia [74], Vertebroplastia [54]
Sulfato Cálcico	45MPa [36]	Si	Muy rápida	Defectos periodontales [70] Empaste temporal [83] Elevación de senos [48] Conservación del alveolo post extracción [32]	Kifoplastia [83] Vertebroplastia [83]
Polimetilmetacrilato	5,2GPa [100]	No	Nula	Base de dentaduras postizas [99]	Kifoplastia [83] Vertebroplastia [83][151][55], Fijación de Fracturas [105] [56], Artroplastia de cadera [118][57], Craneoplastia [97][156][165], Hemangioma [49], Mieloma [49]

Brown y Chow en 1986, fueron los primeros en desarrollar un cemento de fosfato cálcico ortopédico/dental que producía hidroxiapatita después de fraguar [17]. A partir de entonces se han desarrollado diferentes formulaciones de cementos de hidroxiapatita que emplean varios precursores de la reacción de fraguado [47]. Un cemento de fosfato cálcico con una diferencia esencial al propuesto por Brown y Chow es el cemento de brushita, descrito por Lemaitre en 1987, que se obtiene mezclando monofosfato cálcico con  $\beta$ -fosfato tricálcico [77, 94]. Hoy en día, dependiendo del resultante de la reacción química, existen dos familias de cementos de fosfato cálcico: cementos de hidroxiapatita (HAP) y cementos de dihidrato de fosfato dicálcico (DCPD o Brushita). Hasta ahora, la mayoría de los estudios se han concentrado en el desarrollo de los cementos de hidroxiapatita por tres razones principales:

- i) Esta presente en el hueso.
- ii) Tiene buenas propiedades mecánicas.
- iii) Fragua con un pH neutro.

A pesar de estas ventajas que tienen los cementos de hidroxiapatita, los cementos de brushita han levantado recientemente un gran interés debido a su capacidad de ser reabsorbidos por el organismo de manera mucho más rápida que la hidroxiapatita [15]. La reabsorción de la hidroxiapatita es debida principalmente a la acción celular y esta limitada a la superficie del material, ya que las células no pueden penetrar la estructura microporosa del cemento y este se mantiene estable en el organismo durante periodos superiores a 12 meses [47]. Por el contrario, los cementos de brushita son más solubles y reabsorbibles que los de hidroxiapatita al pH fisiológico de 7,4.

Por los motivos anteriormente expuestos, el uso de los cementos de brushita esta

enfocado a situaciones en las que se necesita regeneración ósea, mientras que los cementos de hidroxiapatita se utilizan cuando la reabsorción del material es innecesaria, como en los procesos de vertebroplastia o de obturaciones dentales. Ver tabla 2.1-I. En la tabla 2.1.II se muestra la lista de cementos de fosfato cálcico comercializados hasta el momento junto con sus composiciones [13].

Los cementos de brushita se preparan mediante una reacción ácido-base que ocurre entre el fosfato tricálcico beta y protones donados por un fosfato cálcico ácido como el fosfato monocálcico dihidrógeno, o simplemente aportados mediante una solución de un ácido como el fosfórico o el sulfúrico. Aunque estos cementos son biocompatibles y reabsorbibles, tienen un tiempo de fraguado demasiado rápido, y son demasiado viscosos lo que ha limitado su empleo clínico [6]. Los cementos de brushita han sido mejorados incorporando en su composición sustancias que prolongan el tiempo de fraguado y mejoran las propiedades mecánicas y el manejo de los mismos. Se han utilizado con éxito retardantes químicos como el pirofosfato sódico, el fitato, iones de citrato, iones de fitatocitrato y citrato de sodio, para prolongar el tiempo de fraguado [46,14].

TABLA 2.1.II

De izquierda a derecha, Empresas que producen cementos cálcicos (columna 1), Nombre del producto comercial (columna 2), composición del cemento (columna 3) y producto resultante del fraguado (columna 4) [13].

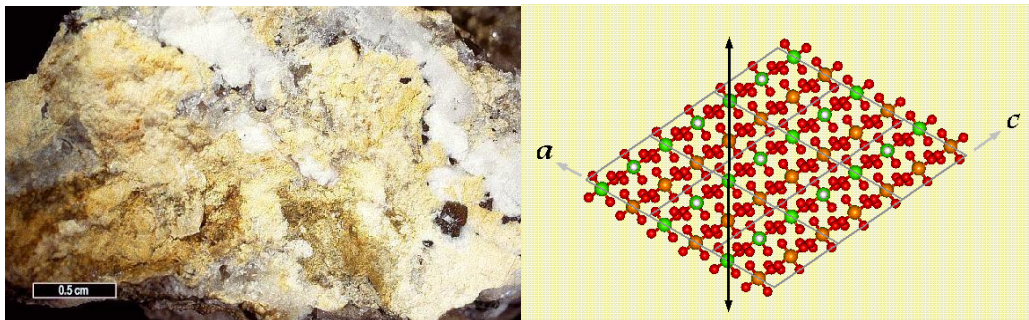
Compañía	Nombre del cemento	Componentes	Producto final
ETEX	$\alpha$ -BSM Embarc Biobon	Polvo: ACP (50%) DCPD (50%) Solución: H <sub>2</sub> O (solución salina)	HAP
Stryker-Leibinger Corp	BoneSource	Polvo: TetCP (73%), DCP (27%) Líquido: H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> y NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HAP
Teknimed	Cementek®	Polvo: $\alpha$ -TCP, TetCP, Na Glicerofosfato Solución: H <sub>2</sub> O, Ca(OH) <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	HAP
	Cementek®LV	Polvo: $\alpha$ -TCP, TetCP, Na Glicerofosfato, dimetilsiloxano Solución H <sub>2</sub> O Ca(OH) <sub>2</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	HAP
Biomet	Calcibon®(previamente llamado "Biocement D")	Polvo: $\alpha$ -TCP (61%), DCP (26%), CaCO <sub>3</sub> (10%) PHA (3%) Solución H <sub>2</sub> O y NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HAP
	Mimix™	Polvo TetCP, $\alpha$ -TCP, C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> Na <sub>3</sub> ·2 H <sub>2</sub> O Solución H <sub>2</sub> O, C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	HAP
	QuickSet Mimix™	Polvo: ND Solución: ND	HAP
Mitsubishi Materials	Biopex®	Polvo $\alpha$ -TCP (75%), TetCP (20-18%), DCPD (5%), HA (0-2%) Solución: H <sub>2</sub> O, succinato sódico (12-13%), condroitin sulfato sódico (5-5.4%).	HAP
	Biopex®-R	Polvo $\alpha$ -TCP, TetCP, DCPD, HA, Mg <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> , NaHSO <sub>3</sub> Solución H <sub>2</sub> O, succinato sódico (12-13%), condroitin sulfato sódico (5-5.4%).	HAP
Kyphon	KyphOs™	Polvo $\alpha$ -TCP (77%), Mg <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> (14%), MgHPO <sub>4</sub> (4.8%), SrCO <sub>3</sub> (3.6%) Solución H <sub>2</sub> O, (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (3,5M)	HAP
Skeletal Kinetics	Callos™	Polvo ND Solución ND	HAP
Shanghai Rebone Materials Co.Ltd Synthes-Norian	Rebone	Polvo TetCP, DCP Solución H <sub>2</sub> O	HAP
	Norian®SRS	Polvo $\alpha$ -TCP (85%), CaCO <sub>3</sub> (12%), MCPM (3%)	HAP
	Norian®CRS	Solución H <sub>2</sub> O, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	HAP
	Norian®SRS Fast Set Putty	Polvo. ND Solución: ND	HAP
	Norian®CRS Fast Set Putty		
	ChronOS™Inject	Polvo: $\beta$ -TCP (73%), MCPM (21%), MgHPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O (5%), MgSO <sub>4</sub> (>1%), NaH <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (<1%) Solución H <sub>2</sub> O, hialuronato sódico (0,5%)	Brushita
Kasios	Eurobone®	Polvo: $\beta$ -TCP (98%), Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (2%) Solución H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (3,0M), H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (0,1M)	Brushita
CalciphOs	VitalOs	Componente 1: $\beta$ -TCP(1,34g), NaH <sub>2</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> (0,025g), H <sub>2</sub> O, PBS(0.05M pH7.4) Componente 2: MCPM(0.78g) CaSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O(0.39g), H <sub>2</sub> O, H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (0,05M)	Brushita

También se han ensayado diferentes soluciones ácidas como precursoras de la reacción de fraguado con el fin de mejorar las propiedades mecánicas del cemento y su

inyectabilidad. En un principio se usó agua destilada, ácido fosfórico y el ácido sulfúrico [14], a los que posteriormente se añadieron polímeros como el ácido hialurónico y goma de xantham mejorando el manejo del cemento [37]. Se ha demostrado recientemente que con el uso aditivos poliméricos gelificantes en la fase líquida del cemento aumenta la cohesión del mismo [13].

## 2.2 Descripción de los minerales que constituyen los cementos cálcicos:

### 2.2.1 Brushita:



**Figura 2.2-1.** La brushita y su estructura cristalina: Calcio (verde); fósforo (naranja);

oxígeno (rojo) [Jeff Weissman / Photographic Guide to Mineral Species]

Brushita es el nombre que se le otorga al mineral de fosfato cálcico dibásico dihidratado de fórmula  $\text{Ca}(\text{HPO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; que cristaliza en una celdilla monoclinica de dimensiones  $a = 5,83 \text{ \AA}$ ;  $b = 15,19 \text{ \AA}$ ;  $c = 6,26 \text{ \AA}$ ;  $\beta = 116,47^\circ$ .

Su peso molecular es de 172,10, y su composición por peso es la siguiente: Calcio (23,29 %), fósforo (18,0 %), hidrógeno (2,93 %), oxígeno (55,78 %) o también:  $\text{H}_2\text{O}$  (26,17 %),  $\text{CaO}$  (32,59 %),  $\text{P}_2\text{O}_5$  (41,24 %).

Es prácticamente insoluble en agua, poco soluble en ácido acético y soluble en  $\text{HCl}$  o  $\text{HNO}_3$ . Se usa en odontología en la pasta de dientes, en la alimentación, en la fabricación de vidrio y en fertilizantes [91].

La estructura cristalina de la brushita consiste de laminas compactadas de cadenas

paralelas en las que los iones de calcio están coordinados por seis átomos de oxígeno de los aniones de fósforo, y por 2 átomos de oxígeno de las moléculas de agua. La brushita contiene 2 tipos de moléculas de agua, una con un ángulo H-O-H igual a  $106,6^\circ$  y la otra con  $105,4^\circ$ . Las uniones de hidrógeno de estas moléculas varían entre sí, el primer tipo de molécula tiene enlaces de hidrógeno de forma lineal mientras que el segundo tipo los tiene con ángulos de  $167,3^\circ$  y  $165,8^\circ$  [127]. La brushita es un electrolito sólido con una capa de moléculas de agua adsorbidas sobre su superficie que con sus uniones de hidrógeno contribuyen a la emigración protónica en el complejo [143].

La brushita es el fosfato cálcico menos estable según la regla de paso de Oswald y es metaestable en condiciones fisiológicas siendo más reabsorbible que la hidroxiapatita y que el fosfato tricálcico beta [102, 150, 15]. De hecho, la brushita puede reabsorberse a una velocidad ligeramente superior a la de neoformación de hueso lo cual es muy interesante en procesos de regeneración ósea [142].

La velocidad de disolución de la brushita es de  $4,26 \times 10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{min}^{-1}$  a pH 5,5. Este valor es 3,4 veces más rápido que el del  $\beta$ -TCP ( $1,26 \times 10^{-4}$ ), y mucho más rápido (300 veces) que el de la hidroxiapatita carbonatada  $1,42 \times 10^{-6}$ , que es la hidroxiapatita con velocidad de reabsorción más alta [27].

En el hueso, la brushita es una de las primeras fases de fosfato cálcico que se forma en el comienzo de la nucleación y crecimiento de los cristales de HAP siendo un mineral importante en el crecimiento de la hidroxiapatita *in vivo* [23].

### 2.2.2. Monetita:



**Figura 2.2-2.** Monetita [Jeff Weissman / Photographic Guide to Mineral Species]

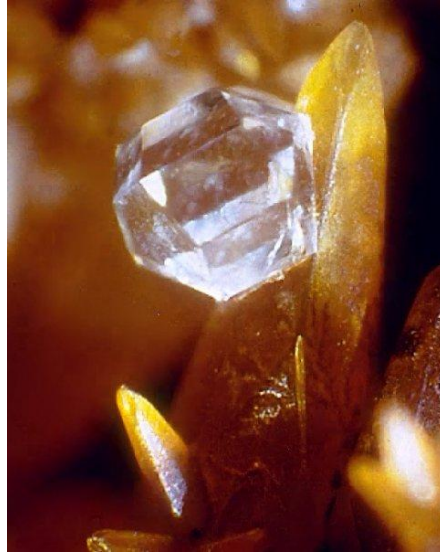
La monetita Es un fosfato cálcico ácido que *in vivo*, es decir a pH alrededor de 7, se transforma en hidroxiapatita [113].

La estructura cristalina de la monetita es de sistema Triclínico y clase pinacoidal que cristaliza en una celdilla de dimensiones  $a = 6,9 \text{ \AA}$ ;  $b = 7 \text{ \AA}$ ;  $c = 6,65 \text{ \AA}$ ;  $Z = 4 \text{ \AA}$ ;  $\alpha = 96,35^\circ$ ;  $\beta = 91,267^\circ$ . La monetita consiste de cadenas unidas por uniones Ca-O y tres tipos de uniones de hidrogeno. Hay dos pares de unidades  $\text{PO}_4$  por cada celda cristalina de monetita [143].

Su estructura química es  $\text{Ca}(\text{HPO}_4)$ . Su peso molecular es de 136,06, su densidad de es de  $2.929\text{g/cm}^3$  y su composición por peso es la siguiente: calcio (29,46 %), fósforo (22,77 %), hidrógeno (0,74 %) y oxígeno (47,04 %). Ó también CaO (41,22 %),  $\text{P}_2\text{O}_5$  (52,16 %),  $\text{H}_2\text{O}$  (6,62 %).

.La monetita ha sido utilizada con éxito en el recubrimiento de superficies de implantes dentales de titanio [113].

### 2.2.3. Fosfato tricálcico beta



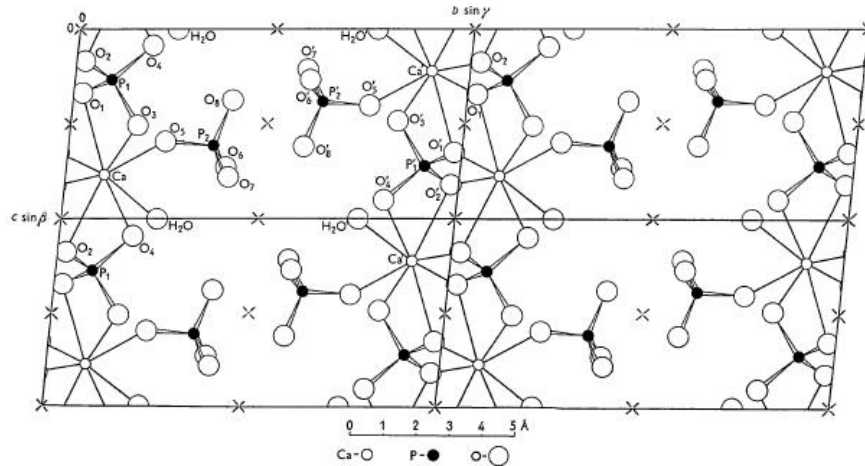
**Figura 2.2-3.** Fotografía del mineral de whitlockita o fosfato tricálcico beta. [Jeff Weissman / Photographic Guide to Mineral Species].

Es un fosfato cálcico tribásico y terciario conocido también como “bone ash” o “ceniza de hueso”. Su forma cristalizada se conoce como whitlockita y es la que observamos en la figura 2.2-3. Su estructura química es  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . El peso molecular es 310,2 D, su densidad es  $3,13\text{g/cm}^3$  y su forma de cristalización es trigonal-ditrigonal piramidal con dimensiones de celda:  $a = 10,33 \text{ \AA}$ ;  $c = 37,103 \text{ \AA}$ ;  $Z = 6$ . La composición en peso es: calcio (38,76 %); fósforo (19,97 %) y oxígeno (41.27%). También puede exponerse:  $\text{CaO}$  (54,24 %);  $\text{PO}_4$  (61,24 %);  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (63,19 %);  $\text{P}_2\text{O}_5$  (45,76 %).

Se suele presentar como un polvo blanco sin sabor, Es insoluble en agua, alcohol o ácido acético; es soluble en  $\text{HCl}$  y  $\text{HNO}_3$ . Se usa en la industria del vidrio, de los productos lácteos, en polvos dentales para pulir, en porcelanas, cerámica, en la industria alimenticia, textil, y en piensos de animales. También se utiliza como antiácido [Merck Index]. El  $\beta$ -Fosfato tricálcico tiene buena biocompatibilidad, bio-reabsorción y

osteoconducción, por ello se usa desde hace años en el ámbito quirúrgico de la regeneración ósea [3,101].

### 2.2.4 Mono fosfato cálcico:



**Figura 2.2-4.** Unidad de celda del mono fosfato cálcico.

También se puede llamar fosfato monocálcico, fosfato cálcico monobásico, bifosfato cálcico, fosfato cálcico primario o calcio superfosfato. Su estructura química es la siguiente:  $\text{CaH}_4(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; su peso molecular es de 252,09 D y su composición en peso es: Ca (15.90%), P (24.58%), O (57%), H (2%). Tiene sabor ácido fuerte, densidad de  $2,20\text{g/cm}^3$ , parcialmente soluble en agua, se descompone en  $\text{H}_3\text{PO}_4$  y en sal insoluble di- o tri-básica. Es soluble en HCl,  $\text{HNO}_3$  y en ácido acético. Se utiliza en los bicarbonatos para la fabricación del pan, en las harinas y como complemento alimenticio [91].

## **2.3. Definición del material ideal para regeneración ósea**

El material ideal para regeneración ósea a parte de ser biocompatible, osteoconductor, osteoinductor y osteogénico, debe tener buenas propiedades mecánicas, ser fácil de manejar y adaptar y tener una velocidad de reabsorción equiparable a la velocidad de crecimiento óseo.

La osteoconducción es la capacidad de una material para guiar y soportar la neoformación de hueso (por ejemplo la hidroxiapatita). La osteoinducción es la capacidad de un material para transformar células mesenquimales en células osteoformadoras (por ejemplo las proteínas morfogenéticas). Y la osteogénesis es la capacidad de crear hueso donde antes no lo había (por ejemplo Las células osteoprogenitoras). El único material que cumple todas estas cualidades es el auto injerto óseo. Por otro lado, las moléculas osteoinductores son muchas, pero tienen un importante inconveniente que es su elevado precio.

La mandíbula humana, tiene un modulo de elasticidad de  $96,2 \pm 40,6$  MPa y su componente de hueso trabecular tiene una fuerza de compresión de  $3,9 \text{ MPa} \pm 2,7$  [95]. El fémur humano, tiene un modulo de elasticidad de 15200 MPa, la fuerza compresión del hueso cortical esta en torno a 170 MPa [167]. Aunque estos valores descenden con la edad nos dan una idea de las importantes diferencias que hay entre los distintos huesos del cuerpo y los materiales de regeneración ósea deben de cubrir las necesidades específicas de cada caso.

La facilidad de manejo y adaptabilidad esta limitada en los injertos en forma de

bloque y forma granular. Lo contrario sucede con los cerámicos diseñados con CAD-CAM y los cementos óseos que se adaptan de manera excelente a los defectos que hay que tratar [13, 93].

Por ultimo la velocidad de reabsorción *in vivo* del biomaterial debe ser similar a la de la neoformación del hueso, que tiene un valor de 20  $\mu\text{m}/\text{día}$ . En la tabla 2.3.III mostramos algunos de los biomateriales empleados en regeneración ósea.

TABLA 2.3.III:

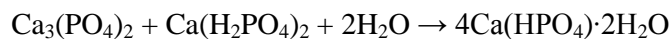
Propiedades de distintos biomateriales para regeneración ósea [124].

	Materiales inorgánicos		Materiales orgánicos	Combinaciones de materiales orgánicos e inorgánicos
Material	Fosfato cálcico-sulfato cálcico-vidrio		Polímeros y plásticos	Composites de fases orgánicas, inorgánicas y aditivos
	Cerámicas	Cementos		
Composición	Cerámicas de hidroxiapatita, coralina, bovina, sintética, cerámicas de TCP, cerámicas bifásicas, sulfato cálcico, biovidrio	HAP Brushita Sulfato cálcico	Poliéster: poliglicólico, poliláctico. Polibutirolacton, policaprolactona,; Poliamidas: polipéptidos, polianhidrido, poliorotoesteres, polifosfacenos.	Combina componentes orgánicos e inorgánicos
Forma	Cerámica porosa, granulado o en bloque	Una fase líquida y otra sólida	Plástica sólida	Distintas formas
Biodegradación	HAP: degradación muy lenta TCP: degradación rápida Sulfato cálcico: degradación muy rápida Bioglass: según la composición	HAP: degradación lenta Brushita: degradación rápida Sulfato cálcico: degradación rápida	Degradación mediante hidrólisis puede ser modificada	Depende de su composición
Productos de degradación	Calcio y fosfato	Calcio y fosfato	Moléculas orgánicas	Depende de su composición
Propiedades	Biocompatible Osteoconductor Porosidad definida No moldeable Se fija mal en defectos	Biocompatible Osteoconductor Porosidad no definida Moldeable Injectable Se fija bien en defectos	“Biocompatible” Buenas propiedades mecánicas iniciales pero empeoran con el tiempo Flexible pero no moldeable	Distintos grados de Biocompatibilidad Osteoconductividad y manejabilidad
	Radiopaco	Radiopaco	No radiopaco	Radiopaco

## **2.4. Efecto de los aditivos añadidos a la fase líquida del cemento de brushita**

### **2.4.1. Efecto de los grupos carboxi**

El cemento de brushita se forma mediante una reacción ácido base en la que la base es el fosfato tricálcico beta y el ácido puede ser ácido fosfórico o monofosfato cálcico,



En estudios recientes sobre cementos de brushita, se ha demostrado que el uso del ácido cítrico en la fase líquida de la reacción prolonga el tiempo de fraguado, y produce cementos fluidos capaces de ser inyectados a través de jeringuillas [6].

El ácido cítrico interacciona con los iones calcio del cemento a través de sus tres grupos carboxi produciendo modificaciones iónicas que estabilizan la reacción de fraguado. Por otro lado este ácido tiene un comportamiento hidrofílico que viene reforzado por el grupo OH que posee [46]. En recientes trabajos, se ha estudiado el efecto de los ácidos orgánicos sobre el fraguado de los cementos de brushita con el fin de determinar el ácido que produce la reacción más favorable [61]. Los ácidos carboxílicos estudiados han sido el ácido cítrico, málico, tartárico, láctico y acético. El cemento fraguado con una solución de cítrico 0,5 M resultó poseer óptimas propiedades mecánicas y tiempo de fraguado adecuado. Además, al fraguar los cementos de brushita con una solución de ácido cítrico de 1 M, se puede conseguir un incremento

significativo de la inyectabilidad del mismo [6].

En estudios con cementos de HAP se ha llegado a incrementar la fuerza de compresión de los cementos en más de 90 MPa con el uso de ácidos y sales de ácidos carboxi con grupos  $\alpha$ -hidroxi y más de un grupo ácido (como el ácido cítrico y el citrato sódico). Con esta tecnología se ha llegado a fabricar cementos de HAP con fuerza de compresión de 180 MPa, muy similar a la del hueso cortical [7].

Utilizando citrato sódico en la reacción de fraguado de los cementos de hidroxiapatita, se consigue una mejor inyectabilidad de los mismos debido a que las moléculas de citrato sódico aumentan la carga eléctrica de la superficie de los cristales que componen la pasta del cemento, evitando así que formen agregados cuando son inyectados [40].

Resumiendo, el ácido cítrico y el citrato sódico contribuyen a mejorar las propiedades mecánicas, los tiempos de fraguado y la inyectabilidad de los cementos de HAP y de brushita. No obstante, el ácido cítrico tiene el inconveniente, de la alta solubilidad en agua de su sal de calcio que se forma durante la reacción de fraguado y por ello no puede ser empleado en concentraciones superiores a 0,5 M ya que a partir de esta concentración la fase de citrato cálcico aumenta, debilitando considerablemente las propiedades mecánicas del cemento. El ácido glicólico es también un ácido con un grupo carboxi y otro hidroxi, y tiene una sal (glicolato cálcico) muy poco soluble (junto a la sal de calcio del ácido tartárico, son los ácidos carboxi  $\alpha$ -hidroxi con sales de menor solubilidad en agua) [8,140]. Además, el ácido glicólico es capaz de estimular la secreción de IL-6, factor importante en el remodelado óseo [114,11].

Por estas razones en este trabajo hemos decidido estudiar el efecto del ácido glicólico en la reacción de fraguado con el fin de mejorar las propiedades de los cementos de

brushita.

### 2.4.2. Efecto del gel de sílice

El gel de sílice es un material biocompatible capaz de promover el depósito de hidroxiapatita *in vivo* [104, 121]. Los iones de sílice aumentan la bioactividad de la hidroxiapatita pura, enfatizando las potenciales aplicaciones biomédicas de estas cerámicas [112]. A eso hay que añadir que muchos materiales conteniendo sílice como las cerámicas (Bioglass<sup>®</sup>, Sintered Hydroxyapatite y Glass-Ceramic A-W), se adhieren espontáneamente al hueso vivo. Estos materiales, denominados bioactivos, son usados clínicamente y comercializados como substitutos óseos en intervenciones quirúrgicas [72].

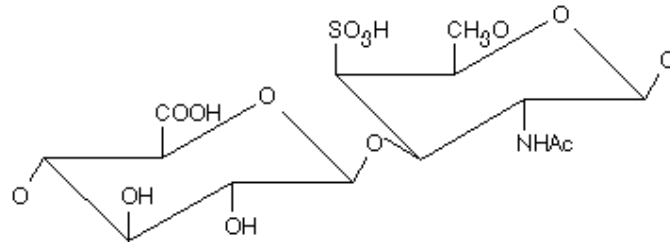
Estudios patentados, han demostrado que utilizando sales de sílice se mejora la fluidez de los cementos de fosfato cálcico así como su inyectabilidad [29]. No obstante, hasta el momento ningún estudio ha planteado la fabricación de cementos de fosfato cálcico combinándolos con geles de sílice. En este trabajo hemos decidido estudiar el efecto de añadir gel de sílice a la reacción de fraguado del cemento.

### **2.4.3. Efecto del condroitin sulfato**

El interés en el uso de macromoléculas como agentes nucleantes en materiales con una base mineral se debe a la posibilidad de poder controlar las propiedades de estos materiales a través de la nucleación y el crecimiento de la micro estructura del mineral. Proteínas, polisacáridos, glucosaminoglicános y geles han sido utilizados para modificar las propiedades mecánicas y biofuncionalidad de cementos utilizados en regeneración ósea. Por ejemplo, la gelatina ha sido usada recientemente para generar macroporos en los cementos de brushita [96, 160].

Entre estas macromoléculas tienen especial interés el grupo de los mucopolisacáridos por el papel que juegan en la conformación de los tejidos del organismo. Los mucopolisacáridos son los glucosaminoglicános más abundantes en el cuerpo humano y están formados por cadenas largas no ramificadas de polisacáridos (unidad de disacárido que se repite). Las unidades de disacáridos contienen: N-acetilgalactosamina o N-acetylglucosamina, y un ácido urónico como el glucuronato o el iduronato. Los glucosaminoglicanos son moléculas con alta densidad de carga negativa que confiere gran viscosidad y baja compresibilidad a sus soluciones, lo que las convierte en moléculas ideales para lubricar los líquidos de las articulaciones. Además estas moléculas son rígidas y mantienen la integridad de su estructura, por eso se encuentran en la superficie de las células o en la matriz extra celular facilitando pasadizos entre las células y permitiendo la migración celular. Los glucosaminoglicanos específicos con mayor importancia en la estructura de la matriz extra celular son el ácido hialurónico, el dermatan sulfato y el condroitin sulfato.

El **ácido hialurónico** o hialurano es un polisacárido aniónico compuesto de unidades repetidas del disacárido beta-1-4-glucuronato y beta-1-3-N-acetilglucosamina que tiene un importante papel en la estructura de los cartílagos,

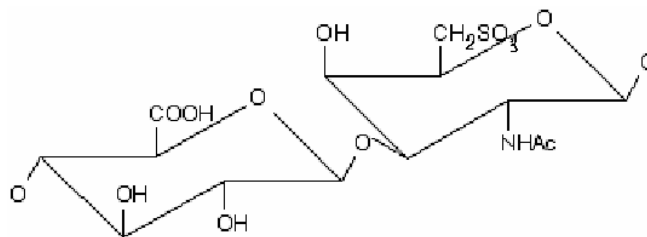


beta-1-4-glucuronato

beta-1-3-N-acetilglucosamina

El **condroitin sulfato** deriva del polímero compuesto de las unidades de disacáridos: D-glucurónico-beta con 2-acetomido-2-deoxi-galactosa. Puede ser sulfatado en las posiciones 4 ó 6 de la 2-acetomido-2-deoxi-galactosa. Por ello existen varios tipos de condroitin sulfato, a continuación explicamos los más relevantes:

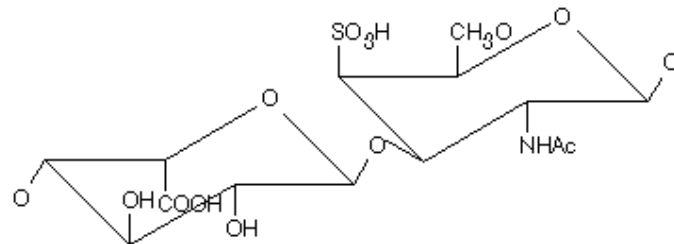
**Condroitin sulfato A** es el nombre alternativo para el **condroitin 6-sulfato (C6S)**, es decir, el condroitin sulfato que esta sulfatado en la posición C6 de la 2-acetamido-2-deoxi-galactosa:



D-glucurónico

2-acetamido-2-deoxi-galactosa

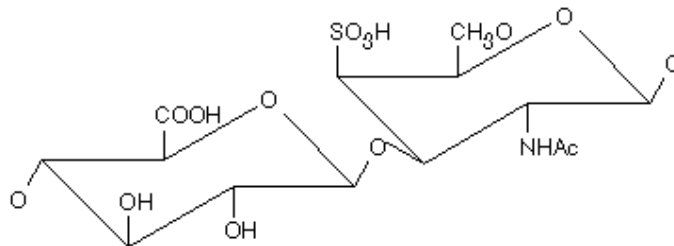
El **condroitin sulfato B** es el nombre alternativo del **dermatan sulfato**. Está sulfatado en la posición C4 del 2-acetamido-2-deoxi-galactosa, pero el C5 del ácido urónico ha sufrido una epimerización a ácido idurónico:



D-glucurónico

2-acetamido-2-deoxi-galactosa

**Condroitin sulfato C** es el nombre alternativo del **condroitin 4-sulfato** que esta sulfatado en la posición C4 del 2-acetamido-2-deoxi-galactosa [62,159].



D-glucurónico

2-acetamido-2-deoxi-galactosa

Los beneficios de emplear el condroitin sulfato en la reparación ósea son bien conocidos desde la década de los 60 [58, 98].

La capacidad regenerativa de las dos variantes principales de condroitin sulfato, C4S y C6S, en las mandíbulas de ratas y primates fue demostrada en múltiples estudios [4, 130]. La combinación del condroitin sulfato con otros biomateriales ha sido empleada para la liberación controlada de moléculas terapéuticas como factores de crecimiento y proteínas morfogenéticas [169]. Recientemente, esponjas de quitosano con C4S han

sido empleadas para la liberación del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF-BB) mejorando la proliferación osteoblastica y aumentando la emigración de los osteoblastos [107]. Mas recientemente, se ha utilizado una combinación de ácido poli(láctico-co-glicólico) con CS como sistema de liberación controlada para proteínas morfogenéticas (BMP2), obteniéndose buena biocompatibilidad y una estimulación osteogénica óptimas [69].

Hoy en día, hay productos que contienen CS comercializados como materiales de regeneración y sustitución ósea. Un ejemplo es el Biostite® que esta compuesto de colágeno, CS y HAP con una capacidad regenerativa equivalente a la de materiales de origen animal como los xenoinjertos de hidroxiapatita bovina (Bio-oss®) [123]. El Biostite® es tolerado satisfactoriamente por el organismo y acelera la actividad osteoblástica así como la producción de matriz extracelular sobre la cual se deposita la HAP ósea [128]. Mas aún, el Biostite® tiene la capacidad de inducir osteogénesis endocondrial lo cual señala al comportamiento osteoinductivo de este material [116].

Se sabe que el CS tiene la capacidad de adsorberse a las superficies de fosfato cálcico como la HAP de coral en un porcentaje de 3,6%. Esta interacción no esta influenciada ni por la masa molecular del polisacárido ni por la posición del grupo sulfato, teniendo una adsorción similar ambos isómeros, el C6S y el C4S [152, 153]. La adsorción depende fundamentalmente de la densidad de carga eléctrica, siendo el grupo sulfato más importante en este fenómeno que los grupos carboxi, sensibles al pH. A pH 7 estos glucosaminoglicanos tienen carga eléctrica negativa que se debe a los grupos sulfato y carboxi [152]. No obstante, el pKa del C4S es de 3,97, lo cual indica que a pH fisiológico solo la mitad de los grupos carboxi estarán disociados y por ello serán los grupos sulfato los responsables de la interacción del CS con la HAP [153]. Además, la

adsorción a la HAP aumenta a niveles de pH más bajos debido a que entonces el C4S forma estructuras mas compactas que interactúan mejor con los iones libres de calcio de la superficie de la HAP [117].

El condroitin sulfato tiene efectos interesantes sobre otros materiales útiles para la regeneración ósea, como los geles de colágeno. De hecho se ha observado que el C4S distorsiona al gel de colágeno tipo I debido al gran tamaño de su molécula, que distorsiona la estructura del gel y disminuye la viscosidad del mismo. Como resultado, se obtiene una mayor difusión y movilidad de las moléculas en el gel, acelerando así la súper saturación, que conlleva una nucleación de minerales homogénea y heterogénea en la solución y en las fibras de colágeno respectivamente [39]. Este efecto podría influir en las propiedades mecánicas del mineral resultante, ya que es bien conocido que diferentes poblaciones de cristales proporcionan diferentes propiedades mecánicas para el material [44].

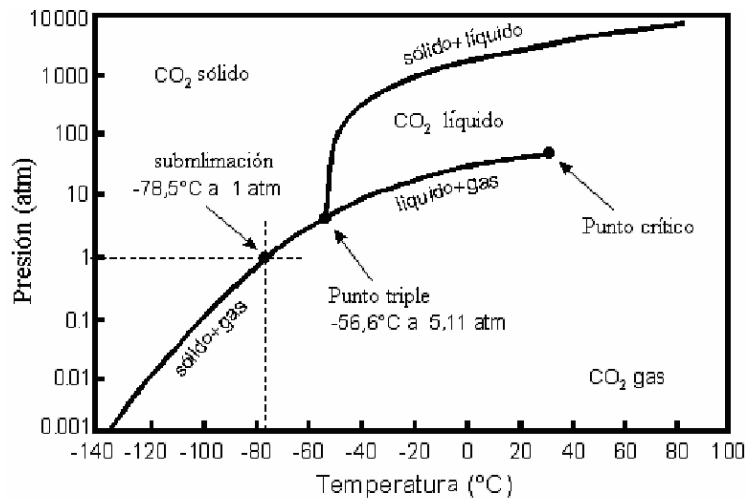
A las propiedades ya mencionadas del C4S se añade también el efecto directo que tiene sobre la cristalización de diversas especies de fosfatos cálcicos. Por ejemplo, el C4S puede inhibir el crecimiento y la agregación del oxalato cálcico monohidrato [106], y también retarda el crecimiento de núcleos de HAP *in vitro*. Se cree que el gran tamaño hidrodinámico y la alta densidad de carga de estas macromoléculas están asociados a su capacidad de inhibir la formación y el crecimiento de la HAP [21]. Este fenómeno es de especial interés a la hora de producir cementos de fosfato cálcico con tiempos de fraguado aceptables y tamaño de cristal reducido. Recientes estudios *in vivo* han demostrado que al añadir CS a un cemento de fosfato cálcico de HAP se mejora la biocompatibilidad y osteoconductividad cuando se emplea en la zona periapical y en los tejidos subcutáneos [161, 162].

En el mercado ya existen productos que combinan glucosaminoglicanos con cementos óseos de fosfato cálcico. Por ejemplo, el cemento de brushita ChronOss™ de la compañía suiza Synthes-Norian contiene un 0,5 % de ácido hialurónico en su componente líquido, y el cemento de HAP Biopex® de la marca japonesa “Mitsubishi Materials” tiene un 5 % de condroitin sulfato en su componente líquido [13]. Hasta el momento no se ha desarrollado ningún cemento de brushita que contenga condroitin sulfato en su composición, por lo que hemos considerado realizar una evaluación del efecto del C4S sobre los cementos de brushita.

## **2.5. Tratamiento del cemento con fluidos supercríticos**

La materia puede encontrarse en distintos estados siendo los más comunes el líquido, el sólido, el gaseoso y el gel. El estado en el que se encuentra una sustancia depende de su composición, la presión y la temperatura. Al aumentar la presión, los gases tienden a pasar al estado líquido, y los líquidos al estado sólido. Por otro lado, al subir la temperatura, los sólidos tienden a hacerse líquidos y los líquidos pasan a gases. Algunos compuestos y elementos pueden tener un estado adicional llamado estado supercrítico que reúne las propiedades de los líquidos y de los gases. Ocurre cuando un gas se encuentra a una presión tan alta que debería convertirse en líquido, pero le resulta imposible por la alta temperatura a la que se encuentra. En el diagrama de fases, la presión y temperatura mínima a la cual una sustancia pasa al estado supercrítico se denomina punto crítico.

El CO<sub>2</sub> pasa al estado supercrítico cuando esta a una temperatura superior a los 31,1 °C y por encima de 73,8 bar de presión (ver figura 2.7-1). En el estado supercrítico el CO<sub>2</sub> tiene propiedades únicas que pueden ser utilizadas en aplicaciones como extracción de moléculas, síntesis de aerogeles, tratamientos antisépticos y esterilización de materiales.



**Figura 2.7-1** diagrama de fases del dióxido de carbono.

Hoy en día los cuatro métodos más comúnmente utilizados en la esterilización de materiales biomédicos son la exposición a óxido de etileno (EtO), la radiación gamma, la autoclave y el calor seco. El primero de los métodos mencionados consigue la esterilización mediante la introducción del biomaterial en una atmósfera de óxido de etileno al 100 %. La esterilización con radiación gamma es realizada mediante la exposición del biomaterial a una radiación mínima de 21,5 KGy. Por otro lado, la esterilización con autoclave se consigue al introducir el material en una atmósfera de humedad al 100 % con una temperatura mínima de 121 °C. Finalmente, la esterilización con calor seco se logra al calentar el material a altas temperaturas durante largos periodos de tiempo (160-170 °C durante 4-2 horas respectivamente).

Cada uno de los métodos mencionados tiene sus ventajas y limitaciones a la hora de esterilizar biomateriales. Por ejemplo, la autoclave es un método bastante económico y eficaz de esterilización, pero no se puede emplear con materiales sensibles a la humedad o a temperaturas superiores a 121 grados, de la misma manera que el calor seco

tampoco se puede utilizar con materiales termosensibles. El óxido de etileno puede dañar la composición de algunos biomateriales, y es un gas tóxico que a veces tarda mucho tiempo en eliminarse del biomaterial una vez finalizado el proceso de esterilización. Por el momento, los rayos gamma son la solución ideal para esterilizar un gran espectro de biomateriales que no podrían ser tratados con los otros tres métodos. No obstante, la esterilización con rayos gamma es una técnica costosa que requiere unas infraestructuras especiales de protección para la radiación.

Los fluidos supercríticos de dióxido de carbono constituyen una alternativa ya que han demostrado conseguir una inactivación completa de un amplio rango de organismos bacterianos a bajas temperaturas y en ausencia de disolventes orgánicos o radiación. Esta técnica ha sido utilizada para esterilizar materiales termolábiles e hidrolábiles como los polímeros biodegradables de ácido poli (láctico-co-glicólico) y ácido poliláctico sin causar daño alguno a las propiedades fisicoquímicas de estos biomateriales [30].

Los tratamientos con altas presiones para fines bactericidas se conocen desde los años setenta aunque su uso no fue muy generalizado debido a que las presiones, necesarias para obtener una eliminación eficaz de microorganismos, eran demasiado altas como para ser practicadas a niveles industriales. El tratamiento con fluidos supercríticos de dióxido de carbono (SC-CO<sub>2</sub>) podría convertirse en una alternativa relevante a los costosos tratamientos de altas presiones para la inactivación microbiana y esterilización en el campo biomédico. La presión hidrostática necesaria para conseguir la inactivación microbiológica está entre 2000 y 7000 bar. Empleando condiciones de SC-CO<sub>2</sub> con presiones entre 250 y 300 bar y temperaturas entre 35-75 °C se ha conseguido reducir bacterias y esporas como *Lactobacillus brevis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. megaterium*, *B. polymyxa*, y *B. coagulans*. La reducción del número de

bacterias vivas obtenida por ciclo es de  $10^{-6}$  con respecto al numero inicial, lo cual se define se como esterilización [134, 64, 65]. En estudios mas recientes, se consiguieron reducciones de 7 ordenes de magnitud para bacterias Gram Negativo, Gram Positivo y esporas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* y *B. subtilis* [135].

Los tratamientos con SC-CO<sub>2</sub> tienen un efecto letal también sobre células de hongos como *Kluyveromyces fragilis*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis*, y sobre algunos virus como inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1), Sindbis, polio Sabin tipo I, y virus de la pseudorabia (PRV) [63, 34].

Además, los tratamientos con SC-CO<sub>2</sub> se pueden utilizar para eliminar las grasas en xenoinjertos y aloinjertos óseos, dejando la microporosidad del hueso más accesible y aumentando la osteoconducción [33]. También se pueden utilizar los fluidos de SC-CO<sub>2</sub> para eliminar contaminantes de biomateriales poliméricos como por ejemplo las prótesis de ligamento cruzado anterior de poliéster [35].

Los nuevos biomateriales para las terapias relacionadas con los tejidos óseos consisten de polímeros, proteínas y otras moléculas orgánicas e inorgánicas que mejoran sus propiedades biológicas físicas y químicas. El uso de estos nuevos materiales limita en muchas ocasiones los métodos de esterilización con los que se pueden tratar previo a su aplicación *in vivo*. La esterilización por temperatura puede utilizarse con sólidos como la apatita y el poliláctico, pero no se puede emplear con otras sustancias, como las soluciones, por que las degrada. Además muchos biomateriales son termosensibles y por ello la esterilización térmica húmeda o seca puede destruirlos o alterar sus propiedades biológicas [30].

Por este motivo, hoy en día muchos biomateriales como poliésteres, los factores de crecimiento, y proteínas morfogenéticas, solo pueden ser esterilizados con la

exposición a radiación gamma 25 (kGy) o al oxido de etileno sin alterar la estructura y las propiedades mecánicas [38, 108].

No obstante estas técnicas tiene también sus problemas, por ejemplo, se ha demostrado que los implantes óseos de copolímeros PLGA con HAP necesitan al menos 14 días de degasificación después de haber sido esterilizados con EtO [168]. De hecho muchos materiales pueden tener efectos tóxicos significativos después de haber sido tratados con EtO por los problemas que tiene esta sustancia para ser eliminada [50].

Los rayos gamma por otro lado, son la opción a elegir para esterilizar una amplia variedad de biomateriales. La ordenanza 11137 de organización de estándares internacionales ISO especifica que la radiación gamma necesaria para asegurar el nivel de esterilización requerido para materiales quirúrgicos es de 21,5 kGy.

Esta radiación no tiene efectos negativos sobre la composición o tiempo de fraguado de los cementos óseos poliméricos [120], pero si que reduce el peso molecular de las cadenas poliméricas y empeora su resistencia a la fatiga así como la fuerza de tensión [45, 52, 80]. De hecho todavía no esta claro si es mejor utilizar EtO para esterilizar los cementos óseos poliméricos [81]. Además, la radiación gamma altera la viscosidad de biomateriales como el quitosano, provoca la hidrólisis del ácido poliláctico y necesita unos equipos y unas medidas de seguridad costosas.

La esterilización por ultrafiltración se emplea con los monómeros líquidos de los cementos de acrilato, porque estos no toleran la irradiación, pero los materiales con alta viscosidad como las soluciones de quitosano no pueden ser tratados con esta técnica. Sin lugar a duda, muchos biomateriales son sensibles y deben de ser esterilizados con métodos especiales [164].

Hay poca información en la literatura sobre las posibles técnicas de esterilización para los cementos de fosfato cálcico. El calor seco, el EtO y la autoclave son métodos inapropiados para tratar los cementos de hidroxiapatita ya que la autoclave provoca una agregación prematura de los gránulos del cemento. El calor seco y el EtO prolongan el tiempo de fraguado y reducen dramáticamente la fuerza de tensión diametral. A pesar de producir prolongaciones en el tiempo de fraguado y disminuciones en la fuerza de tensión diametral a medida que se aumenta la dosis, la radiación gamma es la única técnica aceptable hasta el momento para esterilizar los cementos de hidroxiapatita ya que es la única que no produce cambios en su estructura y composición [139].

La esterilización de biomateriales, y en concreto los destinados a la regeneración ósea y tisular, como los cementos de fosfato cálcico, es hoy por hoy un reto, ya que estos materiales son termosensibles e hidrosensibles. La única opción real de esterilización para muchos biomateriales por el momento es la radiación gamma, con sus consecuentes problemas técnicos y de costo, así como posibles efectos adversos que puede tener sobre las propiedades mecánicas y biológicas de los injertos óseos. Por estos motivos, hemos decidido evaluar la posibilidad de emplear los fluidos SC-CO<sub>2</sub> como tratamiento alternativo para la desinfección y esterilización de cementos dentales y óseos.

## 2.6 Regeneración ósea con granulado de cemento de brushita

El hueso es el único tejido del organismo capaz de regenerarse completamente después de un trauma “*restitution ad integrum*” [89]. No obstante, esta capacidad es limitada, como se observa después de una extracción dental. Por ejemplo, después de la extracción se pierden 2mm de hueso durante los primeros 2 meses, y posteriormente se sigue reabsorbiendo el hueso a un ritmo de 2 mm por año, lo cual provoca dificultades a la hora de aplicar algunos tratamientos dentales [19].

El gran desarrollo de la cirugía dental e implantológica en los últimos años ha sido posible gracias a la investigación en técnicas quirúrgicas y en biomateriales. No obstante, la falta de hueso sigue siendo un problema que los implantólogos tienen todavía que afrontar, y se dedican muchos esfuerzos para encontrar una forma de prevenir o de tratar la atrofia de la cresta alveolar [32].

Para obtener la regeneración ósea necesaria, se han probado diversos materiales osteoconductores que aportan una matriz apropiada para guiar la nueva formación de hueso. Estos materiales pueden ser de origen biológico (autoinjertos óseos, gel de fibrina, hueso desmineralizado liofilizado, quitosano, hidroxiapatita bovina, colágeno... etc.) o sintéticos (ácido poli (láctico-co-glicólico), fosfato tricálcico, sulfato cálcico, hidroxiapatita sintética...etc.) [19, 138, 142, 154, 137, 144, 166, 149, 76]. Los materiales sintéticos están ganando creciente interés porque son más baratos y no presentan los problemas indeseados de infecciones y reacciones inmunitarias

relacionados al uso de materiales de origen humano o animal. Recientemente, los fosfatos cálcicos han empezado a utilizarse en las clínicas demostrando en estudios *in vivo* su aptitud como injertos óseos en cirugía dental con un futuro prometedor [142, 154, 137, 144, 166, 149, 76, 13].

La composición química de los materiales de fosfato cálcico es apropiada para preparar matrices y estructuras porosas que pueden favorecer la proliferación de células y vasos sanguíneos durante los procedimientos de regeneración ósea [144]. Para conseguir un aumento de la cantidad de hueso y también de su calidad, es necesaria una velocidad de reabsorción aceptable que permita el crecimiento del hueso a medida que se va eliminando el material. La mayoría de los fosfatos cálcicos, como HAP, tiene una velocidad de reabsorción muy lenta que dificulta la formación de hueso nuevo durante muchos meses después de su implantación. No obstante, existen algunos fosfatos cálcicos como el  $\beta$ -TCP y el DCPD que tiene una capacidad de reabsorción aceptable. Estudios recientes *in vivo* han demostrado que el  $\beta$ -TCP es capaz de promover el depósito de calcio, aumenta la actividad de la fosfatasa alcalina, se reabsorbe y tiene mejor compatibilidad que el  $\alpha$ -TCP [76, 92, 94, 101, 144, 166].

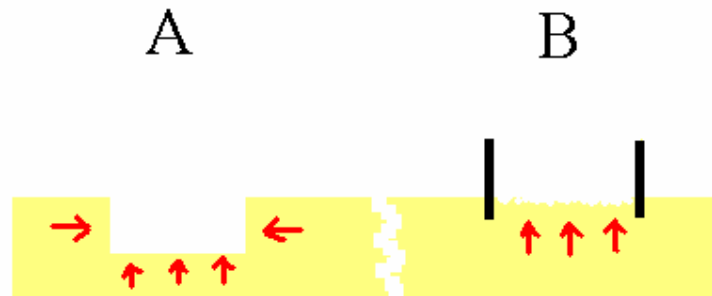
La importancia de los cementos basados en brushita viene de su capacidad de descomponerse en ambientes fisiológicos y ser reabsorbidos por el organismo [142]. La brushita se disuelve al menos 3 veces más rápido que la HAP o el  $\beta$ -TCP [22]. No obstante la eliminación de la brushita de la zona implantada es compleja y depende de procesos fisiológicos aparte de una simple disolución [47]. Según estudios *in vivo* parte de la brushita es convertida en HAP después de 2 semanas de su implantación, y a las 8 semanas, la actividad de remodelado mediada por células osteoclásticas es predominante [25]. Esta conversión en HAP no es deseada porque desacelera la velocidad de reabsorción, y ocurre a través de una reacción química que libera protones

y puede acidificar severamente el pH local comprometiendo la biocompatibilidad del material. Se han dedicado muchos estudios a impedir esta conversión en HAP y apantallar la reducción del pH, añadiendo sales de magnesio o aumentando la fracción de  $\beta$ -TCP en el cemento. Hasta ahora, el potencial regenerativo de los cementos de fosfato cálcico ha sido estudiado aplicándolos en forma de pasta de fraguado, pero recientemente, su uso en forma de gránulos o bloques fabricados a partir del cemento ya fraguado esta ganando interés debido a 2 ventajas principales: primero, la preparación del cemento ya fraguado se realiza a bajas temperaturas lo cual permite añadir agentes activos durante la reacción de fraguado. Segundo, la mayor fracción superficie/volumen de los gránulos del cemento fraguado es mas apropiada para un liberación controlada de medicamentos [13]. Además, se sabe que la transformación de brushita en HAP depende del pH local entre otros factores [15]. Al añadir el cemento al hueso en forma de gránulos en vez de pasta, se puede ayudar a controlar mejor el cambio del pH local y la transformación de DCPD en HAP [141].

Los estudios *in vivo* aportan los datos necesarios para poder empezar los análisis clínicos. Los cementos de fosfato cálcico han sido ensayados en diversos modelos animales [47, 25]. Existen dos modelos *in vivo* para examinar la capacidad de los biomateriales como injertos óseos: i) el modelo del defecto de tamaño crítico y ii) el modelo de la cámara ósea de titanio. En ambos casos, el defecto creado tiene que ser lo suficientemente grande como para retar al hueso adyacente con un espacio que difícilmente podría rellenar de manera espontánea [51, 132]. La mayor parte de las investigaciones de osteoconducción de biomateriales *in vivo* han sido realizadas utilizando el modelo del defecto de tamaño crítico. De esta manera el hueso neoformado es evaluado a medida que progresa desde las paredes y suelo del defecto hacia el material (ver Figura 2.8-1a). Sin embargo, en cirugía dental, el hueso neoformado tiene

que crecer en una dirección vertical emergiendo de la superficie del hueso alveolar [129]. El modelo de la cámara de titanio es más apropiado para cuantificar la regeneración vertical del hueso. En éste se introducen unas barreras en el defecto óseo que impiden la formación lateral del hueso y permiten su crecimiento solo de una manera vertical al suelo del defecto y hacia el cuerpo del biomaterial como se ve ilustrado en la Figura 2.8-1b [66, 68, 85, 86,].

Con la intención de desarrollar un material que combinara características de reabsorción y osteoconducción, hemos diseñado y sintetizado un nuevo tipo de cemento de DCPD/ $\beta$ -TCP que fragua utilizando una solución de ácido glicólico (DCPD/  $\beta$ -TCP/GA) y muestra propiedades fisicoquímicas y mecánicas interesantes. El ácido glicólico es empleado en la reacción de fraguado del cemento por su capacidad para estimular la secreción de la interleukina 6 que es un factor importante en el remodelado óseo y puede beneficiar las propiedades biológicas del cemento aumentando su velocidad de reabsorción. [114]. Con este cemento se fabricó un granulado que luego injertamos en unas cámaras de titanio adaptadas a la calota de un grupo de conejos y se evaluó a la capacidad regenerativa de hueso de este nuevo biomaterial.



**Figura 2.8-1.** Representación esquemática de las dos posibles formas de evaluar la regeneración ósea *in vivo*: a) regeneración ósea con una dirección indefinida, y b) regeneración ósea vertical. El tejido óseo es representado como el fondo amarillo, las direcciones del crecimiento con las flechas rojas y los obstáculos utilizados para limitar el crecimiento del hueso se representan como las líneas negras de trazo grueso.

### **3. Hipótesis y Objetivos:**

### 3.1. Hipótesis de trabajo

La combinación de los cementos de brushita con ácidos orgánicos y macromoléculas como el condroitin 4 sulfato o el gel de sílice, permitirá obtener materiales osteoconductores con mejores propiedades físico-químicas, que preparados en forma granulada producirán una buena regeneración ósea *in vivo*.

El tratamiento con fluidos supercríticos de CO<sub>2</sub> podría ser considerado como una nueva alternativa para la esterilización de los cementos óseos.

### 3.2. Objetivos de la Tesis:

- 1) Analizar el efecto de los ácidos carboxi en el fraguado de los cementos de brushita, y en particular el ácido glicólico mediante la síntesis de cementos de brushita fraguados con ácido glicólico acético y cítrico. Los cementos obtenidos serán analizados y comparados mediante las técnicas de SEM, difracción de rayos X, fuerza de tensión diametral, tiempo final de fraguado y DSC.

- 2) Estudiar la influencia del uso de gel de sílice en la reacción de fraguado del cemento de brushita y en sus propiedades físico-químicas, determinando la variación de las propiedades mecánicas, el tiempo de fraguado y la microestructura de los cementos resultantes.
- 3) Valorar el efecto del condroitin sulfato (C4S) sobre los cementos de brushita evaluando su efecto sobre el tiempo de fraguado, las propiedades mecánicas y la microestructura de los cementos resultantes.
- 4) Evaluar la posibilidad de emplear fluidos supercríticos de CO<sub>2</sub> para la esterilización de cementos de brushita y metacrilato de metilo (Palacos®) analizando las propiedades físico químicas de estos cementos antes y después de su tratamiento con fluidos supercríticos.
- 5) Investigar la posible aplicación en regeneración ósea de los granulados fraguados de cemento de brushita (DCPD/  $\beta$ -TCP/GA) mediante un modelo experimental animal de cámara de osteoconducción en conejos, y evaluar el efecto *in vivo* del nuevo biomaterial con las técnicas de densitometría de rayos X, histología óptica e histomorfometría.

## 4. Materiales y Métodos

---

## 4.1. Materiales

Los siguientes reactivos fueron utilizados para producir el polvo del cemento:

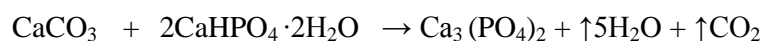
Carbonato cálcico, di hidrogeno fosfato cálcico dihidrato, fosfato monocálcico y pirofosfato sódico. Los reactivos se compraron a Sigma–Aldrich. Para preparar las soluciones ácidas que reaccionan con el polvo del cemento se utilizó: ácido glicólico (Sigma–Aldrich), ácido acético (Merk), ácido cítrico (Panreac). Para producir las soluciones y geles de sílice se utilizó ácido fosfórico, Aerosil e hidróxido de sodio de Panreac y el condroitin sulfato se obtuvo de Sigma-Aldrich. Todos los reactivos fueron adquiridos con la mayor pureza.

El cemento se fabricó preparando una fase líquida y una fase sólida que se mezclaron posteriormente.

### 4.1.1. Preparación de la fase sólida del cemento

#### 4.1.1.1. Síntesis de fosfato tricálcico beta

Para fabricar el fosfato tricálcico beta, se homogenizó con un mortero una mezcla estequiométrica de carbonato cálcico e hidrofosfato cálcico dihidratado y se calentó a 900°C durante 14 horas en un horno (Heraeus; Hanau kr-170)[110]. La reacción química de formación del fosfato tricálcico beta viene dada por la ecuación:



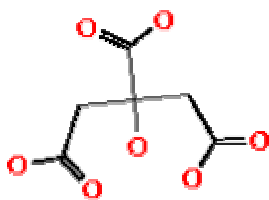
La composición del producto obtenido se analizó con difracción de rayos X comprobándose que se había sintetizado fosfato tricálcico beta puro.

#### 4.1.1.2. Síntesis del polvo de cemento

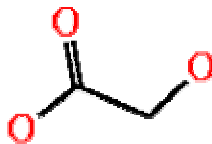
Para obtener el polvo del cemento, se mezclaron con un mortero 1,428 g de fosfato tricálcico con 0.8 g de fosfato monocálcico y 0,012 g de pirofosfato sódico. El polvo de cemento obtenido se almacenó en una secadora hermética con gel sílice para mantenerlo en un ambiente seco ya que el cemento se degrada con la humedad.

#### 4.1.2. Preparación de la fase líquida del cemento

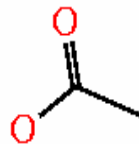
##### 4.1.2.1. Soluciones de ácidos carboxi



**Ácido Cítrico**



**Ácido Glicólico**



**Ácido Acético**

Se prepararon soluciones de ácido acético, glicólico y cítrico a concentraciones de 0,5 M; 1,0 M; 1,5 M; 2,0 M; 2,5 M; 3,0 M y 3,5 M. El análisis de pH de las soluciones se realizó mediante un pH-metro Mettler Toledo (MP230), y también se calculó matemáticamente a través del pKa específico de cada ácido. Las lecturas del pH-metro fueron contrastadas con el pH teórico correspondiente a la molaridad de cada solución

ácida. El pH teórico fue calculado a partir del pKa si HA es un ácido débil, A<sup>-</sup> es su catión y la formula de ionización del ácido se escribe:



La constante de acidez (Ka) se define:

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]}$$

El pKa es una constante característica de cada ácido, y valor para los ácidos empleados en nuestros experimentos se da en la tabla 4.1.I.

Tabla 4.1-I. PKa de los ácidos carboxi investigados

	Ácido Acético	Ácido Glicólico	Ácido Cítrico	Ácido Fosfórico
pKa1	4.75	3.83	3.15	2.12
pKa2	-	-	4.77	7.21
pKa3	-	-	5.19	12.7

Cabe destacar que en el caso de los ácidos cítrico y fosfórico solo empleamos su primer pKa y descartamos el efecto de los otros 2 por ser muy pequeño. El valor de la Ka viene dado por la ecuación:

$$K_a = -\log^{-1} \text{pKa}$$

Una vez obtenido el valor del Ka de cada ácido se procedió a calcular la concentración de H<sup>+</sup> en cada solución:

$$[\text{H}^+] = \frac{K_a[\text{HA}]}{[\text{A}^-]}$$

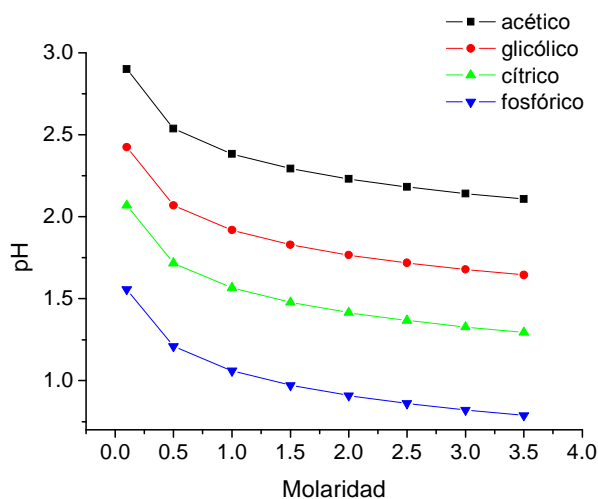
En los ácidos débiles  $[HA]$  = la molaridad del ácido y  $[HA] = 1 - [H^+]$  como  $[H^+] = [A^-]$  resulta:

$$K_a = \frac{[H^+][H^+]}{1 - [H^+]} = \frac{[H^+]^2}{1 - [H^+]}$$

Una vez obtenido el valor  $[H^+]$ , se obtiene el pH mediante la ecuación que lo define:

$$pH = -\log [H^+]$$

De este modo se puede calcular el pH de cada solución ácida en relación a su molaridad como se muestra en la figura (4.1-1):



**Figura 4.1.-1** Relación entre la concentración molar y el pH de una solución de ácido orgánico.

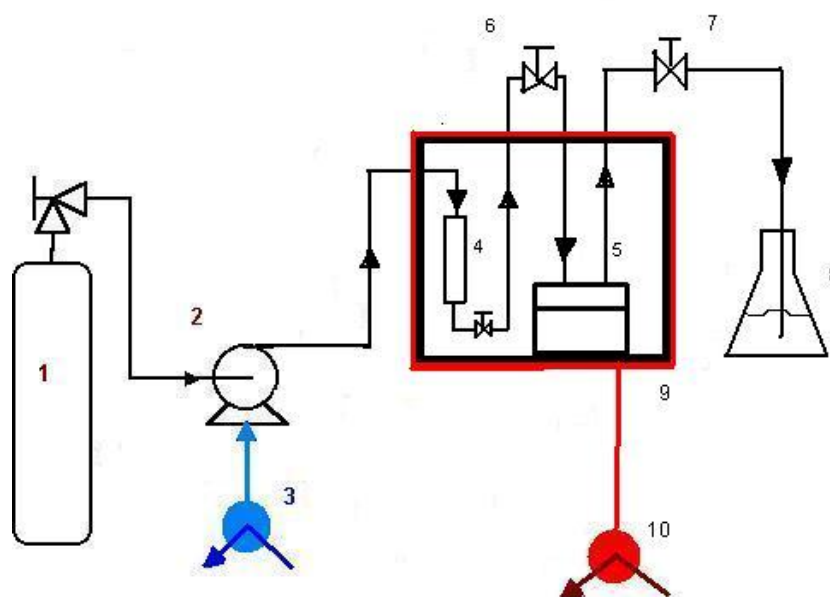
#### 4.1.2.2. Síntesis de geles y soluciones de sílice y C4S

El gel de sílice se preparo fundiendo una cantidad determinada de Aerosil con NaOH 2,0 M obteniendo concentraciones de SiO<sub>2</sub>: 8, 10, 15, 20 y 25 g/L. El líquido se calentó 2 horas a 60 °C para conseguir una completa disolución a pH 12. Posteriormente el pH de la solución de sílice se rebajo usando soluciones concentradas de ácido fosfórico 80 % ó ácido cítrico (sólido) hasta llegar a pH 6,0; 5,5; 4,0; 3,0; 2,5 y 2,0. Las soluciones concentradas de sílice polimerizan bien entre pH 7 y pH 4 produciendo geles, mientras que a un pH inferior o a concentraciones de sílice menores se obtienen soluciones de iones de silicato que no gelifican. Para obtener el gel de sílice con concentración de sílice de 15 g/L y pH 4,1 en 0,5 M de ácido cítrico, se añadió el peso de ácido cítrico necesario para obtener una concentración de la solución de 0,5 M, luego se procedió a rebajar el pH hasta alcanzar el valor de 4,1 añadiendo pequeñas cantidades de ácido fosfórico al 80 %, de modo que el volumen y concentración final del gel no se vieran afectados. La incorporación del condroitin sulfato a la solución se realizó a distintas concentraciones para evaluar su efecto sobre la reacción de fraguado del cemento. También se hicieron soluciones de C4S sin gel de sílice. En ambos casos la concentración de C4S empleada estaba entre 0 % y 10 % peso/peso.

#### **4.1.3. Tratamiento de los cementos con fluidos supercríticos de CO<sub>2</sub>**

La validez de la técnica de fluidos supercríticos se evaluó investigando el efecto de esterilización de estos fluidos sobre la estabilidad de dos cementos óseos bajo condiciones estáticas de SC-CO<sub>2</sub> la brushita el polimetacrilato de metilo. Se precintaron muestras de 1,5 g. de los dos cementos así como de los componentes separados de los cementos de brushita en bolsas para esterilización permeables al SC-CO<sub>2</sub>. Se introdujeron las bolsas en una célula de saturación de acero inoxidable preparada para

soportar las altas presiones de los fluidos supercríticos (con un volumen interno de 157 ml). La célula fue introducida en una cámara termo-estática donde alcanzó la temperatura de 75 °C en 2 horas. La célula fue conectada a una bomba de presión constante que impone una presión interna de CO<sub>2</sub> de 20 MPa generando el estado supercrítico del CO<sub>2</sub> en el interior de la cámara. Las muestras fueron mantenidas a 75 °C y 20 MPa de CO<sub>2</sub> supercrítico durante 2 horas que son las condiciones en las que se ha registrado la mayor destrucción de esporas y bacterias en la bibliografía [134,135]. En la figura (4.1-2) vemos el diagrama de el dispositivo para generar la atmósfera de CO<sub>2</sub> supercrítico.



**Figura 4.1.-2.** Esquema del aparato de SC-CO<sub>2</sub> (1) reservorio de CO<sub>2</sub>, (2) bomba, (3) baño para enfriar, (4) pulmón de presión, (5) célula de saturación, (6) válvula de entrada, (7) válvula de salida, (8) salida de gas, (9) cámara termo-estática, (10) termostato.

#### 4.1.4. Preparación de los cementos de brushita

Se pesan 500 mg del polvo de cemento en una placa petri de 10cm de diámetro

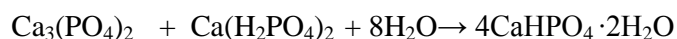
(Soria greiner s.a.) y se vierte la solución o fase líquida sobre el centro del cúmulo de polvo de cemento mediante una micropipeta (Transferpette®). Se espera a que el líquido sea absorbido por el polvo, y se mezcla la muestra con una espátula durante 30 segundos hasta conseguir una pasta homogénea. Los cementos se prepararon utilizando 3 proporciones diferentes de polvo líquido (P/L):

500 g/0,195 ml (2.56 g/ml)

500 g/0,290 ml (1.72 g/ml)

500 g/0,390 ml (1.28 g/ml)

La reacción de fraguado del cemento es la siguiente:



Se fabricaron pastillas introduciendo la pasta del cemento en cilindros de plástico con diámetro interior de 8 mm evitando la formación de burbujas para conseguir una distribución homogénea del material. Posteriormente el cemento fue retirado después de haber fraguado obteniéndose pastillas con 8 mm de diámetro y 4 mm de espesor. Las pastillas se dejaron 48 h a temperatura y humedad ambiente antes de ser utilizadas para medir la fuerza de tensión diametral en seco. Por otro lado, la fuerza de tensión diametral en condiciones de humedad, (más representativa clínicamente) fue analizada después de dejar las pastillas del cemento 24 horas a 37 °C sumergidas en agua destilada. Para los análisis de difracción de rayos-X y DSC las muestras de cemento preparado fueron pulverizadas con un mortero. En el análisis de microscopia electrónica de barrido se examinaron las superficies de fractura de las distintas muestras. Las medidas de tiempo de fraguado se realizaron introduciendo la pasta recién hecha en un cilindro de plástico de 1.5 cm de diámetro

y 1 cm de longitud. Los cilindros que se emplearon para preparar las pastillas de cemento fueron siempre de plástico, ya que cuando se intento usar elementos de cristal o metal, el cemento se adhería a la pared y resultaba difícil de retirar.

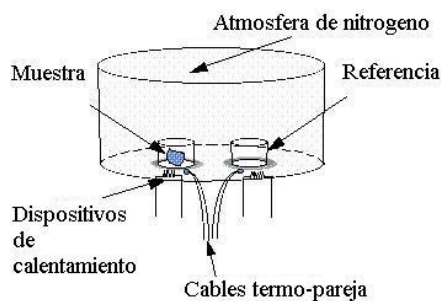
## **4.2. Métodos**

### **4.2.1. Métodos de análisis y caracterización físico-química**

#### **4.2.1.1. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)**

La calorimetría diferencial de barrido mide las diferencias en la cantidad de calor aportado a una sustancia y a una referencia en función de la temperatura de la muestra cuando las dos están sometidas a un programa de temperatura controlado. La calorimetría es el método más ampliamente utilizado de todos los métodos de análisis térmico [131].

El flujo de calor se corresponde a una potencia transmitida y por lo tanto, se mide en Watios o mW. Con la integración de la potencia con respecto al tiempo se obtiene una cantidad de energía expresada en mWs. La energía aportada a la muestra corresponde a un cambio exactamente igual a la entalpía de la muestra, que es endotérmica cuando la muestra absorbe energía y exotérmica cuando la desprende [5].



**Figura 4.2-1.** Esquema del Calorímetro Diferencial de Barrido (DSC).

Las medidas de DSC fueron realizadas con un calorímetro diferencial de barrido Mettler DSC820 equipado con un refrigerador operado con nitrógeno líquido. La escala de temperatura se calibró usando como referencia las temperaturas de fusión del indio y el zinc. El análisis en el DSC se realiza introduciendo las muestras de 5,0 mg en cápsulas de aluminio y calentándolas o enfriándolas a una velocidad de 20 ó 10 grados por minuto en un ambiente inerte y seco mantenido por el flujo de nitrógeno. Se realizaron dos ciclos distintos de temperatura; en el primero la temperatura de inicio se fijó en 10 °C y la temperatura de finalización fue de 500 °C, en el segundo ciclo se comenzó a 25 °C, se enfrió la muestra hasta -30 °C con una velocidad de enfriamiento de -5 °C por minuto, calentando posteriormente la muestra hasta 500 °C con una velocidad de calentamiento de +20 °C/min. Las medidas de DSC se realizaron 5 días después del fraguado del cemento. Durante este tiempo las muestras se almacenaron a temperatura y humedad ambiente.

#### **4.2.1.2. Análisis de pérdida de peso por temperatura**

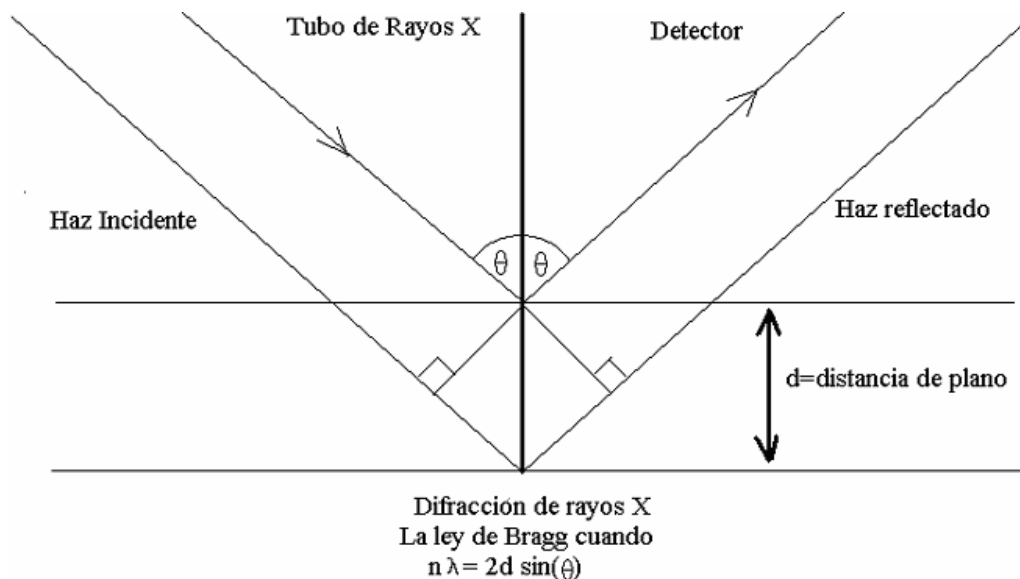
En un análisis termogravimétrico se registra la masa de una muestra colocada en una atmósfera controlada, en función de la temperatura o del tiempo al ir aumentando la temperatura de la muestra. [131]. Para estudios de pérdida de peso se calentaron muestras de cemento pulverizado en una campana de vacío (-60 cmHg) a temperaturas de 120, 135, y 170 °C. Las muestras se mantuvieron 24 horas a cada temperatura y se pesaron para evaluar la pérdida de agua en relación al peso inicial.

Este análisis se realizó con las muestras de cemento que fraguaron usando una proporción de polvo líquido 2,56 y soluciones 1 M de ácidos acético, glicólico y cítrico.

#### **4.2.1.3. Difracción de rayos X**

La técnica de difracción de rayos X se basa en el fenómeno de interferencia o difracción que le ocurre a cualquier onda cuando pasa entre dos puntos separados a una distancia similar a la longitud de onda. Si los puntos son átomos, la distancia interatómica es de unos pocos nanómetros y las ondas adecuadas para que se de el fenómeno de interferencia son los rayos X. La ley de Bragg resume la relación entre la distancia interatómica, la longitud de onda ( $\lambda$ ) y la dirección donde se produce la interferencia a través de la ecuación de Bragg que se ilustra en la figura 4.2-2. En difracción de rayos X se emplea un haz de rayos X como onda incidente sobre la

materia, y el fenómeno se produce debido a la interferencia de la radiación emitida por los átomos situados en determinadas posiciones.

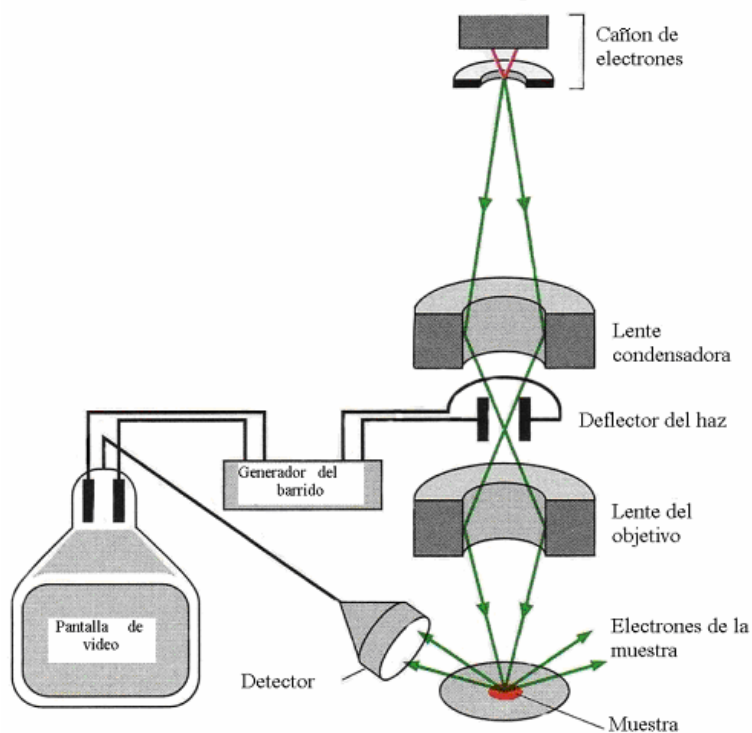


**Figura 4.2-2.** Esquema que ilustra la ley de Bragg donde  $d$  = distancia entre planos,  $\lambda$  = longitud de onda de rayos X y  $\theta$  = el ángulo entre el rayo incidente y el reflejado.

Cuando analizamos con rayos X un material cristalino en el que su estructura atómica ó molecular sigue un patrón ordenado y repetitivo aparecen máximos de difracción y característico de dicho material. Los materiales amorfos no poseen un orden molecular definido y la difracción que producen aparece difusa formando un halo en el diagrama de difracción. La difracción de rayos X es una técnica útil para reconocer los tipos de cristal en un material. Aplicando el análisis de Rietveld se puede calcular el porcentaje de los distintos tipos de cristal que se encuentran en un material.

Los estudios de difracción de rayos X fueron realizados en un difractómetro Philips PW3050. Los difractogramas fueron registrados con un intervalo angular entre  $2\theta=10$  y  $90^\circ$  usando un tamaño de escalón de  $0,04$  grados por segundo. Los picos relacionados con cada una de las fases presentes en el material se registraron para obtener la composición del cemento. En los difractogramas realizados para los análisis de Rietveld se registraron entre  $2\theta=10$  y  $90^\circ$ , con un paso de barrido de  $0,03^\circ$  y un tiempo de 3 s por paso. El análisis de Rietveld se hizo con el software Xpert plus utilizando las referencias ICSD 016132 para la brushita e ICSD 06191 para el  $\beta$ -TCP.

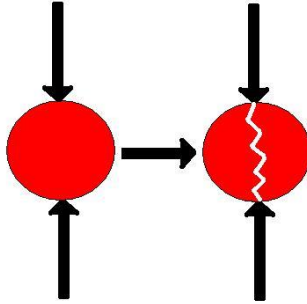
#### 4.2.1.4. Microscopia electrónica de barrido



La técnica de microscopia electrónica, desarrollada por el Premio Nobel Ernst Ruska, se basa en barrer con un haz de electrones una muestra cubierta con una capa de carbono o de oro. Los electrones son dispersados y emitidos en todas las direcciones siguiendo la microtopografía de la muestra. Un detector sensible a los electrones recoge estas emisiones, y las convierte en una imagen visible que se puede registrar en una pantalla de televisión o con una cámara fotográfica. El análisis de microscopia electrónica de barrido se realizó sobre las superficies fracturadas de las muestras de cementos que fueron fijadas en portas de cobre. Se produjeron replicas mediante sombreado con oro depositado con un Blazer Sputter Coater (SCD-004) en una atmósfera de Árgon de 0.05 torr y una corriente de 20 mA. La morfología de las muestras fue examinada usando el microscopio electrónico JSM6400 SEM con una amplificación original de 2000x. Las micrografías obtenidas fueron examinadas con el programa MotiC Image 2000 software, midiendo el tamaño de 30 cristales de brushita por imagen y estimando así la media de los tamaños de los cristales de brushita por muestra de cemento.

#### **4.2.1.5. Fuerza de tensión diametral**

La fuerza de tensión diametral es un valor característico de las propiedades mecánicas de un material y se define la como la fuerza perpendicular al segmento circular de un material que se requiere para producir su fractura [111].



Las tabletas de cemento fueron analizadas con la maquina Pharma Test PTB 311E. Este aparato mide el espesor ( $t$ ), el diámetro ( $D$ ) y la fuerza horizontal necesaria para romper la tableta ( $P$ ). Con estos valores se calcula la fuerza de tensión diametral empleando la siguiente formula:

$$\text{Fuerza de tensión diametral} = 2P/\pi \cdot D \cdot t$$

#### 4.2.1.6. Tiempo de fraguado final

El tiempo de fraguado del cemento se mide mediante el estándar internacional ISO1566 para cementos dentales de fosfato de zinc [162]. En este método se considera que el cemento ha fraguado cuando una aguja de Vicat con punta de un 1 mm de diámetro y cargada con un peso de 400 g es incapaz de producir una indentación circular visible sobre la superficie del cemento. Para realizar esta medida se enraso la pasta del cemento en un anillo de plástico con una profundidad de 1 cm y un diámetro de 1,5 cm sobre una superficie plana y lisa de vidrio, para luego ser analizado con la aguja de Vicat (ProETI).

#### 4.2.1.7. Espectroscopia de rayos infrarrojos (FTIR):

La espectroscopia infrarroja es una técnica útil para determinar el tipo de enlace químico presente en una molécula. La frecuencia de infrarrojos se expresa como número de ondas ( $2\pi/\lambda$ ) y sus unidades como el inverso de la de longitud de onda ( $\text{cm}^{-1}$ ). Los instrumentos habituales de IR tienen un rango de barrido entre 700 y 5000  $\text{cm}^{-1}$ . Esta frecuencia corresponde a energías entre 2 y 12 Kcal/mol, suficiente para afectar las vibraciones de los enlaces químicos y al mismo tiempo bastante más baja que la necesaria para romper dichos enlaces.

**TABLA 4.2.I.**

Absorbancia infrarroja de grupos funcionales

Tipo de enlace	grupo	Clase de compuesto	Rango de frecuencia ( $\text{cm}^{-1}$ )
Unión sencilla a hidrógeno	- C-H	alcanos	2850-3000
	= C-H	alquenos y compuestos aromáticos	3030-3140
	$\equiv$ C-H	Alquiles	3300
	O-H	alcoholes y fenoles	3200-3500 (unido a hidrogeno) 3500-3700(libre)
	COOH	ácidos carboxílicos	2500-3000
	N-H	Amino	3200-3600
	S-H	Tiol	2550-2600
Doble enlace	C=C	Alquenos	1600-1680
	C=N	imines, oxime	1500-1650
	C=O	aldehídos, cetones y ésteres	1650-1780
Triple enlace	$\text{C}\equiv\text{C}$	Alquiles	2100-2260
	$\text{N}\equiv\text{N}$	Nitrilos	2200-2400

El espectro infrarrojo de un compuesto se obtiene en pocos minutos al someter una pequeña cantidad de muestra a una radiación IR, y realizar un barrido de la

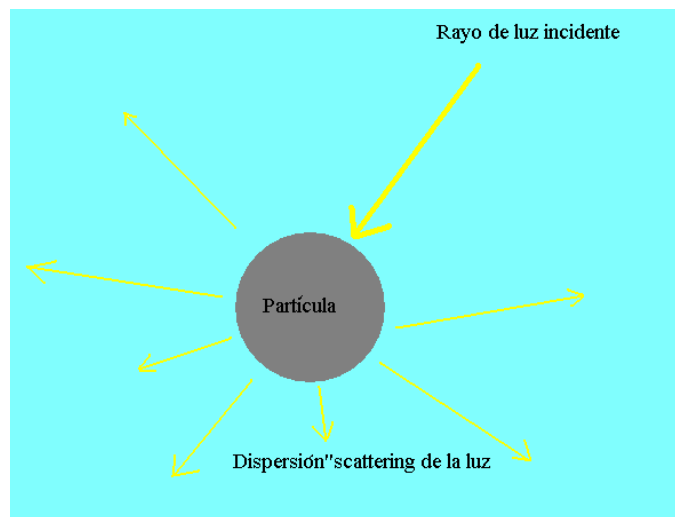
radiación que atraviesa la muestra a una frecuencia dada. La radiación absorbida por las moléculas aparece como una banda de absorción característica de los grupos funcionales presentes en la misma e independiente de otros detalles de la estructura de la molécula.

Para obtener las tabletas necesarias para el análisis de FTIR las muestras del polvo de cemento fueron mezcladas con bromuro de potasio (KBr) en una relación en peso de 1:15 (muestra: KBr) y comprimidas con una fuerza de 10 toneladas al vacío. Se usa el KBr porque es invisible a los rayos infrarrojos y por ello no afecta a la lectura durante el análisis. Se utilizó un espectrofotómetro de rayos infrarrojos JascoFT/IR-350 para realizar el análisis y el rango de longitud de onda se fijó entre 400 y 4000  $\text{cm}^{-1}$ . En las muestras de PMMA También se realizó un análisis micro FTIR para obtener una mayor precisión. En este caso, el polvo de las muestras se dispersó sobre un porta de KBr que luego fue analizado con un micro espectrofotómetro de rayos infrarrojos Jasco Micro FT-IR 200 barriendo longitudes de onda entre 400 y 4500  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **4.2.1.8. Dispersión de luz (light scattering)**

La dispersión de luz es una técnica que se emplea para analizar y calcular el tamaño de partículas con rango de diámetros entre el milímetro y el nanómetro. Dispersión es el fenómeno que describe la deflexión de fotones por pequeñas partículas sin que este involucrado ningún proceso de absorción molecular o de emisión. El cielo es azul porque las partículas que están suspendidas en el aire dispersan la luz azul. La dispersión es el proceso en el que partículas en suspensión en un medio con un índice de refracción diferente difunden una porción de la

radiación incidente en todas las direcciones. En la dispersión no hay transformación de energía solo cambio en la distribución espacial de la radiación. Junto a la absorción, la dispersión es la mayor causa de atenuación de la radiación en la atmósfera y varía en función de la relación entre el diámetro de la partícula y la longitud de onda de la radiación. Cuando esta relación es menor a una décima, ocurre la dispersión Rayleigh en la que el coeficiente de dispersión varía de manera inversa a la cuarta potencia de la longitud de onda. A mayores valores de esta proporción, entre el diámetro de la partícula y la longitud de onda, la dispersión varía en un modo complejo descrito por la teoría de Mie.



**Figura 4.2-3.** Dispersión de la luz por una partícula

La dispersión de Rayleigh, ocurre cuando las partículas son más pequeñas que la longitud de onda de la luz. La cantidad de dispersión Rayleigh de un haz de luz depende del tamaño de las partículas y de la longitud de onda de la luz, mientras que la intensidad varía inversamente con la cuarta potencia de la longitud de onda según una relación que se denomina ley de Rayleigh.

La intensidad  $I$  de la luz dispersada por una única partícula cuando incide sobre ella un haz de longitud de onda  $\lambda$  e intensidad  $I_0$  se calcula con la ecuación:

$$I = I_0 \frac{(1 + \cos^2 \theta)}{2R^2} \left( \frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \left( \frac{n^2 - 1}{n^2 + 2} \right)^2 \left( \frac{d}{2} \right)^6$$

donde  $R$  es la distancia hasta la partícula,  $\theta$  es el ángulo de dispersión,  $n$  es el índice de refracción de la partícula y  $d$  es el diámetro de la partícula.

La distribución angular de la dispersión de Rayleigh esta gobernada por el termino  $(1 + \cos^2 \theta)$  y es simétrica en el plano normal a la dirección incidente.

En nuestro trabajo, hemos utilizado la técnica de dispersión de luz para analizar el tamaño de las partículas del cemento. El análisis del tamaño de partícula se realizó con un equipo de dispersión de luz Malvern MasterSizer X. Se utilizaron las lentes 45mm 100mm y 300 mm necesarios para medir muestras de un diámetro entre 0,1  $\mu\text{m}$  y 300  $\mu\text{m}$ . La longitud de onda del haz de láser se fijo a 690 nm. Las muestras fueron suspendidas en etil acetato exponiéndolas a un baño de ultrasonidos para luego ser introducidas en el dispositivo de dispersión de luz mediante una bomba “Malvern stirrer pump” en un flujo de etil acetato.

## **4.2.2. Estudios in vivo:**

### **4.2.2.1. Preparación de injertos óseos granulados**

Para los estudios *in vivo* se preparo un injerto óseo artificial a partir de un granulado hecho con el cemento ya fraguado. El polvo del cemento se fabricó como

ya ha sido descrito en el apartado de materiales (3.1.1.) y se mezcló con una solución de ácido glicólico 1M en una proporción polvo a líquido de 1.72 g/ml.

Una vez fraguado se molió el cemento para formar gránulos que fueron separados mediante tamices con poros de 200  $\mu\text{m}$  - 1 mm obteniéndose gránulos con tamaño comprendido entre 200  $\mu\text{m}$  y 1 mm. Estos gránulos fueron empleados posteriormente como injerto granulado para regeneración ósea *in vivo*.

#### **4.2.2.2. Regeneración ósea con el nuevo biomaterial:**

##### **Técnica quirúrgica**

Para evaluar el efecto *in vivo* de los materiales se realizaron pruebas en un grupo de 7 conejas New Zealand con mas de 6 meses de edad sanas y con peso entre 3.9 y 4.4 kg conforme con la legislación vigente. Los animales fueron acomodados en el animalario oficial para ensayos animales de la UCM a 22-24 °C, con una humedad relativa de 55-70 %, ciclos de luz de 12 horas y renovación del aire 15 veces por hora. Los animales fueron alimentados con una dieta Panlab SL de mantenimiento y agua *ad libitum*.

Los conejos fueron anestesiados con una dosis intramuscular de 0,75 mg/kg de ketamine (Imalgene 1000, Rhone Merieux, France) y 0,25 mg/kg xilacine (Rompun). Los animales se colocaron en posición de decúbito supino, con la cabeza afeitada y la superficie cutanea desinfectada con una solución de povidona yodada previo a la operación quirúrgica. La superficie ósea de la calota fue expuesta mediante una incisión de aproximadamente 6 cm de largo sobre la *línea media*; la piel fue elevada con un par de pinzas para hacer una incisión en el periostio similar a la de la piel. Se separó el periostio de la superficie ósea con un periostótomo. Con

una trefina adaptada al contrángulo de un fisiodispersador con irrigación constata con suero salino 0,9 %, se procedió a crear dos surcos circulares (10 cm de diámetro y 1mm de profundidad).

Los dos defectos fueron creados a cada lado de la sutura media sagital sin llegar a alcanzarla. Posteriormente se creó una cámara de conducción ósea de titanio mediante la fijación de un anillo de titanio de 4 mm de altura en cada uno de los surcos y se rebajo 1 mm el hueso cortical rodeado por los anillos mediante una fresa redonda adaptada a una pieza de mano eléctrica. En cada conejo, la cámara derecha fue rellena con el material de regeneración ósea, y la contralateral se dejaba vacía como control negativo. La idea de emplear los anillos de titanio es para impedir el crecimiento lateral del hueso y permitir solo su crecimiento vertical tal como se describe en el apartado (2.8.).

El periostio y los tejidos subcutáneos fueron suturados de manera rutinaria con hilos de sutura reabsorbibles (dexon®3/0) con puntos continuos, mientras que la piel fue suturada con hilo de seda (3/0). Como profilaxis post operatoria para infecciones e inflamaciones, se administró a los conejos en el agua de beber Terramicina® durante 7 días. Los animales fueron sacrificados a las 4 semanas de la intervención con una sobredosis de pentobarbital sodio IV (Dolethal; Vetoquinol, Francia).

#### **4.2.2.3. Análisis de las muestras biológicas de hueso regenerado**

Para extraer los bloques de hueso que contenían las cámaras de conducción ósea de titanio en las calotas de los animales se empleó una fresa quirúrgica adaptada a

una pieza de mano eléctrica lenta. Las muestras se fijaron en una solución tampón fosfato a pH 7,0 con formaldehído al 4 %.

#### **4.2.2.3.1. Densitometría mineral ósea**

Los análisis de densidad mineral ósea post mortem se realizaron en los bloques de las calotas utilizando un densitómetro XR-26 Norland. En cada bloque, se analizó un área de  $0,5 \times 0,5 \text{ cm}^2$  dentro de las cámaras de regeneración ósea control y experimental. La resolución de exploración fue de  $1,0 \times 1,0 \text{ mm}^2$ , la resolución de medida fue de  $0,5 \times 0,5 \text{ mm}^2$  y la velocidad de exploración de 40 mm/s. El contenido mineral óseo (BMC) para las muestras control y experimental se obtuvo del análisis de densitometría. La densidad mineral ósea (BMD) se calculó usando la ecuación:

$$\text{BMD} = \frac{\text{BMC}}{\text{Área}}$$

donde el valor de BMC se expresa en gramos y el área fue siempre  $0,25 \text{ cm}^2$ .

#### **4.2.2.3.2. Histología**

El estudio histológico fue realizado por el Departamento de Anatomía y Embriología humana de la Universidad de Alcalá de Henares siguiendo la técnica descrita para el sistema Exakt®. La evaluación de la neoformación ósea se realizó mediante microscopía óptica. Las muestras de hueso fueron deshidratadas en series ascendentes de alcohol (50-100 %) y embebidas en 2-hidroxi-etil-metacrilato para formar bloques listos para cortar. Se cortaron secciones de  $200 \mu\text{m}$  de espesor con

una sierra de banda (Exakt®). Posteriormente las secciones fueron adelgazadas por pulido hasta llegar a un espesor de 50-80 µm utilizando una pulidora Exakt® para luego ser teñidas con hematoxilina & eosina (HE) y azul de toluidina (TB) [31].

#### 4.2.2.3.3. Histomorfometría

Para los análisis histomorfométricos se capturaron las micrografías ópticas de las secciones de las biopsias con una cámara digital a 6 aumentos para luego ser analizadas con el software histomorfométrico MIP-4. Se seleccionaron tres cortes al azar por cada biopsia de las muestras y se midió el área del defecto ocupado por el hueso neoformado. El porcentaje de hueso neoformado fue calculado a partir de la expresión:

$$\text{Porcentaje de hueso neoformado (\%)} = \frac{\text{Área de hueso neoformado}}{\text{Área inicial del defecto}} \times 100$$

### 4.3. Análisis estadístico

El tratamiento estadístico de los datos obtenidos en los estudios físicoquímicos (apartado 4.2.1.) y en los estudios *in vivo* (apartado 4.2.2.) se realizó con el software del programa Origin 6.0 para Windows Microsoft. Los valores de densidad mineral ósea y porcentaje de regeneración ósea fueron utilizados para comparar los defectos experimentales con los defectos control. Primero se hicieron los análisis estadísticos descriptivos para ambas poblaciones. Luego se examinó que ambos grupos seguían una distribución gaussiana mediante un test t de student para una sola población con

un nivel significativo de  $p < 0,05$ . Finalmente se evaluaron las diferencias entre los defectos control y experimental empleando el test  $t$  de student para dos poblaciones con un nivel significativo de  $p < 0,05$ . La  $t$  de student se obtiene a partir de la ecuación:

$$t \equiv \frac{\bar{x} - \mu}{s / \sqrt{n}},$$

Donde  $n$  es el tamaño de la población,  $\mu$  es la media de la población  $\bar{x}$  es la media de la muestra y  $s$  es la varianza de la población.

Posteriormente, con el valor obtenido de  $t$ , en una tabla de intervalos de confianza se contrasta  $t$  con el tamaño de la población para obtener el intervalo de confianza.

## 5. Resultados

---

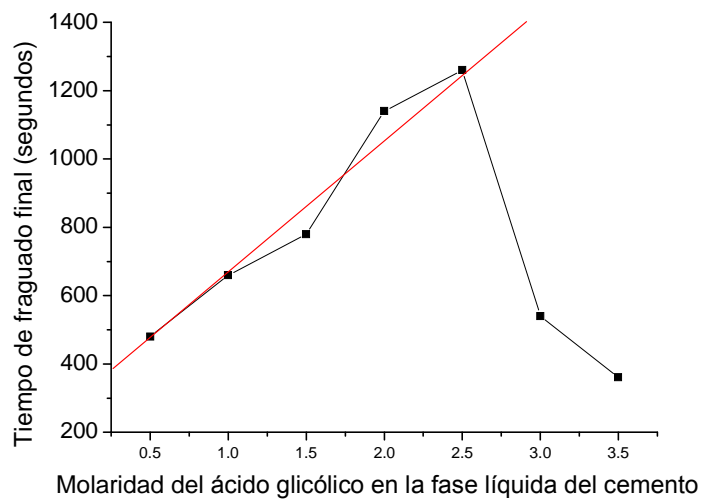
## 5.1. Efecto de los grupos carboxi sobre el fraguado de los cementos de brushita

Los cementos de brushita son biomiméticos, no son citotóxicos, y son más biocompatibles y osteoconductivos que la gran mayoría de los cementos dentales [60, 37, 2]. Además estos cementos son de especial interés porque son reabsorbibles *in vivo*, pero sus aplicaciones están limitadas por su tiempo de fraguado demasiado corto, baja fuerza mecánica y poca inyectabilidad. Se ha ensayado el uso de aditivos como el pirofosfato el citrato y el sulfato sódico, para prolongar el tiempo de fraguado [14]. Por otro lado, al añadir ácidos carboxi en la reacción de fraguado se consigue una cierta mejora de las propiedades mecánicas y en el tiempo de fraguado de los cementos [140, 14]. Hasta el momento los ácidos que habían demostrado tener los mejores efectos son los ácidos oligocarboxílicos  $\alpha$ -hidroxi, especialmente el ácido cítrico. No obstante, el ácido cítrico tiende a reaccionar con el calcio del cemento y forma una sal soluble en agua que debilita las propiedades mecánicas del mismo. En nuestro trabajo hemos decidido estudiar el efecto de añadir al cemento de brushita un ácido carboxi  $\alpha$ -hidroxi con una sal de calcio poco soluble en agua, como el ácido glicólico, y comparar su efecto con el de otros ácidos. Para ello hemos mezclado la fase sólida del cemento (descrita en el apartado 4.1.1.) con distintas fases líquidas que contienen los ácidos orgánicos: glicólico, cítrico y acético (descritas en el apartado 4.1.2.). Los cementos son mezclados (como se describe en el apartado 4.1.4.) y se analizaron sus propiedades mecánicas y fisicoquímicas con el objetivo de profundizar el conocimiento acerca del efecto de los ácidos carboxi sobre la reacción de fraguado del cemento, la estructura y propiedades del mismo.

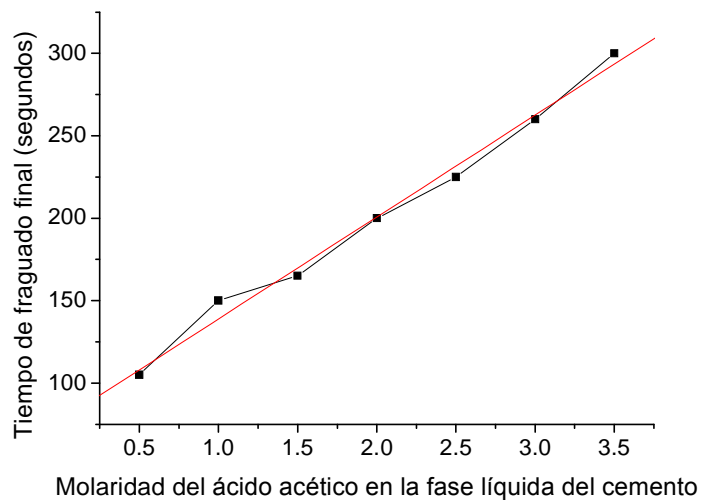
### **5.1.1. Efecto de los ácidos carboxi sobre el tiempo de fraguado el cemento**

Los cementos fraguados con ácido glicólico y cítrico son fluidos y fáciles de manejar mientras que el ácido acético produjo cementos secos difíciles de manejar. Los cementos que fraguaron con proporciones de polvo/líquido (P/L) 1,28 fueron los más fluidos seguidos por los preparados con  $P/L = 1,72$  y finalmente los que fraguaron con  $P/L = 2,56$  fueron los menos fluidos.

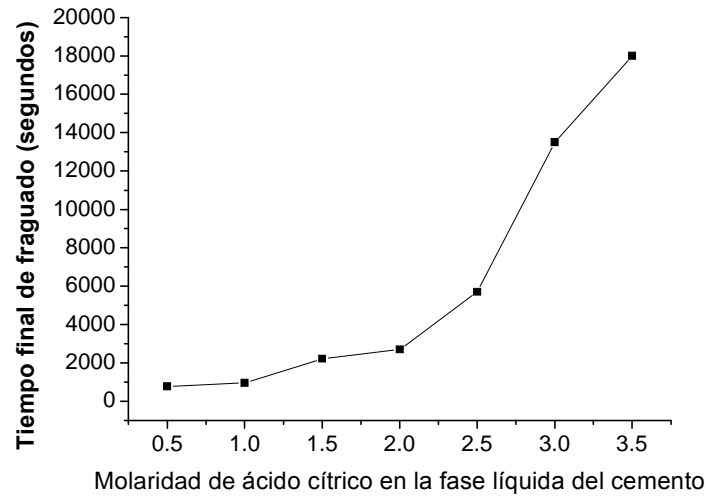
De los ácidos caboxi estudiados el cítrico es un oligocarboxílico  $\alpha$ -hidroxi, el glicólico es monocarboxílico  $\alpha$ -hidroxi, y el acético es monocarboxílico carente de grupo OH. En relación al tiempo de fraguado, los cementos que se prepararon con ácido cítrico tuvieron tiempos de fraguado más prolongados, seguidos por el ácido glicólico, mientras que los preparados con ácido acético tuvieron tiempos de fraguado muy cortos. Por regla general, cuanto mayor es la molaridad de la solución ácida, mas largo es el tiempo de fraguado, con la excepción del ácido glicólico que con molaridades superiores a 3 M reduce el tiempo de fraguado del cemento. La relación entre el tiempo de fraguado y la molaridad de los distintos ácidos presentes en la fase líquida se muestra en las figuras 5.1-1, 5.1-2, 5.1-3 y 5.1-4 y los datos se dan en la tabla 5.1.I.



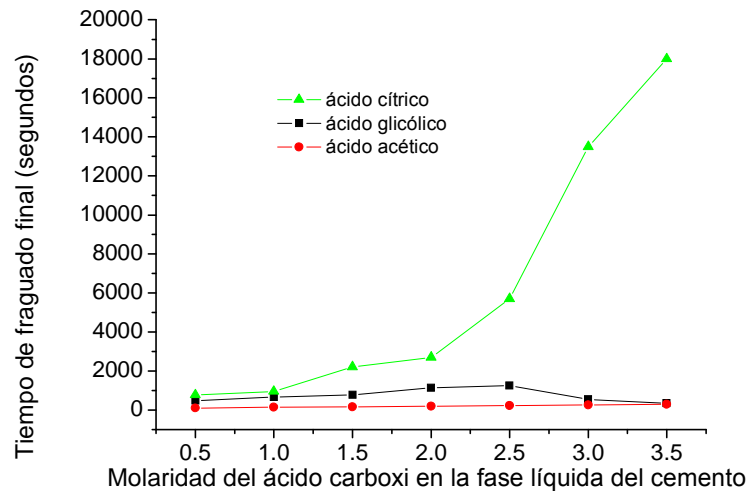
**Figura 5.1-1.** Relación entre el tiempo final de fraguado del cemento y la concentración de ácido glicólico en la fase líquida del cemento.



**Figura 5.1-2.** Relación entre el tiempo final de fraguado del cemento y la concentración de ácido acético en la fase líquida del cemento.



**Figura 5.1-3.** Relación entre el tiempo final de fraguado del cemento y la concentración de ácido cítrico en la fase líquida del cemento.



**Figura 5.1-4.** Relación entre el tiempo final de fraguado del cemento y la concentración de los ácidos carboxílicos; comparación entre el ácido glicólico, al acético y el cítrico.

**TABLA 5.1.I:**

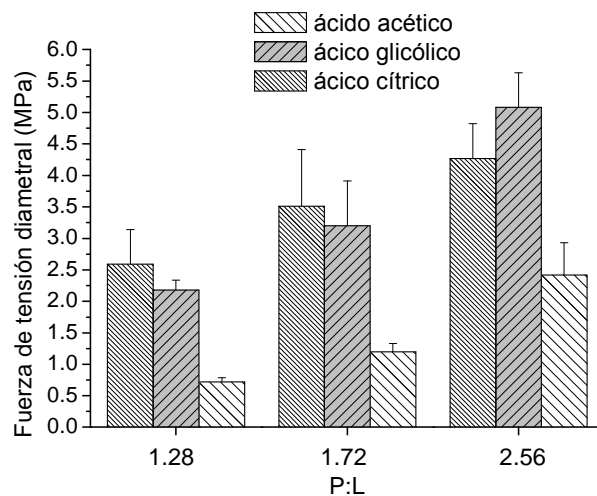
Tiempo de Fraguado del cemento de brushita con (P/L 2,5) al usar distintas soluciones de ácidos carboxi en la fase líquida del cemento

Concentración del ácido en la fase líquida del cemento	Tiempo final de fraguado según el ácido empleado (horas; minutos)		
	Cítrico	Glicólico	Acético
3,5 M	5 h	6 min	4,5 min
3 M	3 h 45 min	9 min	4 min
2,5 M	1 h 35 min	21 min	3,5 min
2,0 M	45 min	19 min	3 min
1,5 M	37 min	13 min	2,5 min
1,0 M	16 min	11 min	2 min
0,5 M	13 min	8 min	-

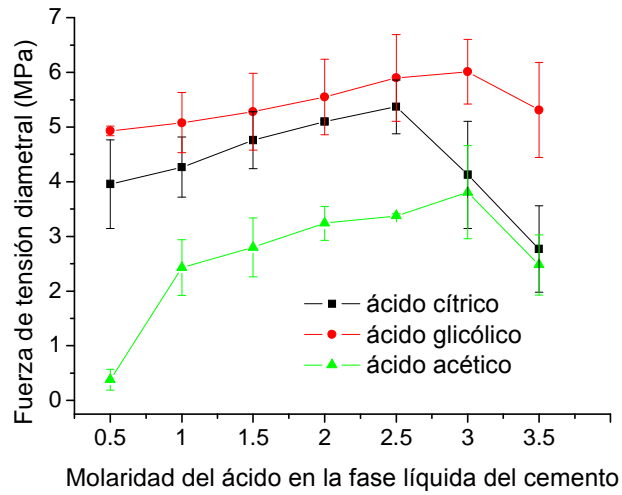
### 5.1.2. Fuerza de tensión diametral de los cementos

La fuerza de tensión diametral de los cementos se midió en dos situaciones distintas, la primera después de dejar fraguar los cementos 48 horas a temperatura y humedad ambiente (en seco), y la segunda situación fue después de dejar fraguar los cementos 24 horas sumergidos en agua destilada a 37°C con el fin de simular el medio fisiológico (en agua). En las muestras que se dejaron fraguar en seco (figura 5.1-5.), los cementos preparados con una proporción  $P/L = 1,28$  presentaron menor fuerza de tensión diametral en comparación con los preparados con proporciones mayores de  $P/L$ , además se observa que el ácido añadido en la reacción de fraguado tiene una influencia considerable sobre la fuerza de tensión diametral. Los cementos que utilizaron ácido glicólico produjeron las fuerzas tensión diametral más altas, seguidos de cerca por los que usaron ácido cítrico, y muy por debajo los que usaron ácido acético. Como se observa en la figura 5.1-6, la fuerza de tensión diametral de los cementos que fraguan en seco y con  $P/L = 2,56$ , incrementa al usar molaridades de ácido mas altas. Esta relación

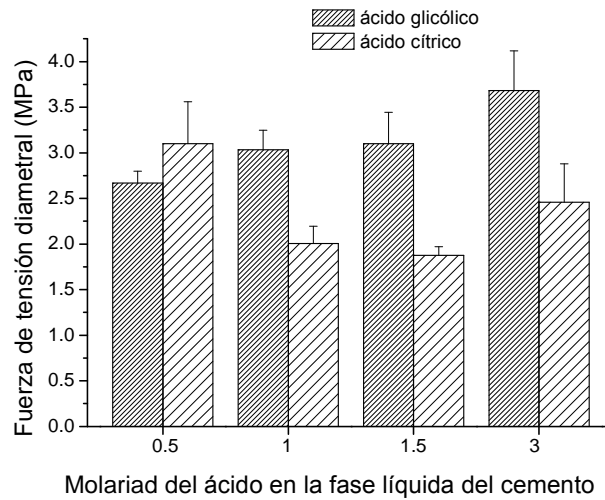
es proporcional hasta 2,5 M para el ácido cítrico y 3,0 M para el ácido glicólico. Por encima de estas molaridades, estos dos ácidos dejan de aumentar las fuerzas de tensión diametral, llegando incluso a reducirlas levemente. Por otro lado, las fuerza de tensión diametral en agua de los cementos fraguados con ácido glicólico son significativamente superiores a los fraguados con ácido cítrico, especialmente cuando se mezclaron con la fase sólida del cemento en altas concentraciones (ver figura 5.1-7). Atribuimos este efecto a la alta solubilidad en agua de la sal de calcio que produce el ácido cítrico, mientras que la sal de calcio del ácido glicólico es poco soluble y por ello no debilita el cemento.



**Figura 5.1-5.** La relación de la fuerza de tensión diametral con el tipo de ácido y la proporción P/L empleados en la reacción de fraguado.



**Figura 5.1-6.** Fuerza de tensión diametral en seco en función de la molaridad del ácido cítrico, glicólico y acético en la fase líquida del cemento cuando  $P/L = 2,56$ .



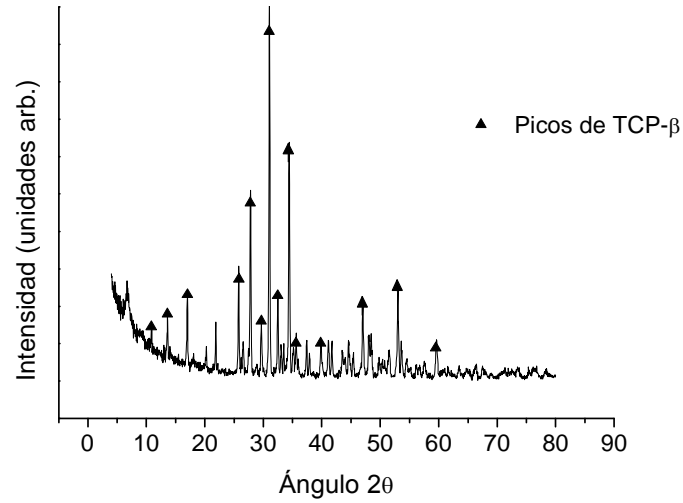
**Figura 5.1-7.** Relación entre la molaridad del ácido en la fase líquida del cemento y la fuerza de tensión diametral del cemento en agua a  $37^{\circ}\text{C}$  ( $P/L = 2,56$ ).

### 5.1.3. Microestructura de los cementos

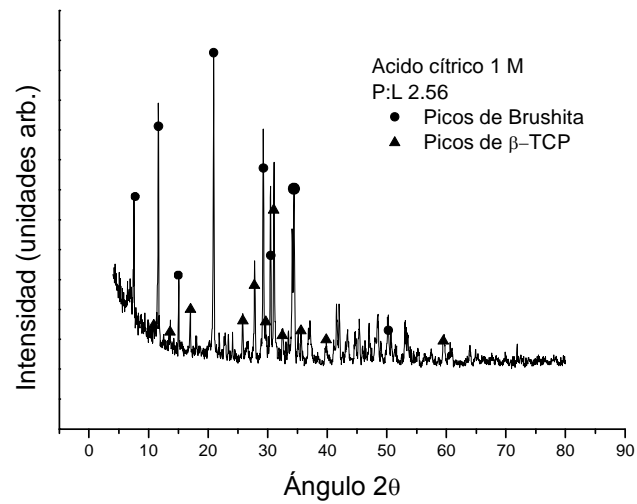
#### 5.1.3.1. Difracción de rayos X

La composición mineral de los cementos se investigó con difracción de rayos X. Los difractogramas de los distintos cementos se muestran en las figuras 5.1-8 hasta 5.1-12. Todas las muestras analizadas tienen un componente mayoritario de brushita y trazas variables de  $\beta$ -TCP. Las muestras de cemento fraguados con ácido cítrico con  $P/L = 2,56$  presentaron los picos de  $\beta$ -TCP mas intensos en relación con los de brushita. No se detecto ningún otro componente que brushita y  $\beta$ -TCP a excepción de las muestras que usaron concentraciones altas de ácido cítrico (3,5 M) y  $P/L = 2,56$  que mostraron en su composición una significativa cantidad de monofosfato calcio dihidrato  $Ca (H_2PO_4)2H_2O$ .

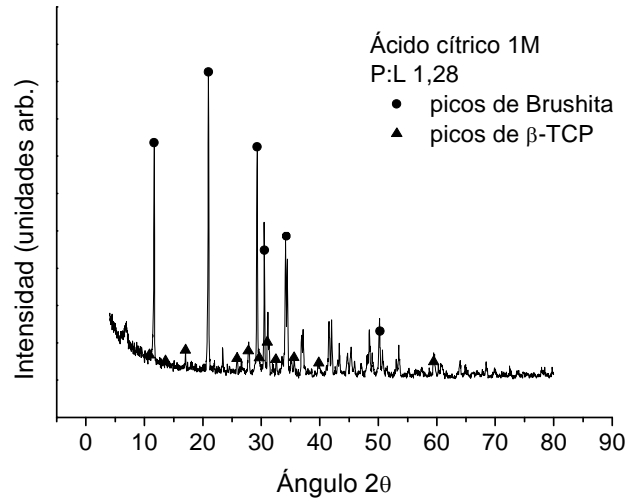
El análisis de difracción de rayos X en función de la temperatura muestra que la composición de los cementos a 25 °C es brushita y  $\beta$ -TCP, a 140 °C sigue estando compuesto por brushita y  $\beta$ -TCP con pequeñas trazas de monetita, mientras que a 200 °C el cemento esta compuesto principalmente de monetita.



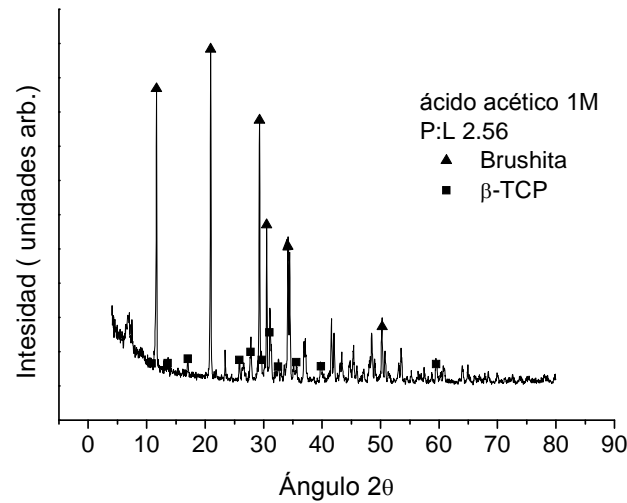
**Figura 5.1-8.** Difractograma de  $\beta$ - TCP puro, sintetizado para fabricar la fase sólida del cemento.



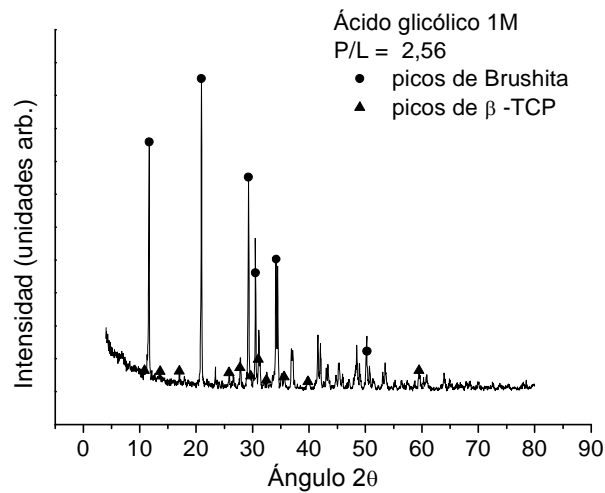
**Figura 5.1-9.** Difractograma de los cementos con P/L = 2,56 y concentración de ácido cítrico 1 M en la fase líquida de la reacción de fraguado.



**Figura 5.1-10.** Difractograma de los cementos con P/L = 1,28 y concentración de ácido cítrico 1 M en la fase líquida de la reacción de fraguado.



**Figura 5.1-11.** Difractograma de los cementos fraguados con P/L = 2,56 y una concentración de ácido acético de 1 M en la fase líquida de la reacción de fraguado.



**Figura 5.1-12.** Difractograma de los cementos fraguados con P/L = 2,56 y una concentración de ácido glicólico de 1 M en la fase líquida de la reacción de fraguado.

### 5.1.3.2. Calorimetría diferencial de barrido

En la figura 5.1-13 se muestra la curva de DSC para el  $\beta$ -TCP donde aparece un pequeño pico endotérmico a 438 °C relacionado con pequeñas cantidades de monetita formada durante el almacenamiento del material. La curva de DSC de la brushita pura que se muestra en la figura 5.1-14 tiene 3 picos endotérmicos, uno pequeño a 160 °C, otro muy marcado a 192 °C y un tercero a 433 °C. El primer pico está relacionado con la pérdida parcial de moléculas de agua de la brushita, el segundo pico corresponde a la transformación de la brushita en monetita, y el tercer pico se debe a la transformación de monetita en pirofosfato cálcico.

En las figuras 5.1-15 y 5.1-16 se compara la curva de DSC de las muestras de cemento preparadas con ácido glicólico y acético siendo P/L = 2,56 y la concentración del ácido 1 M. Como se puede ver en las figuras 5.1-15 y 5.1-16 las muestras que

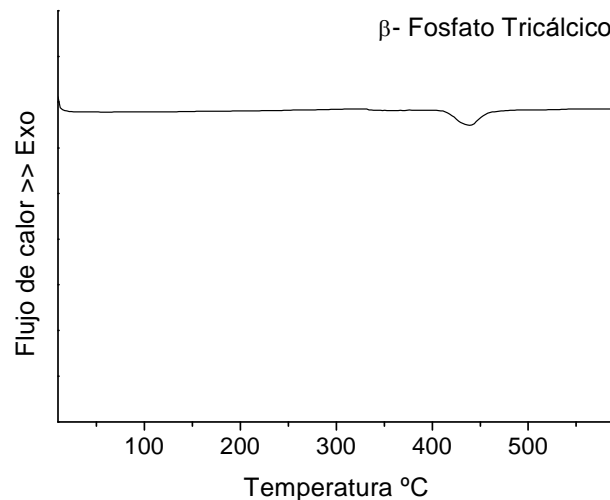
usaron ácido acético y glicólico tienen un gráfico de DSC muy similar al de brushita pura ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Alrededor de 190 °C se observa un pico endotérmico correspondiente a la transformación de brushita en monetita, este pico se trasladó ligeramente hacia menores temperaturas, probablemente debido a la presencia de los ácidos carboxi y sus sales entre los cristales de brushita. La curva de DSC de las muestras de cementos preparados con ácido cítrico es muy diferente como se puede ver en la figura 5.1-17. En este caso se ve un pico endotérmico alrededor de 113 °C y otro más pequeño a 183 °C. Los picos a 113 °C se acentúan en las muestras que se prepararon con una mayor concentración de ácido cítrico, y en las que usaban una proporción P/L mayor (ver figuras 5.1-18 y 5.1-19).

Hay que mencionar que al calentar las muestras que se prepararon con ácido cítrico, estas sufrían un cambio en su color de blanco a amarillo proporcional a la concentración de ácido empleada. Este cambio de color está relacionado a la descomposición del ácido cítrico que ocurre entorno a 140 °C. No se observa este cambio de color con el ácido acético ya que es volátil, ni con el ácido glicólico, que se degrada a 70 °C.

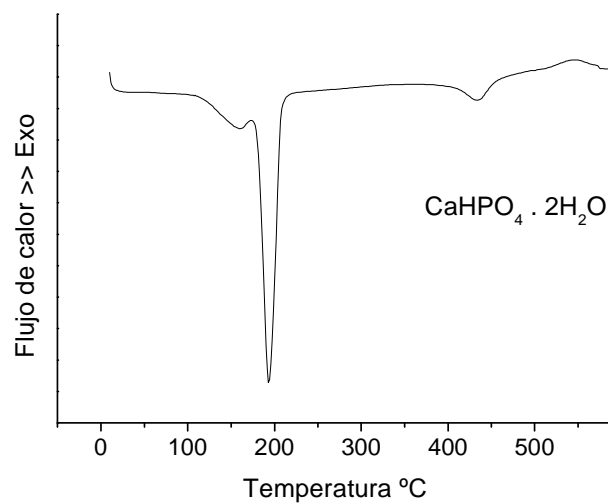
#### **5.1.3.3. Pérdida de peso en relación al incremento de la temperatura**

En la figura 5.1-20 se muestra la pérdida de peso de los cementos en función de la temperatura. La pérdida de peso debida al incremento de la temperatura fue más acentuada en los cementos con ácido cítrico, seguidos por los de ácido glicólico y acético. Estos últimos no tuvieron pérdida alguna en su peso. También cabe mencionar que la pérdida de peso por causas térmicas fue más pronunciada cuando la molaridad del ácido utilizado en el fraguado del cemento fue mayor. Los cementos preparados con una solución de ácido cítrico 1 M y P/L = 2,56 perdieron un  $8,3 \pm 0,5 \%$  de su peso

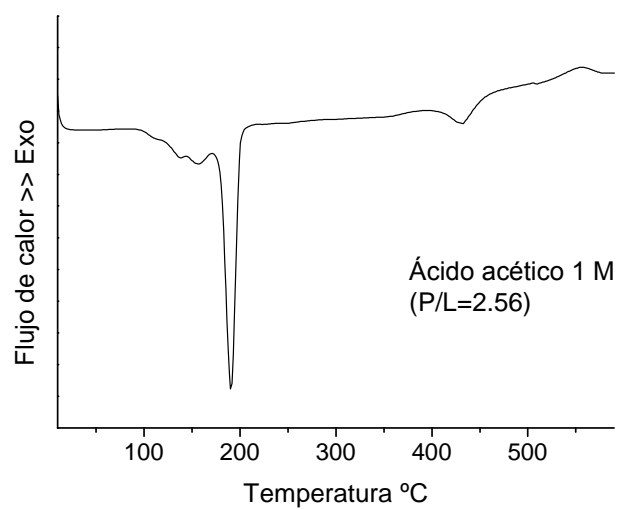
cuando se calentaron hasta 170 °C. Los cementos con ácido glicólico en la misma concentración y proporción perdieron  $4,7 \pm 0,5$  % de su peso original cuando fueron calentados a la misma temperatura. Mientras que los cementos que emplearon ácido acético perdieron  $0,0 \pm 0,5$  % de su peso original (ver figura 5.1-20). La pérdida de peso en función de la concentración de ácido se estudio para el ácido cítrico y se muestra en la figura 5.1-21. Los cementos que fraguaron usando ácido cítrico en concentraciones de 0,1 M, 1 M y 2 M en proporciones P/L = 2,56 tuvieron una pérdida de peso cuando eran calentados hasta 170 °C de  $6,9 \pm 0,5$ ;  $8,3 \pm 0,5$  y  $10,5 \pm 0,5$  respectivamente.



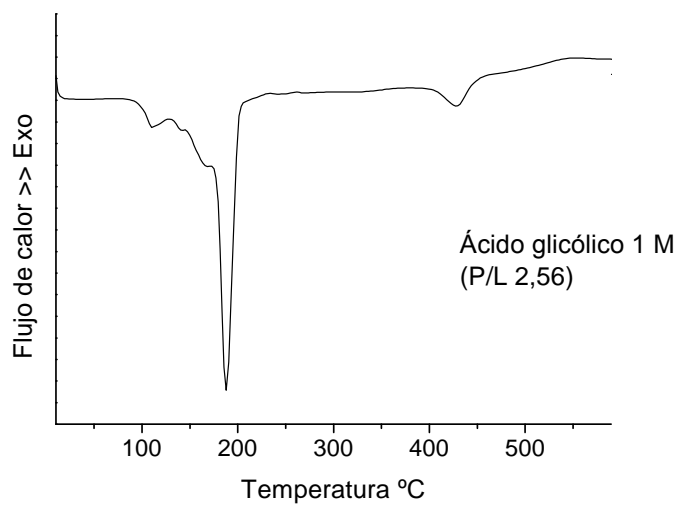
**Figura 5.1-13.** Termograma de β-TCP puro



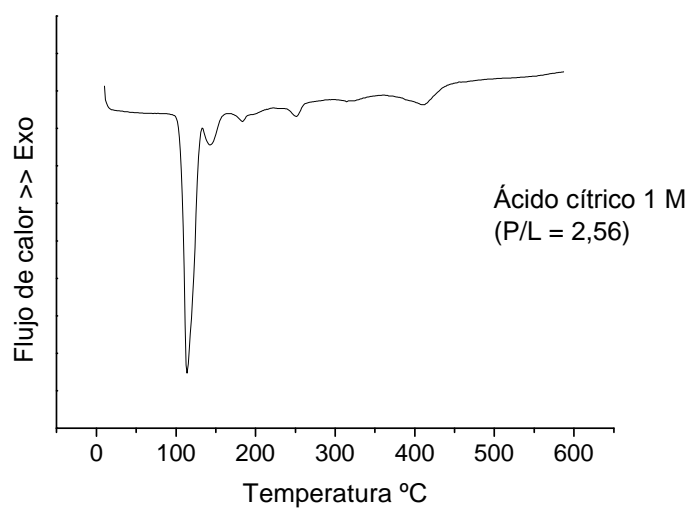
**Figura 5.1-14.** Termograma de la brushita pura



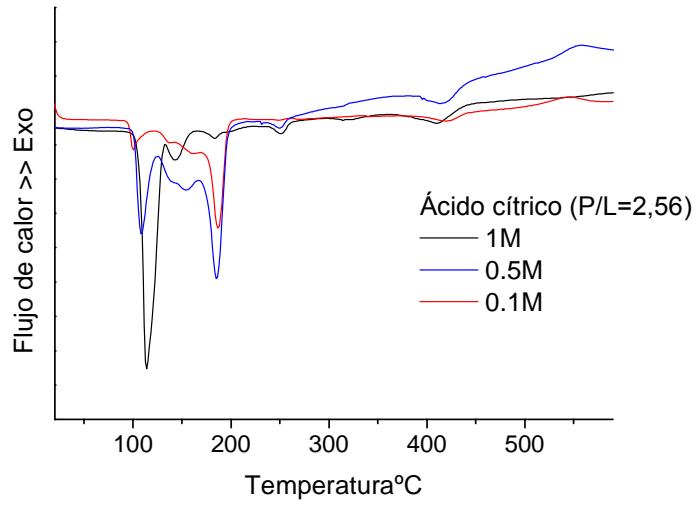
**Figura 5.1-15.** Curva de DSC de cemento fraguado con ácido acético 1 M y P/L = 2,56.



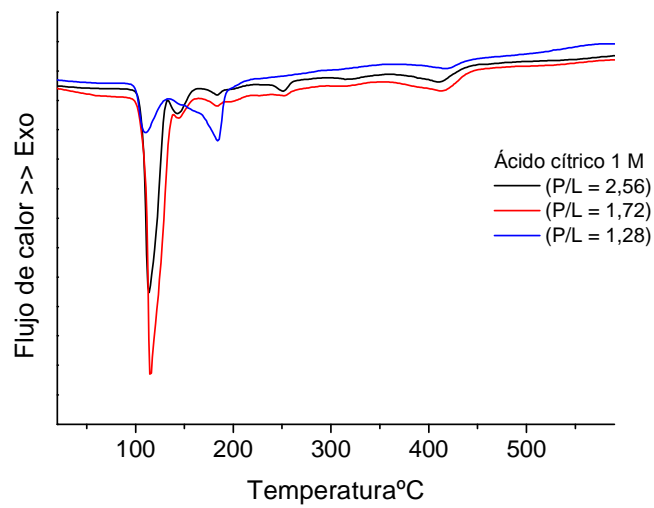
**Figura 5.1-16.** Curva DSC del cemento fraguado con ácido glicólico 1 M y P/L = 2,56.



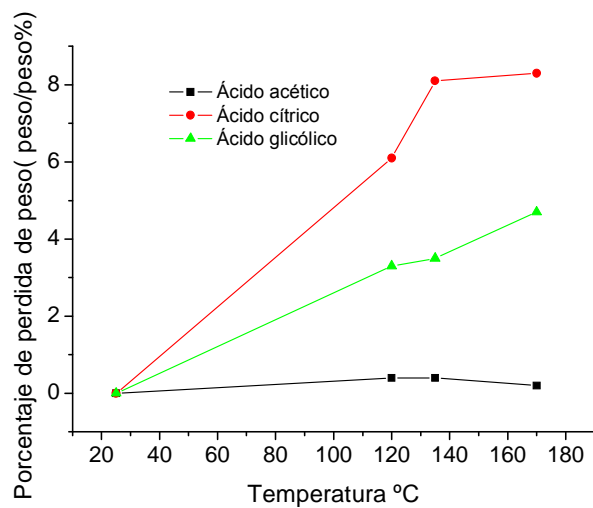
**Figura 5.1-17.** Curva DSC del cemento fraguado con ácido cítrico 1 M y P/L = 2,56.



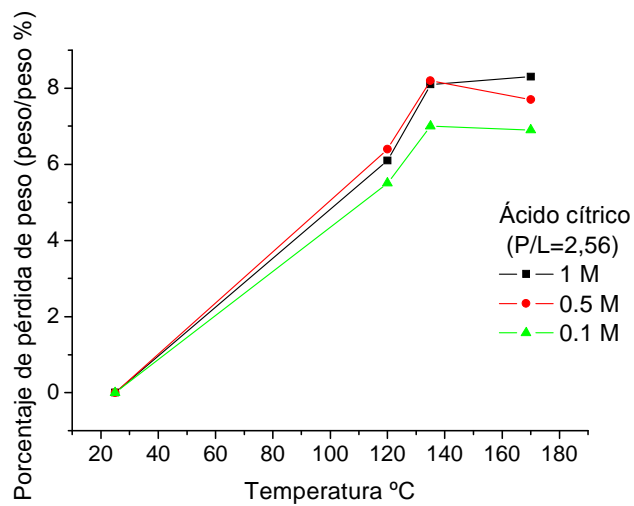
**Figura 5.1-18.** Curva de DSC de cementos fraguados con  $P/L = 2,56$  y concentración de ácido cítrico 0,1 M, 0,5 M y 1 M.



**Figura 5.1-19.** Curva de DSC de cementos fraguados con 1 M de ácido cítrico con  $(P/L = 2,56)$ ,  $(P/L = 1,72)$  y  $(P/L = 1,28)$ .



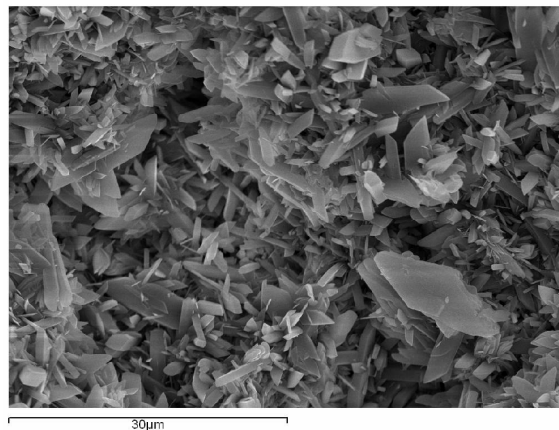
**Figura 5.1-20.** Gráfico de pérdida de peso en función de la temperatura para cementos fraguados con P/L = 2,56 y 1 M de ácido cítrico, 1 M de ácido glicólico y 1 M de ácido acético.



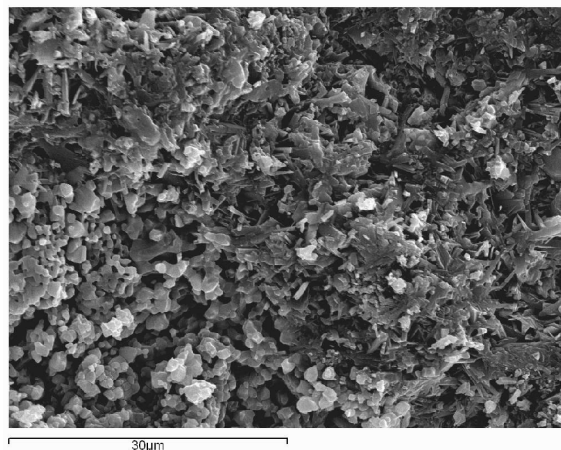
**Figura 5.1-21.** Pérdida de peso de los cementos fraguados con 0,1 M, 1 M y 2 M de ácido cítrico (P/L = 2,56) en función de la temperatura.

#### 5.1.3.4. Microscopía electrónica de barrido

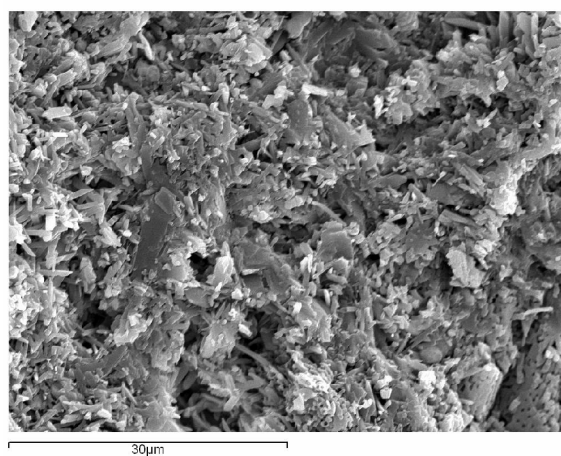
La morfología de las muestras de cemento se estudió con microscopia electrónica de barrido. En las figuras 5.1-22, 5.1-23 y 5.1-24 se muestran las micrografías obtenidas a 2000 aumentos para los cementos que fraguaron con proporciones de polvo líquido,  $P/L = 2,56$ , y soluciones 1 M de cada uno de los ácidos estudiados. Los cristales agudos y alargados característicos de la brushita se aprecian claramente en todas las muestras. Por otro lado, los pequeños y redondeados escasos cristales de fosfato tricálcico beta solo se pudieron apreciar en las muestras que fraguaron usando ácido glicólico y ácido cítrico. Los cementos preparados con una solución 1 M de ácido acético y con  $P/L = 2,56$  formaron cristales de brushita con una media de longitud de 6,12 micrómetros (Figura 5.1-22). Los preparados con una solución 1 M de ácido glicólico (Figura 5.1-23) y cítrico (Figura 5.1-24), y con la misma proporción de polvo líquido mostraron cristales con una longitud media de 2,47  $\mu\text{m}$  y 2,40  $\mu\text{m}$  respectivamente.



**Figura 5.1-22.** Micrografía de cemento fraguado con ácido acético 1M y  $P/L = 2,56$ . La imagen muestra una hegemonía de cristales de brushita alargados y puntiagudos, y prácticamente no se detecta ningún resto de cristales de  $\beta$ -TCP lo cual confirma los resultados de difracción de rayos X y DSC que apuntaban un alto contenido de brushita.



**Figura 5.1-23.** Micrografía de cemento fraguado con ácido cítrico 1 M y P/L = 2,56. La imagen muestra cristales alargados (monoclínicos) de brushita así como los cristales redondeados de  $\beta$ -TCP.



**Figura 5.1-24.** Micrografía de cemento fraguado con ácido glicólico 1M con P/L 2,56. La imagen muestra una gran cantidad de cristales monoclínicos alargados de brushita y una pequeña cantidad de  $\beta$ -TCP.

#### **5.1.4. Discusión del efecto de la adición de ácidos carboxi en la reacción del fraguado del cemento**

Los tres ácidos orgánicos estudiados fueron capaces de inducir la reacción de fraguado del cemento. No obstante, tiempo de fraguado del cemento varió considerablemente dependiendo del ácido empleado, de la molaridad y de la proporción de polvo/líquido. La variación más considerable fue la relativa al tipo de ácido empleado; el ácido cítrico tiene un efecto prolongador de la reacción, así como el glicólico mientras que el acético produce reacciones extremadamente rápidas. Este efecto del ácido cítrico ya ha sido mencionado en la literatura, y según los estudios realizados se debe principalmente a que los 3 grupos carboxi que tiene esta molécula pueden interaccionar con varios iones de calcio simultáneamente. Se cree que esto ocurre especialmente en la superficie de crecimiento del cristal de brushita y de este modo el ácido cítrico inhibe la formación de los cristales, produciendo cristales más pequeños y prolongando la reacción de fraguado del cemento. A pesar de que no hay constancia en la bibliografía sobre el empleo del ácido acético y glicólico en los cementos de brushita, el modelo del ácido cítrico puede explicar la razón por la que el ácido acético, a pesar ser un ácido carboxi es incapaz de prolongar el tiempo de fraguado. Este ácido solo tiene un grupo carboxi, y solo podría interaccionar débilmente o bien con una molécula de agua, o con un único ion de calcio, y esta débil interacción sería insuficiente para ralentizar la formación de cristales de brushita y alargar el tiempo de fraguado. Sin embargo el ácido glicólico tiene un solo grupo carboxi como el ácido acético, pero a diferencia de este último, el ácido glicólico produce una significativa prolongación del tiempo de fraguado del cemento. Lo que llama aun mas la atención en este fenómeno, es el hecho de que el ácido glicólico, cuando es utilizado en

concentraciones superiores a 3 M, invierte su efecto retardante y el cemento fragua más rápidamente. El ácido glicólico y el acético tiene el mismo número de grupos carboxi y aun así producen tiempos de fraguado dispares, los cementos fraguados con glicólico tiene un tiempo de fraguado mas prolongado que los cementos fraguados con ácido acético. Este factor refleja el hecho de que el ácido orgánico empleado en la reacción de fraguado de los cementos de brushita debe ser  $\alpha$ -hidroxi, es decir, que tenga al menos un grupo OH ya que para obtener al inhibición de la reacción de fraguado, la interacción del grupo carboxi con los iones calcio debe de ir acompañada de una interacción con las moléculas de agua del medio mediante puentes de hidrogeno. En resumen los resultados demuestran para obtener un efecto prolongador de la reacción de fraguado, los ácidos orgánicos empleados deben de ser  $\alpha$ -hidroxi y este resultado acaba de ser confirmado por otros autores en estudios recientes[8]. Por otro lado, la disminución del tiempo de fraguado a concentraciones de glicólico superiores a 3 M, la atribuimos a la formación de una fase insoluble de glicolato cálcico que precipita más rápidamente.

En cuanto a las propiedades mecánicas, los cementos fraguados con ácido glicólico, son superiores a los cementos fraguados con ácido cítrico, especialmente cuando se emplean ambos ácidos en concentraciones elevadas. Esto se debe al hecho de que estos ácidos orgánicos producen una fase de glicolato cálcico o citrato cálcico en el cemento. El citrato cálcico es mucho más soluble en agua que el glicolato cálcico, lo cual debilita notablemente la estructura de los cementos fraguados con ácido cítrico cuando son introducidos en un medio acuoso [8, 61].

Las 3 proporciones de polvo a líquido ensayadas fueron capaces de producir cementos de brushita, no obstante, la fuerza de tensión diametral del cemento varia dependiendo de la proporción de polvo/líquido utilizada. De hecho existe una relación entre la proporción polvo/líquido del cemento y la fuerza de tensión diametral. Esta

última aumenta a medida que la proporción de polvo a líquido aumenta, y esto ocurre independientemente del tipo de ácido o solución empleado en la reacción. Otros autores han explicado este fenómeno, describiendo que a mayor porcentaje de líquido, el cemento es más poroso y menos denso, provocando una mayor fragilidad del mismo. Por otro lado, cuanto mayor sea la proporción de polvo, el cemento será más denso y menos poroso aumentando así sus fuerzas de compresión y de tensión diametral [46]. Por estos motivos se seleccionó una proporción polvo/líquido de 2,56, descartando proporciones de polvo/líquido inferiores ya que producían cementos más frágiles.

Los análisis de difracción de rayos X, DSC, SEM y pérdida de peso con temperatura demuestran que las propiedades del cemento varían según el ácido orgánico empleado. Los cementos fraguados con ácido cítrico tienen unos cristales de brushita de menor tamaño, una fuerza de tensión diametral alta y un tiempo de fraguado más prolongado [6]. Los cementos fraguados con ácido glicólico tienen cristales de brushita pequeños, y una fuerza de tensión diametral superior pero un tiempo de fraguado no tan prolongado como en los cementos que utilizaban ácido cítrico. Por otro lado, los cementos fraguados con ácido acético producen cristales de brushita más grandes, tiene peores propiedades mecánicas y tiempos de fraguado muy cortos. El ácido cítrico tiene más grupos carboxi que el ácido acético y glicólico, esto mejora su capacidad de interactuar con los iones calcio del cemento lo cual ayuda a prolongar el tiempo de fraguado del cemento.

Los análisis de difracción de rayos X revelan que los cementos se componen principalmente de brushita y de una pequeña cantidad de  $\beta$ -TCP. Las muestras de cementos que fraguaron con una porción polvo líquido superior tenían una fracción mayor de  $\beta$ -TCP debido a que la reacción de fraguado no se puede completar por falta de agua y protones. La presencia de  $\beta$ -TCP en la estructura del cemento en cantidades

pequeñas (alrededor de 10 %) mejora las propiedades mecánicas del mismo y además tiene un efecto biológico positivo de biocompatibilidad [46, 109]. Por otro lado, los cementos fraguados con concentraciones muy elevadas de ácidos orgánicos tienen fracciones de  $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en su composición, esta sal es muy soluble en agua y debilita la estructura del cemento, por eso, al usar concentraciones elevadas de ácidos orgánicos en el fraguado de los cemento ocurre una disminución muy pronunciada de las propiedades mecánicas.

Según los análisis de Rietveld, los cementos que hemos preparado están compuestos fundamentalmente de brushita, por eso los diagramas de DSC deberían ser similares a los de la brushita pura. El otro componente inorgánico del cemento es el  $\beta$ -TCP que no sufre alteraciones por debajo de los 900 °C, por eso no se registra ninguna transición relativa al  $\beta$ -TCP en nuestras medidas, ya que estas se realizaron entre 20 y 500 °C.

El análisis de DSC indica que entorno a 130 °C la brushita sufre una deshidratación parcial perdiendo una de las dos moléculas de agua que contiene manteniendo su estructura cristalina. Alrededor de 192 °C la brushita pierde su segunda molécula de agua y se transforma en monetita y esta última se convierte en pirofosfato cálcico a 433 °C [9, 67]. El DSC de la brushita pura muestra un pico endotérmico muy pronunciado a 192 °C que corresponde a la transformación en monetita, mientras que los picos de deshidratación parcial a 130 °C son muchos mas débiles lo que refleja la facilidad de la brushita pura para perder su primera molécula de agua.

Los cementos fraguados con una solución de ácido glicólico 1 M, tienen un pico de transición de brushita a monetita en 186 °C y otro pico de transición de monetita a pirofosfato cálcico en 427 °C. El pico de deshidratación parcial de la brushita en torno a 130 °C es despreciable. Estos datos de DSC confirman la composición de brushita del

cemento aunque la ligera disminución de las temperaturas de transición demuestra la presencia de impurezas en el cemento como el  $\beta$ -TCP y sales de glicolato. En los cementos fraguados con 1M de ácido glicólico, éste constituye un 2,3 % del peso seco del cemento y al calentar hasta 170 °C, se pierde el peso relativo al ácido glicólico (la temperatura de degradación del ácido glicólico es de 76 °C) además de un 2,4 % de peso relativo a pérdida de moléculas de agua.

Los picos endotérmicos de los cementos fraguados con ácido acético son muy parecidos a los de la brushita pura 190,2 °C y 432,6 °C. Además los cementos no tienen ninguna pérdida significativa de peso cuándo fueron calentados hasta 170 °C. Estos datos reflejan la pureza del la brushita obtenida así como el bajo contenido de agua libre en la estructura del cemento.

En cambio los DSC de los cementos fraguados con ácido cítrico tienen 3 picos endotérmicos 113 °C, 183 °C y 409 °C. Los picos a 183 °C y 409 °C se deben a la transformación de la brushita en monetita y después en pirofosfato cálcico, los cuales se encuentran a menor temperatura que los picos de la brushita pura (192 °C y 433 °C) debido a la presencia de impurezas. Los picos a 113 °C y 183 °C varían de intensidad de forma inversiva en función de la concentración de ácido o la fracción polvo líquido empleados en la reacción de fraguado. Los picos de 113 °C son más intensos al aumentar la concentración de ácido cítrico en la fase líquida del cemento. La difracción de rayos X en función de la temperatura refleja que el pico endotérmico a 113 °C no se debe a la transformación de brushita en monetita, por lo que la causa de este pico endotérmico es la pérdida parcial de agua de la estructura del cemento. Posiblemente el agua de la superficie de los cristales de brushita y el agua adherida a las moléculas de ácido cítrico. Esto significa que los cementos fraguados con ácido cítrico tienen mas afinidad al agua impidiendo la deshidratación parcial de la brushita que ocurre alrededor

de 113 °C.

Las muestras de cemento fraguadas con ácido cítrico 1M y P/L = 2,56 perdieron un 8,3 % de su peso original cuando fueron calentadas hasta 170 °C. El ácido cítrico representa el 5,8 % del peso seco del cemento y tiende a formar un monohidrato uniéndose a moléculas de agua que aumentan el peso seco del cemento en un 0,5 %. El ácido cítrico se deshidrata a 135 °C y se descompone a 175 °C. Los picos endotérmicos en la región de 140 °C y 170 °C corresponden a esa deshidratación y descomposición de este ácido, mientras que el pico a 113 °C y 180 °C corresponden a la deshidratación de la brushita. Estos datos indican que el ácido cítrico inhibe notablemente la deshidratación parcial de la brushita.

Los estudios calorimétricos reflejan que solo el ácido glicólico y el ácido cítrico fueron capaces de aumentar la cantidad de agua libre en el cemento mientras que el ácido acético no. Este factor está relacionado con la capacidad de interacción de los ácidos  $\alpha$ -hidroxi con las moléculas de agua mediante puentes de hidrógeno. Por ejemplo, los iones de glicolato pueden formar complejos con los iones calcio y 4 moléculas de agua [145]. Las moléculas con grupos carboxi asociadas a grupos OH tienen un efecto inhibitorio sobre la reacción de fraguado de los cementos de fosfato cálcico [8, 61, 88]. Por ello los ácidos carboxílicos  $\alpha$ -hidroxi como el cítrico, el maléico, el tartárico, el málico y el succínico tienen un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los cristales de carbonato de calcio mientras que el ácido acrílico (no  $\alpha$ -hidroxi y más parecido al acético) carece de esta propiedad [155]. Esto se debe a que los ácidos carboxi  $\alpha$ -hidroxi tienen mayor afinidad sobre el calcio de la superficie de los cristales que sobre los iones calcio libres en solución, sin embargo, el ácido acrílico, al interaccionar con los iones calcio de la solución pierde solubilidad y precipita rápidamente sobre los cristales de carbonato de calcio y acelera

la cristalización. Algo parecido le ocurre al ácido acético ya que tiene un efecto acelerador sobre las reacciones de fraguado del cemento, mientras que los ácidos  $\alpha$ -hidroxi cítrico y glicólico, inhiben la reacción mediante interacciones con las superficies de los cristales de brushita.

El ácido cítrico es un agente reductor de agua en la mezcla de fraguado de los cementos de fosfato calcio debido a su alta afinidad por el agua lo que hace que se pierda muy poco agua durante la mezcla del polvo del cemento con el líquido [122]. Mediante los análisis de DSC y de pérdida de peso por la temperatura hemos demostrado que el ácido glicólico y el cítrico mantienen su alta afinidad por el agua aun estando en la estructura del cemento fraguado.

## 5.2. Cementos fraguados con geles de sílice

La sílice es un material biocompatible con propiedades osteoconductoras y su aplicación en los cementos de fosfato cálcico levanta un especial interés como agente que facilita la inyección y manipulación de los mismos [29]. Por este motivo hemos analizado el efecto que tiene añadir gel de sílice al cemento de brushita sobre el tiempo de fraguado, las propiedades mecánicas y la microestructura.

Los geles de sílice fueron preparados como se explica en el apartado 4.1.2.2 y las muestras de cemento se realizaron mezclando dichos geles con el polvo del cemento tal como se describe en los apartados 4.1.1 y 4.1.4. Los cementos fueron preparados con  $P/L = 2,56$ .

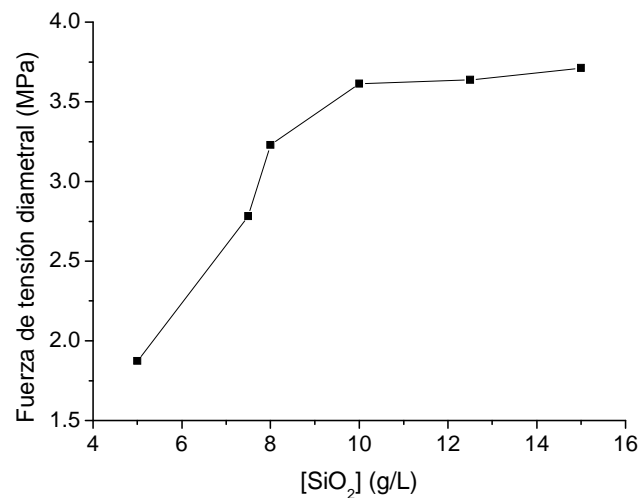
Utilizando geles de sílice en el fraguado del cemento de brushita se obtuvieron cementos fluidos con una textura más cohesionada. Las propiedades mecánicas y tiempo de fraguado y estructura cristalográfica fueron estudiados en función de la cantidad de gel de sílice añadido al cemento.

### 5.2.1. Fuerza de tensión diametral

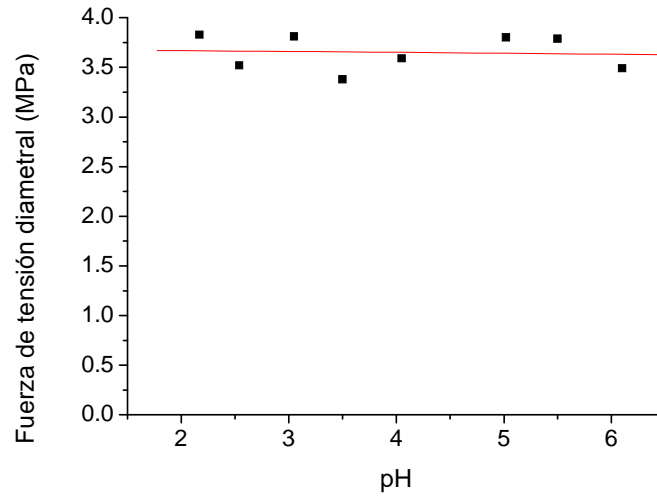
Las muestras de cemento con distintas concentraciones de sílice se mantuvieron a temperatura y humedad ambiente. Los cementos preparados con más de 10 g/L de sílice en la fase líquida tuvieron las mayores fuerzas de tensión diametral que alcanzaron el valor de 3,71 MPa (ver figura 5.2-1). Por encima de la concentración de

15 g/L de sílice, el gel fue demasiado hidrofílico e incapaz de donar las moléculas de agua necesarias para completar la reacción de fraguado, dando lugar a cementos secos difíciles de manejar. Además, se analizaron los cementos producidos usando una concentración de sílice 15 g/L, con diferentes pH, y se observó que la influencia del pH sobre la fuerza de tensión diametral es poco significativa cuando se utilizan geles y soluciones de sílice con pH entre 6,0 y 2,0, tal como se ilustra en la figura 5.2-2.

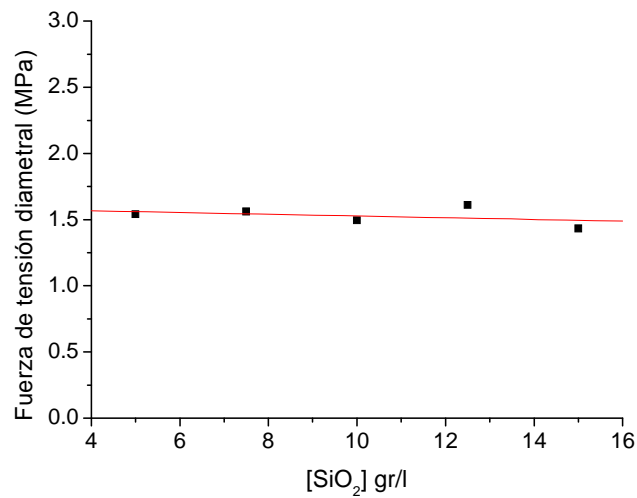
Simulando las circunstancias fisiológicas, se hicieron ensayos para detectar la influencia del grado de humedad sobre el cemento, dejando las muestras una vez fraguadas 24 horas en agua a 37 °C, antes de ser analizadas. Se observó que el gel de sílice apenas afectaba las propiedades mecánicas de los cementos cuando estos se encuentran en un medio similar al fisiológico, tal como se ve en la figura 5.2-3.



**Figura 5.2-1.** Fuerza de tensión diametral en función de la concentración de gel o solución de sílice con pH fijo a (5,5). Las muestras se mantuvieron a temperatura y humedad ambiente.



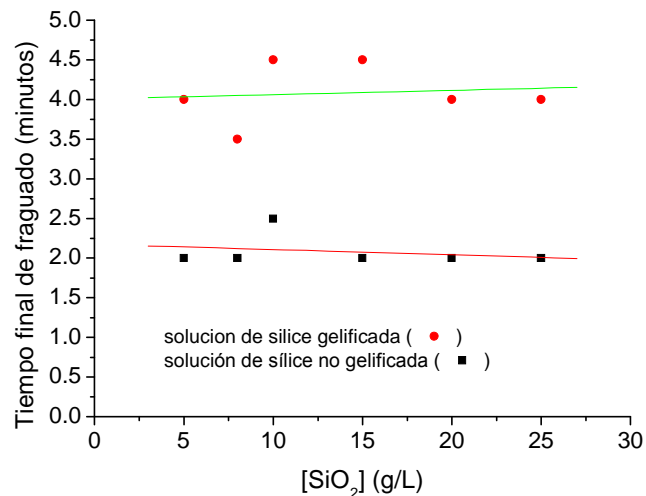
**Figura 5.2-2.** Relación entre la fuerza de tensión diametral de los cementos fraguados con gel de sílice 15 g/L y el pH de la fase líquida empleada en el fraguado del cemento. Como se observa, el pH de los geles empleados apenas influye sobre la fuerza de tensión diametral del cemento en el rango estudiado.



**Figura 5.2-3.** Fuerza de tensión diametral en función de la concentración de solución de sílice sin gelificar con pH fijado a (5,5). Las muestras se mantuvieron en un medio de humedad 100 % y temperatura 37 °C después del fraguado del cemento.

### 5.2.2. Tiempo final de fraguado

La figura 5.2-4 muestra el efecto de la sílice en el tiempo de fraguado. Cuando se añade la sílice en forma de solución antes de completar la gelificación, el tiempo de fraguado (2 min) es considerablemente menor que cuando se añade la sílice gelificada (4 min). Además como puede verse en la figura 5.2-4, la concentración de sílice, en el rango 5 g/L a 30 g/L, apenas influye en el tiempo de fraguado. Los datos de la tabla 5.2.I. indican que el uso del gel de sílice no parece afectar al tiempo de fraguado de los cementos de brushita, ya que con los geles se obtienen valores similares a los conseguidos con agua destilada o con soluciones de ácido fosfórico (2M).



**Figura 5.4-4.** Tiempo de fraguado del cemento en función de la concentración de sílice añadida en la fase líquida del cemento (sílice gelificada y sílice no gelificada).

**TABLA 5.2.I.**

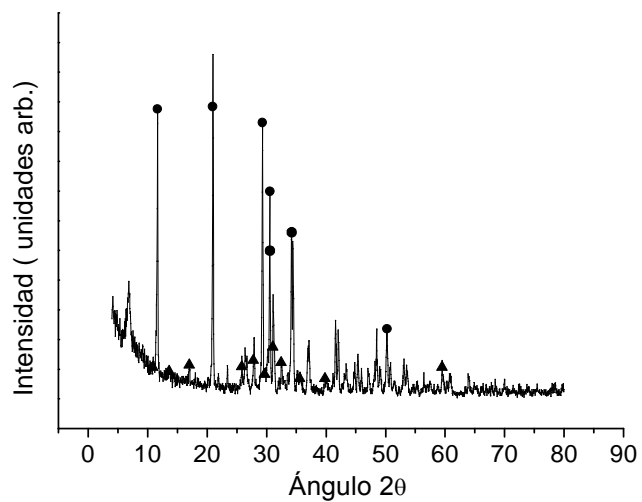
Tiempo de fraguado de los cementos al usar ácido fosfórico, agua destilada y gel de sílice.

Tipo de solución	pH	Tiempo de fraguado final minutos
2M H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	>1	3 min
H <sub>2</sub> O	6,0-5,5	4 min
SiO <sub>2</sub> (5g/L) gel	6,0-5,5	4 min
SiO <sub>2</sub> (8g/L) gel	6,0-5,5	3 min
SiO <sub>2</sub> (10g/L) gel	6,0-5,5	4 min
SiO <sub>2</sub> (15g/L) gel	6,0-5,5	3,5 min
SiO <sub>2</sub> (20g/L) gel	6,0-5,5	4 min
SiO <sub>2</sub> (25g/L) gel	6,0-5,5	4 min

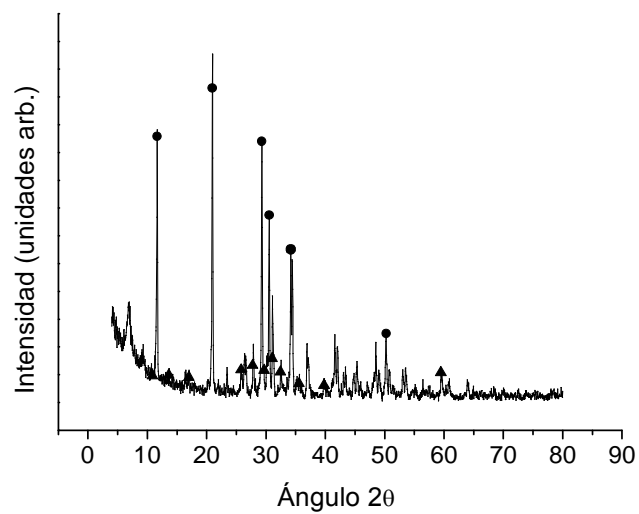
### 5.2.3. Microestructura de los cementos

#### 5.2.3.1. Difracción de rayos X:

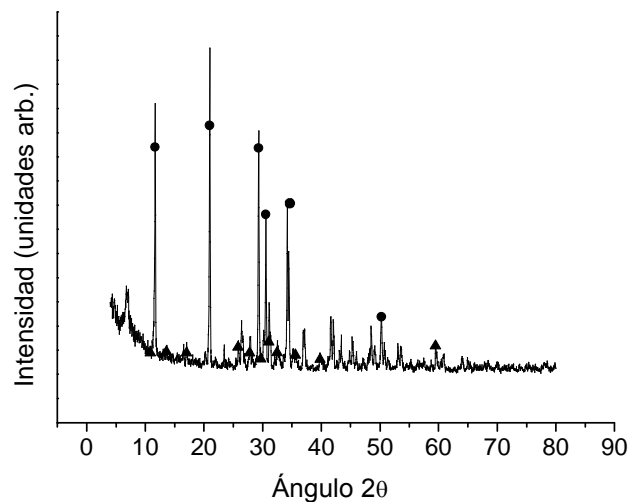
En las figuras 5.2-5, 5.2-6 y 5.2-7 se presentan algunos diagramas de difracción de rayos X de los cementos que fraguaron usando gel de sílice. Todas las muestras analizadas tienen un componente principal de brushita y pequeñas trazas  $\beta$ -TCP. El gel de sílice es amorfo y como su cantidad en el cemento fraguado es pequeña la intensidad del halo amorfo es mucho menor que la intensidad de los picos cristalinos y por ello no es visible en los difractogramas realizados.



**Figura 5.2-5.** Difractograma del cemento de brushita fraguado con gel de sílice  $[\text{SiO}_2] = 20 \text{ g/L}$  y  $\text{pH} = 6,0$ ; (●) Brushita (▲)TCP- $\beta$ .



**Figura 5.2-6.** Difractograma del cemento de brushita fraguado con gel de sílice  $[\text{SiO}_2] = 10 \text{ g/L}$  y  $\text{pH} = 5,7$ ; (●) Brushita (▲)TCP- $\beta$ .



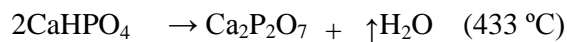
**Figura 5.2-7.** Difractograma del cemento de brushita fraguado con solución de sílice,  $[\text{SiO}_2] = 10 \text{ g/L}$  y  $\text{pH} = 2,3$ ; (●) Brushita (▲)TCP-β.

Del análisis de Rietveld a partir de los difractogramas de rayos X se obtuvieron los porcentajes en peso de las fases de  $\beta$ -TCP y brushita en los cementos (25 % y 75 % respectivamente). Se detecta una leve disminución en el porcentaje de brushita acompañada por un incremento de  $\beta$ -TCP a medida que se añaden geles más concentrados a la reacción de fraguado.

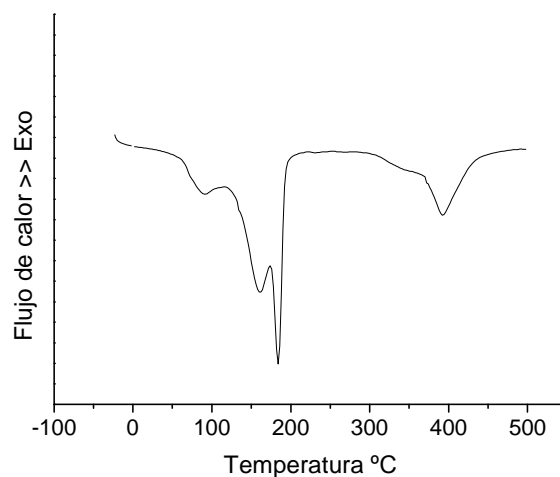
### 5.2.3.2. Calorimetría diferencial de barrido de las muestras de cemento

En las figuras 5.2-8 y 5.2-9 y 5.2.10, se muestran los gráficos de DSC de cementos preparados con 15 g/L de gel y diferentes tiempos de polimerización del gel. Estas curvas son características de la brushita, teniendo los dos picos endotérmicos específicos de la brushita a  $\approx 192^\circ\text{C}$  y  $\approx 433^\circ\text{C}$ , que corresponden a las reacciones químicas:

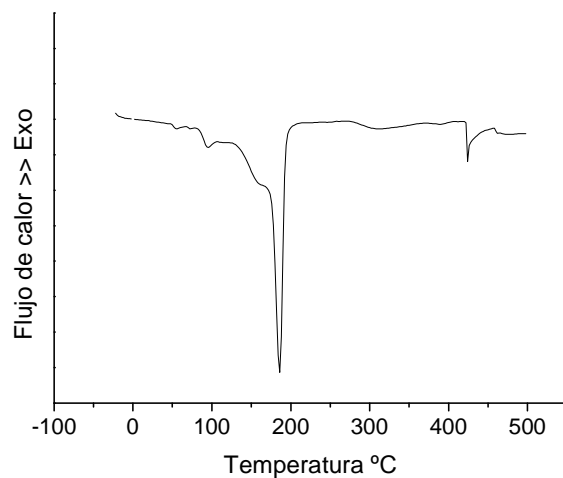
$$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CaHPO}_4 + \uparrow 2\text{H}_2\text{O} \quad (192^\circ\text{C})$$



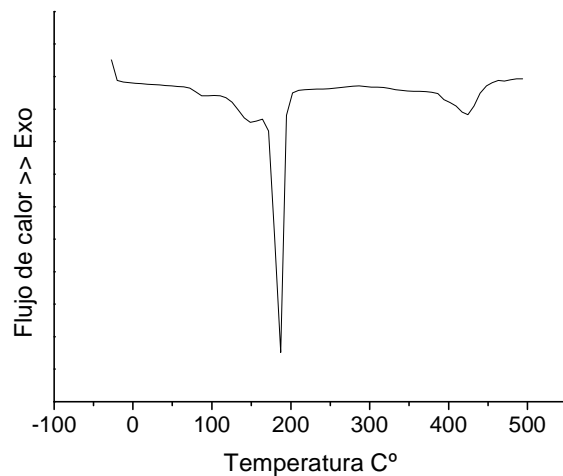
El pico alrededor de 100 °C esta relacionado con la evaporación de las moléculas libres de agua del gel. Este pico es más pronunciado en los cementos que fraguaron usando el gel de sílice con 24 h de polimerización, seguido por los que fraguaron usando una solución de sílice con 0 h de polimerización. Finalmente los que fraguaron con agua destilada tenían el pico de agua libre mas pequeño (figura 5.2-9), lo que parece indicar que el gel ayuda a retener agua en el cemento. Este fenómeno sugiere que el uso del gel de sílice, y en especial el que lleva 24 h gelificado, presenta una mayor afinidad por el agua. El mismo fenómeno se observa en el otro pico endotérmico a  $\approx 150$  °C que corresponde al agua en cluster dentro del gel o al agua superficial de los cristales de brushita.



**Figura 5.2-8.** Termograma de cemento fraguado con gel de sílice, 15 g/L pH (6-5,5), con 24 h de polimerización. El grafico muestra cuatro picos endotérmicos pronunciados, el primero alrededor de 100 °C relacionado con la evaporación de agua libre, el segundo a 150 °C relacionado con la evaporación del agua en cluster, el tercero a 180 °C corresponde a la transformación de brushita en monetita, y el cuarto a 430 °C corresponde a la transformación de la monetita en piro fosfato cálcico.



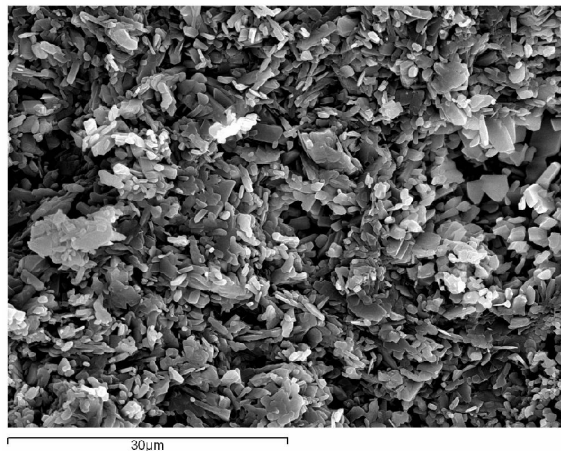
**Figure 5.2-9.** Gráfico de DSC de un cemento fraguado con una solución 15 g/L de sílice a pH (6-5,5) con 0 h de polimerización. Se observa un pequeño pico endotérmico alrededor de 100 °C provocado por el agua libre, otro pico a 180 °C indica la transformación de la brushita en monetita y un tercer pico a 430 °C relacionado a la formación de pirofosfato cálcico.



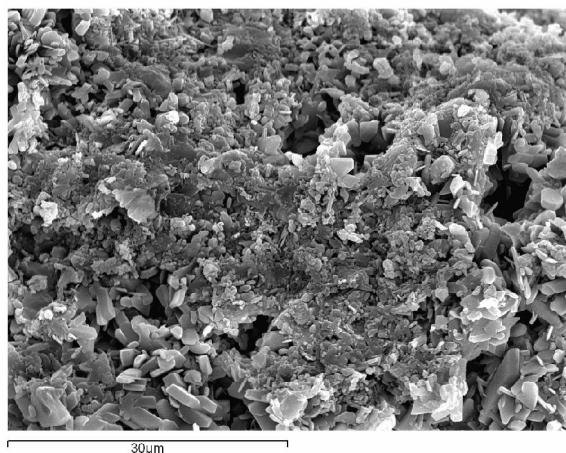
**Figura 5.2-10.** Grafico de DSC para un cemento fraguado con agua destilada a un pH (6-5,5), el gráfico muestra un pico endotérmico de evaporación de agua muy pequeño alrededor de 100 °C. Además también se ven los picos característicos de la formación de monetita y pirofosfato.

### 5.2.3.3. Microscopía electrónica de barrido

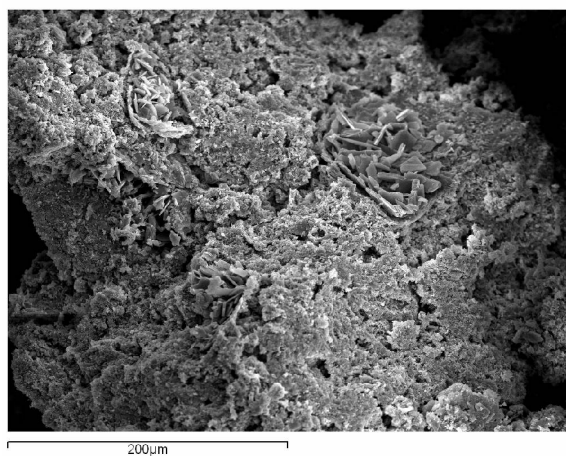
Como se muestra en la figura 5.2-11 los cristales de brushita están claramente separados y diferenciados cuando el cemento fragua empleando únicamente agua destilada. Por el contrario, cuando se utiliza el gel de sílice los cristales de brushita están más compactados. Las micrografías de los cementos fraguados con gel de (15 g/L, pH 6-5.5) y solución de sílice (15 g/L, pH 2) tienen una morfología compacta muy similar en ambos casos, debido a que se necesita aplicar mas fuerza con la espátula para mezclar los componentes del cemento (ver figuras 5.2-12 y 5.2-13).



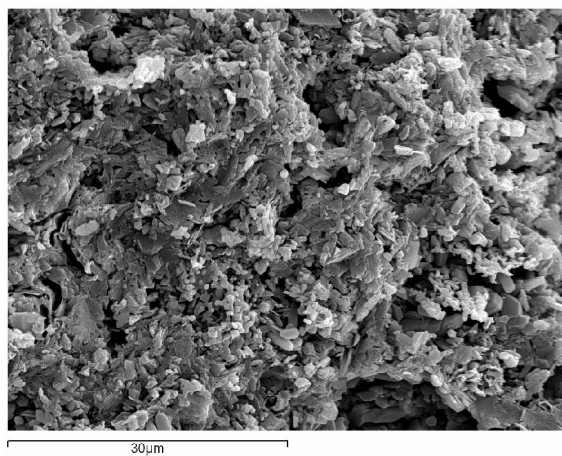
**Figura 5.2-11.** Micrografía de cemento fraguado con agua destilada (pH 6-5,5), amplificación x 2000.



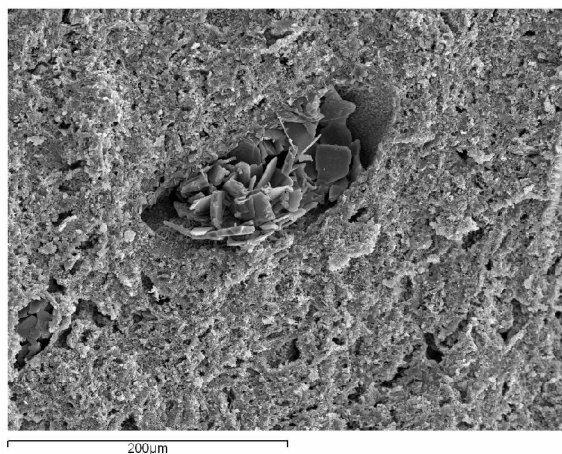
**Figura 5.2-12a.** Micrografía de Cemento fraguado con gel de sílice (15 g/L, pH 6-5,5),  
amplificación x 2000.



**Figura 5.2.12b.** Micrografía de cemento fraguado con gel de sílice (15 g/L, pH 6-5,5),  
amplificación x 300.



**Figura 5.2-13a.** Micrografía de cemento fraguado con solución de sílice (no gel) (15 g/L, pH 2),  
amplificación x 2000.



**Figura 5.2-13b.** Micrografía de cemento fraguado con solución de sílice (no gel) (15 g/L, pH 2),  
amplificación x 300.

#### **5.2.4. Discusión del efecto del gel de sílice sobre el cemento de brushita**

El uso de gel de sílice mejora las propiedades mecánicas del cemento sin afectar al tiempo de fraguado o a la composición cristalográfica final del mismo. Además, el gel de sílice mejora las propiedades del cemento aplicando un medio con un pH relativamente moderado 5,5 y 6. La mezcla y manejo del cemento que emplea gel de sílice en su composición es más fácil que cuando se usan soluciones líquidas. Por otro lado, al análisis de DSC revela una mayor afinidad del cemento por el agua al añadirle el gel de sílice aumentando la cantidad de agua libre en el cemento así como el agua en la estructura mejorando la hidrofiliidad del mismo. Además, los polímeros de geles de sílice tienen grupos hidrofóbicos también que pueden interactuar parcialmente con grupos hidrofóbicos moléculas involucradas en la regeneración tisular como lípidos, proteínas, interleuquinas, hormonas o factores de crecimiento. De hecho los geles de sílice se utilizan de manera rutinaria en cromatografía y HPLC para separar todo tipo de moléculas debido a su naturaleza hidrofílica e hidrofóbica [133].

La influencia de la sílice como agente promotor de la formación ósea es evidente a pesar de que no se conoce aun con exactitud su mecanismo funcionamiento [73]. El gel de sílice estimula la actividad osteoblástica *in vivo* y usando injertos de sílice los núcleos de neoformación ósea aparecen primero y mineralizan antes [1, 158]. Por eso ya se han empezado a desarrollar injertos óseos artificiales basados en sílice que forman más hueso *in vivo* que los basados en HAP [53].

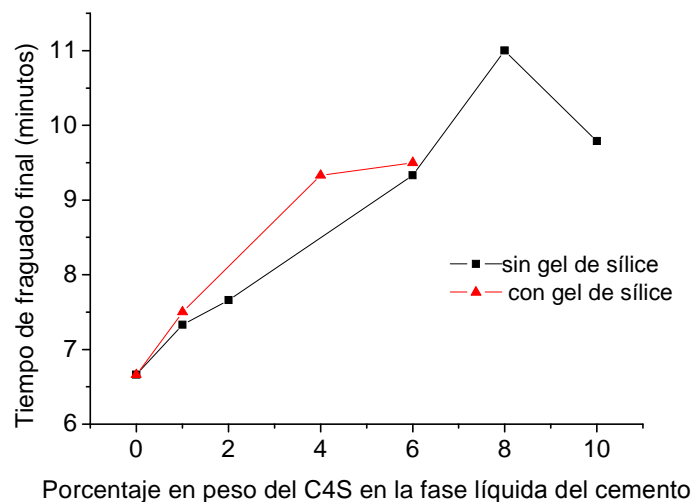
Resumiendo, el gel de sílice además de ser un aditivo económico y biocompatible, facilita el manejo de los cementos y podría mejorar las propiedades biológicas de los mismos *in vivo*.

### **5.3. Cementos fraguados con moléculas que estimulan la regeneración ósea: Condroitin sulfato.**

Tal y como se explica en el apartado (2.6.) el condroitin sulfato (C4S) es un polisacárido extracelular con propiedades osteoinductivas, que al mismo tiempo contiene una gran cantidad de grupos carboxi en su composición que pueden influir de manera positiva en la reacción de fraguado. Por estos motivos hemos realizado este estudio en el que analizamos el efecto que tiene el C4S sobre la reacción de fraguado. Para ello se mezcló el polvo de cemento descrito en el apartado (4.1.1.) con las soluciones de condroitin sulfato descritas en el apartado (4.1.2.2.). Las soluciones de condroitin sulfato fueron mezcladas con ácido cítrico para conseguir cementos con un manejo y tiempo de fraguado mas adecuados. A su vez, los cementos preparados con soluciones de C4S fueron comparados con cementos fraguados con 0,5 M de ácido cítrico, ya que esta solución ha demostrado en numerosos artículos mejorar considerablemente las propiedades de los cementos de brushita. También se prepararon cementos con geles de sílice y C4S. En todos los casos, el pH de la fase líquida se mantuvo a 4,1 y el P/L a 2,56.

### 5.3.1. Influencia del C4S sobre el tiempo de fraguado

En la figura 5.3-1 se representa el tiempo final de fraguado del cemento en función de la concentración de C4S para muestras preparadas con y sin gel de sílice. Como se ve en la figura 5.3-1 con pequeñas concentraciones de C4S (entre 1 y 8 %) se consigue prolongar el tiempo de fraguado del cemento, mientras que a concentraciones superiores al 8 %, el tiempo de fraguado disminuye. Como también puede verse en la figura 5.3-1 al añadir gel de sílice a la reacción, apenas cambia el tiempo de fraguado.

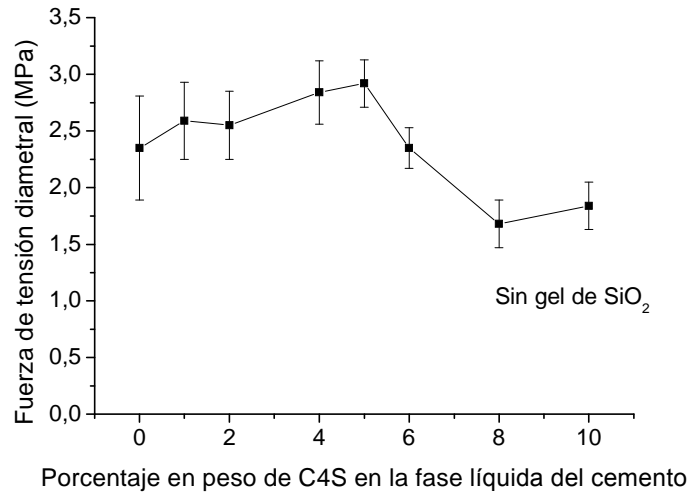


**Figura 5.3-1.** Tiempo de fraguado del cemento en función del contenido de C4S para muestras preparadas con gel de sílice (triángulos) y sin gel de sílice (cuadrados).

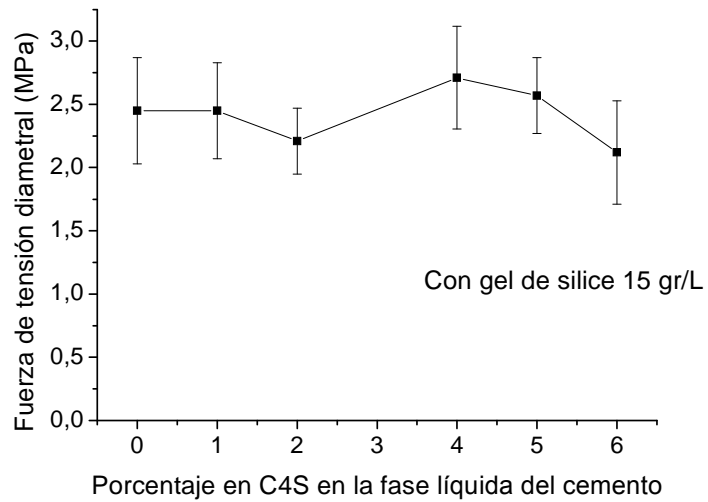
### 5.3.2. Propiedades mecánicas de los cementos con C4S

Se prepararon muestras de cementos con una fase líquida que contenía ácido cítrico (0,5 M) y C4S (0-10 % peso/ peso) pero sin gel de sílice. También se prepararon otros cementos con una fase líquida que contenía gel de sílice (15 g/L) aparte de ácido cítrico (0,5 M) y C4S (0-6 %). No fue posible preparar una pasta de cemento con una reacción de fraguado apropiada si empleábamos fases líquidas con concentraciones de C4S superiores al 10 % (para los cementos sin gel de sílice) y al 6 % (para los cementos con gel de sílice).

La dependencia de la fuerza de tensión diametral del cemento en función de la concentración de C4S se muestra en la figura 5.3-2a. Para cada concentración de C4S se prepararon 10 muestras distintas de cemento que fueron analizadas y se calculó la media y la desviación estándar. Como se ve en la figura 5.3-2a, la fuerza de tensión diametral aumenta levemente al añadir C4S en concentraciones de hasta 2 %, no obstante, después de este punto, la fuerza de tensión diametral del cemento sufre una reducción de hasta un 20 % de su valor original. El efecto del gel de sílice se muestra en la figura 5.3-2b, cuando se añade gel de sílice a la solución de C4S, la fuerza de tensión diametral se mantiene inalterada usando concentraciones de C4S inferiores al 6 %.



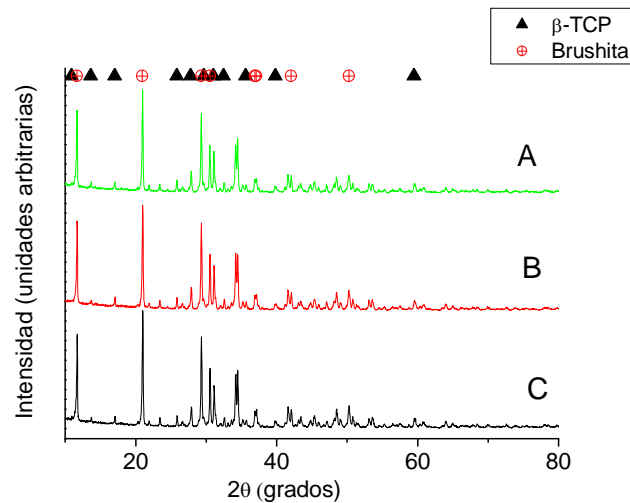
**Figura 5.3-2a.** Fuerza de tensión diametral del cemento fraguado con C4S en función de la concentración de C4S.



**Figura 5.3-2b.** Fuerza de tensión diametral en función de la concentración de C4S para las muestras preparadas empleando 15 g/L de gel de sílice en la fase líquida del cemento.

### 5.3.3. Difracción de rayos X en cementos con C4S

Como se ilustra en la figura 5.3-3, el análisis de difracción de rayos X indica que la composición del cemento después de completar la reacción de fraguado es brushita y  $\beta$ -TCP. No se detectaron picos de intensidad relacionados con otros componentes. Con el análisis de Rietveld obtuvimos los porcentajes en peso del  $\beta$ -TCP y de la brushita en los cementos sintetizados y los resultados se dan en la tabla (5.3.I). Se observa que el cemento con C4S tiene una composición aproximada de 25 %  $\beta$ -TCP y 75 %  $\beta$ -TCP. Se aprecia una reducción en el porcentaje de brushita acompañada con un subsiguiente aumento de  $\beta$ -TCP a medida que se introduce condroitin sulfato y gel de sílice en el cemento.



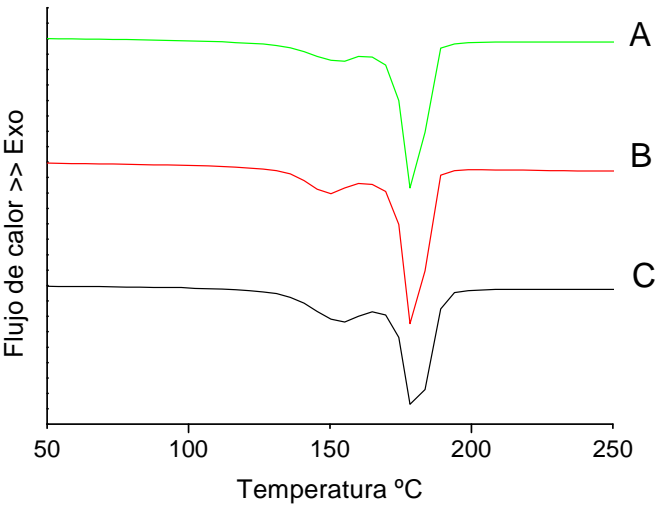
**Figura 5.3-3.** Diagrama de difracción de Rayos X correspondiente a las muestras de cementos que han fraguado utilizando las siguientes fases líquidas en la reacción de fraguado: A) 0,5 M ácido cítrico; B) 0,5 M ácido cítrico + 2 % C4S; y C) 0,5 M ácido cítrico + 2 % C4S + 15 g/L gel de sílice. Los triángulos negros corresponden a los picos de  $\beta$ -TCP y los círculos con cruces a los picos de brushita.

TABLA 5.3.I:

La composición del cemento fraguado con distintas combinaciones de ácido cítrico, C4S, y gel de sílice, tal como se obtiene del análisis de Rietveld.

Composición del cemento fraguado	Composición de la fase líquida del cemento		
	0,5 M ácido cítrico	0,5 M ácido cítrico + 2 % C4S	0,5 M ácido cítrico + 2 % C4S + 15 g/L SiO <sub>2</sub>
Brushita (porcentaje)	75 %	73 %	70 %
β-TCP (porcentaje)	25 %	27 %	30 %

5.3.4. Análisis con DSC



**Figura 5.3-4.** Curvas de DSC de los cementos después del fraguado: A) Muestra de cemento fraguado con ácido cítrico (0,5 M); B) Muestra de cemento fraguado con C4S (2 %) en una solución de ácido cítrico (0,5 M); y C) Muestras fraguadas con C4S (2%) y gel de sílice (15 g/L) en una solución de ácido cítrico al 0,5 M.

La cantidad de agua absorbida por los cementos con o sin sílice fue evaluada mediante la técnica de DSC. Como se puede ver en la figura 5.3-4a, el termograma de las muestras de cemento después del fraguado muestra dos picos endotérmicos, uno ancho alrededor de 140 °C relacionado a la pérdida parcial del agua de hidratación y otro bien definido a 180 °C asociado a la transición de fase del mineral. Se conoce que un 25 % del agua de hidratación de la brushita se pierde entre las temperaturas de 85 °C y 140 °C, un 50 % entre 115 °C y 170 °C y la deshidratación completa se consigue entre 130 °C y 240 °C, con una transición de fase en la que la brushita se transforma en monetita (ver ecuación 5.3.1a y 5.3.1b) [9]. La deshidratación de brushita en monetita es un proceso de dos pasos asociado con dos picos endotérmicos en el DSC. En nuestros diagramas de DSC el pico a 140 °C está relacionado con la deshidratación parcial de la brushita (ecuación 5.3.1a) y el pico a 180 °C corresponde a la deshidratación total de la brushita y a la formación de monetita (ecuación 5.3.1b). El pico de 140 °C es más pronunciado en las muestras de cemento que fueron preparadas con C4S (ver figura 5.3.-4b) y aun mas pronunciado en los cementos que fraguaron con C4S y gel de sílice (ver Figura 5.3-4c).

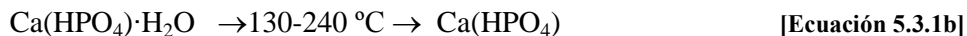
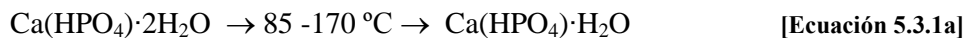


TABLA 5.3.II:

Entalpías y temperaturas de las transiciones que aparecen en las curvas de DSC de los cementos. La entalpía deriva como integración del área de los picos y la temperatura corresponde al máximo de los picos de las curvas de DSC.

Composición de la fase líquida del cemento	Entalpía del primer pico de deshidratación de brushita (J/g)	Entalpía del segundo pico de deshidratación de brushita y formación de monetita (J/g)	T <sub>m</sub> del primer pico endotérmico (°C)	T <sub>m</sub> del segundo pico endotérmico (°C)
0,5 M cítrico	26,2	428,9	153,7	179,5
0,5 M cítrico + 2 % C4S	36,0	382,7	148,5	179,7
0,5 M cítrico + 2 % C4S + 15 g/L gel de sílice	46,8	389,7	152,1	180,4

### 5.3.5. Discusión del efecto del C4S

En estudios recientes *in vivo*, se ha demostrado que al añadir C4S a cementos de HAP mejora la biocompatibilidad y bioactividad de los mismos [161]. En cementos de hidroxiapatita que contienen un 2 % de C4S en su fase líquida, se induce *in vivo* una disminución del número de células multinucleadas alrededor del material, mientras que aumenta el número de fibroblastos, fibras de colágeno y el crecimiento de vasos sanguíneos que se infiltran en la estructura porosa del cemento. Es más, si no se añade C4S o se usa en menores cantidades, los cementos son encapsulados por una capa densa de tejido conectivo fibroso [161].

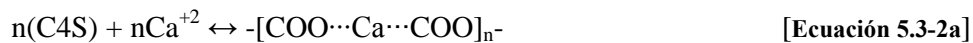
Hemos observado, que el uso de concentraciones moderadas de C4S prolonga la reacción de fraguado hasta duraciones aceptables de 9 minutos cuando la concentración de C4S fue de 6 %, y hasta 11 minutos con 8 % de C4S. Por encima de este punto no se obtiene mayor prolongación del tiempo de fraguado. En otros estudios, se ha descrito

que el C4S tiene un efecto directo sobre la cristalización de diversos fosfatos cálcicos como el oxalato de calcio monohidrato [106]. Se cree que debido al tamaño y alta densidad de carga, de las moléculas de los glucosaminoglicanos, como el C4S, inhiben la nucleación y el crecimiento de los cristales de HAP [21]. Con esta interpretación, la prolongación del tiempo de fraguado en el cemento sería una consecuencia del retardo de nucleación de la brushita.

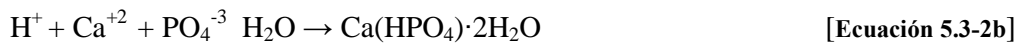
Yoshikawa *et al* demostraron que al añadir C4S a los cementos de fosfato cálcico de HAP mejoraba las propiedades del material en reconstrucciones periapicales, induciendo el crecimiento de los osteoblastos y de las células relacionadas con los osteoblastos [162]. En nuestro estudio demostramos que la concentración máxima de C4S que se puede añadir a los cementos de fosfato cálcicos de brushita sin afectar negativamente sus propiedades mecánicas, ronda entre 5 % y 6 % de su fase líquida. La molécula del C4S tiene cargas eléctricas negativas que facilitan su adhesión a los cristales de brushita, contribuyendo así a la cohesión y agregación de los cristales manteniendo las fuerzas de tensión diametral del cemento. No obstante, cuando se añaden al cemento cantidades excesivas de C4S, la repulsión entre las cargas eléctricas negativas de las moléculas del C4S contribuirán a empeorar las propiedades mecánicas del cemento.

El C4S es un polisacárido que contiene dos grupos ionizables, el grupo carboxi y el grupo sulfato. Las soluciones y geles de C4S se prepararon siempre con un pH fijo en el valor  $\text{pH} = 4,1$ , asegurando así la completa ionización de los grupos sulfato, y la ionización parcial de los grupos carboxi [119]. Es conocido el hecho que los iones multivalentes de polielectrolitos flexibles pueden producir separaciones de fases y precipitaciones por la capacidad que tienen para hacer puentes de enlace [90]. Los

grupos sulfato y carboxi de la molécula del C4S interaccionan con los iones  $\text{Ca}^{+2}$  del cemento formando puentes salinos y creando un complejo polielectrolito durante la reacción de fraguado del cemento (ecuación 5.3-2a y 5.3-2b). Esta reacción procede principalmente de la interacción con los grupos ionizados de sulfato, de las cadenas de C4S con los iones de calcio, mientras que la interacción con los grupos carboxi es menos importante [153]. La unión del calcio con las cadenas de C4S es una unión débil y por ello, a medida que la reacción avanza, los iones de calcio se desasocian y reaccionan con los iones de fosfato para formar brushita ecuación 5.3-2b. Esta interacción inhibe parcialmente la reacción de fraguado del cemento, y por ello prolonga el tiempo de fraguado. No obstante, cuando se añaden cantidades mayores de C4S el equilibrio de la reacción es empujado hacia la derecha de la ecuación 5.3-2a, produciendo grandes cantidades de condroitin calcio sulfato que precipitan y aceleran la reacción de fraguado.



↓



Recientemente, los cementos de brushita han levantado gran interés debido a su alta velocidad de reabsorción. No obstante, *in vivo*, la brushita puede o bien disolverse y ser rápidamente eliminada por el organismo, o se puede hidrolizar y formar HAP que tiene una reabsorción mucho mas lenta [47]. La transformación de brushita en HAP es un proceso indeseado, y se han dedicado muchos estudios a prevenir este fenómeno. [15,113]. Por otro lado, durante el almacenamiento, la brushita tiende a deshidratarse con el tiempo formando monetita, este también es otro mineral indeseado ya que se

transforma rápidamente en HAP al entrar en contacto con el agua. El análisis de DSC muestra el paso crucial de deshidratación de la brushita del cemento y su transformación en monetita.

En los cristales de brushita existen dos tipos de moléculas de agua; las moléculas de agua absorbidas sobre la superficie de los granos de brushita, y las moléculas incorporadas dentro de la estructura del cristal de brushita. Por ello, la deshidratación *in vivo* de la brushita húmeda ocurre en dos pasos: i) Una reacción de superficie, que produce un estado intermedio con moléculas de agua liberándose de la superficie de los cristales de brushita. ii) Una termólisis, que incluye la liberación de las moléculas internas de la brushita y conduce a su descomposición final y formación de la monetita [143]. El estudio de DSC confirma esta interpelación y permite una estimación cuantitativa de las entalpías de transición de los dos tipos de moléculas de agua. El primer proceso de deshidratación es más pronunciado cuando se añadió C4S y gel de sílice al cemento porque estas moléculas previenen la deshidratación protegiendo la superficie de los cristales de brushita interaccionando con ella. No obstante, la entalpía del segundo proceso de deshidratación, que conlleva a la formación de monetita, disminuye levemente, indicando que probablemente los cristales de brushita están distorsionados por la incorporación de algunas moléculas de C4S en su estructura lo que facilita su transformación en monetita. Esto podría significar que el C4S protege la superficie de los cristales de brushita de la deshidratación, pero una vez que esta haya ocurrido, la transformación de fase en monetita se hará con mayor facilidad. La incorporación del gel de sílice tiene unas interesantes consecuencias en este aspecto ya que amortigua el efecto del C4S sobre la transformación de la brushita en monetita. Los geles absorben agua, y al parecer, los materiales obtenidos de la mezcla del cemento con C4S y gel de sílice son más hidroestables y tendrían mayor capacidad para interaccionar

con un amplio espectro de moléculas como las proteínas involucradas en la regeneración ósea.

## **5.4. Tratamiento de los cementos con SC-CO<sub>2</sub>**

En nuestro estudio hemos evaluado la posibilidad de utilizar la técnica de fluidos supercríticos de CO<sub>2</sub> (SC-CO<sub>2</sub>), como alternativa a las ya existentes, para esterilizar los cementos óseos de brushita y de polimetacrilato de metilo, y ver el efecto que tiene sobre las propiedades de los mismos.

Se utilizó SC-CO<sub>2</sub> en la esterilización de un cemento de brushita y de los componentes del cemento por separado. También se hizo un tratamiento de SC-CO<sub>2</sub> a un cemento de Metacrilato (Palacos®) (PMMA) para investigar el efecto del SC-CO<sub>2</sub> en dos materiales muy diferentes.

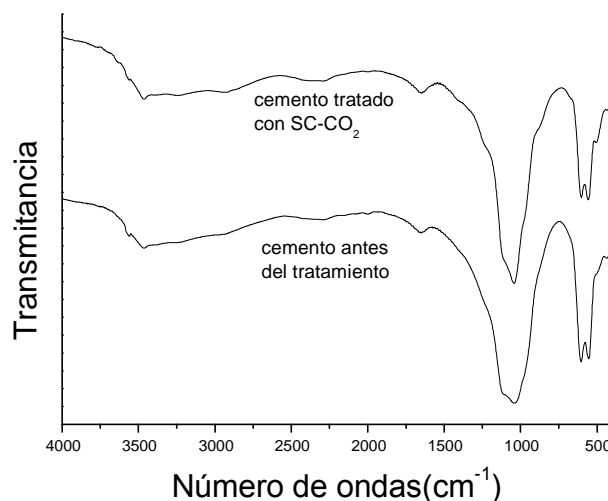
El cemento de brushita fue preparado como se explica en el apartado 4.1. y el tratamiento con fluidos supercríticos se realizó tal como se muestra en el apartado 4.1.3.

El análisis físico-químico de los cementos y sus componentes se hizo antes y después del tratamiento con SC-CO<sub>2</sub> tal como se describe en el apartado 4.2.1.

### **5.4.1. Cemento de brushita:**

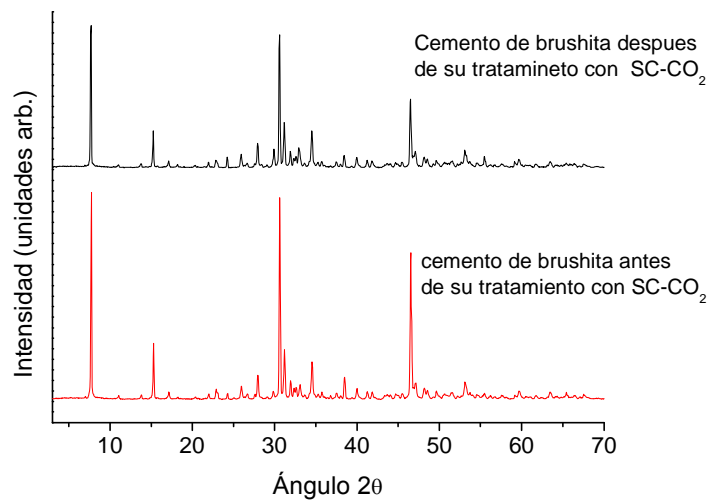
La fase sólida del cemento de brushita se preparó tal y como se describe en el apartado (4.1.) y fue tratada con SC-CO<sub>2</sub> (apartado 4.1.3) para evaluar esta técnica como posible método de esterilización de los cementos de brushita.

Como se muestra en la figura 5.4-1, el espectro FTIR de las muestras de cemento antes y después de su tratamiento con fluidos supercríticos apenas cambia, demostrando que el tratamiento de SC-CO<sub>2</sub> afecta poco a la composición química de los cementos de brushita.



**Figura 5.4-1.** Espectro FTIR de cemento de brushita antes y después de su tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>. Los picos más relevantes son los de los grupos PO<sub>4</sub><sup>-3</sup> alrededor de 1100 cm<sup>-1</sup> y 600 cm<sup>-1</sup>, además se observan unos pequeños picos a 1600 cm<sup>-1</sup> y 3500 cm<sup>-1</sup> relativos a pequeñas cantidades de agua en el material. Se observa una pequeña prolongación del pico en la zona de 1000 cm<sup>-1</sup> después del tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>.

Para comprobar la ausencia de cambios estructurales se realizaron medidas adicionales con difracción de rayos X en los cementos antes y después de su tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>. El patrón de difracción de rayos 5.4-2 del cemento antes y después de haber sido tratado con SC-CO<sub>2</sub> tiene los mismos picos característicos. Aunque la intensidad relativa de los picos de MCP esta ligeramente alterada.

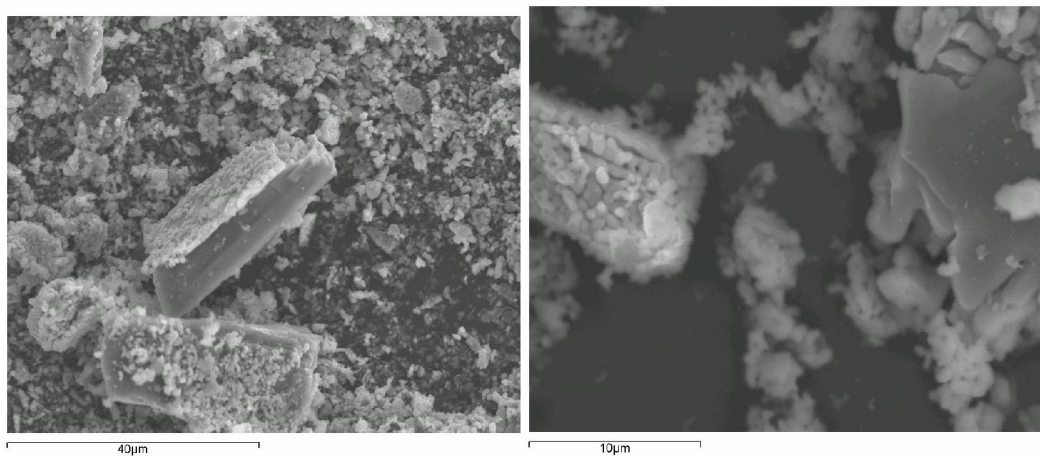


**Figura 5.4-2.** Diagrama de difracción de cementos de brushita antes y después de su tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>.

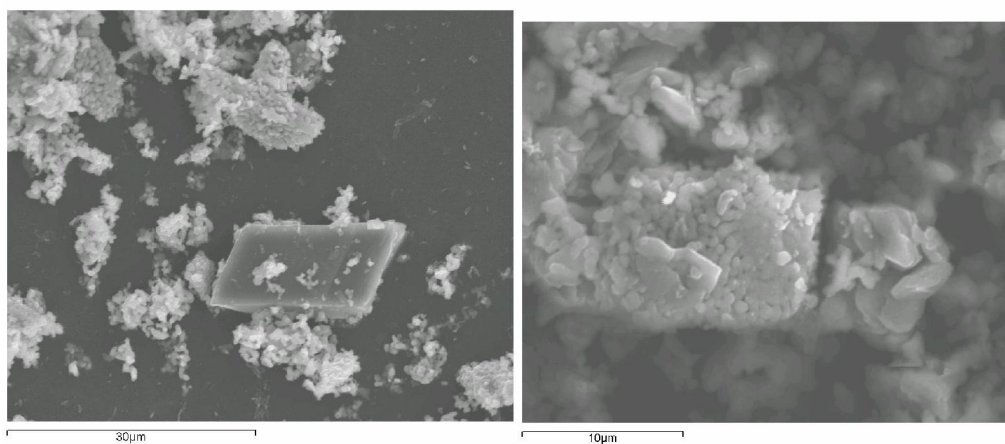
En las micrografías de SEM de las muestras de cemento, observamos que no hay diferencias en la morfología del cemento después de haber sido tratados con SC-CO<sub>2</sub>. Es posible diferenciar claramente los pequeños cristales redondeados de  $\beta$ -TCP y los cristales más grandes de MCP antes y después del tratamiento con SC-CO<sub>2</sub> (ver figuras 5.4-3 y 5.4-4).

#### **5.4.2. Componentes del cemento de brushita por separado:**

Se realizó un análisis físico químico de cada uno de los componentes del cemento por separado antes y después de haber sido tratados con los fluidos SC-CO<sub>2</sub>.



**Figura 5.4-3.** Micrografías de cemento antes del tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>



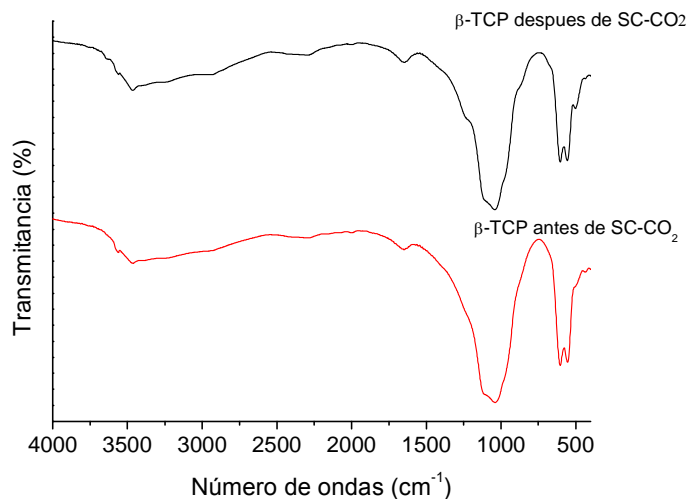
**Figura 5.4-4.** Micrografías de cemento después de haber sido tratado con SC-CO<sub>2</sub>.

#### 5.4.2.1. Fosfato tricálcico $\beta$ ( $\beta$ -TCP)

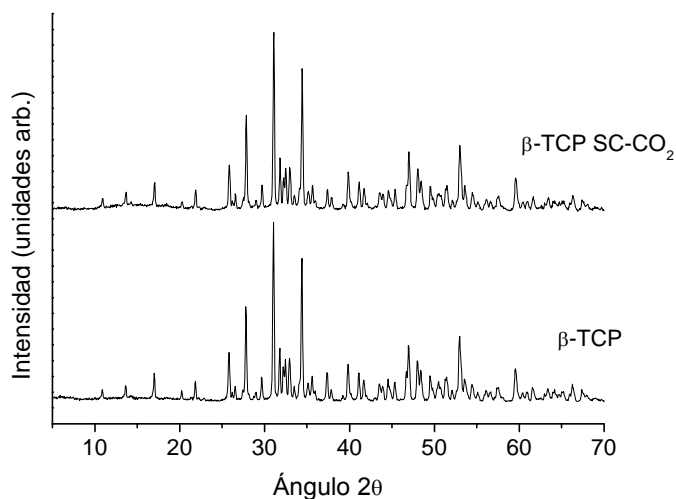
Los análisis de FTIR (Figura 5.4-5) y difracción de rayos X (Figura 5.4-6) realizados en  $\beta$ -TCP puro antes y después de haber sido tratados con los fluidos SC-CO<sub>2</sub> muestran que no se producen alteraciones en la estructura química ni tampoco en la estructura cristalográfica debido a dicho tratamiento. También se estudio si el tratamiento con SC-

CO<sub>2</sub> podría afectar al tamaño de partícula y para ello se utilizó la técnica de dispersión de luz. El análisis del tamaño de partícula con dispersión de luz indica que el tratamiento con fluidos SC-CO<sub>2</sub> no afecta significativamente la distribución de tamaño de partícula (ver tabla 5.4.I).

En las observaciones realizadas con SEM no se vieron cambios en la morfología debidos al tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>. Las estructuras pequeñas y redondeadas de los cristales de  $\beta$ -TCP eran reconocidas perfectamente antes y después del tratamiento (ver figura 5.4-7 y 5.4-8).



**Figura 5.4-5.** Espectro FTIR de  $\beta$ -TCP puro antes y después de su tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>. Se observan a 3500 cm<sup>-1</sup> y 1600 cm<sup>-1</sup> los picos de la humedad, y a 1100 cm<sup>-1</sup> y 600 cm<sup>-1</sup> los picos de los grupos PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.



**Figura 5.4-6.** Diagrama de difracción de rayos X de las muestras de  $\beta$ -TCP puro antes y después de su ser tratados con SC- $\text{CO}_2$

**TABLA 5.4.I.**

Distribución del tamaño de partículas de  $\beta$ -TCP antes y después de su tratamiento con SC- $\text{CO}_2$ .

$\beta$ -TCP	Media de los diámetros ( $\mu\text{m}$ )					Uniformidad
	D(v,0.1)	D(v,0.5)	D(v,0.9)	D[4,3]	D[3,2]	
No SC- $\text{CO}_2$	0,65	6,26	15,57	7,70	1,83	7,615E-01
SC- $\text{CO}_2$	0,61	6,00	14,32	7,27	1,78	7,273E-01

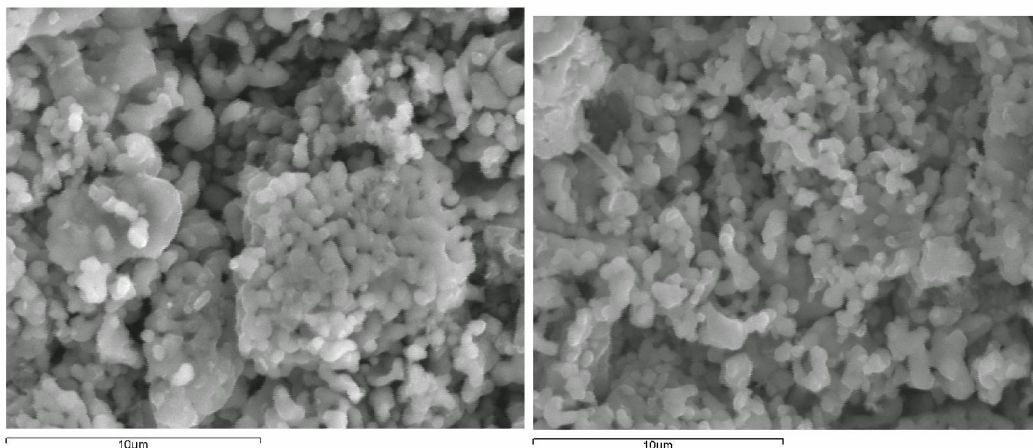
D(v,0.1): Percentil 0,1; 10 % de la población se encuentra por debajo de este valor.

D(v,0.5): Mediana del diámetro del volumen de las partículas.

D(v,0.9): Percentil 0,9; 90 % de la población se encuentra por debajo de este valor.

D[4,3]: Media del diámetro del volumen de la partícula.

D[3,2]: Media del diámetro de la superficie de la partícula.

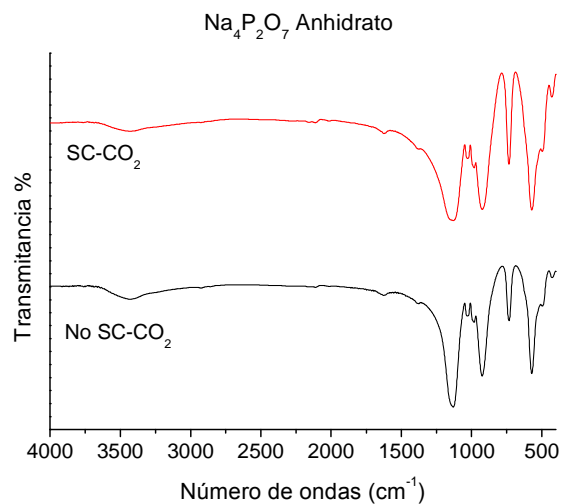


**Figura 5.4-7.** Micrografía de  $\beta$ -TCP puro antes su tratamiento con de SC-CO<sub>2</sub>

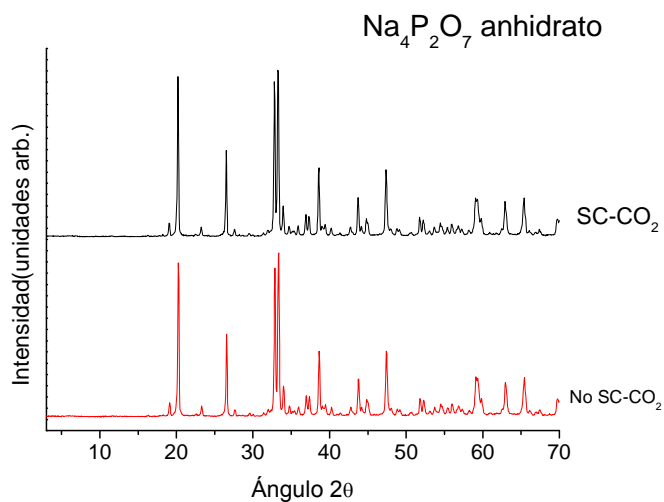
**Figura 5.4-8.** Micrografía de  $\beta$ -TCP puro después de su tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>

#### 5.4.2.2. Pirofosfato sódico ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ )

El Pirofosfato sódico anhidrato fue analizado antes y después de haber sido tratado con los fluidos SC-CO<sub>2</sub>. Los patrones de FT-IR y difracción de rayos X para el pirofosfato sódico antes y después del tratamiento fueron idénticos (ver figuras 5.4-9 y 5.4-10). Por otro lado, el análisis de dispersión de luz muestra una ligera reducción de tamaño de las partículas de pirofosfato sódico después del tratamiento con SC-CO<sub>2</sub> pero esta diferencia no fue significativa (ver Tabla 5.4.II.). Mediante las observaciones con SEM se podía ver que la morfología irregular de los cristales de pirofosfato sódico no fue alterada por los tratamientos con SC-CO<sub>2</sub> (ver figuras 5.4-11 y 5.4-12).



**Figura 5.4-9.** Espectro FTIR de muestra de pirofosfato puro antes y después de su tratamiento con SC- $\text{CO}_2$ . Se observan a 3500  $\text{cm}^{-1}$  y 1600  $\text{cm}^{-1}$  la absorbancia relativa al agua, y a 2200-2400  $\text{cm}^{-1}$ , 1100  $\text{cm}^{-1}$ , 800  $\text{cm}^{-1}$  y 500  $\text{cm}^{-1}$  la absorbancia relativa a los iones  $\text{HPO}_4^{-2}$ .



**Figura 5.4-10.** Difractograma de las muestras de pirofosfato antes y después del tratamiento con SC- $\text{CO}_2$ .

TABLA 5.4.II:

Distribución de partículas de muestras de piro fosfato sódico antes y después del tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>

Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>	Media de diámetros (µm)					Uniformidad
	D(v,0.1)	D(v,0.5)	D(v,0.9)	D[4,3]	D[3,2]	
No SC-CO <sub>2</sub>	2,06	7,59	16,93	8,75	3,89	6,041E-01
SC-CO <sub>2</sub>	1,55	4,91	15,15	7,13	3,24	8,965E-01

D(v,0.1): Percentil 0,1; 10 % de la población se encuentra por debajo de este valor.  
D(v,0.5): Mediana del diámetro del volumen de las partículas.  
D(v,0.9): Percentil 0,9; 90 % de la población se encuentra por debajo de este valor.  
D[4,3]: Media del diámetro del volumen de la partícula.  
D[3,2]: Media del diámetro de la superficie de la partícula.

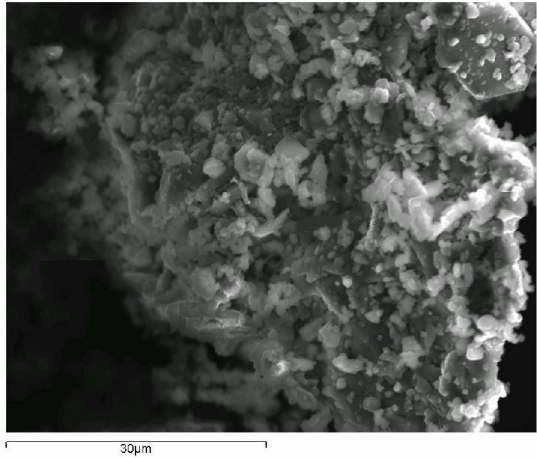


Figura 5.4-11. Micrografía Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> puro antes del tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>

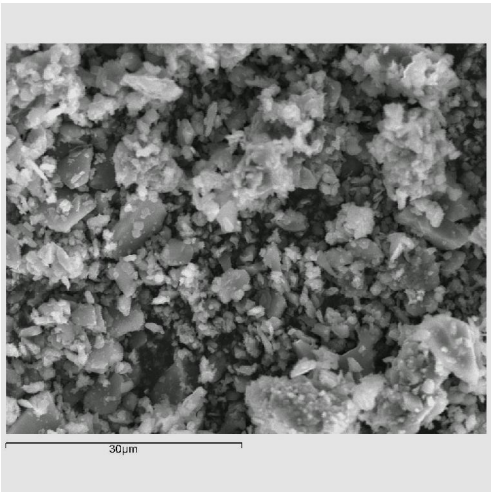


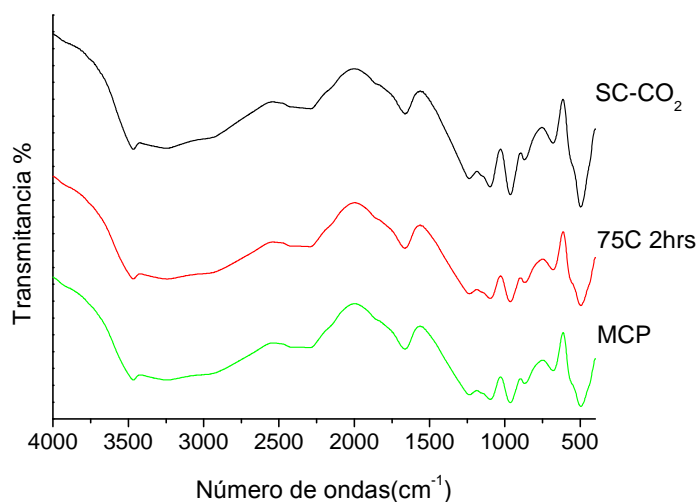
Figura 5.4-12. Micrografía de Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> puro después del tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>

5.4.2.3. Fosfato Monocálcico (MCP)

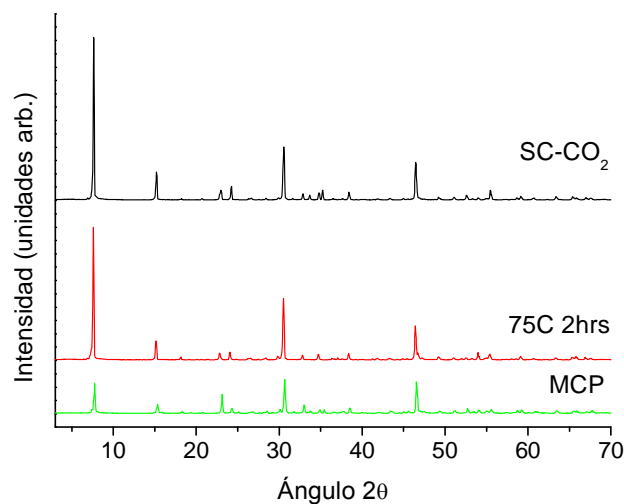
El espectro de FT-IR del MCP no se ve alterado por el tratamiento con SC-CO<sub>2</sub> tal como se muestra en la figura 5.4-13. Sin embargo el diagrama de difracción muestra algunas variaciones en la intensidad relativa de los picos tal como se muestra en la figura 5.4-14. Para descartar el efecto de la temperatura sobre estos cambios en el MCP, se realizaron difractogramas de las muestras de MCP que habían sido calentadas a 75 °C

2 horas, pero sin estar expuestas a fluidos supercríticos. Los análisis de difracción y FTIR mostraron que las muestras tratadas solo con temperatura tenían los mismos patrones de difracción y espectrofotometría que las que habían sido tratadas con SC-CO<sub>2</sub> siendo la temperatura la responsable de los cambios estructurales. Por eso concluimos que los fluidos supercríticos de dióxido de carbono no alteraran la estructura del MCP, y los cambios observados solo se deben al efecto de la temperatura.

El análisis con dispersión de luz demuestra que el tratamiento con SC-CO<sub>2</sub> no tiene ningún efecto significativo sobre el tamaño de las partículas de MCP (ver tabla 5.4.III). En las micrografías (SEM) del MCP podemos observar que después de haber sido tratados con SC-CO<sub>2</sub>, los cristales de MCP tienden a ordenarse mejor en el plano horizontal (ver figuras 5.4-15 y 5.4-16).



**Figura 5.4-13.** Espectro FTIR de muestras de muestras de MCP: sin tratar (-); tratadas solo con temperatura 75 °C 2 horas (-) y tratadas con SC-CO<sub>2</sub> (-). Se observa a 3500 cm<sup>-1</sup> y 1600 cm<sup>-1</sup> la absorbancia relativa al agua, y a 2200-2400 cm<sup>-1</sup>, 1100 cm<sup>-1</sup>, 800 cm<sup>-1</sup> y 500 cm<sup>-1</sup> la absorbancia relativa a los iones HPO<sub>4</sub><sup>-2</sup>.



**Figura 5.4-14.** Difractogramas de muestras de MCP: sin tratar (-); tratadas solo con temperatura 75 °C 2 horas (-) y tratadas con SC-CO<sub>2</sub> (-).

**TABLA 5.4.III:**

Distribución de tamaño de partícula de MCP antes y después de su tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>.

MCP	Media de diámetros (μm)					Uniformidad
	D(v,0.1)	D(v,0.5)	D(v,0.9)	D[4,3]	D[3,2]	
No SC-CO <sub>2</sub>	16,16	51,25	103,84	58,51	26,26	5,541E-01
SC-CO <sub>2</sub>	17,69	56,85	118,01	64,06	29,24	5,476E-01

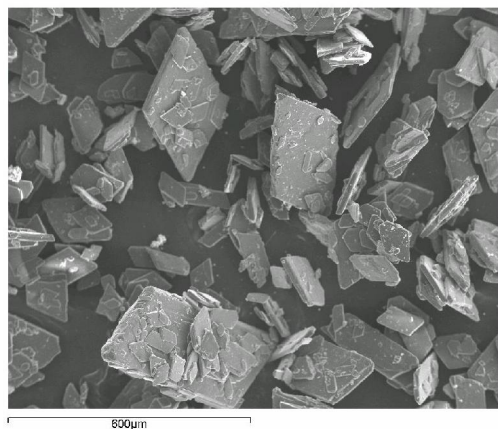
D(v,0.1): Percentil 0,1; 10 % de la población se encuentra por debajo de este valor.

D(v,0.5): Mediana del diámetro del volumen de las partículas.

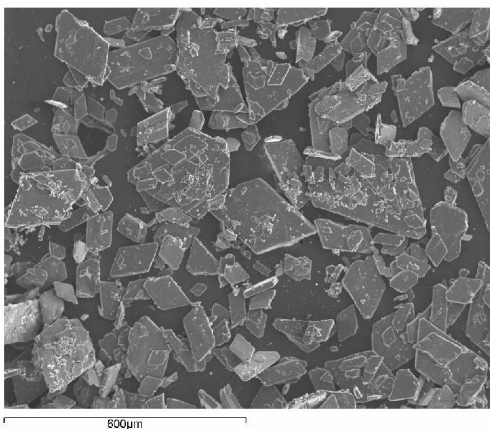
D(v,0.9): Percentil 0,9; 90 % de la población se encuentra por debajo de este valor.

D[4,3]: Media del diámetro del volumen de la partícula.

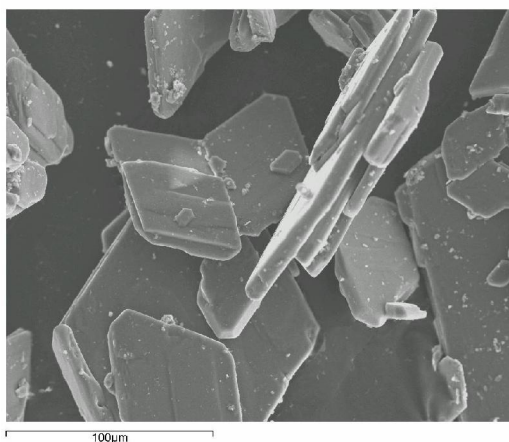
D[3,2]: Media del diámetro de la superficie de la partícula.



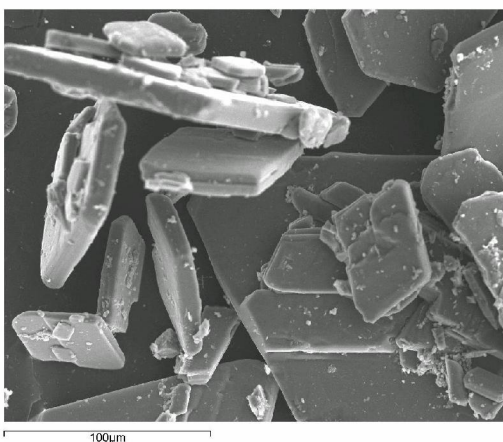
**Figura 5.4-15a.** Micrografía de cristales de MCP antes de ser tratados con SC-CO<sub>2</sub>.



**Figura 5.4-16a.** Micrografía de cristales de MCP después de ser tratados con SC-CO<sub>2</sub>.



**Figura 5.4-15b.** Micrografía de MCP antes su tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>.



**Figura 5.4-16b.** Micrografía de MCP después de su tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>.

### 5.4.3. Análisis mecánico antes y después del tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>.

Para evaluar el efecto del tratamiento con fluidos supercríticos sobre las propiedades mecánicas, las muestras de cemento tratadas con SC-CO<sub>2</sub> y sin tratar fueron mezcladas con una solución de ácido cítrico 0,5 M como ya hemos descrito en el capítulo de materiales y métodos. En esta ocasión la mezcla se hizo en un tubo Ependorf mediante un mezclador vortex. Las pastillas de cemento fueron almacenadas a humedad 100 % y 37 °C durante 24 horas antes de ser analizadas. De este modo conseguimos una mayor homogeneidad de las muestras y una menor dispersión de los valores entre las distintas pruebas con una desviación estándar más pequeña.

**TABLA 5.4.IV**

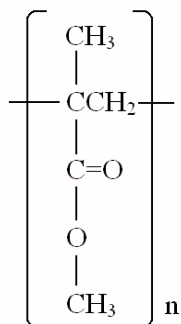
Fuerza de tensión diametral del cemento antes y después del tratamiento con SC-CO<sub>2</sub>

Tratamiento de la muestra	Fuerza de tensión diametral (MPa)	Desviación estándar	Error estándar
SC-CO <sub>2</sub>	2,62	0,44	0,11
No SC-CO <sub>2</sub>	2,66	0,31	0,10

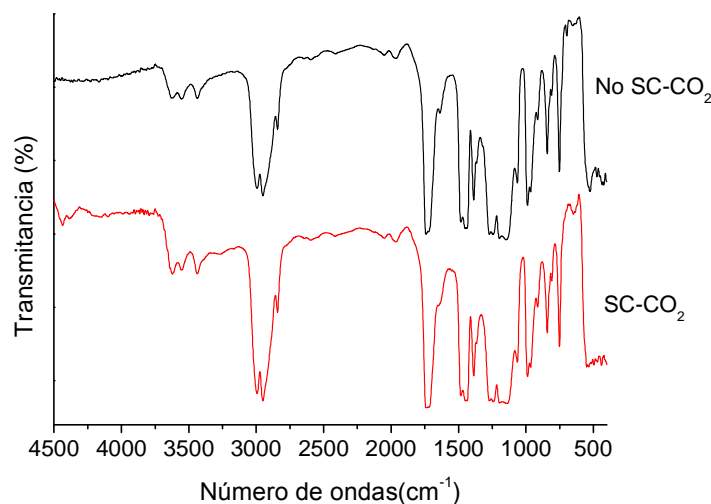
El análisis de la t de student a un nivel de confianza  $p = 0,05$  revela que no hay diferencias significativas en la fuerza de tensión diametral de los cementos tratados con los fluidos SC-CO<sub>2</sub> y los que no fueron tratados. Por ello se puede concluir que al tratar el cemento con fluidos SC-CO<sub>2</sub> no se alteran las propiedades mecánicas finales del cemento.

#### 5.4.4. Cemento de PMMA (M = 120kD)

Dados los resultados obtenidos con los cementos de brushita, se investigó si el tratamiento con SC-CO<sub>2</sub> podría extenderse a otros cementos óseos como el cemento de metacrilato de metilo.



En el gráfico de FTIR para metilmetacrilato se observan los picos de los grupos -CH<sub>3</sub> y -CH<sub>2</sub> alrededor de 3000 cm<sup>-1</sup>, -COO- entorno a 1700 cm<sup>-1</sup>, -COO-CH<sub>3</sub> a 1400 cm<sup>-1</sup> y C-O-C a 1200 cm<sup>-1</sup>. El análisis de FTIR revela que no hay alteraciones significativas en la estructura química del cemento de PMMA después de haber sido tratado con SC-CO<sub>2</sub> (ver Figuras 5.4.1.).



**Figura 5.4-16.** Comparación de los espectros de FTIR de PMMA con  $mw = 120.000$ . (-) sin tratar con  $SC-CO_2$  y (-) tratados con  $SC-CO_2$ .

#### 5.4.5. Discusión de la utilización de fluidos supercríticos en esterilización de cementos

En nuestro estudio se ha reportado por primera vez el efecto de los tratamientos con  $SC-CO_2$  sobre las propiedades físico químicas de los cementos óseos de fosfato cálcico. El análisis de difracción de rayos X revela que no hay cambios en la composición del cemento así como en la de sus componentes por separado después de ser tratados con  $SC-CO_2$ . Solo se pudo observar un pequeño cambio en los cristales de fosfato monocálcico relacionado con la temperatura de tratamiento. Además, las investigaciones de FTIR y SEM confirman que la estructura de los componentes del cemento no se ve alterada por el tratamiento con  $SC-CO_2$ . El análisis de dispersión de luz revela que no hay cambios sustanciales en el tamaño de las partículas del cemento excepto una pequeña reducción en tamaño de las partículas de pirofosfato después de ser tratadas

con SC-CO<sub>2</sub>. Por último, La fuerza de tensión diametral de los cementos de brushita no se ve afectada al tratar el polvo del cemento con fluidos supercríticos antes de ser inducido el fraguado del mismo.

Podemos concluir de nuestro estudio que los tratamientos con SC-CO<sub>2</sub> no producen variaciones significativas en la composición y estructura de los cementos de fosfato cálcico de brushita, y por ello pueden considerarse como una alternativa aceptable para esterilizar estos materiales.

## **5.5. Estudio Piloto de regeneración ósea con un granulado de cemento fraguado con ácido glicólico**

El objetivo final de este trabajo es desarrollar un nuevo biomaterial apto para la regeneración ósea odontológica, que sea biocompatible, osteoconductor, con buenas propiedades mecánicas y reabsorbible. Los cementos que hemos desarrollado con el condroitin sulfato y con el ácido glicólico tienen estas características pero como el condroitin sulfato es un material costoso, hemos decidido hacer una prueba biológica con los cementos preparados con ácido glicólico. Estos materiales tienen buenas propiedades mecánicas, están compuestos de sustancias biocompatibles, todos sus reactivos son baratos, y además el ácido glicólico tiene cierta actividad biológica que puede beneficiar el comportamiento del material *in vivo*.

El material empleado para regeneración ósea *in vivo* está compuesto de un polvo de cemento preparado tal como se describe en el apartado 3.1.1, y se mezcla con una solución de ácido glicólico 1 M y un P/L de 1,72 (apartados 3.1.2 y 3.1.3). El material ya fraguado se fragmentó mediante un mortero y se filtró con tamices para obtener un granulado con un rango de tamaños entre 200  $\mu\text{m}$  y 1.000  $\mu\text{m}$  que se empleó para regeneración ósea.

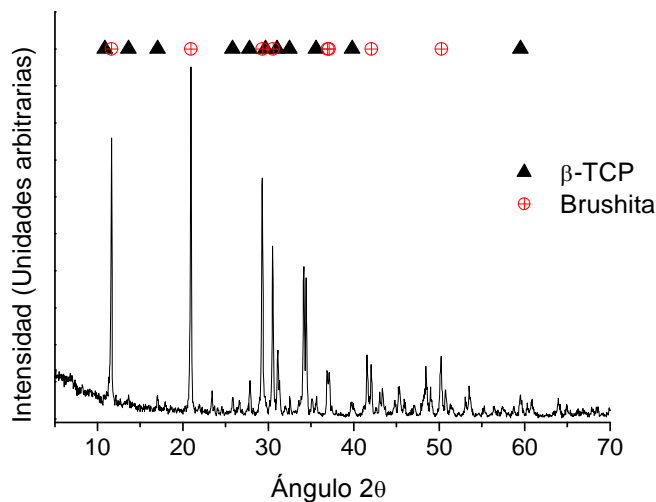
### **5.5.1. Caracterización del cemento seleccionado para los estudios *in vivo***

#### **5.5.1.1. Propiedades mecánicas**

Se midió la fuerza de tensión diametral del cemento en diez muestras y el valor fue de  $2,9 \pm 0,7$  MPa, este valor se encuentra en el rango que se describe en la bibliografía de 0,7 – 5,9 MPa para los cementos de brushita. [78, 14, 41].

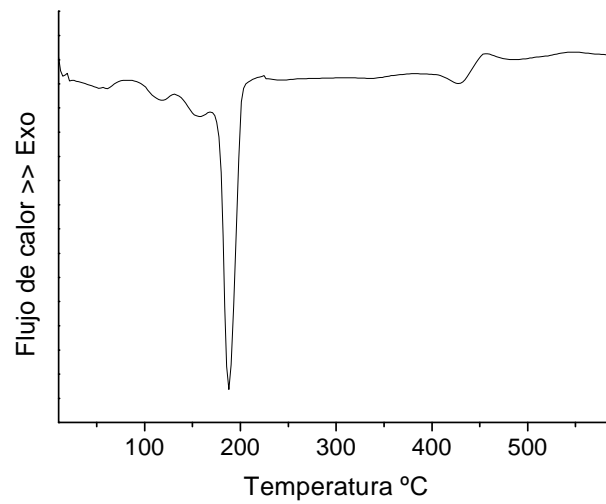
#### **5.5.1.2. Microestructura**

Para averiguar el efecto del GA sobre la microestructura del cemento fraguado se empleo el análisis de difracción de rayos X. Como se observa en la figura 5.5-1, a temperatura ambiente el patrón de difracción de rayos X muestra una composición de brushita y  $\beta$ -TCP. El análisis de Rietveld realizado a los difractogramas revela que los gránulos de cemento fraguado están constituidos de 83 % brushita y 17 %  $\beta$ -TCP. Por eso hemos denominado el cemento con las iniciales DCPD/ $\beta$ -TCP/GA.



**Figura. 5.5-1.** Diagrama de difracción de rayos X del cemento fraguado con una solución 1M de ácido glicólico y una proporción polvo líquido 1,72 g/ml. Los picos marcados con círculos cruzados corresponden a los cristales de brushita y los triángulos indican las reflexiones asociadas a los cristales de  $\beta$ -TCP.

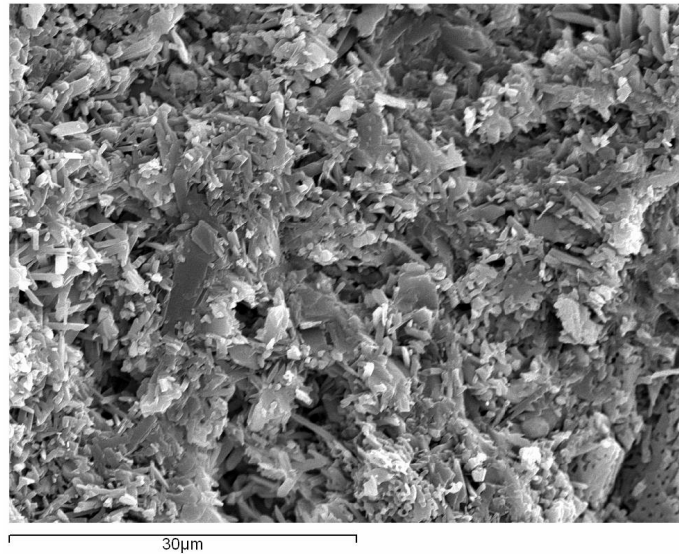
El estudio con DSC indica que la incorporación de glicólico afecta a la transición de brushita a monetita. Como se ve en la figura 5.5-2, el termograma del cemento DCPD/ $\beta$ -TCP/GA tiene cuatro picos endotérmicos a 117, 156, 187 y 450 °C. Los dos picos a 117 y 156 °C están relacionados con la deshidratación parcial de la brushita, mientras que el pico mas agudo a 187 °C corresponde a la transformación de la brushita en monetita (siguiendo la reacción química:  $2\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{CaHPO}_4 + 4\text{H}_2\text{O}$ ) y el pequeño pico endotérmico a 450 °C encaja con la de formación del pirofosfato cálcico. La gran intensidad del pico de 187 °C refleja la entalpía de transición de fase de la forma monoclinica de unidad de célula de DCPD a la unidad de célula triclinica de la monetita, y confirma la gran fracción de brushita en el cemento.



**Figura 5.5-2.** Curva de DSC para el cemento DCPD/ $\beta$ -TCP/GA, se observa un pico intenso a 187 °C que corresponde a la transformación de brushita en monetita.

### 5.5.1.3. Morfología del cemento por SEM

La morfología del cemento fraguado fue estudiada con SEM y el resultado se enseña en la figura 5.5-3. Puede verse que los cementos son muy porosos. Los cristales de brushita pueden ser identificados como las placas y las agujas puntiagudas. Los cristales de  $\beta$ -TCP son reconocidos como pequeños puntos redondeados entre los cristales de brushita.



**Figura. 5.5-3.** Micrografía tomada con SEM del cemento DCPD/ $\beta$ -TCP/GA. La micro estructura consiste de cristales grandes de brushita (agujas y placas) y los mas pequeños de  $\beta$ -TCP (pequeños puntos redondeados entre las agujas y placas).

### 5.5.2. Estudios *in vivo*

El granulado de cemento fue colocado en cámaras de titanio adaptadas al hueso de la calota en un modelo experimental animal tal y como se explica en el apartado 4.2.2.1. y se compararon con controles negativos. El material mostró un buen manejo intra quirúrgico y todos los animales se recuperaron bien de las cirugías sin registrarse complicaciones locales o generales.

#### 5.5.2.1. Densitometría

Mediante el análisis densitométrico se obtuvieron los valores del contenido mineral óseo (BMC) para los grupos control y experimental. La densidad mineral ósea (BMD) se calculó mediante la siguiente ecuación,

$$BMD = \frac{BMC}{Area}$$

donde los valores de BMC son expresados en gramos, los valores de BMD son dados en  $\text{g/cm}^2$  y el área es siempre  $0.25 \text{ cm}^2$ . Los resultados de la densitometría son presentados en las tablas 5.5.I y 5.5.II.

**TABLA 5.5.I.**

Valores BMD y BMC de las cámaras de titanio control de los siete Conejos.

Conejo	BMD( $\text{g/cm}^2$ )	BMC(g)
1	0,15	0,04
2	0,17	0,04
3	0,16	0,04
4	0,15	0,04
5	0,11	0,03
6	0,13	0,03
7	0,13	0,03

**TABLA 5.5.II.**

Valores BMD y BMC en las cámaras de titanio injertadas con el granulado de cemento.

Conejo	BMD( $\text{g/cm}^2$ )	BMC(g)
1	0,27	0,07
2	0,40	0,10
3	0,36	0,09
4	0,22	0,05
5	0,26	0,06
6	0,24	0,06
7	0,25	0,06

Como se ve en la figura 5.5-4. , la densidad mineral ósea es entre 1,5 y 2,5 veces más alta en todos los defectos tratados con los gránulos de cemento DCPD/  $\beta$ -TCP/GA. Se utilizo el análisis t de student para comparar las muestras experimentales con las controles como se ve en las tablas 5.5.III y 5.5.IV.

Al realizar el análisis t de student obtenemos que para un nivel significativo de  $p < 0,05$  el valor de  $t = 5,17$  y  $p = 2,3 \times 10^{-4}$  lo cual indica que las dos poblaciones son significativamente diferentes.

Las tablas 5.5.III. y 5.5.IV. muestran que los valores de BMD son significativamente superiores en las áreas experimentales en relación con las áreas controles ( $p < 0,05$ ).

**TABLA 5.5.III**

Análisis estadístico de los valores BMD para las áreas controles y experimentales

	Media	N	Desviación estándar	Error estándar de la media
BMD Control	0,14	7	0,02	0,01
BMD Experimental	0,29	7	0,07	0,03

TABLA 5.5.IV.

Análisis t de Student par alas diferencias de los valores BMD entre las áreas experimentales y las áreas controles.

	una población		Dos poblaciones
	Muestra BMD	Muestra BMD	Experimental vs. Control
	Experimental	Control	
Media	0,29	0,14	
Varianza	0,005	0,0004	
n	7	7	
t	0,011	- 0,0057	-5,1744
p	0,99	0,999	0,0002
Diferencia significativa	No	No	Si

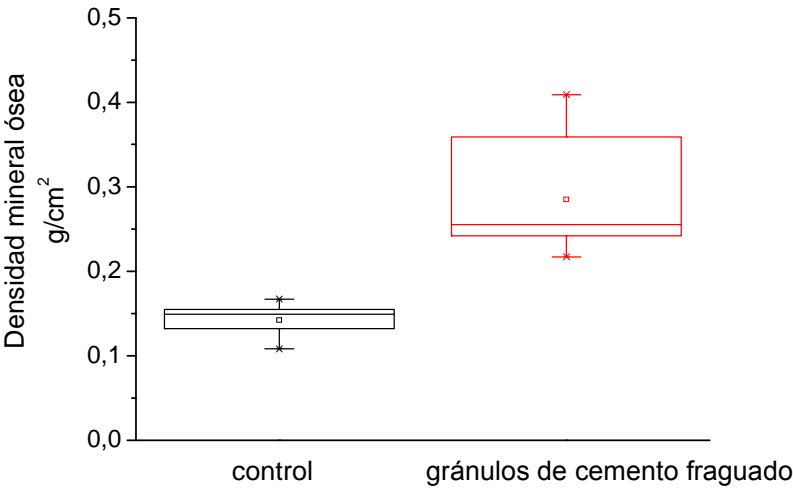
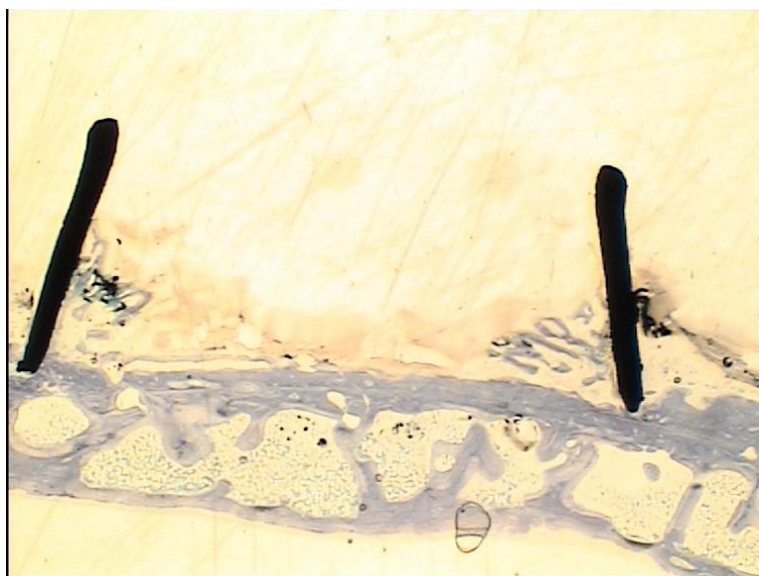


Figura 5.5.4. Ilustración del aumento de la densidad mineral ósea en los huesos tratados con el cemento en comparación con los controles.

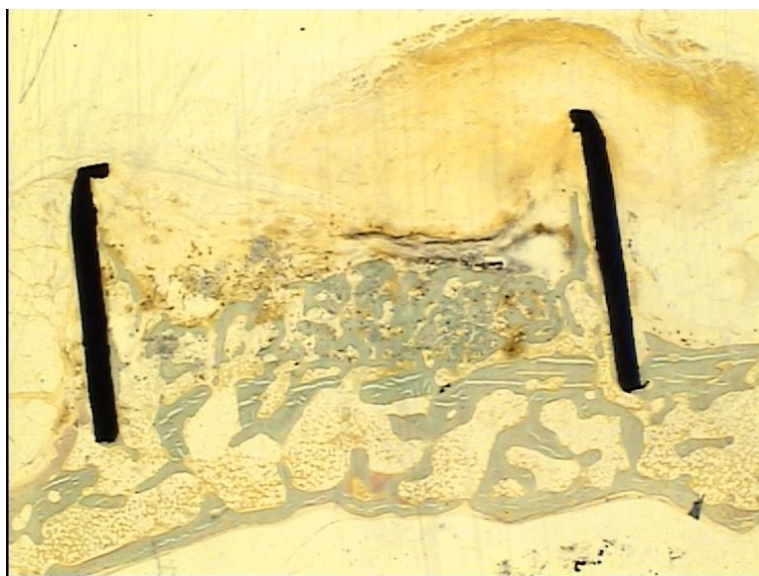
### **5.5.2.2. Estudios histológicos e histomorfométricos**

La histología de los defectos rellenos con el biomaterial revela una reabsorción de los gránulos de fosfato cálcico, con un subsiguiente rellenado de los espacios con hueso neoformado que esta en contacto directo con nuestro biomaterial revelando la biocompatibilidad y osteoconducción del mismo. Se puede observar también una regeneración ósea vertical a medida que el hueso crece desde la superficie original de los tejidos óseos hacia el interior del biomaterial (ver figura 5.5-6 y 5.5-7). Por otro lado, en las muestras control vacías, la formación ósea es muy poca si existe o despreciable (figura 5.5-5.).

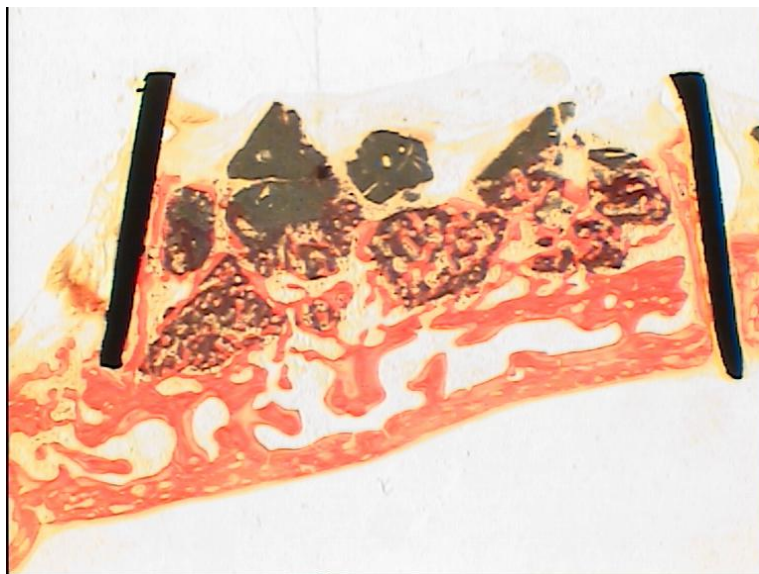
El análisis histomorfométrico de la neoformación ósea revela que hay una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control y el grupo experimental. La neoformación ósea en los defectos tratados con nuestro biomaterial era 3 veces mayor que en los defectos control. Ver figura 5.5-8 y tabla 5.5.V.



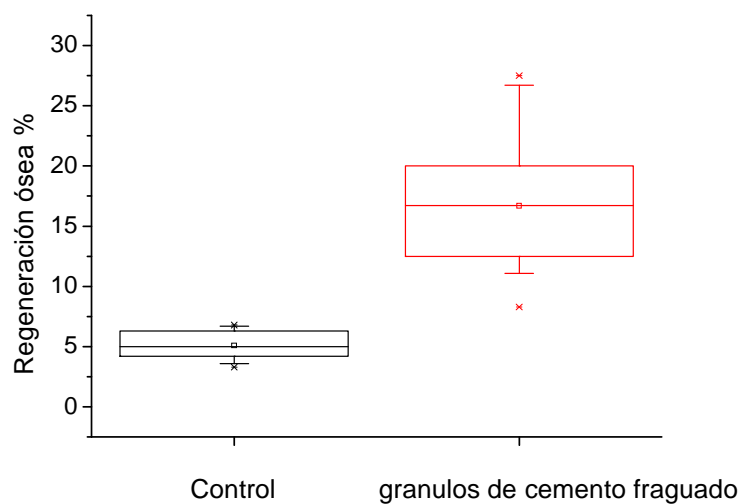
**Figura 5.5-5.** Micrografía óptica de un corte de una cámara de conducción ósea no injertada y teñida con TB. Se observa muy poco hueso reticular neoformado (azul claro) en las paredes de la cámara de osteoconducción de titanio (tiras negras).



**Figura 5.5-6.** Micrografía óptica de un corte de una cámara de conducción ósea injertada con el granulado DCPD/  $\beta$ -TCP/GA y teñido con TB. Se observa el hueso reticular neoformado (azul claro) creciendo densamente dentro de la cámara de osteoconducción (tiras negras).



**Figura 5.5-7.** Micrografía óptica de un corte con tinción HE para una cámara de conducción ósea injertada con los gránulos de cemento DCPD/  $\beta$ -TCP/GA. El nuevo hueso reticular inmaduro (rojo) penetra los restos de los gránulos de brushita (marrón oscuro) rodeados por la cámara de titanio (tiras negras).



**Figura 5.5-8.** Ilustración del aumento en la regeneración ósea en las muestras injertadas con nuestro biomaterial en comparación con los controles.

**TABLA 5.5.V.**

Análisis t de student para las diferencias en el porcentaje de regeneración ósea entre las muestras experimentales y controles.

	Una población		Dos poblaciones
	Muestra Experimental	Muestra control	Experimental vs. Control
Media	16,7	5,1	
Varianza	4,9	1,1	
n	21	21	
t	1,28083E-6	1,86983E-5	-11,09671
p	1,000	0,999	2,44984E-14
Diferencia significativa	no	no	si

### **5.5.3. Discusión de la utilización de los granulados de brushita para regeneración ósea**

Hoy en día los injertos de hueso autólogo siguen siendo los mejores materiales disponibles para regeneración ósea, no obstante el uso de otras alternativas es de gran importancia en situaciones donde la disponibilidad del hueso autólogo esta comprometida [10, 147].

Otras alternativas son los injertos de origen humano (aloinjertos) o animal (xenoinjertos), pero estos pueden causar problemas inmunogénicos de rechazo así como transmisión de enfermedades. El futuro prometedor de los injertos sintéticos (injertos aloplásticos) deriva de su capacidad de evitar estos riesgos además de ser más baratos [10].

Los injertos sintéticos de fosfato cálcico como HAP,  $\beta$ -TCP, y DCPD tiene un particular interés porque su composición es muy similar a la del hueso natural. La HAP es la más biocompatible de este grupo, pero tiene el inconveniente de ser muy poco reabsorbible *in vivo*. El  $\beta$ -TCP es considerado superior a los aloinjertos y xenoinjertos comúnmente utilizados como el hueso desmineralizado y liofilizado DFDB y es más económico [18, 149]. El  $\beta$ -TCP es considerado por muchos el material sintético más adecuado para osteoconducción, sin embargo tiene una lenta reabsorción *in vivo* que dificulta su aplicación en procedimientos de regeneración ósea [137, 144, 149, 166]. El DCPD es biocompatible, osteoconductor y se reabsorbe mas rápido que el  $\beta$ -TCP permitiendo una neoformación ósea mas veloz. La mezcla de estos dos últimos minerales parece muy apropiada para aplicaciones biomédicas en regeneración ósea [59]. Las fracciones de 83 % (peso) DCPD y 17 % (peso)  $\beta$ -TCP obtenidas por el cemento DCPD/ $\beta$ -TCP/GA que hemos sintetizado encaja en la predicción previamente mencionada, combinando unas buenas propiedades mecánicas con buenos resultados de regeneración ósea.

Los cementos con DCPD *in vivo* se transforman eventualmente en HAP a causa de la exposición a altas concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  al entrar en contacto con los tejidos óseos [47]. A pesar de que nuestro material tiene un alto contenido en brushita (83 %), y que la descomposición de la misma en HAP puede producir una acidificación local que compromete la regeneración ósea, la ausencia de reacciones inmunológicas o inflamatorias en nuestro experimento, indica que no ha ocurrido una intensa acidificación local. Atribuimos este resultado a la aplicación del cemento en forma de gránulos fraguados, que aportan una mayor área superficial para interaccionar con el medio local, facilitando la difusión de los iones hacia el medio fisiológico.

Cuando se emplean cementos de brushita o hidroxiapatita como injertos óseos, los cambios histológicos mas relevantes ocurren en las primeras 8 semanas después de la intervención [25]. La reabsorción completa del injerto necesita periodos de tiempo más largos (de hasta 30 semanas para el cemento” Norian SRS®) [59] pero se pueden obtener resultados positivos de las observaciones histológicas a partir de la 1ª, 2ª, 4ª y 8ª semanas. En nuestra investigación, hemos seleccionado el periodo de 4 semanas porque este era lo suficientemente largo como para observar diferencias significativas con los defectos control [16]. Gracias a los buenos resultados obtenidos en este experimento, en futuros experimentos permitiremos periodos más prologados de implantación para obtener más información sobre la regeneración ósea y el tiempo necesario para una completa reabsorción del injerto con este nuevo biomaterial.

El análisis estadístico de los datos obtenidos mediante la densitometría de rayos X, demuestra que empleando los gránulos DCPD/  $\beta$ -TCP/GA como injertos óseos se obtiene un aumento significativo de la densidad mineral ósea. Como la densidad mineral ósea puede estar sesgada por restos de gránulos no reabsorbidos se realizaron los estudios histológicos e histomorfométricos. Los análisis histológicos revelan que las cámaras de conducción ósea injertadas contienen un crecimiento óseo y un aumento vertical óseo estadísticamente significativo. Esto parece confirmar la biocompatibilidad y osteoconducción del biomaterial. Hemos observado una rápida reabsorción de los gránulos de cemento fraguado seguidos por una inmediata formación de hueso reticular en contacto directo con los restos no reabsorbidos de los gránulos. Después de 4 semanas de implantación, fuimos capaces de apreciar una significativa regeneración ósea con nuestro biomaterial, mientras otros materiales que contienen HAP o  $\beta$ -TCP necesitarían meses o incluso años para conseguir resultados similares [13]. Además, la velocidad de reabsorción de los gránulos parece ser similar a la velocidad de formación

ósea, como indica la ausencia de espacio entre el frente de hueso neoformado y el frente de reabsorción de los gránulos. Una reabsorción demasiado rápida podría comprometer la consistencia mecánica del nuevo tejido, provocando inestabilidad y reacciones inflamatorias que inhibirían el proceso de regeneración ósea [12].

La administración del cemento en forma de gránulos mejora su interacción *in vivo* con el medio local, y aporta unos mejores resultados de reabsorción. Es conocida la capacidad del ácido glicólico para estimular la secreción de citokinas como la interleukina 6 que estimula la actividad y desarrollo de los osteoclastos [11, 114]. Creemos que el ácido glicólico tiene un papel activo en la estimulación de la rápida reabsorción *in vivo* del biomaterial, a pesar de que esto debería ser demostrado en futuros estudios. Además la gran área superficial de los gránulos de cemento puede tener especial interés en desarrollar sistemas de liberación controlados. Los fosfatos cálcicos cerámicos son producidos a altas temperaturas, limitando su posible combinación con compuestos orgánicos mientras que los gránulos de cementos son producidos a temperatura ambiente [13]. De esta forma se pueden añadir antibióticos o sustancias osteoconductoras como factores de crecimiento durante la fase de síntesis, consiguiendo una liberación controlada de los mismos *in vivo* y aumentando las propiedades biológicas de estos injertos artificiales de fosfato cálcico.

El hueso puede ser reticular o laminar. El hueso reticular esta formado por fibras de baja fuerza que se ordenan rápidamente durante el crecimiento o la reparación ósea. Por el contrario, el hueso laminar es mucho mas fuerte porque se forma por fibras paralelas. El hueso reticular suele ser reemplazado eventualmente por hueso laminar a medida que el proceso de remodelado óseo continua [28]. Aquí estamos evaluando una fase temprana de regeneración ósea, por eso el hueso que vemos en las muestras injertadas

es hueso reticular. Es de esperar que permitiendo periodos más largos de implantación será posible ver la remodelación del hueso reticular en un hueso laminar más fuerte.

## 6. Conclusiones

---

### Conclusiones (Español):

- 1) La utilización del ácido glicólico en la síntesis de cementos de brushita permite obtener cementos con mejores propiedades mecánicas que aquellos preparados con ácido cítrico. El número de grupos carboxi en los ácidos orgánicos  $\alpha$ -hidroxi juega un papel fundamental en la prolongación del tiempo de fraguado del cemento.
- 2) El uso del gel de sílice mejora las propiedades mecánicas del cemento seco sin afectar al tiempo de fraguado o a la composición cristalográfica final del mismo. Además el gel de sílice aumenta la afinidad del cemento por el agua.
- 3) El empleo de C4S a bajas concentraciones, en la fase líquida del cemento de brushita permite prolongar el tiempo de fraguado sin alterar las propiedades mecánicas del material resultante, siendo la concentración más idónea la de 5 %.
- 4) El tratamiento con SC-CO<sub>2</sub> no afecta a las propiedades físico químicas de los cementos de brushita y de metacrilato, por lo que puede ser considerada su posible aplicación en la esterilización de los mismos.
- 5) El DCPD/ $\beta$ -TCP/GA es un material con buenas propiedades mecánicas, osteoconductor y biocompatible, que al aplicarse en forma de granulado facilita la difusión de las especies disueltas lo cual tiene tres ventajas fundamentales: i) mejora la reabsorción del biomaterial, ii) permite el rápido crecimiento óseo que rellena los espacios vacíos, y iii) disminuye los cambios locales del pH evitando reacciones inflamatorias y la transformación *in vivo* del DCPD en HAP.

### Conclusions (English):

1) Brushite cements prepared with glycolic acid solutions have better mechanical properties than those synthesized with citric acid. Furthermore, the number of carboxy groups in the  $\alpha$ -hydroxy acids plays an important role in prolonging the cement final setting time.

2) The use of silica gel improves the mechanical properties of brushite cements in dry environments without affecting the cement setting time or the crystallographic composition. Moreover, silica gel improves the cement water affinity.

3) The use of C4S in the cement liquid phase at low concentrations permits to prolong the cement setting time without affecting its mechanical properties, being the ideal concentration 5 % of the cement liquid phase.

4) The treatment with SC-CO<sub>2</sub> does not affect the physical chemical properties of brushite and methacrylate cements, therefore it could be considered for the sterilization of these materials.

5) DCPD/ $\beta$ -TCP/GA is a biocompatible novel material with good mechanical and osteoconductive properties that applied in form of granules present the following advantages: i) Better biomaterial resorption, ii) faster bone ingrowth, filling the empty spaces, and iii) reduction of the local pH changes preventing inflammatory reactions and the possible *in vivo* transformation of DCPD into HAP.

## 7. Bibliografía

---

1. **Anderson SI**, Downes S, Perry CC, Caballero AM. Evaluation of the osteoblast response to a silica gel in vitro. *J Mater Sci Mater Med*. 1998;9(12):731-5.
2. **Apelt D**, Theiss F, El-Warrak AO, Zlinszky K, Bettschart-Wolfisberger R, Böhner M, Matter S, Auer JA, von Rechenberg B. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 2004;25(7-8):1439-51.
3. **Aybar B**, Bilir A, Akcakaya H, Ceyhan T. Effects of tricalcium phosphate bone graft materials on primary cultures of osteoblast cells in vitro. *Clin Oral Implants Res*. 2004;15(1):119-25.
4. **Azaz B**, Gordon D, Shteyer A. The effect of exogenic chondroitin sulphate on healing of experimental bone fractures in rats. *Refuat Hapeh Vehashinayim*. 1974;23:75.
5. **Balart Gimeno R**, López Martínez J, García Sanoguera D, Parres García F. Técnicas experimentales de análisis térmicos de polímeros, Universidad Politécnica de Valencia, 1ª edición, 2003; p36.
6. **Barralet JE**, Grover LM, Gbureck U. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity . part II: hypodermic injection and strength improvement of brushite cement. *Biomaterials*. 2004;25(11): 2197-203.
7. **Barralet JE**, Hofmann M, Grover LM, Gbureck U. High strength apatitic cement by modification with  $\alpha$ -hydroxyl acid salts. *Adv. Mater*. 2003;15(24): 2091-95.
8. **Barralet JE**, Tremayne M, Lilley KJ, Gbureck U. Modification of calcium phosphate cement with  $\alpha$ -Hydroxy acids and their salts. *Chem Mater* 2005;17: 1313-19.

9. **Berend G**, Hegedüs AJ. Thermoanalytische untersuchung von sekundärem calciumphosphatdihydrat. *Thermochimica Acta* 1975;11:367-79.
10. **Betz RR**. Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics*. 2002;25(5):s561-70.
11. **Blair HC**, Robinson LJ, Zaidi M. Osteoclast signalling pathways. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;328(3):728-38.
12. **Blattert TR**, Delling G, Weckbach A. Evaluation of an injectable calcium phosphate cement as an autograft substitute for transpedicular lumbar interbody fusion: a controlled, prospective study in the sheep model. *Eur Spine J*. 2003;12(2):216-23.
13. **Bohner M**, Gbureck U, Barralet JE. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. *Biomaterials* 2005;26:6423-9.
14. **Bohner M**, Leimaitre J, Ring TA, Effect of sulfate pyro phosphate, and citrate ions on physiochemical properties of cements made of beta-tricalcium phosphate-phosphoric acid-water mixtures. *J Am Ceram Soc*. 1996;79(6):1427-34.
15. **Bohner M.**, Theiss F., Apelt D., Hirsiger W. , Houriet R. G. Rizzoli, Gnos E., Frei C., Auer J. A. and Von Rechenberg B.. Compositional changes of dicalcium phosphate dyhydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials* 2003;24:3463-74.
16. **Boo JS**, Yamada Y, Okazaki Y, Hibino Y, Okada K, Hata K, Yoshikawa T, Sugiura Y, Ueda M. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold. *J Craniofac Surg*. 2002;13(2):231-43.
17. **Brown PW**, Chow LC.A calcium phosphate water setting cement. *Cements research progress. Proceedings of the American Ceramic Society*. 1986;352-79

18. **Buser D**, Hoffmann B, Bernard JP, Lussi A, Mettler D, Schenk RK. Evaluation of filling materials in membrane-protected bone defects. A comparative histomorphometric study in the mandible of miniature pigs. *Clin Oral Implants Res.* 1998;9(3):137-50.
19. **Carmagnola D**, Adriaens P, Berglundh T. Healing of human extraction sockets filled with Bio-Oss<sup>®</sup>. *Clin Oral Impl Res.* 2003;14:137-43.
20. **Chaung HM**, Hong CH, Chiang CP, Lin SK, Kuo YS, Lan WH, Hsieh CC. Comparison of calcium phosphate cement mixture and pure calcium hydroxide as direct pulp-capping agents. *J Formos Med Assoc.* 1996;95(7):545-50.
21. **Chen CC**, Boskey AL. Mechanisms of proteoglycan inhibition of hydroxyapatite growth. *Calcif Tissue Int.* 1985;37(4):395-400.
22. **Chow LC**, Markovic M, Takagi S. A dual constant composition titration system as an in vitro resorption model for comparing dissolution rates of calcium phosphate biomaterials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2003;65(2):245-51.
23. **Chusei CC**, Goodman DW. Brushite  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  by XPS. *Surface Science Spectra.* 2001;8(1-4):39.
24. **Comuzzi L**, Ooms E, Jansen JA. Injectable calcium phosphate cement as a filler for bone defects around oral implants: an experimental study in goats. *Clin Oral Implants Res.* 2002;13(3):304-11.
25. **Constanz BR**, Barr BM, Ison IC, Fulmer MT, Baker J, McKinney L, Goodman SB, Gunasekaran S, Delaney DC, Ross J, Poser RD. Histological, chemical, and crystallographic analysis of four calcium phosphate cements in different rabbit osseous sites. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater).* 1998;43:451-61.

26. **Csizy M**, Buckley RE, Fennell C. Benign calcaneal bone cyst and pathologic fracture--surgical treatment with injectable calcium-phosphate bone cement (Norian): a case report. *Foot Ankle Int.* 2001;22(6):507-10.
27. **Cuneyt Tas A**, Bhaduri SB. Chemical Processing of  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  its conversion to hydroxyapatite. *J Am Ceram Soc.* 2004;87(12):2195-200.
28. **Currey JD**. The many adaptations of bone. *J Biomech.* 2003;36(10):1487-95.
29. **Delaney D**, Constantz B. Calcium phosphate cements prepared from silicate-phosphate solutions. Patente 2004;US2005009176.
30. **Dillow AK**, Dehghani F, Hrkach JS, Foster NR, Langer R. Bacterial inactivation by using near- and supercritical carbon dioxide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(18):10344-8.
31. **Donath K**, Breuner G. A method for the study of undecalcified bones and teeth with attached soft tissues. The Sage-Schliff (sawing and grinding) technique. *J Oral Pathol.* 1982;11(4):318-26.
32. **Douglass GL**. Alveolar ridge preservation at tooth extraction. *J Calif Dent Assoc.* 2005;33(3):223-31.
33. **Fages J**, Marty A, Delga C, Condoret JS, Combes D, Frayssinet P. Use of supercritical  $\text{CO}_2$  for bone delipidation. *Biomaterials.* 1994;15(9):650-6.
34. **Fages J**, Poddevin N, King MW, Marois Y, Bronner J, Jakubiec B, Roy R, Mainard D, Laroche G, Delagoutte JP, Guidoin R. Use of supercritical fluid extraction as a method of cleaning anterior cruciate ligament prostheses: in vitro and in vivo validation. *ASAIO J.* 1998;44(4):278-88.
35. **Fages J**, Poirier B. Viral inactivation of human bone tissue using supercritical fluid extraction. *ASAIO J.* 1998;44(4):289-93

36. **Fernandez E**, Vlad MD, Gel MM, Lopez J, Torres R, Cauich JV, Bohner M. Modulation of porosity in apatitic cements by the use of alpha-tricalcium phosphate-calcium sulphate dihydrate mixtures. *Biomaterials*. 2005;26(17):3395-404.
37. **Flautre B**, Leimatre J, Maynou C, Van Landuyt P, Hardouin P. Influence of polymeric additives on the biological properties of brushite cements:an experimental studies in rabbit. *J Biomed mater Res A*. 2003;66(2):214-23.
38. **Fray ME**, Bartkowiak A, Prowans P, Slonecki J. Physical and mechanical behavior of electron-beam irradiated and ethylene oxide sterilized multiblock polyester. *J Mater Sci Mater Med*. 2000;11(11):757-62.
39. **Gafni G**, Septierand D, Goldberg M. Effect of chondroitin sulfate and biglycan on the crystallization of hydroxyapatite under physiological conditions. *J Cryst Growth*. 1999;205(4):618-25.
40. **Gbureck U**, Barralet JE, Spatz K, Grover LM, Thull R. Ionic modification of calcium phosphate cement viscosity. Part I: hypodermic injection and strength improvement of apatite cement. *Biomaterials*. 2004;25(11):2187-95.
41. **Gbureck U**, Grolms O, Barralet JE, Grover LM, Thull R. Mechanical activation and cement formation of  $\beta$ -tricalcium phosphate. *Biomaterials*. 2003;24(23):23-4131.
42. **Gbureck U**, Knappe O, Grover LM, Barralet JE. Antimicrobial potency of alkali ion substituted calcium phosphate cements. *Biomaterials*. 2005;26(34):6880-6.
43. **Geurtsen W**. Biocompatibility of root canal filling materials. *Aust Endod J*. 2001;27(1):12-21.

44. **Ginebra MP**, Driessens FCM, Planell JA. Effect of the particle size on the micro and nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis. *Biomaterials*. 2004;25(17):3453-62.
45. **Graham J**, Pruitt L, Ries M, Gundiah N. Fracture and fatigue properties of acrylic bone cement: the effect of mixing method, sterilization treatment, and molecular weight. *J Arthroplasty*. 2000;15(8):1028-35.
46. **Grases F**, Ramis M, Costa-Bauza A. Effects of phytate and pyrophosphate on brushite and hydroxyapatite crystallization. Comparison with the action of other polyphosphates. *Urol Res*. 2000;28(2):136-40.
47. **Grover LM**, Knowles JC, Fleming GJ, Barralet JE. In vitro aging of brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*. 2003;24(23):4133-41.
48. **Guarnieri R**, Bovi M. Maxillary sinus augmentation using prehardened calcium sulfate: a case report. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2002;22(5):503-8.
49. **Guglielmi G**, Andreula C, Muto M, Gilula LA. Percutaneous vertebroplasty: indications, contraindications, technique, and complications. *Acta Radiol*. 2005;46(3):256-68. Review.
50. **Gunther K**, Scharf HP, Puhl W. In vitro toxicity tests of bioceramics and bone transplants in fibroblast culture *Biomed Tech (Berl)*. 1993;38(10):249-54.
51. **Hannink G**, Aspenberg P, Willem Schreurs B, Buma P. Development of a large titanium bone chamber to study in vivo bone ingrowth. *Biomaterials*. 2006;27(9):1810-6.
52. **Harper EJ**, Braden M, Bonfield W, Dingeldein E, Whalig H. Influence of sterilization upon a range of properties of experimental bone cements. *J Mater Sci Mater Med*. 1997;8(12):849-53.

53. **Heikkilä J.T.**, Aho AJ, Kangasniemi I, Yli-Urpo A. Polymethacrylate composites: disturbed bone formation at the surface of bioactive glass and hydroxyapatite. *Biomaterials* 1996;17:1755–60.
54. **Heini PF**, Berlemann U, Kaufmann M, Lippuner K, Fankhauser C, van Landuyt P. Augmentation of mechanical properties in osteoporotic vertebral bones--a biomechanical investigation of vertebroplasty efficacy with different bone cements. *Eur Spine J.* 2001;10(2):164-71.
55. **Heini PF**, Berlemann U. Bone substitutes in vertebroplasty. *Eur Spine J.* 2001;10 (S2):S205-13.
56. **Heini PF**, Franz T, Fankhauser C, Gasser B, Ganz R. Femoroplasty-augmentation of mechanical properties in the osteoporotic proximal femur: a biomechanical investigation of PMMA reinforcement in cadaver bones. *Clin Biomech.* 2004;19(5):506-12.
57. **Herman JH**, Sowder WG, Anderson D, Appel AM, Hopson CN. Polymethylmethacrylate-induced release of bone-resorbing factors. *J Bone Joint Surg Am.* 1989;71(10):1530-41.
58. **Herold H.Z.**, Tadmor A. Chondroitin sulphate in treatment of experimental bone defects. *Isr J Med Sci.* 1969;5(3):425-7.
59. **Herron S**, Thordarson DB, Winet H, Luk A, Bao JY. Ingrowth of bone into absorbable bone cement: an in vivo microscopic evaluation. *Am J Orthop.* 2003;12:581-4.
60. **Higashi S**, Ohsumi T, Ozumi K, Kuroki K, Inokuchi Y, Terashita M. Evaluation of cytotoxicity of calcium phosphate cement consisting of alpha-tricalcium phosphate and dicalcium phosphate dihydrate. *Dent Mater J.* 1998;17(3):186-94.
61. **Hofmann MP**, Lilley KJ, Gbureck U, Barralet JE. Carboxylic acid as brushite

- bone cement setting retardants. ESB2005, 19<sup>th</sup> European conference on biomaterials, Sorrento Italia. 2005;P418-411.
62. **Iozzo RV**, Naso MF, Cannizzaro LA, Wasmuth JJ, Mcpherson JD. Mapping of the versican proteoglycan gene (cspg2) to the long arm of human chromosome-5 (5q12-5q14). *Genomics*. 1992;14:845-851.
  63. **Isenschmid A**, Marison IW, von Stockar U. The influence of pressure and temperature of compressed CO<sub>2</sub> on the survival of yeast cells. *J Biotechnol*. 1995;39(3):229-37.
  64. **Ishikawa H**, Shimoda M, Shiratsuchi H, Osajima Y. Sterilization of microorganisms by the supercritical carbon dioxide micro-bubble method. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1995;59(10):1949-50.
  65. **Ishikawa H**, Shimoda M, Tamaya K, Yonekura A, Kawano T, Osajima Y. Inactivation of *Bacillus* spores by the supercritical carbon dioxide micro-bubble method. *Biosci Biotechnol Biochem*. 1997;61(6):1022-3.
  66. **Jensen OT**, Greer RO Jr, Johnson L, Kassebaum D. Vertical guided bone-graft augmentation in a new canine mandibular model. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10(3):335-44.
  67. **Jinlong N**, Zhenxi Z, Dazong J. Investigation of Phase Evolution During the Thermochemical Synthesis of Tricalcium Phosphate. *Journal of Materials Synthesis and Processing*. 2001;9(5):235-40.
  68. **Jovanovic SA**, Schenk RK, Orsini M, Kenney EB. Supracrestal bone formation around dental implants: an experimental dog study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 1995;10(1):23-31.
  69. **Keskin D.S.**, Tezcaner A., Korkusuz P., Korkusuz F., Hasirci V. Collagen-chondroitin sulfate-based PLLA-SAIB-coated rhBMP-2 delivery system for bone

- repair. *Biomaterials*. 2005;26(18):4023-34.
70. **Kim CK**, Chai JK, Cho KS, Choi SH. Effect of calcium sulphate on the healing of periodontal intrabony defects. *Int Dent J*. 1998;48(3 S1):330-7.
71. **Kim JS**, Baek SH, Bae KS. In vivo study on the biocompatibility of newly developed calcium phosphate-based root canal sealers. *J Endod*. 2004;30(10):708-11.
72. **Kokubo T**, Kim HM, Kawashita M. Novel bioactive materials with different mechanical properties. *Biomaterials*. 2003;24(13): 2161-75.
73. **Korventausta J**, Jokinen M, Rosling A, Peltola T Yli-Urpo A. Calcium phosphate formation and ion dissolution rates in silica gel-PDLLA composites. *Biomaterials*. 2003;24(28): 5173-82.
74. **Kuemmerle JM**, Oberle A, Oechslin C, Böhner M, Frei C, Boeckel I, von Rechenberg B. Assessment of the suitability of a new brushite calcium phosphate cement for cranioplasty - an experimental study in sheep. *J Craniomaxillofac Surg*. 2005;33(1):37-44.
75. **Larsson S**, Bauer TW. Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review. *Clin Orthop*. 2002;395:23-32.
76. **Lee YM**, Park YJ, Lee SJ, Ku Y, Han SB, Choi SM, Klokkevold PR, Chung CP. Tissue engineered bone formation using chitosan/tricalcium phosphate sponges. *J Periodontol*. 2000;71(3):41041-7.
77. **Lemaitre J**, Mirtchi A, Mortier A. Calcium phosphate cements for medical use: state of the art and perspectives of development. *Silicate Industriels*, 1987;10:141-6.
78. **Lemaitre J**, Munting E, Mirtchi AA. Setting hardening and resorption of calcium phosphate hydraulic cements. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*. 1992;93(3):163-5.

79. **Leung KS**, Siu WS, Li SF, Qin L, Cheung WH, Tam KF, Lui PP. An in vitro optimized injectable calcium phosphate cement for augmenting screw fixation in osteopenic goats. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005 Nov 16; en imprenta.
80. **Lewis G**. Apparent fracture toughness of acrylic bone cement: effect of test specimen configuration and sterilization method. *Biomaterials*. 1999;20(1):69-78.
81. **Lewis G** , Mladsi S. Effect of sterilization method on properties of Palacos R acrylic bone cement. *Biomaterials*. 1998;19(1-3): 117-24.
82. **Lieberman R**, Ben-Amar A, Frayberg E, Abramovitz I, Metzger Z. Effect of repeated vertical loads on microleakage of IRM and calcium sulfate-based temporary fillings. *J Endod*. 2001;27(12):724-9.
83. **Lieberman IH**, Togawa D, Kayanja MM. Vertebroplasty and kyphoplasty: filler materials. *Spine J*. 2005;5(6S):S305-16.
84. **Lobenhoffer P**, Gerich T, Witte F, Tschern H. Use of an injectable calcium phosphate bone cement in the treatment of tibial plateau fractures: a prospective study of twenty-six cases with twenty-month mean follow-up. *J Orthop Trauma*. 2002;16(3):143-9.
85. **Lundgren AK**, Lundgren D, Hammerle CH, Nyman S, Sennerby L. Influence of decortication of the donor bone on guided bone augmentation. An experimental study in the rabbit skull bone. *Clin Oral Implants Res*. 2000;11(2):99-106.
86. **Lundgren AK**, Lundgren D, Wennerberg A, Hammerle CH, Nyman S. Influence of surface roughness of barrier walls on guided bone augmentation: experimental study in rabbits. *Clin Implant Dent Relat Res*. 1999;1(1):41-8.
87. **Mahr MA**, Bartley GB, Bite U, Clay RP, Kasperbauer JL, Holmes JM. Norian craniofacial repair system bone cement for the repair of craniofacial skeletal

- defects. *Ophthal Plast Reconstr Surg*. 2000;16(5):393-8.
88. **Majekodunmi AO**, Deb S, Nicholson JW. Effect of molecular weight and concentration of poly(acrylic acid) on the formation of a polymeric calcium phosphate cement. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14(9):747-52.
89. **Mann FA**, Payne JT. Bone healing. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)*. 1989;4(4):312-21.
90. **Masui M**, Suzuki M, Fujise Y, Kanayama N. Calcium-induced changes in chondroitin sulfate chains of urinary trypsin inhibitor. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1546:261-7.
91. **Merck Index** - © 1952 by Merck & Co., Inc.
92. **Merten HA**, Wiltfang J, Grohmann U, Hoenig JF. Intraindividual comparative animal study of alpha- and beta-tricalcium phosphate degradation in conjunction with simultaneous insertion of dental implants. *J Craniofac Surg*. 2001;12(1):59-68.
93. **Meyer U**, Buchter A, Hohoff A, Stoffels E, Szuwart T, Runte C, Dirksen D, Wiesmann HP. Image-based extracorporeal tissue engineering of individualized bone constructs. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2005;20(6):882-90.
94. **Mirtchi AA**, Lemaitre J. Calcium phosphate cements: study of the  $\beta$ -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate system. *Biomaterials*. 1989;10(7):475-80.
95. **Misch CE**, Qu Z, Bidez MW. Mechanical properties of trabecular bone in the human mandible: implications for dental implant treatment planning and surgical placement. *J Oral Maxillofac Surg*. 1999;57(6):700-8.
96. **Miyazaki K**, Horibe T, Antonucci JM, Takagi S, Chow LC. Polymeric calcium phosphate cements: analysis of reaction products and properties. *Dent Mater*. 1993;9(1): 41-5.

97. **Moreira-Gonzalez A**, Jackson IT, Miyawaki T, Barakat K, DiNick V. Clinical outcome in cranioplasty: critical review in long-term follow-up. *J Craniofac Surg.* 2003;14(2):144-53. Erratum in: *J Craniofac Surg.* 2003;14(5):16.
98. **Moss M**, Kruger GO, Reynolds DC. The effect of chondroitin sulfate on bone healing *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20(6):795-801.
99. **Mutluay MM**, Ruyter IE. Evaluation of adhesion of chairside hard relining materials to denture base polymers. *J Prosthet Dent.* 2005;94(5):445-52.
100. **Narva KK**, Lassila LV, Vallittu PK. The static strength and modulus of fiber reinforced denture base polymer. *Dent Mater.* 2005;21(5):421-8.
101. **Ohsawa K**, Neo M, Matsuoka H, Akiyama H, Ito H, Kohno H, Nakamura T. The expression of bone matrix protein mRNAs around beta-TCP particles implanted into bone, *J Biomed Mater Res.* 2000;52:460–6.
102. **Ohura K**, Bohnert M, Hardouin P, Lemaitre J, Pasquier G, Flautre B. Resorption of and bone formation from, new beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study. *J Biomed Mater Res.* 1996;30(2):193-200.
103. **Okada E**, Maruyama Y, Hayashi A. Nasal augmentation using calcium phosphate cement. *J Craniofac Surg.* 2004;15(1):102-5.
104. **Oliveira AL**, Malafaya PB, and Reis RL. Sodium silicate gel as a precursor for the in vitro nucleation and growth of a bone-like apatite coating in compact and porous polymeric structures. *Biomaterials* 2003;24(15):2575-84.
105. **Oner FC**, Dhert WJ, Verlaan JJ. Less invasive anterior column reconstruction in thoracolumbar fractures. *Injury.* 2005;36 (S2):B82-B89. Review.

106. **Ouyang J**, Deng S, Zhoun J. Crystallization of calcium oxalate monohydrate at dipalmitoylphosphatidylcholine monolayers in the presence of chondroitin sulfate A. *J Cryst Growth*. 2004;270(3-4):646-54.
107. **Park YJ**, Lee YM, Lee JY, Seol YJ, Chung CP, Lee SJ. Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate–chitosan sponge for guided bone regeneration. *J Control Release*. 2000;67(2-3): 385-94.
108. **Pekkarinen T**, Hietalal O, Jamsa T, Jalovaara P. Gamma irradiation and ethylene oxide in the sterilization of native reindeer bone morphogenetic protein extract. *Scand J Surg*. 2005;94(1):67-70.
109. **Penel G**, Leroy N, Van Landuyt P, Flautre B, Hardouin P, Lemaître J and Leroy G. Raman microspectrometry studies of brushite cement: in vivo evolution in a sheep model. *Bone*. 1999;25(2):81S-84S.
110. **Peña J**, Vallet-Regí M. Hydroxyapatite, tricalcium phosphate and biphasic materials prepared by a liquid mix technique. *J Eur Ceramic Soc*. 2003;23(10): 1687-96.
111. **Philips RW**. Elements of dental Materials. Philadelphia, W.B. Saunders. 1984; p 325.
112. **Porter AE**, Patel N, Skepper JN, Best SM, Bonfield W. Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics. *Biomaterials*. 2003;24(25):4609-20.
113. **Prado Da silva MH**, Lima JHC, Soares GA, Elias CN, De Andrade MC, Best SM, Gibson IR. Transformation of monetite into hydroxyapatite in bioactive coatings on titanium. *Surfaces Coatings Technology*. 2001;137(2-3):270-6.
114. **Rakic L**, Lapiere CM, Nusgens BV. Comparative caustic and biological activity of trichloroacetic and glycolic acids on keratinocytes and fibroblasts in vitro. *Skin*

- Pharmacol Appl Skin Physiol. 2000;13(1):52-9.
115. **Ravanshad S**, Ghoreeshi N. An in vitro study of coronal microleakage in endodontically-treated teeth restored with posts. *Aust Endod J*. 2003;29(3):128-33.
  116. **Rebaudi A**, Silvestrini P, Trisi P. Use of a resorbable hydroxyapatite-collagen chondroitin sulfate material on immediate postextraction sites: a clinical and histologic study. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003;23(4):371-9.
  117. **Rees SG**, Hughes Wassell DT, Waddington RJ, Embery G. Interaction of bone proteoglycans and proteoglycan components with hydroxyapatite. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1568(2):118-28.
  118. **Ries MD**, Young E, Al-Marashi L, Goldstein P, Hetherington A, Petrie T, Pruitt L. In vivo behavior of acrylic bone cement in total hip arthroplasty. *Biomaterials*. 2006;27(2):256-61.
  119. **Rueda C**, Arias C., Galera P., López-Cabarcos E. and Yagüe A. Mucopolysaccharides in aqueous solutions: effect of ionic strength on titration curves. *Il Farmaco*. 2001;56 (5-7): 527-32.
  120. **Sainz Vidal D**, Rodriguez Napoles D, Fuentes Estevez G, Guerra M, Arcis Soriano W, Peon Aves E, Diaz Argota JM, Zaldivar Silva D. Radiation sterilization of a bifunctional cement formulation of hydroxylapatite-plaster-polymers. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;875:64-70.
  121. **Salinas AJ**, Martin AI, Vallet-Regi M. Bioactivity of three CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> sol-gel glasses. *J Biomed Mater Res*. 2002;61(4): 524-32.
  122. **Sarda S**, Fernandez E, Nilsson M, Balcells M, Planell JA. Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements water-reducing agent; *J Biomed Mater Res*. 2002;61(4):653-9.

123. **Scabbia A**, Trombelli L. A comparative study on the use of a HA/collagen/chondroitin sulphate biomaterial (Biostite) and a bovine-derived HA xenograft (Bio-Oss) in the treatment of deep intra-osseous defects. *J Clin Periodontol*. 2004;31(5): 348-55.
124. **Schedle A**, Franz A, Rausch-Fan X, Spittler A, Lucas T, Samorapoompichit P, Sperr W, Boltz-Nitulescu G. Cytotoxic effects of dental composites, adhesive substances, compomers and cements. *Dent Mater*. 1998;14(6):429-40.
125. **Schliephake H**, Gruber R, Dard M, Wenz R, Scholz S. Repair of calvarial defects in rats by prefabricated hydroxyapatite cement implants. *J Biomed Mater Res A*. 2004;69(3):382-90.
126. **Schnurer SM**, Gopp U, Kuhn KD, Breusch SJ. [Bone substitutes] *Orthopade*. 2003;32(1):2-10.
127. **Schofield PF**, Knight KS, van der Houwen JAM Valsami E. The role of hydrogen bonding in the thermal expansion and dehydration of brushite, dicalcium phosphate dehydrate. *Pys Chem Minerals*. 2004;31:606-24.
128. **Serre CM**, Papillard M, Chavassieux P, Boivin G. *in vitro* induction of a calcifying matrix by biomaterials constituted of collagen and/or hydroxyapatite: an ultrastructural comparison of three types of biomaterials. *Biomaterials*. 1993;14(2):97-103.
129. **Simion M**, Jovanovic SA, Tinti C, Benfenati SP. Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1-5 year follow-up. *Clin Oral Impl Res*. 2001;12:35-45.
130. **Skinner RA**, Toto PD, Gargiulo AW. Xenogeneic implants in primates. Collagen and chondroitin sulfate. *J Periodontol*. 1976;47(4):196-202.

131. **Skoog DA**, James HF, Nieman TA Principios de análisis instrumental. Edt. McGraw Hill, 5ª edición. 2001; p 870.
132. **Slotte C**, Lundgren D, Burgos PM. Placement of autogeneic bone chips or bovine bone mineral in guided bone augmentation: a rabbit skull study. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;18(6):795-806.
133. **Sowa JM**, Subbaiah PV. Variable recoveries of fatty acids following the separation of lipids on commercial silica gel TLC plates Selective loss of unsaturated fatty acids on certain. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2004;813(1-2):159-66.
134. **Spilimbergo S**, Bertucco A, Lauro FM, Bertoloni G. Inactivation of *Bacillus subtilis* spores by supercritical CO<sub>2</sub> treatment. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 2003;4(2):161-5.
135. **Spilimbergo S**, Elvassore N, Bertucco A. Microbial inactivation by high-pressure. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2002;22(1):55-63.
136. **Sugawara A**, Fujikawa K, Takagi S, Chow LC, Nishiyama M, Murai S. Histopathological and cell enzyme studies of calcium phosphate cements. *Dent Mater J*. 2004;23(4):613-20.
137. **Szabo G**, Suba Z, Hrabak, K, Barabas J, Nemeth Z. Autogenous bone versus  $\beta$ -Tricalcium Phosphate Graft alone for bilateral sinus elevations (2- and 3-dimensional computed tomographic, histologic, and histomorphometric evaluations): preliminary results. *Int J Oral Maxillofac Implants*. 2003;16(5):681-92.
138. **Taguchi Y**, Amizuka N, Nakadate M, Ohnishi H, Fujii N, Oda K, Nomura S, Maeda T. A histological evaluation for guided bone regeneration induced by a collagenous membrane. *Biomaterials*. 2005;26(31):6158-66.

139. **Takechi M**, Miyamoto Y, Momota Y, Yuasa T, Tatehara S, Nagayama M, Ishikawa K. Effects of various sterilization methods on the setting and mechanical properties of apatite cement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2004;69(1):58-63.
140. **Tamimi Mariño F**, Lopez Cabarcos E, Blanco Jerez L. The Effect of Carboxyl Groups on the Setting of Brushite Cements. Annual Meeting of the American Society for Biomaterials, Philadelphia, 2004.
141. **Tamimi F**, Lopez-Cabarcos E, Blanco L, Tresguerres I, Torres J, Rueda C. Granulado de cemento de brushita fraguado con ácido glicólico para regeneración ósea. Patente española 2005; 200503094/5.
142. **Theiss F**, Apelt D, Brand B, Kutter A, Zlinszky K, Bohner M, Matter S, Frei C, Auer JA, von Rechenberg B. Biocompatibility and resorption of a brushite calcium phosphate cement. *Biomaterials*. 2005;26(21):4383-94.
143. **Tortet L**, Gavarrí JR, Nihoul G, Dianoux AJ. Proton mobilities in brushite and brushite/polymer composites. *Solid State Ionics*. 1997;97(1-4): 253-6.
144. **Trisi P**, Rao W, Rebaudi A, Fiore P. Histologic effect of pure-phase beta-tricalcium phosphate on bone regeneration in human artificial jawbone defects. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 2003;23(1):69-77.
145. **Tsipis AC**, Tsipis CA, Valla V. Quantum chemical study of the coordination of glycolic acid conformers and their conjugates to  $[Ca(OH)_2]^{2+}$  ( $n=0-4$ ) ions. *J Molecular Structure (Thechem)*. 2003;630:81-100.
146. **Tuncer S**, Yavuzer R, Isik I, Basterzi Y, Latifoglu O. The fate of hydroxyapatite cement used for cranial contouring: histological evaluation of a case. *J Craniofac Surg*. 2004;15(2):243-6.
147. **Vaccaro AR**, Chiba K, Heller JG, Patel TCh, Thalgott JS, Truumees E,

- Fischgrund JS, Craig MR, Berta SC, Wang JC. North American Spine Society for Contemporary Concepts in Spine Care. Bone grafting alternatives in spinal surgery. *Spine J.* 2002;2(3):206-15.
148. **Van Landuyt P.**, Peter B., Beluze L. and Lemaître J. Reinforcement of osteosynthesis screws with brushite cement. *Bone.* 1999;25(2-S1): 95S-98S.
  149. **Velich N**, Nemeth Z, Toth C, Szabo G. Long-term results with different bone substitutes used for sinus floor elevation. *J Craniofac Surg.* 2004;15(1):38-41.
  150. **Vereecke G**, Lemaître J. Calculation of the solubility diagrams in the system  $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-H}_3\text{PO}_4\text{-KOH-HNO}_3\text{-CO}_2\text{-H}_2\text{O}$ . *J Crystal Growth.* 1990;104(4):820-32.
  151. **Verlaan JJ**, Cumhur Oner F, Dhert WJ. Anterior spinal column augmentation with injectable bone cements. *Biomaterials.* 2006;27(3):290-301.
  152. **Volpi N**. Adsorption of glycosaminoglycans onto coral—a new possible implant biomaterials for regeneration therapy. *Biomaterials.* 1999;20(15): 1359-63.
  153. **Volpi N**. Influence of charge density, sulfate group position and molecular mass on adsorption of chondroitin sulfate onto coral. *Biomaterials.* 2002;23(14): 3015-22.
  154. **Von Arx T**, Cochran DL, Hermann JS, Schenk RK, Buser D. Lateral ridge augmentation using different bone fillers barrier membrane application. A histologic and histomorphometric pilot study in the canine mandible. *Clin Oral Implants Res.* 2001;12(3):260-9.
  155. **Wada N**, Kanamura K, Umegaki T. Effects of Carboxylic Acids on the crystallization of calcium carbonate. *J Colloid Interf Sci.* 2001;(233):65-72.
  156. **Weiping R**, Bin Wu, Lois Mayton, Paul H. Wooley. Polyethylene and methyl methacrylate particle-stimulated inflammatory tissue and macrophages up-regulate bone resorption in a murine neonatal calvaria in vitro organ system.

- Journal of Orthopaedic Research. 2002;20(5):1031-7.
157. **Wooley PH**, Morren R, Andary J, Sud S, Yang SY, Mayton L, Markel D, Sieving A, Nasser S. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch. *Biomaterials*. 2002;23(2):517-26.
  158. **Xynos ID**, Edgar AJ, Buttery LDK, Hench LL, Polak JM. Gene expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of bioglass 45S5 dissolution. *J Biomed Mater Res*. 2001;55:151-7.
  159. **Yagüe Alvarez, A.M.** Caracterización, análisis potenciométrico y propiedades reológicas de las disoluciones de mucopolisacáridos. Tesis doctoral, Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Farmacia, 1990.
  160. **Yin Y**, Ye F, Cai S, Yao K, Cui J, Song X. Gelatin manipulation of latent macropores formation in brushite cement. *J Mater Sci Mater Med*. 2003;14: 255-61.
  161. **Yoshikawa M**, Hayami S, Toda T. In vivo estimation of calcium phosphate cements containing chondroitin sulfate in subcutis. *Mater Sci and Eng: C*. 2002;20(1-2):135-41.
  162. **Yoshikawa M**, Toda T. In vivo estimation of periapical bone reconstruction by chondroitin sulfate in calcium phosphate cement. *J Eur Ceram Soc*. 2004;24(2): 521-31.
  163. **Yuji FY**, Shu C. Gelatin manipulation of latent macropores formation in brushite cements. *J Mat Sci: Mat Med*. 2003;14:255-61.
  164. **Zahraoui C**, Sharrock P. Influence of sterilization on injectable bone biomaterials. *Bone*. 1999;25(2 S):63S-65S.
  165. **Zambonin G**, Colucci S, Cantatore F, Grano M. Response of human osteoblasts to polymethylmetacrylate in vitro. *Calcif Tissue Int*. 1998;62(4):362-5.

166. **Zerbo IR**, Bronckers AL, de Lange GL, van Beek GJ, Burger EH. Histology of human alveolar bone regeneration with a porous tricalcium phosphate. A report of two cases. Clin Oral Implants Res. 2001;12(4):379-84.
167. **Zioupou P**, Currey J. Changes in the Stiffness, Strength, and Toughness of Human Cortical Bone With Age. Bone. 1998;22(1):57-66.
168. **Zisli T**, Martin SA, Cerbas E, Heath JR 3rd, Mansfield JL, Hollinger JO. A scanning electron microscopic study of in vitro toxicity of ethylene-oxide-sterilized bone repair materials. J Oral Implantol. 1989;15(1):41-6.
169. **Zou XH**, Foong WC, Cao T, Bay BH, Ouyang HW, Yip GW. Chondroitin sulfate in palatal wound healing. J Dent Res. 2004;83(11):880-5.

# Apéndice

## Anexo I (Definiciones):

**Ácidos carboxílicos:** Ácidos orgánicos que contienen grupos carboxi.

**Artroplastia:** La Artroplastia es la reconstrucción o sustitución quirúrgica de una articulación dolorosa o degenerada, con objeto de restablecer la movilidad de la misma en casos de osteoartritis o de artritis reumatoide, o con vistas a corregir una deformidad congénita.

**Bioactividad:** La capacidad de un material de inducir, estimular, provocar o modular una acción biológica en el tejido receptor.

**Biocompatibilidad:** Tolerancia biológica local de cualquier biomaterial, caracterizada por la ausencia de una respuesta inflamatoria aguda o crónica durante su implantación e incorporación, así como por la carencia de efectos nocivos sobre tejidos distantes.

**Biomaterial:** Sustancia natural o sintética, o combinación de sustancias, que puede implantarse en el organismo para tratar, restituir, sustituir o aumentar un tejido, órgano o función.

**Canal dental (conducto):** La cámara interina del diente en la que se encuentran los tejidos blandos del diente, el tratamiento de canal (en inglés) o de conducto (español) es

el procedimiento clínico en el que se limpia la pulpa y conductos dentales para luego rellenarlos con un biomaterial.

**Celdilla unidad de un cristal:** Repetición indefinida de un grupo de átomos en una red espacial infinita. Esta puede ser en 7 sistemas posibles: Monoclínico, Triclínico, Ortorrómbico, trigonal, hexagonal, tetragonal y cúbico.

**Cemento:** Se denomina cemento a un aglutinante o aglomerante hidráulico que, mezclado con agregados y agua, crea una mezcla uniforme, manejable y plástica capaz de fraguar y endurecer al reaccionar con el agua y adquiriendo por ello consistencia pétreas.

**Cerámica:** La palabra cerámica deriva del vocablo griego *keramos*, cuya raíz sánscrita significa *quemar*. En su sentido estricto se refiere a la arcilla en todas sus formas. Sin embargo, el uso moderno de este término incluye a todos los materiales inorgánicos no metálicos. Históricamente, los productos cerámicos han sido duros, porosos y frágiles. Los materiales cerámicos son generalmente iónicos o vidriosos.

**Citokinas:** Mensajeros celulares o moléculas que transmiten mensajes entre las células.

**Clase triclinico-pinacoidal:** Una división del sistema triclinico.

**Craneoplastia:** La craneoplastia es el cierre de defectos óseos en el cráneo con diversos biomateriales.

**Densitometría ósea:** Es la técnica que mide la absorción de un material a los rayos X material y se utiliza en medicina para evaluar la densidad mineral ósea.

**Electrolito sólido:** Es una sustancia sólida conductora de protones, que no permite el movimiento de las cargas negativas, y es capaz de conducir la electricidad a través del movimiento de los protones.

**Entalpía:** Es también conocido como el contenido de calor, y es la suma de la energía interna de la materia y el producto de su volumen por la presión.

**Estadística descriptiva:** Son los análisis estadísticos que describen y resumen los datos relativos a la población estudiada; las estadísticas descriptivas más comunes incluyen la media la moda, la desviación estándar, el error estándar y el rango; también se conocen como las medidas de la tendencia central.

**Esterilización:** Tratamiento tras el cual la probabilidad de supervivencia de los microorganismos menor de  $10^{-6}$ .

**Factores de crecimiento óseo:** Proteínas que regulan el crecimiento celular y determinan la calcificación de la matriz ósea.

**Grupo carboxi:** Grupo molecular que corresponde a la formula química  $\text{COO}^-$ .

**Histología:** Es el estudio de un tejido seccionado en cortes finos utilizando un microscopio. También se puede definir como la anatomía microscópica.

**Histomorfometría:** Es la técnica mediante la cual se identifican las células y los componentes tisulares para ser medidos en longitudes (mm), áreas ( $\text{mm}^2$ ) o número de células (número/mm o número/ $\text{mm}^2$ ).

**Implante:** Material o tejido no viable, aunque no sea biológicamente inerte. De esta forma todo tejido capaz de ser almacenado sin bioprotección debería ser denominado como implante.

**Injerto:** Biomaterial, tejido u órgano que se inserta en un lugar del organismo ya sea en el propio, en el de otro o en el de otra especie. Se caracteriza porque una vez implantado se puede rehabitar y se mantiene vital gracias a los tejidos vivos del receptor.

**Interleuquinas:** Son citoquinas relacionadas al sistema inmunitario.

**Kifoplastia:** La kifoplastia o cifoplastia es un procedimiento en el que los cirujanos insertan un tampón inflable en el hueso a través de una incisión de media pulgada utilizando un rayo X para guiar el dispositivo hasta el hueso fracturado. El globo se infla y comprime el área que lo rodea, empujando el hueso desplazado a su posición original. El globo se desinfla y retira, dejando una cavidad dentro del hueso. Los cirujanos rellenan la cavidad con cemento óseo para reforzar el hueso, de manera similar a un yeso interno, para evitar que se desplace. La kifoplastia puede producir un alivio inmediato del dolor y el reintegro rápido a las actividades diarias.

**Osteoblastos:** Células de origen mesenquimático que desempeñan un importante papel en el control de la mineralización ósea y producen la formación activa de hueso. Al final de la fase de formación del tejido óseo, los osteoblastos se pueden convertir en osteocitos o células de revestimiento.

**Osteoconducción:** Propiedad pasiva de un material o tejido de recibir y guiar el crecimiento óseo, por medio de la invasión vascular y celular proveniente del tejido óseo vivo del receptor.

**Osteoinducción:** Capacidad de un material para promover la diferenciación celular hacia la síntesis de matriz ósea mineralizada, mediada por los factores locales de crecimiento.

**Osteogénesis:** Desarrollo y formación de tejido óseo a partir de células osteoformadoras como los osteoblastos.

**Proteínas morfogenéticas (BMP):** Proteínas básicas de bajo peso molecular que se pueden aislar desde el hueso cortical, la dentina y algunos tumores óseos. Los estudios han demostrado que la cantidad de tejido óseo formado es mayor en presencia de BMP.

**Reabsorbible:** Condición que poseen algunos biomateriales de degradarse en componentes de menor peso molecular, ya sea a través de las vías metabólicas u otras rutas alternativas del organismo.

**Regla de Oswald:** La regla de paso de Oswald se utiliza en el estudio del crecimiento de los cristales, y predice la secuencia de transición de fases metaestables hacia una fase de equilibrio.

**Vertebroplastia:** La vertebroplastia se utiliza en el tratamiento de las fracturas por compresión de las vértebras y consiste en introducir en el cuerpo de la vértebra cemento óseo o metilmetacrilato, que es un compuesto que endurece rápidamente dando consistencia al cuerpo vertebral y evitando la progresión del aplastamiento y aliviando el dolor.

## Anexo II (abreviaturas):

ACP	Fosfato cálcico amorfo (amorphous calcium phosphate)
BMC	Contenido mineral óseo
BMD	Densidad mineral ósea
BMP2	Proteínas morfogenéticas 2
C6S	Condroitin 6 sulfato
C4S	Condroitin 4 sulfato
CAD-CAM	(Computer-Aided Design/Computer-Aided Manufacturing) Diseño asistido por computador/Fabricación asistida por computador.
CC	Carbonato cálcico
CS	Condroitin sulfato
DCP	Fosfato dicálcico o monetita
DCPD	Fosfato dicálcico dihidratado, o brushita.
DFDB	Hueso desmineralizado liofilizado
DSC	Calorímetro diferencial de barrido
FTIR	Espectroscopia infrarroja con transformación de Fourier
HAP	Hidroxiapatita
HE	Hematoxilina y eosina
ICSD	Base de datos de la estructura de los cristales inorgánicos
IR	Infrarrojos
MCP	Monocalcio fosfato

MCPM	Monofosfato cálcico monohidratado
MPa	Megapascuales
ND	No disponible
PBS	Solución de tampón de fosfato
PHA	Hidroxiapatita precipitada
PMMA	Polimetacrilato de metilo
SC-CO <sub>2</sub>	Fluido supercrítico de dióxido de carbono
TB	Azul de toluidina
TetCP	Fosfato tetracálcico
β-TCP	Fosfato tricálcico beta
α-TCP	Fosfato tricálcico alfa
UCM	Universidad Complutense de Madrid