

Cimento de α -Fosfato Tricálcico: Cito1toxicidade “In Vitro”

L. A. dos Santos¹, R. G. Carrodeguas³, E. C. S. Rigo², S. O. Rogero⁴, O. Z. Higa⁴, A. O. Boschi² e A. C. F. de Arruda¹

¹Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP-FEM – Caixa Postal 6122.

Campinas SP CEP:13081-970 -Brazil. E-mail: p-las@power,ufscar.br

²Universidade Federal de São Carlos - Departamento de Engenharia de Materiais- Caixa Postal 676 - CEP 13565-905 – São Carlos – SP - Brazil.. E-mail: daob@power.ufscar.br

³Universidad de La Habana - Centro de Biomateriales- La Habana – Cuba. E-mail: biomat@comuh.uh.cu

⁴Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN-CNEN/SP Caixa Postal 11049 CEP 05422-970. São Paulo – SP – Brazil –. E-mail: sorogero@net.ipen.br

RESUMO

A utilização de biocerâmicas a base de fosfato de cálcio tem revolucionado a ortopedia e odontologia no reparo de partes danificadas do sistema ósseo. Dentre estes, os cimentos a base de fosfatos de cálcio de pega hidráulica tem despertado grande interesse em função de sua biocompatibilidade e endurecimento “in situ”, o que permite facilidade de manipulação e adaptação à forma e dimensões do defeito ósseo. O efeito citotóxico de um cimento de fosfato de cálcio baseado no α -fosfato tricálcico, imerso por diferentes períodos em SBF (Simulate Body Fluid), foi investigado “in vitro” utilizando-se a norma ISO-10993 “Biological Evaluation of Medical Devices”. As células de cultura utilizadas foram de Ovário de Hamster Chinês (CHO) em contato com extratos diluídos do cimento de fosfato de cálcio. Os resultados obtidos mostram que o cimento de fosfato de cálcio avaliado é citotóxico e que o índice de citotoxicidade do material reduz-se com o aumento do tempo de imersão em SBF.

Palavras-chave: Biomaterial; Biocerâmica; Cimento de Fosfato de Cálcio; Citotoxicidade.

ABSTRACT

Calcium phosphate-based bioceramics have revolutionized orthopedics and dentistry in the repair of damaged parts of the bone system. Among these bioceramics, cements based on

calcium phosphates with hydraulic setting characteristics have aroused much interest owing to their biocompatibility and *in situ* hardening, which offer easy manipulation and adaptation to the shape and dimensions of bone defects. The *in vitro* citotoxic effect of a calcium phosphate cement based on α -tricalcium phosphate immersed for different periods of time in SBF (Simulated Body Fluid) was investigated in this study based on the ISO-10993 "Biological Evaluation of Medical Devices" standard. The cultures used were Chinese Hamster Ovary (CHO) cells in contact with diluted calcium phosphate cement extracts. Our findings revealed that calcium phosphate cement is citotoxic and that the material's citotoxicity reduces proportionally to the increased immersion time of the cement in SBF.

Key-words: Biomaterial; Bioceramic; Calcium Phosphate Cement; Citotoxicity

INTRODUÇÃO

O termo “cimento de fosfato de cálcio” foi introduzido por Gruninger e colaboradores⁽¹⁾. Segundo eles, um cimento deste tipo pode ser preparado misturando-se um sal de fosfato de cálcio com água ou com uma solução aquosa para que se forme uma pasta que possa reagir a temperatura ambiente ou do corpo para dar lugar a um precipitado que contenha um ou mais fosfato de cálcio, dando pega pelo inter cruzamento dos cristais deste precipitado. Eles são constituídos por um componente ácido e outro básico os quais quando se misturam com água reagem para formar um ou vários produtos com uma acidez intermediária a dos produtos de partida. Estes cimentos reúnem uma série de vantagens que permitem seu uso como preenchimento e substituto de partes danificadas do sistema ósseo dentro das quais estão:

- Não ser necessário dar forma ao preenchimento.
- Mínima cavidade do preenchimento.
- A preparação é realizada durante o ato cirúrgico.
- Existe um ótimo contato entre osso e implante.
- Biocompatibilidade e bioatividade

Além de uma maior manipulação e adaptação, os cimentos de fosfatos de cálcio podem ser empregados como matriz portadora na qual podem ser adicionados, com facilidade, diversos medicamentos ou drogas, tais como, antibióticos, antitumores, anti-inflamatórios⁽²⁾, etc. Apesar da ampla gama de possíveis aplicações dos cimentos de

fosfato de cálcio, poucos trabalhos na literatura tem apresentado testes de biocompatibilidade *in vitro* destes materiais, atendo-se mais aos testes *in vivo*, e muito menos a sua correlação com os produtos resultantes da reação de pega do cimento. Os testes *in vitro* podem não representar a situação real de implantação, uma vez que quanto mais complexo o sistema maior a variabilidade. Entretanto o seu uso pode fornecer resultados rápidos a respeito das interações dos materiais em meios biológicos, auxiliando na minimização dos testes em animais. Os testes *in vitro* tem sido utilizados para a avaliação da biocompatibilidade de materiais a mais de duas décadas, sendo atualmente muito utilizados em função da disponibilidade de linhagens de células que podem ser adquiridas facilmente no mercado. Além disto existe uma ampla gama de métodos que são utilizados em função de sua repetibilidade e reprodutibilidade, sendo estabelecidos em normas nacionais e internacionais utilizadas comercialmente e cientificamente no desenvolvimento de novos materiais ou produtos. O objetivo do presente trabalho foi determinar o nível de citotoxicidade de cimento de fosfato de cálcio baseado no α -fosfato tricálcico, através do método de supressão de colônias usando cultura de células de ovário de Hamster Chinês (CHO).

MATERIAIS E MÉTODOS

Preparou-se α -fosfato tricálcico (α -TCP) segundo descrito em literatura⁽³⁾, através da reação: $\text{CaCO}_3 + \gamma\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 = \alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Os reagentes em quantidades equimolares foram misturados em moinho de bolas de zircônia a seco por 2 horas, calcinados a 1300°C por 15 horas e resfriado rapidamente sobre placa de aço inoxidável⁽⁴⁾. O produto da reação foi moído em jarro de polietileno com bolas de zircônia em meio alcoólico (etanol anidro) por 5 horas. Utilizou-se solução a 2,5% de Na_2HPO_4 para permitir a reação de pega do cimento de α -TCP, com uma relação líquido/sólido igual a 0,32. Foram preparados 3 corpos de provas de 21mm de diâmetro e 10mm de altura empregando-se molde de silicone. Os corpos foram mantidos durante 24 horas a 100% de umidade relativa (composição **0D**), sendo então colocados em frascos de poliestireno com SBF (Simulated Body Fluid) durante 24 horas e 7 dias (composições **1D** e **7 D**, respectivamente) a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ (relação volumétrica líquido/sólido=50). Após o período de imersão os corpos de prova foram colocados em álcool etílico anidro para parar a reação de pega, sendo os corpos de prova então secos à temperatura ambiente por 3 dias. Após este período os corpos de prova foram moídos utilizando-se almofariz de porcelana e passados em peneira malha 100 ASTM. O pó de α -TCP e os

cimentos foram analisados por difração de raios-x qualitativa e quantitativa através de difratômetro de raios-x modelo D 5000 (Siemens, Karlsruhe) com radiação $\text{CuK}\alpha$ com filtro de Ni, 40 kV e 40 mA. O intervalo angular 2θ analisado foi de 20 a 40°, com velocidade de varredura de 2°/min para a análise qualitativa. O método de análise quantitativa utilizado foi o do padrão interno, com varredura ponto a ponto com intervalos de 0,017° para a análise quantitativa. O desvio padrão foi considerado como a raiz quadrada do número de contagens da fase⁽⁵⁾. Mediu-se também o pH do pó dos cimentos em água destilada utilizando-se pHmetro Analion PM 608.

O teste de citotoxicidade foi realizado colocando-se diluições do extrato do pó do cimento de fosfato de cálcio em contato com cultura de células CHO em placa de petri (15X60mm), sendo utilizados como controle positivo uma solução de fenol 0,02% e como controle negativo a alumina (Al_2O_3)^(6,7). Para os ensaio de citotoxicidade foram colocados 6 g do pó do cimento de fosfato de cálcio e 6 g de Al_2O_3 , esterilizados por radiação gama (25 kGy), em frascos de vidro com capacidade de 100 mL. Foram adicionados 60 mL do meio de cultura MEM-Sfb (Minimum Eagle Medium contendo 10% de Soro Fetal Bovino e 1% de solução de penicilina e estreptomicina) e incubadas por 48 horas a 37°C. Após este tempo os sobrenadantes foram filtrados em membrana Millipore®, poros de 0,22 μm e foram feitas diluições seriadas dos extratos do cimento de fosfato de cálcio, Al_2O_3 e da solução de fenol 0,02% (50, 25, 12,5 e 6,25%). A alumina e a solução de fenol foram utilizadas como controles negativo e positivo, respectivamente. As células CHO foram cultivadas em garrafas de plástico em meio MEM-Sfb, em estufa a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO_2 , até obtenção de uma camada de células. O meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com tampão fosfato salina sem cálcio e magnésio (PBS-CMF – Phosphate Buffer Saline– Calcium Magnesium Free). Para o desprendimento das células da garrafa foi adicionado uma solução de tripsina 0,2%. Após tripsinização as células foram lavadas duas vezes com PBS-CMF, ressuspensas em MEM-Sfb ajustando-se para uma suspensão contendo 100 células/mL. Dessa suspensão foram distribuídas 2 mL em cada placa de cultura (15x60mm) e incubadas por 5 horas para adesão das células. Após esse período o meio de cultura foi removido e nessas placas foram adicionados 5 mL do extrato puro e de cada diluição seriada. Na placa de controle de células CHO foi adicionado 5 mL do meio fresco. Foram feitas triplicatas de cada concentração dos extratos testados. As placas foram incubadas em estufa úmida com 5% de CO_2 a 37°C por 7 dias. Decorrido este tempo o meio foi removido e as colônias formadas foram fixadas com solução de formol 10% diluído em solução salina 0,9% e coradas com

corante de Giemsa. As colônias visíveis em cada placa foram contadas e comparadas com o número de colônias da placa controle de células CHO. O potencial citotóxico do material avaliado foi expresso em índice de citotoxicidade ($IC_{50}(\%)$), que é a concentração do extrato que suprime em 50% a formação de colônias de células, em relação ao controle ⁽⁶⁾.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Fig. 1 apresenta o difratograma de difração de raios-x e a microestrutura do α -fosfato tricálcico obtido, apresentando linhas de difração somente das fases α e β -fosfato tricálcico, não apresentando linhas de difração correspondentes à Hidroxiapatita, como obtido em trabalhos anteriores⁽⁸⁻¹⁰⁾. A presença do β -TCP como impureza no α -TCP é reportado por diversos autores⁽¹¹⁻¹⁴⁾, não conhecendo-se trabalhos que registrem a obtenção de α -TCP puro, sendo que usualmente os α -TCP obtidos contém cerca de 15% de β -TCP⁽¹⁵⁾. O material analisado por difração de raios-x quantitativa acusou a presença de 3% de β -fosfato tricálcico. A ausência da fase hidroxiapatita pode ser em decorrência do menor tempo de moagem do $CaCO_3 + \gamma-Ca_2P_2O_7$ utilizado neste trabalho, permitindo a obtenção de partículas de β -TCP de granulometria mais grossa e menos suscetível à reação de transformação do equilíbrio: $HA \rightleftharpoons \beta-TCP \rightleftharpoons \alpha-TCP$, na qual a velocidade da primeira reação de reversão é menor que a reação direta⁽¹²⁾. A microestrutura do material obtido apresenta grãos interconectados, microestrutura esta demonstrando que o material reagido entrou nos primeiros estágios do processo de sinterização, através do empescoamento e união das partículas vizinhas. Entretanto esta união não foi suficientemente forte que dificultasse o processo de moagem do material. A presença de porosidade também pode ser explicada pela evolução de CO_2 durante a reação de obtenção do α -TCP. A distribuição granulométrica por sedimentação do material após moagem em meio alcoólico apresentou uma distribuição entre 25,0 e 2,0 μm , com valor médio de 8,0 μm , sendo assim similar ao reportado em literatura, que possuem uma distribuição entre 20 e 2 μm . Isto explica a quantidade de líquido contendo 2,5% de Na_2HPO_4 utilizado (0,32ml/g), igual o reportado em literatura^(16,17), uma vez que a granulometria do pó em um cimento é fator determinante da relação líquido/pó necessária para a obtenção de uma pasta com consistência adequada.

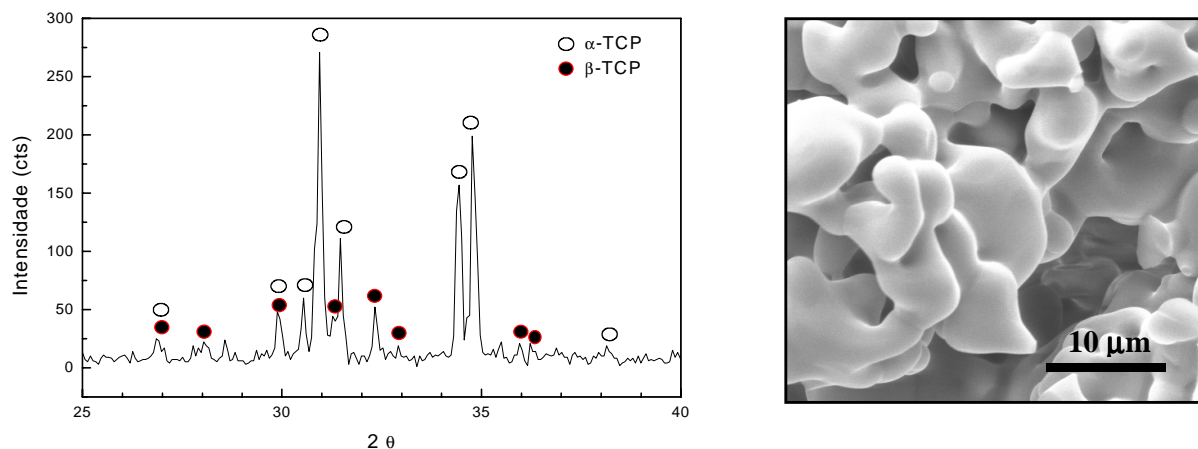


Fig. 1. Difratoograma de raios-x e microscopia eletrônica de varredura do α -fosfato tricálcico obtido.

As porcentagens do número de colônias visíveis nas placas, nas diferentes concentrações dos extratos projetado em gráfico é apresentado na Fig. 2. O potencial citotóxico é avaliado pelo índice de citotoxicidade, $IC_{50}(\%)$, que é a concentração do extrato do material analisado que inibe em 50% a formação de colônias. O controle negativo quando testado não deve produzir resposta citotóxica, como pode ser observado com a alumina ($IC_{50} > 100\%$), e o controle positivo deve levar a uma resposta citotóxica positiva, como é o caso da solução de fenol que apresentou $IC_{50} = 18\%$. É interessante notar que com o aumento da concentração do extrato no controle positivo ocorre uma redução gradativa do número de colônias formadas. Tal comportamento auxilia no controle do teste de citotoxicidade, demonstrando eventuais falhas durante o ensaio.

O cimento de fosfato de cálcio após imersão em SBF apresentou um aumento do valor de $IC_{50}(\%)$ com o aumento do tempo de imersão, iniciando com $IC_{50} = 30\%$, para o cimento mantido a 100% de umidade relativa e sem imersão em SBF, aumentado para $IC_{50} = 78\%$ para o material mantido por 24 hs em SBF. Para o material mantido por 7 dias em SBF houve um pequeno aumento da citotoxicidade, com $IC_{50} = 68\%$. Entretanto, considerando-se os desvios-padrões, os valores são bem próximos. A alteração nos valores de $IC_{50}(\%)$ para diferentes tempos de imersão do cimento em SBF parece ser explicado pela alteração de fases e pH do material após imersão em SBF.

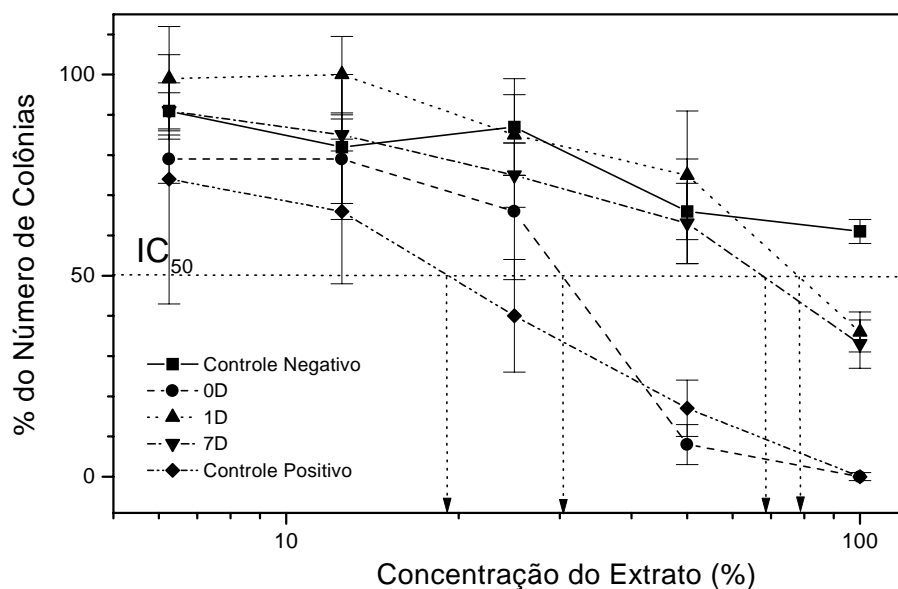


Fig. 2. Curvas de supressão de colônias no teste de citotoxicidade.

No material de partida (*Inicial*) observa-se apenas as fases α -TCP e β -TCP, como mostrado pelo difratograma qualitativo (Fig.1) e análise quantitativa de raios-x (Fig. 3). Para o material não imerso, e mantido a 100% de umidade relativa por 24 hs (*0D*), observou-se a presença de picos correspondentes às fases α -TCP, β -TCP e CDHA (Hidroxiapatita deficiente em cálcio). Após o material ser colocado em SBF por 24 horas e 7 dias (composições *1D* e *7D*), observou-se o desaparecimento dos picos de difração do α -TCP, surgindo então, excetuando-se os picos de β -TCP, somente picos de difração correspondentes à CDHA. A Fig. 3.a) apresenta os resultados de análise por difração de raios-x quantitativa para as três fases detectadas na análise qualitativa. A quantidade de CDHA foi calculada a partir das quantidades de α e β -TCP, uma vez que o provável pequeno tamanho dos cristais de hidroxiapatita, que influencia a largura dos picos de difração, dificulta sua análise quantitativa. Podemos notar que a quantidade de β -TCP permanece constante com o tempo de imersão, o que indica que esta fase não participa da reação de pega, sendo a transformação decorrente da dissolução do α -TCP e precipitação de CDHA.

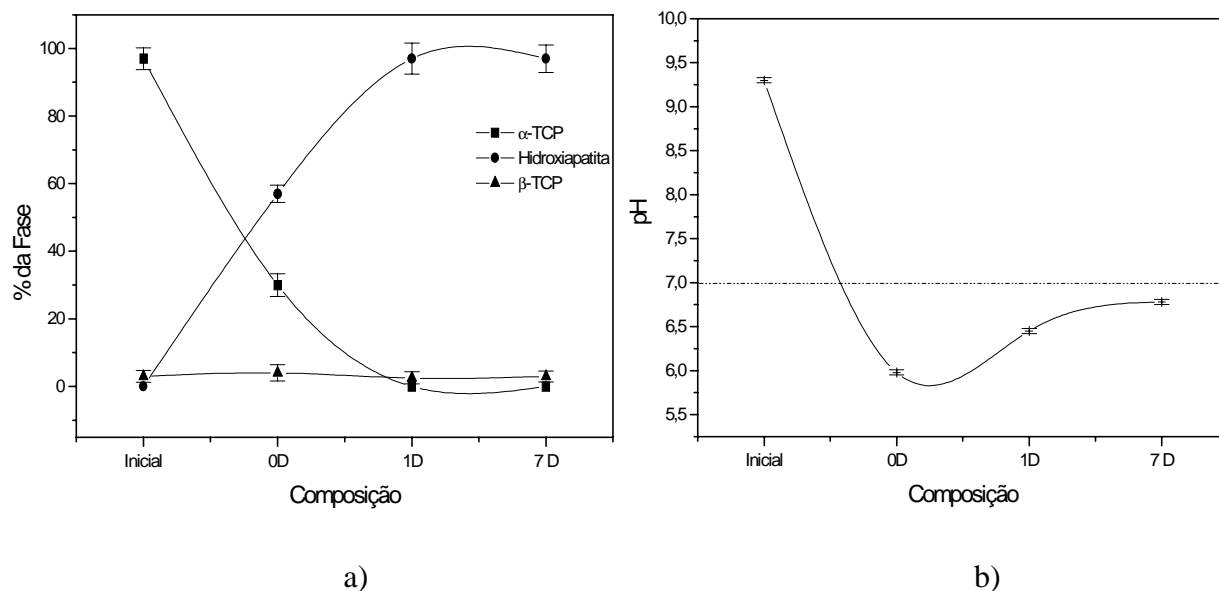


Fig.3. a) Análise quantitativa de raios-x e b) pH em água destilada do cimento de fosfato de cálcio para as composições estudadas

O pH do α -TCP (Fig. 3.b)), antes de ocorrer a reação de solubilização e formação de hidroxiapatita, é de aproximadamente 9,3 (composição *Inicial*), reduzindo rapidamente quando adiciona-se o componente líquido contendo ácido, Na_2HPO_4 , o que explica os baixos valores de pH para a composição apenas mantida por 24 Hs em 100% de umidade relativa. A utilização de ácidos nas composições de cimento de fosfato de cálcio se faz em virtude de que na faixa de pH de aproximadamente 4,2 e acima, a Hidroxiapatita é o composto de fosfato de cálcio mais estável (menos solúvel)⁽¹⁸⁾ e que componentes ácidos ou básicos adicionados à composição favorecem a solubilização dos sais de fosfato de cálcio⁽¹⁹⁾, permitindo a saturação do líquido em Ca e P e a precipitação do composto mais estável, no caso a CDHA. Na ausência de solução ácida, o α -TCP possui um pH em água elevado (9,3) que diminui lentamente para valores próximos a 7,0⁽²⁰⁾, em função da reação de transformação: $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 + \text{H}_2\text{O} \diamond \text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$. A presença da solução de Na_2HPO_4 e a baixa solubilidade do α -TCP explica os valores baixos de pH para os cimentos com reduzidos tempos de imersão em SBF (composição *0D*), que aumenta conforme a reação de transformação prossegue (composições: *1D* e *7D*), estabilizando em patamar próximo de 6,8. O valor de pH neutro (7,0) não é atingido, entretanto o valor de pH obtido não permite concluir alguma reação deletérea quando da implantação do material *in vivo*, uma vez que além do pH estar próximo ao fisiológico, os fluidos extracelulares possuem características de

tamponamento, impedindo uma reação de rejeição mais acentuada. Entretanto estes valores de pH parecem atuar fortemente no ensaio de citotoxicidade, determinando os resultado do ensaio. A alteração do pH do meio de extração pôde ser comprovada pela mudança de sua coloração, que passou de rosa escuro para tonalidades amarelas quando da adição das composições de cimento avaliados. Quanto menor o pH, mais amarela tornou-se a coloração da solução. Tal efeito é produzido pela presença de indicadores de pH na solução MEM, introduzidas para efeito de controle da solução. O pH da solução MEM+Sfb tende a não modificar-se com o tempo pela presença do cimento de fosfato de cálcio em pó. Apesar da solubilização do α -TCP, não deve ocorrer a precipitação de CDHA, uma vez que a quantidade de líquido é extremamente elevada, impedindo a saturação do meio em Ca e P. Tal efeito de manutenção do pH, quando o material encontra-se pulverizado e em grande quantidade de líquido, parece também ocorrer para o sistema de cimento de fosfato de cálcio baseado no TTCP (Fosfato Tetracálcico). Ishikawa⁽²¹⁾ encontrou que a implantação de diversos fosfatos de cálcio pulverizados (TTCP, DCPA (Fosfato dicálcico anidro), TTCP+DCPA) em ratos produziu reação inflamatória após uma semana de implantação, o mesmo não ocorrendo quando utilizou-se cimento (TTCP+DCPA) conformado. Driessens⁽³⁾ afirma que o pH durante e após a pega deve permanecer entre 6,5 e 8,0 para que o cimento não seja citotóxico. Apesar do cimento utilizado estar na faixa de valores preconizadas por Driessens, notadamente após 24hs e 7 dias de imersão em SBF, o material apresentou comportamento citotóxico. Tal diferença de resultados pode estar ligado às diferentes metodologias utilizadas (meio de cultura, cultura celular).

As micrografias da superfície de fratura dos cimentos reagidos em diferentes condições são apresentadas na Fig. 4. Para o material apenas mantido por 24 hs a 100% de umidade, não podemos observar o aparecimento de estruturas de CDHA, como seria de se esperar. O aparecimento de agulhas ou placas petalóides é característico dos cimentos de fosfato de cálcio baseados no α -TCP⁽¹⁻³⁾. A não observação de agulhas ou placas petalóides na microestrutura da Fig. 2 a) parece ser devido ao tempo insuficiente para nucleação e crescimento da CDHA, além do tempo e condições insuficientes para reação total do material. Nas figuras 2 b) e 2 c) entretanto observa-se facilmente a presença destas microestruturas características do cimento de α -fosfato tricálcico reagido. É através do intercruzamento destes cristais que ocorre o aumento da resistência mecânica do material⁽¹⁾.

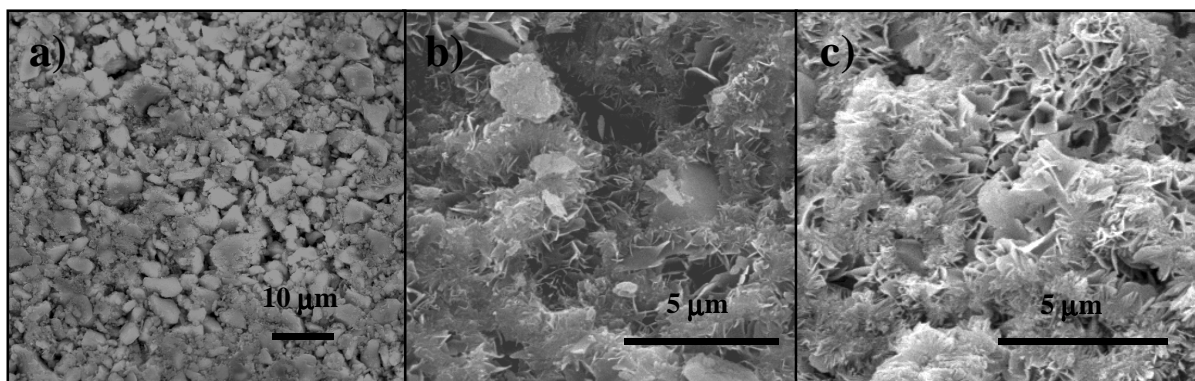


Fig. 4 – Microscopia eletrônica de varredura das amostras a) 0D; b)1D e c) 7 D .

CONCLUSÕES

- O cimento de α -fosfato tricálcico ensaiado é citotóxico pelo método utilizado.
- Determinou-se o nível de citotoxicidade de cimento de fosfato de cálcio baseado no α -fosfato tricálcico, obtendo-se um valor de IC_{50} que variou de 30 a 78%, dependendo do tempo de imersão em SBF.
- O pH do cimento de fosfato de cálcio em água varia de acordo com o tempo de imersão em SBF, sendo que este fator parece influenciar diretamente o valor do índice de citotoxicidade.
- Os resultados relativamente altos de IC_{50} para as composições imersas por 24 hs e 7 dias em SBF não permitem descartar o material para uso em implantação. Ensaio de citotoxicidade por contato e “in vivo” são necessários para uma melhor avaliação de citotoxicidade do material.

AGRADECIMENTOS

À FAPESP pelo suporte financeiro, processos Nos. 98/11691-2 e 98/00563-3. Ao The Third World Academy of Sciences (JRP 18/95). À Fabio Satoshi Fukazawa pelo auxílio laboratorial nos ensaios de citotoxicidade.

BIBLIOGRAFIA

1. Gruninger, S. E.; Siew, C.; Chow, L. C.; O'Young, A.; Ts'ao, N. K.; Brown, W. E.; J. Dent. Res. 63-200(1984).

2. Yu, D., Wong, J., Matsuda, Y., Fox, J.L., Higuchi, W.I. and Otsuka, M.: "Self-setting hydroxyapatite cement: A novel skeletal drug delivery system for antibiotics"; in *J. Pharm. Sci.* 81(6): 529-31 (1992).
3. Driessens, F.C.M.; Fernández, E.; Ginebra, M.P.; Boltong, M.G.; Planell, J.A.: Calcium phosphates and ceramic bone cements vs. acrylic cements. *Anal. Quim. Int. Ed.* 1997, 93: S38 - S43.
4. Monma, H.; Goto, M.; Kohmura, T.: Effect of additives on hydration and hardness of tricalcium phosphate. *Gypsum and lime* 188: 11-16 (1984).
5. Jenkins, R. e Vries, J. L. "An Introduction to X-Ray Powder Diffractometry" N. V. Philips Gloeilampenfabrieken – Eindhoven – Holanda, 1971.
6. International Standard: Biological Evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. ISO 10993-5. 1992.
7. Nakamura, A.; Ikarashi, Y., Tshuchiya, T., Kaniwa, M. radiation vulcanized natural rubber latex is not cytotoxic. In: International Symposium on Radiation Vulcanization of Natural Rubber Latex. Proceedings. Japan Atomic Research Institute JAERI-M 89-228, Takasaki, Japan; 1989, p. 79-87.
8. Santos, L. A. , Oliveira, L. C., Rigo, E. C. S. , Carrodéguas, R. G. , Boschi, A. O., Arruda, A. C. F. – "Influence of polymeric Additives on the Mechanical Properties of α -Tricalcium Phosphate Cement". *Bone*, 25, 2, Supplement. August 1999. 99S-102S
9. Santos, L. A. , Oliveira, L. C., Rigo, E. C. S. , Carrodéguas, R. G. , Boschi, A. O., Arruda, A. C. F – "Fiber Reinforced Calcium Phosphate Cement". *Artificial Organs*. In press.
10. Carrodéguas, R. G. , Santos, L. A. , Rigo, E. C. S. , Mondéjar, S. P., Arruda, A. C. F, Boschi, A. O. – "Improvement of Mechanical strength of Calcium Phosphate Cement by Dual-Setting Principle". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. Kluwer Academic Publishers. In press.
11. Bermúdez, O.; Boltong, M. G.; Driessens, F. C. M.; Planell, J. A.: Development of na octacalcium phosphate cement. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5: 144-146 (1994).
12. Tampieri, A.; Celotti, G.; Szontagh, F.; Landi, E.: Sintering and characterization of HA and TCP bioceramics with control of their strength and phase purity. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 8: 29-37 (1997).
13. Famery, R.; Richard, N.; Boch, P.: Preparation of α - and β -tricalcium phosphate ceramics with and without mahnesium addition. *Ceramics International* 20: 327-336 (1994).

14. Fernández, E.; Ginebra, M. P.; Boltong, M. G.; Verbeeck, R. M. H.; Planell, J. A.: Kinetic study of the setting reaction of a calcium phosphate bone cement. *J. Biomed. Mater. Res.* 32: 367-374 (1996).
15. Ginebra, M. P.; Fernández, E.; De Maeyer, E. A. P.; Verbeeck, R. M. H.; Boltong, M. G.; Ginebra, J.; Driessens, F. C. M.; Planell, J. A.: Setting reaction and hardening of an apatitic calcium phosphate cement. *J. Dent. Res.* 76(4): 905-912 (1997).
16. Driessens, F. C. M.; Boltong, M. G.; Bermudez, O.; Planell, J.: Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1994, 5: 164-170.
17. Fernández, E.; Ginebra, M. P.; Bermudez, O.; Boltong, M. G.; Driessens, F. C. M.: Dimensional and thermal behaviour of calcium phosphate cements during setting compared to PMMA bone cements. *J. Mater. Sci. Lett.* 1995, 14: 4-5.
18. Chow, L. C. "Development of Self-Setting Calcium Phosphate Cements" *Journal of The Ceramic Society of Japan*, , vol 99, 927-936, 1991.
19. Ishikawa, K.; Takagi, S.; Chow, L. C.; Ishikawa, Y.; Eanes, E. D.; Asaoka, K.; "Behavior of a Calcium Phosphate Cement in Simulated Blood Plasma In Vitro " *Dent. Mater.* 10:26-32, Janeiro, 1994.
20. Bermúdez, O.; Boltong, M. G.; Driessens, F. C. M. ; Planell, J. ^a; "Development of some Calcium Phosphate Cements from Combinations of α -TCP, MCPM and CaO" *J. Mat. Sci.: Mat. In Med.* 5(1994) 160-163
21. Ishikawa, K., Miyamoto, Y., Suzuki K., Nagayama M. "Mechanism of Inflammatory Response to Calcium Phosphate Cement". *J. Dent. Res.* 1446, p. 812, 1998.