

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA  
INFORMÁTICA  
GRADO EN INGENIERÍA DE LA SALUD

**Composición, Morfología y Biocompatibilidad de Cementos  
Dentales de Fosfato de Zinc Modificados con Aditivos de  
Calcio**

**Composition, Morphology and Biocompatibility of Zinc  
Phosphate-based Dental Cements Modified with Calcium  
Additives**

Realizado por  
**Fátima Arjona Pulido**  
Tutorizado por  
**Pascual Olivera Pastor**  
**Silvia Claros Gil**  
Departamento  
**Química Inorgánica, Cristalografía y Mineralogía**

UNIVERSIDAD DE MÁLAGA  
MÁLAGA, Junio 2017

Fecha defensa:  
El Secretario del Tribunal



## **AGRADECIMIENTOS**

Después de un intenso período, hoy es el día: me gustaría agradecer a todas aquellas personas que me han ayudado y apoyado en la realización de este trabajo fin de grado.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mi tutor Pascual Olivera, por su constante ayuda y dedicación que han hecho posible la realización de este proyecto.

Al Departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología, especialmente a mi cotutora Silvia Claros y a J. A. Andrades, por su predisposición a ayudarnos a que este trabajo sea una realidad. Así como también al Servicio Central de Apoyo a la Investigación por su eficacia y todas las pruebas realizadas.

A mis padres y hermano, por enseñarme que con esfuerzo y constancia todo se consigue, así como afrontar mis decisiones.

No quisiera olvidarme de mis amigos, por estar siempre a mi lado aguantándome cuando les hablaba de cosas que ni entendían, y motivándome como mis cucharonas; siempre tenían un “TÚ PUEDES CON ESO Y CON MÁS”.

Por último y no menos importante, a Jesús, por su apoyo y cariño desde lejos, pero siempre tan cerca.



**Resumen:** Se han preparado y caracterizado biomateriales dentales basados en fosfato de zinc, con el propósito de estudiar los efectos de varios aditivos de calcio en su composición, morfología y bioactividad. Un primer estudio consistió en analizar los cambios introducidos, con respecto a un material de referencia, por la adición de dos reactivos de calcio, silicato tricálcico y zincato de calcio. Para ello, se realizó un seguimiento de los productos sintetizados, utilizando las técnicas de caracterización de difracción de rayos-X (DRX) con análisis de Rietveld, fluorescencia de rayos-X (WDXRF), análisis térmico diferencial y termogravimétrico (ATD-TG), microscopía electrónica de barrido (SEM) y análisis superficial mediante adsorción de nitrógeno (ASP). Los cementos dentales obtenidos constan de varias fases cristalinas, principalmente hopeita,  $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$ , junto con otras fases secundarias, existiendo, además, una fase amorfa en la que invariablemente siempre se encuentra el calcio. Esto influye en la morfología y porosidad de los materiales, siendo las muestras con más zincato de calcio las menos porosas. El segundo estudio se basó en la preparación de recubrimientos de fosfato zinc sobre sustratos de titanio (Ti). El proceso consistió en un tratamiento hidrotermal del metal con disoluciones de fosfato de zinc y los aditivos de calcio usados en el estudio anterior. El objetivo fue comprobar si al incluir calcio en tales recubrimientos, lo cual favorece la osteointegración del metal implantable, la capa superficial de fosfato de zinc es estable y mantienen la biocompatibilidad del metal. En ambos estudios se analizó, in vitro, la respuesta celular para los biomateriales desarrollados. El Análisis de citotoxicidad, mediante el ensayo de MTS, así como los estudios de inmunofluorescencia, mediante microscopía confocal (MC), y SEM, mostraron una biocompatibilidad similar a los materiales de referencia.

**Palabras Clave:** cemento dental, biomateriales, fosfato de zinc, hopeita, zincato de calcio, silicato tricálcico, recubrimiento de titanio, cultivo celular, biocompatibilidad.

**Abstract:** Zinc phosphate-based dental cements, modified with calcium additives (tricalcium silicate and calcium zincate) have been prepared and full characterized, with the purpose of studying the effects of these additives on their composition, morphology and bioactivity. A first stage consisted of analyzing the changes introduced with respect to a reference material by using X-ray diffraction (XRD) with Rietveld refinement, X-ray Fluorescence (WDXRF), differential thermal and thermogravimetric analyses (DTA-TG), scanning electron microscope (SEM) and BET surface analysis. The obtained dental cements consist of multiple crystalline phases, mainly hopeite,  $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_2O$ , together with other secondary phases. Additionally, an amorphous phase of unknown composition as yet, in which calcium is invariably present, was also detected. The morphology and porosity of biomaterials was found to be affected by the type and amount of the calcium additive, the less porous sample being that prepared with calcium zincate. The second stage of this study deal with the preparation of zinc phosphate-based coatings on titanium substrates. The process consisted of a hydrothermal treatment of the metal with calcium-containing solutions of zinc phosphate. The goal was to check the effects of the presence of calcium on coating properties, such as chemical stability and biocompatibility. For both kinds of biomaterial preparations, the cell response was analyzed, in vitro. Analysis of cytotoxicity by MTS testing, as well as immunofluorescence, using confocal microscopy (CM), and SEM studies, showed a biocompatibility behavior similar to that of the reference biomaterials.

**Keys words:** dental cement, biomaterials, zinc phosphate, hopeite, calcium zincate, tricalcium silicate, titanium coating, cell culture, biocompatibility.



# ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN .....	11
1.1. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS .....	11
1.2. ORGANIZACIÓN DE LA MEMORIA .....	12
1.3. EL DIENTE Y SUS TEJIDOS .....	12
1.3.1. Morfología del diente.....	13
1.3.2. Composición química de los tejidos del diente .....	14
1.3.2.1 Composición del esmalte .....	14
1.3.2.2 Composición de la dentina .....	15
1.3.2.3 Composición del cemento .....	16
1.3.2.4 Composición de la pulpa .....	16
1.4. CEMENTOS DENTALES .....	16
1.4.1. Óxido de zinc y eugenol .....	17
1.4.2. Fosfato de zinc .....	17
1.4.3. Hidróxido de calcio .....	18
1.4.4. Cementos de silicato .....	18
1.4.5. Policarboxilato de zinc.....	19
1.4.6. Ionómero de vidrio .....	19
1.4.7. Ionómero de vidrio modificado con resina .....	19
1.4.8. Cemento con resina .....	19
1.5. RECUBRIMIENTO DE TITANIO.....	20
1.5.1. Mecanismos de modificación de la superficie de titanio .....	20
CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
2.1. PREPARACIÓN DE LOS CEMENTOS DENTALES.....	23
2.1.1. Preparación de la fase sólida del cemento.....	23
2.1.1.1. Síntesis del $\text{CaZn}_2(\text{OH})_6(\text{H}_2\text{O})_2$ .....	23
2.1.1.2. Preparación del polvo del cemento .....	24
2.1.2. Preparación de la fase líquida del cemento .....	24
2.1.3. Síntesis del cemento .....	24
2.2. RECUBRIMIENTO DE TITANIO.....	27
2.2.1. Preparación de las soluciones de fosfato de zinc.....	27
2.2.2. Preparación de las muestras recubiertas.....	27
2.3. CULTIVOS CELULARES.....	28
2.3.1. Estudio de la viabilidad celular mediante MTS.....	28

2.3.2. Estudio de la morfología y diferenciación celular mediante ensayos de inmunofluorescencia .....	29
2.3.3. Estudio de la adhesión y morfología celular mediante SEM .....	29
CAPÍTULO 3. TÉCNICAS INSTRUMENTALES.....	30
3.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	30
3.1.2. Fundamento.....	30
3.1.3. Equipo experimental.....	31
3.1.4. Afinamiento estructural por el método de Rietveld.....	31
3.1.5. X'Pert High Score .....	32
3.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE RAYOS-X DE LONGITUD DE ONDA .....	34
3.2.1. Fundamento.....	34
3.2.2. Equipo experimental.....	34
3.3. ANÁLISIS TÉRMICO DIFERENCIAL (ATD) Y TERMOGRAVIMÉTRICO (TG)....	35
3.3.1. Fundamento del análisis térmico diferencial (ATD) .....	35
3.3.2. Fundamento del análisis termogravimétrico (TG).....	35
3.3.3. Equipo experimental.....	35
3.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM) .....	36
3.4.1. Fundamento.....	36
3.4.2. Equipo experimental.....	36
3.5. ANÁLISIS DE SUPERFICIE.....	36
3.5.1. Fundamento.....	36
3.5.2. Equipo experimental.....	37
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
4.1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL .....	38
4.2. ANÁLISIS QUÍMICO .....	42
4.3. CARACTERIZACIÓN TÉRMICA .....	43
4.4. MICROESTRUCTURA DE LOS MATERIALES.....	44
4.5. ANÁLISIS DE SUPERFICIE.....	45
4.6. VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTS.....	48
4.6.1. Pastillas de cemento dental .....	48
4.6.2. Discos de Ti con recubrimiento.....	49
4.7. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA.....	49
4.7.1. Pastillas de cemento dental .....	49
4.7.2. Discos de Ti con recubrimiento.....	50

4.8. ADHESIÓN Y MORFOLOGÍA CELULAR MEDIANTE SEM.....	51
4.8.1. Pastillas de cemento dental .....	51
4.8.2. Discos de Ti con recubrimiento.....	52
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS .....	54
BIBLIOGRAFÍA .....	56

# CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS

El dominio de investigación de los biomateriales es multidisciplinar e incluye diversos aspectos de la ciencia de los materiales, la química, la física, la biología y la medicina. Un biomaterial es un material farmacológicamente inerte, diseñado para interactuar con sistemas biológicos con el fin de tratar, evaluar, reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo. Su aplicaciones y rendimiento, son de vital importancia para el desarrollo de implantes y tejidos en ingeniería biomédica.

La situación actual en biomateriales como los implantes dentales, obliga a desarrollar y mejorar los cementos dentales, así como las técnicas de recubrimiento para dichas prótesis. Desde una mejora de sus propiedades mecánicas, capacidad anticariogénica, osteointegración, reducción de costes y mejora de la calidad entre otras.

El presente TFG tiene como finalidad preparar, caracterizar y verificar, mediante test de biocompatibilidad, la idoneidad de biomateriales dentales, basados en fosfato de zinc. El objetivo que se persigue con esta aproximación metodológica es obtener materiales bioactivos, con posibilidad de interactuar con los materiales biológicos y, así, aumentar su integración realizando pruebas de recubrimiento de titanio puro, de uso dental, con los fosfatos de zinc, con el objeto de aumentar la osteointegración del metal implantable.

## **1.2. ORGANIZACIÓN DE LA MEMORIA**

Este documento está estructurado en cinco capítulos principales: Introducción (1), Materiales y Métodos (2), Técnicas de Caracterización (3), Resultados y Discusión (4) y, finalmente, Conclusiones y Líneas Futuras (5).

En el Capítulo 1 se pone de manifiesto las principales motivaciones y objetivos que se han tenido en cuenta para la realización de este Trabajo Fin de Grado (TFG), así como una descripción del estado del arte en distintos aspectos, desde los cementos dentales hasta las técnicas de recubrimiento en implantes de Titanio. Se revisa la estructura y composición química dental, los diversos cementos dentales existentes y por último, las principales técnicas de recubrimiento de Titanio.

El Capítulo 2 está dedicado a la descripción de los métodos de síntesis utilizados en la preparación de los materiales. Por un lado, la síntesis de los cementos dentales derivados del cemento de fosfato de zinc, y por otro, el método hidrotermal utilizado para el recubrimiento de Titanio. Por último, se detalla el proceso de funcionalización celular de los materiales sintetizados.

En el Capítulo 3 se describen las diferentes técnicas de caracterización, tanto de la estructura local como de la microestructura, utilizadas a lo largo del TFG.

En el Capítulo 4 se discuten los resultados más relevantes obtenidos durante la realización del presente trabajo de investigación. Se describe la caracterización de los materiales mediante diferentes técnicas estructurales y microestructurales, así como la funcionalización celular de los materiales sintetizados.

Por último, en el Capítulo 5 se resumen las conclusiones generales y los principales logros de este trabajo, así como las posibles líneas de desarrollo.

## **1.3. EL DIENTE Y SUS TEJIDOS**

El sistema masticatorio es el conjunto de tejidos y órganos inervados encargados de la masticación, la deglución e incluso del habla y de la fonética. Está formado por huesos, dientes, articulaciones, ligamentos y músculos. Algunos de estos constituyentes son tejidos duros, como las piezas dentarias y el hueso alveolar; otros, son estructuras blandas que sostienen y protegen a los anteriores.

Los seres humanos poseen dos denticiones a lo largo de su vida. La primera es la llamada dentición temporal o decidua (empieza a formarse alteraciones congénitas, enfermedades dentales...), donde los primeros dientes aparecen aproximadamente a los 6 meses hasta los 28 meses. A partir de los 6 años, los primeros dientes permanentes empiezan a erupcionar. Dicha emergencia indica el periodo de transición en el que concurren dientes temporales con dientes de reemplazo hasta los 12 años, momento en el que comienza la fase de dentición permanente [1].

### 1.3.1. Morfología del diente

El diente es un órgano duro, formado por cuatro tejidos, tres derivados del mesodermo: la dentina, el cemento y la pulpa, y uno derivado del ectodermo: el esmalte [2]. Además, está constituido por una corona clínica (porción libre) y una raíz (porción inserta en la cavidad del hueso maxilar denominada alveolo dentario). La unión entre ambos es el cuello dentario (Figura 1).

El esmalte dental es el tejido más duro y mineralizado del organismo, así como acelular. Su dureza se debe a su elevado contenido en sales minerales y a una organización cristalina particular, haciéndolo la capa protectora del diente. Es translúcido y recubre a la dentina, la cual le da el color al diente [3].

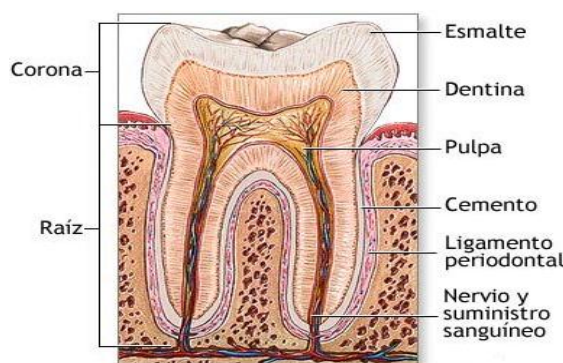


Figura 1. Estructura anatómica del diente [4].

La dentina es el segundo tejido más duro del cuerpo humano. Su contenido mineral es menor que el del esmalte porque tiene más cantidad de fase orgánica (la cual determina su elasticidad) y un plasma acuoso. La dentina se diferencia del esmalte por ser un tejido capaz de autorepararse [3]. La pulpa es un tejido conjuntivo gelatinoso altamente vascularizado que ocupa la cavidad pulpar de la corona y el conducto radicular.

El complejo dentino-pulpar está constituido por distintos tipos de células, de las cuales las más importantes son los odontoblastos, responsables de formar y reparar la dentina. Estas células producen la matriz colágena de la dentina participando en el proceso de calcificación de la misma. También encontramos fibroblastos que secretan los precursores de las fibras colágenas, reticulares y elásticas permitiendo la unión entre sí de las células; células ectomesenquimáticas, las cuales disminuyen con la edad; macrófagos, que cambian de forma según se encuentren fijos o libres en el tejido conectivo actuando como mecanismo de defensa y otras células como linfocitos, células plasmáticas, etc. [3].

El cemento es un tejido conectivo calcificado responsable de la fijación del diente al hueso alveolar. Entre sus células formadoras encontramos cementoblastos, cementocitos (cementoblastos atrapados en el interior del cemento mineralizado) y cementoclastos, los cuales tienen capacidad de resorción de los tejidos duros [3]. El

cemento dental se encuentra rodeando a la superficie externa de la raíz del diente y recubriendo al mismo tiempo la dentina.

Por último, el periodonto es el conjunto de tejidos que constituyen el órgano de sostén y protección del diente. Formado por el cemento, el ligamento periodontal y el hueso alveolar, comprende dos regiones: la encía que rodea al cuello dentario y la unión dentogingival que une la encía a la pieza dentaria.

### 1.3.2. Composición química de los tejidos del diente

#### 1.3.2.1 Composición del esmalte

Químicamente está constituido aproximadamente por un 96% de matriz inorgánica, un 1% de matriz orgánica y un 3% de agua. El material inorgánico está formado por diminutos cristales de apatita en forma de carbonato apatita con alta sustitución iónica, organizándose en cristales de 50 nm de ancho y 25 nm de grosor.

La composición química de la apatita cambia radicalmente de superficie a interior; este último es menos denso y contiene más carbonato y magnesio y menos fluoruro. De forma general, se puede representar por la siguiente fórmula [5]:



Lo cual indica que el biomineral es no estequiométrico, deficiente en calcio y fosfato, este último parcialmente sustituido por carbonato. Además de los indicados en la fórmula, otros muchos elementos pueden estar presente en diferentes concentraciones, sustituyendo parcialmente al  $\text{Ca}^{2+}$  o al  $\text{OH}^-$ , por ejemplo,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ , etc.

Los cristales según el ángulo de corte, se disponen como bandas delgadas dispuesta irregularmente en cortes longitudinales, o como secciones ovoides en cortes transversales, Figura 2. Forman prismas hexagonales en la matriz extracelular, esmalte prismático, de 5  $\mu\text{m}$  de ancho y 9  $\mu\text{m}$  de largo dispuestos perpendiculares a la superficie de dentina, de forma circular y entrelazada. Sin embargo, en la periferia de la corona dental se encuentra el esmalte aprismático, ver Figura 2. Este se caracteriza por una variación brusca en la organización y orientación de los cristales [3], [6].

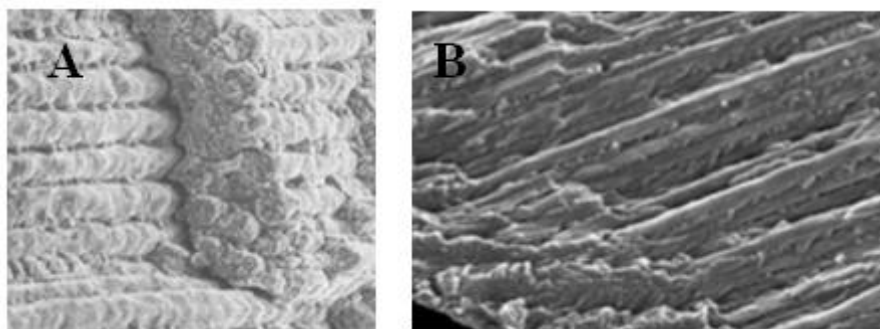
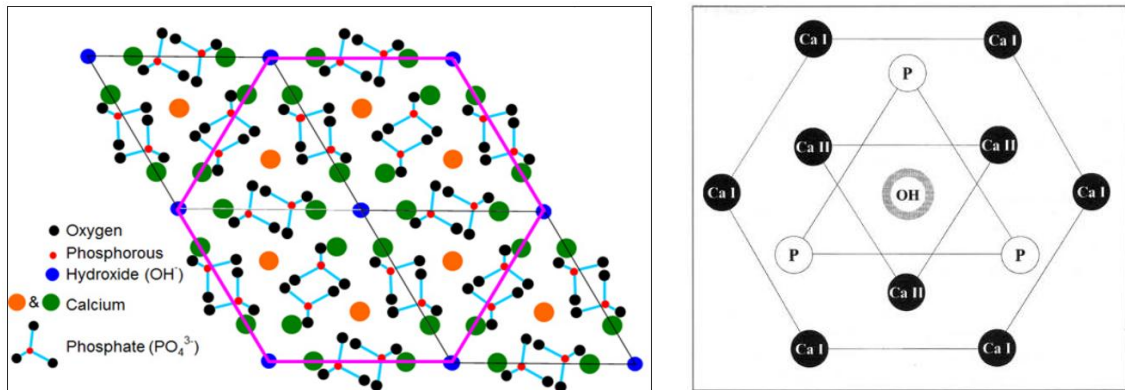


Figura 2. En A, esmalte prismático en corte longitudinal, en B, esmalte aprismático [7].

La estructura de la apatita puede verse en la figura 3. Los iones hidroxilo se encuentran en canal central (dirección c) interaccionando con iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), que se disponen en los vértices de un hexágono. A su vez existen otros iones de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) que ocupan los vértices de otro hexágono periférico. Los iones fosfato se colocan entre los dos tipos de iones de calcio.



**Figura 3. Modelo estructural de hidroxiapatito a la izquierda de la figura [8]. A la derecha se muestra la estructura plana de los hexágonos con la disposición de iones calcio y fosfato alrededor del hidroxilo en el eje central [9].**

La matriz orgánica resulta difícil de caracterizar debido a la contaminación que se produce al intentar separar su fase orgánica, sin embargo, se sabe que está constituida por una pequeña cantidad de polisacáridos y proteínas (principalmente enamelinas) [10]. Las amelogeninas se localizan entre los cristales de las sales minerales y su contenido disminuye a medida que madura el esmalte. De la degradación de las amelogeninas resultan las enamelinas (localizadas en la periferia de los cristales), formando las proteínas de cubierta. En la capa más exterior podemos encontrar ameloblastinas. Por último, el agua se localiza en la periferia del cristal formando la capa de hidratación.

Las células formadoras de esmalte son los ameloblastos. Dicho mecanismo se conoce como amelogénesis, y consta de una primera fase de elaboración de la matriz orgánica y de una segunda fase, la mineralización de la misma.

### 1.3.2.2 Composición de la dentina

La composición química de la dentina es aproximadamente de 70% de materia inorgánica (principalmente cristales de hidroxiapatita), 18% de materia orgánica (principalmente fibras colágenas) y 12% de agua [3].

La matriz inorgánica está compuesta por cristales de hidroxiapatita, siendo más pequeños y delgados que los del esmalte y más parecidos a los del tejido óseo. Los cristales se orientan de forma paralela entre los espacios de las fibras de colágeno. En la fracción mineral, además hay cierta cantidad de fosfatos amorfos, carbonatos, sulfatos y oligoelementos. La matriz orgánica está constituida por un 90% de colágeno (tipo I en un 98%), 10% de proteínas no colágenas y fosfolípidos [3].

En la estructura de la dentina podemos encontrar unidades primarias como los túbulos dentarios, que son estructuras cilíndricas delgadas que se extienden por todo el espesor de la dentina y unidades secundarias, que son las líneas incrementales, las cuales se deben al crecimiento continuo de la dentina.

### **1.3.2.3 Composición del cemento**

El cemento contiene de 46 a 50 % de sustancia inorgánica, un 22 % de materia orgánica y un 32 % de agua. La parte inorgánica está formada por fosfatos de calcio en forma de cristales de hidroxiapatita más pequeños que los del esmalte y la dentina. Estos cristales son más delgados en la superficie aumentando hacia las capas profundas. Además contiene carbonatos de calcio y oligoelementos, teniendo la mayor cantidad de fluoruro de todos los tejidos mineralizados del cuerpo. Según su composición, podemos encontrar tres tipos de cementos, el acelular, el celular y el afibrilar [3]. La matriz orgánica está compuesta por colágeno (tipo I en un 90%), proteoglucanos, glucosaminoglucanos y glucoproteínas.

### **1.3.2.4 Composición de la pulpa**

La pulpa está formada por un 75% de agua y un 25% de materia orgánica constituida por células y matriz extracelular. Estructuralmente podemos distinguir cuatro zonas: una zona odontoblástica en la periferia pulpar, la zona acelular por debajo de los odontoblastos, una zona celular y la zona central de la pulpa que se caracteriza por la presencia de vasos sanguíneos y nervios [6].

## **1.4. CEMENTOS DENTALES**

La odontología restauradora se encarga del cuidado y conservación de las piezas dentarias. Ante dientes con caries, fracturados o incluso ausencia de ellos, existen las restauraciones dentales directas y las indirectas. El modo directo es aquel en el que rellenan espacios mediante amalgamas o composites y el indirecto es en el que se fabrica un modelo que actuará como prótesis uniéndose al diente, mediante cementos convencionales o adhesivos.

La función principal de un cemento dental es llenar el espacio entre el material restaurador (definitivo o provisional) y la preparación de los dientes (o implante), así como para mejorar la resistencia al desprendimiento de la restauración durante su función. El éxito a largo plazo de una restauración es muy dependiente de la adecuada selección y manipulación de los mismos.

La mayoría de los cementos se suministran en forma de polvo y líquido. A excepción de los cementos de resina, el líquido suele ser una solución ácida y el polvo de naturaleza básica que al fraguar adquieren suficiente resistencia como para ser empleados en restauraciones permanentes o temporales. Dada la gran variedad de cementos disponibles actualmente, existen distintas clasificaciones. Algunas atienden a la capacidad de adhesión, otras a su composición química y otras a su longevidad. Un

resumen cronológico puede visualizarse en la Figura 4 y algunas de las propiedades físicas de los mismos en la Tabla 1.

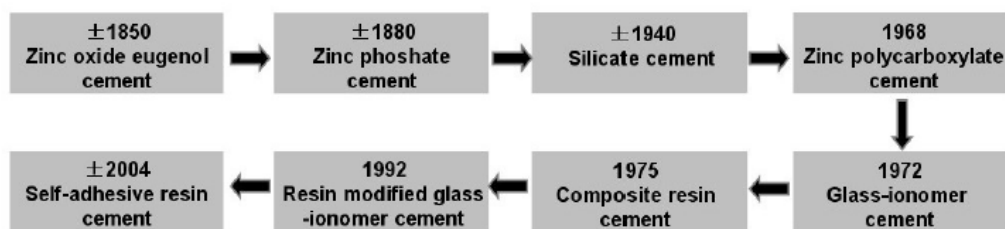


Figura 4. Desarrollo cronológico de los cementos dentales [11].

#### 1.4.1. Óxido de zinc y eugenol

El cemento se forma a partir de una mezcla de óxido de zinc y eugenol. Diversos aditivos se han combinado para mejorar su resistencia y solubilidad, por ejemplo, sílice, alúmina, fosfato dicálcico entre otros; sin embargo, a pesar de su buen efecto sobre la pulpa por su contenido de eugenol, tiene un alto espesor de película y se ha limitado su uso en la práctica clínica actual [12].

#### 1.4.2. Fosfato de zinc

Se basa en una reacción ácido-base a través de la mezcla de polvo y líquido. El polvo es óxido de zinc con óxido de magnesio (2-10%) y el líquido es ácido fosfórico (45-64%) con óxido de aluminio (0-3%) y óxido de zinc (0-10%). El uso de estos reactivos se debe a que forman fosfatos que estabilizan el pH ácido y reducen su reactividad [13].

La mezcla del cemento es crítica y debe realizarse en una placa de vidrio a temperatura ambiente o incluso enfriada a 6 °C, en pequeños incrementos en un área amplia. El fracaso en la mezcla, acelera la reacción y afecta a la consistencia del cemento final. Durante la mezcla, comienza una reacción exotérmica, formando una matriz amorfa de óxidos de zinc y en la superficie, fosfato ácido de zinc que finalmente se transforma en un fosfato de zinc terciario hidratado,  $Zn_3(PO_4)_2 \cdot 4H_3O$ , conocido como Hopeita. El MgO reacciona para formar fosfato de magnesio ( $Mg_3(PO_4)_2$ ).

El tiempo de trabajo del cemento se puede extender en gran medida desde 2-11 min., y está influenciado por la relación polvo/líquido, las pequeñas variaciones en el tiempo y contenido de agua del componente líquido. Este último, también influye en la aparición de poros amplios y capas de cristales en la superficie, afectando a las propiedades de resistencia y adhesiva del cemento.

Algunas de sus ventajas son su fácil manipulación y su bajo coste, fuerza compresiva de 83 a 110 MPa y bajo grado de solubilidad. Entre sus desventajas tiene un pH inicial de 3,5 lo que provoca irritación pulpar, carece de adhesión a estructura dental ya que ejerce una unión mecánica [14]. Sin embargo, está permitiendo su uso en áreas de gran esfuerzo masticatorio y prótesis parciales fijas extensas [11].

Algunas modificaciones que ha tenido este tipo de cemento ha sido la adición de cobre; provocando decoloración y siendo tóxico, plata; haciéndolo pocos estéticos, fluoruro de estaño (1-3%); para proporcionar propiedades anticariogénicos y eugenol, para evitar la acidez inicial. A pesar de ello, estos cementos tenían baja resistencia y fueron altamente solubles.

#### 1.4.3. Hidróxido de calcio

Compuesto básicamente de hidróxido de calcio  $(Ca(OH))_2$  más agua bidestilada formando un hidrogel. Es el material de protección más soluble, tiene baja resistencia y se usa para proteger a la pulpa por su acción básica [12].

#### 1.4.4. Cementos de silicato

Fue uno de los primeros cementos translucidos. El polvo está compuesto por óxido de silicio, óxido de aluminio y fluoruros. El líquido es una solución acuosa de ácido fosfórico, con mayor porción de agua que los cementos de fosfato de zinc [13]. Son altamente irritantes para la pulpa, de alta fragilidad y solubilidad.

**Tabla 1. Resumen de las características de los principales tipos de cementos dentales [12].**

Tipo cemento	Tiempo fraguado (min)	Espesor película ( $\mu$ )	Adhesión a la dentina (MPa)	Resistencia a la compresión (MPa)	Resistencia a la tracción (MPa)	Solubilidad en agua (%)	Módulo elástico (GPa)
ZnO y eugenol	4-10	25	-	6-28	-	0.04	5.4
Fosfato de Zinc	5	<25	0	104	5.5	0.06	13.5
Policarboxilato de zinc	6	<25	-	55	6.2	0.06	5.1
Ionómero de vidrio	7	<25	1.1-4.5	86	6.2	0.4-1.5	7.3
Ionómero de vidrio con resina	5-6	10-22	5-7	120-155	20-24	0.07	0.037
Resina	2-4	>25	18-30	70-172	34-37	0.01	2.1-3.1

#### **1.4.5. Policarboxilato de zinc**

Fue el primer cemento que surgió al buscar un agente cementante adhesivo, se trata de una reacción ácido-base al añadir óxido de zinc y de magnesio a una solución viscosa de ácido poliacrílico. Las principales ventajas son su baja irritación pulpar y fácil manipulación. Presenta baja resistencia a la compresión, débil adhesión al diente y el exceso se debe retirar antes de que frague [14].

#### **1.4.6. Ionómero de vidrio**

Se trata de una reacción ácido-base entre partículas de material vítreo fluorado, silicato de aluminio y un líquido compuesto por ácido poliacrílico y carboxílicos. Posee adhesión al diente, pero presentan sensibilidad a la humedad y son altamente solubles [14]. Carecen de resistencia en zonas de elevada concentración de carga, por lo que se le incorporó partículas metálicas. Su aspecto grisáceo los hace poco estéticos, han sido recomendados como una alternativa a la amalgama en ciertas aplicaciones [12].

#### **1.4.7. Ionómero de vidrio modificado con resina**

Este tipo de cemento se forma reemplazando parte del ácido poliacrílico en el ionómero de vidrio convencional por monómeros hidrófilos de metacrilato. Entre sus ventajas se destacan su fácil manipulación, mejor resistencia a la compresión y tensión que el fosfato de zinc, los cementos de policarboxilato y algunos ionómeros convencionales, así como poca sensibilidad en la pulpa si su mezcla se realiza correctamente [11]. A pesar de la liberación del flúor, su efecto no está bien definido y precisa más estudios; además, la retención del material es menor [15].

#### **1.4.8. Cemento con resina**

Los cementos con resina fueron introducidos como alternativa a la reacción ácido-base. Son cementos a base de polímeros que pueden ser polvo-polvo o polvo-líquido. El ácido metacrílico monomérico se combina con un material vítreo, a base de fluoroaluminosilicato de bario, cuarzo, sílice y otros rellenos de vidrio [14]. Presenta algunas desventajas como la inhibición parcial en presencia de óxido de zinc y eugenol, y protectores pulpares, además de presentar escasa retención en estructuras cementadas sobre implantes y su elevado coste. Algunas de sus ventajas son su unión a la dentina y su baja solubilidad [12].

A pesar del gran número de cementos que hay a día de hoy, ninguno de ellos puede reemplazar al esmalte y a la dentina, por ello es de suma importancia su preservación. Además, no existe el cemento que pueda ser usado universalmente para todas las restauraciones, pues cada uno posee características que las diferencian una de otras. El hecho de la búsqueda del cemento ideal, se debe a que la restauración debe fijarse perfectamente al diente, es decir, perfecto sellado marginal y duradero evitando el intercambio de bacterias presentes en los fluidos bucales que puedan conllevar a la aparición de caries y sensibilidad dental.

Aunque el uso del cemento de fosfato de zinc ha disminuido debido a sus propiedades mecánicas y biológicas frente a otros más novedosos, su trayectoria exitosa apoyada en evidencias clínicas [13] lo mantiene hoy en día en gran uso para restauraciones cementadas. Este hecho, junto con las ventajas que tiene, despierta el interés por llevar a cabo modificaciones químicas para evaluar si se obtienen mejoras frente a otros cementos.

## **1.5. RECUBRIMIENTO DE TITANIO**

La mayoría de los biomateriales metálicos son considerados inertes y muy utilizados en implantología. Los principales son el acero inoxidable, el titanio y sus aleaciones así como también aleaciones de cobalto.

El titanio es un metal reactivo que expuesto al medio ambiente forma una fina capa de óxido (4-5nm) que evita su corrosión [15]. Sin embargo, la capa de óxido no es estable bajo condiciones de carga pudiendo liberar iones Ti, por lo que es necesario realizar revestimientos químicamente estables y biocompatibles que eviten su corrosión y toxicidad al entrar en contacto con los fluidos corporales favoreciendo la osteoconductividad [16].

El titanio comercialmente puro tiene diversos grados de pureza graduadas de 1 a 4 que se caracterizan en función del contenido de oxígeno, carbono y hierro. Algunas de sus características principales son su resistencia frente a los fluidos corporales y a la corrosión, su elevada resistencia a la tracción, gran tenacidad y bajo módulo elástico [17].

A pesar de sus excelentes propiedades es necesario tener en cuenta la localización del implante, pues la interfase tejido-implante que se originará determinará la biocompatibilidad del mismo. En el caso de implantes llevados a cabo en el hueso es necesario que tras la respuesta inflamatoria por parte del organismo, los fibroblastos no formen una capa fibrosa que evite el contacto directo con el implante. Este hecho favorecería micromovimientos y rechazo del material. En el caso ideal, las células que se diferencian en osteoblastos deben formar junto con los fibroblastos una capa cerca de la superficie del implante llenando el espacio entre el hueso y el implante con una matriz colagénica que posteriormente mineralizará llevando a cabo la osteointegración [18].

### **1.5.1. Mecanismos de modificación de la superficie de titanio**

Dada la importancia de controlar las propiedades físico-químicas y la morfología de la superficie del implante, se han ido desarrollando una gran variedad de métodos que modifican la superficie de los mismos. Hay diferentes clasificaciones de los tratamientos superficiales en los metales. Un tipo de clasificación podría ser en dos grupos principales, modificación de la superficie y revestimiento de la superficie [16]. Hay muchos tipos de métodos de modificación superficial, tales como, tratamiento hidrotermal, pulverización catódica de iones, grabado ácido, tratamiento con peróxido

de hidrógeno, etc. También hay métodos de recubrimiento como rociado de plasma, deposición por láser, preparación del sol-gel, entre otros. Otra clasificación podría ser en función de si son métodos mecánicos (modificación del tamaño de poros, desgaste, rugosidad etc.), métodos químicos (tratamientos químicos, métodos de sol-gel, etc.) o métodos físicos (pulverización térmica, implantación de iones, etc.) [19].

Los métodos mecánicos consisten en obtener topografías superficiales específicas llevadas a cabo con deformaciones que aumentan la dureza superficial. Incluyen mecanismos de pulido, desgaste, entre otros.

Los métodos químicos son aquellos que mejoran la biocompatibilidad, la osteointegración, la resistencia a la corrosión, etc. Algunos de los métodos químicos utilizados son: los tratamientos químicos, basados esencialmente en reacciones entre el titanio y una solución; el método sol-gel, en el que se depositan revestimientos cerámicos delgados asegurando un mejor control con respecto a la composición química y microestructura del recubrimiento; la deposición química en vapor, donde se realiza una deposición de un compuesto no volátil sobre el sustrato aumentando la dureza y la resistencia a la corrosión; los procesos electroquímicos, los cuales consisten en depositar finas capas de metal sobre la superficie del material sumergido en una solución de iones metálicos o electrolito; los métodos bioquímicos, llevados a cabo por electrodeposición de fosfato de calcio, proteínas o factores de crecimiento.

Los métodos físicos persiguen formar películas porosas, densas y resistentes. Incluyen procesos tales como la pulverización térmica, donde los materiales de revestimiento son fundidos térmicamente y pulverizándolos a alta velocidad sobre el sustrato, implantación de iones y sputtering (pulverización catódica).

Además de estos métodos mencionados, recientemente se están estudiando la obtención de nanoestructuras que interaccionen con las células permitiendo una mejor adhesión e incluso liberación de fármacos al poseer una superficie y características mecánicas similares a las del hueso; modificaciones con gradientes, es decir, obtención de dos materiales con diferentes propiedades formando uno; modificaciones biomiméticas, las cuales emulen a la naturaleza conduciendo así respuestas celulares deseables [18].

Cabe destacar que la mayoría son procesos caros, y que se estudiará el recubrimiento en Ti por la técnica de fosfatación de zinc por su bajo costo, fácil producción, buena resistencia a la corrosión, etc. Se trata de una técnica muy conocida en revestimientos en el campo de la ingeniería. La capa de recubrimiento es químicamente estable y fuertemente adherida. Se compone de zinc y de fosfato, este último en cantidad similar al de la hidroxiapatita, pudiendo ser un método alternativo a los recubrimientos de hidroxiapatita. Se pretende con ello, llevar a cabo una hibridación con cerámicas bioactivas que al interaccionar con el hueso, tejidos adyacentes y fluido oral, pueda llegar a formar hidroxiapatita, ver Figura 5.

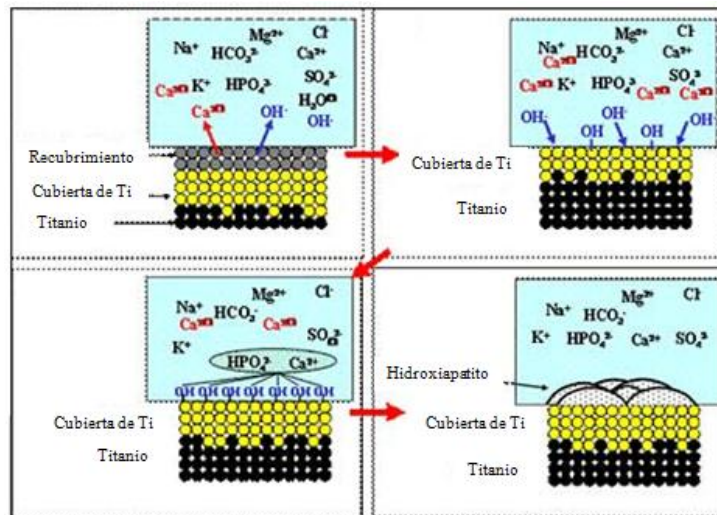


Figura 5. Esquema de la formación de hidroxiapatito a partir de cerámicas bioactivas (modificación de <http://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=4022>).

## CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. PREPARACIÓN DE LOS CEMENTOS DENTALES

El cemento se sintetizó a partir de una fase líquida y una sólida que se mezclaron posteriormente. Para la síntesis de la fase sólida del cemento se emplearon los siguientes reactivos: óxido de zinc, ZnO 99.5%, hidróxido de calcio, Ca(OH)<sub>2</sub> 97%, y óxido de magnesio, MgO 99.9%, de VWR Chemicals, óxido de zirconio anhidro, ZrO<sub>2</sub>, de Merck, silicato tricálcico, (3CaO·SiO<sub>2</sub>, alita), de Mineral Research Processing y zincato de calcio, CaZn<sub>2</sub>(OH)<sub>6</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>, sintetizado en el laboratorio según el procedimiento descrito a continuación. Para preparar la fase líquida se mezcló ácido fosfórico (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) 85%, de VWR Chemicals, con ZnO 99.5% e hidróxido de aluminio, Al(OH)<sub>3</sub>, de Sigma-Aldrich.

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

##### 2.1.1.1. Síntesis del CaZn<sub>2</sub>(OH)<sub>6</sub>(H<sub>2</sub>O)<sub>2</sub>

Para la síntesis del zincato de calcio se disolvió 0.25 g ZnO en 25 mL de una disolución de hidróxido de potasio (KOH) al 20%. Disuelto el ZnO, se adicionó 2.5g de Ca(OH)<sub>2</sub>, 3.6 mL de agua y 5.5 g de ZnO. Tras dos días en agitación se centrifuga la suspensión y el sólido blanco se suspende en 100 mL de agua destilada, posteriormente, se filtra y se lava con acetona. En último lugar, se seca en una estufa a 60°C [20].

### **2.1.1.2. Preparación del polvo del cemento**

Para obtener el polvo del cemento, se calcinaron los reactivos de ZnO, Ca(OH)<sub>2</sub>, MgO a 1000 °C durante 4 h. para reducir la reactividad del polvo y controlar sus propiedades. Posteriormente se molturaron en un mortero de ágata y almacenaron por separado en recipientes para muestras. Los reactivos Al(OH)<sub>3</sub> y alita no se calcinaron.

El principal componente del polvo es el ZnO, conocido por su propiedad antimicrobiana, proveniente de la liberación de iones Zn<sup>2+</sup> que inhibe el transporte y el metabolismo de los azúcares, desestabilizando la formación de placa dental bacteriana [21]. Además, el zinc interviene en la formación de los huesos. El segundo reactivo mayoritario es el MgO, esencial para el desarrollo de los dientes y huesos, da color blanco y aumenta la resistencia a la comprensión del cemento. Otros reactivos minoritarios como relleno son: el CaO (resultado de calcinar Ca(OH)<sub>2</sub>, que contiene el componente mayoritario de los huesos y dientes, pudiendo formar Apatito al entrar en contacto con el ácido fosfórico; zincato de calcio, por ser una combinación de zinc y calcio; silicato tricálcico, biocompatible e inductor de tejidos mineralizados. Por último, el reactivo ZrO<sub>2</sub> se utiliza por su radiopacidad, pues los implantes, hueso y cementos endodónticos necesitan ser lo suficientemente radiopacos para poder distinguirse del resto de estructuras anatómicas circundantes. Hasta ahora, una de las opciones más utilizadas había sido el óxido de bismuto, pero se ha demostrado que causa decoloración dental y que influye negativamente en el crecimiento y proliferación del tejido de la pulpa dental [22].

### **2.1.2. Preparación de la fase líquida del cemento**

El líquido es una combinación de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> y agua con sales de zinc y aluminio que actúan como buffer disminuyendo la velocidad de reacción y amortiguando la acidez del H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Para ello, se tomó H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> al 85% en peso y se añadió agua destilada hasta obtener una concentración del 56% en peso. El motivo de usar esta concentración es que el contenido de agua en el líquido es significativo (44% en este caso), ya que controla la ionización del ácido influyendo en la velocidad de reacción de fraguado [13].

En las distintas muestras preparadas, al H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> se añadieron, hasta un 5% en peso de la cantidad total de polvo, ZnO y Al(OH)<sub>3</sub>, según se indica en la Tabla 1, 2 y 3, por lo beneficios que aportan en la preparación de los rellenos dentales, a pesar de tener la opción de no introducir dichos reactivos.

### **2.1.3. Síntesis del cemento**

El método de síntesis es el aplicado por Servais [23] ya que se sigue usando en la literatura actual. Se prepararon diferentes series de muestras de cemento por peso variando la proporción de líquido/polvo. En la serie R, la de referencia, dicha relación era de 0.8 en peso; la composición química del polvo utilizado fue una relación en peso de 10:1 de ZnO/MgO suponiendo un 95% en peso del total del polvo. El 5% restante lo conformaban los reactivos ZnO y Al(OH)<sub>3</sub>, ver Tabla 2. Las series A, B y C (Tabla 3-

5), se caracterizan porque el 5% restante lo conforman los reactivos de CaO, alita, Zr<sub>2</sub>, ZnO y Al(OH)<sub>3</sub>. Con respecto a la serie R, la serie A solo añade alita y Zr<sub>2</sub> y la serie B, solo CaO. La serie C es una combinación de todos los reactivos. Por último, la serie D se caracteriza por añadir el reactivo de zincato de calcio variando la relación líquido/polvo en peso hasta un valor de 0.55 (añadiendo más cantidad de polvo), ver Tabla 6.

Para la síntesis del cemento, a temperatura ambiente, en una loseta gruesa de vidrio se coloca la cantidad de polvo a mezclar para 1 g de líquido y, con una espátula de acero inoxidable, se hacen 8 divisiones al polvo como se ilustra en la Figura 6. A continuación se va mezclando el polvo de forma sucesiva, durante unos 15 segundos para cada división, hasta lograr la consistencia adecuada. De esta manera, se va neutralizando la acidez de la pasta y se libera la máxima cantidad de calor, para que no frague antes de tiempo, ya que se trata de una reacción muy exotérmica.

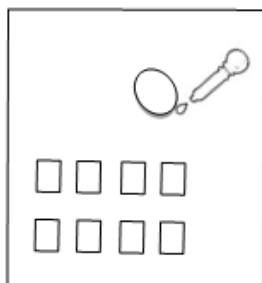


Figura 6. División del polvo de cemento junto con la fase líquida antes de proceder a su mezcla.

Si buscamos el cemento de tipo I, esta consistencia debe ser filante, utilizada para la fijación de prótesis, incrustaciones o incluso bandas de ortodoncia. Para conseguir el cemento de tipo 2, obteniendo una textura de masilla, se añade más cantidad de polvo para la misma cantidad de líquido. El proceso de síntesis en ambos tipos es el mismo y el tiempo total de mezcla es de dos minutos. Ambos tipos de cemento fueron sintetizados consiguiendo añadir hasta 1.8 g. de polvo por 1 g. de líquido.

Tabla 2. Composición de las fases sólida y líquida para la serie R de los cementos sintetizados y su pH correspondiente (medido con un pHmetro a las 2 horas de la sintetización del cemento).

SERIE R:	POLVO (%)			LÍQUIDO (%)		pH
	ZnO	MgO	Peso total (g.)	ZnO	Al(OH) <sub>3</sub>	
1	86.355	8.645	1.25	2.5	2.5	6.61
2	86.355	8.645	1.25	2	3	6.95
3	86.355	8.645	1.25	3	2	6.90

**Tabla 3. Composición de las fases sólida y líquida para la serie A de los cementos sintetizados y su pH correspondiente (medido con un pHmetro a las 2 horas de la sintetización del cemento).**

SERIE A:	POLVO (%)					LÍQUIDO (%)		pH
	ZnO	MgO	3CaO·SiO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub>	Peso total (g.)	ZnO	Al(OH) <sub>3</sub>	
1	86.355	8.645	2		1.25	1	2	7.21
2	84.900	8.645	1.58	1.5	1.25	1.42	2	6.49
3	84.452	8.645	1.1		1.25	1.9	2	6.95

**Tabla 4. Composición de las fases sólida y líquida para la serie B de los cementos sintetizados y su pH correspondiente (medido con un pHmetro a las 2 horas de la sintetización del cemento).**

SERIE B:	POLVO (%)				LÍQUIDO (%)		pH
	ZnO	MgO	CaO	Peso total (g.)	ZnO	Al(OH) <sub>3</sub>	
1	86.355	8.645	2	1.25	1	2	6.30

**Tabla 5. Composición de las fases sólida y líquida para la serie C de los cementos sintetizados y su pH correspondiente (medido con un pHmetro a las 2 horas de la sintetización del cemento).**

SERIE C:	POLVO (%)						LÍQUIDO (%)		pH
	ZnO	MgO	CaO	3CaO·SiO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub>	Peso total (g.)	ZnO	Al(OH) <sub>3</sub>	
1	86.355	8.645	1	1		1.25	1	2	6.09
2	85.595	8.645	1.12	1.12	0.80	1.25	0.76	2	6.7

**Tabla 6. Composición de las fases sólida y líquida para la serie D de los cementos sintetizados y su pH correspondiente (medido con un pHmetro a las 2 horas de la sintetización del cemento).**

SERIE D:	POLVO (%)						LÍQUIDO (%)		pH
	ZnO	MgO	3CaO·SiO <sub>2</sub>	ZrO <sub>2</sub>	CaZn <sub>2</sub> (OH) <sub>6</sub> ·2H <sub>2</sub> O	Peso total (g.)	ZnO	Al(OH) <sub>3</sub>	
1	81.1	8.19	2		5(0.90% CaO)	1.25	1	2	5.10
2	81.1	8.19	2	4	5 (0.90% CaO)	1.29	1	2	6.37
3	86.355	8.645	2	4	7 (1.26% CaO)	1.39	1	2	6.98
4	86.355	8.645	2	4	13,58 (2.5% CaO)	1.47	1	2	5.31
5	86.355	8.645	1	3	5,51 (1% CaO)	1.30	1	2	3.06

## 2.2. RECUBRIMIENTO DE TITANIO

En este estudio, piezas de Ti puro, en forma de discos, se trataron con disoluciones de fosfato de zinc mediante un método hidrotermal. Tras el proceso, se investigó la naturaleza de la capa de recubrimiento y la respuesta de células in vitro.

### 2.2.1. Preparación de las soluciones de fosfato de zinc

Se utilizó el método descrito por Valanezhad *et al.* [16] en el que relación molar Zn/P se mantiene fija en un valor de 0.62. Así, la disolución de fosfato de zinc contiene: H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0.968 M, HNO<sub>3</sub> 2.53 M y ZnO 0.6 M. Se prepararon tres muestras diferentes. La A, disolución de partida anteriormente descrita; la B, que incluye la adición de CaO con la relación molar ZnO/CaO de la muestra B.1; y la C, que incluye la adición de zincato de calcio con la relación molar ZnO/Zincato de la muestra D.2.

### 2.2.2. Preparación de las muestras recubiertas

A partir de una lámina de Ti [24] de 0.127 mm de espesor se obtuvieron discos de unos 13mm. de diámetro. Los discos, lavados previamente con acetona y agua destilada, se sumergieron en las correspondientes disoluciones de fosfato de zinc, situadas en reactores de Teflón<sup>®</sup> aptos para síntesis hidrotermal. La reacción se mantuvo a 180 °C, durante 48 horas. Al finalizar, los discos se lavaron con agua destilada en baño de ultrasonidos.

## **2.3. CULTIVOS CELULARES**

Para evaluar la morfología, diferenciación, viabilidad y adhesión a las superficies de las muestras preparadas, se utilizó células madre mesenquimales, procedentes de la médula ósea de rata. Por un lado, se evaluaron las muestras R.2, C.2 y D.4 en forma de pastilla de 13 mm. de diámetro y 0.23 g. Para su realización, se prensaron aplicando una fuerza de una tonelada en tres veces consecutivas. Por otro lado, se utilizaron las muestras de recubrimiento de Ti obtenidas por calentamiento hidrotermal. Cada muestra se hizo por triplicado. Dicho proceso se realizó en el departamento de Biología Celular, Genética y Fisiología de la universidad de Málaga.

El paso de las células supone transferirlas a un nuevo cultivo. Como las células se encuentran en cultivos adherentes, han de ser inicialmente despegadas usando la enzima tripsina. Dado que esta se inhibe al entrar en contacto con el suero, hace falta realizar tres lavados con tampón fosfato salino (PBS), pues el medio en el que se encontraban cultivadas las células contenía suero fetal bovino (FBS), glutamina y una serie de antibióticos, mantenidas en una incubadora celular a 37 °C con 5% de humedad y 90% de humedad.

Extraídas las células, se incubaron durante 4 min en las mismas condiciones que se encontraban anteriormente en la incubadora. Tras este paso, se centrifuga para eliminar la tripsina y se vuelve a preparar el medio de cultivo con FBS. Por último, se sumerge cada muestra (esterilizada a 121 °C durante 20 minutos) a analizar en pocillos diferentes con los cultivos celulares durante 12 días. El número de células usadas en cada muestra fueron de 30000, incluyendo la muestra control. Cabe destacar, que en los 12 días de cultivo, se realizaron cambios de medios para renovar los nutrientes y evitar la acumulación de productos metabólicos potencialmente tóxicos y células muertas.

### **2.3.1. Estudio de la viabilidad celular mediante MTS**

La viabilidad celular se analizó mediante un método colorimétrico que determina el número de células vivas debido a la bio-reducción del reactivo de Owen, por la acción de las co-enzimas NADPH (Nicotinamida-Adenina Dinucleótido fosfato) o NADH producidas en las enzimas deshidrogenasa presentes en las células metabólicamente activas. Para ello se utilizó (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), mediante el Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay, MTS [25].

El producto final es una coloración a causa del formazán, el cual es soluble en el medio de cultivo y puede ser cuantificado midiendo la absorbancia. Las muestras fueron transferidas a una microplaca y lavadas con PBS. El medio de cultivo se mezcló con el reactivo MTS en una relación 5:1. Transcurridas 3 horas de incubación, fueron extraídos 100 µl de medio y depositados en una microplaca para medir la absorbancia a 490 nm utilizando un lector multiplacas.

### **2.3.2. Estudio de la morfología y diferenciación celular mediante ensayos de inmunofluorescencia**

Para estudiar la morfología celular, se utilizó la tinción del citoesqueleto de actina. La preparación de las muestras consistió en los siguientes procesos:

1. Se lavaron una vez con PBS, a 4 °C durante 1 hora, con una disolución de formalina al 10%.
2. Se lavaron nuevamente con PBS tres veces y durante 5 minutos con tampón fosfato (PB) 0.1 M a temperatura ambiente.
3. Se añadió el tampón bloqueo (TB) (8.9 mL de PB (0.1M), 1 mL de FBS (10%) y 0.1 mL de triton X-100 al 0.1%) durante 2 horas a temperatura ambiente.
4. Posteriormente, cada muestra se mantuvo a 4 °C toda la noche en ausencia de luz tras añadir 10 µL de bodipy-FL phalloidin junto con el TB. Transcurrido dicho tiempo, se eliminó la disolución y se lavó con PB 0.1 M.
5. Por último, se añaden 5µl de 4.6-diamino-2-fenilindol (DAPI) incorporado (Vectashield, Vector Laboratories Inglaterra) con 5 ml de H<sub>2</sub>O por 30 minutos que sirve para teñir a los núcleos. Transcurrido dicho tiempo se lavan nuevamente dos veces con PB.

Para su visualización, se añadió una gotita de medio de montaje (Dako Fluorescent Mounting Medium) sobre el portaobjetos con las muestras.

### **2.3.3. Estudio de la adhesión y morfología celular mediante SEM**

Para estudiar la adhesión y la morfología adoptada por las células cultivadas sobre las distintas muestras, se utilizó el microscopio electrónico de barrido a un voltaje de 10KV. Las muestras fueron lavadas con PBS (2 veces) y fijadas con una disolución de glutaraldehído al 2 % durante una noche a 4°C. Pasado este tiempo, se lavaron con PBS tres veces más. Previamente a su visualización, fueron deshidratadas en distintas concentración de EtOH cada 5 minutos (30-90% en intervalos de 10%, después al 96% y por último a 100% tres veces) y secadas por el método de punto crítico. Las muestras fueron recubiertas con una capa de oro antes de su observación por SEM.

## CAPÍTULO 3. TÉCNICAS INSTRUMENTALES

### 3.1. DIFRACCIÓN DE RAYOS X

#### 3.1.2. Fundamento

La difracción de rayos X es una técnica que permite reconocer las fases cristalinas en un material. Se basa en el fenómeno de difracción que ocurre cuando una onda pasa entre dos puntos separados a una distancia similar a la longitud de onda. En este caso, del orden de 0.1 nm.

La ley de Bragg, Ecuación 1, consiste en que el haz de rayos X con longitud de onda  $\lambda$  incide sobre los planos de átomos del cristal, separados a una distancia  $d$ , produciendo una reflexión con el mismo ángulo ( $\theta$ ) que el de incidencia. Para ello es necesario que los haces estén en fase, situación que solo ocurrirá si hay la misma distancia entre AB y BC mostradas en la figura 7, para que su suma sea igual a un número entero ( $n$ ) de veces la longitud de onda [26].

$$n\lambda = 2d\text{sen}(\Theta) \quad \text{Ecuación 1}$$

El resultado de esta técnica se conoce como difractograma, en el que aparecen máximos de difracción característicos de cada material y en el que aplicando el análisis de Rietveld, se puede calcular el porcentaje de los distintos tipos de cristales. Los materiales amorfos al no poseer un orden molecular definido, la difracción que producen aparece difusa.

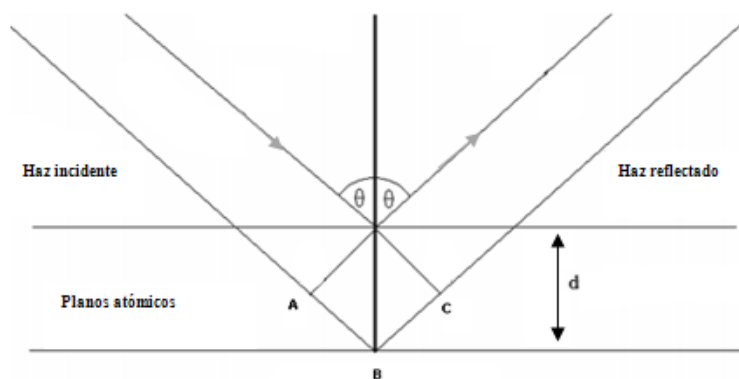


Figura 7. Esquema de la difracción de rayos X de un material.

### 3.1.3. Equipo experimental

Los estudios de difracción de rayos X se realizaron en un difractómetro automático Empyrean (PANalytical) con detector PIXcel (Figura 8). Consta de un cargador automático y portamuestras giratorio permitiendo obtener datos de gran resolución al usar radiación monocromática  $\text{CuK}\alpha_1$ . En el camino del haz difractado, el sistema óptico está formado por una rendija programable, un detector X'Celerator y un sistema de rendijas Soller. En el camino del haz incidente, la óptica está formado por un monocromador primario con un cristal de  $\text{Ge}(111)$ , un sistema de rendijas Soller, una rendija divergente y una máscara que limita el ancho del haz, entre otros componentes.

Los difractogramas se registraron en una región angular comprendida entre  $2\theta = 5^\circ$  y  $80^\circ$ , con un paso de  $0.033^\circ$ . Para la identificación de las fases cristalinas de los difractogramas se analizaron con el software X'Pert High Score (v. 3e, 2011).

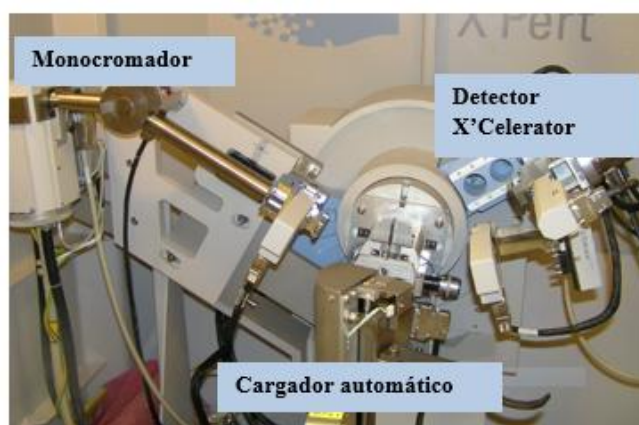


Figura 8. Interior del difractómetro automático PANalytical Empyrean.

### 3.1.4. Afinamiento estructural por el método de Rietveld

El método de Rietveld es una técnica de afinamiento de estructuras cristalinas en patrones de difracción de rayos-X, que se basa en minimizar la diferencia entre un difractograma experimental y uno calculado. Para ello utiliza un modelo estructural aproximado y unos parámetros que permiten distribuir las intensidades de las diferentes

reflexiones en el difractograma. Dicho modelo tiene que ajustar la posición, forma e intensidad de cada pico (dependientes del modelo estructural). La función a minimizar (Ecuación 2) es [27]:

$$S_y = \sum_i w_i |y_i(o) - y_i(c)|^2 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde  $y_i(o)$  e  $y_i(c)$  son la intensidad observada y la calculada, respectivamente, del conjunto de datos, y  $w_i$  es el peso asignado a cada punto. Para obtener las intensidades calculadas son necesarios dos tipos de datos [27]:

- Parámetros atómicos parámetros de red, grupo espacial, posiciones atómicas, entre otros. Calculan las intensidades de las diferentes reflexiones para cada una de las fases.
- Parámetros globales: factor de escala del difractograma, desplazamiento del cero, parámetros que describen la forma de los picos, coeficientes que corrigen efectos de orientación preferente, la absorción, valores de la celda unidad, entre otros. Afectan a todo el difractograma distribuyendo las intensidades de las reflexiones en cada uno de los puntos del mismo.

La intensidad calculada en cada punto de una fase se obtiene como la suma de las contribuciones de todas las reflexiones con intensidad en ese punto del difractograma, más la contribución del fondo en ese punto.

La calidad del afinamiento se evalúa a partir de los residuos en las intensidades usando el factor  $R_{wp}$  o factor del difractograma ponderado (weight profile R-factor). Si el ajuste es bueno,  $R_{wp}$  tiene un valor bajo (aproximadamente a un 10%).

### 3.1.5. X'Pert High Score

En el software X'Pert High Score, se aplica el método de Rietveld para identificar y cuantificar las diferentes fases cristalinas. Un breve resumen del proceso de identificación de las fases cristalinas se detalla. Tras cargar el archivo .xrdml (obtenido tras realizar la difracción de rayos-X), se selecciona el background para ajustar el fondo y minimizar la coincidencia de los picos de diferentes fases que puedan coincidir. Ajustado dicho parámetro, se hace una selección de los elementos de la tabla periódica que forman parte de nuestro material, y se realiza una búsqueda de picos que corresponderán con los posibles candidatos a ser fases cristalinas, ver Figura 9.

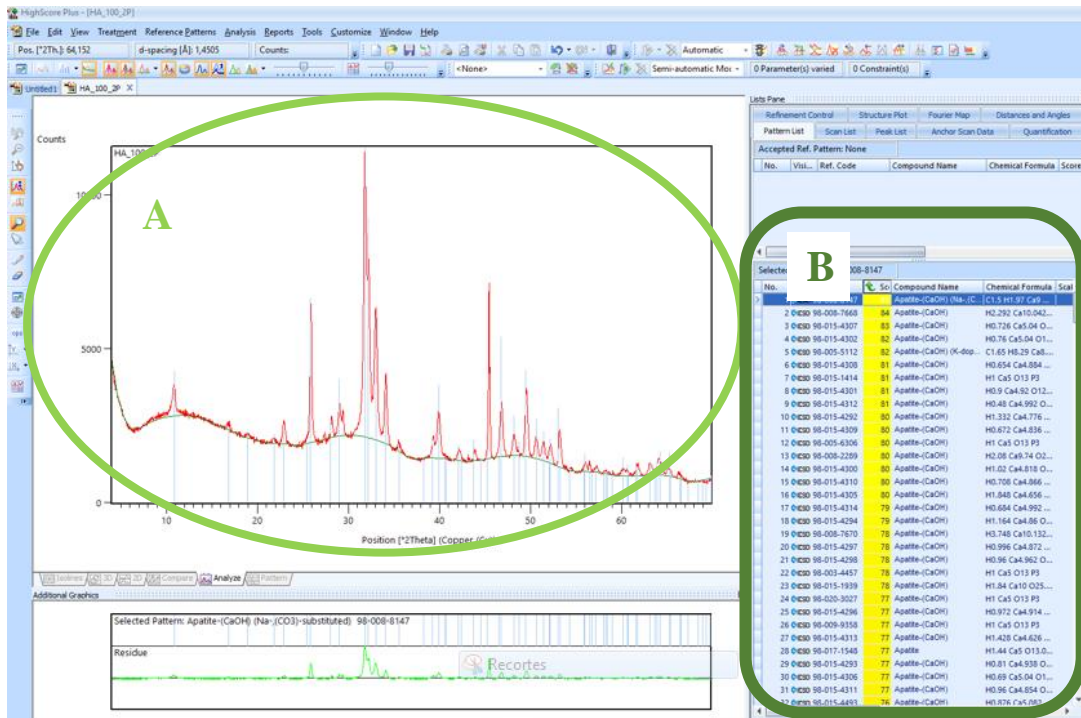


Figura 9. En A se muestra el difractograma a analizar. En B, aparecen los candidatos posibles a fases cristalinas.

Seleccionados los candidatos, ver figura 10, se ajustan los parámetros necesarios en cada fase para aplicar el método de Rietveld y minimizar el proceso de reconocimiento de cada una de las fases cristalinas presentes.

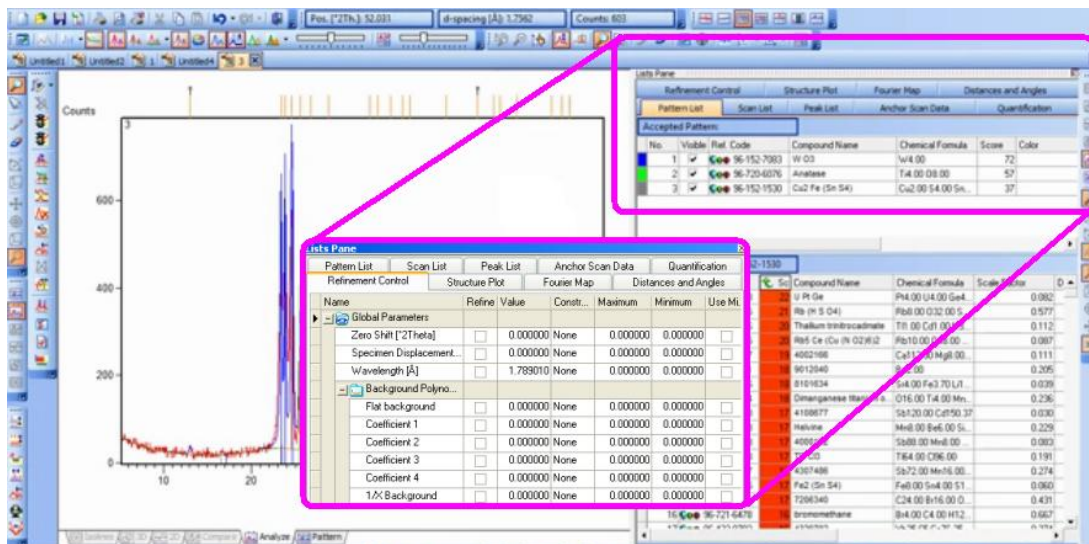


Figura 10. Fases cristalinas identificadas y parámetros a ajustar para aplicar el análisis de Rietveld.

## **3.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA DE RAYOS-X DE LONGITUD DE ONDA**

### **3.2.1. Fundamento**

La fluorescencia de rayos X (WDXRF) es una técnica utilizada para determinar el contenido y composición elemental de los materiales. Para ello, utiliza la emisión secundaria o fluorescente generada al excitar una muestra con una fuente de rayos X. Dada la configuración electrónica de los átomos, algunos electrones que se encuentran en las capas interiores son sacados del átomo por la acción de los rayos X incidentes (primarios), siendo ocupados dichos lugares por electrones de capas más externas. El exceso energético resultante de esta transición se disipa en forma de radiación X fluorescente, con una longitud de onda característica que depende de la diferencia energética de los orbitales electrónicos implicados, y una intensidad directamente relacionada con la concentración del elemento en la muestra [28].

### **3.2.2. Equipo experimental**

Los estudios fueron llevados a cabo en el modelo ARL ADVANT'XP+ secuencial de la casa THERMO, ver Figura 11. El equipo consta de un automuestreador, un tubo de rayos X de Rh y un goniómetro (formado por 3 colimadores y 4 cristales que permiten medir desde el F hasta del U y dos detectores, SC y FPC). El equipo puede medir en un ambiente de He o en vacío.

El procedimiento llevado a cabo se divide en dos partes. En primer lugar se lleva a cabo la determinación del LOI (pérdida por ignición), se tomó una cantidad de muestra, previamente secada a 105°C durante 1h, y se calcinó durante 2h a 1050°C. A continuación, el resto del contenido de las muestras fueron analizadas en polvo en ambiente de He. Los datos de concentración se obtuvieron mediante el Software integrado UNIQUANT, en forma de óxidos y teniendo en cuenta el valor del LOI.



**Figura 11. ARL ADVANT'XP+ secuencial de la casa THERMO [29].**

### **3.3. ANÁLISIS TÉRMICO DIFERENCIAL (ATD) Y TERMOGRAVIMÉTRICO (TG)**

El análisis térmico comprende una serie de técnicas en las que se estudia las propiedades físicas de una muestra sometida a una variación de temperatura en una atmósfera controlada. El resultado de estas medidas son curvas de análisis térmico, en las que observan picos, discontinuidades, cambios de pendiente, etc. Las dos técnicas más importantes son la Termogravimetría y Análisis Térmico Diferencial.

#### **3.3.1. Fundamento del análisis térmico diferencial (ATD)**

Este análisis implica un calentamiento de la muestra junto con una muestra de referencia inerte, permitiendo conocer el flujo de calor de la muestra. Dicha variación puede ser una pérdida o una ganancia de masa:

- Procesos exotérmicos: reacciones que desprenden calor (oxidaciones, combustiones...) y se reflejan en la curva de ATD como máximos respecto a la línea base.
- Procesos endotérmicos: reacciones que absorben calor (pérdida de agua, transformaciones de fase...) y se reflejan en la curva de ATD como mínimos respecto a la línea base.

#### **3.3.2. Fundamento del análisis termogravimétrico (TG)**

El análisis termogravimétrico es una técnica que mide el cambio de masa de una muestra con la variación de temperatura, en una atmósfera específica debido a la descomposición, deshidratación u oxidación. Permite conocer el rango de estabilidad térmica de los materiales, las condiciones en que se oxidan los metales o se degradan los polímeros [30].

#### **3.3.3. Equipo experimental**

Ambos estudios de análisis térmico se realizaron en el analizador SDT-Q600 de TA Instruments, ver Figura 12, instrumento que ofrece una medición simultánea de DTA y TGA. Las condiciones empleadas fueron de temperatura ambiente hasta 900°C y una velocidad de calentamiento de 20°C/min.



Figura 12. Analizador SDT-Q600 TA Instruments [29].

### 3.4. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE BARRIDO (SEM)

#### 3.4.1. Fundamento

La técnica de microscopía electrónica se basa en la producción de imágenes de alta resolución de la superficie de una muestra. Para ello, se realiza un barrido de haz de electrones sobre una muestra cubierta con una capa de carbono o de oro, si no es conductora. La colisión de los electrones sobre la superficie de la muestra, excita los átomos de la misma generando electrones dispersados, secundarios, radiación electromagnética, etc. Dicha energía es recogida por detectores que la transforman en las imágenes.

Además, la emisión de los electrones secundarios de la muestra genera vacante que al ser ocupados por electrones de mayor energía se emiten rayos-X con una frecuencia característica de cada elemento. La captación de estos permite un análisis elemental de la zona (EDX).

#### 3.4.2. Equipo experimental

El estudio se realizó en un microscopio Jeol JSM-6490LV con un voltaje de aceleración de 20 kV, una resolución variable de 5-100  $\mu\text{m}$  y rangos de aumentos entre X150-5000, ver Figura 13.



Figura 13. Microscopio Jeol JSM-6490LV [29].

### 3.5. ANÁLISIS DE SUPERFICIE

#### 3.5.1. Fundamento

El análisis de adsorción de ciertos gases, como nitrógeno ( $\text{N}_2$ ), permite caracterizar la superficie de los sólidos (determinando el área superficial, la distribución, el volumen y el tamaño de los poros). El método utilizado está basado en la teoría de Brunauer–Emmett–Teller (BET) [31], el cuál asume que el nitrógeno, a la temperatura de su punto de ebullición ( $-195.79\text{ }^\circ\text{C}$ , 77 K), es adsorbido por las superficies sólidas llenando sus poros y formando multicapas. Conociendo la cantidad

de gas adsorbido necesario para formar una monocapa y el área que ocupa la molécula de  $N_2$  adsorbida, es posible estimar el área del sólido.

### 3.5.2. Equipo experimental

El análisis de las muestras se ha realizado en el equipo automático MICROMERITICS: ASAP 2020, ver Figura 14. Dicho equipo genera las isotermas de adsorción-desorción de  $N_2$  a 77K a temperatura ambiente y variando la presión relativa ( $P/P_0$ ), registra el volumen de gas absorbido en la superficie del sólido.



**Figura 14. Equipo automático MICROMERITICS: ASAP 2020 [29].**

Cabe destacar que todas las técnicas instrumentales salvo el análisis térmico, se realizan en los Servicios Centrales de Apoyo a la Investigación (SCAI) de la Universidad de Málaga.

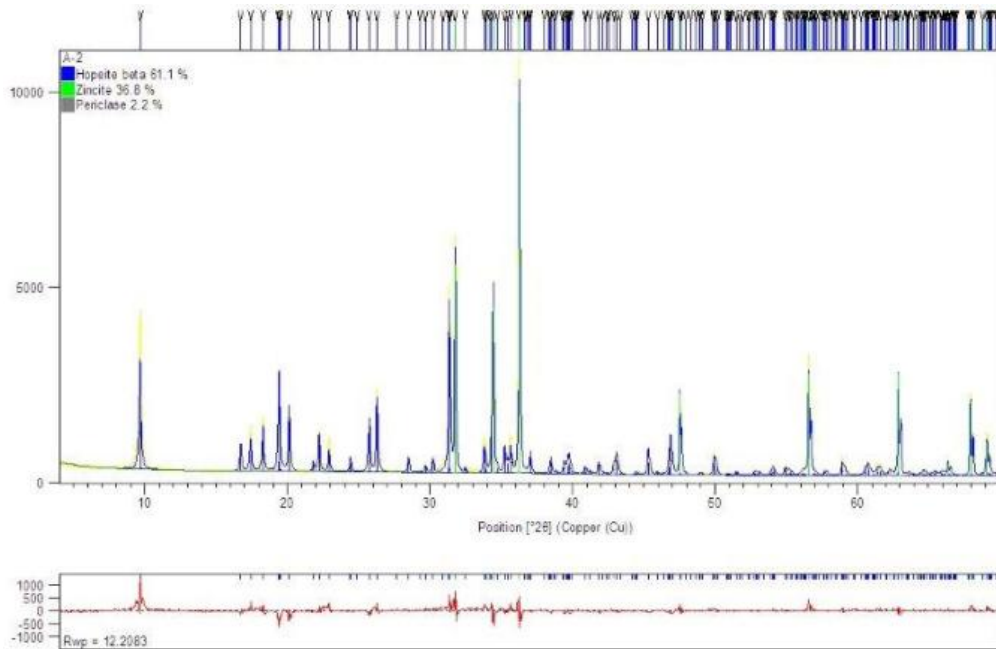
## CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL

Las fases cristalinas para todas las composiciones se han determinado por el método de Rietveld, utilizando datos de difracción de rayos-X de laboratorio. Se comenzó por el estudio de la composición de los cementos de la serie R.

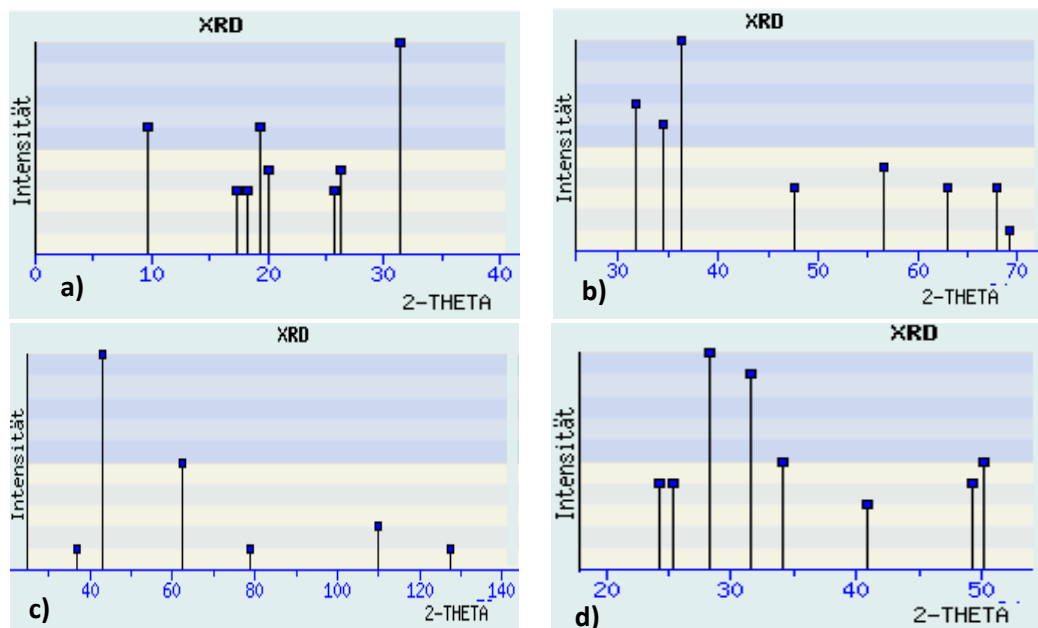
Los datos de difracción de rayos-X revelan que los materiales de la serie R, cumplen con el patrón típico de este tipo de cemento [23]. Se ha detectado hopeita ( $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) como fase cristalina principal, 55.9-61.1 %, mientras que zincita ( $\text{ZnO}$ ) y periclase ( $\text{MgO}$ ) se han identificado en porcentajes más bajos, 36.5-40.6 % y 2.2-4.2 %, respectivamente. Junto a estas fases cristalinas coexiste una fase amorfa minoritaria, caracterizada por la aparición de anchas ondulaciones de la señal de fondo, a determinados valores  $2\theta$ , que son típicas de un material no cristalino. Una representación del difractograma de las fases cristalinas presentes en la muestra R.2 se muestra en la Figura 15.

La fase amorfa contiene una fracción de  $\text{ZnO}$  sin reaccionar. Un dato a destacar es, que teniendo las tres muestras la misma cantidad de  $\text{ZnO}$  y  $\text{MgO}$ , los porcentajes de fases cristalinas varían ligeramente; una posible justificación de ello es la influencia que ejerce el  $\text{Al}^{3+}$  presente en la fase líquida de los reactivos. La mayor cantidad de hopeita se consigue en el caso de mayor presencia de  $\text{Al}^{3+}$  (ver Tabla 7).



**Figura 15. Difractograma de la muestra R.2**

Para hacer hincapié en las fases cristalinas detectadas, en la Figura 16 se muestran los distintos difractogramas para cada una de ellas. Si se hacen corresponder los picos detectados, se aprecia una perfecta coincidencia entre ellos. Esto lleva a asegurar la correcta identificación de las fases cristalinas.



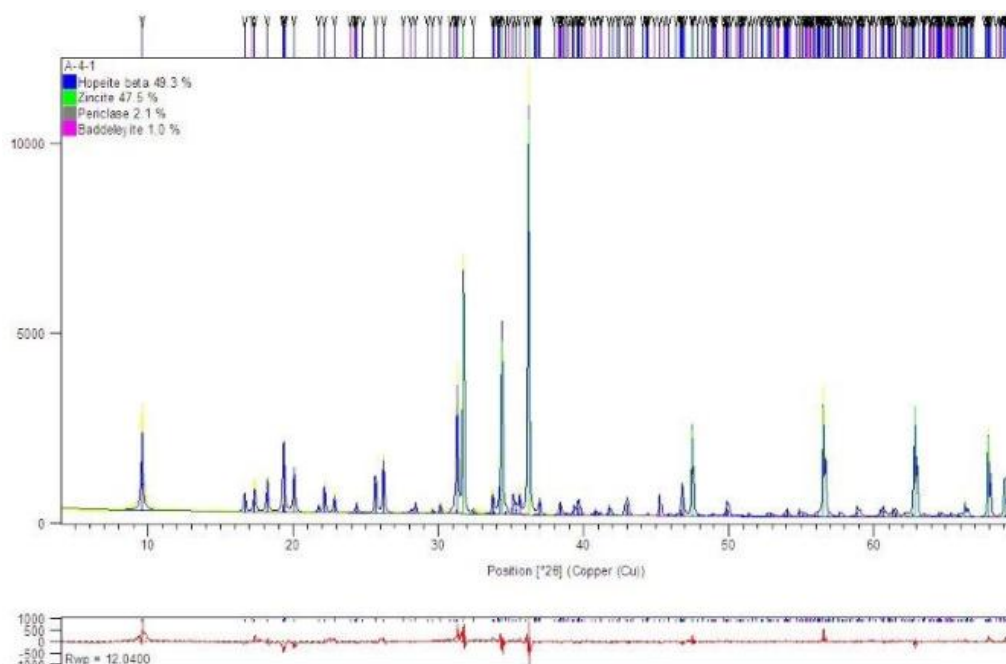
**Figura 16. Difractogramas de las fases cristalinas: (a) hopeita, (b) zincita, (c) periclase y (d) baddeleyita identificadas en las muestras analizadas. Los símbolos indican los picos de difracción más intensos.**

En la serie A, las muestras presentan resultados parecidos con respecto a la serie R. Cabe destacar que se obtiene más periclase en la muestra A.1 aún teniendo la misma cantidad de MgO de partida (ver Tabla 7). Una posible justificación podría ser la falta de ZrO<sub>2</sub> y elevado pH (pH = 7.21) respecto a las otras dos. En esta serie, al introducir el ZrO<sub>2</sub>, aparece una nueva fase, la baddeleyita (ver Figura 16). Aún así los

difractogramas no presentan grandes diferencias con los de la serie anterior, por lo que en la Figura 17 puede verse el correspondiente a la muestra A.2.

**Tabla 7. Representación de los porcentajes de las fases cristalinas para cada una de las muestras estudiadas y los valores de los factores de desacuerdo obtenidos (los cuales son aceptables).**

Muestra	Hopeita (%)	Zincita (%)	Periclasa (%)	Baddeleyita (%)	R <sub>wp</sub> (%)
R.1	55.9	40.6	3.5		12.73
R.2	61.1	36.8	2.2		12.20
R.3	59.3	36.5	4.2		12.48
A.1	52	45.2	4.8		12
A.2	49.3	47.5	2.1	1	12.04
A.3	57.3	39.5	2.1	1.2	12.52
B.1	53.3	44.5	2.2		13.18
C.1	53.6	44.3	2.1		12.59
C.2	51.8	44.7	2.5	1.1	13.57
D.1	51.6	45.5	2.9		12.69
D.2	47.2	45.9	2.1	4.9	11.84
D.3	47.6	47.9	1.3	3.2	11.57
D.4	41.2	51.1	3	4.7	10.80
D.5	51.5	43.2	2.9	2.4	11.73



**Figura 17. Difractograma de la muestra A.2.**

La serie B, la cual tiene aportación de calcio a través del reactivo CaO, sigue el mismo patrón que las series anteriores. Un detalle a notar es que la presencia del calcio y silicio no afecta a la formación de las fases cristalinas, así como tampoco a la formación de alguna en las que formen parte. Esto queda confirmado con la serie C, donde se incorporan todos los reactivos introducidos en las series anteriores, y las fases cristalinas se mantienen por igual (ver Tabla 7).

Por último, en la serie D, la diferencia entre la muestra D.1 respecto las muestras D.2-D.5, es la presencia del  $ZrO_2$ , sin conllevar ello a una formación de nuevas fases. En general, en las muestras D.2 a la D.5, a pesar de tener más cantidad de polvo para la misma cantidad de líquido, las formación de las fases se sigue manteniendo como hasta ahora, con pequeños cambios de porcentaje que no son significativos, salvo la D.4, en la que la cantidad de hopeita es menor con respecto a las otras fases cristalinas. Este hecho puede deberse a que dicha muestra cuenta con la mayor cantidad de zincato de calcio y la que presenta mayor contenido de amorfo, ver Figura 18. Destacar también, que a pesar de tener la misma cantidad de  $ZrO_2$  y entre un 5-5.51% de zincato de calcio, en la muestra D.2 la baddeleyita tiene un porcentaje de casi el doble con respecto a la D.5. Por último, la fase que más cambios presenta es la periclase, que va desde 1.3-2.9 % teniendo la misma cantidad de MgO la muestra (Tabla 7).

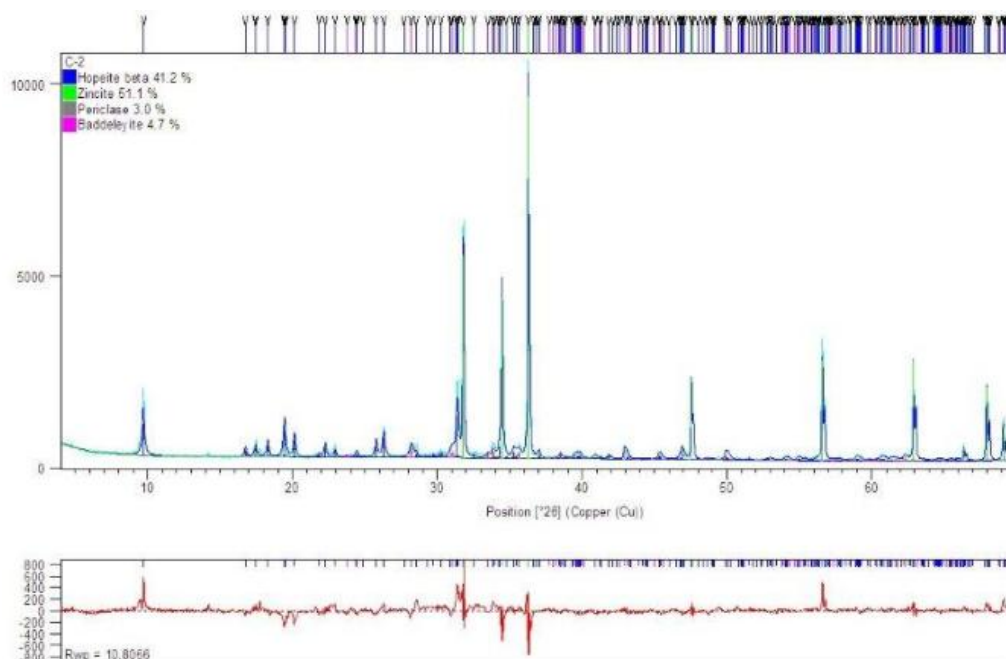


Figura 18. Difractograma de la muestra D.2.

En general, la formación de las fases cristalinas resultantes son las mismas, con pequeñas variaciones en sus porcentajes. La mayor parte de las muestras tienen picos a 17.7 y 22.6 que no se han podido identificar con esas dos reflexiones. Asimismo, en todos los casos coexiste una fase amorfa minoritaria, típica de un material no cristalino como se mencionó anteriormente. Esta fase amorfa contiene una fracción de ZnO sin reaccionar, junto con CaO y alita pudiendo llegar a interacciones con los tejidos circundantes tras la aplicación del cemento dental.

Kim *et al.* [32], realizaron un estudio *in vitro* para investigar el mecanismo de adherencia de apatito artificial al apatito natural. El producto artificial se puso en contacto con un fluido corporal simulado (SBF), es decir una disolución acuosa con una composición de sales minerales muy parecida a la del plasma sanguíneo. Se observó que sobre la capa superficial del apatito artificial cristalizado se desarrolló una capa de fosfato de calcio amorfo que evoluciona posteriormente a un apatito similar al del hueso en composición y estructura. Este y otros estudios revelan la importancia de las fases

amorphas transitorias para el crecimiento del hueso a partir de biomateriales de apatito. Así mismo, también se hace notable la importancia de los vidrios bioactivos, entre ellos, óxido de silicio (derivado de la alita) ya que ralentiza la aparición de caries secundaria y provee al diente de los minerales perdidos. Ver Figura 5 en el apartado de la Introducción donde se detalla la importancia de la interacción de las fases amorfas en la bioactividad.

## 4.2. ANÁLISIS QUÍMICO

A partir de los datos de análisis químico se puede afirmar que a pesar de que los resultados de la caracterización estructural no hayan aparecido fases cristalinas en las que pudiesen formar parte ciertos reactivos de partida, efectivamente se encuentran en la estructura.

**Tabla 8. Resultados de espectroscopía de fluorescencia de rayos-X de longitud de onda.**

Muestra	P (%)	Zn (%)	Mg (%)	Al (%)	Ca (%)	Zr (%)	Si (%)	LOI (%)
R.2	11.14± 0.10	42.35± 0.20	4.72± 0.08	0.685± 0.03				12.57
A.2	10.37± 0.09	42.54± 0.20	5.43± 0.09	0.481± 0.024	0.502± 0.025	0.485± 0.024	0.128± 0.0064	11.69
A.3	10.71± 0.09	41.44± 0.20	4.81± 0.08	0.469± 0.023	0.345± 0.017	0.877± 0.04	0.0893± 0.0045	13.12
B.1	11.15± 0.10	40.56± 0.20	5.66± 0.09	0.471± 0.023	1.09± 0.04	0.0044± 0.0004	0.0086± 0.0020	12.11
D.1	11.00± 0.09	41.37± 0.20	5.18± 0.08	0.497± 0.025	1.03± 0.04		0.121± 0.0061	12
D.2	11.29±0 .10	39.00±0 .20	4.98±0. 08	0.485±0.0 24	1.31±0.05	1.78±0.0 6	0.162± 0.008	11.74
D.3	10.87± 0.09	40.27± 0.20	4.77± 0.08	0.502± 0.025	1.16± 0.05		0.154± 0.007	11.71
D.4	10.07± 0.09	40.59± 0.20	5.48± 0.09	0.436± 0.022	1.96± 0.06	1.73± 0.06	0.117± 0.005	11.09
D.5	10.82± 0.09	41.13± 0.20	5.26± 0.09	0.516± 0.026	0.616± 0.031	1.34± 0.05	0.0701± 0.0035	11.48

### 4.3. CARACTERIZACIÓN TÉRMICA

El objetivo del análisis termogravimétrico es conocer la cantidad de agua que las muestras absorben en función de la temperatura, es decir, el diferente grado de hidratación de las muestras, dependiente de la composición de las mismas.

Como puede verse en la Figura 19, las curvas termogravimétricas muestran dos etapas de pérdida de peso diferentes y las curvas de DTA muestran dos picos endotérmicos. La primera pérdida de masa ocurre en el intervalo de temperaturas de 50-200°C, acompañada por dos picos endotérmicos a 60 y 200°C, respectivamente. La segunda etapa de pérdida de peso se sitúa en el intervalo de temperaturas comprendidas entre 250-500°C, a partir de la cual la masa del producto se mantiene estable hasta el final de la medición.

La primera pérdida de peso en las muestras, ronda el 10-11%. Esto es debido a la pérdida de agua que se forma en el proceso de cristalización. La segunda pérdida, un 2-3% más respecto a la anterior, puede atribuirse a agua fuertemente retenida tanto en la estructura de hopeita como en la fracción amorfa.

El pico exotérmico a 600°C, más pronunciado en las muestras C.2 y D.4, es probablemente debido a la fusión de hopeita. Por lo tanto, a esta temperatura se ablanda el cemento y la estructura se vuelve pastosa.

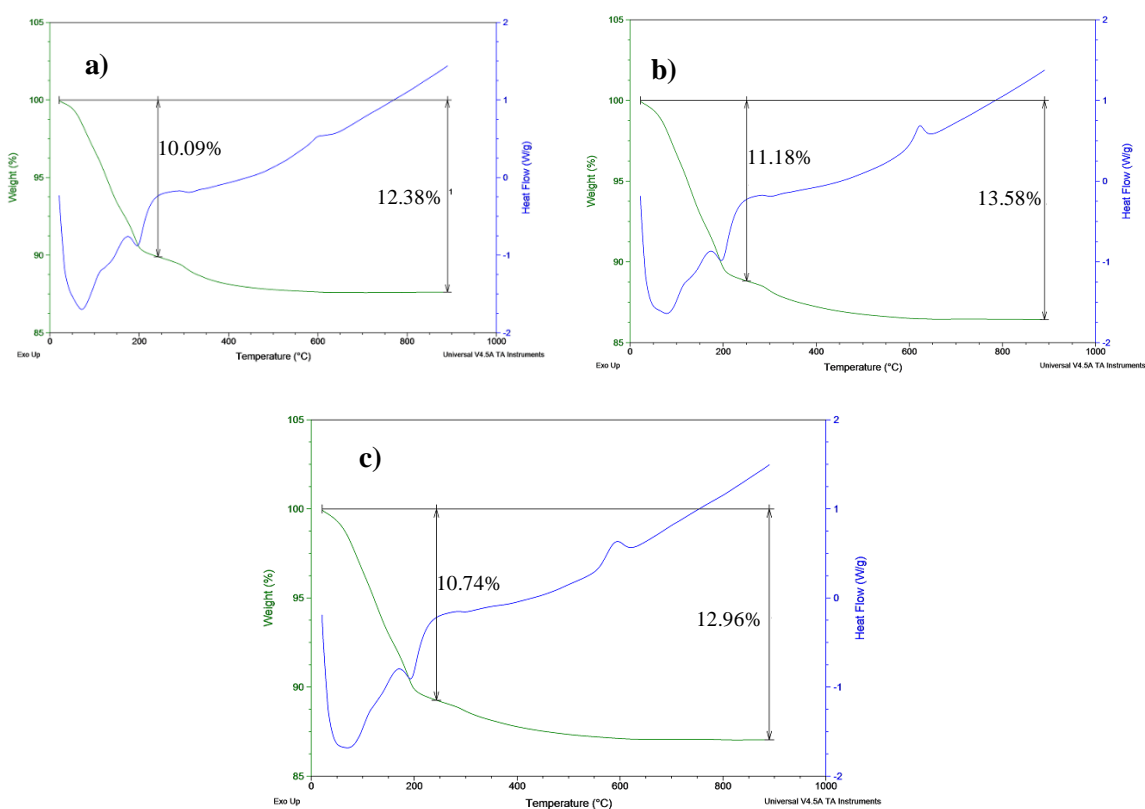


Figura 19. Curvas de análisis ATD/TGA para: (a) R.2, (b) C.2 y (c) D.4.

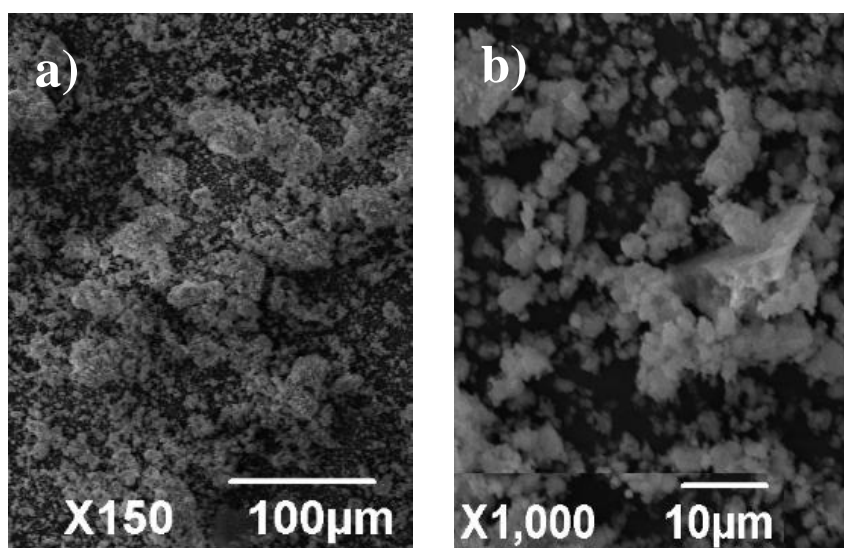
Conocida la pérdida de agua experimental, podemos calcular el valor teórico de dicha pérdida y contrastarlo. Como se muestra en la Tabla 9, existe una relativa buena concordancia en las muestras C.2 y D.4, indicativa de que el agua se encuentra concentrada en la fase cristalina de hopeita. La discordancia observada en la muestra de referencia R.2 sugiere que la parte amorfa, en este caso, tiene un menor grado de hidratación y contribuye a la disminución del contenido de agua del material.

**Tabla 9. Pérdida de H<sub>2</sub>O teórica y experimental (medida en %) para las muestras analizadas.**

Muestra	H <sub>2</sub> O teórico (%)	H <sub>2</sub> O experimental (%)
R.2	14.16	12.38
C.2	13.51	13.58
D.4	12.50	12.96

#### 4.4. MICROESTRUCTURA DE LOS MATERIALES

La microestructura de los cementos (en polvo) se estudió mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). En la Figura 20 se muestran las fotomicrografías de la topografía de la muestra R.2. La muestra presenta un aspecto granular en una escala menor a 5 micras, sin signos de formación de cristales salvo en una zona, ver Figura 20. Este cristal tiene una altura aproximadamente de 10 micras, siendo cristal de hopeita que dio origen al patrón de difracción de rayos-X observado. Las partículas tienen forma redondeada y corroída que se agrupan principalmente en aglomerados más grandes, de pocas micras de tamaño. En la superficie de estas agrupaciones se observa otras partículas más pequeñas que pueden ser cristales de zincita formando agregados granulares y hojosos, o restos de polvo de la fase amorfa del cemento.



**Figura 20. Micrografías de SEM de la superficie de la muestra R.2 a diferentes aumentos: X150 en A y en B a X1000, observándose la formación del cristal de hopeita.**

En las demás muestras se comparten las mismas características morfológicas, salvo el tamaño de los agregados granulares que tienen un tamaño de hasta 5 micras. El polvo está compuesto en gran parte por el ZnO con forma redonda de tamaños inferiores a 2 micras, pudiendo formar parte de ZnO no reactivo en una matriz aparentemente amorfa. Los granos sin reaccionar se distribuyen heterogéneamente e igualmente de abundantes. Su superficie expuesta es irregular, sin porosidad aparente ni formación de cristales.

Las muestras que contienen zincato de calcio mostraron una topografía diferente, ver Figura 2. En estas muestras, a su vez, las que contienen menor cantidad de zincato se siguen formando gránulos con agregados más pequeños, pero con una morfología más difusa y algunos cristales en forma laminar. Por el contrario, la muestra D.4, que es la que más cantidad de zincato de calcio tiene, además de los gránulos característicos, también forma otros agregados en forma laminar con una textura aparentemente lisa y de un tamaño variable inferior a 5 micras o incluso superior. Estas formas presentan algunas fisuras que pueden deberse a la molturación de la muestra para su preparación.

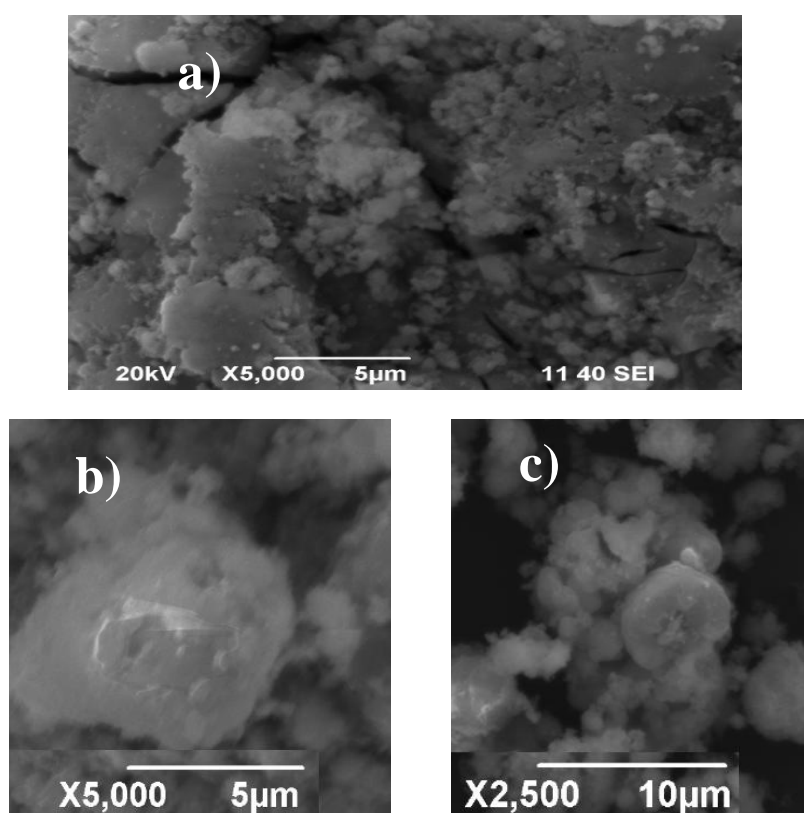


Figura 21. Micrografías de SEM de la superficie para: (a) D.4, (b) D.3 a X5000 y (d) D.3 a X2500.

#### 4.5. ANÁLISIS DE SUPERFICIE

En la Figura 22 se muestran las isotermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> a 77K para los materiales R.2, C.2 y D.4 Una isoterma de absorción no es más que la cantidad

de gas absorbido por un material a una temperatura fija en función de la presión; según el tipo de adsorbente, el tipo de adsorbato y las interacciones intermoleculares entre el gas y la superficie, pueden tener diferentes formas.

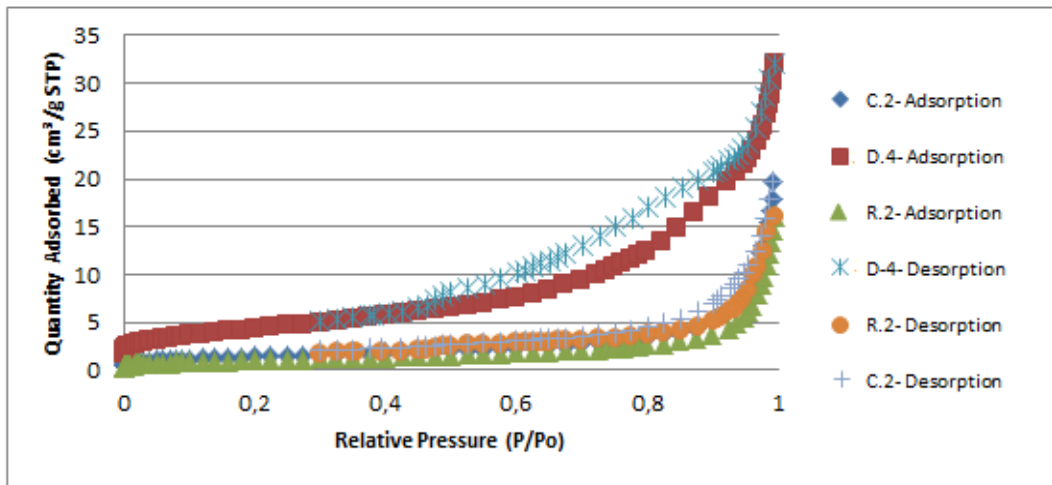


Figura 22. Isothermas de adsorción-desorción de  $N_2$  para las muestras analizadas.

Siguiendo la clasificación de la IUPAC (International Union Pure Applied Chemistry)[33], las isothermas obtenidas podrían clasificarse dentro del tipo II, características de sólidos adsorbentes no porosos o macroporosos. En ellas, se observa que las curvas de adsorción respecto al eje de la presión relativa, son cóncavas a bajas presiones, luego aumentan linealmente hasta volverse convexas. Estos cambios pueden deberse a la formación de una capa absorbida cuyo espesor es directamente proporcional a la presión relativa. En las Figuras 23-24, pueden observarse las isothermas de las muestras R.2 y C.2 que se superponen en la Figura 22.

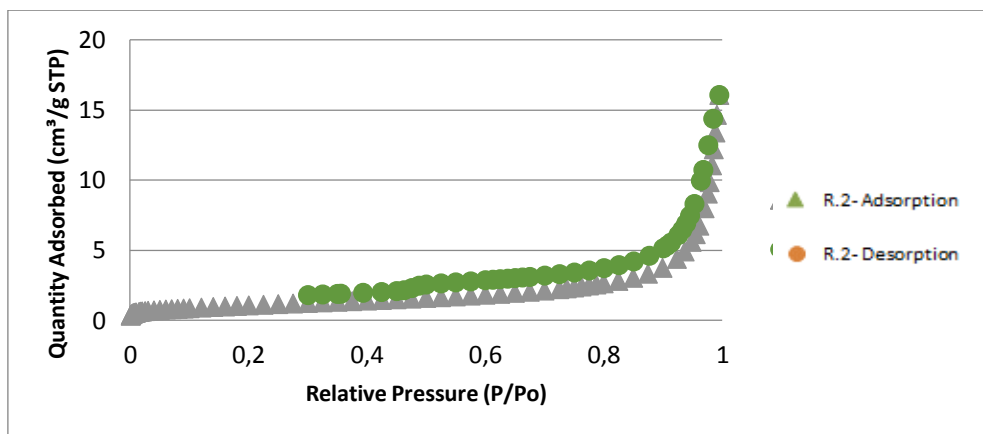


Figura 233. Isothermas de adsorción-desorción de  $N_2$  para la muestra 1.2.

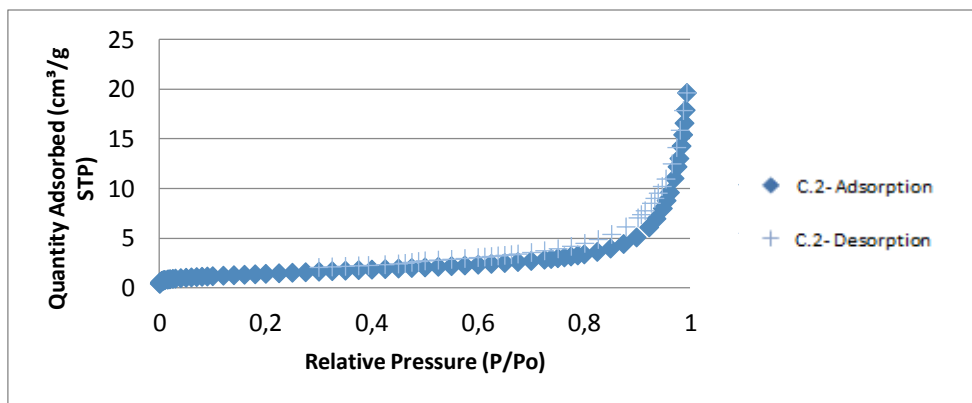


Figura 244. Isothermas de adsorción-desorción de N<sub>2</sub> para la muestra 1.5.1.

En general, se aprecian fenómenos de histéresis poco pronunciados entre presiones relativas de 0.3 y 1, coincidiendo las ramas de todas las isothermas para valores de presiones relativas inferiores a 0.3. Además, muestran un bucle de histéresis de tipo H3 [33], ocasionadas por las diferencias de presiones relativas entre los procesos de condensación y evaporación capilar en mesoporos. La muestra D.4 presentó mayor capacidad de adsorción hacia el nitrógeno, frente a la R.2 que fue la menor (ver Figura 22).

Las propiedades texturales, obtenidas a partir de las isothermas de adsorción de N<sub>2</sub>, para los tres materiales estudiados se muestran en la Tabla 10. Se observa un aumento de la superficie BET al aumentar el porcentaje de Ca, lo cual se interpreta como un efecto positivo, dado que la mayor superficie del material conlleva una mayor interactividad con la superficie dental y además está provocada por la presencia de un ion común al material dental. Además, el tamaño de poro de la muestra con más contenido en calcio se ve reducido más de la mitad con respecto a las otras dos.

La influencia del Ca<sup>+2</sup> en la capacidad de adsorción de N<sub>2</sub> ha sido notada también para otros materiales, en los que se observó también una mayor interacción con la molécula de N<sub>2</sub> [34].

Tabla 10. Propiedades texturales obtenidas por adsorción de N<sub>2</sub>.

Muestra	CaO (%)	Área superficial BET (m <sup>2</sup> /g)	Volumen microporos (cm <sup>3</sup> /g)	Área microporos (m <sup>2</sup> /g)	Tamaño poro por BHJ (nm)
R.2	0.00	3.9258	0.000003	0.1301	25.02
C.2	1.12	5.2280	0.000278	0.6930	24.23
D.4	2.50	15.7247	-	-	11.85

Los resultados obtenidos por porosimetría se presentan por curvas de distribución de tamaño de poros acumulativos de las muestras en la Figura 25. Mediante el análisis de dicha figura, se puede observar que en las muestras analizadas, la mayor parte de mesoporos se encuentran en la región 2-20nm y hay ausencia de macroporos con un diámetro mayor a 0.23  $\mu\text{m}$ . Asimismo, la presencia de macroporos en el intervalo entre 50 nm y 0.23  $\mu\text{m}$  parece ser la misma para los tres casos analizados. Cabe destacar que los datos obtenidos para la muestra R.2 no corresponde con lo citado en la bibliografía, dado que se esperaba más presencia de poros en el intervalo de 1-8  $\mu\text{m}$  [23] ,[35].

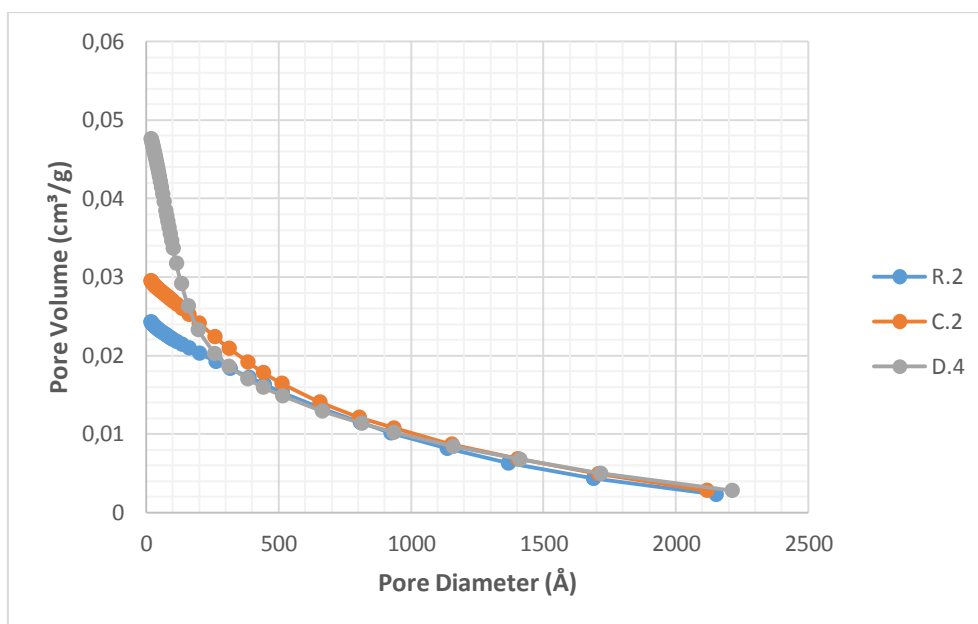


Figura 255. Distribución del tamaño de poro por volumen para las muestras R.2, C.2 y D.4.

En resumen, se deduce que estos materiales exhiben una porosidad mixta, macroporos más una cantidad de mesoporos, la cual se origina por la agrupación de partículas con diferente morfología y tamaño. Dado el tipo de histéresis, los poros se caracterizan por tener forma de hendidura abierta de tamaño y forma no uniforme, presentan cuerpos anchos, con aperturas de poros cortas y estrechas, formados en las etapas de cristalización.

## 4.6. VIABILIDAD CELULAR MEDIANTE MTS

### 4.6.1. Pastillas de cemento dental

Los resultados del ensayo de MTS para los materiales ensayados se muestran en la Figura 26. Todas las muestras presentan niveles de absorbancia en un rango poco variable (0.30-0.32), por lo que varía poco el crecimiento celular entre las muestras. La R.2 que es la de referencia, presenta una absorbancia intermedia respecto a las otras dos muestras, lo que nos lleva a pensar que en la C.2 hay mayor actividad metabólica por su mayor valor de absorbancia.

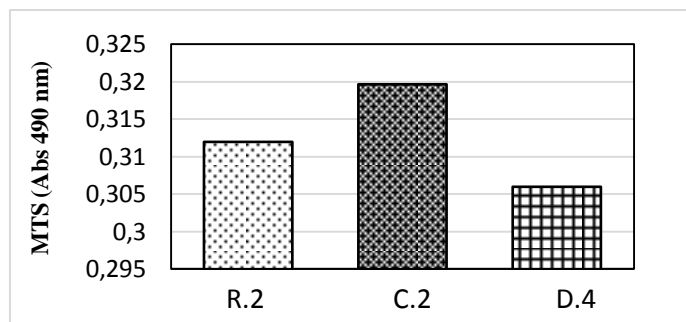


Figura 26. Viabilidad celular de los cultivos celulares en presencia de las muestras R.2, C.2 y D.4.

En general se observa una viabilidad celular reducida que puede darse por la liberación de iones y por la variación de pH que se producen, dada la coloración rosa que se observó en los pocillos tratados. Por lo que podemos contar con una toxicidad inicial que afecta al ambiente celular.

#### 4.6.2. Discos de Ti con recubrimiento

Los resultados del ensayo de MTS para los materiales ensayados se muestran en la Figura 27. La muestra de Ti se toma como control, mostrando mayor actividad metabólica que las otras tres. Entre las muestras A-C, la que más absorbancia tiene es la muestra A, la cual no contiene calcio ni zincato de calcio. Como en el caso anteriormente analizado, esta disminución de la viabilidad celular puede deberse a la liberación de iones; sin embargo, es llamativa esta respuesta dado que el calcio no debería afectar a la actividad celular de forma negativa.

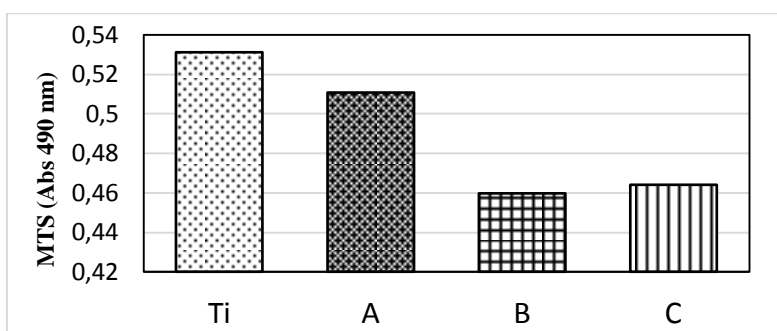


Figura 27. Viabilidad celular de los cultivos celulares en presencia de las muestras Ti (referencia), A, B y C.

## 4.7. ENSAYOS DE INMUNOFLUORESCENCIA

A fin de estudiar la interacción de las células con los materiales sintetizados, se evaluó el desarrollo del citoesqueleto de actina y los núcleos de las células cultivadas mediante el microscopio confocal LEICA, modelo TCS NT [29].

### 4.7.1. Pastillas de cemento dental

En la Figura 28 se observa las imágenes de los núcleos (azul) y el citoesqueleto de actina (verde) de las muestras analizadas. Las células presentan una morfología

redondeada con ausencia de filamentos de actina desarrollados y bien definidos, típica de una célula mesenquimal muerta. Sin embargo, se aprecian algunos núcleos en las muestras C.2 y D.4. Al comparar estos datos con los obtenidos en los ensayos de MTS, se hace corresponder bien para todas las muestras, pudiendo pensar que las células no están bien adheridas a la superficie.

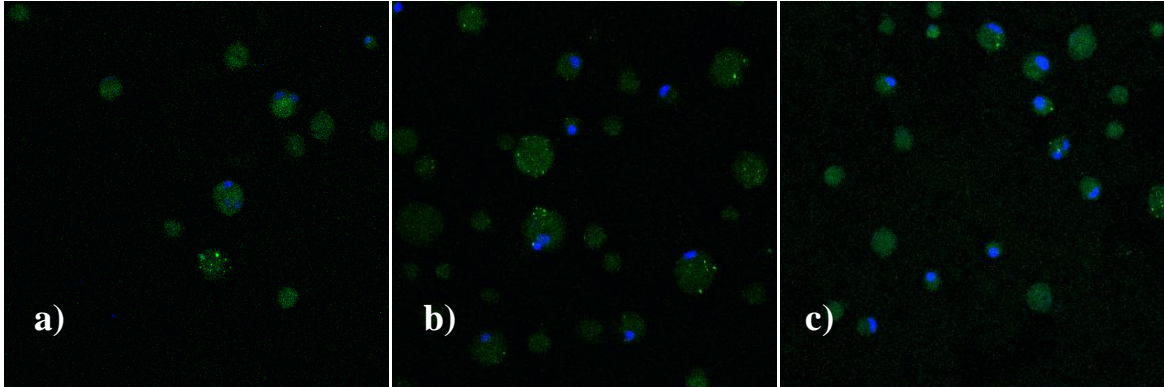


Figura 28. Ensayo de inmunofluorescencia para las muestras: (a) R.2, (b) C.2 y (c) D.4. En verde se muestra el citoesqueleto de actina y en azul los núcleos celulares.

#### 4.7.2. Discos de Ti con recubrimiento

En la Figura 29 se observan las imágenes de las muestras analizadas, donde los núcleos aparecen coloreados de azul y el citoesqueleto de actina de color verde. Las células muestran una morfología fibroblástica, típica de las células mesenquimales, dada por la disposición de los filamentos de actina que forman parte del citoesqueleto de actina, orientados en una determinada dirección. En el caso de la muestra de Ti se aprecian colonias y los citoesqueletos muy extendidos y orientados paralelamente. Si comparamos las muestras A-C entre ellas, destaca la B, la cual tiene añadido calcio respecto a la muestra A, y es en la que se aprecia más cantidad de filamentos de actina exhibiendo un citoesqueleto con filamentos bien desarrollados y casi paralelos. En cambio, en las muestras A-C, las células tienen una morfología de estrella con una orientación un poco oblicua.

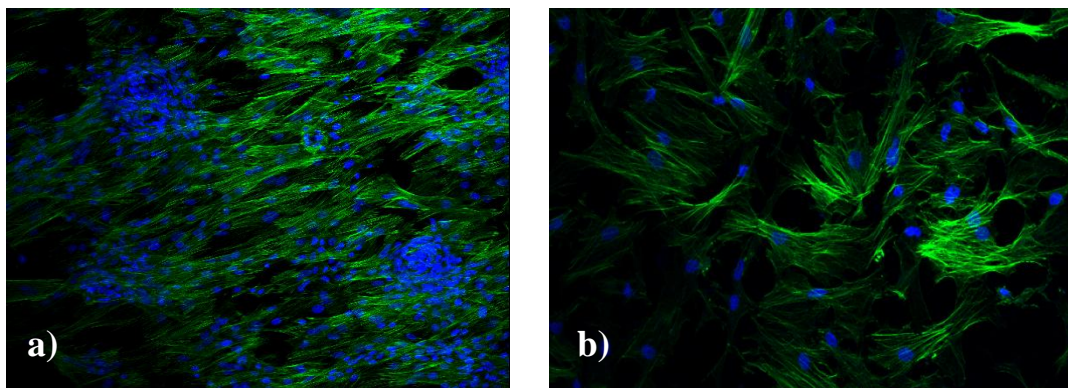
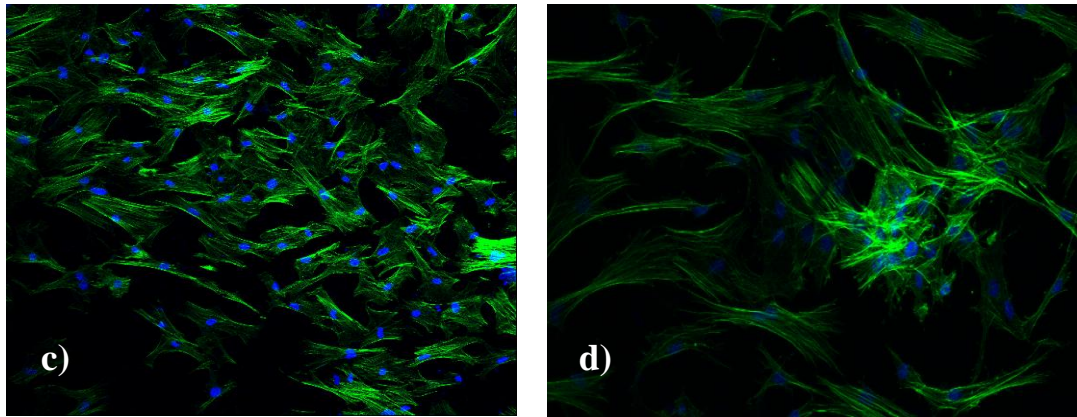


Figura 29. Ensayo de inmunofluorescencia para las muestras: (a) Ti, (b) A, (c) B y (d) C. En verde se muestra el citoesqueleto de actina y en azul los núcleos celulares.



Continuación de la Figura 29. Ensayo de inmunofluorescencia para las muestras: (a) Ti, (b) A, (c) B y (d) C. En verde se muestra el citoesqueleto de actina y en azul los núcleos celulares.

## 4.8. ADHESIÓN Y MORFOLOGÍA CELULAR MEDIANTE SEM

### 4.8.1. Pastillas de cemento dental

En las Figuras 30-31 se muestran micrografías por SEM de las muestras analizadas. Estas micrografías sirven para confirmar los datos obtenidos hasta ahora, pues no se muestra ninguna actividad celular. En las micrografías de la Figura 30 se observa la zona del borde, donde no hay apenas células en comparación con el centro de la muestra, con las de la Figura 31. Esto puede deberse a que las células están menos protegidas y con los lavados de medio se hayan eliminado mayor cantidad. En líneas generales, aparecen todas las células con una morfología redondeada y sin prolongaciones en una disposición aislada unas de las otras presentando una mayor preferencia por las zonas agrietadas. Además muestran una mayor apetencia en la muestra R.2 aunque podamos asegurar que no ha habido proliferación celular.

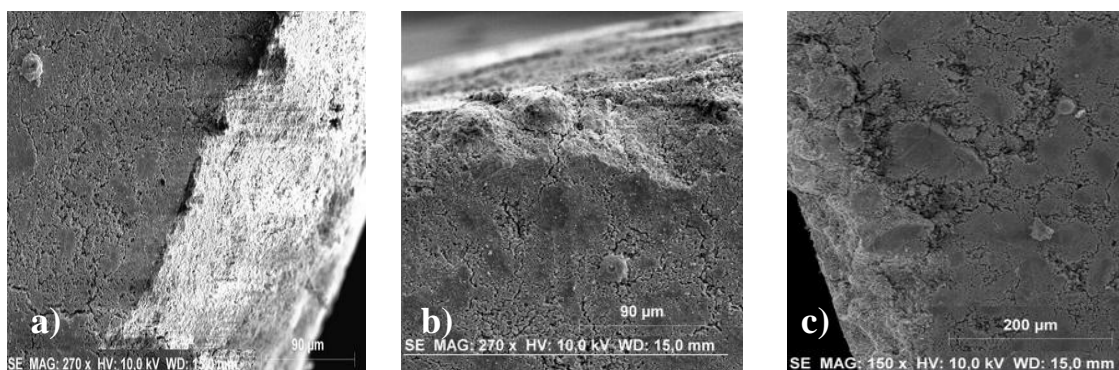


Figura 30. Micrografías SEM del borde las muestras (a) R.2, (b) C.2 y (c) D.4.

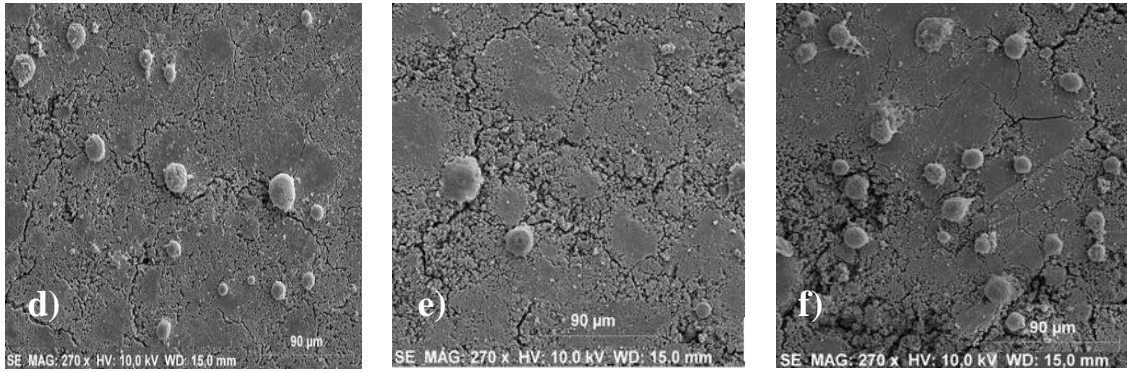


Figura 31. Micrografías SEM del centro de la muestra para las muestras: (d) R.2, (e) C.2 y (f) D.4.

#### 4.8.2. Discos de Ti con recubrimiento

En la Figura 32-33 se muestran micrografías por SEM de las muestras analizadas. En estas micrografías se observan las células se ven bien ancladas al material. En la muestra control, se corrobora lo visualizado en la Figura 29, donde se veía un crecimiento en colonias. La morfología presentada tanto por la muestra A como C es parecida y homogénea, células estrechas con largas prolongaciones. En el caso de la muestra B, las células exhiben una morfología plana y más ancha que en los otros dos casos anteriores.

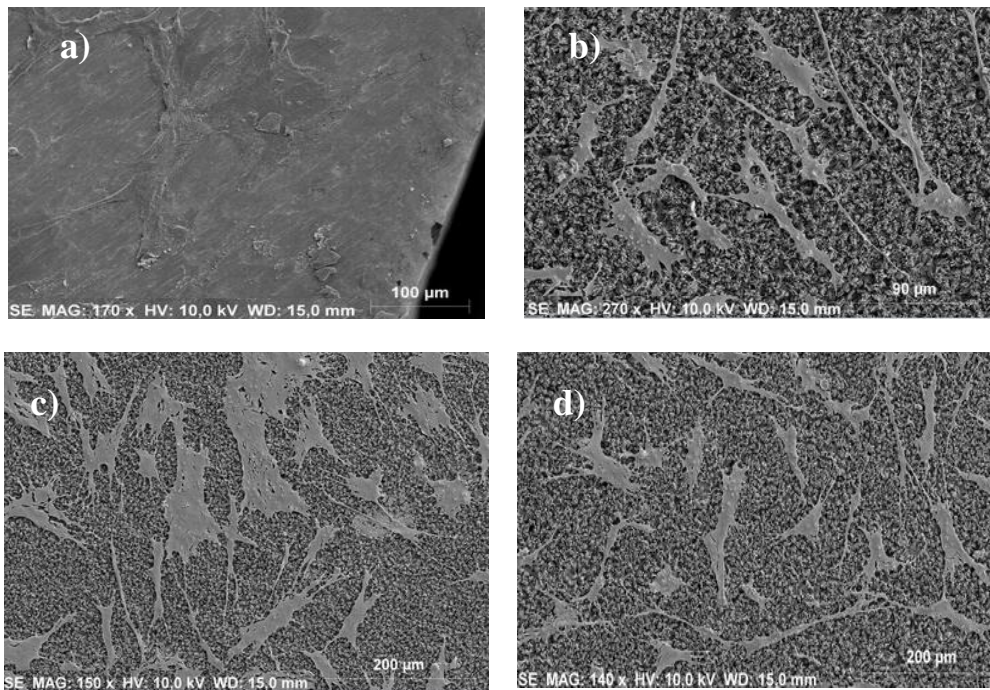
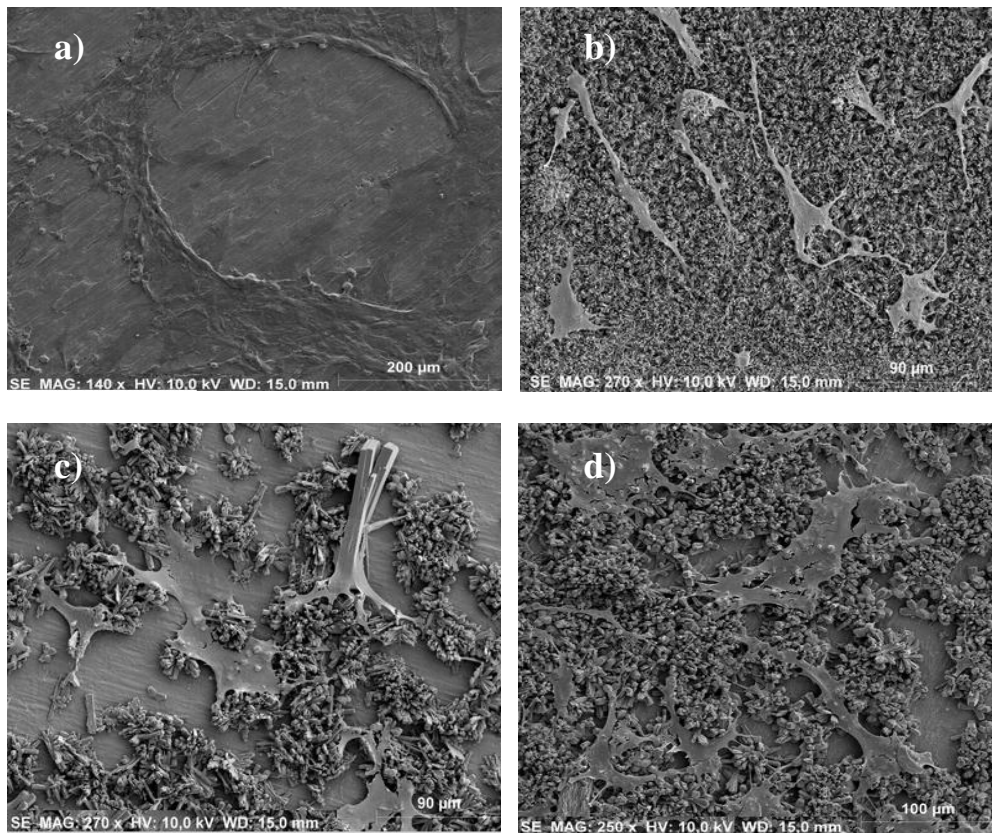


Figura 32. Micrografías SEM de las muestras (a) muestra control de Ti, (b) A, (c) B y (d) C.

En la Figura 33 se puede observar con más detalle la adhesión de las células al material. En la muestra de referencia se aprecian unos relieves que son formados por la acumulación de unas células encima de otras, mostrando una biocompatibilidad buena. Esto también se puede apreciar en la muestra B, donde las células tienden a adherirse a la superficie de Ti sin recubrir y sobre los cristales que forman parte del sustrato. En

cambio, la muestra A y C las células se muestran más superficiales sobre los cristales formados en el revestimiento y no tienden a prolongarse sobre las zonas sin recubrimiento.



**Figura 33. Micrografías SEM de las muestras: (a) muestra control de Ti, (b) A, (c) B y (d) C.**

## CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

1. Se ha sintetizado una serie de cementos dentales de fosfato de zinc, conteniendo cantidades variables de compuestos de calcio. El propósito fue aumentar la bioactividad de los biomateriales, por la presencia de iones de calcio y fosfatos, componentes inorgánicos mayoritarios de huesos y dientes. Además, se ha introducido el óxido de zirconio para dotarlos de radiopacidad.
2. La preparación de los cementos de fosfato de zinc conlleva la formación de cristales de hopeita (47.2-59.3%) principalmente, junto con otras fases minoritarias como zincita, periclase y baddeleyita, más una fase amorfa minoritaria no cuantificada, en la que permanece el calcio y el silicio, dos elementos reconocidos por su elevada bioactividad.
3. Las variaciones morfológicas de los cementos se han comprobado por SEM. Además de los cambios morfológicos, la superficie específica también experimenta modificaciones, relacionadas con la concentración y la clase de aditivo de calcio empleada. Morfológicamente, los cementos con más zincato de calcio forman agregados en forma laminar con una textura aparentemente lisa frente a los gránulos redondeados y corrugados de las otras formulaciones. Respecto a la porosidad, los materiales sintetizados se clasifican como no porosos con menor tamaño de poro en aquellos donde el contenido de zincato de calcio es mayor. Esto se debe a la formación de fases de alta cristalinidad muy compactas que no favorecen la porosidad y donde la escasa porosidad depende, más bien, de cómo se acomoden las partículas entre sí.
4. El estudio preliminar de biocompatibilidad revela que los cementos dentales muestran una viabilidad celular similar al de un material de referencia de fosfato de

zinc. A pesar de ello, los resultados muestran unos valores bajos de biocompatibilidad, debido a la falta de acondicionamiento de las muestras, previo a su funcionalización celular. Aun así, se obtuvo mejor respuesta en los cementos sintetizados con relación a la de la muestra de referencia.

5. El tratamiento hidrotermal de titanio metálico con diferentes disoluciones ácidas, conteniendo principalmente fosfato y zinc ( $Zn^{2+}$ ), da lugar a la formación de una capa de fosfato de zinc, depositada sobre la superficie del sustrato metálico. Aunque las células mesenquimales muestran una biocompatibilidad mayor por el titanio puro, en los recubrimientos formados en presencia de compuestos de calcio, las células se muestran con una morfología fibroblastoide y bien ancladas. Por el contrario, cuando el recubrimiento solo contiene fosfato de zinc la biocompatibilidad es menor.

### **LÍNEAS FUTURAS**

1. Completar los estudios de biocompatibilidad para el caso de los cementos dentales sintetizados.
2. Estudiar las propiedades mecánicas.
3. Optimizar el método de recubrimiento para aumentar su homogeneidad y biocompatibilidad, con el fin de aplicarlo para implantes metálicos.
4. Determinar los límites de tolerancia de los aditivos nuevos añadidos en la preparación de los biomateriales sintetizados.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] S. Nelson y M. Ash, Wheeler Anatomía, fisiología y oclusión dental, Barcelona: Elsevier España, 2010.
- [2] C. Ayala y J. E., Anatomía dental y de la oclusión, La Habana: Ciencias Médicas, 2009.
- [3] M. E. Gómez y A. Campos, Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental, Madrid: Médica Panamericana, 2009.
- [4] M. Sempere, «tuSintoma,» 15 Marzo 2015. [En línea]. Available: <https://tusintoma.com/anatomia-dental/>. [Último acceso: 9 Marzo 2017].
- [5] J. Elliot, R. Wilson y S. Dowker, «Apatite Structures,» *International Centre for Diffraction Data*, vol. XLV, pp. 172-81, 2002.
- [6] C. Infante, «Desarrollo Dental y Estructuras de soporte,» [En línea]. Available: <http://www.bdigital.unal.edu.co/634/11/9789584442864.10.pdf>.
- [7] «SlideShare,» 4 Octubre 2006. [En línea]. Available: <http://myslide.es/documents/lminashistologiadental.html>. [Último acceso: 9 Marzo 2017].
- [8] J. Wallace, «Bone Biology and Mechanics Lab at IUPUI,» [En línea]. Available: <http://www.iupui.edu/~bbml/boneintro.html>. [Último acceso: 15 Marzo 2017].
- [9] R. C *et al.*, «The Chemistry of Enamel Caries,» *Crit Rev Oral Biol Med*, vol. XI, n° 4, pp. 481-495, 2000.
- [10] L. Gartner y J. Hiatt, Atlas en Color y Texto de Histología, Madrid: Médica Panamericana , 2015.
- [11] J. Paul, «Dental Cements, A Review to Proper Selection,» *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.*, vol. IV, n° 2, pp. 659-69, 2015.
- [12] J. Burgess, «A Practical Guide To The Use Of Luting,» Junio 2008. [En línea]. Available: [https://www.dentalacademyofce.com/courses/2070/PDF/1103cei\\_cements\\_web.pdf](https://www.dentalacademyofce.com/courses/2070/PDF/1103cei_cements_web.pdf). [Último acceso: 18 Marzo 2017].
- [13] K. Ladha y M. Verma, «Conventional and Contemporary Luting Cements: An Overview,» *J india Prosthodont Soc*, vol. X, n° 2, pp. 79-88, 2010.
- [14] J. Simon *et al.*, «Dental Cements,» *Inside dentristy*, vol. II, n° 2, 2006.
- [15] S. E. d. Odontopediatría, «Protocolos de la sociedad española de odontopediatría,» [En línea]. Available: [http://www.odontologiapediatrica.com/selladores\\_de\\_fosas\\_y\\_fisuras](http://www.odontologiapediatrica.com/selladores_de_fosas_y_fisuras).

[Último acceso: 1 Abril 2017].

- [16] L. Carneiro *et al.*, «The effect of titanium topography features on mesenchymal human stromal cells' adhesion,» *Clinical Oral Implants Research*, vol. XXI, nº 2, pp. 250-4, 2010.
- [17] A. Valanezhad, «A new biocompatible coating layer applied on titanium substrates using a modified zinc phosphatizing method,» *Surface & Coatings Technology*, vol. CCVI, nº 8-9, pp. 2207-12, 2012.
- [18] S. Rodil, «Modificación superficial de biomateriales metálicos,» *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales*, vol. XXIX, nº 2, 2009.
- [19] M. Kulkarni, A. Mazare y P. Schmuki, «Biomaterial surface modification of titanium and titanium alloys for medical applications,» de *Nanomedicine*, Germany, One Central Press, 2014, pp. 111-136.
- [20] J. M. Rubio Caballero, «Calcium zincate as precursor of active catalysts for biodiesel production under mild conditions,» *Applied Catalysis B: Environmental*, vol. LII, nº 4, pp. 339-346, 2009.
- [21] A. Chaple, «Propiedades anti-placa dental bacteriana de los principales materiales dentales empleados en consultas estomatológicas,» *Cubana Estomatol*, vol. LII, nº 4, pp. 32-38, 2015.
- [22] M. Xuereb, F. Sorrentino, D. Damidot y J. Camilleri, «Development of novel tricalcium silicate-based endodontic cements with sintered radiopacifier phase,» *Clin Oral Invest*, vol. XX, p. 967-982, 2016.
- [23] G. Servais y L. Cartz, «Structure of Zinc Phosphate Dental Cement,» *Journal of Dental Research*, vol. L, nº 3, pp. 613-20, 1971.
- [24] «Sigma-aldrich,» [En línea]. Available: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/348791?lang=es&region=ES>. [Último acceso: 17 Marzo 2017].
- [25] «Cell Titer 96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay,» Diciembre 2012. [En línea]. Available: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf>. [Último acceso: 20 Mayo 2017].
- [26] «Deducción e interpretación informal de la ley de Bragg,» [En línea]. Available: Deducción e interpretación informal de la ley de Bragg. [https://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte\\_05\\_5.html](https://www.xtal.iqfr.csic.es/Cristalografia/parte_05_5.html). [Último acceso: 18 Abril 2017].
- [27] V. Esteve, El método de Rietveld, Castellón de la Plana: Universidad Jaume I. Servicio de Comunicaciones y Publicaciones, 2006.

- [28] A. d. pensamiento, «Espectrometría de fluorescencia de rayos X,» [En línea]. Available: <https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-rayos-x/espectroscopia-de-fluorescencia-de-rayos-x.html>. [Último acceso: 5 Mayo 2017].
- [29] P. Cañada, «Servicios Centrales de Investigación,» 2011. [En línea]. Available: <http://www.scai.uma.es/>. [Último acceso: 6 Mayo 2017].
- [30] «Tema 6. Análisis térmico: TG y DTA,» [En línea]. Available: <http://www.uco.es/~iq2sagr/TranspATG.pdf>. [Último acceso: 9 Mayo 2017].
- [31] S. Brunauer, P. H. Emmett y E. Teller, «Adsorption of Gases in Multimolecular layers,» *Journal of the American Chemical Society*, vol. LX, nº 2, pp. 309-19, 1938.
- [32] T.-M. Kim, T. Himeno, M. Kawashita, T. Kokubo y T. Nakamura, «The mechanism of biomineralization of bone-like apatite on synthetic hydroxyapatite: an in vitro assessment,» *J R Soc Interface*, vol. I, nº 1, pp. 17-22, 2004.
- [33] J. Rouquerol *et al.*, «Recommendations for the characterization of porous solids,» *Pure and Appl. Chem.*, vol. LXVI, nº 8, pp. 1739-58, 1994.
- [34] J. Flores, A. Maubert y N. Martin, «Evaluación de los intercambios iónicos en una zeolita natural Mexicana para la separación de N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> en el aire atmosférico,» *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. V, pp. 119-29, 2006.
- [35] A. Viani, K. Sotiriadis, I. Kumpová, L. Mancini y M.-S. Appavou, «Microstructural characterization of dental zinc phosphate cements using combined small angle neutron scattering and microfocus X-ray computed tomography,» *Dental materials*, vol. XXXIII, pp. 402-417, 2017.