

INVESTIGAÇÃO DO DESEMPENHO *IN VIVO* DE COMPÓSITOS DE ALUMINA/FOSFATO DE CÁLCIO (CaPs) VISANDO SUA APLICAÇÃO COMO MATERIAL PARA RECONSTRUÇÃO ÓSSEA

Marcelino Guedes de Lima¹

Adriano Lima da Silva²

Elíria Maria de Jesus Agnolon Pallone³

Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa⁴

INTRODUÇÃO

Na ciência de desenvolvimento de implantes e/ou preenchimentos ósseos, os fosfatos de cálcio (CaPs) possuem um perfil biológico altamente atrativo, pois apresentam composição química muito semelhante à fase mineral dos ossos e dentes (íons fosfato e cálcio). Podem, então, participar ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica apresentando grande habilidade em formar ligações com o tecido hospedeiro sem, no entanto, apresentar toxicidade local ou sistêmica, resposta inflamatória ao implante e formação de um tecido fibroso envoltório (KAWACHI *et al.*, 2000). Sendo assim, os CaPs, conseguem fornecer, um grau de integridade estrutural ao implante a fim de mantê-lo no lugar e intacto até que o novo osso cresça. Além disso, estimulam o crescimento de um tecido ósseo e apresentam solubilidade controlável, de maneira que podem ser absorvidos pelo organismo permitindo que o novo osso substitua o implante (VANDERSCHOOT, 2002).

Dentre os materiais empregados para tais fins, a hidroxiapatita (HAp) apresenta características promissoras para várias aplicações biomédicas visto que, é uma das fases do fosfato de cálcio mais atrativa para aplicações biomédicas devido à sua excelente biocompatibilidade, bioatividade, não toxicidade, biodegradação lenta, boa estabilidade mecânica, grande capacidade de adsorção e biocompatibilidade (Tan *et al.*, 2012; D'elía *et al.*, 2013) área superficial e porosidade elevada (Pon-On, 2011) e principalmente por sua

¹Professor, Titular, CCBS-UEPB, Doutor, Pesquisador, E-mail: marcelino.lima@hotmail.com;

²Mestre, Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais - UFCG, E-mail: adrianolimadasilva@hotmail.com;

³ Professora Titular, DCB/USP, Doutora e Co-Orientadora, E-mail: eliria@usp.br;

⁴Professora, Titular, UAEMa-UFCG, Doutora e Orientadora, E-mail: ana.costa@ufcg.edu.br;

semelhança com o osso humano natural (Wijesinghe *et al.*, 2014). Contudo, as propriedades mecânicas dos fosfatos de cálcio dependem do tamanho, forma, distribuição das partículas e da formação dos aglomerados, os quais influenciam o processo de densificação (sinterização do material com retração).

Desta forma, estudos que viabilizam a síntese de fosfatos de cálcio tem se tornado um grande atrativo para pesquisadores nas mais diversas áreas (como por exemplo, medicina, ciências dos materiais, químicos e engenheiros), visando obter estes materiais com características estruturais e morfológicas que aperfeiçoem as propriedades físico-químicas de modo a contribuir para o avanço tecnológico e científico nas mais diversas aplicações.

Por outro lado, pesquisas científicas também avançam no estudo e desenvolvimento de novos materiais que possam resultar em propriedades mais compatíveis para fabricação de produtos mais estáveis termicamente e quimicamente, com alta durabilidade, propriedades mecânicas, elétricas, magnéticas e ópticas mais pronunciadas, de forma a reduzir o descarte no meio ambiente e possibilite a melhoria da qualidade de vida. Associado, temos também a busca pelos novos materiais que possam substituir ou reparar parte do corpo humano (os biomateriais) e que tem ganhado um forte impulso na última década, visto que tem crescido a busca incansável do homem por padrões de vida superiores e pela longevidade, gerando cada vez mais a necessidade de alternativas para o reparo e substituição de tecidos vivos vitimados por traumas ou patogenia.

Assim, este trabalho tem como objetivo investigar o desempenho *in vivo* dos compósitos de alumina/fosfato de cálcio ($Al_2O_3/CaPs$), por meio de análise radiográficas em tíbias de coelhos visando sua aplicação como biomaterial de reconstrução óssea.

DESENVOLVIMENTO

Biomateriais

Os materiais utilizados na substituição de ossos enquadram-se numa classe denominada de biomateriais, que devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos do hospedeiro, de modo a estimular uma resposta adequada aos mesmos. Tais propriedades caracterizam a biocompatibilidade. Os materiais sintéticos utilizados para estes fins podem ser metais, polímeros, compósitos, cerâmicas e vidros (WONG e BRONZINO, 2007). Inúmeros dispositivos e materiais são utilizados no

tratamento de doenças ou ferimento, como exemplo pode citar: suturas, agulhas, cateteres, placas, obturações dentárias, próteses, entre outros.

Em geral, biomateriais utilizados na reposição dos chamados tecidos moles são muito diferentes daqueles usados na substituição de tecidos duros (ossos e dentes). Para os tecidos duros, dependendo do esforço mecânico a que são submetidos, alguns materiais podem ser mais apropriados que outros, devido à sua maior resistência (KAWACHI *et al.*, 2000).

A diversidade das aplicações dos biomateriais reportados na literatura, assim como o amplo espectro de sua composição química e a necessidade de formas e morfologias apropriadas para sua utilização, faz da pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho de característica eminentemente interdisciplinar, envolvendo fatores que definem o sucesso de suas aplicações, tais como: rotas de síntese, processamento em formas variadas, qualidade e esterilidade clínica e resposta do tecido hospedeiro (KAWACHI *et al.*, 2000).

Desta forma, o desenvolvimento de biocerâmicas e de próteses constituídas destes materiais deve ocorrer sob as mesmas condições de interdisciplinaridade que determinam o desenvolvimento de qualquer outro biomaterial. Dentro deste contexto, os profissionais da área química, saúde, engenharia dos materiais, entre outros, podem contribuir de forma significativa para a evolução desta área e para o aumento do leque de sua aplicabilidade, através do desenvolvimento de novos e eficazes biomateriais e também na elucidação dos mecanismos que regem a regeneração óssea.

Biocerâmicas

Cerâmicas têm sido usadas pelos seres humanos há milhares de anos. Nos últimos anos, os seres humanos têm percebido que a cerâmica e as suas composições também podem ser usados para aumentar ou substituir várias partes do corpo, especialmente ossos. Assim, as cerâmicas utilizadas para esses fins são classificadas como biocerâmicas. A cerâmica apresenta inércia em relação aos fluidos corporais, alta resistência à compressão e aparência esteticamente agradável, o que viabilizou sua utilização na odontologia como coroas dentárias. Podemos citar como exemplo, carvões usados como implantes, utilizados especialmente para aplicações em interface com o sangue, tais como válvulas cardíacas (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Devido à sua alta resistência semelhante a das fibras (naturais ou sintéticas) e sua biocompatibilidade, a cerâmica também está sendo usada como reforço de componentes de materiais compósitos para implante e para aplicações em tendões e ligamentos artificiais. Para

ser classificado como biocerâmicas, o material cerâmico deve atender ou exceder as seguintes propriedades: não tóxico, não carcinogênico, não alérgico, não inflamatório, biocompatível e biofuncional (WONG e BRONZINO, 2007).

Dentro da classe das biocerâmicas duas especificamente merecem destaque em aplicações biomédicas: a alumina e os fosfatos de cálcio.

A alumina densa - coríndon (α - Al_2O_3) como biocerâmica, tem seu uso datado a mais de 40 anos atrás, com base na sua característica de ser bioinerte, alta resistência à corrosão, elevada resistência mecânica, dureza, excelente biocompatibilidade e estabilidade no corpo humano (PICONI et al., 2003)

A alumina (Al_2O_3) é um material que pode atuar também como um biomaterial por apresentar-se altamente inerte e resistente à maioria dos ambientes corrosivos, incluindo o ambiente altamente dinâmico que é o corpo humano. Em condições fisiológicas é praticamente inerte, causando pouca ou nenhuma resposta dos tecidos em volta do implante e mantendo-se essencialmente inalterado. No entanto, o corpo humano a reconhece como material estranho e procura isolá-lo formando uma camada de tecidos fibroso não aderente em volta do implante. As principais características que tornam a alumina adequada para ser utilizada como biomaterial, quando comparada com outras biocerâmicas aplicadas a biomateriais são (PEZZOTTI *et al.*, 2010): alto grau de inércia química sob condições fisiológicas; alta resistência de uso; habilidade de ser polida com alto acabamento superficial; dureza excelente; maior tenacidade à fratura; maior resistência mecânica à flexão e; menor módulo de elasticidade.

Os fosfato de cálcio, é um grupo de minerais que contém íons de cálcio (Ca^{2+}) juntamente com ortofosfatos (PO_4^{3-}), metafosfatos ou pirofosfatos ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) e ocasionalmente hidrogênio ou íons de hidróxido. Sua fórmula molecular é $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (FERNANDES, 2007). O fosfato de cálcio na rocha ígnea e sedimentar é exclusivamente apatítico. Originalmente, todas as apatitas terrestres estão presentes em rochas ígneas. Através do tempo geológico, a extensa e contínua lixiviação dessas rochas primárias pelas águas tem sido uma fonte para a formação de fosfato de cálcio biológico, na forma de apatita. Os esqueletos de algumas espécies marinhas também são fontes deste mineral. Alguns contêm carbonato de cálcio, porém a maioria contém fosfato de cálcio. Os esqueletos que não são reabsorvidos no ciclo da vida, carnívoro do mar depositam-se no fundo de mares, oceanos e lagos formando depósitos minerais (PAIVA, 2011).

Os fosfatos de cálcio vêm despertando grande interesse entre biólogos, mineralogistas e químicos inorgânicos e industriais por muitos anos, pois as apatitas constituem o principal componente mineral dos ossos e dentes (GUASTALDI e APARECIDA, 2010). A hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ compõe cerca de 23 % em massa dos ossos e 90 % do esmalte dental (HIJÓN *et al.*, 2006). É considerada a apatita mais cristalina produzida por organismos vivos, apesar de possuir baixo grau de cristalinidade, devido à troca de íons OH^- por íons F^- ou Cl^- , resultando em fluorapatita e cloroapatita. Poderá ocorrer também a troca de Ca^{2+} por outros íons divalentes com diâmetro maior que 0,97 Å e a troca de fosfato por carbonatos e sulfatos. Muitos fosfatos de cálcio são encontrados em processos de mineralização e em calcificações patológicas (GUASTALDI e APARECIDA, 2010).

Os fosfatos de cálcio apresentam-se hoje como os principais materiais estudados e empregados como biomaterial para a reposição e regeneração do tecido ósseo, pois apresentam como principais características: semelhança com a fase mineral de ossos, dentes e tecidos calcificados; excelente biocompatibilidade; bioatividade; ausência de toxicidade; taxas de degradação variáveis; osteocondutividade (indicam o caminho para o crescimento ósseo, fazendo que ocorra sobre a superfície ou através dos poros) (KAWACHI *et al.*, 2000).

As principais aplicações dos fosfatos de cálcio estão na área médica-odontológica, onde estes são utilizados como biomateriais, pois apresentam a característica de serem biocompatíveis não induzindo nenhuma resposta inflamatória do organismo a este tipo de material. Podem ser utilizados em: reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas, aumento de rebordo alveolar, coadjuvante na colocação de implantes metálicos, regeneração guiada de tecidos ósseos, reconstrução bucomaxilofacial, equipamentos percutâneos, reparo e substituição de paredes orbitais, substituição do globo-ocular, enxerto ou recobrimento de próteses metálicas, tratamentos periodontais, aplicações em otorrinolaringologia e recobrimento de implantes metálicos (ANMIN *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2006; LEGEROS *et al.*, 2003; GAVRILOVIC *et al.*, 2003; ANDERSSON *et al.*, 2005).

Reconstrução Óssea

A recuperação de áreas que sofreram traumas, retiradas de tumores ou devido a própria constituição genética do paciente podem ser feitas por meio dos enxertos com biocerâmicas que apresentem boa resistência mecânica, biocompatibilidade, bioinércia, biofuncionalidade e osseointegração.

Na odontologia bucomaxilofacial tomando como exemplo, temos regiões que

precisam ser recuperadas, por exemplo: o mento (queixo), nasal, zigoma e o ângulo mandibular (Figura 1). Esta recuperação pode ser feita com as biocerâmicas puras ou com compósitos destas biocerâmicas (GINEBRA *et al.*, 2010).

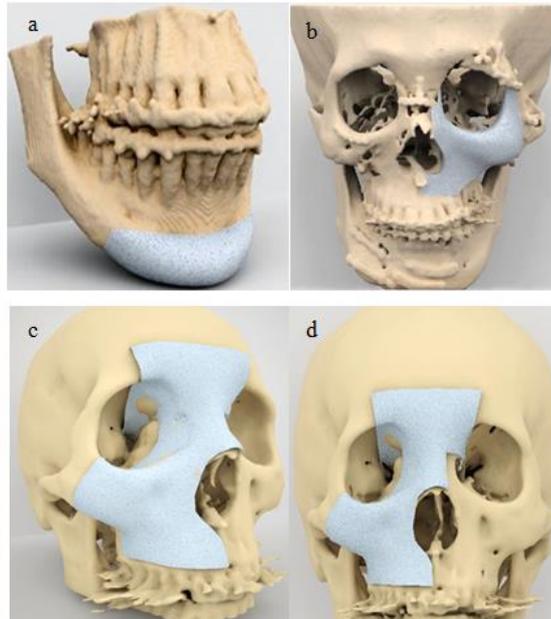


Figura 1 - Regiões implantadas, (a) mento, (b), (c) e (d) seios da face. **Fonte:** Kawachi *et al.*, 2000.

A odontologia bucomaxilofacial engloba tratamentos como: enxertos ósseos, transplantes e reimplantes de dentes, dentes inclusos biópsias, cirurgias com finalidade protética, cirurgias com finalidade ortodôntica, cirurgias ortognáticas e tratamento cirúrgico de cistos, afecções radiculares e periradiculares, doenças das glândulas salivares, doenças da articulação têmporo-mandibular, lesões de origem traumática na área bucomaxilofacial, malformações congênitas ou adquiridas dos maxilares e da mandíbula e os tumores da região oral e maxilofacial (SOTTO MAIOR, *et al.*, 2006).

A evolução da implantodontia na última década trouxe consigo a necessidade da utilização de técnicas de aumento dos rebordos ósseos maxilares, receptores dos implantes dentários, mediante enxertos ósseos e procedimentos para sua expansão (SEGUNDO, 2000). Dentre esses procedimentos visando o ganho de tecido ósseo, em altura e espessura, o enxerto ósseo é o mais utilizado (ARACIL *et al.*, 2003, KUABARA, 2001, STUANI, 2000).

Os enxertos, quanto à sua origem, podem ser autógenos quando obtidos do mesmo indivíduo, sendo este receptor e doador; exógenos quando obtidos de outro indivíduo com mesma carga genética; homogêneos quando obtidos de indivíduos diferentes com carga genética diferente, porém da mesma espécie e os heterógenos que são obtidos de outras

espécies. Dentre esses tipos de ossos utilizados nas enxertias, o autógeno é o mais compatível e o que mostra melhor resultado (CHENG *et al.*, 2010).

Os enxertos autógenos basicamente podem ser de dois tipos, em bloco ou esponjoso medular em partículas. Os primeiros constituem peças sólidas, cujas fontes são, por exemplo, a crista ilíaca, costela, tibia ou outro osso adequado. Os enxertos esponjosos - medulares são obtidos pela curetagem do osso medular, da medula hematopoiética e do endóstio associado. O ilíaco é a localização mais comum para a sua obtenção. A principal desvantagem deste tipo de enxerto é a necessidade de outro local cirúrgico para a área doadora, além dos riscos de morbidade com o local doador (MARZOLA, 2005).

A maioria dos autores concorda que os enxertos autógenos são a melhor opção para a realização das reconstruções faciais (MULLINS e OGLE, 2001; PINTO e DONÁ, 2001; MARZOLA, 2005; CRUZ, 2006), pois são inertes, não produzem reação imunológica sendo remodelados pela reação osteoclástica e formação óssea, apesar de suas limitações e do grande desenvolvimento tecnológico em relação aos materiais aloplásticos (BARBOSA, 2003).

Em se tratando de uma reabsorção óssea severa em mandíbula, os enxertos de aumento proporcionam resistência às mandíbulas extremamente deficientes, além de altura e contorno de ossos adequados para a colocação de implantes e/ou próteses. Os tipos de materiais disponíveis para enxertia incluem o osso autógeno ou alógeno, além de materiais aloplásticos.

Dentro do grupo de materiais aloplásticos, encontra-se hidroxiapatita, cujo uso tem se tornado popular para aumento ósseo de maxila e mandíbula. O aumento do bordo superior da mandíbula com enxertos ósseos é indicado nos casos de grave atrofia, com altura e contorno inadequados para reabilitação, além de risco potencial de fraturas. Nesta técnica são empregados enxertos de crista ilíaca, costela ou ainda pequenas partículas de osso desidratado e liofilizado (SVANBORG *et al.*, 2011).

Entretanto, devido aos casos de reabsorção, morbidade na área doadora e necessidade de hospitalização, têm-se empregado materiais aloplásticos para a correção de mandíbula atrofica, sendo a hidroxiapatita o material de escolha e, por ser biocompatível quase se une física e quimicamente ao osso (MARX e SAUNDERS, 2001). Esta técnica dispensa a cirurgia complementar em área doadora, não ocorrendo a reabsorção do enxerto, podendo a cirurgia ser feita a nível ambulatorial. No entanto, às vezes é difícil conter o material no local pré-determinado e obter a altura desejada do rebordo. Com a evolução dos estudos, observou-se que o osso autógeno é superior a qualquer outro material, quanto à osteogênese inicial,

osteoidução, osteocondução e reabsorção com remodelamento ósseo, além de oferecer resultados mais previsíveis (MARZOLA, 2005).

A mandíbula, o osso parietal, porção escamosa do occipital, frontal, parte da asa maior do esfenóide, escápula e clavícula desenvolve-se pela via intramembranosa e, dessa forma não ocorre o aparecimento prévio de tecido cartilaginoso. Na região apendicular, membros e vértebras, as células participam no fenótipo endocondral, promovendo a ossificação condrogênica antes da osteogênica (TAGA *et al.*, 2000).

Além da origem embriológica deve-se avaliar a necessidade do local a ser enxertado, ou seja, as dimensões do defeito a ser recuperado para se determinar qual área doadora oferece uma quantidade óssea suficiente para esse local. As fontes bucais apresentam como vantagens o fato de serem materiais eficientes, seguros e de fácil obtenção (TAGA *et al.*, 2000).

A costela humana também pode ser um doador para enxertos ósseos e, uma ou mais costelas, normalmente a quinta, sexta ou sétima, podem ser retiradas de qualquer lado da caixa torácica, podendo ser retirados até 10 cm do osso. As complicações para esta cirurgia podem ser a deiscência da ferida cirúrgica ou ainda um pneumotórax (MARZOLA, 2005).

A realização de enxerto ósseo possibilita a reconstrução da anatomia e devolve previsibilidade ao tratamento. A neoformação óssea ocorre por três mecanismos: osteogênese, osteoidução e osteocondução (ABRAHAMS, 2000). A osteogênese é caracterizada quando o próprio enxerto é suprido de células capazes de formação óssea (osteoblastos); a osteoidução é a capacidade do enxerto de estimular a atividade osteoblástica do tecido ósseo adjacente (leito receptor) com neoformação óssea e na osteocondução células mesenquimais diferenciadas invadem o enxerto, promovendo a formação de cartilagem e em seguida a ossificação (RAGHOEBAR *et al.*, 2005).

Dentre os materiais de opção para a realização do enxerto temos: o osso alógeno, materiais aloplásticos, usualmente a hidroxiapatita e o osso autógeno, que pode ser obtido de áreas extrabucais como: osso ilíaco e calota craniana. Como também de áreas intrabucais como: túber, mento e região retromolar. Sendo o osso autógeno aquele que apresenta o padrão mais próximo do ideal para a reconstrução desta região (RAGHOEBAR *et al.*, 2005).

O critério para a seleção do material para enxerto é determinado pelas seguintes características: capacidade de produção óssea no seio por proliferação celular através de osteoblastos transplantados ou por osteocondução de células da superfície do enxerto, capacidade de produzir osso por osteoidução de células mesenquimais, capacidade do osso

inicialmente formado de se transformar em osso medular maduro, manutenção do osso maduro ao longo do tempo sem perda após entrar em função, capacidade para estabilizar implantes quando colocados simultaneamente com enxerto, baixa taxa de infecção, fácil acesso, baixa antigenicidade e alto nível de confiabilidade (SPIEKERMANN, BIESTERFELD e EDELHOFF, 2000).

MATERIAIS E MÉTODOS

Os materiais utilizados nesse trabalho foram: alumina comercial: Al_2O_3 AKP – 53 Sumitomo Co. Japan, com 99,995% de pureza, tamanho de partícula de 0,2 μm e área superficial de 13,6 m^2/g ; hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) P.A. fabricado pela VETEC; ácido fosfórico (H_3PO_4) P.A. fabricado pela VETEC; água deionizada (H_2O).

Obtenção do Fosfato de Cálcio (CaPs)

O fosfato de cálcio (CaPs) foi sintetizado pelo método de precipitação (7,8) envolvendo uma reação ácido-base denominada neutralização entre as soluções de ácido fosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] com concentração 1M, obedecendo a relação de fósforo/cálcio = 1,67 (Leite *et al.*, 2018). A solução de hidróxido de cálcio foi submetida à agitação constante em um misturador/aquecedor IKA®RH *basic* KT/C até atingir a temperatura de 80 °C. Em seguida a esta solução, adicionou-se gota a gota a solução de H_3PO_4 previamente preparada, agitando constantemente, até atingir viscosidade de uma pasta que propiciou um meio adequado para manter em suspensão as partículas do CaPs. Depois de atingida a consistência da viscosidade desejada, a solução permaneceu em estufa FANEM Modelo 315 a 110 °C por 24 horas.

Preparação dos Compósitos $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$

Os compósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ foram obtidos usando percentual de 10 e 30 % em massa de CaPs em relação a massa total da Al_2O_3 . Os compósitos obtidos foram designados por 10C e 30C. Para obtenção das formulações dos compósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ utilizou-se o seguinte procedimento: Em um becker de 100 mL foi colocado 60 mL de água deionizada e adicionado 30 g do pó da mistura de alumina e do CaPs, previamente pesados mantendo-se sob agitação constante durante 30 minutos em um agitador magnético modelo IKA®RH *basic* KT/C, a temperatura ambiente. A mistura resultante da formulação de cada compósito foi levada à estufa FANEM Modelo 315 por 24 horas a uma temperatura de 60 °C. Após a

secagem a mistura na forma de pó de $Al_2O_3/CaPs$, foram desaglomerados em almofariz ágata e passado em peneira ABNT N° 100 (150 μm) e, então reservadas para conformação dos compósitos. A mistura $Al_2O_3/CaPs$ de cada formulação foram compactadas na forma de pastilha com 10,0 mm de diâmetro e espessura em torno de 5 mm em um molde de aço tratado termicamente por meio de prensagem uniaxial 75 MPa.

Após a prensagem uniaxial as amostras foram prensadas isostaticamente com pressão de 260 MPa em prensa isostática marca AIP modelo CP 360. Os compósitos foram então, sinterizados a 1350 °C/2h em um forno MAITEC, fabricação INTI, modelo FE1600. As condições de sinterização foram: taxa de aquecimento 2 °C/min até 400 °C/1h; taxa de aquecimento de 10 °C/min até 1350 °C/2h. A temperatura de 1350 °C/2h foi tomada como referência a temperatura de máxima densificação (taxa de retração linear máxima) obtida para a alumina comercial utilizada neste estudo CHINELATTO *et al.*, 2008.

As amostras e os compósitos foram caracterizados quanto à estrutura cristalina por difração de raios X. A partir dos dados de difração foi realizada a identificação das fases formadas, cálculo do tamanho de cristalito, e da cristalinidade. O equipamento utilizado foi LAB X Ray Diffractometer 6000 da Shimadzu, com radiação monocromática de cobre.

Procedimento *In Vivo*

A implantação *in vivo* foi realizada pela introdução dos compósitos $Al_2O_3/CaPs$ com concentração de 10 % (10C) e 30 % (30C) do CaPs em cobaias do tipo coelho (*Oryctolagus Cuniculus*), da raça Nova Zelândia, sendo utilizados 18 coelhos hípidos, adultos, machos. A idade variou entre 7 e 9 meses (média 8,1 + 1,11 meses) e o peso entre 1.800 e 3.500 g, com média de 2,511 + 586 g). A desvermifugação foi realizada com ivermectina (0,5 mg/kg) por via subcutânea.

Os animais foram divididos ao acaso em dois grupos, cada qual com nove coelhos, segundo o período de eutanásia (30 e 60 dias após o procedimento cirúrgico):

Grupo I – Recebeu os compósitos implantados (10C e 30C) e um orifício controle (padrão de referência) por 30 dias.

Grupo II – Recebeu os compósitos implantados (10C e 30C) e um orifício controle (padrão de referência) por 60 dias.

O orifício superior da tíbia direita face interna, de cada coelho, tanto para o período de 30 e 60 dias de eutanásia, receberam os compósitos com 30 %, o orifício médio receberam os compósitos com 10 % e o orifício inferior não recebeu nenhum compósito, servido de

controle. O procedimento cirúrgico foi realizado conforme os padrões estabelecidos de Cirurgia na Policlínica Veterinária de Campina Grande, sob a supervisão do médico veterinário Rodrigo Tavares Jordão de Vasconcelos CRMV 0828 - PB. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da UFCG. Cada animal recebeu de forma padronizada dois implantes (compósitos 10C e 30C) e um orifício controle (C) situado na metáfise proximal da tíbia direita, face interna. No pré-operatório cada animal foi submetido a jejum sólido por seis horas e líquido por uma hora. A tricotomia foi feita com aparelho de tricotomia com lâmina nº 0, sendo compreendida desde a região femoral distal até o calcâneo. Aproximadamente 30 minutos antes do ato operatório foi feita a administração de cefalosporina na dose de (22 mg/kg via intravenosa IV). A medicação anestésica consistiu na associação de xilazina 10 mg/kg via intramuscular (IM) com cloridrato de quetamina de 10 mg/kg, misturadas na mesma seringa.

Os animais foram, colocados nas gaiolas para a recuperação da anestesia, em ambiente silencioso, com pouca luz, com um mínimo de manipulação, evitando assim estresse dos animais.

As Figuras 2, 3 e 4 ilustram os fluxogramas de todo o procedimento cirúrgico e o pós-operatório.



Figura 1 - Procedimento cirúrgico: (a) coelho anestesiado, (b) incisão, (c) exposição óssea, e (d) trepanação.

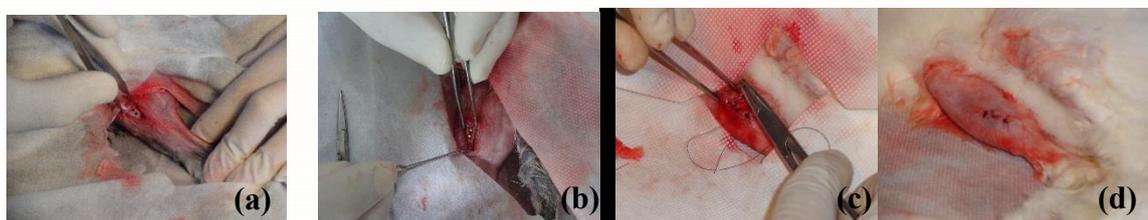


Figura 2 - Procedimento cirúrgico: (a) confecção do defeito, (b) implantação, (c) sutura, e (d) finalização da sutura.



Figura 3 - Pós-operatório: (a) curativo, (b) pós-operatório e (c) retirada dos pontos.

Após os procedimentos cirúrgicos foram sacrificados por eutanásia 9 coelhos com 30 (Grupo I) e 9 coelhos com 60 dias (Grupo II). A eutanásia foi realizada através da administração de anestésico em dose letal, conforme previsto pela Comissão de Ética em Pesquisa – CEP da UFCG. Os animais foram submetidos à após o procedimento cirúrgico. Inicialmente foi feita a administração de xilazina (3 mg/kg, IM) e cetamina (2 mg/kg, IM).

Depois de dois minutos após a indução anestésica foi induzida a parada cardíaca por administração de cloreto de potássio (100 mg/kg, IV). Confirmada a morte, foi removido o membro inferior direito de cada coelho, que foram radiografadas, realizando-se em seguida remoção das tíbias. O descarte dos coelhos após eutanásia foi feito por incineração no setor de patologia do Hospital Veterinário da UFCG.

Avaliação Radiológica – RX

As radiografias foram realizadas na posição média lateral (ML) do membro operado, com 30 e 60 dias de pós-operatório, visando acompanhar o processo de reparação óssea em torno do implante. Foi utilizado o equipamento de raios X Chemetron Universal X Ray Easymatic Super 325 da Clínica Radiológica Dr. Saturnino Nóbrega de Campina Grande, com auxílio da Prof^a. Dr^a. Denise Nobrega Diniz, chefe do setor de radiologia. O aparelho para emissão de raios X perpendicularmente mantinha a distância foco filme padronizada de 30 cm. Cada uma das 18 radiografias foi analisada separadamente e em conjunto com o seu referido grupo, onde foram avaliados a neoformação óssea, reabsorção óssea e fratura óssea em torno do implante, de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Escala gradual para avaliação do grau de radiopacidade da lesão óssea produzida experimentalmente na tíbia de coelhos.

Graus de Radiopacidade	Valores atribuídos	Descrição da reação óssea
Radiopacidade ausente	0	Ausência de reação periosteal
Radiopacidade discreta	1	Reação periosteal apenas nas bordas da lesão óssea

Radiopacidade moderada	2	Reação periosteal nas bordas da lesão com radiopacidade evoluindo concentricamente sem consolidação completa da lesão óssea
Radiopacidade acentuada	3	Consolidação completa da lesão óssea

Fonte: AFFATATO, 2012.

Na avaliação radiográfica para os 18 coelhos nos dois grupos se tomaram como padrão para referência da radiopacidade, a região correspondente ao osso cortical remanescente (osso original) da tíbia dos coelhos. Então, de acordo com Azevedo (2011) a ausência de radiopacidade (grau 0), indica que em torno do implante existe uma área radiolúcida, que será reconhecida por um elo (anel) preto em volta do implante. Grau de radiopacidade discreta o escore apresenta grau 1, indicando que houve uma discreta reação periosteal em torno do implante, sendo visualizado por um elo preto difuso em torno do implante.

Para a radiopacidade de escore grau 2, indica que existe uma atividade osteoblástica em torno do implante, sendo reconhecido por um elo com cor próxima a da radiopacidade apresentada pelo osso cortical remanescente (branco). Para a radiopacidade acentuada, com escore de grau 3, indica que ocorreu a completa reparação do osso, de forma que não se observa diferença entre o osso cortical remanescente e a área do implante ou do local do orifício controle.

As radiografias foram realizadas na posição média lateral (ML) do membro operado, com 30 e 60 dias de pós-operatório, visando acompanhar o processo de reparação óssea em torno do implante. Foi utilizado o equipamento de raios X Chemetron Universal X Ray Easymatic Super 325 da Clínica Radiológica Dr. Saturnino Nóbrega de Campina Grande, com auxílio da Profa. Dra. Denise Nobrega Diniz, chefe do setor de radiologia. O aparelho para emissão de raios X perpendicularmente mantinha a distância foco filme padronizada de 30 cm. Cada uma das 18 radiografias foi analisada separadamente e em conjunto com o seu referido grupo, onde foram avaliados a neoformação óssea, reabsorção óssea e fratura óssea em torno do implante.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 5 encontra-se ilustrados os difratogramas de raios X dos compósitos $Al_2O_3/CaPs$ sinterizados a $1350^\circ C$.

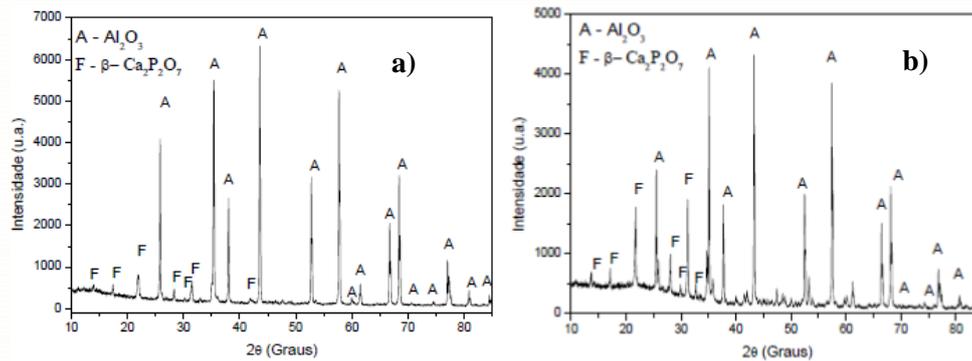


Figura 5 – Difração de raios – X dos compósitos: (a) 10C e (b) 30C.

Observa-se na Figura 5a, a presença da fase cristalina romboédrica da $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ identificada pela ficha cristalográfica JCPDS 75 – 0783, sob a forma do mineral coríndon. Para a Figura 5b, compósitos com adição do CaPs, observou-se a presença da fase $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ e presença da fase $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ identificado de acordo com a ficha JCPDS 09 - 0346. Importante ressaltar que o CaPs identificado pela fase $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ foi a fase majoritária indicando que a sinterização a 1350 °C, não alterou a estrutura do CaPs.

A Figuras 6 ilustra o aspecto radiográfico na metafise proximal das tíbias de 9 coelhos para período de eutanásia após 30 dias da realização do implante.



Figura 6 - Aspecto radiográfico das tíbias dos coelhos após 30 dias da realização do implante.

Mediante as radiografias da Figura 6, observa-se para os implantes 10C que todas as imagens radiográficas das tíbias dos nove (9) coelhos apresentaram escore com grau 3, ou seja, com radiopacidade semelhante a radiopacidade apresentada pelo osso cortical remanescente. Para o implante 30C, observa-se escore com grau de radiopacidade 3 para

todos os coelhos, exceto o coelho N^o 17, que apresentou escore com grau 2, indicando que a reparação óssea ainda se encontra em fase de neoformação óssea.

Para o orifício controle, verifica-se que só ocorreu neoformação óssea total, escore de grau 3, apenas para os coelhos N^o 12, 14, 16 e 18. Nos coelhos N^o 10, 11, 13 e 17 foi observado escore de grau 2, indicando que a reparação óssea ainda se encontra em fase de neoformação óssea.

Apenas para o coelho N^o 15 foi observado para o orifício controle escore de grau 1 (radiopacidade discreta) indicando que houve uma discreta reação periosteal em torno do implante, sendo visualizado por uma região preta difusa.

A Tabela 2 mostra o resultado dos escores apresentados pelos implantes 10C e 30C, e o orifício controle para o período de eutanásia de 30 dias (grupo I).

Tabela 2 - Grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 30 dias de pós-operatório.

Coelhos	10C	30C	Controle
10	3	3	2
11	3	3	2
12	3	3	3
13	3	3	2
14	3	3	3
15	3	3	1
16	3	3	3
17	3	2	2
18	3	3	2

Mediante as radiografias da Figura 7, observa-se para os implantes 10C que todas as imagens radiográficas das tíbias dos 9 coelhos apresentaram escore com grau 3, ou seja, com radiopacidade semelhante a radiopacidade apresentada pelo osso cortical remanescente. Para o implante 30C, observa-se escore com grau de radiopacidade 3 para todos os coelhos, exceto o coelho N^o 17, que apresentou escore com grau 2, indicando que a reparação óssea ainda se encontra em fase de neoformação óssea.

A Figura 7 ilustra o aspecto radiográfico das tíbias dos coelhos após 60 dias da realização do implante.

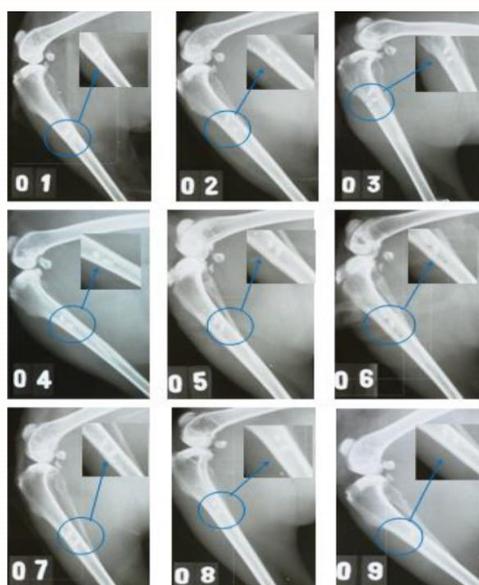


Figura 7 - Aspecto radiográfico das tíbias dos coelhos após 60 dias da realização do implante.

Para o orifício controle, verifica-se que só ocorreu neoformação óssea total, escore de grau 3, apenas para os coelhos N^o 12, 14, 16 e 18. Nos coelhos N^o 10, 11, 13 e 17 foi observado escore de grau 2, indicando que a reparação óssea ainda se encontra em fase de neoformação óssea. Apenas para o coelho N^o15 foi observado para o orifício controle escore de grau 1 (radiopacidade discreta) indicando que houve uma discreta reação periosteal em torno do implante, sendo visualizado por uma região preta difusa.

A Tabela 3 mostra o resultado dos escores apresentados pelos implantes 10C e 30C, e o orifício controle para o período de eutanásia de 60 dias (grupo II).

Tabela 3 - Grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 60 dias de pós-operatório.

Coelhos	10C	30C	Controle
01	3	3	2
02	3	3	2
03	3	3	3
04	3	3	3
05	3	3	2
06	3	3	1
07	3	3	2
08	3	2	3
09	3	3	2

Como reportado nas Tabelas 2 e 3, e Figuras 6 e 7, observou-se na incidência médio lateral dos raios X para os implantes 10C, tanto no grupo I quanto o grupo II, radiopacidade com escore grau 3, indicando a total neoformação óssea. Para os implante 30C também foi observada a radiopacidade de grau 3 para os grupo I e II, exceto o coelho N^o 17 com período de eutanásia de 30 dias que apresentou uma discreta radiopacidade com escore de grau 2.

Em relação ao orifício controle evidenciou-se uma considerável variação nos escores desde o grau 1 ao grau 3, tanto para o grupo I quanto para o grupo II, indicando presença de neoformação óssea. A análise estatística das tomadas radiográficas das tíbias dos coelhos para o período de eutanásia de 30 e 60 dias encontra-se descrita nas Tabelas 4 e 5.

Tabela 1 - Avaliação do grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 30 dias de pós-operatório*.

Parâmetro	30C (n = 9)	10C (n = 9)	Controle (n = 9)
Variação	3 – 3	3 – 3	1 – 3
Mediana	3	3	2
Intervalo interquartil	3 – 3	3 – 3	2 – 3

p implante 30C e 10C = 0,47, p implante 30C com controle = 0,006, p implante 10C com controle = 0,02, * em nenhum grupo houve diferença dos parâmetros comparando-se 30 com 60 dias de pós-operatório.

Comparando os escores de radiopacidade nos coelhos submetidos à eutanásia com 30 e 60 dias, não se evidenciou nenhuma diferença significativa entre esses, motivo pelo qual não se apresenta a comparação de acordo com o tempo de sacrifício. Tanto com 30 como com 60 dias a mediana de radiopacidade foi de 3 nos orifícios preenchidos com os implantes 10C e 30C e de 2 no orifício controle. Não observamos áreas radiolúcida no entorno das implantações, apenas parcialmente no orifício controle, o que pode ter ocorrido em função do posicionamento do membro no momento da incidência do feixe de raios X.

Tabela 2 - Avaliação do grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 60 dias de pós-operatório*.

Parâmetro	30C (n = 9)	10C (n = 9)	Controle (n = 9)
Variação	3 – 3	2 – 3	1 – 3
Mediana	3	3	2
Intervalo interquartil	3 – 3	3 – 3	2 – 3

p implante 30C e 10C = 1,00, p implante 30C com controle = 0,006, p implante 10C com controle = 0,02.

Comparando a radiopacidade em torno dos implantes 10C e 30C em relação ao grupo controle, observou-se que a radiopacidade foi significativamente maior nos orifícios preenchidos com os implantes em relação ao controle (mediana de 2), $p = 0,0005$ e $p = 0,0018$, respectivamente, indicando que os valores de p experimentais foi menor que o p do método de Mann-Whitney ($p < 0,05$) (ALVES, 2013). Isto mostra que os grupos foram diferentes porque p foi menor que 0,05.

No entanto, não houve diferença no grau de radiopacidade dos orifícios preenchidos com os implantes 10C e 30C, ambos com mediana de escore de 3 ($p = 0,47$), mostrando que o valor de p foi muito próximo ao valor do método de Mann-Whitney ($p < 0,05$) (Tabela 14). Isto indica que entre os implantes 10C e 30C a diferença não foi estatisticamente significativa.

Sá (2005) utilizou compósito cerâmico zircônia-hidroxiapatita em metáfise distal de fêmur de cães, evidenciando algum grau de radiopacidade na interface compósito-cortical aos 30 dias e em 100% aos 120 dias. Em nosso experimento, observamos que tanto com 30 como com 60 dias a radiopacidade foi quase absoluta, possivelmente devido ao comportamento histofisiológico dos coelhos. Este mesmo comportamento também foi observado no trabalho de Filgueira (2012), que utilizou compósito de quitosana-hidroxiapatita em coelhos.

CONCLUSÕES

- Todos os compósitos $Al_2O_3/CaPs$ apresentaram fase majoritária da alumina e segunda fase pirofosfato de cálcio.
- O estudo *in vivo* indicou que o implante na concentração de 10 % de CaPs foi biocompatível.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências de fomento, CNPQ, CAPES/Rede Nanobiotec-Brasil; Inct-INAMI e JHs Biomateriais;

REFERENCIAS

ABRAHAMAS, J. J.; HAYT, M. W.; ROCK, R. Sinus lift procedure the maxilla in patients with inadequate bone for dental implants: radiographic appearance. **American Journal of Roentgenology**, v. 174, p.1289-1292, 2000.

AFFATATO, S.; TADDEI, P.; CARMIGNATO, S.; MODENA, E.; TONI, A. Severe damage of alumina-on-alumina hip implants: Wear assessments at a microscopic level. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 32, p. 3647–3657, 2012.

ANDERSSON, J.; AREVA, S.; SPLIETHOFF, B.; LINDÉN M. Sol-gel synthesis of a multifunctional, hierarchically porous silica/apatite composite. **Biomaterials**, v. 26, p. 6827, 2005.

ANMIN, H.; MING, L.; DALI, M., Preparation and characterization of a titanium-substituted hydroxyapatite photocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 267, p. 79, 2007.

APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; SANTOS, M. L.; GUASTALDI, A. C. Estudo da influência dos íons K^+ , Mg^{2+} , SO_4^{2-} e CO_3^{2-} na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP). **Eclética Química**, v. 30 (4), p. 892-896, 2007.

ARACIL, L.; RODRIGO, D.; ALONSO, A.; BLANCO, J.; SANZ, J. Utilização de osso congelado proveniente de bancos para enxertos prévios à colocação de implantes ósseo -integrados - estudo prospectivo de 3 anos (resultados clínicos e histológicos). In: **Congresso ibérico I.T.I.** Lisboa, 2003.

BARBOSA, Q. O. Áreas Doadoras de enxerto autógeno para reconstruções faciais: Revisão de literatura. Bauru, SP. **Monografia** apresentada ao curso de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial, como parte dos requisitos para obtenção do título de especialista em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial. AHB, APCD, p. 36-7, 2003.

BAUMANN, T. F.; GASH, A. E.; CHINN, S. C.; SAWVEL, A. M.; MAXWELL, R. S.; SATCHER, J. H. Synthesis of high-surface-area alumina aerogels without the use of alkoxide precursors. **Chemistry of Materials**, v. 17, p. 395-401, 2005.

CASTRO, R. H. R. Estudos da influência de aditivos na transformação de gama-alfa da alumina. **Tese (doutorado em Engenharia)** – Universidade de São Paulo, 2005.

CHENG L.; YE, F.; YANG, R.; LU, X.; SHI, Y.; LI, L.; FAN, H.; BU, H. Osteoinduction of hydroxyapatite/beta - tricalcium phosphate bioceramics in mice with a fractured fibula. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 1569–1574, 2010.

CHINELATTO, A. S. A.; PALLONE, E. M. J. A.; TROMBINIC, V. ; TOMASI, R. Influence of heating curve on the sintering of alumina subjected to high-energy milling. **Ceramics International**, v. 34, p. 2121–2127, 2008.

CRUZ, M. Regeneração guiada tecidual. São Paulo: Ed. Santos, 2006.

FERNANDES, A. J. D. Fosfatos de cálcio modificados organicamente com mercaptopropil síntese, caracterização e aplicação. **Dissertação (Mestrado Programa de Pós-Graduação em Química)** - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

GAVRILOVIC, A. L.; PIATTELLI, A.; ABE, K., Nerve growth factor β (NGF β) delivery via a collagen/hydroxyapatite (col/Hap) composite and its effects on new bone ingrowth, **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14, p. 95, 2003.

GINEBRA, M. P.; ESPANOL, M.; MONTUFAR, E. B.; PEREZ, R. A.; MESTRES, G. New processing approaches in calcium phosphate cements and their applications in regenerative medicine. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p.2863–2873, 2010.

GUASTALDI, A. C. e APARECIDA, A. H. Fosfatos de Cálcio de Interesse Biológico: Importância como Biomateriais, Propriedades e Métodos de Obtenção de Recobrimentos: Revisão. **Química Nova**, v. 33(6), p. 1352-1358, 2010.

HIJÓN, N. M.; CABAÑAS, V.; IZQUIERDO-BARBA, I.; GARCÍA, M. A.; VALLET-REGÍ, M. Nanocrystalline bioactive apatite coatings. **Solid State Sciences**, v. 8 (6), p. 685-691, 2006.

KAWACHI, E. Y., BERTRAN, C. A., REIS, R. R., ALVES, O. L., Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química Nova**, v. 23 (4), p. 518-522, 2000.

KRIEGER, S. Biocerâmica. Universidade de São Paulo, v. 2, p. 1-6, 2003.

KUABARA, M. R. Avaliação clínica de enxertos ósseos autógenos de crista ilíaca em maxilas atroficas para instalação de implantes osseointegrados. **Dissertação (mestrado em Odontologia)** - Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2001.

LEE, Y. J.; KO, J. S.; KIM, H. M. The role of cell signaling defects on the proliferation of osteoblasts on the calcium phosphate apatite thin film. **Biomaterials**, v. 27, p. 3738, 2006.

LEGEROS, R. Z. ; LIN, S.; ROHANIZADEH, R.; MIJARES, D.; LEGEROS, J. P. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 14 (3), p. 201-209, 2003.

LEITE, R. B.; ARAÚJO, P.; BATISTA, H.; SANTOS, P.; BEZERRA, D.; COSTA, A. Avaliação da Temperatura de Aquecimento Externo na Síntese por Reação de Combustão para Obtenção da Hidroxiapatita. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 13, n. 2, 2018.

MARX, R. E., SAUNDERS, T. R. Reconstruction and rehabilitation of cancer patients. In: FONSECA, R. J.; DAVIS, W. H., Reconstructive preprosthetic, Oral and Maxillofacial Surgery, Philadelphia: Ed. W. B. Saunders Co., 1986, In: MARZOLA, C.; TOLEDO-FILHO, J. L.; RODRIGUES-SANCHES, M., P. R. Os Enxertos Ósseos e de Biomateriais e os Implantes Osseointegrados. **Revista Brasileira Cirúrgica Implantodontia**, v. 8 (30), p. 126-140, 2001.

MARZOLA, C. Fundamentos de Cirurgia Buco Maxilo Facial. CDR, Bauru: Ed. Independente, 2005.

MORAES, B. S. M. C. Microestrutura e Propriedades Mecânicas de Compósitos Alumina-Zircônia para próteses Dentárias. **Tese (doutorado)**. Curso de Doutorado em Ciência dos Materiais do Instituto Militar de Engenharia, Rio de Janeiro, 2004.

MULLINS, J. E.; OGLE, O. E. Total mandibular reconstruction with cancellous cellular bone graft, allogenic bone crib, and endosseous implants. **Compendium**, v. 22, p. 499 – 506, 2001.

NOELIA L.; D'ELÍA, A.; GRAVINA, N.; RUSO, J. M.; LAIUPPA, J. A. SANTILLÁN, G. E. MESSINA, P. V. Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v.1830, p. 5014-5026, 2013.

PAIVA, P. R. P. Propriedades de Superfície de apatita proveniente de rocha de filtração carbonítica e sua concentração por flotação. **Tese de doutorado**, Universidade de Brasília, 2011.

PEZZOTTI, G.; MUNISSO, M. C.; PORPORATI, A. A.; LESSNAU, K. On the role of oxygen vacancies and lattice strain in the tetragonal to monoclinic transformation in alumina/zirconia composites and improved environmental stability. **Biomaterials**, v. 31 (27), p. 6901-6908, 2010.

PICONI, C.; MACCAURO, G.; MURATORI, F.; BRACH DEL PREVER, E. Alumina and zirconia ceramics in joint replacements. **Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics**, v. 1, p. 19-32, 2003.

PINTO, J. T.; DONÁ, W. Enxerto ósseo autógeno bilateral em seio maxilar, com área doadora intrabucal: relato de caso clínico. **Revista Brasileira de Cirurgia e Implantodontia**, v. 8 (31), p. 216-9, 2001.

PON-ON, W.; CHAROENPHANDHU, N.; TANG, I-M.; JONGWATTANAPISAN, P.; KRISHNAMRA, N.; HOONSAWATF, R. Encapsulation of magnetic CoFe_2O_4 in SiO_2 nanocomposites using hydroxyapatite as templates: A drug delivery system. **Materials Chemistry and Physics**, v. 131, p. 485-494, 2011.

POWERS, M. P., BARKER, H. D. Oral and maxillofacial surgery – reconstructive and implant surgery. Philadelphia: Saunders Company, v. 7, p. 361 - 444, 2000.

RAGHOEBAR, G. M.; SCHORTINGVIS, J.; LIEM, R.S.; RUBEN, J. L.; VAN DER WAL, J. E. VISSINK, A. Does platelet-rich plasma promote remodeling of autologous bone grafts used for augmentation of the maxillary sinus floor? **Clinic Oral Implant Research**, Holanda, v. 16, p. 349-356, 2005.

SEGUNDO, T. K. Avaliação dos enxertos ósseos e homólogos utilizados em implantodontia. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 48 (4), p. 217-22, 2000.

SOTTO MAIOR, B. S. S.; OLIVEIRA, R. G.; FUSARO, B. F.; VIEIRA, F. D. D. Enxerto ósseo autógeno em seio maxilar com implantes imediatos: uma alternativa terapêutica para maxilas atroficas. **Estação Científica**, v. 1, p. 15, 2006.

SPIEKERMANN, Y. M.; BIESTERFELD, S.; EDELHOFF, D. Maxillary sinus augmentation using xenogenic bone substitute material Bio-Ossa in combination with venous blood: a histologic and histomorphometric study in humans. **Clinic Oral Implantologia Research**, v. 11, p. 217-229. 2000.

STUANI, M. B. S. Indução experimental de ossificação com enxerto de hidroxiapatita, osso liofilizado e autógeno. (**Tese de Doutorado**). Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. Universidade Federal do Rio de Janeiro; 2000.

SVANBORG, L. M.; HOFFMAN, M.; ANDERSSON, M.; CURRIE, F.; KJELLIN, P.; WENNERBERG, A. The effect of hydroxyapatite nanocrystals on early bone formation surrounding dental implants. **International Journal Oral Maxillo Facial Surgeons**, v. 40, p. 308 – 315, 2011.

TAGA, R.; CESTARI, T. M.; TAGA, E. M.; TAVANO, O. ; GRANJEIRO, J. M. Evolução de enxertos ósseos autógenos e alógenos colocados em defeitos ósseos de tamanho crítico em calvária de cobaias. **Revista Brasileira de Cirurgia Implantodontia**, v. 7 (26), p. 37, 2000.

TAN, F.; NACIRI, M.; DOWLING, D.; AL –RUBEAI, MOHAME. *In vitro* and *in vivo* bioactivity of CoBlast hydroxyapatite coating and the effect of impaction on its osteoconductivity. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 352-362, 2012.

VANDERSCHOOT, P. Treatment Options and Development of a Vertebral Replacement. Implant, **Tese de Doutorado**. Holanda: Universidade Católica de Leuven, 2002.

WIJESINGHE, W.P.S.L.; MANTILAKA, M.M.M.G.P.G.; PREMALAR, E.V.A.; HERATH, H.M.T.U.; MAHALINGAM, S.; EDIRISINGHE, M.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; RAJAPAKSE, R.M.G. Facile synthesis of both needle-like and spherical hydroxyapatite nanoparticles: Effect of synthetic temperature and calcination on morphology, crystallite size and crystallinity. **Materials Science and Engineering: C**, v.42, p.83-90, 2014.

WONG, J. Y., BRONZINO, J. D. Biomaterials, Publisher: CRC Press, 2007.