

CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE GRÂNULOS DE HIDROXIAPATITAS
COMERCIAIS UTILIZADOS EM ENXERTOS ÓSSEOS

Márcio Baltazar Conz

TESE SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DA COORDENAÇÃO DO PROGRAMA
DE PÓS-GRADUAÇÃO DE ENGENHARIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO
DE JANEIRO COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A
OBTENÇÃO DE GRAU DE MESTRE EM ENGENHARIA METALÚRGICA E DE
MATERIAIS.

Aprovado por:

Glória de Almeida Soares, D. Sc

Ericksson Rocha e Almendra, D. Sc

José Mauro Granjeiro, D.Sc

Nilce Carbonel Campos da Rocha, D. Sc

RIO DE JANEIRO, RJ – BRASIL

JUNHO DE 2003

CONZ, MÁRCIO BALTAZAR

Caracterização *in vitro* de grânulos de hidroxiapatitas comerciais utilizados em enxertos ósseos.[Rio de Janeiro] 2003

IX, 94 p, 29,7cm (COPPE/UFRJ, M.Sc., Engenharia Metalúrgica e de Materiais, 2003)

Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE.

1. Caracterização
2. Enxertos ósseos
3. Hidroxiapatita

I. COPPE/UFRJ II. Título (série).

Aos meus pais e irmã, pela educação,
carinho e incentivo aos meus estudos,
a minha eterna gratidão.

À minha esposa, pelo apoio,
compreensão e amor no dia a dia.

AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar os meus caminhos na estrada da vida.

À Dra. Glória Almeida Soares, pela sua valiosa dedicação e orientação neste trabalho, pela confiança depositada em mim, por sua amizade e acima de tudo por sempre me incentivar ao aprendizado.

Ao Dr. Guaracilei Maciel Vidigal Jr., o responsável por este momento estar acontecendo, meu incentivador, meu mestre e acima de tudo um grande amigo, divido a felicidade por mais esta conquista em minha vida.

A Dra. Mônica Calixto de Andrade pela orientação na análise dos espectros de Infravermelho.

Aos amigos Jorge, Lídia, Fernandes, Márcia, Renata e Paola pela colaboração na pesquisa, pelas sugestões enriquecedoras, pelas críticas e pela amizade formada neste período.

Aos amigos Márcio Martins, Oldemar e Rupert da disciplina de implantologia oral - UNIGRANRIO pelo apoio, amizade e incentivo à realização deste trabalho.

Ao amigo Dr. Edson Jorge Lima Moreira pela valiosa contribuição na revisão ortográfica e gramatical deste trabalho.

Ao CETEM/MCT e em particular as Dr^{as}. Marisa Monte e à engenheira Antonieta, pela execução dos espectros de infravermelho e análise da área superficial específica (BET).

Ao INT e em particular à Dra. Mareai Varella pelo acesso ao analisador de partículas a laser.

Ao NUCAT/UFRJ pela execução dos espectros de Raios-x das amostras.

Aos amigos professores do Curso de especialização em implantologia oral da UNIGRANRIO pelo incentivo e solidariedade.

Às empresas PROLINE, GENIUS e INTRA-LOCK que forneceram os materiais para a elaboração deste trabalho.

Aos agentes financiadores deste trabalho: CAPES, CNPq, FAPERJ e FUJB.

Resumo da Tese apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de mestre em ciências (M.Sc.)

**CARACTERIZAÇÃO *IN VITRO* DE GRÂNULOS DE HIDROXIAPATITA
COMERCIAIS UTILIZADOS EM ENXERTOS ÓSSEOS.**

Márcio Baltazar Conz / Junho-2003

Orientador: Glória de Almeida Soares

Programa : Engenharia Metalúrgica e de Materiais

Os materiais à base de fosfato de cálcio são amplamente utilizados como materiais de enxertos ósseos na forma de blocos ou grânulos. O comportamento *in vivo* destes materiais é altamente dependente de suas características que pode ser estimado por testes *in vitro*. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar seis materiais de enxertos ósseos comercializados como hidroxiapatitas (HAs) absorvível e não-absorvível. A caracterização englobou a análise em microscopia eletrônica (MEV e MET), difração de Raios-X (DRX), Infravermelho (IV) e determinação da área superficial específica. Os testes *in vitro* foram feitos por meio de imersão dos grânulos em solução TRIS e solução simuladora de fluido corpóreo (SFC) por sete dias. O resultado demonstrou que todos os materiais eram constituídos de hidroxiapatita (HA) com diferentes níveis de incorporação de carbonatos, diferentes faixas granulométricas, área de superfície variando de 0,76 a 84,54 m²/g e cristalinidade variando de 30% a 92,3%. Os principais parâmetros que devem ser controlados por afetar as repostas *in vitro e in vivo* das hidroxiapatitas são: a cristalinidade, a área superficial específica e a composição química. O teste de degradação utilizando solução TRIS pode ser relevante para quantificar a degradação dos produtos, permitindo a classificação do material ser menos, ou mais, absorvível.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science (M.Sc.)

***IN VITRO* CHARACTERIZATION OF SIX HYDROXYAPATITE GRANULES
COMMERCIAL FOR APPLICATIONS AS BONE GRAFT.**

Márcio Baltazar Conz / Junho-2003

Advisor: Gloria de Almeida Soares

Department: Metallurgical and Materials Engineering

Calcium phosphate based materials are widely used as bone graft in block or granules form. The *in vivo* behavior of these materials is highly dependent on materials characteristics and can be estimated through the use of *in vitro* tests. The aim of this work was to characterize six commercial granules with different resorption levels. Characterization was carried out by using electron microscopy (SEM and TEM), x-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FT-IR) and measurement surface area (BET). *In vitro* tests were carried out through the immersion of the granules on TRIS solution and simulated body fluids (SBF) up to seven days. Results shown that all materials were composed by only hydroxyapatite (with different levels of carbonate incorporation), with surface area varying from 0,76 to 84,54 m²/g and crystallinity varying from 30,0 to 92,3%. The major parameters that should be controlled as they affect *in vitro* and *in vivo* response of hydroxyapatite granules are: crystallinity, surface area and composition. The dissolution test using TRIS solution can be relevant for quantification of the degradation products, allowing the classification of the tendency of the material to be more, or less, resorbable.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 TECIDO ÓSSEO	13
2.2 CLASSIFICAÇÃO DOS ENXERTOS ÓSSEOS QUANTO À SUA ORIGEM	16
2.2.1-ENXERTOS AUTÓGENOS	16
2.2.2- ENXERTOS ALÓGENOS	19
2.2.3- ENXERTOS XENÓGENOS	20
2.2.4- ENXERTOS ALOPLÁSTICOS	21
2.3 - MECANISMOS BIOLÓGICOS DE FORMAÇÃO ÓSSEA	23
2.4 - BIOMATERIAIS PARA ENXERTOS ÓSSEOS	24
2.5 - MATERIAIS DE ENXERTO ÓSSEO À BASE DE FOSFATOS DE CÁLCIO	27
2.5.1- HIDROXIAPATITA DE CÁLCIO	32
2.5.2- β -FOSFATO TRICÁLCIO	35
2.6 - TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FOSFATOS DE CÁLCIO	36
2.6.1 - DIFRAÇÃO DE RAIOS-X (DRX)	37
2.6.2 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO - IV	38
2.6.3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV	40
2.6.4 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO - MET	41
2.6.5 - ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA – BET	41
2.6.6 – TESTES <i>IN VITRO</i>	43
A- TESTE DE DEGRADAÇÃO	43
B- TESTES EM SOLUÇÕES SIMULADORAS DE FLUIDOS CORPÓREOS (SFC)	44
3. - MATERIAIS E MÉTODOS	46

3.1 - MATERIAIS	46
3.2 - METODOLOGIA	50
3.2.1- MORFOLOGIA	50
3.2.2- COMPOSIÇÃO DAS AMOSTRAS	51
3.2.3- ÁREA SUPERFICIAL ESPECÍFICA	52
3.2.4- DEGRADAÇÃO	53
3.2.5- BIOATIVIDADE	53
4. - RESULTADOS	55
5. - DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	75
6. - CONCLUSÕES	84
7. - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

1 – INTRODUÇÃO

Os tratamentos regenerativos dos defeitos ósseos podem apresentar dois tipos de resultados: o reparo que é caracterizado pela cicatrização da ferida por um tipo de tecido que difere do tecido original, no que diz respeito à morfologia e função, e a regeneração no qual a cicatrização ocorre por um tecido idêntico ao tecido original preexistente (LINDHE et al., 1999). A previsibilidade dos tratamentos para a regeneração do tecido ósseo perdido depende de vários fatores como a técnica cirúrgica utilizada, assepsia, topografia e extensão do defeito ósseo, vascularização e do material de enxerto utilizado (MISCH, 1999). A utilização de enxertos na odontologia teve um grande avanço na última década com o desenvolvimento dos biomateriais, que se tornaram indispensáveis para os profissionais que atuam nas áreas de cirurgia bucomaxilofacial, periodontia, cirurgia paraendodôntica, cirurgia ortognática e implantodontia. Apesar do tecido ósseo ter um grande potencial de auto-regeneração e poder restaurar por completo a sua estrutura e funções originais, os defeitos ósseos podem ocorrer (LINDHE et al., 1999). Os biomateriais utilizados para restabelecer ou aumentar os tecidos biológicos devem apresentar propriedades físicas, químicas, biomecânicas e biológicas apropriadas para serem utilizados em pacientes, após testados em laboratórios e em animais. Estes materiais ganharam aceitação e são utilizados para aplicações médico-odontológicas em regeneração, aumento ou substituição de tecido ósseo. As aplicações odontológicas dos materiais de enxerto ósseo incluem preenchimento de defeitos periodontais, aumento de rebordo alveolar, implantes imediatos após exodontia, reconstrução maxilofacial, preenchimento de alvéolos após exodontia e fenestração ou deiscência associadas à instalação de implantes orais (LEGEROS et al. 1995).

Os materiais de enxertos utilizados podem ser classificados quanto à sua origem em enxerto autógeno (do próprio indivíduo), alógeno (de indivíduos diferentes da mesma espécie), xenógeno (de espécie diferente) e aloplástico (sintéticos) (MISCH, 1999). Estes materiais apresentam diferentes características e quando utilizados podem promover a formação óssea pelos seguintes mecanismos:

Osteogênese - refere-se à regeneração do tecido ósseo promovida pelas células que foram transferidas junto ao enxerto transplantado.

Osseoindução - envolve uma formação do tecido ósseo promovida pelas proteínas ósseas morfogenéticas encontradas nos materiais de enxertos, que estimulam as células mesenquimais a se diferenciarem em osteoblastos.

Osseocondução - caracteriza-se pelo crescimento ósseo na matriz do material de enxerto utilizado, que atua como um arcabouço para a regeneração óssea (BURG et al., 2000).

O material autógeno tem sido preferido pelos profissionais devido às suas excelentes propriedades osteogênicas, porém há limitações quanto ao seu uso no que diz respeito à morbidade do sítio doador, problemas de reabsorção durante a cicatrização, problemas estruturais e anatômicos. Os materiais alógeno e xenógeno apresentam como desvantagens a possibilidade de contaminação por vírus e bactérias ou ainda outros problemas antigênicos, além disso, sua composição e suas propriedades podem variar consideravelmente dentro de uma população, sendo de difícil controle. Materiais sintéticos podem ser uma boa opção para uso como enxertos.

Existe hoje uma preocupação direcionada à utilização de materiais de enxertos ósseos sintéticos, incluindo hidroxiapatita (HA), fosfato tricálcio (TCP) e biovidros cerâmicos (BG) (DUCHEYNE & QIU., 1999; LORENZO et al., 2001 e KOKUBO et al. 2003). Variações na composição e cristalinidade em materiais à base de fosfatos de cálcio foram observadas de um fabricante para outro e algumas vezes em diferentes lotes do mesmo fabricante (LEGEROS et al., 1995). Essas variações decorrentes da falta de controle na fabricação dos materiais de enxertos ósseos sintéticos, como grau de degradação, composição química, granulometria, densidade do material, dentre outras, afetam diretamente o resultado clínico, tornando-se um fator limitante para sua utilização. No Brasil a comercialização dos materiais de enxertos ocorre sem que haja um controle adequado de fabricação por um órgão específico, por não existirem normas que definam critérios para a avaliação desses materiais.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar seis (6) materiais para enxertos ósseos comerciais utilizados na odontologia. A caracterização englobou a análise granulométrica através do peneiramento do material e a análise granulométrica a laser, razão molar Ca/P, forma das partículas através de MEV e MET, cristalinidade, área superficial específica de amostra (BET), a identificação e quantificação de fases presentes pela difração de raios-x e Infravermelho e a correlação destas fases com os resultados dos testes de degradação e bioatividade.

2 – REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Tecido ósseo

O osso é um tecido conjuntivo especializado, caracterizado pela calcificação de sua matriz óssea (LINDHE et al., 1999). O tecido ósseo pode ser formado pelo processo chamado de ossificação **intramembranosa**, que ocorre no interior de uma membrana conjuntiva, onde as células mesenquimais se diferenciam em osteoblastos para iniciar a formação do osso. Este processo é formador dos ossos frontal, parietal, parte do occipital, temporal, maxila e mandíbula. O outro processo formador do tecido ósseo é a ossificação **endocondral**, que se inicia sobre um molde cartilaginoso, o qual é destruído gradualmente e substituído por tecido ósseo que se forma a partir de células do tecido conjuntivo adjacente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1982).

A estrutura óssea macroscópica é de um tecido ósseo **cortical** ou osso compacto denso que envolve um tecido ósseo **esponjoso** ou osso trabecular (GARG, 1999).

Histologicamente existem quatro tipos de tecido ósseo: o **osso primário** é um tecido altamente celular que é formado rapidamente em resposta ao crescimento ou injúria (30 a 50 $\mu\text{m}/\text{dia}$ ou mais), contendo um baixo conteúdo mineral e altamente desorganizado, com as fibras colágenas dispostas em várias direções e que será substituído gradativamente pelo osso secundário. Este osso tem baixa resistência biomecânica. O **osso secundário** é o componente predominante do osso cortical e medular maduro. Nos adultos as fibras colágenas (colágeno tipo I) organizadas em lamelas de 3 a 7 μm de espessura, que ou ficam paralelas umas às outras, ou se

dispõem em camadas concêntricas em torno de canais com vasos, formando os sistemas de Harvers ou Ósteon. Estes sistemas de Harvers se intercomunicam através dos canais de Volkmann (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1982). As fibras colágenas são formadas relativamente devagar ($< 1.0 \mu\text{m}/\text{dia}$), tendo uma matriz altamente organizada e densamente mineralizada pela deposição de íons fosfato e cálcio que formam cristais de hidroxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (MISCH, 1999). O **osso fasciculado** é característico das inserções de ligamentos e tendões e o **osso composto** é caracterizado pela deposição do osso lamelar sobre a matriz do osso primário (MISCH, 1999), sendo um termo utilizado para descrever a transição entre o osso primário e o osso secundário (GARG, 1999). Todos os ossos são revestidos em suas superfícies externas e internas por membranas conjuntivas que possuem células osteogênicas, o **periósteo** e o **endósseo**, respectivamente (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1982). O periósteo é formado por tecido conjuntivo denso, muito fibroso em sua parte externa e rico em células e vasos sanguíneos na porção interna junto ao tecido ósseo. As células do periósteo apresentam morfologia semelhante á dos fibroblastos, transformam-se facilmente em osteoblastos e têm papel fundamental no crescimento e regeneração do tecido ósseo. Os vasos sanguíneos do periósteo se ramificam e penetram nos ossos através dos canais da matriz. O endósseo é geralmente constituído por uma camada de células osteogênicas achatadas revestindo as cavidades do osso esponjoso, o canal medular, os canais de Harvers e os de Volkmann.

As células do tecido ósseo são: 1. Os **osteoblastos** que são as células que sintetizam a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) da matriz óssea. Estão relacionados com o metabolismo ósseo e sua fisiologia. Esta matriz óssea, recém-formada, adjacente aos osteoblastos ativos e que ainda não está

calcificada recebe o nome de **osteóide** ; 2. Os **osteócitos** que aparecem quando os osteoblastos são envoltos pela matriz óssea e se situam em cavidades ou lacunas no interior desta matriz calcificada; 3. Os **osteoclastos** derivados dos monócitos do sangue são células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem a matriz mineralizada do tecido ósseo, participando dos processos de remodelação e reabsorção dos ossos (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1982).

Ao nível molecular o osso é um material composto apresentando uma parte **orgânica** que representa cerca de 35% da matriz óssea sendo formada por fibras colágenas (95%), constituída de colágeno tipo I e por pequena quantidade de substância fundamental amorfa, que contém agregados de proteoglicanas e glicoproteínas (osteocalcina e sialoproteína) (GARG, 1999 e JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1982). A parte **inorgânica** corresponde a 65% do peso ósseo, onde os minerais são encontrados predominantemente na forma de cristais de fosfato de cálcio com a estrutura da hidroxiapatita com a seguinte composição: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ (LYNCH et al., 1999). Esses cristais se arranjam ao longo das fibrilas colágenas e são envolvidos por substância fundamental amorfa. A associação da hidroxiapatita com as fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência do tecido ósseo. (JUNQUEIRA & CARNEIRO, 1982).

W. F. Newman e M. W. Newman (1958) descreveram a fórmula química do principal componente do tecido ósseo: $[\text{Ca}_9\text{H}_3\text{O}_2(\text{PO}_4)_6] - [\text{Ca}, \text{Mg}_{0.3}, \text{Na}_{0.3}, \text{CO}_3, \text{Citrato}_{0.3}]$, porém esta fórmula não é exata para a apatita do tecido ósseo onde a composição química da apatita óssea varia de acordo com a espécie, idade e das diferentes regiões do esqueleto. A razão molar Ca/P aumenta com a idade, chegando próximo a 1.67. O tamanho dos cristais das apatitas biológicas é bem pequeno,

menor que 0,2 μ m. Os resultados de difração de raios-X, espectroscopia de infravermelho e análise química demonstraram que as apatitas biológicas são compostas principalmente de hidroxiapatita, onde o tamanho dos cristais variam de 350 a 650 nm (AOKI, 1994, DALCONI et al., 2003).

2.2 - Classificação dos enxertos ósseos quanto à sua origem:

Os materiais de enxertos ósseos podem ser classificados quanto à sua origem em:

2.2.1 - Enxertos ósseos autógenos

É um enxerto ósseo retirado do próprio paciente, onde o processo de cicatrização do defeito ósseo ocorre por meio de mecanismos chamados de osteogênese, osseoindução e osseocondução (GARG, 1999, MISCH, 1999 e TOTH et al, 1995). A primeira opção em materiais de enxertos ósseos seria a utilização do osso autógeno, por ser um material orgânico e seu emprego fundamentado no transplante de células ósseas vivas para a região receptora junto com a matriz óssea autógena . Este tipo de enxerto pode ser de osso cortical, osso medular ou da associação de ambos. O mais eficiente é o enxerto de osso medular que fornece uma maior quantidade de células ósseas junto ao enxerto (MISCH, 1999). O enxerto autógeno pode ser retirado tanto de áreas extra-orais, como crista ilíaca, tíbia, calota craniana, quanto da área intra-oral como região retro molar, sínfise mandibular e tuberosidade maxilar (GARG, 1999, MISCH, 1999). O sítio a ser escolhido depende da quantidade em volume e do tipo de enxerto desejado para a cirurgia em questão. Uma vez retirado o enxerto ósseo autógeno, este deve ser utilizado imediatamente ou armazenado em solução salina ou solução lactada de Ringer's para a manutenção da vitalidade celular. A

água destilada é contra indicada para o armazenamento do enxerto devido a sua hipotonicidade que resultará na lise celular (MISCH, 1999). Segundo MISCH (1999), o mecanismo de crescimento ósseo do enxerto de osso autógeno inclui três fases: As células ósseas vivas transplantadas junto ao enxerto sobrevivem dentro de 3 a 4 dias por meio da nutrição do tecido vascular ao redor do enxerto. Os osteoblastos presentes no osso medular que sobreviverão ao processo do transplante serão os responsáveis pela proliferação e formação do tecido osteóide. Esse processo osteogênico, chamado de fase 1, ocorre em 4 semanas, e está relacionado à densidade celular do enxerto ósseo autógeno transplantado, que ditará a quantidade do novo tecido ósseo que irá se formar. Na fase 2, ocorre o processo de osseoindução estimulado pelas proteínas ósseas morfogenéticas e fatores de crescimento ósseo encontrados nos derivados do enxerto. Esta fase se inicia em 2 semanas e permanece até 6 meses após a colocação do enxerto. A fase 3 é caracterizada pelo processo de osseocondução, no qual a matriz inorgânica do enxerto ósseo se comporta como uma matriz ocupando o espaço, servindo como um arcabouço, a ser preenchido pelo novo tecido ósseo formado. TOTH et al. (1995), relataram que os materiais de enxertos autógenos são freqüentemente os preferidos por várias razões, dentre elas: por ser um material biocompatível, não imunogênico e retirado do próprio indivíduo; não transmite doenças; e apresenta grande potencial osteogênico das células transplantadas. Devido à atividade osteogênica celular existente nos enxertos autógenos, estes apresentam vantagens sobre os enxertos ósseos alógenos e aloplásticos. BECKER et al. (1994^A), avaliaram a regeneração dos defeitos ósseos associados aos implantes instalados em mandíbulas de cães, comparando os resultados dos seguintes tratamentos: utilização de membrana (Gore-Tex), osso liofilizado + membrana, osso autógeno + membrana e um grupo controle que não

recebeu nenhum tratamento. Os cães foram sacrificados após 12 semanas e os resultados demonstraram que a utilização do osso autógeno + membrana apresentaram os melhores resultados com 95% dos defeitos preenchidos, contra 80% do grupo com apenas membrana, 75% do grupo com osso liofilizado desmineralizado e 37% do grupo controle. BEHNEKE et al. (2000), após avaliarem o tratamento de defeitos perimplantares em 17 pacientes utilizando enxertos ósseos autógenos por um período entre 6 meses e 3 anos, verificaram um preenchimento de 90% dos defeitos preexistentes. BECKER et al. (1994^B), compararam a capacidade de regeneração de dois diferentes materiais de enxertos ósseos (osso liofilizado desmineralizado e osso autógeno) colocados em 14 alvéolos dentários humanos após extração. Foram realizadas biópsias no período que variou entre 3 e 13 meses, e os resultados demonstraram que nos sítios com osso autógeno foi observado a presença de canais vasculares, a presença de osso primário e osso secundário, ao passo que nos sítios enxertados com osso liofilizado não se observou evidência de nova formação óssea na superfície das partículas implantadas. TOTH (1995), relatou que embora o osso autógeno ofereça vantagens em relação aos outros tipos de enxertos ósseos, esses apresentam algumas desvantagens e limitações como: nos casos de enxertos extra orais estes necessitam de hospitalização do paciente, morbidade do sítio doador, cicatriz e desconforto pós-operatórios; já os sítios intra-orais resultam em uma morbidade do paciente, necessita de um segundo sítio para ser operado e existe um limite da quantidade de material de enxerto ósseo autógeno a ser retirado (GARG, 1999). Tais desvantagens levaram ao desenvolvimento dos materiais de enxertos ósseos alternativos como os alógenos, xenógenos e aloplásticos.

2.2.2 - Enxertos ósseos Alógenos

Os enxertos alógenos são obtidos dos tecidos ósseos de cadáveres humanos ou de doadores vivos que são processados em condições de esterilidade e armazenados com várias formas e tamanhos nos bancos de ossos humanos. Esses apresentam capacidade osseointegradora, transformando o tecido conjuntivo em tecido ósseo endocondral. A possibilidade de induzir crescimento ósseo com enxertos alógenos é o resultado da ação das proteínas ósseas morfogenéticas, que são responsáveis pela diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em células precursoras do tecido ósseo (LINDHE et al., 1999). As vantagens da utilização dos materiais alógenos são eliminar a necessidade de um sítio doador, tempo de cirurgia e quantidade de anestésicos menores que os necessários para os enxertos autógenos, sangramento menor, quantidade de enxerto ilimitada e menores complicações cirúrgicas. A desvantagem está associada à utilização de um tecido de outro indivíduo e com isto a probabilidade de transmissão de doenças deve ser considerada. Os enxertos alógenos podem ser comercializados nas seguintes formas; congelados, liofilizados (congelados e secos), liofilizado desmineralizado e irradiados (GARG, 1999). O osso transplantado induz uma resposta imune do hospedeiro, sendo que os enxertos alógenos congelados são considerados os mais antigênicos e por isto são pouco utilizados (MISCH, 1999). O processo para formar o osso liofilizado se inicia pela retirada de osso cortical e medular do doador seguindo o processo de lavagem em água destilada e particulando o osso em tamanhos que variam de 500 µm a 5 µm. Em seguida o osso é imerso em 100% de etanol para remoção de gorduras, congelado em nitrogênio, seco, esterilizado em óxido de etileno ou irradiado e posteriormente armazenado. O osso desmineralizado é processado com um passo adicional, onde a desmineralização das partículas é feita

em 0,6M de ácido clorídrico ou nítrico de 6 a 16 horas (ROBERTS, 1987). O osso alógeno remanescente após os processamentos apresenta fatores de crescimento osseoindutivos necessários para a formação óssea, incluindo as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs), que não são solúveis em ácidos (URIST, 1965 e MISCH, 1999). A utilização de osso irradiado apresenta controvérsias pela falta de referências à sua segurança e eficiência no que diz respeito à manutenção das propriedades osseoindutivas nos processos biológicos regenerativos (GARG, 1999).

2.2.2 - Enxertos ósseos Xenógenos

Estes enxertos ósseos são caracterizados por serem retirados de uma espécie diferente, do qual o material será utilizado (BAUER & MUSCHLER, 2000). Os enxertos xenógenos são fabricados da porção inorgânica do tecido ósseo, de origem animal, e são classificados como osseocondutores (MISCH, 1999). O tecido ósseo inorgânico de origem bovina é tratado quimicamente para a remoção do seu conteúdo orgânico. Assim, após esterilizado o material xenógeno pode ser utilizado como material de enxerto ósseo sem causar uma resposta imune no hospedeiro (GARG, 1999). Segundo BAUER & MUSCHLER (2000), a presença de uma vigorosa resposta imune do hospedeiro após a colocação do enxerto limita a utilização de vários enxertos xenógenos preparados. São exemplos de materiais xenógenos disponíveis no mercado o Bio-Oss (Geistlich Biomaterials, Switzerland), Osso bovino mineralizado e Osteograf /N300 (hidroxiapatita natural, de origem bovina, microporosa). Os microporos são menores do que 5µm em diâmetro, o que permitem a reabsorção mediada por células e a presença de uma fase carbonatada facilita a reabsorção mediada por solução. Os enxertos xenógenos são indicados para

vários tratamentos regenerativos, incluindo defeitos ósseos, defeitos periodontais, fenestrações e deiscência ósseas ao redor de implantes, levantamento de seio maxilar, regeneração óssea guiada, severa reabsorção da maxila ou mandíbula e implantes imediatos após extração. (GARG, 1999 e MISCH 1999). Segundo CALLAN & ROHRER (1993), as vantagens da utilização dos enxertos xenógenos são as seguintes: não há necessidade de um sítio doador no paciente, quantidade ilimitada de material disponível, material de fácil manipulação e os resultados são previsíveis quando respeitados os princípios cirúrgicos como, ambiente estéril e manipulação correta, segundo as orientações do fabricante. As desvantagens da utilização dos enxertos de origem bovina são a possibilidade de transmissão de doenças e a reação imune do hospedeiro ao material implantado, em casos onde o enxerto apresente remanescentes de matriz orgânica, o que diminui a aceitação da utilização destes materiais pelos pacientes e pelos profissionais.

2.2.4 - Enxertos ósseos aloplásticos

As limitações e dificuldades existentes para a obtenção de enxertos ósseos autógenos, como desconforto pós operatório do paciente, morbidade do sítio doador, limitação da quantidade de enxerto, dentre outras e a possibilidade de transmissão de doenças dos enxertos alógenos ou xenógenos levaram os pesquisadores a desenvolverem os materiais aloplásticos para auxiliar na regeneração do tecido ósseo perdido (YAMAMOTO, 1994). Os materiais sintéticos utilizados na regeneração óssea incluem os materiais ósseos porosos derivados de origem bovina, as cerâmicas de fosfato de cálcio sintéticas (HA - hidroxiapatita de cálcio e TCP – fosfato tricálcio), carbonato de cálcio, polímeros para substituição de tecidos duros (HTR),

biovidros cerâmicos e como carreadores de fatores de crescimento ósseo, citocinas e proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs). Estes materiais são fabricados com várias texturas, tamanhos e formas. Eles podem ser classificados de acordo com sua porosidade em denso (microporoso) e macroporoso; em relação à sua cristalinidade estes são classificados em cristalinos e amorfos; e em relação à sua solubilidade em materiais absorvíveis e não-absorvíveis (GARG, 1999). O mecanismo de formação óssea associado aos enxertos sintéticos é a osseocondução, caracterizado pelo crescimento ósseo na matriz do material de enxerto utilizado, que atua como um arcabouço para a regeneração do tecido ósseo perdido (BURG, 2000). A forma, a porosidade, a área de superfície e a cristalinidade são propriedades físicas dos materiais, já a composição química, a substituição iônica e as impurezas compõem as propriedades químicas. As propriedades físicas, químicas e biológicas influenciam diretamente na função, na velocidade e extensão do processo de reabsorção do material utilizado (BURG, 2000). A proliferação dos osteoblastos é sensível à textura e à topografia dos materiais de enxertos ósseos, influenciando na diferenciação das células para a formação de um tecido fibroso ou ósseo. O tamanho de partícula, a forma e a textura da sua superfície afetam a adesão, proliferação e o fenótipo celular (DUCHEYNE et al., 1999). Os materiais aloplásticos produzidos para a utilização na regeneração óssea devem apresentar um controle rigoroso na sua fabricação, no que diz respeito às suas propriedades físicas, químicas e mecânicas, a fim de permitir uma resposta celular previsível ao material enxertado (NAGASE, 1999; BEZZI et al. 2003). Os materiais de enxertos ósseos aloplásticos mais utilizados no tratamento de regeneração óssea são os materiais à base de fosfato de cálcio, como as hidroxiapatitas, fosfato tricálcio, β -fosfato tricálcio e o bifosfato de cálcio. A falta de controle e fiscalização dos materiais aloplásticos que são comercializados

transforma-se em uma limitação para a utilização de alguns materiais aloplásticos, no que diz respeito à previsibilidade de resultado no tratamento regenerativo do tecido ósseo perdido.

2.3 - Mecanismos biológicos de formação óssea

Os mecanismos biológicos que formam o princípio básico para a utilização dos enxertos ósseos incluem três processos: osteogênese, osseoindução e osseocondução.

Osteogênese – Ocorre quando os osteoblastos transferidos junto ao material de enxerto promovem o crescimento ósseo (MISCH, 1999). Estes osteoblastos ou as células precursoras dos osteoblastos são transplantados com o material de enxerto para a área receptora, onde formam centros de formação óssea. O osso autógeno intra-oral e extra-oral são exemplos de materiais de enxertos com propriedades osteogênicas. Estes materiais de enxertos ósseos são capazes de formar tecido ósseo mesmo na ausência de células mesenquimais indiferenciadas (LINDHE et al., 1999).

Osseoindução – Envolve a formação de um novo tecido ósseo pela diferenciação local das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos sobre a influência de um ou mais agentes indutores, como as proteínas ósseas morfogenéticas (BMP) (LINDHE et al., 1999). Os materiais osseoindutores contribuem mais eficientemente para a formação do tecido ósseo durante o processo de remodelamento ósseo. Os materiais osteoindutivos mais utilizados são o osso alógeno e o osso autógeno. Os enxertos alógenos são obtidos através de cadáveres, são processados de várias formas e tamanhos diferentes, e armazenados em bancos de ossos (MISCH, 1999). Como

exemplos de materiais osseointegrativos temos os ossos congelados, irradiados, liofilizados e liofilizados-desmineralizados.

Osseointegração – Ocorre quando a superfície do material de enxerto serve como um arcabouço para o crescimento de células precursoras de osteoblastos no interior do defeito (BAUER & MUSCHLER, 2000 , GATTI et al 2001) . O osso cortical autógeno ou alógeno de banco de ossos pode ser citado como exemplos de materiais com propriedades osseointegrativas (LINDHE et al., 1999). Outros materiais osseointegrativos utilizados são os materiais aloplásticos ou sintéticos, podendo ser classificados como cerâmicas, polímeros ou compósitos (GARG, 1999).

2.4 - Biomateriais para enxertos ósseos

Biomateriais são materiais de origem sintética ou natural, que podem ser utilizados com o objetivo de tratar, aumentar ou restabelecer a função de qualquer tecido biológico que tenha sido lesionado ou perdido. (HELMUS e TWEDEN, 1995).

Segundo a FDA (Food and Drugs Administration) os requisitos para um material ser considerado biocompatível são: não deve ser tóxico, cancerígeno ou antigênico, não mutagênico, não deve interferir com a cicatrização dos tecidos que foram injuriados durante o ato cirúrgico e os tecidos do hospedeiro devem tolerar as propriedades biomecânicas dos materiais (HELMUS e TWEDEN, 1995). Os enxertos ósseos podem ser utilizados como uma matriz nos procedimentos de regeneração óssea, indicados em aumentos de defeitos ósseos resultantes de cirurgias ou traumas, nos procedimentos para restaurar o tecido ósseo perdido

resultante de doença periodontal ou lesões endodônticas, no preenchimento dos alvéolos de dentes extraídos para preservar a altura e espessura óssea de rebordo alveolar, e em reconstruções de rebordo alveolares atróficos (GARG, 1999). O princípio da regeneração tecidual guiada (RTG) foi introduzido na periodontia por MELCHER (1976), e com isso vários estudos em animais foram realizados demonstrando a previsibilidade da técnica de RTG, onde se utilizam membranas sobre a área lesionada ou sobre os materiais de enxertos como barreiras físicas que excluem células indesejáveis, favorecendo a proliferação das células responsáveis pela regeneração dos tecidos lesionados ou perdidos. Este princípio foi aplicado para a regeneração de defeitos ósseos locais. A presença de uma membrana se torna essencial para a regeneração óssea guiada (ROG), pois permite a ação das células ósseas ou a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em células formadoras de tecido ósseo, eliminando assim a competição com as células do tecido conjuntivo e epitelial (KAY et al., 1997). A manutenção do espaço sob a membrana é um fator importante para permitir que ocorra a regeneração do tecido ósseo perdido (LINDHE et al., 1999). Segundo MISCH 1999, os princípios básicos para a regeneração óssea guiada são: exclusão dos tecidos e células indesejáveis à cicatrização do defeito, criação e manutenção do espaço, proteção do coágulo sanguíneo e estabilização da membrana sobre o defeito ósseo. Os materiais de enxertos ósseos estão sendo utilizados associados aos procedimentos de regeneração óssea guiada com diferentes funções, dependendo do enxerto ósseo utilizado. Segundo TOTH et al. (1995), diferentes materiais de enxertos são utilizados em cirurgias ósseas regenerativas ou corretivas, sendo que cada um destes materiais de enxertos apresentam vantagens e desvantagens na sua aplicação, entretanto, os enxertos ósseos devem apresentar como características:

- 1- ser biocompatível, não ser tóxico, não ser carcinogênico, e não ser mutagênico: o material não deve iniciar uma resposta biológica adversa.
- 2- Exibir propriedades osteogênicas e osteoindutoras, onde o material deve permitir a diferenciação das células mesenquimais indiferenciadas em osteoblastos ativos.
- 3- Não estar contaminado.
- 4- Ser osseocondutor, sendo utilizado como uma matriz para a formação do novo tecido ósseo.
- 5- Apresentar resistência estrutural quando o sítio receber algum tipo de carga.
- 6- Estar disponível em quantidades ilimitadas.
- 7- Ser fácil de esterilização, sem degradar ou alterar a propriedade biológica do material.
- 8- Ser de fácil utilização.
- 9- Ter um custo baixo.
- 10- Fornecer uma resposta biológica apropriada, baseada nas propriedades do material.

As reações teciduais induzidas pela presença de um material estranho em um tecido vivo são diretamente dependentes do tipo tecidual, do método de introdução e do tipo de material introduzido. A reação pode ser negativa e levar à rejeição do material; o material pode levar à formação de um tecido conjuntivo fibroso ao seu redor; ou ele pode, em casos favoráveis, resultar em uma íntima integração entre o tecido e o material ou ser completamente absorvido(MISCH, 1999).

NAGASE (1995) descreveu os tipos de reações biológicas teciduais que podem ocorrer após a introdução dos materiais de enxertos nos tecidos vivos. As possíveis reações são: **reação inflamatória** local que é um mecanismo de defesa do organismo. O mecanismo da reação inflamatória depende das propriedades físicas do material de enxerto como estrutura, tamanho e forma, além da sua composição química; **Reação imune** onde ocorre uma resposta imunológica do hospedeiro em função do material de enxerto utilizado; **Reação mutagênica** dos tecidos em contato com material; **Reação oncogênica**, onde as partículas dos materiais de enxertos produzem uma transformação neoplásica nos tecidos e a **Reação tóxica** do material de enxerto quando em contato com os tecidos, causando a morte celular ao ser introduzido nos tecidos receptores.

HANSON et al. (1996), relataram que os biomateriais devem ser testados e avaliados por meio de normas desenvolvidas por organizações padrões. Assim, a ASTM (American Society for Testing and Materials) e o ISO (International Standards Organization) podem oferecer protocolos detalhados e amplamente aceitos dos procedimentos para teste dos biomateriais. A aplicação dos protocolos e dos testes dos biomateriais devem ser controlados por agências governamentais (Ex: FDA- Food and Drug Administration e ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária) e realizados em laboratórios públicos ou privados, previamente aprovados para esse fim.

2.5 - Materiais de enxertos ósseos à base de fosfato de cálcio

Os biomateriais à base de fosfato de cálcio utilizados como material de enxerto ósseo ou no recobrimento de implantes dentários ou ortopédicos são chamados de materiais bioativos, devido à sua capacidade de participar ativamente no processo de cicatrização e/ou regeneração do tecido ósseo (LEGEROS et al., 1995; FULMERA et al., 2002). A similaridade dos materiais de fosfato de cálcio com as apatitas do tecido ósseo, faz com que estes materiais se comportem como materiais bioativos quando inseridos no tecido ósseo. As apatitas e seus derivados, em particular a hidroxiapatita de cálcio (HA), bem como o fosfato tricálcio e o pirofosfato de cálcio são os principais biomateriais de enxertos ósseos sintéticos que têm sido investigados (TOTH et al., 1995; RODRIGUES-LORENZO et al., 2001). A principal vantagem dos biomateriais de enxertos à base de fosfatos de cálcio utilizados no tecido ósseo é que tanto os íons cálcio quanto os íons fosfatos podem interferir na função celular e fisiológica dos tecidos adjacentes, permitindo assim uma resposta tecidual favorável ao tratamento. Além disso, ao se dissolverem parcialmente no meio fisiológico liberam Ca^{2+} e PO_4^{2-} que parecem atuar, dentro de certos limites, como catalisadores da formação óssea.

Os materiais de enxertos podem apresentar diferentes formas e tamanhos de acordo com as suas preparações e aplicações, podendo ser classificados de acordo com a sua forma em materiais de enxertos particulados; utilizados para o preenchimento de defeitos periodontais e alvéolos dentários, aumento de rebordos alveolares, no auxílio das reconstruções maxilofaciais e associados à instalação de implantes osseointegrados; e materiais pré-modelados, utilizados para a reconstrução de rebordos atróficos e na reconstrução óssea maxilofacial. Os materiais particulados

podem apresentar uma configuração esférica ou irregular de acordo com o método de fabricação (MISCH, 1999). Os materiais à base de fosfato de cálcio (Hidroxiapatita – HA, β -Fosfato tricálcio – β -TCP, ou Fosfato de cálcio bifásico) podem ser preparados nas seguintes formas: denso (microporoso) ou macroporoso. As cerâmicas densas ou microporosas são preparadas pela compactação ou compressão sob alta pressão (20,000 a 30,000 Psi) e sinterizadas em altas temperaturas (1100-1300°C). Uma outra técnica utilizada para a sinterização de cerâmicas densas é a técnica de prensagem isostática a quente (HIP), que resulta em cerâmicas de elevadas densidades, alta resistência à compressão e uma densidade mais uniforme em todas as dimensões do que os outros métodos. O grau de microporosidade depende do método de compactação e da temperatura de sinterização. Hidroxiapatitas densas são descritas como tendo no máximo 5% de porosidade por volume, com a microporosidade de no máximo 1 micrômetro em diâmetro (LEGEROS et al., 1995). Os fosfatos de cálcio macroporosos apresentam poros de 100 μ m a 500 μ m, que compreendem 15% ou mais do volume total do material. Assim, para uma mesma composição, quanto maior a porosidade maior é a velocidade de reabsorção do material de enxerto (MISCH, 1999).

Outra forma de classificar a hidroxiapatita é quanto à sua reabsorção *in vivo*: em HA absorvível indicada em casos de regeneração óssea, onde o material enxertado é substituído por tecido ósseo, como nos procedimentos regenerativos na periodontia e na implantodontia; e HA não-absorvível indicada para procedimentos de reconstrução e plástica dos tecidos lesionados ou perdidos. Sua indicação em casos de cirurgia bucomaxilofacial, cirurgias ortognáticas e cirurgias plásticas de tecidos, visa restaurar os defeitos oriundos de grandes perdas ósseas. Na periodontia e na implantodontia podem ser utilizadas para restabelecer depressões existentes no tecido

gingival decorrentes de perdas ósseas associadas às exodontias ou a tumores que afetam a estética dos pacientes (MISCH, 1999). Na tabela 2.1 são apresentados os principais materiais de enxertos a base de fosfato de cálcio e seus produtos comercializados (LEGEROS et al., 1995):

Tabela 2.1: Produtos comercializados (adaptado de LEGEROS et al, 1995)

Cerâmicas de Fosfatos de cálcio – Sigla	Produtos comerciais
Hidroxiapatita de cálcio – HA $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$	Calcitite, Durapatite, Alveograf, Osteograf, Bioapatite, Himed-HA, Allotropatt, Pro-HA, Gen-phos e etc...
B- Tricálcio fosfato – β -TCP $Ca_3(PO_4)_2$	Synthograf e Augmen.
Fosfato de cálcio bifásico – BCP Mistura de HA / TCP	Triosit (60%HA / 40% β -TCP); Himed –TCP (85%HA / 15%TCP ou 60%HA / 40%TCP)
Fosfatos de cálcio absorvível	Produtos comerciais
Fosfatos de cálcio não sinterizado Ex: Apatitas deficientes em cálcio, Fosfatos de cálcio	Osteogen, Himed – AP,
Fosfatos de cálcio de origem natural	Produtos comerciais
Bancos de ossos humano liofilizado e congelado, Osso humano sinterizado	Bancos de ossos
Osso bovino sinterizado/processado	Produtos comerciais
Osso bovino	Bio-Oss, Osteograf –N

Um modo conveniente de se classificar os compostos de fosfatos de cálcio é por grupos onde a razão molar Ca/P é definida, de acordo com a tabela 2.2:

Tabela 2.2 – Fosfatos de cálcio (AOKI, 1994; BROWN, 1993)

Ca/P	Fórmula	Nome	Abreviação
2.0	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tetracálcio	<i>TTCP</i>
1.67	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$	Hidroxiapatita	<i>HA</i>
	$\text{Ca}_{10-x}\text{H}_{2x}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$	Fosfato de cálcio amorfo	<i>ACP</i>
1.50	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	Fosfato tricálcio (α , β , γ)	<i>TCP</i>
1.33	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Fosfato octacálcio	<i>OCP</i>
1.0	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Hidrogeno Fosfato de cálcio (brushita)	<i>DCPD</i>
1.0	CaHPO_4	Fosfato dicálcio (Monetita)	<i>DCP</i>
1.0	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	Pirofosfato de cálcio hidratado	<i>CPP</i>
0.7	$\text{Ca}_2\text{P}_4\text{O}_{17} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Fosfato heptacálcio	<i>HCP</i>
0.67	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	Fosfato tetracálcio dihidrogenado	<i>TDHP</i>
0.5	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Fosfato de cálcio monohidratado	<i>MCPM</i>

2.5.1 - Hidroxiapatita de cálcio

A hidroxiapatita é o principal componente inorgânico do tecido ósseo e dos dentes. A palavra hidroxi se refere ao íon (OH^-), ao passo que a apatita se refere ao nome do mineral cristalino que apresenta a composição: $\text{M}_{10}(\text{ZO}_4)_6\text{X}_2$

Várias apatitas de diferentes composições podem ser preparadas pela substituição dos elementos da fórmula acima, **M, Z e X**

$\text{M} = \text{Ca, Sr, Ba, Cd, Pb, Mg, Na, K, H, D, etc.}$

$\text{Z} = \text{P, CO}_3, \text{V, As, S, Si, Ge, Cr, B, etc.}$

$\text{X} = \text{OH, CO}_3, \text{O, BO}_2, \text{F, Cl, Br, Vazio, etc.}$

As apatitas minerais são encontradas em quase todas as rochas ígneas, sedimentárias e metamórficas. As apatitas mais comuns são:

Fluorapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}$

Cloroapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{Cl}_2$

Hidroxiapatita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$

Podolita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$

Dailita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6\text{OH}_2$

Francolita - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{F, OH}_2)$

Os cristais de hidroxiapatitas $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}_2$ são formados por centenas ou milhares de unidades, que se mantêm unidas por meio de atrações eletrostáticas dos átomos que as compõem, apresentando os seguintes dados:

Peso molecular: $M = 1004,8$

Sistema cristalino: Hexagonal

Espaçamento de grupo: $P6_3/m$

Parâmetro de rede: $a = 9,423 \text{ nm} / c = 6,875 \text{ nm}$

Numero de unidade química: $Z = 1$

Densidade $D = 3,16 \text{ Kg/m}^3$ (AOKI, 1994)

A estrutura cristalina da hidroxiapatita é apresentada na figura 2.1

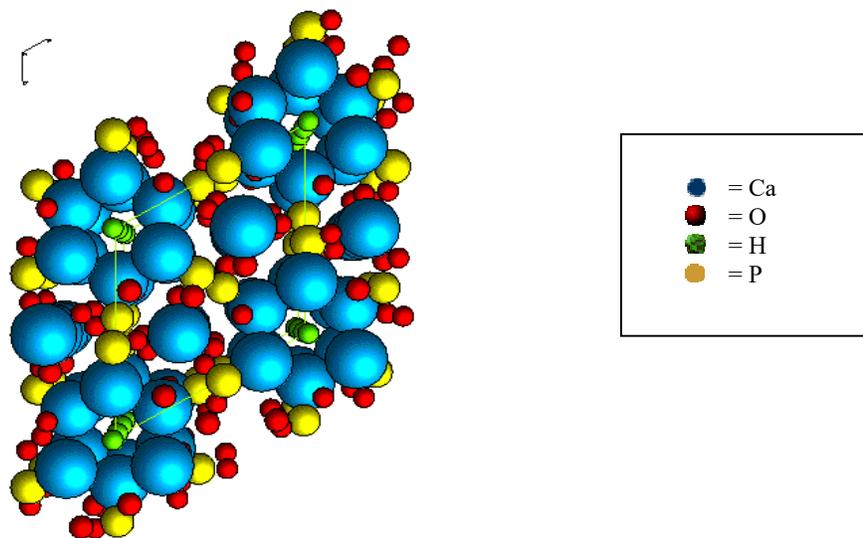
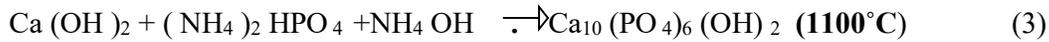
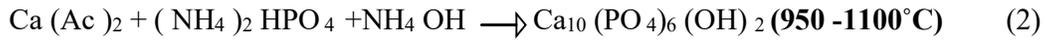
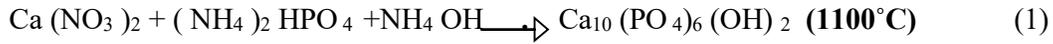


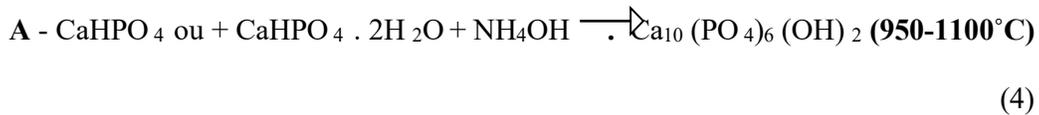
Figura 2.1 – Célula unitária da hidroxiapatita

As cerâmicas de hidroxiapatita de cálcio são usualmente preparadas por precipitação e/ou hidrólise sob condições básicas e subsequentemente sinterizadas

em temperaturas que variam entre 950°C e 1300°C. A precipitação pode ocorrer pelas seguintes reações:



As hidroxiapatitas cerâmicas podem também ser preparadas por meio da sinterização dos produtos da hidrólise do DCPD (fosfato de cálcio dihidratado) ou OCP (fosfato octacálcio) em solução básica e do CaCO_3 em solução de fosfato: (LEGEROS et al., 1995).



Para a obtenção da hidroxiapatita é muito importante o controle do pH e da concentração de cada reagente.

Os principais métodos para a produção das hidroxiapatitas são:

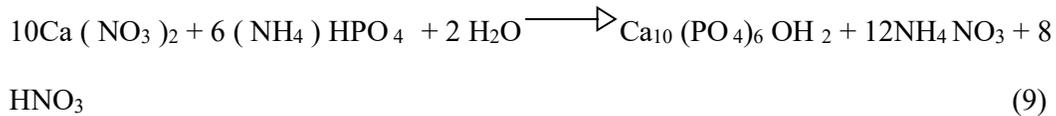
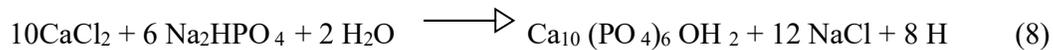
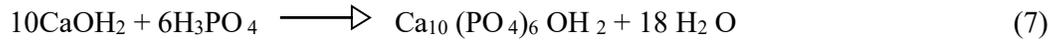
A – Métodos secos

São utilizados para a produção de pó de hidroxiapatita com pequenos cristais ou um material não cristalino. Existem dois tipos de processamento no método seco: Um processo que envolve uma reação neutra de um ácido e uma solução alcalina; e outro envolvendo uma reação dos sais de cálcio e sais de fosfato (AOKI, 1994).



B – Métodos úmidos

Utilizados para preparar hidroxiapatita cristalina por uma reação em estado sólido. O resultado desta reação é uma HA muito fina com elevada cristalinidade. Por exemplo, quando brushita, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, e o carbonato de cálcio são utilizados para a preparação da hidroxiapatita, ocorre a seguinte reação(AOKI, 1994):



A cristalinidade da hidroxiapatita preparada pelo método úmido é melhor do que a preparada pelo método seco.

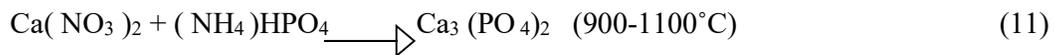
Existem outros métodos de preparação de hidroxiapatita como os métodos secos com homogeneizador ultra-sônico, método hidrotérmico e o método do fluxo (AOKI, 1994).

As propriedades mecânicas dos materiais cerâmicos sinterizados em temperaturas elevadas (1150°C) que apresentam em torno de 20% de porosidades são baixas, pois a resistência dos materiais policristalinos é dependente de fatores como porosidade e

do tamanho do grão. HA sinterizada a 900 °C apresenta uma quantidade maior de defeitos de rede quando comparados com as HA sinterizadas a 1200°C (LEGEROS et al.,1995). Portanto, quanto maior o número de poros existentes no material, menor será a sua resistência mecânica (AOKI, 1994).

2.5.2 β - Fosfato Tricálcico (β -TCP)

O β - Fosfato Tricálcico é um biomaterial indicado no tratamento de regenerações ósseas, para coberturas de implantes e como carreador de produtos orgânicos (MISCH, 1999). Segundo LEGEROS et al. (1995), o β -TCP pode ser obtido a partir da sinterização da apatita deficiente de cálcio (Ca/P = 1.65), pelo método da precipitação ou por hidrólise (reações de 1 a 9), mas sob condições ácida ou neutra, por exemplo:



O fosfato de cálcio cristalino ($\beta\text{Ca}_3[\text{PO}_4]_2$) (β -TCP) é considerado um biomaterial de alta pureza (máximo de < 50 ppm impurezas) em comparação com os outros produtos (MISCH, 1999). Devido ao seu alto grau de solubilidade quando comparado com a hidroxiapatita este material é indicado quando um alto grau de bioatividade é desejado, porém este alto grau de bioatividade pode resultar na reabsorção completa do material, sem que ocorra a deposição de tecido ósseo (BOHNER, 2000). Este é o principal problema para certas aplicações do seu uso, tais como aumento de rebordos atróficos, onde um material absorvível é indicado. As reabsorções precoces deste material nos sítios alveolares podem levar a falha clínica dos procedimentos regenerativos (TOTH et al., 1995). Uma das formas de regular a

degradação dos fosfatos de cálcio é utilizar fosfatos bifásicos, que são compostos de combinações de HA e TCP em diversas razões.

2.6 - Técnicas de caracterização dos fosfatos de cálcio

Uma combinação de técnicas analíticas é recomendada na investigação das propriedades cristalinas dos materiais à base de fosfatos de cálcio. Estas técnicas incluem difração de raios-x (DRX), Espectroscopia de infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET) e experimentos de dissolução que fornecem informações de solubilidade. Cada uma destas técnicas fornece informações específicas com suas limitações, necessitando assim do uso combinado de algumas técnicas para uma caracterização mais precisa e compreensiva do material (LEGEROS et al., 1995).

2.6.1 - Difração de Raios-X (DRX)

O uso das várias técnicas de difração de raios-x está relacionado à emissão de um feixe de raios-x paralelo ao espécime e à reflexão do feixe incidente do espécime. Os raios refletidos se interagem, entretanto, se estes raios não estão em fase eles se destroem e o raio não emerge (SOUTHWORTH, 1975). Este fenômeno pode ser representado pela equação da lei de Bragg: $n\lambda = 2d\sin\theta$

onde:

- λ = comprimento de onda dos raios-x difratados;
- d = espaço entre os planos do cristal;
- θ = ângulo formado entre a superfície do cristal e os raios incidentes e espalhados.

Esta lei determina que $d \sin \theta$ seja um número inteiro, múltiplo do comprimento de onda (λ), para que os raios saiam em coincidência de fase, e se reforcem. Caso n não seja um número inteiro ocorrerá interferência destrutiva e os raios serão absorvidos (apud, MONTEIRO, 2000). A difração de raios-x pode nos fornecer as seguintes informações: fases presentes, desde que a menor fase presente esteja acima de 1%; pureza do material, presença de fase simples ou múltiplas fases; cristalinidade das fases presentes (refletido o tamanho do cristal e ou suas deformações); percentual de cristalinidade (fases cristalinas x amorfas); tamanho e forma aproximada do cristal, aproximada pela dimensão entre a direção a e c; parâmetro de rede das fases cristalinas; diferenças estruturais tais como α vs. β -TCP; e a relação de cada fase (ex. relação β -TCP / HA ou ACP / HA) (LEGEROS et al., 1995).

2.6.2 - Espectroscopia de infravermelho (IV)

A análise de amostras utilizando a técnica de espectroscopia de infravermelho teve início em 1940 nos laboratórios de caracterização orgânica, utilizando técnicas analíticas. O espectrômetro de infravermelho permite observarmos as seguintes características dos materiais analisados: identificação da fase ou da presença de fases; presença de grupos funcionais (ex. CO_3 , PO_4 , OH , P_2O_7 da fase inorgânica; NH_2 , e CO da fase orgânica); e a cristalinidade do material (refletindo sua

crystalinidade) (LEGEROS et al., 1995). Os dados obtidos pela análise do material na espectroscopia de infravermelho complementam os dados observados na difração de raios-x, porque identificam a composição química dos fosfatos de cálcio cristalinos. Enquanto a difração de raios-x pode identificar o fosfato de cálcio, como a apatita, a espectroscopia de infravermelho identifica alguns elementos da sua composição, principalmente a substituição de grupos e a presença dos grupos carbonato e hidroxila (TOTH et al., 1995). A combinação dos dados da análise das amostras no DRX e IV fornecem informações precisas nas substituições encontradas na estrutura da HA ou β -TCP (ex. a substituição do CO_3 nas apatitas biológicas do esmalte, dentina e osso) (LEGEROS et al., 1995).

Na tabela 2.3 são apresentadas as frequências de Infravermelho (cm^{-1}) para a hidroxiapatita $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (Arcn. Oral Biol., Vol 11, pp.477 – 492).

Tabela 2.3: Frequência das principais bandas da hidroxiapatita no Infravermelho

Frequência de Infravermelho	Valor de frequência
3570	Fraco
2140	Muito fraco
2075	Muito fraco
2050	Muito fraco
2000	Muito fraco
1985	Muito fraco
1092	Forte
1040	Muito forte
962	Fraco
631	Médio
601	Médio
575	Médio
561	Médio
472	Muito fraco

2.6.3 – Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura é utilizado geralmente para observações de amostras espessas, ou seja, basicamente não transparentes a elétrons. A razão principal de sua utilização está associada à alta resolução que pode ser atingida, atualmente na ordem de 3,0 nm, e à grande profundidade de foco, da ordem de 300 vezes maior que a do microscópio ótico, resultando em imagens com aparência tridimensional (KESTENBACH & BOTTA FILHO, 1989). Estas imagens são produzidas através da interação inicial de um feixe de elétrons com a amostra, que é mantida sob condições de vácuo. A interpretação de imagens no MEV é mais direta, quando comparada com o MET, devido às similaridades com as imagens observadas com a microscopia ótica; na maioria dos casos, é possível associar diretamente a imagem observada às características superficiais da mesma. Entretanto, isto não significa que as características químicas, físicas ou cristalográficas não afetam o tipo de contraste. Imagens formadas predominantemente por elétrons secundários são as que possibilitam a maior resolução no MEV, e são amplamente utilizadas para analisar as características topográficas da amostra. (KESTENBACH e BOTTA FILHO, 1989).

A análise das amostras pela microscopia eletrônica de varredura permite a descrição da morfologia dos diferentes biomateriais à base de fosfato de cálcio, embora os cristais individuais sejam de difícil visualização (SILVEIRA 1995).

2.6.4 – Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Além do seu grande poder de resolução que hoje atinge a faixa de resolução atômica e, portanto já compete com a resolução de campo iônico, de aplicação mais restrita, o MET oferece mais duas vantagens importantes que são a possibilidade de observar o que existe “por dentro” dos materiais (uma vez que os elétrons que formam a imagem atravessam toda a amostra) e a facilidade de identificação dos detalhes da microestrutura através da técnica de difração (KESTENBACH e BOTTA FILHO, 1989). O poder de resolução do microscópio eletrônico de transmissão atinge hoje valores na faixa de 0,2 nm e permite a observação não apenas de pequenos detalhes morfológicos da microestrutura, mas também da estrutura cristalina dos materiais. A técnica de microscopia eletrônica de transmissão pode ser utilizada para confirmar a informação do tamanho e forma do cristal obtida por DRX, bem como a presença de outras fases que não a hidroxiapatita. O MET também é muito utilizado para demonstrar a formação de pequenos cristais na superfície dos implantes orais recobertos com cerâmicas de fosfato de cálcio (LEGEROS et al., 1995).

2.6.5 – Área superficial específica (BET)

A determinação da área superficial e a porosidade existente nos grânulos dos materiais de enxerto à base de fosfato de cálcio particulado são importantes pelo fato destes parâmetros estarem diretamente relacionados com a solubilização desses materiais. Os átomos localizados na superfície mais externa dos materiais sólidos têm menos vizinhos do que os átomos mais internos e com isto os átomos mais

externos procuram atrair em sua volta moléculas de gases, processo este chamado de sorção gasosa. O monitoramento do processo de sorção gasosa fornece informações úteis para a caracterização de materiais sólidos. A adsorção física (fisiosorção) é o tipo mais comum tipo de adsorção. As moléculas fisioadsorvidas se encontram relativamente livres para moverem-se em volta da superfície da amostra. Com a introdução de mais moléculas de gás no sistema, as moléculas adsorvidas tendem a formar uma camada fina que recobre toda a superfície do material. Baseado na teoria de BRUNAUER, EMMETT e TELLER (BET), pode-se estimar o número de moléculas necessárias para recobrir a superfície do material com uma monocamada de moléculas adsorvidas, N_m . Multiplicando o N_m pela área seccional transversal das moléculas adsorvidas temos a área de superfície da amostra. BRUNAUER, EMMETT e TELLER (BET) – 1938 – expandiram a teoria cinética de Langmuir para a adsorção de moléculas em multicamadas. A teoria BET estabelece que quando uma superfície está recoberta por somente uma camada de adsorvente, existe um equilíbrio entre a camada e o vapor, e onde as duas camadas são adsorvidas; a camada superior está em equilíbrio com o vapor, e assim por diante. O nitrogênio é utilizado como gás (adsorvido) padrão, exibindo usualmente uma propriedade que ocorre em quase todas as superfícies onde a área superficial é suficientemente pequena para impedir a adsorção localizada e ainda é adequadamente grande para impedir que a camada adsorvida se comporte como um gás em duas dimensões. (apud, MONTEIRO, 2002). O sorptômetro BET tem a capacidade de medir a área de superfície total da amostra e avalia, também, a média dos tamanhos, a distribuição, o volume e a estrutura dos poros existentes. (THOMAS e LOWELL, 1992.)

2.6.6 – Testes *in vitro*

A – Teste de degradação

A dissolução é uma característica importante para os biomateriais por influenciar diretamente as propriedades osseointegrativas dos mesmos. A dissolução de um material sólido é contínua até que uma condição de equilíbrio seja alcançada, após a condição saturada, o sólido e o líquido mantêm o equilíbrio. Solubilidade é definida como a máxima concentração de soluto em uma solução em condição de equilíbrio. Este valor depende de fatores relacionados à solução, como tipo e concentração da solução, pH da solução, razão sólido/líquido e de fatores relativos às amostras, como composição química, cristalinidade e área de superfície específica. O grau de porosidade, a presença de defeitos na estrutura, a quantidade e o tipo de fases presentes também afetam a solubilidade do material (LEGEROS et al., 1995; FULMERA et al., 2002). As alterações da posição dos grupos CO_3 na hidroxiapatita também afetam a solubilidade da hidroxiapatita, onde o CO_3 pode substituir tanto a hidroxila (OH) como o grupo fosfato (PO_4), designando-se substituições do tipo A e B, respectivamente. Estas substituições causam efeitos opostos nos parâmetros de rede, nas dimensões do eixo-a e eixo-c. Na substituição do tipo A ocorre uma expansão nas dimensões do eixo-a e contração nas dimensões do eixo-c, ao passo que o oposto é observado na substituição do tipo B. Com as substituições podemos verificar mudanças tanto no tamanho, na forma do cristal da apatita (de cristal acicular para bastões com aumento de carbonatos); bem como nas propriedades de dissolução onde o CO_3 substituído na apatita é inicialmente mais solúvel do que o CO_3 livre na apatita sintética. Outras substituições também alteram a taxa de dissolução das apatitas: ex. Sr – por - Ca ou Mg – por – Ca (LEGEROS, 1993)

Segundo AOKI (1994) a hidroxiapatita é solúvel em condições ácidas, insolúvel em solução alcalina e levemente solúvel em água destilada, com a solubilidade em água destilada aumentando com a adição de eletrólitos. OONISHI e OMAMIUDA (1998), compararam a taxa de dissolução e a taxa de precipitação de cálcio em 6 fosfatos de cálcio imersos em soluções livres de cálcio e fosfato com pH 7,3. A taxa de dissolução aumentou na seguinte ordem: Hap < CDAP < OHAp < β -TCP < α TCP < TTCP e a taxa de precipitação do β -TCP < (HAp e α -TCP) < TTCP. (CDAP – hidroxiapatita deficiente em cálcio, OHAp – hidroxiapatita dihidroxilada).

O protocolo utilizado no presente trabalho foi preconizado pela norma internacional ISO/FDIS 10993-14:2001 para avaliação de materiais médicos (parte 14: Identificação e quantificação da degradação de produtos cerâmicos).

B - Testes em soluções simuladoras de fluido corpóreo (SFC)

Atualmente o simulador de fluido corpóreo (SFC) é utilizado em estudos *in vitro* para avaliar a formação ou precipitação de fosfatos de cálcio (apatitas) na superfície de diferentes tipos de biomateriais. A avaliação da precipitação de apatitas na superfície dos biomateriais tem sido utilizada como um indicador *in vitro* da sua bioatividade, portanto os precipitados de fosfatos de cálcio dos materiais no SFC são usados na prática como um indicador do potencial de aposição óssea dos biomateriais (LI et al, 1996).

O teste de bioatividade pode ser monitorado pela a variação dos teores de Ca e P na solução fisiológica em função do tempo de imersão do material a ser testado (SILVA et al., 1999).

Diversas soluções têm sido empregadas como simuladores de fluido corpóreo, dentre as quais pode-se destacar Hanks, Ringer, Kokubo e Kokubo-modificada. Estas soluções são inorgânicas ou inorgânicas/orgânicas, acelulares ou meios de cultura celular (KIM et al., 2001). A tabela 2.4 apresenta a comparação entre as soluções de Kokubo, Kokubo modificada, utilizadas como simuladoras de fluido corporal (SFC), e o plasma sanguíneo humano:

Tabela 2.4: Soluções simuladoras de fluido corporal e plasma sanguíneo humano (KIM et al., 2001)

Íon	Concentração / mM			
	Kokubo conv.	Kokubo modif.	Plasma	Comparação
Na ⁺	142,0	142,0	142,0	=
K ⁺	5,0	5,0	5,0	=
Mg ²⁺	1,5	1,5	1,5	=
Ca ²⁺	2,5	2,5	2,5	=
Cl ⁻	148,8	103,0	103,0	≠
HCO ₃ ⁻	4,2	27,0	27,0	≠
HPO ₄ ²⁻	1,0	1,0	1,0	=
SO ₄ ²⁻	0,5	0,5	0,5	=

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais

Amostras

Para este estudo foram escolhidos seis materiais particulados à base de fosfato de cálcio comerciais encontrados no mercado nacional. Dentre os materiais empregados, dois são importados (HA-4 e HA-6) e os outros produzidos no Brasil (HA-1, HA-2, HA-3 e HA-5):

HA-1

Segundo o fabricante este material é uma hidroxiapatita sintética na faixa granulométrica menor que $450\mu\text{m}$; é esterilizado em radiação cobalto 60; tem indicação para ser utilizado onde não serão inseridos implantes posteriormente. Os lotes são controlados por laudos emitidos pelo IPEN (Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares). A obtenção da hidroxiapatita sintética é feita por precipitação em soluções aquosas, sínteses hidrotermais ou reações de estado sólido, seguindo as especificações contidas nas normas ASTM F 1088-87 e ASTM F 1185-88 (Especificações padrão para implantação cirúrgica de β -TCP e Hidroxiapatita respectivamente). O fabricante não relata a técnica empregada para a obtenção do material.

HA-2

Hidroxiapatita granular sintética não absorvível. Disponível em frascos com grânulos apresentando diferentes faixas granulométricas : micro – 100 a $250\mu\text{m}$, 250

a 500 μm e 500 a 1000 μm ; e macro – 250 a 1000 μm . Foi utilizada no trabalho a hidroxiapatita micro com faixa granulométrica entre 500 a 1000 μm .

HA-3

Comercializada como hidroxiapatita sintética absorvível utilizada para procedimentos regenerativos do tecido ósseo. Disponível em frascos com grânulos de 250 a 1000 μm . O fabricante não fornece informações adicionais sobre o produto.

HA-4

Segundo o fabricante, é uma forma não cerâmica de hidroxiapatita obtida sinteticamente, sendo reabsorvida pelo organismo humano e indicada para a remodelagem ou incremento de irregularidades no rebordo alveolar; suporte e preenchimento de alvéolos dentais ou lojas císticas. É um material altamente cristalino, comparável ao tecido ósseo sem apresentar β -TCP, α TCP, fases amorfas ou piro-fosfatos inibidores do crescimento ósseo. A forma de ação do produto se baseia na osseocondução durante a reparação óssea, sendo uma matriz lentamente reabsorvida. Disponível em seringas com material particulado de granulometria entre 300 e 400 μm , contendo 0,3g ou frascos com 0,4g.

HA-5

Este material é comercializado como uma hidroxiapatita natural absorvível com faixa granulométrica fina (menor que 450 μm) ou grossa (450 a 750 μm), esterilizado em radiação cobalto 60. São indicadas para correções de defeitos ósseos extensos e

no preenchimento de alvéolos onde se inserirá implantes posteriormente. A expectativa de reabsorção fornecida pelo fabricante é de 5 a 7 meses. Segundo o fabricante a obtenção da hidroxiapatita natural ou imperfeita, se dá a partir da estrutura mineral de osso bovino através de reações no estado sólido, onde as demais fases cristalinas existentes são transformadas em hidroxiapatita de baixa cristalinidade. O processo para a obtenção do material tem o seguinte princípio: Após a obtenção do osso bovino sem tecido muscular, este passa por processo de dissolução e retirada dos compostos fibrocartilagosos, adiposos e demais orgânicos; lavagem e retirada de resíduos não-minerais; e descontaminação dos produtos químicos utilizados nos procedimentos anteriores. Após todo processamento químico ocorre a moagem do material para a obtenção de grânulos, processamento térmico com limpeza por autoclavagem, secagem em estufa, análise química do lote para determinação de impurezas, embalagem do material e esterilização. As análises e os ensaios realizados nas amostras são: de pureza química realizada por espectroscopia de raios-x, cristalinidade por difração de raios-X, e morfologia e tamanho de partículas por microscopia eletrônica.

HA-6

Segundo o fabricante é uma matriz óssea mineral porosa, natural e não antigênica. Obtida após a remoção de todos os componentes orgânicos do osso bovino. Devido à sua estrutura natural, esse material é física e quimicamente comparável à matriz mineral do osso humano, disponível em blocos e também grânulos de osso cortical ou esponjoso. A granulometria do material é de 500 a 1000µm, apresentados em frascos com 0,5g. Está recomendado para o tratamento de aumento ou reconstrução

do rebordo alveolar, preenchimento de defeitos intra-ósseos, preenchimento de alvéolos dentários para preservação do rebordo alveolar, elevação do seio maxilar, preenchimento de defeitos periodontais associados à regeneração tecidual guiada e preenchimento de defeitos perimplantares.

A tabela 3.1 resume as características dos materiais utilizados neste trabalho.

Tabela 3.1: Resumo das características dos materiais particulados utilizados.

NOME	NAC	IMP	CARACTERÍSTICA		ORIGEM		FAIXA GRANULOMÉTRICA
			ABSORV.	NÃO-ABSORV.	BOVINA	SINTÉTICA	
HA-1	X			X		X	250-450µm
HA-2	X			X		X	500-1000µm
HA-3	X		X			X	250-1000µm
HA-4		X	X			X	300-400µm
HA-5	X		X		X		250-450µm
HA-6		X	X		X		250-1000µm

3.2- Metodologia

Os materiais foram analisados empregando-se as seguintes técnicas:

3.2.1 – Morfologia e tamanho de partículas

A análise da forma dos grânulos foi feita por microscopia eletrônica de varredura (MEV, ZEISS, modelo DSM 940A), com 20 kV de aceleração de elétrons. Uma pequena quantidade do material foi colocada numa base e sobre a amostra foi evaporado ouro.

A microscopia eletrônica de transmissão também foi utilizada na análise da forma dos cristais de HA, onde foi utilizado o equipamento JEOL 2000 FX com 200 kV. Os grânulos foram macerados e peneirados em uma peneira de 300 μ m, posteriormente uma gota de solução HA-acetona foi depositada numa grade de cobre recoberta com filme carbono.

A análise da distribuição granulométrica das amostras foi realizada pelo peneiramento em peneiras Granulotest (Telastem peneiras para análises Ltda.) de 75, 125, 250, 350, 420 e 600 μ m. Foi realizada também uma análise da distribuição granulométrica a laser (CILAS 1064) das amostras que apresentavam uma faixa granulométrica menor que 600 μ m. Nesta técnica a amostra é dispersa em um meio líquido (água destilada), onde incide um laser multicromático. A luz é difratada em vários ângulos pelas partículas sendo medida por um detector de silício. A análise da distribuição do tamanho das partículas fica entre 0,04 e 500 μ m.

Após o teste de peneiramento inicial verificou-se que as amostras número 2 e 6 apresentavam a maioria das partículas com o tamanho maior que 600 μ m, ficando assim as duas amostras excluídas deste teste.

3.2.2 Composição das amostras

A caracterização estrutural foi realizada utilizando um difratômetro de raios-X (DRX-MINIFLEX, Rigaku, Tóquio, Jactam), operado em 30 kV, 15mA e radiação $\text{CuK}\alpha$. Os dados foram obtidos de $5-100^\circ 2\theta$.

Após a análise dos espectros dos DRX foi realizado o refinamento destes, utilizando o programa CELREF, com o objetivo de comparar uma curva teórica da hidroxiapatita padrão com o material utilizado. O coeficiente de relação (R) obtido como resultado, exprime as diferenças entre os dados experimentais e os teóricos. Assim, R igual a 1 (um) significa uma adequação perfeita do espectro com os dados teóricos.

O Índice de cristalinidade das amostras foi determinado utilizando a técnica preconizada por LANDI et al. (2000), que avaliou a cristalinidade do material através dos espectros de raios-x aplicando a seguinte fórmula: $X_c \cong 1 - (V_{112/300} / I_{300}) \times 100$, onde X_c é o índice de cristalinidade da amostra, $V_{112/300}$ corresponde ao vale existente no espectro de raios-X entre os planos (112) e (300); e I_{300} corresponde ao valor da intensidade do plano (300).

O equipamento utilizado para a análise de infravermelho foi um espectrômetro da marca Bomem, modelo MB102, com transformada de Fourier e detector DTGS (alanina dopada com sulfato de triglicina deuterada) e janelas de iodeto de céσιο (CsI). O método de refletância difusa foi utilizado, objetivando maximizar a sensibilidade da análise da superfície dos pós.

A principal dificuldade na investigação da espécie adsorvida por espectroscopia de IV está relacionada ao diminuto volume do material adsorvido, em comparação ao elevado volume do adsorvente. Conseqüentemente, as raias devidas à absorção da

espécie (ou espécies adsorvidas) têm intensidade muito menor em relação às raias produzidas pelo adsorvente. Esse problema pode ser minimizado produzindo-se um pó finíssimo, por moagem, isto é, aumentando a área específica superficial (ANÔNIMO, 1998).

Para a obtenção dos espectros, 20 mg do pó foi misturada com 220 mg de KBr. A seguir, a mistura foi transferida para o recipiente do acessório de refletância difusa, RD. Foram realizadas 1000 varreduras para cada amostra a uma velocidade de 20 varreduras/min e resolução de 4 cm^{-1} . O espectro foi analisado no intervalo de frequência entre 4.000 e 400 cm^{-1} .

A razão molar Ca/P das amostras foi determinada em um espectrômetro de massa (ICP – OPTIMA 3000 – Perkin Elmer).

3.2.3 Área superficial específica

A determinação da área específica dos grânulos (BET) nos materiais de enxerto particulados à base de fosfatos de cálcio foi realizada através de adsorção de nitrogênio a 77K . A estrutura e reatividade dos materiais sólidos determinam a maneira como sua superfície interage com moléculas gasosas. Quantificando as interações gás – sólido, através da geração isotermas de sorção gasosa permite a avaliação rotineira das propriedades que controlam o comportamento dos sólidos, como área superficial da amostra.

3.2.4 Degradação

Após a análise das diversas técnicas existentes para avaliar a degradação dos materiais de enxertos particulados à base de fosfato de cálcio, foi definido que seria utilizado um protocolo preconizado pela norma internacional ISO/FDIS 10993-14:2001 para avaliação de materiais médicos (parte 14: Identificação e quantificação da degradação de produtos cerâmicos). As partículas foram peneiradas de modo a apresentarem uma faixa granulométrica entre 325 e 400 μ m. O protocolo preconiza a utilização da relação de 1 grama de material para 20 ml de solução. Como a quantidade de material disponível era pequena, o ensaio foi realizado em duplicatas das amostras pesadas com 0,10g e imersas em 2ml de solução tampão TRIS, onde permaneceram em uma temperatura de 37⁰ C, pH de 7,3, por um período de 120 horas sob agitação constante. Após as 120 horas as amostras foram filtradas em um filtro politetrafluoretileno (Sartorius AG 37070), com o tamanho de poros de 0,2 μ m. Posteriormente, os filtros foram colocados em estufa a 37⁰C por um período de 24 horas para a secagem do material. A degradação do material foi calculada pela diferença entre a massa antes e após o experimento

3.2.5 Bioatividade

A capacidade de formação de apatitas biológicas na superfície das amostras foi avaliada por meio da imersão dos materiais analisados na solução de Kokubo convencional, onde foi empregado 10 mg de material para 30 ml de solução, em banho com temperatura controlada a 37⁰C com agitação constante. Os testes foram realizados em duplicata. Os seis tempos empregados foram escolhidos em função dos

resultados obtidos por MONTEIRO et al. (2002) e estão listados na tabela 3.2. A formação de apatita sobre os grânulos foi avaliada pela medida do teor de Ca na solução, e ao fim do experimento os grânulos foram observados em MEV .

Tabela 3.2: tempos utilizados no teste de bioatividade

Nomenclatura	Tempo (horas)
T1	0,5
T2	1
T3	6
T4	24
T5	72
T6	120

4 – RESULTADOS

Neste capítulo serão apresentados os resultados das caracterizações realizadas nos seis materiais de enxertos ósseos particulados à base de fosfato de cálcio.

Antes dos testes de caracterização dos grânulos das hidroxiapatitas comerciais foi determinada a faixa granulométrica dos materiais como recebidos, apresentados na tabela 4.1. Além da granulometria real obtida através do peneiramento das amostras, é apresentada também a faixa granulométrica indicada pelo fabricante:

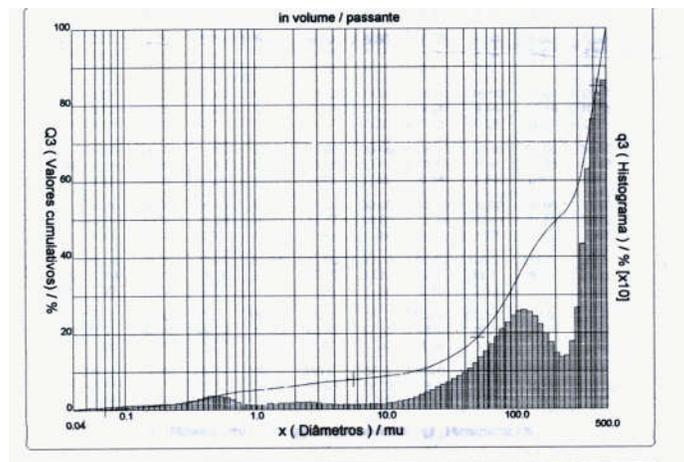
Tabela 4.1- Granulometria real e a indicada pelo fabricante.

Amostra	Granulometria / Real (μm)	Granulometria / Fabricante (μm)
HA-1	Variando < 75 a 600	Variando de 250-450
HA-2	Variando de 250 a > 600	Variando de 500-1000
HA-3	Variando <75 a 125	Variando de 250-1000
HA-4	Variando < 75 a 420	Variando de 300-400
HA-5	Variando < 75 a 600	Variando de 250-450
HA-6	Variando 250 a > 600	Variando de 250-1000

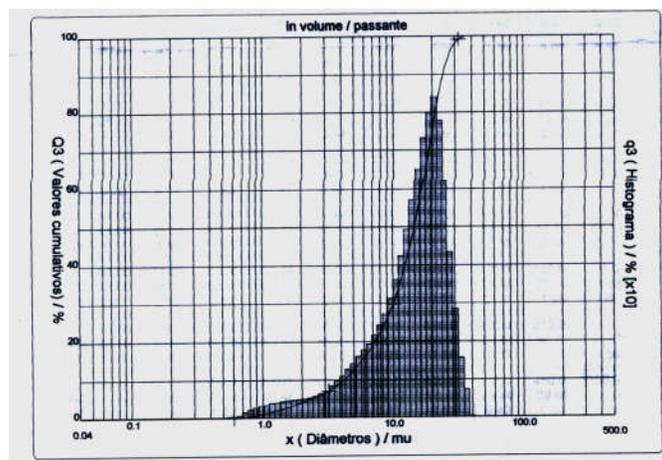
A tabela 4.2 e a figura 4.1 mostram o resultado da análise granulométrica a laser. As amostras HA-2 e HA-6 não foram analisadas por apresentarem tamanhos de partículas maiores que $600\mu\text{m}$, o que contra indica a utilização desta técnica. Os grânulos das amostras HA-3 e HA-4 apresentam distribuição quase normal, sendo que a HA-3 apresenta distribuição bastante estreita.

Tabela 4.2- Distribuição do tamanho de partículas por análise granulométrica a laser.

Amostra	Diâmetro mínimo (μm)	Diâmetro Máximo (μm)	Tamanho médio (μm)
HA-1	16,52	450,00	226,18
HA-3	4,18	24,27	14,52
HA-4	5,36	73,60	38,92
HA-5	0,51	204,36	72,89

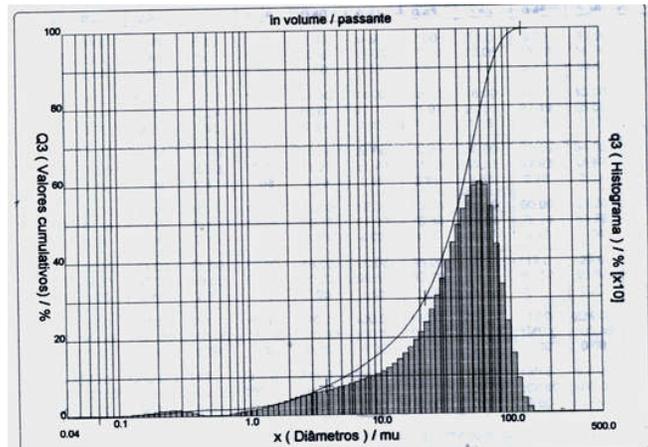


HA 1

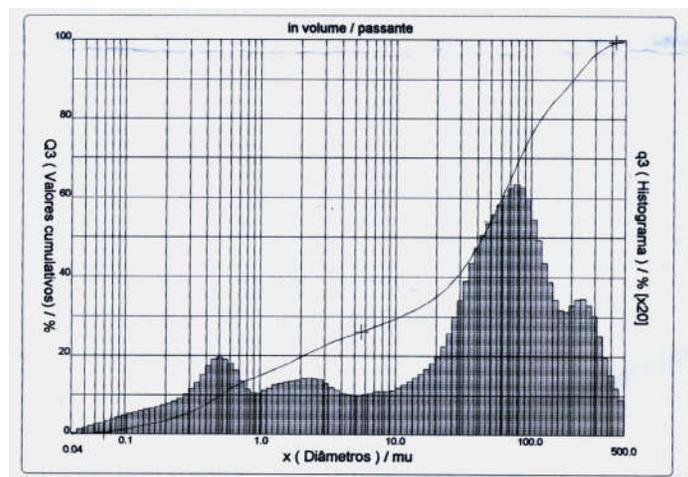


HA 3

Figura 4.1: Distribuição granulométrica das amostras analisadas.



HA 4



HA 5

Figura 4.1(continuação): Distribuição granulométrica das amostras analisadas.

A medida de área superficial foi realizada nos grânulos originais das hidroxiapatitas comercializadas. A tabela 4.3 apresenta os resultados da área superficial específica dos materiais analisados, com a HA-2 apresentando o menor valor e HA-6 o maior.

Tabela 4.3: Valores da área superficial das amostras.

Amostra	Área superficial (m²/g)
HA-1	4,38 ± 0,04
HA-2	0,76 ± 0,005
HA-3	49,63 ± 0,14
HA-4	40,53 ± 0,21
HA-5	4,38 ± 0,048
HA-6	84,54 ± 0,48

A forma das partículas dos materiais de enxertos, obtidas por MEV, pode ser observada nas micrografias da figura 4.2 com aumentos de 50x, 100x e 1000x. Verificaram-se diferenças morfológicas em relação ao tamanho e forma entre as partículas analisadas, com a HA-3 apresentando partículas menores (em média) que as demais amostras.

A análise da morfologia dos cristais de hidroxiapatita também foi avaliada em microscopia eletrônica de transmissão conforme apresentado na figura 4.3.

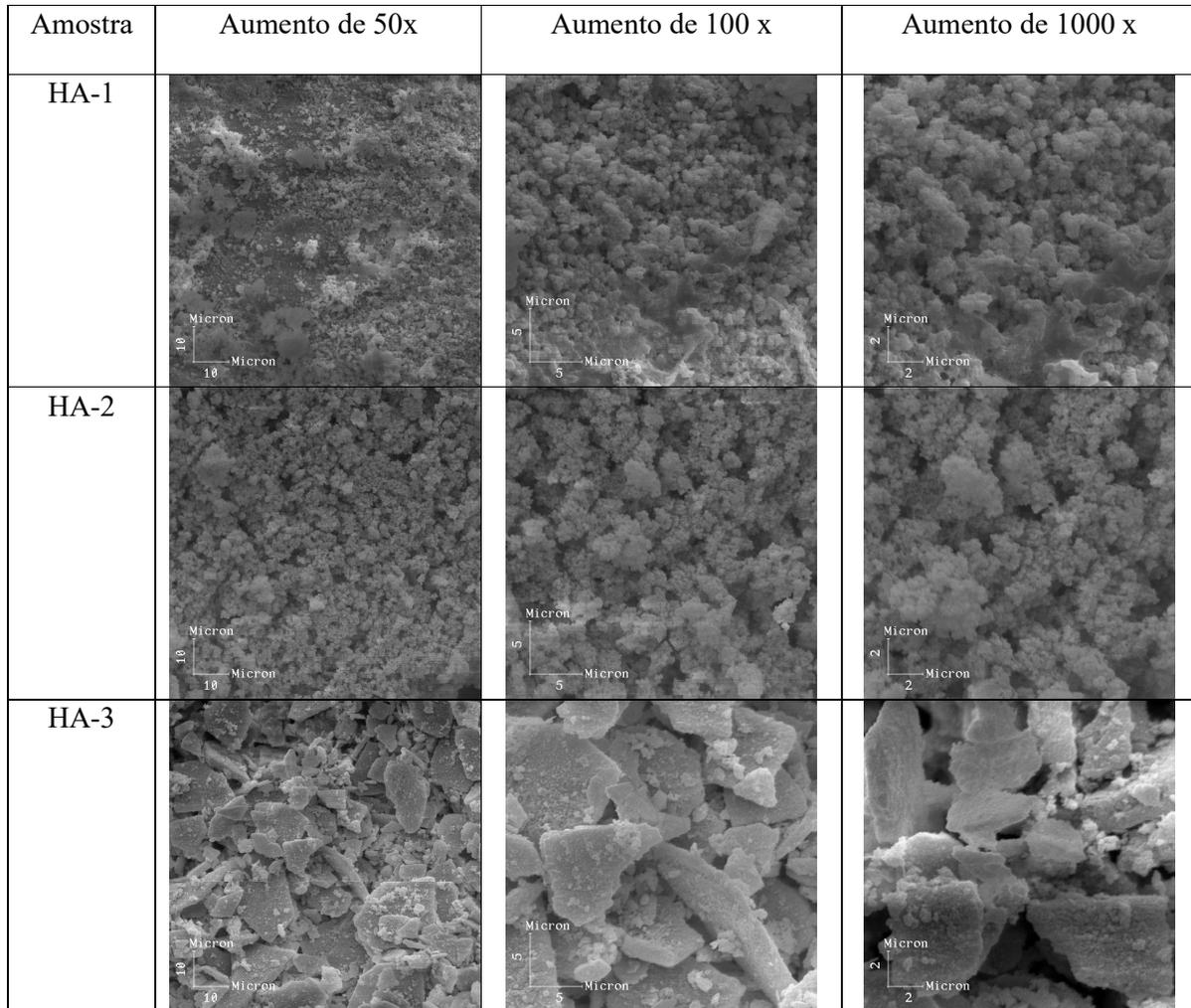


Figura 4.11 – Micrografias (MEV) das partículas dos materiais de enxertos ósseos 120h.

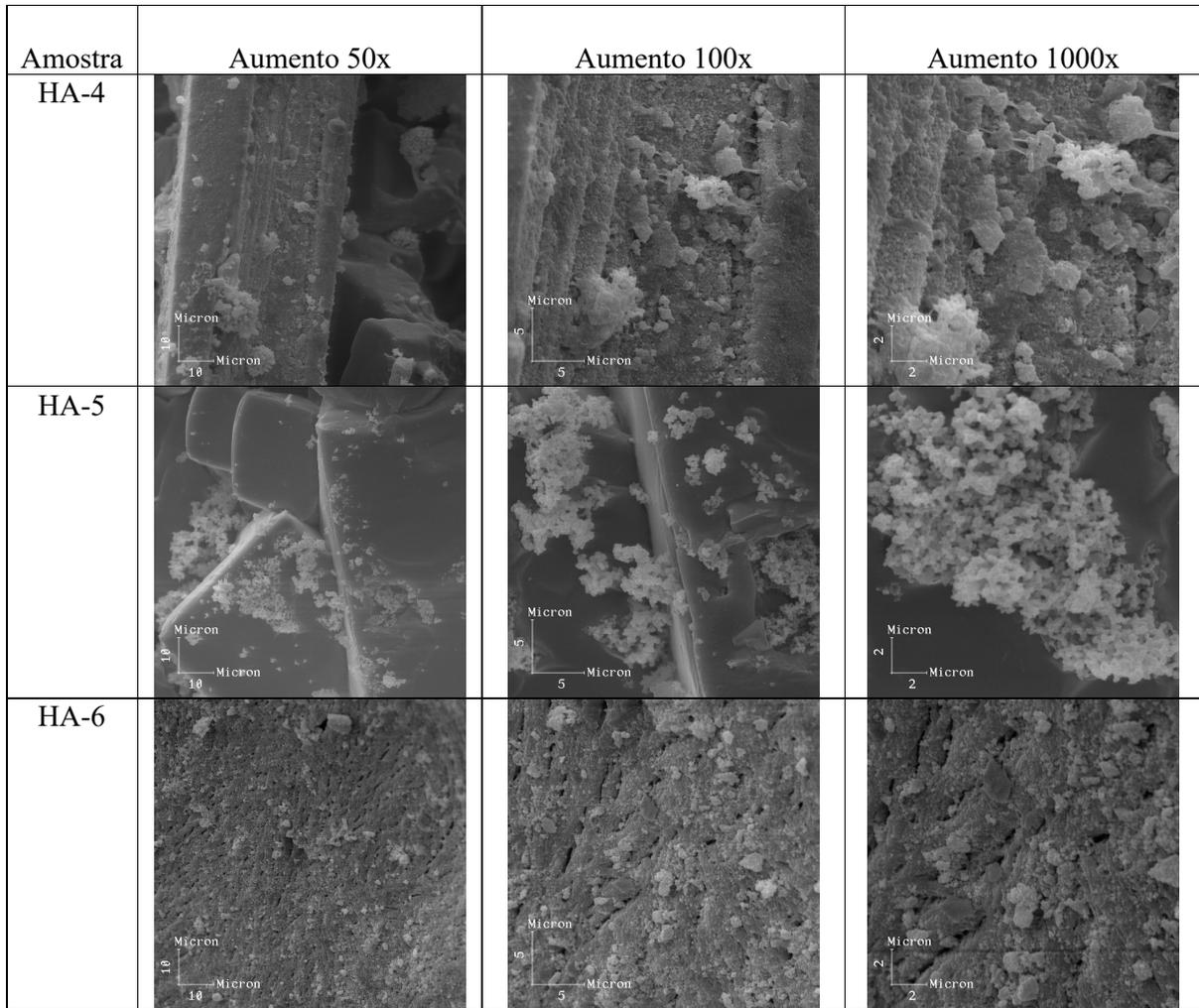


Figura 4.11 – Micrografias (MEV) das partículas dos materiais de enxertos ósseos 120h.

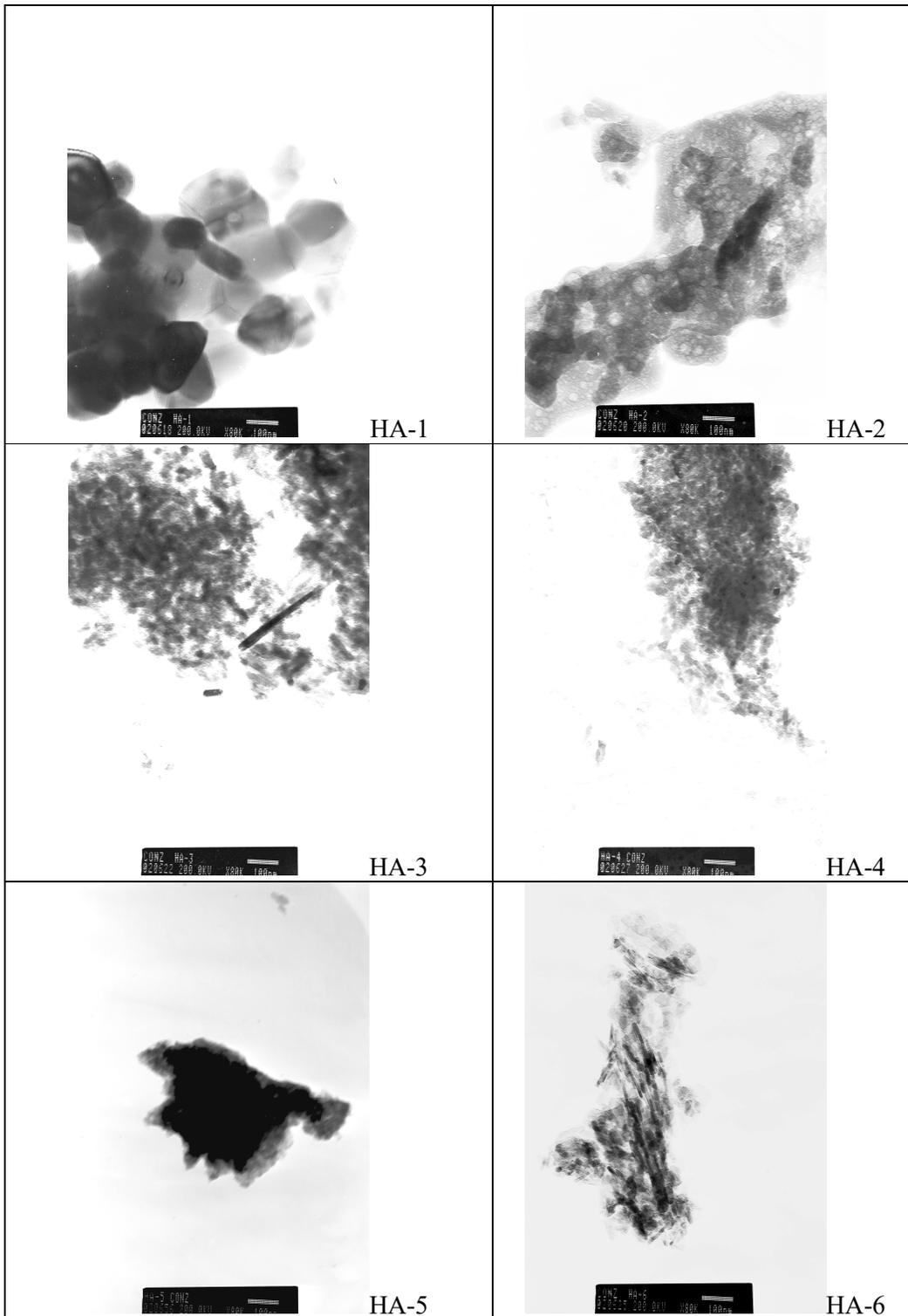


Figura 4.3 apresenta a micrografia (MET) das amostras analisadas, com aumento de 80.000x.

O teor de cálcio e fósforo foi determinado em um espectrômetro de massa (ICP) e a razão molar Ca/P para cada uma das amostras é apresentada na tabela 4.4. Todas as razões Ca/P indicam que os materiais eram cálcio deficiente.

Tabela 4.4- razão molar Ca/P das seis amostras analisadas

Amostra	Razão molar Ca/P
HA-1	1,51 ± 0,02
HA-2	1,42 ± 0,10
HA-3	1,39 ± 0,01
HA-4	1,40 ± 0,001
HA-5	1,60 ± 0,03
HA-6	1,63 ± 0,03

As figuras 4.4 a 4.6 apresentam os difratogramas de raios-X dos seis materiais analisados neste trabalho. Os espectros obtidos apresentaram os picos principais referentes a hidroxiapatita sintética (JCPDS-ICDD cartão 9-432, 1992), podendo destacar a presença dos picos nas intensidades de 100% correspondente ao plano (211), o pico na intensidade de 60% correspondente ao plano (300) e o pico na intensidade de 40% correspondente ao plano (002).

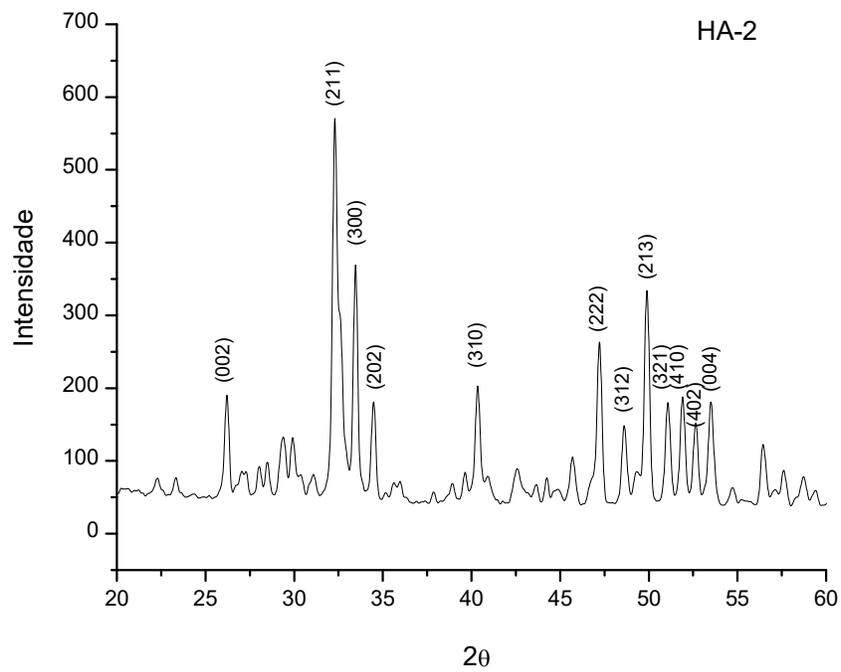
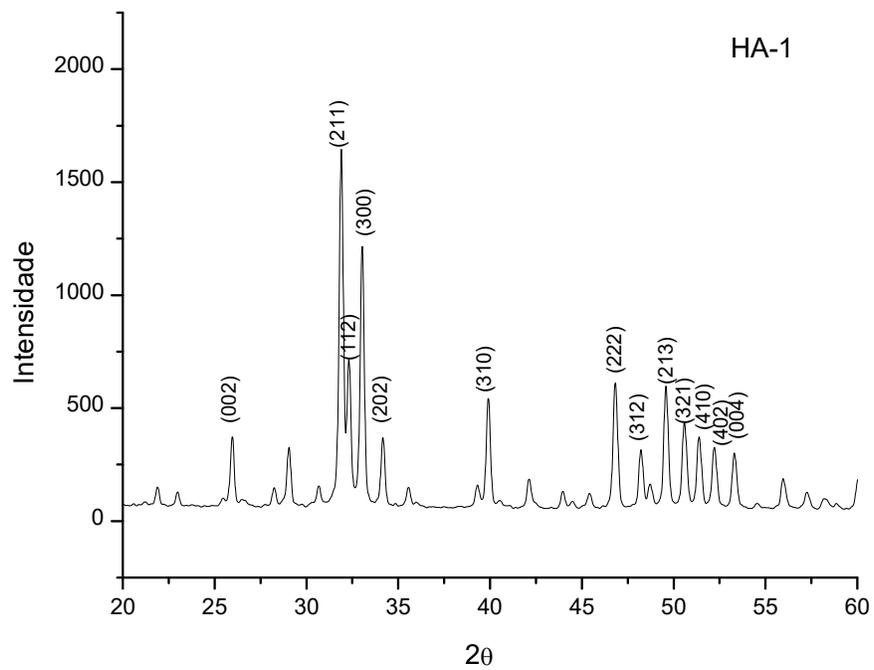


Figura 4.4- Difractogramas das hidroxiapatitas não reabsorvíveis (HA-1 e HA-2)

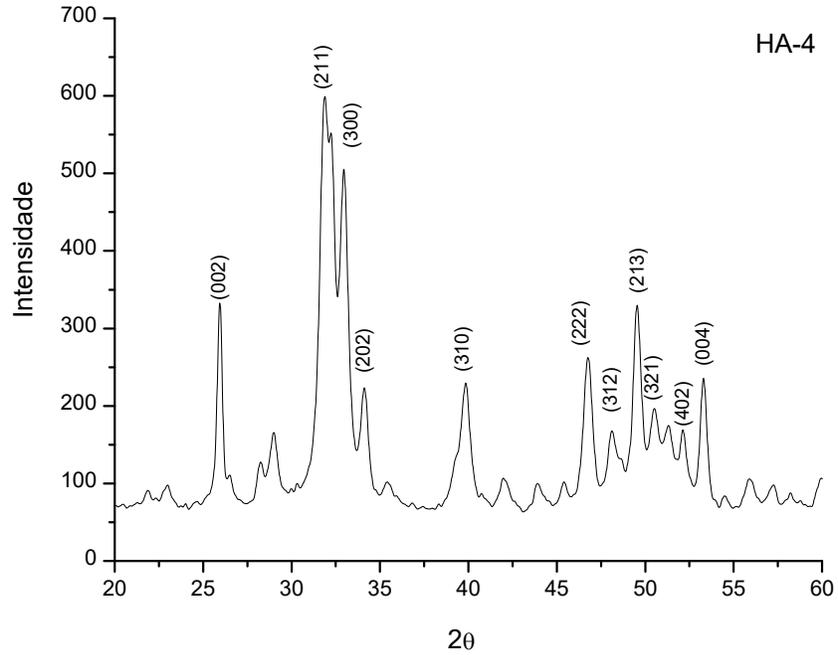
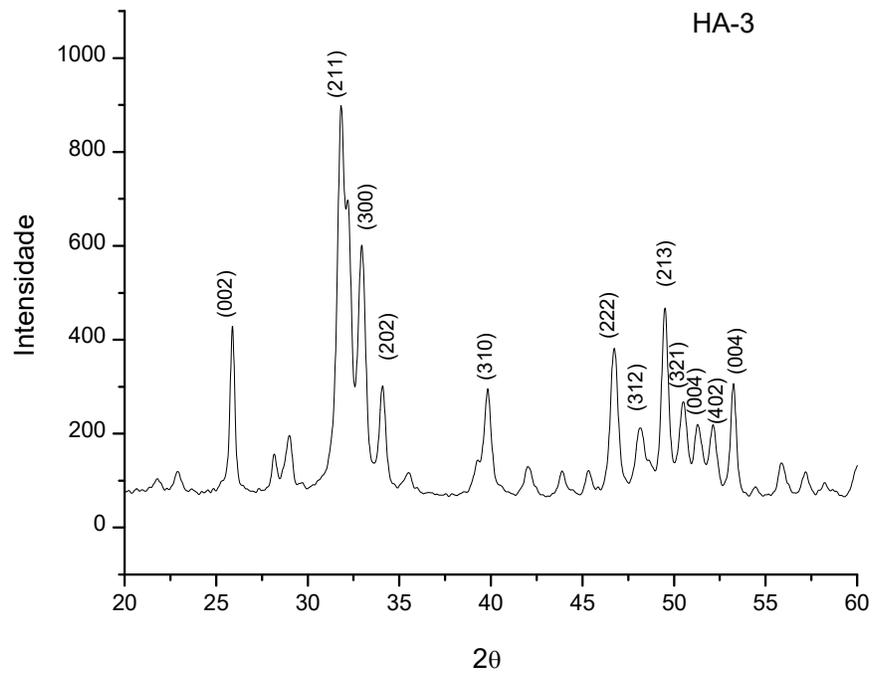


Figura 4.5- Difratomogramas das hidroxiapatitas reabsorvíveis sintéticas (HA-3 e HA-4).

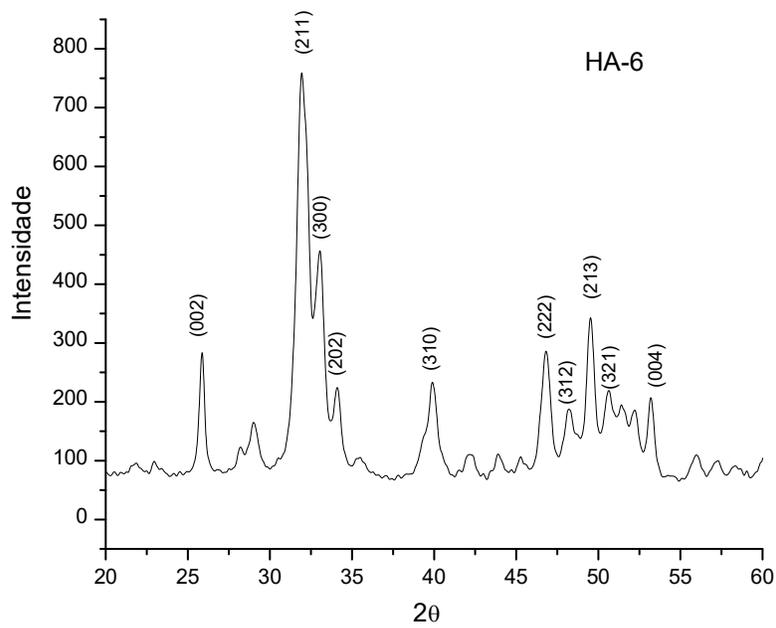
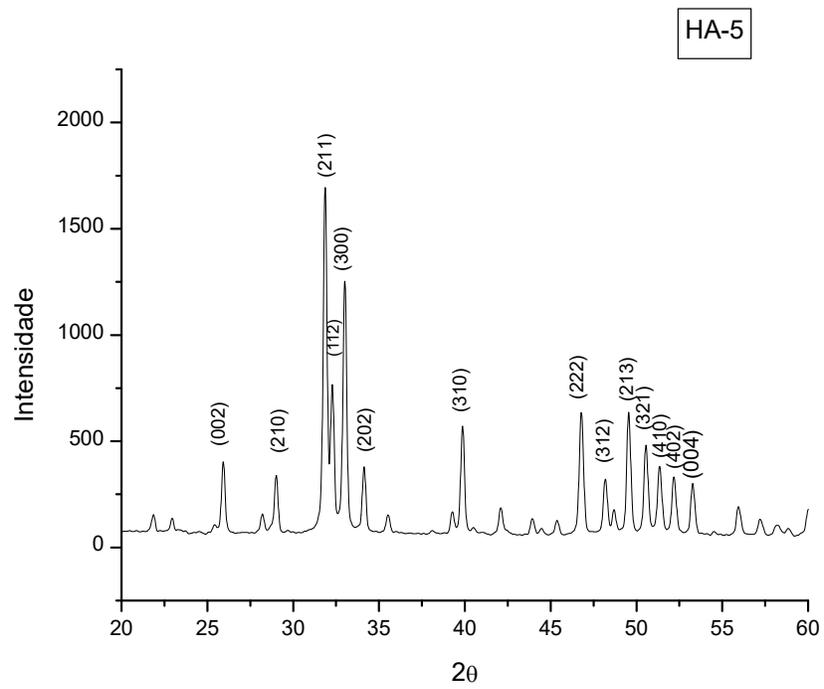


Figura 4.6- Difratoogramas das hidroxiapatitas reabsorvíveis de origem natural (HA-5 e HA-6).

Os padrões de difração de Raios-x das diferentes amostras foram refinados para os cálculos dos parâmetros de rede, apresentados na tabela 4.5. Nesta tabela também foi incluído o índice de cristalinidade determinado através da técnica preconizada por Landi e cols. (2000), conforme descrito na seção 3.2.2.

Tabela 4.5: Parâmetros da rede cristalina e índice de cristalinidade das amostras.

Amostra	Cristalinidade (%)	Parâmetro de rede a=b (nm)	Parâmetro de rede c (nm)
HA-1	92,3	0,94322	0,68929
HA-2	89,1	0,93994	0,69011
HA-3	57,4	0,94343	0,68924
HA-4	37,4	0,94384	0,68922
HA-5	92,0	0,94338	0,68962
HA-6	30,0	0,94235	0,68934
HA-padrão		0,94180	0,68840

Os espectros de raios-x foram analisados e os resultados obtidos foram comparados com a ficha da hidroxiapatita pura sintética (JCPDS 9-432) no programa CELREF, fazendo assim uma comparação dos dados teóricos e experimentais dos materiais. Os coeficientes de correlação (fator R) mostrados na tabela 4.6 demonstram a similaridade das hidroxiapatitas comerciais com a hidroxiapatita padrão.

Tabela 4.6: Apresenta o resultado do programa CELREF, para a análise comparativa dos dados teóricos e experimentais dos materiais analisados.

Amostra	Fator R
HA-1	0,9996
HA-2	0,9989
HA-3	0,9994
HA-4	0,9993
HA-5	0,9995
HA-6	0,9991

Os resultados da análise de infravermelho dos grânulos das hidroxiapatitas (HAs) comerciais: HA-1 a HA-6 estão apresentados nas figuras 4.7 a 4.9.

Nos espectros dos materiais analisados podemos observar bandas na faixa do comprimento de onda 1454-1469, 1400-1420 e 850 cm^{-1} correspondentes ao grupamento funcional CO_3^{2-} das HAs. A quantidade de carbonato variou nas diferentes amostras. As bandas na faixa do comprimento de onda 570, 603, 962, 1045 e 1096 cm^{-1} correspondem ao grupamento funcional PO_4 das HAs. Também podemos observar bandas na faixa do comprimento de onda 633 cm^{-1} característica do grupamento funcional OH^- e bandas correspondentes aos grupamentos H-O-H e P=O (TAS et al 2000 e KUMAR et al 2000). Os espectros referentes às HA-1 e HA-5 apresentam alta definição das bandas, sendo uma indicação da alta cristalinidade do material.

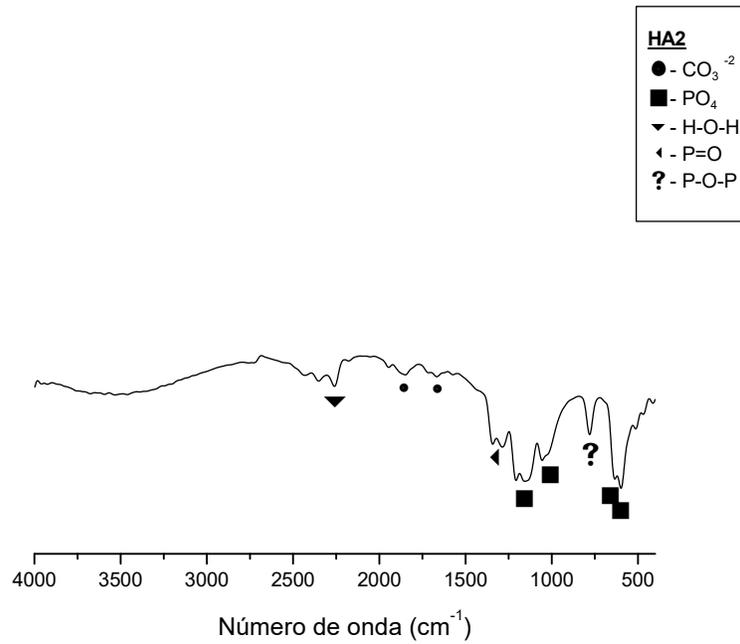
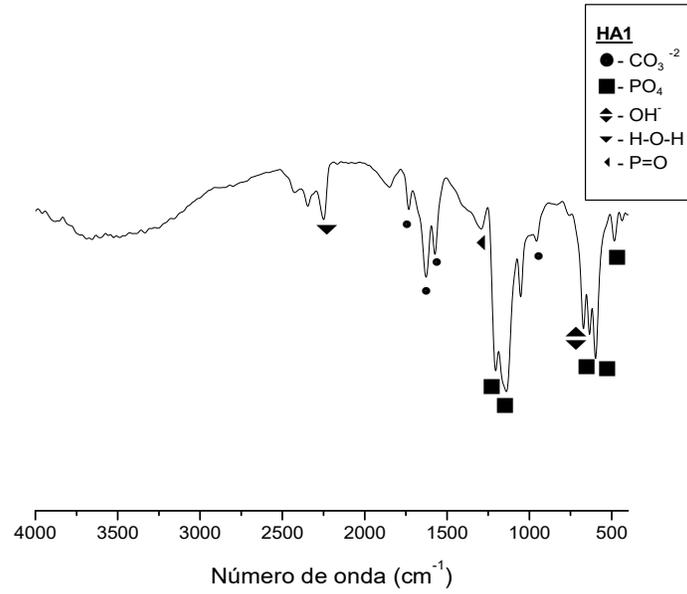


Figura 4.7: Espectros de infravermelhos das hidroxiapatitas não-absorvíveis (HA-1 e HA-2)

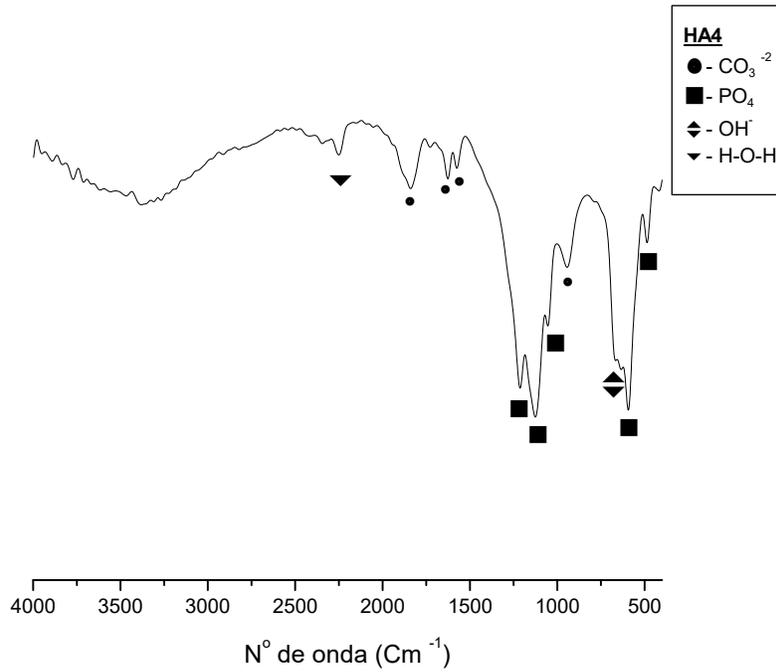
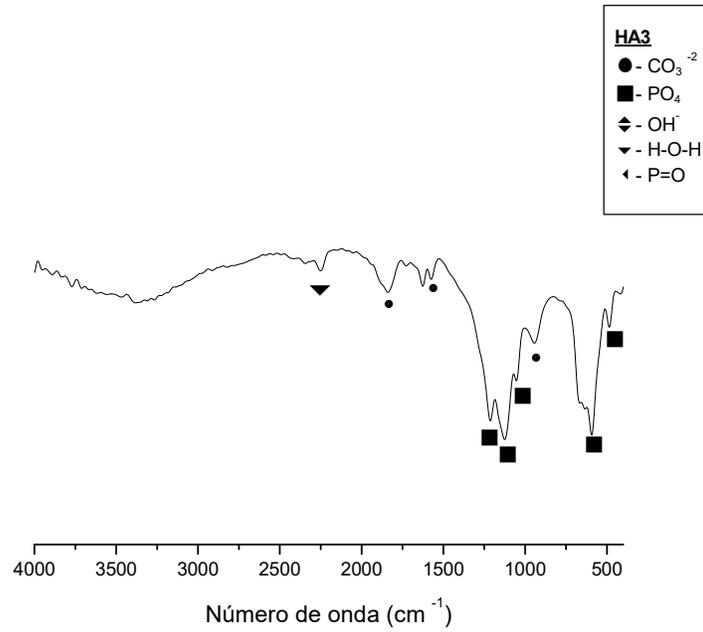


Figura 4.8: Espectros de infravermelhos das hidroxiapatitas absorvíveis sintéticas (HA-3 e HA-4).

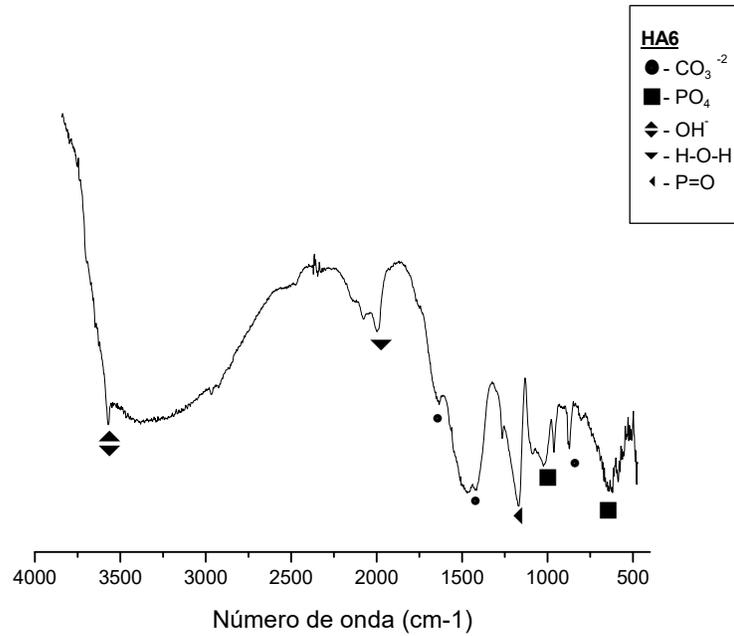
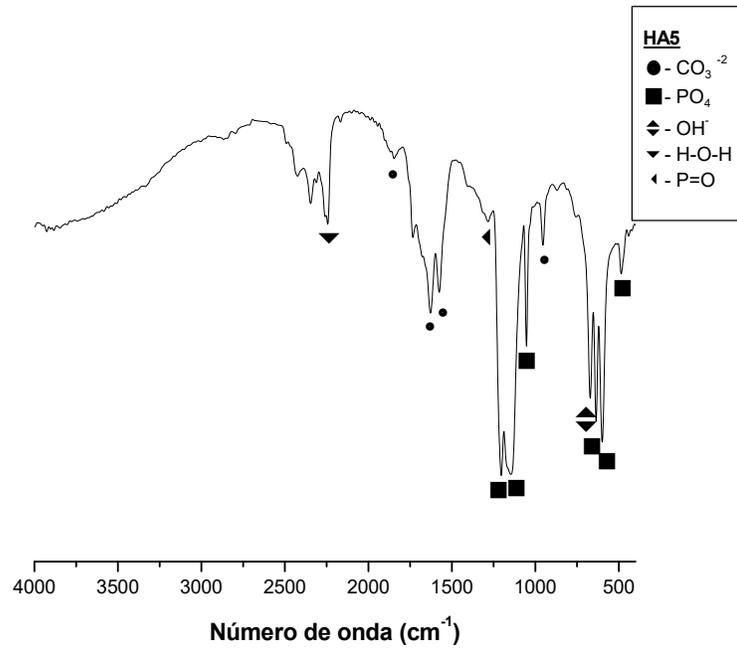


Figura 4.9: Espectros de infravermelhos das hidroxiapatitas absorvíveis de origem natural (HA-5 e HA-6).

Na tabela 4.7 é mostrada a perda de massa de cada um dos materiais submetidos ao teste da degradação em solução TRIS.

Tabela 4.7 – Apresenta os resultados do teste de degradação.

Amostra	Média de Perda%	Desvio Padrão
HA-1	18,42	6,05
HA-2	3,98	0,16
HA-3	3,99	1,28
HA-4	7,60	0,56
HA-5	10,47	0,24
HA-6	4,72	1,61

A figura 4.10 representa a variação do teor de cálcio na solução simuladora de fluido corpóreo com o tempo em que as amostras ficaram imersas na solução. Um comportamento similar para todas as amostras pode ser verificado. Podemos observar um aumento da concentração de cálcio na solução de todas as amostras entre o tempo T1 (0,5 hora) e T2 (1 hora) decorrente da dissolução parcial dos grânulos. Posteriormente observa-se pouca variação da concentração de cálcio até o tempo T4 (24 horas). Após este tempo ocorre uma diminuição do teor de Ca na solução, indicando a precipitação de uma fase contendo Cálcio sobre os grânulos das HA que se tornou constante e em equilíbrio até o tempo T6 (120 horas).

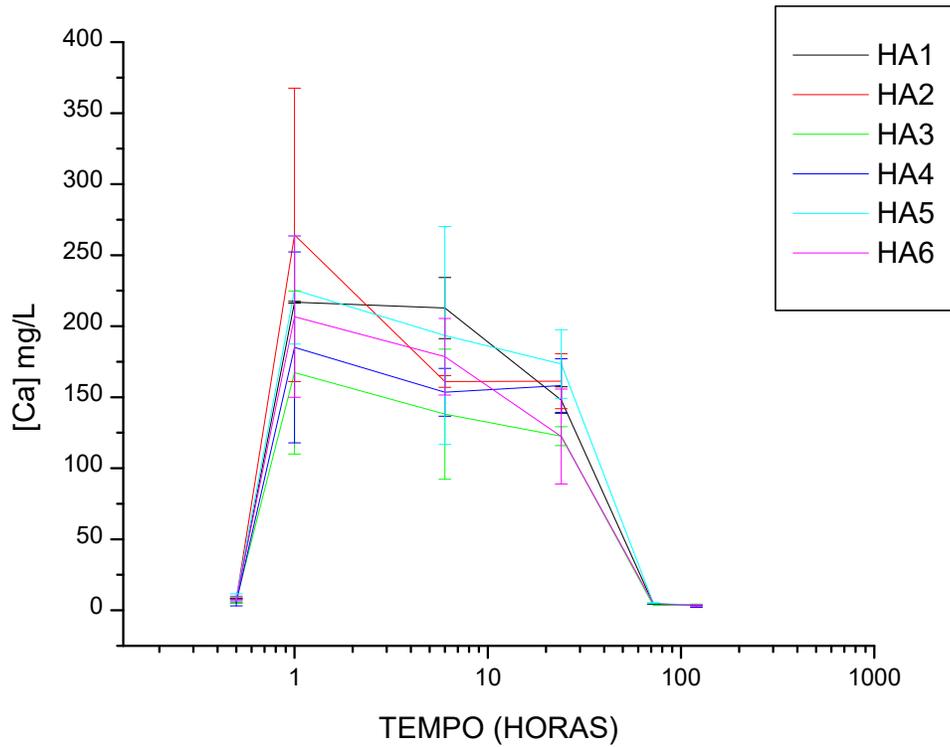


Figura 4.10 apresenta o resultado do teste de bioatividade das HA comerciais.

As micrografias obtidas em MEV das amostras com aumentos de 1000X, 3000x e 5000x após as 120h de imersão em solução de Kokubo convencional são observadas na figura 4.11 e 4.12. Observam-se diferenças não significativa na quantidade e morfologia dos precipitados ricos em cálcio.

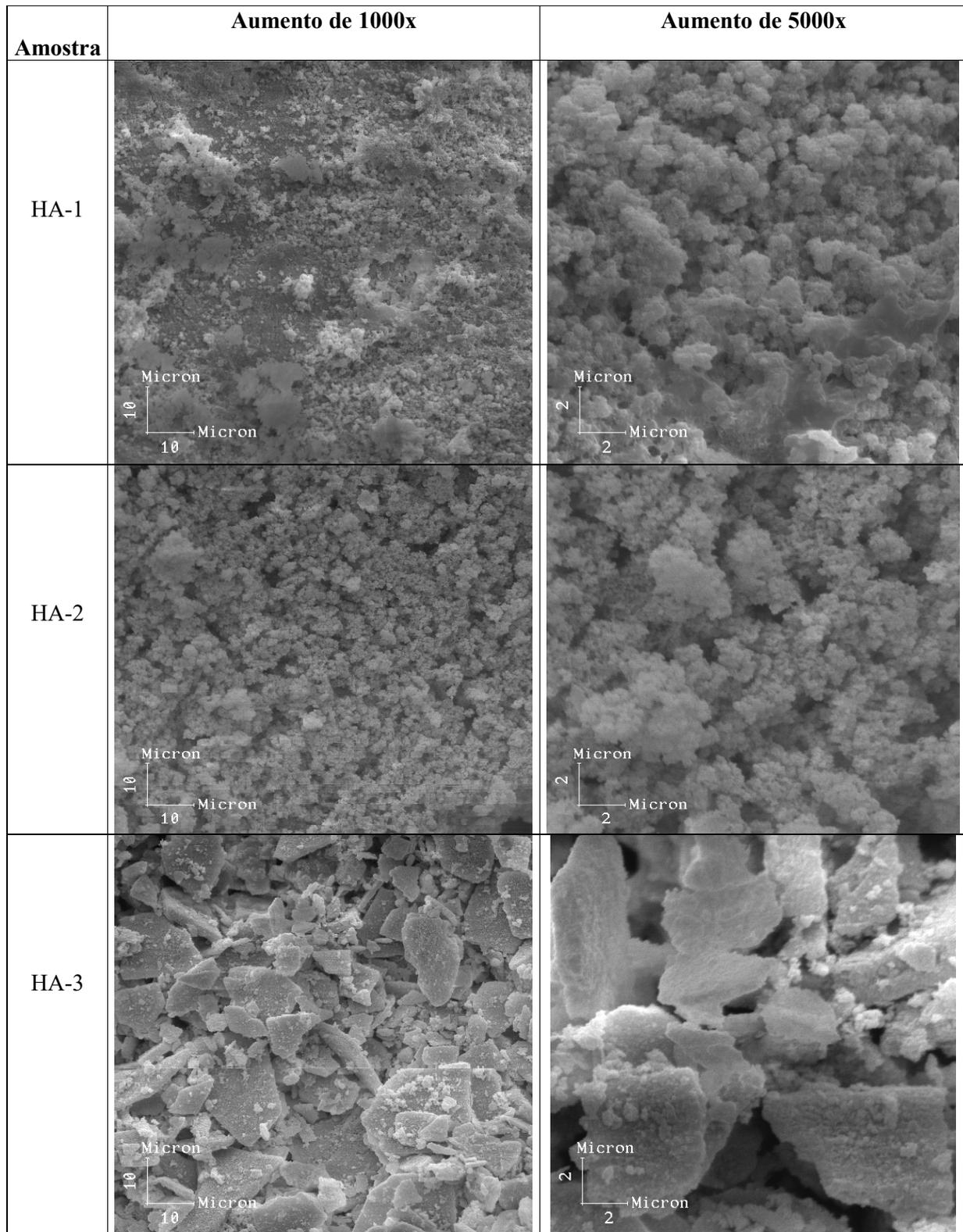


Figura4.11 – Micrografias (MEV) dos grânulos das HAs após teste de bioatividade

120h.

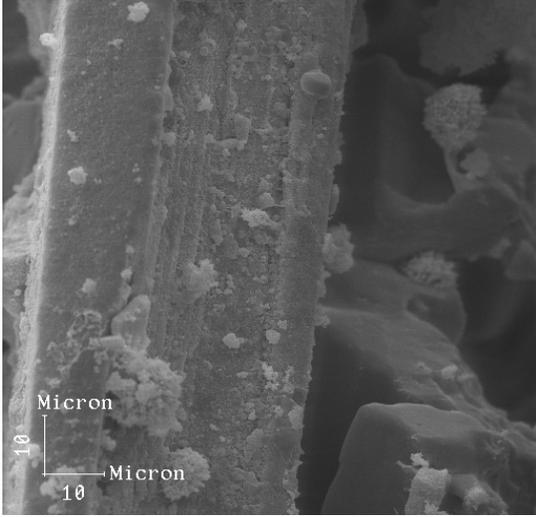
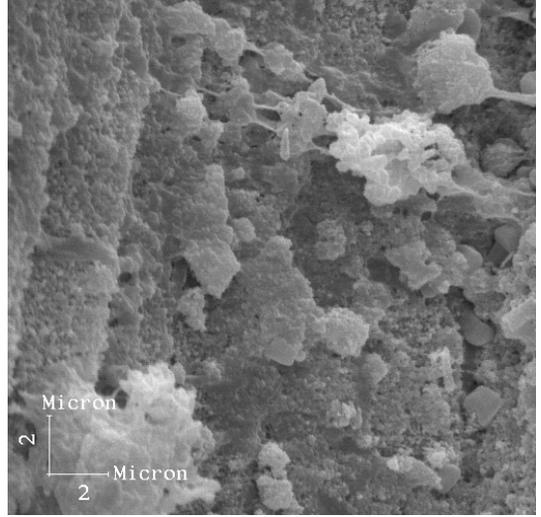
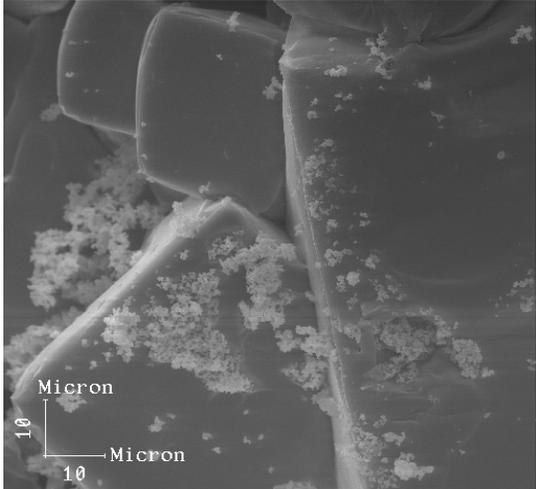
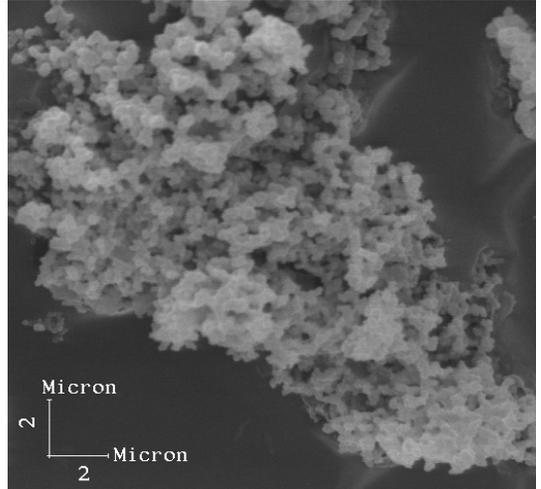
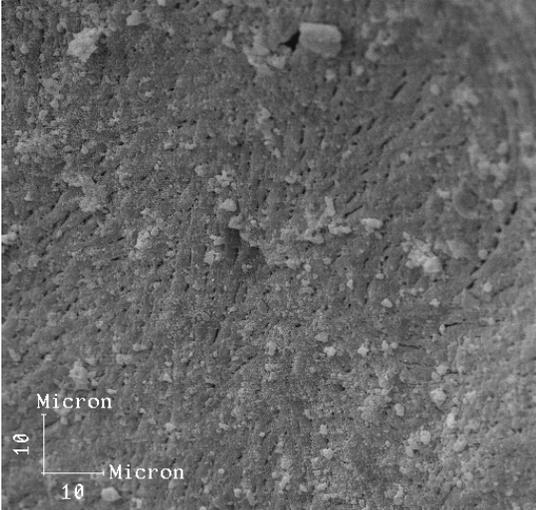
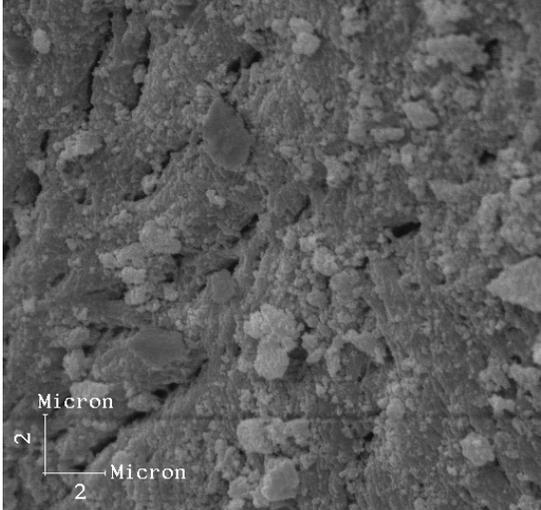
Amostra	Aumento de 1000x	Aumento de 5000x
HA-4		
HA-5		
HA-6		

Figura4.12 – Micrografias (MEV) dos grânulos das HAs após teste de bioatividade

120h.

5 – DISCUSSÃO

Neste capítulo serão comentados os resultados apresentados sobre as caracterizações dos seis materiais de enxertos particulados analisados, correlacionando as propriedades físico-químicas dos materiais com a literatura existente.

Na tabela 4.1 foram apresentados os resultados da avaliação granulométrica das amostras após o teste de peneiramento e também a faixa granulométrica indicada pelo fabricante. Como podemos observar, apenas a amostra HA-6 apresentou como resultado a indicação fornecida pelo fabricante. A confrontação dos dados das tabelas 4.1 e 4.2 com as imagens obtidas por MEV (figura 4.2) mostram discrepância de resultados para a HA-4. Esse material quando caracterizado por laser apresentou diâmetros de partículas na faixa de 5,3 a 73,60 μm com valor médio igual a 38,92 μm . No entanto por MEV podem ser visualizadas partículas com formas de agulhas bastante grosseiras, com comprimento de até 1 mm. Por essas partículas apresentarem uma morfologia semelhante à uma agulha, a análise a laser tende a analisar apenas o diâmetro das partículas, não levando em consideração o seu comprimento (VASCONCELOS, 2003). O comportamento dos materiais de enxertos particulados depende pelo menos em parte, do tamanho e da sua distribuição granulométrica. DUCHEYNE & QUI (1999) após avaliarem o efeito da reatividade da superfície das cerâmicas bioativas na formação e na função das células óssea relataram que uma variação estreita no tamanho das partículas é importante para a promoção da diferenciação celular através do defeito ósseo, permitindo assim uma vascularização adequada. Quando ocorre uma variação muito grande do tamanho das partículas, como observado na figura 4.2 para a HA-5, o espaço

entre as partículas maiores tende a ser rapidamente preenchido pelas partículas menores, obstruindo assim o tecido reparador.

A diferença de solubilidade de uma hidroxiapatita estequiométrica pode estar relacionada à cristalinidade, à porosidade e ao tamanho de partícula do material (BOHNER, 2000). Se considerarmos materiais com composição química idêntica, o material com partículas maiores permanecerá um maior tempo no local implantado. Assim partículas com 75 μm irão ser reabsorvidas mais rapidamente que as partículas de 3000 μm (MISCH, 1999). O tamanho da partícula, sua forma e a aspereza da superfície também podem afetar a adesão e a proliferação celular sobre o material (BURG, 2000). A análise da área superficial específica das amostras está apresentada na tabela 4.3. Foi observada uma correlação dos resultados relacionados com os diferentes tamanhos de partículas e com a presença de porosidades na estrutura das amostras. As amostras HA-1, HA-2 e HA-5 apresentam uma área de superfície baixa devido à presença de partículas maiores. A área de superfície das amostras HA-3 e HA-4 aumentaram com a diminuição dos tamanhos das partículas, ao passo que a amostra HA-6 apresentou a maior área de superfície entre as amostras avaliadas apesar de suas partículas serem relativamente grandes (observar na tabela 4.1). A razão do aumento da área de superfície desta amostra decorre da presença de macroporos e microporos na estrutura do material conforme visto na figura 4.12. A estrutura e reatividade dos materiais sólidos determinam a maneira como sua superfície interage com o meio. Assim quanto maior a área de superfície das amostras, maior será a quantidade de células em contato com o material enxertado.

A presença de poros na superfície da hidroxiapatita aumenta a área de superfície do material de enxerto, com característica osteocondutora, permitindo um crescimento ósseo também no interior dos poros (WERNER et al. 2002; ASHOK et al. 2002). Para ocorrer o crescimento ósseo no interior dos materiais de enxertos os poros devem apresentar um diâmetro de no mínimo 100µm (CAROTENUTO et al. 1999.; MISCH, 1999; TAMPIERI, 2001). A influência do tamanho dos poros das hidroxiapatitas no crescimento ósseo foi avaliada por SCHLIEPHAKE et al. (1986), onde foram inserido blocos de hidroxiapatita com diferentes tamanhos de poros (150 µm e 260 µm) no tecido ósseo de animais suínos. A análise histológica tridimensional da distribuição do crescimento ósseo nos materiais enxertados foi feita após três meses de cicatrização. O resultado demonstrou que os blocos com poros de 260 µm apresentaram um crescimento ósseo 3 vezes maior que os blocos com poros de 150 µm. O aumento do percentual de crescimento ósseo no interior dos materiais de enxertos ósseos que apresentam porosidades é diretamente proporcional ao aumento do tamanho dos poros (BLITTERSWIJK et al. 1986).

A tabela 4.3 apresenta a razão molar Ca/P dos materiais analisados, onde ocorreu uma variação entre 1,39 (HA-3) a 1,63 (HA-6). A razão molar Ca/P é uma característica importante a ser analisada nos materiais de enxertos particulados, uma vez que a solubilidade dos materiais de enxertos aumenta com a diminuição da sua razão molar Ca/P (BOHNER, 2000; RAYNAUD ^{A e B} et al. 2002). Os baixos valores encontrados devem embutir um erro analítico do equipamento e técnica empregados, uma vez que outras fases como monetita e fosfato tricálcio não foram identificados por DRX e infravermelho.

A morfologia das partículas e dos cristais dos materiais de enxertos foi examinada por MEV (figura 4.2) e MET (figura 4.3).

Por MEV observou-se como característica geral a forma irregular e grosseira das partículas (figura 4.2). As exceções foram a HA-4 que apresentou morfologia de bastões lisos e a HA-3 nitidamente mais refinada que as demais. As amostras HA-1 e HA-5 produzidas pelo mesmo fabricante e com características de não-reabsorvível e reabsorvível, respectivamente, apresentam morfologia similar e distribuição granulométrica mais achatada que as demais amostras.

Por MET (figura 4.3) pode-se observar nas amostras HA-1 e HA-2 (comercializadas como não-absorvíveis) morfologia dos cristais compatível com a de materiais calcinados, particularmente a HA-1. Já as hidroxiapatitas sintéticas comercializadas como absorvíveis (HA-3 e HA-4) são formadas por cristais nanométricos similar às morfologias observadas em hidroxiapatitas obtidas por precipitação via úmida (MAVROPOULOS et al. 2003). Nas amostras de origem natural são observados aglomerados não claramente definidos (HA-5) e estruturas porosas (HA-6). A morfologia dos materiais de enxertos ósseos apresenta uma característica importante na sua propriedade biológica. GOMI et al. (1993), avaliou a reabsorção de hidroxiapatita sintética com superfície polida e rugosa por osteoclastos *in vitro*, observando que os osteoclastos são capazes de reabsorver a hidroxiapatita sintética. A superfície rugosa apresentou uma maior reatividade, com uma maior quantidade de células multinucleadas sobre sua superfície.

Os espectros observados nos difratogramas de raios-x nas figuras 4.4, 4.5 e 4.6 apresentaram picos característicos de uma hidroxiapatita pura sintética (JCPDS cartão

9-432) com o parâmetro de rede da célula unitária $a=b$ e c variando de 0,9399 a 0,9438 e de 0,6892 a 0,6896 nm, respectivamente (tabela 4.5). Não foram identificados outras fases, como β -TCP muitas vezes presentes principalmente em hidroxiapatitas sintéticas obtidas por via úmida (MONTEIRO, 2002). A cristalinidade das hidroxiapatitas analisadas no presente estudo foi calculada através dos espectros de difração de raios-x e apresentada na tabela 4.5. As Hidroxiapatitas HA-1, HA-2 e HA-5 (92,3%, 89,1% e 92,0% respectivamente) são altamente cristalinas, já as amostras HA-3, HA-4 e HA-6 tiveram apresentaram uma cristalinidade menor (57,4%, 37,4% e 30,0% respectivamente). Esta característica do material afeta a taxa de reabsorção, a dissolução do material e a sua estabilidade à alta temperatura (FULMERA, 2002). Estruturas altamente cristalinas são mais resistentes à alteração e à reabsorção em longo prazo, por outro lado os materiais com menor cristalinidade são mais susceptíveis a decomposição em outras fases cristalinas (AOKI, 1994). Cabe destacar que a HA-5 indicada como HA absorvível de origem sintética apresentou morfologia e cristalinidade compatível com o material não-absorvível. Em face desses resultados foram adquiridos novos lotes das Hidroxiapatitas HA-1, HA-2, HA-3 e HA-5 e repetida a caracterização por difração de raios-x (DRX). Os resultados obtidos nos novos lotes corroboraram os resultados já apresentados.

Os espectros de infravermelho foram apresentados nas figuras 4.7, 4.8 e 4.9. Após a análise dos espectros foi constatado que todos os grânulos eram compostos de hidroxiapatita com a incorporação de íons carbonato. A diferença entre os materiais está na quantidade de substituições pelo carbonato do tipo A e B, nas diferentes definições dos picos e nas diferentes intensidades dos picos entre os espectros. A identificação da presença de íons carbonato é comum em HA naturais, bem como em HA produzidas em laboratório quando o CO_2 é incorporado à HA, com o aumento das substituições pelo

carbonato acarretando um aumento da solubilidade da hidroxiapatita (ANDRADE, 1999). Pelos espectros de infravermelho não é possível diferenciar uma hidroxiapatita sintética da hidroxiapatita de origem natural. Porém, os espectros referentes às HA-1 e HA-5 apresentam alta definição das bandas, indicando a alta cristalinidade do material. A quantidade de íons carbonato é maior nas HA-1, HA-5 e HA-6, o que tenderá a conferir a esses materiais uma maior degradação.

O teste de degradação dos materiais particulados seguiu o protocolo ISO/FDIS10993-14:2001(E) para a identificação e quantificação dos produtos de degradação das cerâmicas. Neste protocolo é preconizado uma relação de 1grama de material para 20 ml de solução. O emprego de uma quantidade de 0,10 g para 2ml de solução tampão tris, acarretou grande dispersão dos resultados associado, provavelmente, a erros de pesagem.

O teste de bioatividade realizado em uma solução simuladora de fluido corpóreo (solução de Kokubo) constatou um aumento da concentração de cálcio na solução entre os tempos T1 (30 minutos) e T2 (1 hora). Este aumento ocorre pela dissolução do material liberando íons de cálcio para a solução. Após este tempo, ocorre um equilíbrio da concentração de Ca na solução até o tempo T4 (24 horas) e uma diminuição do Ca na solução nos tempos T5 e T6 (72 e 120 horas), indicando a precipitação do Ca sobre os grânulos das HAs. Esta precipitação pode ser observada nas micrografias realizadas em MEV após o teste de bioatividade (figura 4.11). Resultado similar foi encontrado por Monteiro (2002) que investigou grânulos de HA produzidos em laboratório. Na figura 4.11 e 4.12 pode-se visualizar também que a tendência à precipitação de cálcio (na

forma de apatita biológica) é maior nas superfícies rugosas e em frestas ou poros como relatado por WENG (1996).

Como o teste de degradação gerou resultados não totalmente confiáveis e o teste de bioatividade não mostrou diferenças significativas entre os materiais testados pode-se inferir a tendência de comportamento (absorvível e não-absorvível) de cada uma das HAs em função de três parâmetros analisados: área superficial, cristalinidade e teor de carbonato. A reabsorção dos grânulos aumenta com o aumento da área superficial, a diminuição da cristalinidade e o aumento do teor de carbonato. A Tabela 5.1 resume as especificações dos fabricantes e os resultados encontrados.

Tabela 5.1: correlação das características apresentadas pelos fabricantes com os resultados encontrados.

Amostra	Área de superfície	Cristalinidade	% de carbonato	Tendência de comportamento
HA-1 Sintética, não-absorvível (fabricante nacional 1)	Baixa	Alta	Alta	*
HA-2 Sintética, não-absorvível (fabricante nacional 2)	Baixa	Alta	Baixa	Pequena absorção
HA-3 Sintética, absorvível (fabricante nacional 2)	Média	Média	Média	Média absorção
HA-4 Sintética, absorvível (importada 1)	Média	Baixa	Média	Média absorção
HA-5 Natural, absorvível (fabricante nacional 1)	Baixa	Alta	Alta	*
HA-6 Natural, absorvível (importada 2)	Alta	Baixa	Alta	Elevada absorção

* A elevada % de carbonato e a elevada cristalinidade atuam de forma oposta não permitindo prever o efeito combinado sobre a tendência à absorção. Entretanto, se considerarmos os resultados dos testes de degradação esses dois materiais poderiam ser definidos como de elevada absorção.

Os critérios para a produção e comercialização de materiais de enxertos ósseos não são bem definidos pelas agências reguladoras responsáveis acarretando uma falta de controle dos materiais utilizados em humanos. Ficam descritas abaixo sugestões de testes que deveriam ser realizados quando da comercialização de materiais de enxertos ósseos:

1. Determinação da cristalinidade (DRX) e da quantidade de carbonato (IV);
2. Identificação de outras fases que não a HA (DRX e IV);
3. Testes de citotoxicidade;
4. Distribuição granulométrica (peneiramento ou laser) + Descrição da morfologia do material (MEV) **ou** medida de área superficial (BET);
5. Testes *in vitro* (degradação);
6. Testes *in vivo* em cobaias;
7. Estudo clínico longitudinal do material;

6- CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos das caracterizações e testes *in vitro* realizados nos grânulos das HAs do presente estudo permitiu que se chegasse às seguintes conclusões:

1. Todas as amostras comerciais eram compostas de HA sem a presença de outras fases.
2. No resultado da análise granulométrica observamos que apenas o fabricante da amostra HA-6 foi preciso nas informações fornecidas.
3. As amostras apresentaram valores diferentes de cristalinidade (de 30 a 92,3%), da área superficial (de 0,76 a 84,54 m²/g) e do % de carbonato.
4. O comportamento das amostras submetidas ao teste de bioatividade foi similar para todas as amostras.
5. O comportamento dos diferentes grânulos da HA quando inseridos no tecido ósseo será dependente das suas características químicas e físicas. Dentre essas, destacaríamos como mais importantes a composição química de fases, a cristalinidade, o teor de carbonato e a área superficial.

7- BIBLIOGRAFIA

AOKI, H.; 1994, *Medical application of hydroxyapatite*, 1ª edição, Tokyo, Ishiyaku, Euro Americana.

ANDRADE, MONICA C., 1994, *Cristalização Hidrotérmica da Hidroxiapatita*. Dissertação de Mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

ANÔNIMO, AUTOSORB-1: CATÁLOGO QUANTACHROME, 1998, Characterization of particle technology.

ASHOK M.; SUNDARAM N. M. e KALKURA S. M., 2002, “Crystallization of hydroxyapatite at physiological temperature”. *Materials letters*, 57, pp. 2066-2070.

BAUER, T. e MUSCHLER, G. F; 2000, Bone Graft Materials. In: *Clinical Orthopedics and Related Research*; nº 371; pp.10-27.

BECKER, W., CAHLIN, C., BECKER, B. E., et al., 1994, “The use of e-PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: A prospective multicenter study”. *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, Vol.9; pp.31-40.

BECKER, W. BECKER, B B. E., POLIZZI, G. et al., 1994, "Autogenous bone grafting of bone defects adjacent to implants placed into extraction sockets in patients: A prospective study". *Int. J. Oral Maxillofacial Implants*, Vol.9; pp.389-396.

BEZZI, G., CELOTTI, G., LANDI, E. et al., 2003, "A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation". *Materials chemistry and physics*, vol. 78; pp.816-824.

BEHNEKE, A., BEHNEKE, N. e D'HOEDT, B.; 2000, "Treatment of peri-implantitis defects with autogenous bone graft: Six-month to 3-year results of a prospective study in 17 patients". *Int. J Oral Maxillofac Implants*, vol. 15; pp. 125-138.

BLITTERSWIJK, V., GROTE, J., KUIJPERS, W. et al., 1986, "Macropore tissue ingrowth: a quantitative and qualitative study on hydroxyapatite ceramic". *Biomaterials*, vol.7; pp. 137-143.

BOHNER, M., 2000, "Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphates cements". *Injury, Int. J. Care Injured*, vol. 31; pp.37-47.

BROWN, P. W., 1993, "Hydroxyapatite Formation". *Earth and Minerals Science*, Vol. 19; pp.13-18.

BURG, K. J. L; PORTER, S. e KELLAN, J. F., 2000, “Biomaterial developments for bone tissue engineering”. *Biomaterials*, vol. 21, pp. 2347-2359.

CALLAN, D. P. e ROHRER, M. D., 1993, “Use of hydroxyapatite in the treatment of edentulous ridge defects: A human clinical and histologic case report”. *J. Periodontology*, 64 (6); pp. 575-582.

CAROTENUDO, G., SPANGNUOLO, G., AMBROSIO, L. et al. 1999, “Macroporous hydroxyapatite as alloplastic material for dental applications”. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 10; pp. 671-676.

DALBY, M. J., DI SILVIO, L., DAVIES, G. W., et al., 2000, “Surface topography and HA filler volume effect on primary human osteoblasts in vitro.” *Journal of materials science: material in medicine*, vol.11, Issue 12, pp. 807-810.

DALCONI, M. C., MENEGHINI, C., NUZZO, S. et al.,2003, “Structure of bioapatite foetal bones: An x-ray diffraction study”. ”. *Nuclear instruments and methods in physics research* ,vol. 200, pp.406-410.

DUCHEYNE, P. E QIU, Q., 1999, “Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function”. *Biomaterials*, vol. 20, pp.2287-2303.

FULMERA, M. T., ISON, I. C., HANKERMAYER, C. R. et al. 2002. “Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatite”. *Biomaterials*, vol.23; pp.751-755.

GARG, A. K., 1999, “Grafting Materials in Repair and Restoration”. In: *Tissue Engineering – Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*.Cap.5; Quintessence Books (Publishing).

GATTI, A. M., MONARI, E., POLI, G. et al., “Clinical long-term evaluation of hydroxyapatite granules implantation in periodontal defects”. *Key engineering materials*, vols. 192-195; pp 921-924.

GOMI, K.; LOWENBERG, B.; SHAPIRO, G. et al., 1993, “Resorption of sintered synthetic hydroxyapatite by osteoclasts in vitro”. *Biomaterials*, vol. 14; pp. 91-96.

HANSON, S.; LALOR, P. A.; NIEMI, S. M. et al., 1996, “Testing Biomaterials”. *Biomaterials Science – An Introduction to Materials in Medicine*. Cap. 5; pp.215-220.

HELMUS, M. N. E TWEDEN, K., 1995, “Materials Selection”. In: *Encyclopedic Handbook of biomaterials and bioengineering*, part A, vol. 1, pp. 27-59.

JUNQUEIRA, L. C. E CARNEIRO, J. 1982. *Histologia Básica*, 5ª edição, Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro – RJ.

KAY, S. A.; WISNER-LYNCH, L.; MARXER, M. et al., 1997, “Guided Bone Regeneration: Integration of a Resorbable Membrane and a Bone Graft Material”. *Pract Periodont Aesthetic Dent*, Vol. 9, nº 2, pp.185-194.

KESTENBACH, H-J. E BOTTA FILHO, W. J., 1989, *Microscopia eletrônica de transmissão e varredura*. Associação Brasileira de Metais / São Paulo. Édile serviços gráficos e editora Ltda.

KIM, H-M.; MIYAZAKI, T.; KOKUBO, T. E NAKAMURA, T., 2001. “Revised Simulated Body Fluid”. *Key Engineering Materials* Vols. 192-195, pp. 47-50.

KOKUBO T.; KIM, H-M. e KAWASHITA M., 2003, “Novel bioactive materials with different mechanical properties”. *Biomaterials*, article in press.

KUMAR T.S. S.; MANJUBALA I. e GUNASEKARAN J., 2000, “Synthesis of carbonated calcium phosphate ceramics using microwave radiation”. *Biomaterials*, vol. 21, pp. 1623-1629.

LANDI, E; TAMPIERI, A.; CELOTTI, G. et al., 2000, “Densification behavior and mechanisms of synthetic hydroxyapatite”. *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 20, pp.2377-2387.

LEGEROS, R.Z., 1993, “Biodegradation And bioresorption of calcium phosphates ceramics”. *Clinical materials*, vol.14; pp. 65-68.

LEGEROS, R.Z.; LEGEROS, J. P.; DACULSI, G.;KIJKOWSKA, R., 1995, “Calcium Phosphate Biomaterials: preparation, properties and biodegradations ”. *In: Encyclopedic Handbook of Biomaterials Anal*, vol I, part A, ed. Marcel, Dekka, N.Y., pp. 1429-1463.

LI, J.; LIAO, H. e SJOSTROM, M., 1997, “Characterization of Calcium Phosphates Precipitated from Simulated Body Fluid of Different Buffering capacities”. *Biomaterials*, vol.18, pp. 743-747.

LINDHE, J.; KARRING, T.; LANG N. P., 1999, *Tratado de periodontia Clinica e implantologia oral*, 3ª edição ,editora Guanabara Koogan.

LYNCH, S. E.; GENCO, R. e MARX, R. E.; 1999. *Tissue Engineering – Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Quintessence Books (Publishing).

MAVROPOULOS, E., ROSSI, A. M.; ROCHA, N. et al., 2003, "Dissolution of calcium-deficient hydroxyapatite synthesized at different condition – materials characterization". *Paper in press*.

MELCHER, A. H., 1976, "On the Repair Potential of Periodontal Tissues". *J. Periodontology*, Vol. 47, nº 5, pp. 256-260.

MISCH C., 1999, *Contemporary implant dentistry*, ed. Mosby.

MONTEIRO, M. M., 2002 "*Produção e caracterização in vitro de grânulos de fosfatos de cálcio para aplicação em enxertos ósseos*". Dissertação de mestrado, COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.

NAGASE, M, 1995, "*Host Reactions to Particulate Biomaterials*". In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials Anal*, vol. I, part A, ed. Marcel, Dekka, N.Y., Cap.8; pp.269-278.

OONISHI, H. E. e OOMAMIUDA, K., 1998, *Handbook of Biomaterial Properties*. cap. 8, pp. 406-419, editora J. Black e G. Hastings.

RAYNAUD S., CHAMPION, E., THOMAS, P.; 2002, "Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio I. Synthesis, characterization and stability of powers. *Biomaterials*, vol. 23, Issue 4, pp. 1065-1072.

RAYNAUD S.; CHAMPION E. e ERNACHE-ASSOLANT D., 2002, “Calcium phosphate apatites with variable Ca/P atomic ratio II. Calcination and sintering. *Biomaterials*, vol. 23, Issue 4, pp. 1073-1080.

ROBERTS, E., 1987. “Bone physiology and metabolism”. *California Dental Association Journal*.; pp. 54-61.

RODRIGUEZ-LORENZO, L. M.; VALLET-REGI, M. e FERREIRA, J. M. F. ; 2001. “Fabrication of hydroxyapatite bodies by uniaxial pressing from a precipitated power”. *Biomaterials* , vol.22 pp. 583-588.

SCHLIEPHAKE, H., NEUKMAN, F. W., KLOSA, D.; 1991. “influence of pore dimension on bone ingrowth into porous hydroxyapatite blocks used as bone graft substitutes. A histometric study”. *Int. Journal of Oral and Maxillofacial surgery*, vol. 20; pp. 53-58.

SILVA, M. H. P.; SOARES, G. ^a; ELIAS, N. C.; GIBSON , I. R.; BEST, S. M., 1999, “Bioactivity assessment of electrolytically deposited hidroxyapatite on titanium substrates”. *Bioceramics*, vol. 2, October, pp. 177-180.

SILVEIRA, M., 1995, “*Preparo de amostras biológicas para microscopia eletrônica de varredura*”. Laboratório de microscopia eletrônica, instituto de Física, Universidade de São Paulo.

SOUTHWORTH, H. N., 1975, *Introduction to modern microscopy*; Wykeham publications (London) LTD.

TAMPIERI, A., CELOTTI, G., SPRIO, S. et al., 2001, “Porosity-graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone”. *Biomaterials*, vol. 22, Issue 12, pp. 1365-1370.

TAS, A. C., 2000, “Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37⁰C in synthetic body fluids”. *Biomaterials*, Vol. 21, Issue14, pp. 1429-1438.

THOMAS, M. e LOWELL, S. F., 1992, “*Power/Particle; Characterization Techniques*”. *Ceramic industry*, Quantachrome corp., Boynton beach, FL.

TOTH, J. M.; LYNCH, K. L.; DEVINE, T. R., 1995, “Mechanical and Biological Characterization of Calcium Phosphates for Use as Biomaterials”. In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials Anal*, vol I, part A, ed. Marcel, Dekka, N.Y., pp. 1465-1497.

URIST, M., 1965, “Bone formation by auto induction”. *Science 150*; PP. 893-899.

VASCONCELOS, H., 2003, “Como escolher um analisador de tamanho de partículas”. *Manual de instrutécnica*”. Instrutécnica C. R. S. Ltda.; pp. 1-10.

WENG, J. e BAPTISTA, A. , 1996, “A new synthesis of hydroxiapatite”. *Journal of the European Ceramic Society*, vol.17; pp. 1151-1156.

WERNER, J., BRITA, L. K., FRIESS, W. et al., 2002, “Mechanical properties and in vivo cell compatibility of hydroxyapatite ceramics with graded pore structure”. *Biomaterials*, vol. 23; pp. 4285-4294.

YAMAMOTO, M. K.; LUZ, J. G. C. e ARAÚJO, V. C., 1994, “Resposta tecidual óssea frente a hidroxiapatita granular implantada em defeitos criados na mandíbula de ratos”. *Rev. Odontol. Univ. São Paulo*, Vol 8, nº 4, pp. 281-286.