



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
ENGENHARIA DE MATERIAIS



**MARCELINO GUEDES DE LIMA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO COMPÓSITO  $Al_2O_3/CaPs$  PARA USO  
NA CIRURGIA BUCOMAXILOFACIAL**

**CAMPINA GRANDE - PB**

**2013**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E ENGENHARIA DE  
MATERIAIS

**MARCELINO GUEDES LIMA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO COMPÓSITO  $Al_2O_3/CaPs$  PARA USO  
NA CIRURGIA BUCOMAXILOFACIAL**

Tese submetida à Universidade Federal de  
Campina Grande como parte dos requisitos para a  
obtenção do título de Doutor em Ciência e  
Engenharia de Materiais.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa (UAEMa/UFCG)

Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Elíria Maria de Jesus Agnolon Pallone (DCB/USP)

CAMPINA GRANDE - PB

**2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UFCG

L732a Lima, Marcelino Guedes.

Avaliação *in vitro e in vivo* do compósito Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs para uso na cirurgia bucomaxilofacial / Marcelino Guedes Lima. -- Campina Grande, 2013.

137 f. : il. color.

Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Centro Ciências e Tecnologia, 2013.

"Orientação: Profa. Dra. Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa, Prof. Dra. Elíria Maria de Jesus Agnolon Pallone.

Referências.

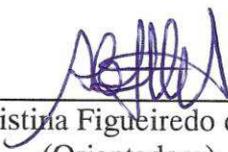
1. Compósitos Alumina/Fosfato de Cálcio. 2. Crescimento Celular. 3. Biocompatibilidade. 4. Traumatologia Bucamaxilofacial. I. Costa, Ana Cristina Figueiredo de Melo. II. Pallone, Elíria Maria de Jesus Agnolon. III. Título.

CDU 678.7(043)

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN VIVO* DO COMPÓSITO Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs PARA USO  
NA CIRURGIA BUCOMAXILOFACIAL**

**Marcelino Guedes de Lima**

Tese Aprovada em 28/06/2013 pela banca examinadora constituída dos seguintes membros:



---

Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa  
(Orientadora)  
UAEMa – UFCG



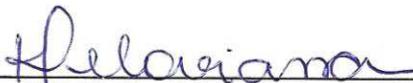
---

Dr<sup>a</sup>. Darlene Cristina Ramos Eloy Dantas  
(Examinadora Externa)  
DO/UEPB



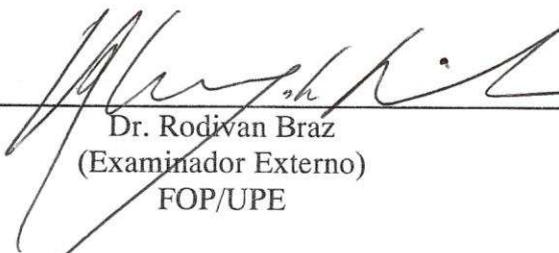
---

Dr. Gelmires de Araújo Neves  
(Examinador Interno)  
UAEMa/UFCG



---

Dr<sup>a</sup>. Kaline Melo de Souto Viana  
(Examinadora Externa)  
EC&T/UFRN



---

Dr. Rodivan Braz  
(Examinador Externo)  
FOP/UPE

## AGRADECIMENTOS

A Deus pela força que tem me dado a cada dia.

Aos meus familiares pela compreensão, carinho e apoio para a realização desta caminhada, meus sinceros agradecimentos.

A Professora Dra. Ana Cristina F. de Melo Costa, pela extrema orientação, dedicação, amizade, respeito e confiança em mim depositada.

A Professora co-orientadora Dra. Elíria Maria de Jesus Agnolon Pallone, pela co-orientação e realização dos ensaios de compressão diametral, e MEV discussão dos mesmos.

Prof. Dr. Anderson de Oliveira Lobo, Laboratório de Nanotecnologia Biomédica (NANO BIO), Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) pelos ensaios de citotoxicidade.

Ao médico veterinário Rodrigo Tavares Jordão de Vasconcelos pela colaboração na condução dos procedimentos cirúrgicos.

Aos Professores Dr. Marcus Vinicius Lia Fook e Dr. Marcelo Jorge Cavalcanti de Sá, pelo incentivo e estímulo para realização do doutorado.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais da Universidade Federal de Campina Grande, pela oportunidade de propiciar a participação de profissionais de outras áreas neste programa.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Melania Amorim pela ajuda, colaboração e dedicação no procedimento cirúrgico no estudo *in vivo* e interpretação dos resultados.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ruth Herta G. Aliaga Kiminami pelas análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A Clínica Odontológica Marques de Almeida Lima pelo apoio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuem na minha formação pessoal e profissional.

## RESUMO

Este trabalho tem como objetivo obter e caracterizar compósitos de alumina/fosfato de cálcio e avaliar *in vitro* e *in vivo* seu efeito como material de reconstrução óssea para aplicação na traumatologia bucomaxilofacial como substituto de perda óssea. O trabalho foi dividido em duas etapas: Etapa I - síntese química do fosfato de cálcio, preparação dos compósitos de  $Al_2O_3/CaPs$ , e caracterização; e Etapa II – estudo *in vitro* e *in vivo* dos compósitos em tíbias de coelhos. As amostras e os compósitos foram caracterizados por difração de raios X, espectroscopia de infravermelho, microscopia eletrônica de varredura, microscopia eletrônica de transmissão, distribuição granulométrica, adsorção de nitrogênio, densidade geométrica e compressão diametral. Antes de serem implantados, foi avaliado a citotoxicidade *in vitro*. Após eutanásia realizou-se a avaliação radiológica e histológica das áreas enxertadas. Os resultados confirmam a obtenção de fosfato de cálcio, cuja fase predominante foi o pirofosfato de cálcio, e fases secundária composta por fosfato tetracálcio e hidroxiapatita. Os compósitos obtidos apresentaram estrutura constituída da fase principal da alumina (matriz) e do pirofosfato de cálcio como fase secundária. Todos os compósitos apresentaram microestrutura formada por grãos bem definidos de alumina ( $Al_2O_3$ ) e do fosfato de cálcio. A elevação do teor de fosfato de cálcio nos compósitos causou um aumento no tamanho de grão e uma redução na resistência mecânica à compressão quando comparado à resistência a compressão da alumina pura. O estudo *in vitro* (citotoxicidade) indicou crescimento celular para todos os compósitos avaliados, incluindo a alumina pura. O estudo *in vivo* permitiu avaliar após eutanásia que os compósitos implantados nas tíbias de coelhos foram biocompatíveis, sendo um material promissor para utilização na traumatologia bucomaxilofacial como substituto de perda óssea.

Palavras Chaves: compósitos, alumina, fosfato de cálcio, crescimento celular, biocompatibilidade, bucomaxilofacial.

## ABSTRACT

This paper aims to obtain and characterize alumina/calcium phosphate composite and to evaluate *in vitro* and *in vivo* its effect as bone reconstruction material for application in maxillofacial traumatology as a substitute for bone loss. The work was divided into two stages: Stage I - chemical synthesis of calcium phosphate, preparation of alumina/calcium phosphate composites, and characterization, and Stage II - study *in vitro* and *in vivo* of composites in rabbit tibiae. The samples and composites were characterized by X ray diffraction, infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, particle size distribution, nitrogen adsorption, geometric density and diametrical compression. Before being implemented, the cytotoxicity was evaluated *in vitro*. After euthanasia it was performed histological and radiological evaluation of the grafted areas. The results confirm obtaining of calcium phosphate, whose predominant phase was calcium pyrophosphate and secondary phases were tetracalcium phosphate and hydroxyapatite. The obtained composites presented structure constituted of alumina (matrix) as main phase and calcium pyrophosphate as the secondary phase. All composite presented microstructure consisting of well-defined grains of alumina ( $Al_2O_3$ ) and calcium phosphate. The increase in calcium phosphate content in the composites caused an increase in grain size and a reduction in compressive strength when compared to the compressive strength of pure alumina. The *in vitro* study (cytotoxicity) indicated cell growth for all composites evaluated, including the pure alumina. The *in vivo* study allowed us to evaluate after euthanasia that the composites implanted in the rabbit tibia e were biocompatible, being a promising material for use in maxillofacial traumatology as a substitute for bone loss.

Key words: composite, alumina, calcium phosphate, cell growth, biocompatibility, maxillofacial.

## PUBLICAÇÕES

**LIMA, M. G., SANTOS, P. T. A., COSTA, A. C. F. M.** Estudo da temperatura de calcinação em amostras de fosfatos de cálcio sintetizadas pelo método de via direta In: 56° CONGRESSO BRASILEIRO DE CERÂMICA, 2012, Curitiba - PR. **56° CONGRESSO BRASILEIRO DE CERÂMICA**. São Paulo - SP: Associação Brasileira de Cerâmica, 2012, v. CDROM. p. 536 – 546.

SOUZA C. V., **LIMA, M. G.**, ELVIA LEAL, SÁ M. J. C., PALLONE, E. M. J. A., KIMINAMI, R. H. G. A., **COSTA, A. C. F. M.** Caracterização estrutural e morfológica da hidroxiapatita obtida por via úmida In: VI CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA MECÂNICA, 2010, Campina Grande. **Anais do VI CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA MECÂNICA**. São Paulo: Associação Brasileira de Engenharia e Ciências Mecânicas, 2010, v. CDROM. p. 1 – 7.

**LIMA, M. G.;** SOUZA C. V.; LEAL E.; PALLONE, E. M. J. A.; KIMINAMI, R. H. G. A.; **COSTA, A. C. F. M.** Caracterização microestrutural e mecânica de compósitos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/HAp para uso odontológico In: 54° Congresso Brasileiro de Cerâmica, 2010, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. São Paulo: Associação Brasileira de Cerâmica, 2010, v. CDROM. p. 2049 - 2060

A. C. F. M. COSTA; **M. G. LIMA**; L. H. M. A. LIMA; V. V. CORDEIRO; K. M. S. VIANA; C. V. SOUZA; H. L. LIRA. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. Revista Eletrônica de Materiais e Processos, v. 4.3 (2009) p. 29-38. ISSN 1809-8797.

**M. G. LIMA**, E. LEAL, TEIXEIRA, C. M. L. C.; E. M. J. A. PALLONE, A. C. F. M. COSTA, R. H. G. A. KIMINAMI. Microstructural and mechanical investigation of alumina/hydroxyapatite nanocomposites for use as bone graft for maxillofacial reconstruction. Submitted for Journal Materials Science, 2013.

## SIGLAS E ABREVIATURAS

- ACP - Fosfato de cálcio amorfo
- AKP – Alumina fornecida pela Sumitomo Co. Japan
- ALP - fosfatos alcalinos
- $Al_2O_3/CaPs$  - Compósito alumina/fosfato de cálcio
- $Al_2O_3/ZrO_2$  - Alumina/zircônia
- BC - Osso mandibular cortical bovino
- BCP – Fosfato de cálcio bifásico
- BCI – Infecção centrada no biomateriais
- BCMs – Enxerto ósseo
- BET - Brunauer, Emmett e Teller
- BSA – Biocerâmica de fosfato de cálcio
- CaPs - Fosfatos de cálcio
- CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- CMP - Metafosfato de cálcio ( $\alpha, \beta, \gamma$ )
- CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
- CPP - Pirofosfato de cálcio
- CPC – Fosfato de cálcio
- CPPD - Pirofosfato de cálcio dihidratado
- CRMV – Conselho Regional de Medicina Veterinária
- DCPD - Mono-hidrogênio fosfato de cálcio dihidratado
- DCP - Mono-hidrogênio fosfato de cálcio
- DCB – Departamento de ciências biológicas
- DO – Departamento de odontologia
- eHAp – Hidroxiapatita derivada de cascas de ovos
- EC&T – Escola de Ciências e Tecnologia
- FOP – Faculdade de Odontologia de Pernambuco
- FTIR – Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier
- HAp ou HA- Hidroxiapatita
- HCP - Fosfato heptacálcico
- HD - Dentina de um canino humano
- [hkl] – Família de planos cristalográficos
- hMsCs – Células tronco mesenquimais

hUCMSC - Células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano

IM – Intramuscular

INAMI – Instituto Nacional de Marcadores Integrado

IV – Intravenoso

KASIOS<sup>®</sup>TCP – KA - Enxerto ósseo com 99,9 % de  $\beta$ -TCP, osso sintético

LSZ – Proteínas lisozima/albumina

MBPC - Fosfato de cálcio bifásico

MCPM - Fosfato monocálcico mono-hidratado

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

Mg-PSZ - Cerâmicas à base de zircônia estabilizada com magnésia

MO – Microscopia ótica

Mo – Medula óssea

MPa – Mega Pascal

MSC ou BMSC ou hMSC – Células-tronco mesenquimais

NANOBIO - Laboratório de Nanotecnologia Biomédica

NO – Neoformação óssea

OCP - Fosfato octacálcico

ONU – Organização das Nações Unidas

Ot – Osso trabecular

p – Erro estatístico

PMMA – Polimetilmetacrilato

PRP – Plasma rico em plaquetas

PTFE - Politetrafluoretileno

Re – Regiões escuras

rhBMP-7 – Proteína recombinada

rhBMP-2 - Proteína humana morfogenética óssea recombinante

SBF – Soro fetal bovino

SEM – Scanning electronic microscopy

SHAp – Hidroxiapatita sintética

TCPss – Silício em solução sólida no TCP

TeCP - Fosfato tetracálcico

TCP - Fosfato tricálcico, ou tricálcio fosfato

TDHP - Di-hidrogênio fosfato tetracálcico

TEM – Transmission electronic microscopy  
t-ZrO<sub>2</sub> - Precipitados tetragonal de zircônia  
UAEMa – Unidade Acadêmica de Engenharia de Materiais  
UAMV – Unidade Acadêmica de Medicina Veterinária  
UFCG – Universidade Federal de Campina Grande  
UFE – Universidade de Pernambuco  
UFRN – Universidade Federal do Rio Grande do Norte  
UNIVAP - Universidade do Vale do Paraíba  
USP – Universidade de São Paulo  
XRD – X ray diffraction  
 $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> - Alfa alumina  
 $\alpha$ -TCP- Alfa-fosfato tricálcico  
 $\alpha'$ -TCP – Alfa' fosfato tricálcico  
 $\beta$ -TCP- Beta-fosfato tricálcico  
 $\gamma$ -TCP- Gama-fosfato tricálcico  
3D – Três dimensões

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Exemplos de biocerâmicas comercial de ortofosfato de cálcio. ....	27
Figura 2 - Estrutura Cristalina da $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ em 3D. ....	28
Figura 3 - Prótese de cabeça de fêmur. ....	30
Figura 4 - Regiões implantadas, (a) mento, (b), (c) e (d) seios da face. ....	36
Figura 5 - (a) Pré-operatório; (b) orthopantomografia para implante. ....	37
Figura 6 - Esquema da reconstrução mandibular com enxerto ósseo, destacando-se a realização de osteotomias para reprodução do contorno anatômico. ....	41
Figura 7 - Fluxograma para obtenção do CaPs pelo método de precipitação. ....	52
Figura 8 - Fluxograma do processo de obtenção dos compósitos $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ . ....	54
Figura 9 - Representação esquemática do ensaio de compressão diametral até a fissura. ....	58
Figura 10 - Representação esquemática da reação de redução do MTT a formazana. ....	61
Figura 11 - Localização da posição onde foram implantados os compósitos 10C, 30C e controle. ....	63
Figura 12 - Procedimento cirúrgico: (a) coelho anestesiado, (b) incisão, (c) exposição óssea, e (d) trepanação. ....	66
Figura 13 - Procedimento cirúrgico: (a) confecção do defeito, (b) implantação, (c) sutura, e (d) finalização da sutura. ....	66
Figura 14 - Pós-operatório: (a) curativo, (b) pós-operatório e (c) retirada dos pontos. ....	67
Figura 15 - Eutanásia e remoção das tíbias dos coelhos: (a) anestesia, (b) exposição da tíbia, (c) tíbias removidas, (d) tíbias no formol, (e) tíbia removida e (f) condicionamento. ....	68
Figura 16 - Difractogramas de raios X: (a) AC e (b) CaPs. ....	72
Figura 17 - Espectro vibracional na região do infravermelho: (a) AC e (b) CaPs. ....	76
Figura 18 - Distribuição de tamanho de aglomerados: a) alumina comercial e, b) CaPs. ....	77
Figura 19 - Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio: (a) alumina e (b) fosfato de cálcio. ....	78
Figura 20 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da alumina: (a) escala 20 $\mu\text{m}$ e; (b) escala 500 nm. ....	80
Figura 21 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do CaPs: (a) escala 20 $\mu\text{m}$ e; (b) escala 500 nm. ....	80

Figura 22 - (a) e (b) MET em campo claro, (c) padrão de difração da alumina comercial. ....	81
Figura 23 - (a) e (b) MET, e (c) padrão de difração para CaPs. ....	82
Figura 24 - Difratogramas de raios X dos compósitos sinterizados a 1350°C: (a) AC, (b) 5C, (c) 10C, (d) 15C, (e) 20C e (f) 30C. ....	84
Figura 25 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da alumina AC; (a) escala 5 µm e; (b) escala 1 µm. ....	86
Figura 26 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 5C; (a) escala 5 µm e; (b) escala 1 µm. ....	87
Figura 27 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 10C; (a) escala 5 µm e; (b) escala 1 µm. ....	87
Figura 28 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 15C; (a) escala 5 µm e; (b) escala 1 µm. ....	88
Figura 29 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 20C; (a) escala 5 µm e; (b) escala 1 µm. ....	88
Figura 30 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 30C; (a) escala 5 µm e; (b) escala 1 µm. ....	89
Figura 31 - Mapeamento dos íons presentes no compósito 5C: (a) micrografia da região da amostra onde foi realizado o mapeamento; (b) íons de oxigênio (O); (c) íons de alumínio (Al); (d) íons de fósforo (P); (e) íons de cálcio (Ca). ....	91
Figura 32 - Mapeamento dos íons presentes no compósito 10C: (a) região da amostra onde foi realizado o mapeamento; (b) íons de oxigênio (O); (c) íons de alumínio (Al); (d) íons de fósforo (P); (e) íons de cálcio (Ca). ....	92
Figura 33 - Mapeamento dos íons presentes no compósito 15C: (a) Região da amostra onde foi realizado o mapeamento; (b) íons de oxigênio (O); (c) íons de alumínio (Al); (d) íons de fósforo (P); (e) íons de cálcio (Ca). ....	93
Figura 34 - Mapeamento dos íons presentes no compósito 20C: (a) Região da amostra onde foi realizado o mapeamento; (b) íons de oxigênio (O); (c) íons de alumínio (Al); (d) íons de fósforo (P); (e) íons de cálcio (Ca). ....	94
Figura 35 - Mapeamento dos íons presentes no compósito 30C: (a) Região da amostra onde foi realizado o mapeamento; (b) íons de oxigênio (O); (c) íons de alumínio (Al); (d) íons de fósforo (P); (e) íons de cálcio (Ca). ....	95
Figura 36 - Valores experimentais médios da resistência mecânica à compressão referente aos compósitos Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /CaPs. ....	96
Figura 37 - Viabilidade celular apresentada para os compósitos. Como controle positivo para a citotoxicidade - luva de látex. Para o controle negativo para a citotoxicidade - papel de filtro. Amostras coletadas com o n = 5. * p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. ....	98

Figura 38 - Aspecto radiográfico das tíbias dos coelhos após 30 dias da realização do implante. ....	100
Figura 39 - Aspecto radiográfico das tíbias dos coelhos após 60 dias da realização do implante. ....	102
Figura 40 - Aspecto histomorfológico dos coelhos após 30 0 dias dos implantes: (a) orifício controle, aumento de 40x e (b) compósito 10C aumento de 40x. ....	105

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Aplicações clínicas dos biomateriais.....	22
Tabela 2 - Classificação das biocerâmicas. ....	25
Tabela 3 - Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio.....	33
Tabela 4 - Nomenclatura adotada para designar os compósitos de Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /CaPs.....	53
Tabela 5 - Implantação dos compósitos. ....	63
Tabela 6 - Escala gradual para avaliação do grau de radiopacidade da lesão óssea produzida experimentalmente na tíbia de coelhos.....	69
Tabela 7 - Fluorescência de raios X da alumina comercial e do CaPs calcinado a 900 °C/120 min.....	74
Tabela 8 - Valores de área superficial (S <sub>BET</sub> ), raio de poro (R <sub>P</sub> ), volume de poro (V <sub>P</sub> ) e tamanho de partícula (D <sub>BET</sub> ). ....	79
Tabela 9 - Resultados de densidade aparente (D <sub>a</sub> ), densidade relativa (D <sub>a</sub> /D <sub>t</sub> ) e porosidade aparente (P <sub>a</sub> ) para os compósitos Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /CaPs sinterizados 1350 °C.....	83
Tabela 10 - Percentuais de óxido presente teórico e determinado por fluorescência de raios X (EDX) para os compósitos Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /CaPs sinterizados a 1350 °C e para 100 % do CaPs. T – teórico; E – experimental; D – diferença entre o percentual teórico e experimental; e I – percentagem total de impurezas detectadas por EDX. ....	85
Tabela 11 - Valores de viabilidade celular (VC) para os compósitos, controle positivo (CP) e controle negativo (CN) para período de incubação de 24 e 48 horas.....	99
Tabela 12 - Grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 30 dias de pós-operatório.....	101
Tabela 13 - Grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 60 dias de pós-operatório.....	103
Tabela 14 - Avaliação do grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 30 dias de pós-operatório*.....	103
Tabela 15 - Avaliação do grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 60 dias de pós-operatório*.....	104

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	18
<b>1.2 Objetivos</b> .....	20
1.2.1 Objetivo Geral .....	20
1.2.2 Objetivos Específicos .....	20
<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	21
<b>2.1 Biomateriais</b> .....	21
<b>2.2 Biocerâmicas</b> .....	24
<b>2.3 Alumina</b> .....	27
2.3.1 Estrutura e Transformações Alotrópicas .....	27
2.3.2 Propriedades .....	28
2.3.3 Aplicações Biomédicas.....	29
<b>2.4 Fosfatos de Cálcio (CaPs)</b> .....	30
<b>2.5 Odontologia Bucomaxilofacial</b> .....	35
<b>2.6 Estado da Arte de Fosfatos de Cálcio e Compósitos Aplicados Enxertos Ósseo</b> .....	41
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	51
<b>3.1 ETAPA I - Materiais e Métodos Utilizados para a Obtenção do CaPs, dos compósitos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs e Caracterizações</b> .....	51
3.1.1 Materiais .....	51
3.1.2 Obtenção do Fosfato de Cálcio (CaPs).....	51
3.1.3 Preparação dos Compósitos Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> /CaPs.....	53
3.1.4 Caracterização .....	55
3.1.4.1 Difração de Raios X .....	55
3.1.4.2 Espectroscopia de Fluorescência de Raios X (EDX) .....	55
3.1.4.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	56
3.1.4.4 Distribuição Granulométrica .....	56
3.1.4.5 Análise Textural (BET).....	56
3.1.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	57
3.1.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	57
3.1.4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	57
3.1.4.8 Medidas Físicas .....	57
3.1.4.9 Compressão Diametral.....	57
<b>3.2 ETAPA II – Materiais e Métodos Utilizados para os Ensaios <i>In Vitro</i> e <i>In Vivo</i> para Implante dos Compósitos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs em Coelhos (<i>Oryctolagus Cuniculus</i>)</b> .....	58
3.2.1 Materiais .....	58
3.2.2 Procedimento <i>In Vitro</i> - Citotoxicidade .....	59
3.2.2.1 Preparação e Manutenção das Culturas Celulares .....	59
3.2.2.2 Análise da Viabilidade Celular Utilizando MTT.....	60
3.2.2.3 Análise Estatística para Citotoxicidade .....	62
3.2.3 Procedimento <i>In Vivo</i> .....	62
3.2.3.1 Animais .....	62
3.2.3.2 Preparação dos Compósitos para Implante .....	64
3.2.3.3 Procedimento Cirúrgico .....	64
3.2.3.4 Cuidados Pós-Cirúrgicos .....	65
3.2.3.5 Protocolo de Eutanásia .....	67
3.2.3.6 Remoção das Tíbias.....	67
3.2.3.7 Colheita e Processamento do Sítio Cirúrgico Pós-Eutanásia .....	68
3.2.3.8 Caracterização Após Implante .....	69
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	72

<b>4.1 ETAPA I - Caracterização da Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Comercial e do Fosfato de Cálcio (CaPs)</b> .....	72
4.1.1 Difração de Raios X .....	72
4.1.2 Espectroscopia de Fluorescência de Raios X (EDX) .....	74
4.1.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) .....	75
4.1.4 Distribuição Granulométrica .....	77
4.1.5 Adsorção de Nitrogênio (BET) .....	78
4.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	79
4.1.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	81
<b>4.2 ETAPA II – Conformação, Sinterização e Caracterização dos Compósitos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs</b> .....	82
4.2.1 Medidas Físicas .....	82
4.2.2 Difração de Raios X .....	83
4.2.3 Fluorescência de Raios X (EDX) .....	85
4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	86
4.2.5 Compressão Diametral .....	95
<b>4.3 ETAPA III – Procedimento <i>In Vitro</i> e <i>In Vivo</i> para Implante dos Compósitos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs</b> .....	97
4.3.1 Procedimento <i>In Vitro</i> – Citotoxicidade.....	97
4.3.2 Ensaio <i>In Vivo</i> : Aspecto Radiográfico .....	100
4.3.3 Ensaio <i>In Vivo</i> : Aspecto Histomorfológico .....	105
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	108
<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	109
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	110
<b>APÊNDICES</b> .....	123
<b>ANEXOS</b> .....	133

## 1. INTRODUÇÃO

A investigação das biocerâmicas por cientistas das mais diferentes áreas tornou-se intensa a partir dos anos 70, com a necessidade de obtenção de novos materiais para substituição de partes do corpo humano que foram destruídas ou danificadas, por consequência dos materiais metálicos até então em uso, começarem mostrar problemas no implante. As biocerâmicas apesar da baixa propriedade mecânica quando comparada aos metais, possuem vantagem de serem os materiais que mais se assimilam com o tecido do osso (AZEVEDO et al., 2007).

O tipo de cerâmica aplicada a biomateriais são aquelas de baixa densidade, conseqüentemente de alta porosidade que são utilizadas em casos onde se necessita de enxertos que acelerem a recuperação do tecido removido ou danificado. Isso ocorre porque a porosidade do material permite que o tecido invada os poros. Fosfatos de cálcio (CaPs), do tipo tricálcio, tetracálcio, octacálcico e hidroxiapatita e outras cerâmicas tais como alumina e zircônia, já foram investigados quanto suas reações *in vitro* e *in vivo*, revelando uma boa compatibilidade com células vivas (GOMIDE e ZAVAGLIA, 2006).

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

Para aplicações biomédicas, os fosfatos de cálcio, por exemplo, a hidroxiapatita (HAP -  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) tem sido o fosfato de cálcio mais utilizado devido à grande similaridade à fase mineral dos ossos e dentes humanos. Porém, outros fosfatos tais como o fosfato tetracálcio, fosfato tricálcico, e pirofosfato de cálcio também apresentam grande atrativo nas áreas biomédicas. Contudo, as propriedades mecânicas dos fosfatos de cálcio dependem do tamanho, forma, distribuição das partículas e da formação dos aglomerados, os quais influenciam o processo de densificação (sinterização do material com retração). Desta forma,

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

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

Assim, a motivação para a realização desta pesquisa se deu com base em vários aspectos:

- i) a importância comercial e tecnológica da alumina devido a suas excelentes propriedades, podendo ser utilizada em várias aplicações diferentes tais como componentes eletrônicos, sensores, material catalítico, membranas cerâmicas e como biomaterial;
- ii) o fato dos fosfatos de cálcio ser um material de compatibilidade com o corpo humano, fácil de sintetizar e economicamente viável pelo seu baixo valor comercial;
- iii) o avanço tecnológico no desenvolvimento de compósitos  $Al_2O_3/CaPs$ , utilizando propriedades de origem de cada material, visando um material de maior desempenho, e por fim;
- iv) a necessidade na área da odontologia de se obter um material que possibilite seu uso em aplicações na cirurgia bucomaxilofacial com boa compatibilidade, osseointegração, boa resistência mecânica, bioinerte e que seja economicamente viável sua aplicação.

Estes aspectos justificam, em si, a relevância deste trabalho, aliados ao crescimento no desenvolvimento de novos materiais para aplicações já existentes e também novas aplicações e com custo relativamente baixo, especificamente quando relacionados a área da odontologia.

## 1.2 Objetivos

### 1.2.1 Objetivo Geral

**Preparação e caracterização de compósitos de alumina/fosfato de cálcio ( $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ ) visando o estudo *in vitro* e *in vivo* visando à obtenção de um material substituto de perdas óssea na traumatologia bucomaxilofacial.**

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- 1. Obtenção do fosfato de cálcio (CaPs) pelo método de precipitação e caracterização do CaPs e da  $\text{Al}_2\text{O}_3$  comercial.**
- 2. Preparar compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  nas proporções de 0, 5, 10, 15, 20, e 30 % em peso de CaPs.**
- 3. Caracterizar por meio de difração de raios X, espectroscopia de infravermelho, distribuição granulométrica, microscopia eletrônica de transmissão e microscopia eletrônica de varredura nas matérias-primas: CaPs e da  $\text{Al}_2\text{O}_3$  comercial;**
- 4. Caracterizar os compósitos quanto a estrutura por difração de raios X, microestrutura por microscopia eletrônica de varredura e avaliar as propriedades mecânicas por meio de compressão diametral.**
- 5. Avaliar a biocompatibilidade dos compósitos por teste de citotoxicidade *in vitro*.**
- 6. Investigar o desempenho *in vivo* dos compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ , por meio de análise radiográficas e histológicos em tíbias de coelhos.**
- 7. Indicar o melhor compósito para uso na cirurgia bucomaxilofacial.**

## **2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Biomateriais**

Os materiais utilizados na substituição de ossos enquadram-se numa classe denominada de biomateriais, que devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos do hospedeiro, de modo a estimular uma resposta adequada aos mesmos. Tais propriedades caracterizam a biocompatibilidade. Os materiais sintéticos utilizados para estes fins podem ser metais, polímeros, compósitos, cerâmicas e vidros (WONG e BRONZINO, 2007). Inúmeros dispositivos e materiais são utilizados no tratamento de doenças ou ferimento, como exemplo pode citar: suturas, agulhas, cateteres, placas, obturações dentárias, próteses, entre outros.

Em geral, biomateriais utilizados na reposição dos chamados tecidos moles são muito diferentes daqueles usados na substituição de tecidos duros (ossos e dentes). Para os tecidos duros, dependendo do esforço mecânico a que são submetidos, alguns materiais podem ser mais apropriados que outros, devido à sua maior resistência. A Tabela 1 relaciona algumas aplicações de biomateriais sintéticos (KAWACHI et al., 2000).

Os primeiros implantes bem-sucedidos foram introduzidos no sistema esquelético. Placas de metais foram introduzidas em humanos no início dos anos 1900 para ajudar na fixação de ossos longos. Muitas dessas placas não obtiveram bons resultados, pois possuíam desenho mecânico pouco sofisticado e apresentavam concentração de tensão na superfície dos implantes. Outros materiais, como o aço-vanádio, que foi escolhido por suas boas propriedades mecânicas, sofreram corrosão rapidamente no corpo de humanos e causou efeitos adversos sobre a cicatrização tais como inflamações. Após a introdução de aços inoxidáveis e ligas de cromo-cobalto em 1930, foi alcançado o maior sucesso em fixação de fratura e o primeiro implante de joelho foi realizado (WONG e BRONZINO, 2007).

A diversidade das aplicações dos biomateriais apresentada na Tabela 1, assim como o amplo espectro de sua composição química e a necessidade de formas e morfologias apropriadas para sua utilização, faz da pesquisa nesta área do conhecimento um trabalho de característica eminentemente interdisciplinar, envolvendo fatores que definem o sucesso de suas aplicações, tais como: rotas de síntese, processamento em formas variadas, qualidade e esterilidade clínica e resposta do tecido hospedeiro (KAWACHI et al., 2000).

**Tabela 1** - Aplicações clínicas dos biomateriais.

<b>Biomaterial</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>	<b>Aplicações</b>
<b>Polímeros</b>			
Poliétileno PTFE Poliéster Poliuretano PMMA Silicone	Elasticidade, Fácil fabricação e baixa densidade	Baixa resistência mecânica, Degradação dependente do tempo	Suturas, artérias, veias, maxilofacial (nariz, orelhas, maxilar, mandíbulas e dentes); cimento, tendão artificial; oftalmologia.
<b>Metais e ligas</b>			
Aço inoxidável Ligas de titânio Ligas de cobalto-cromo	Alta resistência à tensão, alta resistência a desgaste, energia de deformação alta	Baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, perda das propriedades mecânicas com tecidos conectivos moles, alta densidade	Fixação ortopédica (parafusos, pinos, placas, fios e hastes); implantes dentários
<b>Cerâmicas e vidros</b>			
Alumina Zircônia Carbono Fosfatos de cálcio Porcelana Vidros bioativos	Boa biocompatibilidade, resistência à corrosão, inércia, alta resistência à compressão	Baixa força de tensão, baixa resistência mecânica, baixa elasticidade, alta densidade	Ossos, juntas, dentes, válvulas, tendões, vasos sanguíneos e traqueias artificiais.
<b>Compósitos</b>			
Fibra de carbono- resina termofixa Fibra de carbono- termoplástico Carbono-carbono Fosfato de cálcio- colágeno	Boa biocompatibilidade, inércia, resistência à corrosão, alta força de tensão	Material de fabricação incompatível	Válvula cardíaca artificial (carbono ou grafite pirolítico), implantes de juntas de joelho (fibra de carbono reforçada com polietileno de alta densidade)

Fonte: KAWACHI et al., 2000.

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

Várias definições têm sido estabelecidas para definir o termo “biomateriais”. O consenso desenvolvido por especialistas neste campo é os seguintes: “biomateriais (ou

materiais biomédicos) são definidos como materiais sintéticos ou naturais a serem utilizados para substituir partes de um sistema vivo ou para funcionar em contato íntimo com os tecidos vivos” (WILLIAMS, 1999; WILLIAMS, 1986). No entanto, muito recentemente, uma definição mais complicada tem sido publicada: " Um biomaterial é uma substância que foi projetada a assumir uma forma que, por si só ou como parte de um sistema complexo, é usado para controle das interações com componentes de sistemas vivo, de qualquer processo de diagnóstico ou terapêutico, em medicina humana ou veterinária. " (WILLIAMS, 2009).

Em geral, biomateriais destina-se a interagir com sistemas biológicos para avaliar, tratar aumentar ou substituir qualquer tecido, órgão ou função do corpo e são usados num certo número de aplicações diferentes em todo o corpo (BEST E PORTER, 2008). A principal diferença de biomateriais de outras classes de materiais é a sua capacidade de se manter num ambiente biológico sem danificar o ambiente, e sem serem danificados nesse processo (DOROZHKIN, 2010).

Outras definições mais recentes são relatadas, por exemplo: “biomateriais diferem exclusivamente de materiais sintéticos, por serem derivado de animais ou tecido humano e preservar, em algum grau, as propriedades biológicas originais e a estrutura da matriz extracelular desse tecido”. Em geral, estes materiais não só servem inicialmente como uma ponte mecânica funcional ou reforço, mas após o implante, também atuar como um andaime (*scaffolds*) biológico que pode ser reformado com o tecido do hospedeiro (KIM, GREGORY e EVANS, 2012).

Segundo Chen, Liang e Thouas (2013), o termo biomaterial é “qualquer instrumento, aparelho, instrumento, máquina, aparelho, implantes, reagente ou calibrador *in vitro*, software, material ou outro similar, ou artigos relacionados, destinados pelo fabricante a ser utilizado, sozinho ou em combinação, em seres humanos para uma ou mais dos fins específicos de diagnóstico, prevenção, controle, tratamento, investigação, apoio ou sustentação da vida, controle da concepção, e desinfecção dos dispositivos médicos".

A escolha e a classificação de um biomaterial estão diretamente relacionadas com a reação do meio biológico a este. De maneira geral, quando qualquer material é implantado no corpo ocorrerá reação do meio a esta “invasão”. Da interação implante-hospedeiro (meio biológico), podem ocorrer quatro situações: a necrose (lise celular), que ocasiona a morte tecidual; a formação de uma cápsula fibrosa não aderente em torno do implante, não implicando em ligação ou em rejeição, caso o material seja biologicamente inerte; a formação de uma ligação química (bioadesão) na superfície do implante bioativo, devido a uma resposta biológica específica na interface com o tecido vivo, seguida da dissolução e/ou absorção do

tecido; a dissolução do implante, como no caso dos materiais biodegradáveis ou reabsorvíveis. Esses materiais têm uma maior afinidade ao corpo humano, começando por dissolução (reabsorção) e vagarosamente proporcionando a gênese de estruturas orgânicas específicas, de acordo com o local de aplicação e com o biomaterial utilizado (WONG e BRONZINO, 2007).

O conceito de biomateriais é fundamentado no conhecimento da interação sinérgica da ciência dos materiais, ciências biológicas, ciência química, ciência médica e a ciência mecânica, e requer a compreensão de todos estes domínios, de modo que os biomateriais implantados desempenhem adequadamente em um corpo vivo as funções normais do corpo. A final pretende-se alcançar a interação biológica correta entre o biomaterial do implante com os tecidos vivos de um hospedeiro (VALLET-REGI', 2008; BUDDY et al., 2013).

Diferentes materiais são usados cada vez mais na medicina moderna principalmente em aplicações de trauma, cirurgia oncológica ou para substituir problemas pré-existentes, dando suporte ou restaurando a função do corpo humano, como por exemplo, em próteses de quadril, próteses valvulares cardíacas ou cateteres, próteses em cardiovascular, ortopédico, dentário, oftalmológico, cirurgia de reconstrução e em outras intervenções, tais como suturas cirúrgicas, bioadesivos e os dispositivos de libertação controlada de drogas (BUDDY et al., 2013).

## **2.2 Biocerâmicas**

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

Devido à sua alta resistência semelhante a das fibras (naturais ou sintéticas) e sua biocompatibilidade, a cerâmica também está sendo usada como reforço de componentes de materiais compósitos para implante e para aplicações em tendões e ligamentos artificiais. Para ser classificado como biocerâmicas, o material cerâmico deve atender ou exceder as seguintes

propriedades: não tóxico, não carcinogênico, não alérgico, não inflamatório, biocompatível e biofuncional (WONG e BRONZINO, 2007).

A utilização de gesso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ ) como biomaterial, data de 1894 como um possível substituto para ossos. Este material apresenta uma resistência mecânica muito baixa e é completamente reabsorvido pelo organismo, resultando em uma rápida fragmentação e degradação. Tais propriedades pouco atrativas praticamente excluíram a utilização do gesso como biocerâmica implantável (KRIEGER, 2003).

A alumina densa - coríndon ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ) se destacou como biocerâmica, tendo seu uso muito difundido. A seleção de alumina como um biomaterial, data a mais de 40 anos atrás, foi com base em boas características bioinerte, alta resistência à corrosão, elevada resistência mecânica, dureza, excelente biocompatibilidade e estabilidade no corpo humano (PICONI et al., 2003). Devido a estas propriedades, este material vem sendo usado até os dias de hoje com frequência, em próteses ortopédicas que substituam ossos ou parte deles que são submetidos, na sua atividade funcional, a esforços elevados (AFFATATO et al., 2012).

Segundo Wong e Bronzino (2007) as biocerâmicas podem ser classificadas de acordo com a estrutura física e interação com o meio biológico. Estas características estão apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Classificação das biocerâmicas.

<b>Tipo de biocerâmicas</b>	<b>Interações com os tecidos</b>	<b>Exemplos</b>
Inertes	Não há interações químicas nem biológicas	Alumina
Porosas	Ocorre o crescimento interno dos tecidos através dos poros	Alumina e hidroxiapatita porosos
Bioativas	Ocorre uma forte ligação na interface osso-implante	Biovidros, hidroxiapatitas e vitro-cerâmicas
Reabsorvíveis	As cerâmicas são degradadas e substituídas pelos tecidos	Sulfato de cálcio e Fosfato tricálcio

Fonte: WONG e BRONZINO, 2007.

A grande aceitação das biocerâmicas a base de sais de fosfato de cálcio deve-se, principalmente, ao seu alto grau de biocompatibilidade, que está relacionada com a sua similaridade química com relação à dos materiais normalmente encontrados no tecido ósseo. Entre as cerâmicas com melhor desempenho, estão os biovidros, a alumina, o beta-fosfato tricálcico ( $\beta\text{-TCP}$ ) e a hidroxiapatita (HAp). Desta forma o grande interesse pela HAp como biomaterial, está relacionado com o fato desta ser a principal fase mineral encontrada no tecido ósseo e ter alta biocompatibilidade (SVANBORG et al., 2011). Porém, outras fases de

fosfatos de cálcio também se mostram atrativas para aplicações biomédicas, principalmente quando relacionadas à obtenção de cimentos ou preenchimento de cavidades (COMBES e REY, 2010).

Além da alumina densa (AFFATATO et al., 2012), outras cerâmicas como a zircônia ( $ZrO_2$ ) (GERGELY et al., 2013), o dióxido de titânio ( $TiO_2$ ) (TIAINEN, WIEDMER, HAUGEN, 2013), os fosfatos de cálcio e as vitrocerâmicas de sílica/fosfato de cálcio (NEZAFATI et al., 2013), apresentam uso muito difundido atualmente. O uso das biocerâmicas tem se estendido desde o emprego isolado do material até outras formas de utilização, como por exemplo, no revestimento de próteses metálicas ou na associação com materiais poliméricos, tais como o colágeno, polietileno de ultra-alto peso molecular e quitosana (BYELY et al., 2012; BALDASSARRI et al., 2011; CROISIER E JÉRÔME, 2013).

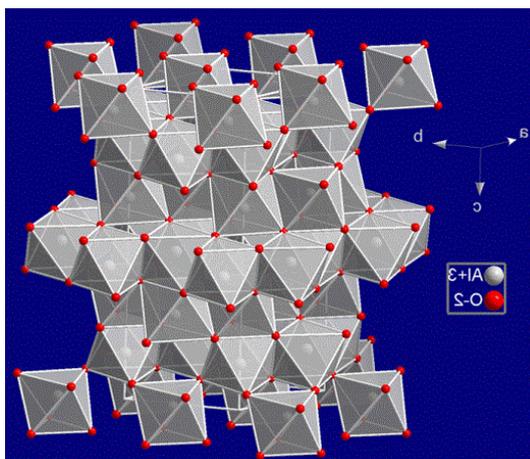
As cerâmicas empregadas no corpo humano podem ser divididas nas três classificações de biomateriais (Tabela 2): inerte, biodegradável e bioativo (os três principais tipos de resposta de tecidos). Os materiais inertes (mais estritamente quase inertes) causam resposta de tecidos mínima ou nula. Materiais ativos estimulam a ligação de tecido vizinho com, por exemplo, estímulo de novo crescimento ósseo. Materiais degradáveis, ou reabsorvíveis, são incorporados no tecido vizinho, ou podem até mesmo ser completamente dissolvidos após certo período de tempo (GOMIDE e ZAVAGLIA, 2006).

Como exemplos de biocerâmicas bioinertes podemos citar a alumina ( $\alpha$ -  $Al_2O_3$ ), zircônia ( $ZrO_2$ ) e dióxido de titânio ( $TiO_2$ ). Por outro lado, uma biocerâmica bioativa é definida como aquela que induz uma atividade biológica específica. Como exemplos destas últimas destacam-se a hidroxiapatita [ $Ca_{10}(P_4O)_6(OH)_2$ ], o fosfato tricálcico [ $Ca_3(PO_4)_2$ ] os biovidros. Como materiais cerâmicos reabsorvíveis como exemplo, temos o aluminato de cálcio (WONG e BRONZINO, 2007; VALLET-REGI e GONZÁLEZ-CALBET, 2004).

Biocerâmicas satisfazem necessidades tão diversas quanto: baixos coeficientes de atrito para a lubrificação de próteses de juntas, superfícies de válvulas de coração que evitam coagulação do sangue, materiais que estimulem o crescimento ósseo e aqueles que podem prender espécies radioativas para tratamentos terapêuticos. Estes materiais podem ser encontrados na forma de microesferas, camadas ou coberturas finas em implantes metálicos, redes porosas, e componentes poliméricos (compósitos) (GOMIDE e ZAVAGLIA, 2006).

As biocerâmicas de ortofosfato de cálcio são utilizadas em uma série de aplicações diferentes em todo o corpo, cobrindo todas as áreas do esqueleto. As aplicações incluem implantes dentários, dispositivos percutâneos e uso no tratamento periodontal, tratamento de defeitos ósseos, tratamento de fratura, substituição total da articulação (aumento de osso),



**Figura 2** - Estrutura Cristalina da  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  em 3D.

Fonte: File: Corundum.Gif, 2013.

Isto amplia no campo de utilização desta fase principalmente em aplicações a temperaturas elevadas (800-1200 °C), tal como catalisadores para jatos propulsores, conversores de escape de automóveis e muitos compósitos práticos de combustão. Com relação à fase alfa, altas temperaturas de transformação sempre resultam no crescimento das partículas e formação de aglomerados duros no material. A presença destes aglomerados dificulta a sinterização e densificação do material e prejudicando suas propriedades mecânicas (BAUMANN et al., 2005).

### 2.3.2 Propriedades

A alumina pura é um dos representantes mais destacados do grupo dos materiais cerâmicos especiais. Apresenta uma série de propriedades favoráveis, tais como: alta dureza, boa resistência ao desgaste, excelente estabilidade contra ataque químico e oxidação e boa estabilidade térmica. Estas propriedades permitem a utilização da alumina como material abrasivo, revestimento de fornos, componentes para implantes ortopédicos e odontológicos, pedras preciosas e aplicações nas áreas espaciais e aeroespaciais. Outra aplicação da alumina com tamanhos de partículas na escala nanométrica visa atender às solicitações do crescente mercado de cerâmicas porosas usadas em membranas de ultrafiltração e suportes de catalisador. Nestas aplicações, a alumina na fase cristalina alfa ( $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) é a preferida, uma vez que este material é quimicamente muito mais resistente do que as outras fases de transição da alumina (CASTRO, 2005).

Por suas qualificações tecnológicas e viabilidade econômica crescente, a alumina é utilizada em uma vasta série de processos industriais. A alumina possui dois planos de

deslizamentos: basal e prismática, que podem ocorrer em temperaturas próximas a 1000 °C. A alfa alumina possui boas propriedades mecânicas em comparação com outros óxidos cerâmicos. Somente os óxidos de zircônio e de tório são comparáveis na resistência compressiva da alumina (EDRISSI e NOROUZBEIGI et al., 2007).

Algumas propriedades como a alta dureza, resistência ao desgaste, resistência ao ataque químico, resistência à corrosão ao ar e estabilidade termodinâmica, e o fato de manter a resistência em temperaturas altas coloca a alumina como um típico representante da classe das cerâmicas estruturais. No entanto, a alumina possui limitações como todo material empregado na engenharia. A alumina é um material que apresenta uma alta fragilidade, baixa tenacidade à fratura ( $3 - 5 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ ) e susceptibilidade ao choque térmico e mecânico. Seu módulo de elasticidade é afetado pelo aumento da temperatura acima de 1000 °C, onde ocorrem solitações inelásticas e prováveis deslizamentos de planos cristalinos. A presença de poros também é responsável por uma grande variação na elasticidade do material, sendo que um aumento de 5 % na porosidade reduz o módulo de Young em aproximadamente 20 % (WANG et al., 2003).

### 2.3.3 Aplicações Biomédicas

A alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) é um material altamente inerte e resistente à maioria dos ambientes corrosivos, incluindo o ambiente altamente dinâmico que é o corpo humano. Em condições fisiológicas é praticamente inerte, causando pouca ou nenhuma resposta dos tecidos em volta do implante e mantendo-se essencialmente inalterado. No entanto, o corpo humano a reconhece como material estranho e procura isolá-lo formando uma camada de tecidos fibroso não aderente em volta do implante. As principais características que tornam a alumina adequada para ser utilizada como biomaterial, quando comparada com outros biocerâmicas aplicados a biomateriais são (PEZZOTTI et al., 2010): alto grau de inércia química sob condições fisiológicas; alta resistência de uso; habilidade de ser polida com alto acabamento superficial; dureza excelente; maior tenacidade à fratura; maior resistência mecânica à flexão e; menor módulo de elasticidade.

Devido à possibilidade de polimento com alto acabamento superficial e sua excelente resistência de uso, a alumina é muito utilizada em superfícies em próteses de substituição de juntas, tais como cabeças fêmures para substituições de quadris e placas de uso em substituições de joelhos. Cabeças fêmures de alumina foram utilizadas em conjunto com uma haste femural metálica e um copo acetabular feito de polietileno de peso molecular muito alto

(*ultra high molecular weight polyethylene*– UHMWPE) (FOOK, 2005).

Alumina porosa também pode ser utilizada para repor grandes áreas do osso que tenha sido removida devido às enfermidades, como câncer. A natureza porosa destes materiais permite que o osso cresça dentro dos poros, permitindo, a proliferação dos osteoblastos, favorecendo ao crescimento ósseo. A alumina também é utilizada em aplicações dentárias. Especificamente para substituição de dentes, áreas da face, mandíbula e do crânio. (KARLSSON et al., 2003). A Figura 3 ilustra uma prótese de cabeça de fêmur de alumina.

**Figura 3** - Prótese de cabeça de fêmur.



Fonte: Kim, et al., 1999.

## 2.4 Fosfatos de Cálcio (CaPs)

Fosfato de cálcio é o nome dado a um grupo de minerais que contém íons de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) juntamente com ortofosfatos ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), metafosfatos ou pirofosfatos ( $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ ) e ocasionalmente hidrogênio ou íons de hidróxido. Sua fórmula molecular é  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (FERNANDES, 2007). O fosfato de cálcio na rocha ígnea e sedimentar é exclusivamente apatítico. Originalmente, todas as apatitas terrestres estão presentes em rochas ígneas. Através do tempo geológico, a extensa e contínua lixiviação dessas rochas primárias pelas águas tem sido uma fonte para a formação de fosfato de cálcio biológico, na forma de apatita (PAIVA, 2011).

Os esqueletos de algumas espécies marinhas também são fontes deste mineral. Alguns contêm carbonato de cálcio, porém a maioria contém fosfato de cálcio. Os esqueletos que não são reabsorvidos no ciclo da vida, carnívoro do mar depositam-se no fundo de mares, oceanos e lagos formando depósitos minerais. Alguns autores acreditam que depósitos de apatitas

podem também ser formados por precipitação direta da água do mar, e alguns dos depósitos de carbonatos de cálcio são convertidos em apatita pela reação direta com fosfato dissolvido. A precipitação de fosfato de cálcio dos oceanos, mares e lagos produzem apatitas formadas por cristais de tamanho muito pequeno e com propriedades dependente da sua alta área superficial por unidade de massa (PAIVA, 2011).

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

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

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

Além destas importantes aplicações, os fosfatos de cálcio também fornecem o suprimento de fosfatos que são extensamente utilizados na produção de fertilizantes, colunas

cromatográficas, indústria de alimentos e na indústria farmacêutica, em cremes dentais (ANDERSSON et al., 2005).

Biocerâmicas de fosfato de cálcio vêm sendo usadas na liberação controlada de fármacos mediante administração via oral do medicamento associado a um polímero (por exemplo, colágeno, quitosana), ou da associação do fármaco com o biomaterial, onde este além de substituir ou reparar algum defeito ósseo terá o medicamento sendo liberado no local, em que o implante foi realizado (ONER et al., 2011). Na década passada estudos *in vitro* foram realizados, utilizando-se alguns fármacos das classes de hormônios de crescimento, antibióticos, antiinflamatórios e quimioterápicos. No tratamento de tumores ósseos, a introdução de fármacos de ação anticancerígena em blocos de hidroxiapatita porosa foi atrativa, pois combinou o tratamento do tumor com a substituição do osso doente (LINEARES e BRIKGI, 2006; HU et al. 2007).

De forma genérica, as biocerâmicas de fosfato de cálcio se degradam, na seguinte ordem:  $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaHPO}_4 > \text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O} > \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 > \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ . A reabsorção do material que representa esta degradação é causada pela dissolução, que depende do produto de solubilidade do material e do pH local no meio fisiológico, pela desintegração física em partículas menores e, ainda, por fatores biológicos, como a fagocitose, a presença de leucócitos e de mediadores químicos que causam a redução do pH local. A velocidade de reabsorção pode aumentar com o aumento da área superficial [ $A_{\text{pó}}$  (Área superficial do pó)  $> A_{\text{sólido poroso}}$  (Área superficial do sólido poroso)  $> A_{\text{sólido denso}}$  (Área superficial do sólido denso)], com o decréscimo da cristalinidade e, no caso da hidroxiapatita, pela substituição de  $\text{CO}_3^{2-}$  nos sítios de fosfato e por  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  nos sítios de cálcio (KAWACHI et al., 2000).

Porém, fosfatos de composições estáveis podem ter a relação Ca/P estendida para aproximadamente 1,5. Este fosfatos é biodegradável e biocompatível, sendo parcialmente reabsorvido entre 6 e 15 semanas após o implante, dependendo de sua porosidade (APARECIDA et al. 2007). As possíveis relações Ca/P dos fosfatos de cálcio, os nomes e as fórmulas químicas estão apresentados na Tabela 3.

Dentre as cerâmicas de fosfato de cálcio, o fosfato tricálcico em sua forma polimórfica  $\beta$  ( $\beta$ -TCP), é uma cerâmica bioabsorvível, tem sido alvo de inúmeras pesquisas, por apresentar estabilidade química, resistência mecânica e taxa de bioabsorção mais adequadas a aplicações em implantes que seus outros polimorfos (RYU et al., 2002). Entretanto, uma das desvantagens apresentadas por estas biocerâmicas é a sua reduzida resistência mecânica, que restringe sua utilização a regiões que não requeiram altos esforços mecânicos. Esta limitação está relacionada à relativamente baixa temperatura de transformação para a fase polimórfica

$\alpha$ , que ocorre por volta de 1200°C. Isto ocasiona defeitos (trincas) no material, reduzindo a sua resistência mecânica (RYU et al., 2002; ENDERLE et al., 2005).

**Tabela 3** - Razão Ca/P dos fosfatos de cálcio.

Fosfatos de cálcio	Fórmula química	Ca/P
Fosfato tetracálcico (TeCP)	$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$	2,0
Hidroxiapatita (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,67
Fosfato de cálcio amorfo (ACP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2.n\text{H}_2\text{O}$	1,5
Fosfato tricálcico ( $\alpha$ , $\alpha'$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (TCP)	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1,5
Fosfato octacálcico (OCP)	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6.5\text{H}_2\text{O}$	1,33
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio dihidratado (DCPD)	$\text{CaHPO}_4.2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Mono-hidrogênio fosfato de cálcio (DCP)	$\text{CaHPO}_4$	1,0
Pirofosfato de cálcio (CPP)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$	1,0
Pirofosfato de cálcio dihidratado (CPPD)	$\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7.2\text{H}_2\text{O}$	1,0
Fosfato heptacálcico (HCP)	$\text{Ca}_7(\text{P}_5\text{O}_{16})_2$	0,7
Di-hidrogênio fosfato tetracálcico (TDHP)	$\text{Ca}_4\text{H}_2\text{P}_6\text{O}_{20}$	0,67
Fosfato monocálcico mono-hidratado (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2.H_{20}$	0,5
Metafosfato de cálcio ( $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$ ) (CMP)	$\text{Ca}(\text{PO}_3)_2$	0,5

Fonte: Aparecida et al., 2007.

A hidroxiapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , com razão Ca/P igual a 1,67 e é o fosfato de cálcio mais estável e o menos solúvel de todos. É o constituinte mineral natural encontrado no osso representando de 30 a 70 % da massa dos ossos e dentes. A hidroxiapatita sintética possui propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, o que a torna substituta do osso humano em implantes e próteses, daí o grande interesse em sua produção. Estas propriedades somadas à sua alta capacidade de adsorver e/ou absorver moléculas fazem da hidroxiapatita um excelente suporte para ação prolongada de drogas anticancerígenas no tratamento de tumores ósseos, e também eficiente no tratamento de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (ZHAO et al., 2011).

O uso clínico da hidroxiapatita é limitado devido a sua lenta biodegradação. Estudos efetuados por longos períodos de tempo têm mostrado que a hidroxiapatita começa a ser reabsorvida gradualmente após 4 ou 5 anos de implante. A reabsorção é uma característica desejada para um biomaterial em alguns tipos de implantes, nos quais o processo de degradação é concomitante com a reposição do osso em formação (REIS, 2008). Porém, seu uso é muito difundido na área ortopédica, principalmente, devido ser biocompatível, atóxica e não alergênica e possuir boa bioatividade, ou seja, forte interação cerâmica/tecido ósseo, características que, levam esse material a ter uma grande aceitação como implante (GOLLER et al., 2004).

Com exceção do pirofosfato de cálcio ( $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ), a maioria dos fosfatos de cálcio está

presente *in vivo* na forma de ortofosfatos de cálcio. Os ortofosfatos de cálcio são sais de ácido fosfórico tribásico  $H_3PO_4$ , e assim podem formar compostos que contêm os íons  $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$  ou  $PO_4^{3-}$ . Os fosfatos que contêm os íons  $HPO_4^{2-}$  e  $PO_4^{3-}$ , geralmente, constituem os fosfatos de cálcio biologicamente importantes (ocorrem na fase mineral de ossos e dentes e também em várias calcificações patológicas), enquanto que aqueles apenas com íons  $H_2PO_4^-$  normalmente não são encontrados em condições fisiológicas, mas são comercialmente importantes como componentes em fertilizantes (SILVA, 2006).

O pirofosfato de cálcio é considerado um fosfato condensado ou polimérico, obtido por condensação e polimerização dos grupos  $PO_4^{3-}$  (OLIVEIRA et al., 2009). Os íons, pirofosfatos ou difosfatos são inibidores da formação de cristais de hidroxiapatita e são essenciais para o controle de biomineralização (GROVER et al., 2005). Apesar dos pirofosfatos inibir a formação mineral, os osteoblastos segregam nos fosfatos alcalinos (ALP), que pode hidrolisar os íons de pirofosfato provocando a perda deste efeito inibidor na formação da hidroxiapatita e supersatura o fluido extracelular com ortofosfatos que induzem mineralização. Seu mecanismo tem demonstrado ser essencial para o controle da mineralização óssea. Com a exceção da fase altamente insolúvel e termicamente estáveis  $\beta$ -pirofosfato dicálcico, os pirofosfatos são relativamente inexplorado em aplicações de substituição de enxerto ósseo, apesar de décadas de pesquisa demonstrando o papel deste íon nos ossos (GROVER et al., 2013).

Grover et al., 2013 mostraram que a modificação biomateriais de fosfato de cálcio com pirofosfato de cálcio amorfo pode aumentar a taxa de formação de osso *in vivo*. Os autores reportam a aplicação bem-sucedida do pirofosfato de cálcio como cimento osteocondutor degradável para reparação óssea, sendo o primeiro exemplo de uma substituição do cimento ósseo, que contém uma fase que pode atuar como um substrato para uma enzima associada com o processo de mineralização e pode, assim, aumentar a competência dos ossos. Deste modo pesquisas usando pirofosfato de sódio podem demonstrar um futuro promissor no uso deste material em aplicações biotecnológicas.

A obtenção dos ortofosfatos de cálcio reportados na Tabela 3 pode ser realizada por diferentes métodos de síntese química, por exemplo, emulsão (SONODA et al., 2002), sol-gel (BEZZI et al., 2003, YELTEN et al., 2012), mecanoquímico (MOCHALES et al., 2004.), micro-ondas (KALITA e VERMA, 2010), gravitacional (NATHANAEL et al., 2011) e reação de combustão (GHOSH et al., 2011), co-precipitação (MARTÍNEZ-PÉREZ et al., 2012) e precipitação (RIGO et al., 2007; RAMESH et al., 2013; BARROS et al., 2012; MEDVECKY et al., 2013).

Em todos estes métodos a estequiometria para obter a fase hidroxiapatita com relação  $\text{Ca/P} = 1,67$  depende da forma como o ácido fosfórico será adicionado a solução de hidróxido de cálcio. Caso haja excesso de ácido fosfórico pode surgir fases como o fosfato tricálcico ( $\alpha$ ,  $\alpha'$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) (TCP) ( $\text{Ca/P} = 1,5$ ) ou mesmo o pirofosfato de cálcio ( $\text{Ca/P} = 1,0$ ). Se houver deficiência de ácido fosfórico pode-se obter o fosfato tetracálcico (TeCP) cuja relação  $\text{Ca/P} = 2,0$ .

Rigo et al. (2007) sintetizaram hidroxiapatita por precipitação para utiliza-la como substitutos ósseos na implantologia. Segundo os autores, o fator limitante para obtenção das fases dos fosfatos cálcio é a quantidade e a maneira com a que a solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  é adicionada ao  $\text{Ca(OH)}_2$ . Nos seus estudos mostraram que o produto após secagem a  $110^\circ\text{C}$  apresentou só a fase da hidroxiapatita não ocorrendo a precipitação de fases de outros sistemas de fosfatos de cálcio. Estudos histológicos das áreas enxertadas e radiografias demonstraram que o leito receptor apresentou adequado crescimento de tecido ósseo, possibilitando a instalação dos implantes e posterior suporte de cargas mastigatórias.

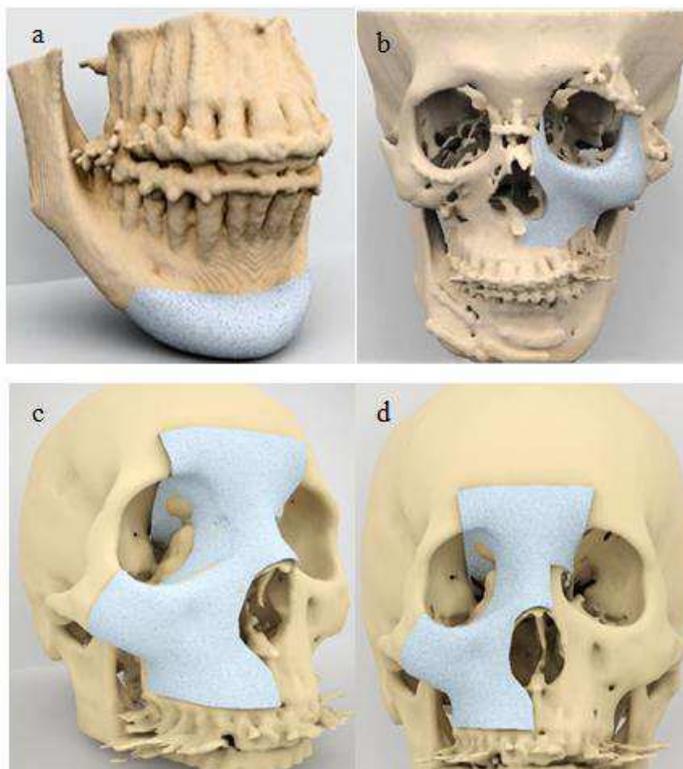
Costa et al., (2009) reportou que durante a preparação de fosfatos de cálcio pelo método de precipitação, se a titulação da solução de fosfato na solução de hidróxido de cálcio for rápida pode levar a falta de homogeneidade química no produto final. A titulação lenta e as soluções diluídas devem ser utilizadas para melhorar a homogeneidade química e a estequiométrica da HAp resultante. O cuidadoso controle das condições da solução é crítico na precipitação via úmida. Caso contrário, uma diminuição do pH da solução abaixo de 9 pode conduzir à formação da estrutura da HA deficiente em íons de Ca levando ao surgimento de fases com relação  $\text{Ca/P}$  inferior a 1,0.

## **2.5 Odontologia Bucomaxilofacial**

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

Na odontologia bucomaxilofacial especialmente, temos regiões que precisam ser recuperadas, por exemplo: o mento (queixo), nasal, zigoma e o ângulo mandibular (Figura 4). Esta recuperação pode ser feita com as biocerâmicas puras ou com compósitos destas biocerâmicas (GINEBRA et al., 2010).

**Figura 4** - Regiões implantadas, (a) mento, (b), (c) e (d) seios da face.



Fonte: Kawachi et al., 2000.

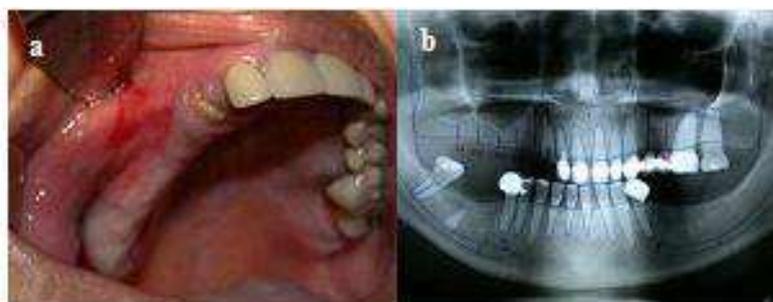
A odontologia bucomaxilofacial engloba tratamentos como: enxertos ósseos, transplantes e reimplantes de dentes, dentes inclusos biópsias, cirurgias com finalidade protética, cirurgias com finalidade ortodôntica, cirurgias ortognáticas e tratamento cirúrgico de cistos, afecções radiculares e periradiculares,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

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

Na Figura 5, imagens de pessoas que sofrem com reabsorção óssea estão ilustradas. Este caso ocorre, por exemplo, quando as pessoas perdem uma parte ou todos os seus dentes com as extrações, passam, a partir desse momento, a sofrer de constante atrofia óssea (reabsorção), como mostra a Figura 5b. Ao longo de poucos meses o osso do local da extração perde de 30 a 70 % de sua espessura e altura. Isso significa que a boca murcha, a fala é

alterada, mastigação é reduzida, e a expressão facial e o sorriso ficam limitado, como mostra a Figura 5a. A única maneira comprovada cientificamente de interromper a perda óssea por falta de função é com a adaptação de implantes dentários, que são parafusos de titânio colocados no interior do osso, no lugar do dente perdido, e próteses adaptadas sobre eles (SOTTO MAIOR et al., 2006).

**Figura 5** - (a) Pré-operatório; (b) orthopantomografia para implante.



Fonte: Sotto Maior et al., 2006

Os enxertos, quanto à sua origem, podem ser autógenos quando obtidos do mesmo indivíduo, sendo este receptor e doador; exógenos quando obtidos de outro indivíduo com mesma carga genética; homogêneos quando obtidos de indivíduos diferentes com carga genética diferente, porém da mesma espécie e os heterógenos que são obtidos de outras espécies. Dentre esses tipos de ossos utilizados nas enxertias, o autógeno é o mais compatível e o que mostra melhor resultado (CHENG et al., 2010).

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

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

Os enxertos autógenos, embora tenham propriedades biológicas ideais na maioria dos casos, apresentam limitação quanto à quantidade possível de ser retirada, principalmente em situações que requeiram um grande volume de enxerto, como nas revisões de artroplastias de quadril e cirurgias oncológicas reconstrutivas. Os substitutos ósseos (hidroxiapatita, sulfato de cálcio, etc.) se encontram em fase experimental, quanto às suas propriedades biomecânicas, de osteointegração e osteoindução, não sendo ainda uma alternativa definitiva (BAUER e MUSCHLER, 2000).

Os enxertos alógenos, também denominados aloenxertos ou homoenxertos, são obtidos de outro indivíduo da mesma espécie. Com a finalidade de se reduzir sua antigenicidade, faz-se o tratamento da peça, promovendo a destruição das células osteogênicas, sendo necessário que o receptor produza esses elementos, tornando-se indispensável, portanto, a boa saúde do indivíduo. Elimina assim, a necessidade de outro local cirúrgico no hospedeiro, porém não fornece células viáveis para osteogênese (MARZOLA, 2005).

Logo, o enxerto homólogo (aloenxerto) surge como boa opção. Após o advento dos bancos de tecidos, ampliação e melhora das técnicas de preservação, aumentou as disponibilidades dos aloenxertos, o que vem de encontro às diversas necessidades ortopédicas. Por ser preparado previamente ao procedimento da enxertia, o aloenxerto contribui de forma relevante na redução da morbidade cirúrgica e melhoria dos resultados finais, devido à redução do tempo cirúrgico e de isquemia (quando se utiliza o torniquete) (ROBERTS et al., 2011).

As desvantagens dos aloenxertos envolvem o risco da transmissão de doenças e o potencial de antigenicidade, complicações estas que podem ser controladas por meio dos métodos de congelamento e armazenamento. O risco infeccioso pode ser diminuído por meio de testes sorológicos dos doadores, descarte de material que produza cultura bacteriológica positiva, manipulação do enxerto sob condições assépticas e esterilização, seja por radiação ou óxido de etileno (SOMMERVILLE et al., 2000).

*Enxertos xenógenos*, conhecidos também como xenoenxertos ou heteroenxertos, são retirados espécies diferentes e transplantados a outra. As diferenças antigênicas são bastante pronunciadas, implicando num tratamento mais acurado do enxerto para ser evitada a rejeição, sendo muito utilizados na cirurgia maxilofacial. Não exige um segundo local de intervenção no receptor, porém não fornece células viáveis para a fase I da osteogênese, além de ser tratado para a redução da antigenicidade (FERREIRA et al., 2007).

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

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

Entretanto, devido aos casos de reabsorção, morbidade na área doadora e necessidade de hospitalização, têm-se empregado materiais aloplásticos para a correção de mandíbula atrofica, sendo a hidroxiapatita o material de escolha e, por ser biocompatível quase se une física e quimicamente ao osso (MARX e SAUNDERS, 2001). Esta técnica dispensa a cirurgia complementar em área doadora, não ocorrendo a reabsorção do enxerto, podendo a cirurgia ser feita a nível ambulatorial. No entanto, às vezes é difícil conter o material no local pré-determinado e obter a altura desejada do rebordo. Com a evolução dos estudos, observou-se que o osso autógeno é superior a qualquer outro material, quanto à osteogênese inicial, osteoindução, osteocondução e reabsorção com remodelamento ósseo, além de oferecer resultados mais previsíveis (MARZOLA, 2005).

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

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

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

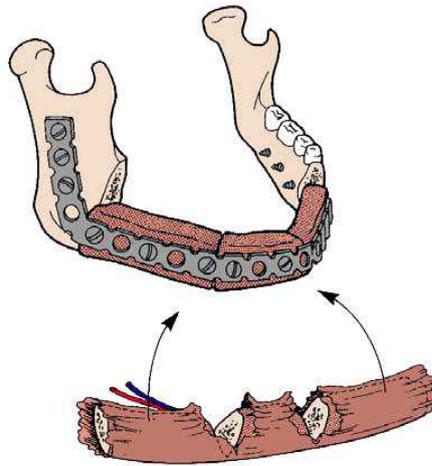
A realização de enxerto ósseo possibilita a reconstrução da anatomia e devolve previsibilidade ao tratamento. A neoformação óssea ocorre por três mecanismos: osteogênese, osteoindução e osteocondução (ABRAHAMS, 2000). A osteogênese é caracterizada quando o próprio enxerto é suprido de células capazes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

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

O critério para a seleção do material para enxerto é determinado pelas seguintes características: capacidade de produção óssea no seio por proliferação celular através de osteoblastos transplantados ou por osteocondução de células da superfície do enxerto, capacidade de produzir osso por osteoindução de células mesenquimais, capacidade do osso inicialmente formado de se transformar em osso medular maduro, manutenção do osso maduro ao longo do tempo sem perda após entrar em função, capacidade para estabilizar implantes quando colocados simultaneamente com enxerto, baixa taxa de infecção, fácil acesso, baixa antigenicidade e alto nível de confiabilidade (SPIEKERMANN, BIESTERFELD e EDELHOFF, 2000). Na Figura 6, observa-se o esquema de reconstrução mandibular com enxerto ósseo.

O tipo de cerâmica aplicada a biomateriais são aquelas de baixa densidade, conseqüentemente de alta porosidade, que são utilizadas em casos, em que, os pacientes precisam de enxertos, que acelerem a recuperação do tecido removido ou danificado. Isso ocorre porque a porosidade do material permite que o tecido invada os poros. A hidroxiapatita e também uma significativa variedade de outras cerâmicas, já foi investigado quanto suas reações *in vitro* e *in vivo*, revelando uma boa compatibilidade com células vivas (SVANBORG et al. 2011).

**Figura 6** - Esquema da reconstrução mandibular com enxerto ósseo, destacando-se a realização de osteotomias para reprodução do contorno anatômico.



Fonte: Powers e Barker, 2000.

## 2.6 Estado da Arte de Fosfatos de Cálcio e Compósitos Aplicados Enxertos Ósseo

Cerâmica de fosfato de cálcio têm comprovado boas propriedades biológicas e sucessos clínicos tem demonstrado sua eficácia na reparação óssea. Infelizmente, os fosfatos de cálcio exibem pobre resistência à tração e cisalhamento (LARSSON e HANNINK, 2011). Na prática, a resistência mecânica de cimentos a base de fosfato de cálcio é inferior ao dos ossos, dentes, ou biocerâmicas sinterizadas de ortofosfato de cálcio (DOROZHKIN, 2008). Isto restringe a sua utilização para defeitos ósseos que exigem boa resistência a compressão, com exemplo, aplicações típicas no tratamento de defeitos maxilofacial ou deformidades, reparação facial do crânio ou do aumento da coluna e platô tibial. Uma melhoria das propriedades mecânicas prolongaria significativamente a aplicabilidade dos fosfatos de cálcio e isto pode ser alcançado através da formação de materiais compósitos (KRÜGER E GROLL, 2012).

A principal força motriz por trás do uso de ortofosfatos de cálcio como materiais substitutos de osso é a sua semelhança química com o componente mineral dos ossos e dentes de mamíferos (DOROZHKIN, 2009). Além de ser não tóxico, biocompatíveis, não são reconhecidos como substâncias estranhas no corpo e, mais importantes, são bioativos (ONG e CHAN, 1999). São também conhecidos por serem osteocondutores (capaz de fornecer um andaime ou modelo para formação de novo osso) e apoiar adesão e proliferação dos osteoblastos (ANSELME, 2000).

Mesmo assim, a maior limitação ao uso de biocerâmica de ortofosfatos cálcio são suas propriedades mecânicas por serem quebradiços e apresentar pobre resistência à fadiga (HENCH, 1998; SUCHANEK e YOSHIMURA, 1998). Por exemplo, a tenacidade à fratura de biocerâmica de HA não excede o valor de  $1.0 \text{ MPam}^{1/2}$  (o osso humano é na faixa de  $2\text{-}12 \text{ MPam}^{1/2}$ ), e diminui quase linearmente com o aumento da porosidade. Geralmente, a resistência à fratura aumenta com diminuição do tamanho do grão. No entanto, em alguns materiais, especialmente cerâmicas, a resistência à fratura atinge um máximo e cai rapidamente com a diminuição do tamanho dos grãos (SUCHANEK e YOSHIMURA, 1998).

Por exemplo, Halouani et al. (1995), investigaram a resistência à fratura da HA pura com tamanhos de grão entre  $0,2$  e  $1,2 \mu\text{m}$  prensada á quente. Os autores reportaram dois comportamentos distintos. A tenacidade à fratura aumentou com diminuição do tamanho de grão acima de  $0,4 \mu\text{m}$  e depois, observou uma redução na tenacidade à fratura com a diminuição do tamanho dos grãos. A tenacidade à fratura máxima determinada foi de  $1,20 \pm 0,05 \text{ MPam}^{1/2}$  para HA com tamanho de grão de  $0,4 \mu\text{m}$ .

De acordo com SUCHANEK e YOSHIMURA, (1998) a resistência à flexão, compressão e tração de biocerâmica HA densas estão na faixa de  $38\text{-}250 \text{ MPa}$ ,  $120\text{-}900 \text{ MPa}$ , e  $38 - 300 \text{ MPa}$ , respectivamente. Valores semelhantes para biocerâmica HA porosa encontram-se na faixa de  $2\text{-}11 \text{ MPa}$ ,  $2\text{-}100 \text{ MPa}$  e  $3 \text{ MPa}$ , respectivamente. Variação nestes valores pode ser causada pela distribuição de força, influência da microporosidade remanescente, o tamanho dos grãos, e a presença de impurezas. Estes valores também podem aumentar com o aumento da razão de Ca/P, atingindo o valor máximo para razão  $\text{Ca/P} = 1.67$  (HA estequiométrica) e diminuindo para razão  $\text{Ca/P} > 1.67$ . Além disso, segundo Tancret et al., (2006) a força diminui quase exponencialmente com o aumento da porosidade.

Yang e Chou (2007) avaliaram as propriedades mecânicas de camadas de HA sobre substratos de alumina visando melhorar a resistência mecânica da HA e a biocompatibilidade de alumina. A adesão do revestimento de HA ao substrato de alumina foi obtida pela adição de uma camada de porcelana via pulverização por plasma e pelo pós-tratamento a  $750$ ,  $800$ ,  $850$  e  $900 \text{ }^\circ\text{C}$  durante  $0,5 \text{ h}$ . Os resultados mostram que a resistência da ligação entre o revestimento de HA substrato  $\text{Al}_2\text{O}_3$  pode ser melhorada empregando a porcelana como o revestimento adesivo após o tratamento térmico, sendo o melhor valor obtido de  $13 \text{ MPa}$ .

Ravarian et al., (2010), sintetizaram a  $1000 \text{ }^\circ\text{C}$ , caracterizaram e avaliaram a biocompatibilidade do compósito hidroxiapatita/ biovidro, com proporções em massa  $100\%$  de biovidro,  $90 \%$  de biovidro e  $10 \%$  de hidroxiapatita,  $80 \%$  de biovidro e  $20 \%$  de hidroxiapatita,  $70\%$  de biovidro e  $30 \%$  de hidroxiapatita. Os autores observaram através do

DRX que os compósitos apresentaram a fase majoritária pseudovolastonite e hidroxiapatita. Os autores observaram que os compósitos imersos em fluido corporal simulado, apresentaram uma formação de camada de apatita na superfície da amostra. O biovidro na estrutura da HA causou uma decomposição, devido o vidro ser altamente reativo a altas temperaturas. Ao utilizar de HA, com biovidro, uma hidroxiapatita silicada pode ter sido produzida, fornecendo a produção de um material altamente bioativo.

Um estudo sobre substitutos ósseos registrado na Holanda para uso no trauma e cirurgia ortopédica foi reportado por Stok et al., (2011). Neste estudo, a resistência à compressão, módulo de Young, tensão e resistência ao cisalhamento de alguns produtos a base de sulfato de cálcio, fosfatos de cálcio e biovidro foram reportados como possíveis materiais a serem utilizados no trauma e cirurgias ortopédicas e craniomaxilofacial. Entre os compósitos mais significativos em termos de propriedades mecânicas foram citados: i) Endobon (cimento a base de HA): força à compressão *in vitro* de 1-11 MPa, com módulo de Young de 20-3100 MPa. Em testes *in vivo* mostraram um 2-20 MPa de resistência à compressão e o módulo de Young de 20-1200 MPa. ii) Norian SRS (cimentos a base de fosfatos de cálcio): resistência à compressão de 23-55 MPa, com uma resistência à tração de 2,1 MPa e uma força de cisalhamento de 0,85-1,3 MPa. iii) BoneSource (composto fosfato tetracálcico e fosfato dicálcico anidro): resistência à compressão de 6,3-34 MPa, com um módulo de Young de 3,6-4,7 MPa. iv) Calcibon (cimentos a base de fosfatos de cálcio): resistência à compressão de 35-55 MPa, com um módulo de Young de 2500-3000 MPa e uma força de tração de 4,5 MPa. v) HydroSet™ (cimentos a base de fosfatos de cálcio): resistência à compressão de 14-24 MPa e módulo de Young de 125-240 MPa e uma força de tração de 0,11- 0,17 MPa.

A reconstrução de osso frontal e redução dos ossos próprios do nariz foram estudadas em três casos clínicos em paciente do sexo masculino de 19 anos usando hidroxiapatita HAP-91<sup>®</sup> granular e a COL.HAO 91<sup>®</sup> como material de enxerto fornecido pelo Laboratório JHS. Os experimentos mostraram que ambas as amostras avaliadas foram adequadas para a reconstrução de pequenos defeitos, permitindo cirurgias menos complexas do que, por exemplo, para reconstrução por enxertia óssea, levando o portador a uma menor morbidade (BICALHO, BORGES e REZENDE, 2011).

Öhman et al., (2011) avaliaram a resistência a compressão do osso cortical de adultos e crianças com a finalidade de um estudo comparativo. Os autores verificaram que o tecido ósseo cortical coletado de crianças tem menor resistência à compressão e rigidez, do que o osso cortical adulto. Estes resultados confirmam que as propriedades mecânicas do osso

cortical de uma criança são diferentes daquelas de tecido de um adulto. No entanto, essas diferenças estão relacionadas com diferenças na densidade do tecido dos ossos. Na criança foi reportado valores entre 50 e 180 MPa, para o adulto estes valores foram na faixa de 120 a 250 MPa.

Bohner et al., (2012) destacam que apesar de 40 anos de intensos estudos, a comunidade científica ainda está procurando por substitutos ósseos ideais, *os enxertos ósseos reabsorvíveis*, sendo os possíveis candidatos os seguintes materiais: cerâmicas (biovidros, fosfatos di-cálcio de-hidratado, carbonato de cálcio, fosfato octacálcio,  $\beta$ -fosfato tricálcio –  $\beta$ -TCP, fosfato de cálcio bifásico – BCP, cristais de hidroxiapatita precipitados,  $\beta$ -pirofosfato de cálcio e hidroxiapatita sinterizada), metais (ligas de magnésio, ligas de ferro, titânio e tântalo) e polímeros (poliácidos láticos, poliglicosídeos, policaprolactona, celulose, colágeno e quitosana); *os enxertos ósseos com alta resistência mecânica*, com destaque para o composto wollastonita – hidroxiapatita que apresenta resistência à flexão inicial de 157 MPa e após um tempo de vida de 10 anos implantado *in vivo*, ainda exibe 65 MPa de resistência à flexão e; finalmente *os enxertos ósseos osteoindutivo*, que podem ser desde enxertos metálicos, cerâmicos ou poliméricos que contenham uma camada de fosfatos de cálcio depositados em sua superfície.

Kolk et al., (2012) avaliaram materiais para serem utilizados como substituto ósseo. Segundo os autores vários substitutos do enxerto ósseo estão disponíveis, tais como a matriz óssea desmineralizada e os materiais à base cálcio, formando compósitos consistindo de uma matriz osteocondutora, que suporta o novo osso, e proteínas osteoindutivo, que sustentam mitogênese de células indiferenciadas e células osteogênicas (osteoblastos ou precursores de osteoblastos), as quais são capazes de formar osso em ambiente apropriado. Todos os substitutos podem substituir o osso autógeno ou expandir uma quantidade existente de enxerto ósseo autógeno. Neste estudo os autores avaliaram a resistência do compósito NanoBone (ARTOSS GmbH, Rostock, Alemanha), composto por em 76 % em peso de HA nanocristalina e 24 % em peso de dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ). Apesar da alta porosidade NanoBone, este possui elevada resistência de ruptura cerca de 40 MPa. Este material puramente sintético assimila imediatamente as proteínas do corpo e para dos nanoporos, enquanto está a ser reduzido por osteoblastos.

Sopyan, Fadli e Mel, (2012) reportaram estudo de compósito alumina-HA fabricados através das proteínas de método espuma-consolidação. Os corpos de provas foram queimados em 600 °C durante 1 h, e sinterizados a temperaturas de 1200 – 1550 °C durante 2h. Os compósitos de alumina - HA porosos apresentaram retração entre 26 - 77 %, porosidade de 46

% - 52 % e força de compressão de 1 - 6,4 MPa. A força de compressão dos corpos aumentou com as temperaturas de sinterização crescentes. Estudo da biocompatibilidade de alumina - HA poroso foi realizado em num bioreator de tanque agitado usando cultura de células e bom grau de compatibilidade das células para os microsuptes porosos foram observados, pois as células cresceram na superfície do microsuptes em 8 - 120 horas cultivadas.

Toker et al., (2012) realizaram um estudo *in vivo* com o objetivo de comparar a eficácia relativa do tratamento sistêmico e local com o alendronato (agente anti-reabsorção mais utilizado e eficaz para o tratamento de doenças em que há um aumento da reabsorção óssea, incluindo osteoporose pós-menopausa, doença de Paget e osteólise associada à tumores) em defeitos ósseos de calvária de ratos com preenchimento de um enxerto ósseo sintético, o MBPC, um fosfato de cálcio bifásico (HAp e  $\beta$ -TCP numa proporção de 60/40) com estrutura porosa micro e macrométrica. Os animais utilizados nesta pesquisa foram 40 ratos machos, da linhagem *Wistar*. Dentro das condições estudadas, os autores concluíram que o uso do alendronato, administrado por via sistêmica ou local, não agregou nenhum benefício à já comprovada regeneração óssea induzida pelo enxerto de MBPC em defeito ósseo craniano de ratos.

Val et al., (2012) defenderam a hipótese de que o  $\alpha$ -TCP com silício em solução sólida (TCPss) é mais reativo do que um  $\alpha$ -TCP puro por causa da sua maior solubilidade em fluidos fisiológicos. Assim, os autores realizaram um estudo *in vivo* com o objetivo de investigar se blocos de TCPss com diferentes concentrações de Si (0 %, 1,5 % e 3,0 % em peso) apresentavam a capacidade de estimular deposição óssea em suas superfícies, juntamente com reabsorção e/ou biodegradação de células osteoclásticas quando estes blocos fossem usados como material de implante em defeitos em tíbias de coelho, comparando este material com  $\alpha$ -TCP sintético puro. Os autores chegaram à conclusão de que o enxerto TCPss com 3 % de Si foi mais eficaz sendo uma alternativa aos outros materiais utilizados para a substituição óssea e regeneração de atrofia óssea. O 3 % - TCPss apresentou uma matriz ideal nos processos regenerativos devido a sua estabilidade dimensional inicial (93,5 % de material remanescente em 15 dias), taxa de reabsorção (57,8 % de material restante aos 60 dias), e indução à formação óssea (67,6 % de contato com o osso lateral ao implante e 57,3 % de contato com o osso na base do implante em 60 dias), sendo então um forte candidato para substituição de enxertos com osso autólogo.

Lee et al., (2012) desenvolveram um trabalho *in vivo* cujo objetivo foi comparar as propriedades físicas e a capacidade regenerativa de enxertos ósseos confeccionados com hidroxiapatita sintética (sHAp) e com hidroxiapatita derivada de cascas de ovos (eHAp) em

defeitos de calvária de coelho. Os autores observaram que as amostras de sHAp (compostas por partículas menores que  $1\mu\text{m}$ ) apresentaram maior indução à neoformação óssea quando comparados ao grupo que não recebeu enxerto algum (grupo controle), enquanto que as amostras de eHAp (formada por partículas maiores que  $1\mu\text{m}$ ) apresentou maior quantidade de formação óssea para o período de 8 semanas quando comparado ao enxerto de sHAp. Assim, a eHAp derivada de material natural (casca de ovos) apresentou maior taxa de degradação e por isso maior absorção pelo organismo, resultando num menor resíduo de enxerto ao final de 8 semanas e que ambas a amostra de sHAp e eHAp foram eficientes na regeneração óssea. A eHAp destaca-se pelo fato de ser mais econômico e que apelo ambiental, já que é proveniente da reciclagem de resíduos sólidos alimentícios.

Canullo et al., (2012) realizaram um estudo *in vivo* com o objetivo de avaliar o desempenho de enxerto de hidroxiapatita sintética nanocristalina, embebida num gel de sílica nanoestruturada ( $\text{SiO}_2$ ), comercialmente conhecido como NanoBone<sup>®</sup>, na reconstrução do seio maxilar. Material que já está disponível para aplicações clínicas. O NanoBone<sup>®</sup> é um material osteocondutor e biodegradável, com taxa de degradação semelhante ao processo natural de remodelamento ósseo. Neste estudo foram recrutados dez pacientes com necessidade de fixação de maxilar posterior, com idade média de 54 anos (entre 43 a 72 anos). Após 3 meses de cicatrização, foi comprovado que o implante de NanoBone<sup>®</sup> pode ser indicado como material substituto de seio maxilar, uma vez que o mesmo não apresentou comportamento osteogênico e com uma rápida regeneração óssea. Na literatura, encontra-se informação de que são necessários de seis a nove meses de cicatrização para que ocorra regeneração óssea, o que neste estudo se deu com apenas três meses. O autores atribuem este fenômeno ao fato de que no material NanoBone<sup>®</sup> as nanopartículas de HAp estão embebidas num gel de  $\text{SiO}_2$  o que aumentou a sua capacidade de interação com o material biológico.

Naudi et al., (2012) avaliaram o aspecto histológico, radiográfico, propriedades mecânicas e a capacidade de regeneração tecidual de *scaffolds* de  $\beta$ -TCP impregnados com proteínas rhBMP-7 para reconstrução mandibular. Utilizaram 9 coelhos da raça Nova Zelândia com pesos variando 3,0 e 4,0 kg. Após a análise das radiografias feitas com 0, 4, 8 e 12 semanas pós implante, observaram gradual substituição dos *scaffolds* de  $\beta$ -TCP (mais radiopaco) por tecido ósseo neoformado. Os *scaffolds* de  $\beta$ -TCP/ rhBMP-7 apresentaram taxa de degradação/substituição óssea mais alta dos que os *scaffolds* de  $\beta$ -TCP puros. Com relação a resistência mecânica, todos os *scaffolds* ( $\beta$ -TCP/rhBMP-7 e  $\beta$ -TCP puro) apresentaram quebra catastrófica após a nucleação de trinca na região superior do implante com rápida propagação pela espessura do mesmo até a fratura total. Todos os *scaffolds* apresentaram

resistência mecânica similar à do osso mandibular, ressaltando que a proteína rhBMP-7 não ocasionou aumento da mesma. As análises histológicas mostram que os *scaffolds*  $\beta$ -TCP/rhBMP-7 foram superior à capacidade de regeneração óssea em comparação ao *scaffolds*  $\beta$ -TCP puro, o que comprovaram que os *scaffolds* de  $\beta$ -TCP contendo rhBMP-7 foram mais eficazes na regeneração óssea de defeitos de mandíbulas de coelhos.

Dong et al., (2012) realizaram estudos com um *scaffold* de  $\beta$ -TCP de 3 e 5 mm, com 70 % de porosidade e poros interconectados de 150  $\mu$ m, utilizados para confeccionar telas de titânio com espessura de 3 mm, sobrepostas compondo um cubo de 1 cm<sup>2</sup>. Os *scaffolds* de  $\beta$ -TCP foram alocados no interior das “gaiolas” de Ti, que foram confeccionadas de dois tipos, tipo I – gaiolas de Ti, íntegra e gaiola de Ti tipo II – com abertura central. Células-tronco mesenquimais (BMSC) foram cultivadas em placas de vidro contendo soro fetal bovino (SBF). A preparação dos *scaffolds* pré-vascularizados se deu da seguinte forma: 0,44 g de  $\beta$ -TCP foram introduzidos nas gaiolas de Ti e em seguida os *scaffolds* foram embebidos por uma solução contendo aproximadamente 10<sup>7</sup> células de BMSC/mL, gerando assim, compósitos BMSC/ $\beta$ -TCP. Utilizaram 15 coelhos brancos da raça Nova Zelândia pesando entre 2,0 - 2,5 kg. Os autores comprovaram que a vascularização do enxerto não só promoveu a absorção do mesmo pelo tecido hospedeiro, mas também aumentou a taxa de formação de osso novo, podendo ser esta uma nova técnica a ser utilizada em cirurgias de enxertos ósseos.

Kim et al., (2012) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar e comparar histologicamente a capacidade de regeneração de enxertos de fosfatos tricálcio (TCP), contendo recobrimento de rhBMP-2 (proteína humana morfogenética óssea recombinante) e outro misturado à PRF (derivados de plaquetas). Utilizaram 36 coelhos fêmeas, da raça Nova Zelândia, com mais de 6 meses de idade e peso entre 2,5 e 3,5 kg. O grupo B (enxerto de TCP + PRP) apresentou atividade regeneradora óssea notadamente superior ao grupo controle e ao grupo A (enxerto de TCP + rhBMP-2) em todos os períodos estudados, o que facilitou a proliferação de osteoblastos e conseqüentemente aumentou a taxa de formação óssea.

Li et al., (2012) defenderam a hipótese de que nanocerâmicas de fosfatos de cálcio bifásico não só ajudam na osteogênese, mas pode facilitar e acelerar a cicatrização de defeitos ósseos por osteoindução forçada. Os autores realizaram um estudo para determinar a capacidade de adsorção seletiva de biocerâmicas de fosfatos de cálcio às proteínas lisozima/albumina (BSA/LSZ) obtidas a partir do soro de bovino para indução no crescimento das células tronco mesenquimais (hMSCs) *in vitro*, bem como sua resposta *in vivo*. As biocerâmicas de fosfato de cálcio estudadas foram amostras de BCP (HA $\beta$  +  $\beta$ -TCP) com tamanhos de poros variados nanométricos (nBCP) e submicrométricos (mBCP), sinterizados

em forno micro-ondas e, micrométricos (cBCP), sinterizados em forno convencional. Para o teste *in vivo* utilizaram 6 cachorros, com peso entre 25 e 30 kg. Embora o mecanismo do processo de regeneração *in vivo* seja ainda desconhecido, o resultado *in vitro* deste estudo indicou que a nBCP adsorveu seletivamente proteínas de baixo peso molecular e promoveu a diferenciação do gene relacionado com osso, o que pode estimular o crescimento de células subsequentes para gerar osso na sua superfície.

Ohba et al., (2012) analisaram o efeito da aceleração de crescimento ósseo induzido pelo compósito hidroxiapatita/plasma rico em plaquetas (HAp/PRP) previamente polarizado. O teste *in vivo* foi realizado com 18 coelhos, nos quais foram confeccionados defeitos ósseos com 3 mm de diâmetro e 5 mm de profundidade, em que ficou comprovado que o compósito HAp/PRP apresentou atividade osteocondutora, evidenciada pela presença de material ósseo neoformado após 3 semanas da realização do implante, validando a hipótese de que a polarização da superfície da HAp realmente melhorou a sua característica de osteoindução.

Pekkan et al., (2012) estudaram a radiopacidade apresentada por vários enxertos ósseos (BGMs) em comparação com o osso cortical bovino mandibular e a dentina de um canino humano. Os materiais estudados foram: Dexabone<sup>®</sup> - DB (enxerto ósseo com alta porosidade, osso bovino), Bio-Oss<sup>®</sup> - BO (enxerto ósseo natural obtido a partir da desmineralização do osso bovino, osso natural), 4BONE SBS – 4B (enxerto ósseo composto com 60 % de HAp e 40 % de  $\beta$ -TCP com 70 % de porosidade, osso sintético), KASIOS<sup>®</sup>TCP – KA (enxerto ósseo com 99,9 % de  $\beta$ -TCP, osso sintético), S.C. PONETI<sup>®</sup> - PO (100 % de hidroxiapatita) e apatita- wollastonita – AW (cerâmica de vidro bioativo – MgO – CaO – SiO<sub>2</sub> – P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> – Compósito F). Neste estudo, os níveis de radiopacidade das 6 amostras de BGMs diferentes foram testados utilizando as amostras como recebidas dos fabricantes.

A dentina de um canino humano (HD), o osso mandibular cortical bovino (BC) e uma cunha de Al foram utilizadas como materiais de referências. A radiopacidade de todas as amostras dos BGMs investigados foram muito baixa para ser detectada radiograficamente quando colocado no interior do osso mandibular cortical. A radiopacidade dos enxertos 4B e BO revelou valores de radiopacidade significativamente mais baixos do que a do enxerto BC e desta forma, a sua utilização em casos que devam ser acompanhados radiograficamente não foi recomendado (PEKKAN et. al., 2012).

Thein-Han et al., (2012) incorporaram agentes biofuncionais em *scaffolds* de CPC (fosfatos de cálcio) para investigar a ocorrência de diferenciação de células-tronco mesenquimais de cordão umbilical humano (hUCMSC) na superfície do CPC biofuncionalizado para diferenciação osteogênica. A proliferação de células-tronco, a

diferenciação osteogênica e a síntese de material mineral foram expressivamente maior nos *scaffolds* biofuncionalizados do que no *scaffolds* controle e que a densidade de células vivas aumentou devido à incorporação de agentes biofuncionais nos *scaffolds* de CPC. O módulo de elasticidade dos *scaffolds* biofuncionalizados foi equivalente ao do osso esponjoso, o que comprovou que estes *scaffolds* “embebidos” de agentes biofuncionais têm elevada vantagem em aplicações odontológicas, craniofaciais e ortopédicas que necessitem de regeneração óssea.

Sanyal et al., 2012 avaliaram a resistência a tensão de cisalhamento do osso trabecular humano. Os autores reportaram resistência à compressão variando de 1 a 30 MPa. Segundo os autores os resultados mostram que o osso trabecular humano o ser humano foi de modo geral muito mais fraco em cisalhamento de compressão no nível aparente, refletindo diferentes mecanismos de falha ao nível dos tecidos.

Barros et al., (2012) e Barros (2012) avaliaram o efeito da adição 1, 3 e 5% em massa de hidroxiapatita (HAp) no cimento endodôntico MTA objetivando adquirir novos cimentos endodônticos com propriedade osteocondutora. Para este fim, estudos *in vivo* em defeitos ósseos de fêmures de rato do tipo Wistar foi investigado. Os cimentos endodônticos foram preparados com percentuais de 1, 3 e 5% em massa de HAp sintetizada pelo método de precipitação e sinterizada a 1300°C adicionada ao MTA comercial. Os ensaios *in vivo* (análises radiográfica, histológica e estatística), mostrou que a concentração de 5% de hidroxiapatita forneceu a melhor propriedade de osteocondução ao MTA. Assim para utilização na Saúde Pública através dos tratamentos odontológicos conservadores como capeamento pulpar direto e indireto, pulpotomia e cirurgias pararendodônticas, indicou a hidroxiapatita como o melhor material para a indução de pontes dentárias. No caso de selamentos de infiltração nos tratamentos endodônticos, o MTA/HAp5% foi o material mais indicado pois apresentou a função seladora do MTA, juntamente com a indução de neoformação óssea da HAp, diminuindo o tempo de preservação.

Behnia et al., (2013) estudaram a capacidade osteocondutora e osteoindutora do de enxerto comercial NanoBone<sup>®</sup> acrescido de PRGF (plasma rico em fator de crescimento) e/ou MSC (células tronco mesenquimais), avaliando a regeneração óssea em defeitos de calvária de coelho. Utilizaram 8 coelhos machos, da raça Nova Zelândia, pesando aproximadamente 2,5 kg, onde cada um deles recebeu um tipo diferente de enxerto. O enxerto NanoBone<sup>®</sup>, mostrou ser um portador apropriado de células de MSC e PRGF, e que, a combinação do NanoBone<sup>®</sup>/MSC/PRGF num único material (*scaffold*) gerou um enxerto eficaz para a regeneração óssea de defeitos de calvária de coelho.

Wu et al., (2013) utilizaram a sinterização por micro-ondas para sinterizar *scaffolds* porosos de hidroxiapatita (HAp) fabricados pela técnica de deposição de extrusão. Foram investigados os efeitos da sinterização por micro-ondas na microestrutura, composição de fases, degradação, resistência à compressão e propriedades biológicas, em comparação com *scaffolds* de HAp sinterizados em forno convencional. Os *scaffolds* produzidos com porosidade entre 55 e 60 % foram sinterizados a 1200 °C por 30 minutos em forno micro-ondas e após a sinterização foi determinada a sua resistência mecânica à compressão, onde esta foi determinada de 45,57 MPa em comparação com a resistência mecânica à compressão dos *scaffolds* sinterizados em forno convencional (20,70 MPa).

O teste de degradação foi determinado por imersão dos *scaffolds* em uma solução fisiológica salina e a concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  foi determinada. Os resultados indicaram que os *scaffolds* sinterizados por micro-ondas apresentaram maior solubilidade e consequentemente maior concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  quando comparado com os *scaffolds* sinterizados em forno convencional, na mesma temperatura. Os *scaffolds* sinterizados por micro-ondas apresentaram adesão significativa, alta distribuição e proliferação das células em questão. Desta forma, foi possível concluir que a sinterização em forno micro-ondas agrega efeito positivo aos *scaffolds* de hidroxiapatita uma vez que neste método de sinterização obtêm-se partículas de tamanhos menores que adsorvem mais facilmente as células biológicas, evidenciando que os materiais, principalmente *scaffolds*, sinterizados por micro-ondas são promissores para uso em aplicações de engenharia tecidual (WU et. al., 2013).

Nanocompósitos de alumina/hidroxiapatita ( $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{nHA}$ ) e óxido de titânio/hidroxiapatita ( $\text{TiO}_2/\text{nHA}$ ) foram obtidos por moagem de alta energia, e sinterizados a 1400 °C a fim de estudar a densificação processo e avaliação das características mecânicas. Como a decomposição nHA em fosfato tricálcico (TCP) é conhecido por ser a principal razão na redução da densidade e as propriedades mecânicas da nHA, neste estudos os autores adicionaram nanopós de  $\text{TiO}_2$  e  $\text{Al}_2\text{O}_3$  visando retardar a deterioração mecânica da nHA a 1250 °C, 1300 °C e 1400 °C, respectivamente. O aumento da resistência à flexão de 27% e 40% foram alcançados usando o  $\text{TiO}_2$  e  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , proporcionalmente. Aumentando a dureza de 2,52 (nHA pura) a 5,12 ( $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{nHA}$ ) e 4,27 GPa ( $\text{TiO}_2/\text{nHA}$ ) foram medidas. O valor da tensão de flexão aumentou gradualmente, com a temperatura acima de 61 MPa (1250 °C), 78 MPa (1300 °C), 85,8 MPa (1400 °C) para nHA pura,  $\text{TiO}_2/\text{nHA}$  e  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{nHA}$ , respectivamente (AMINZARE et al., 2013).

### 3. METODOLOGIA

A metodologia proposta para realização desta tese foi descrita em duas etapas, para maior clareza e entendimento da mesma. A primeira etapa consistiu na descrição dos materiais e métodos utilizados para a obtenção do fosfato de cálcio (CaPs), dos compósitos de  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  e as caracterizações. A segunda etapa consistiu na descrição dos materiais e métodos utilizados para os ensaios *in vitro* e *in vivo* para implante dos compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*).

#### 3.1 ETAPA I - Materiais e Métodos Utilizados para a Obtenção do CaPs, dos compósitos $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ e Caracterizações

##### 3.1.1 Materiais

Os materiais utilizados nesta Etapa I foram:

- a) Alumina comercial:  $\text{Al}_2\text{O}_3$  AKP – 53 Sumitomo Co. Japan, com 99,995% de pureza, tamanho de partícula de 0,2  $\mu\text{m}$  e área superficial de 13,6  $\text{m}^2/\text{g}$ .
- b) Hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) P.A. fabricado pela VETEC.
- c) Ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) P.A. fabricado pela VETEC.
- d) Água deionizada ( $\text{H}_2\text{O}$ )

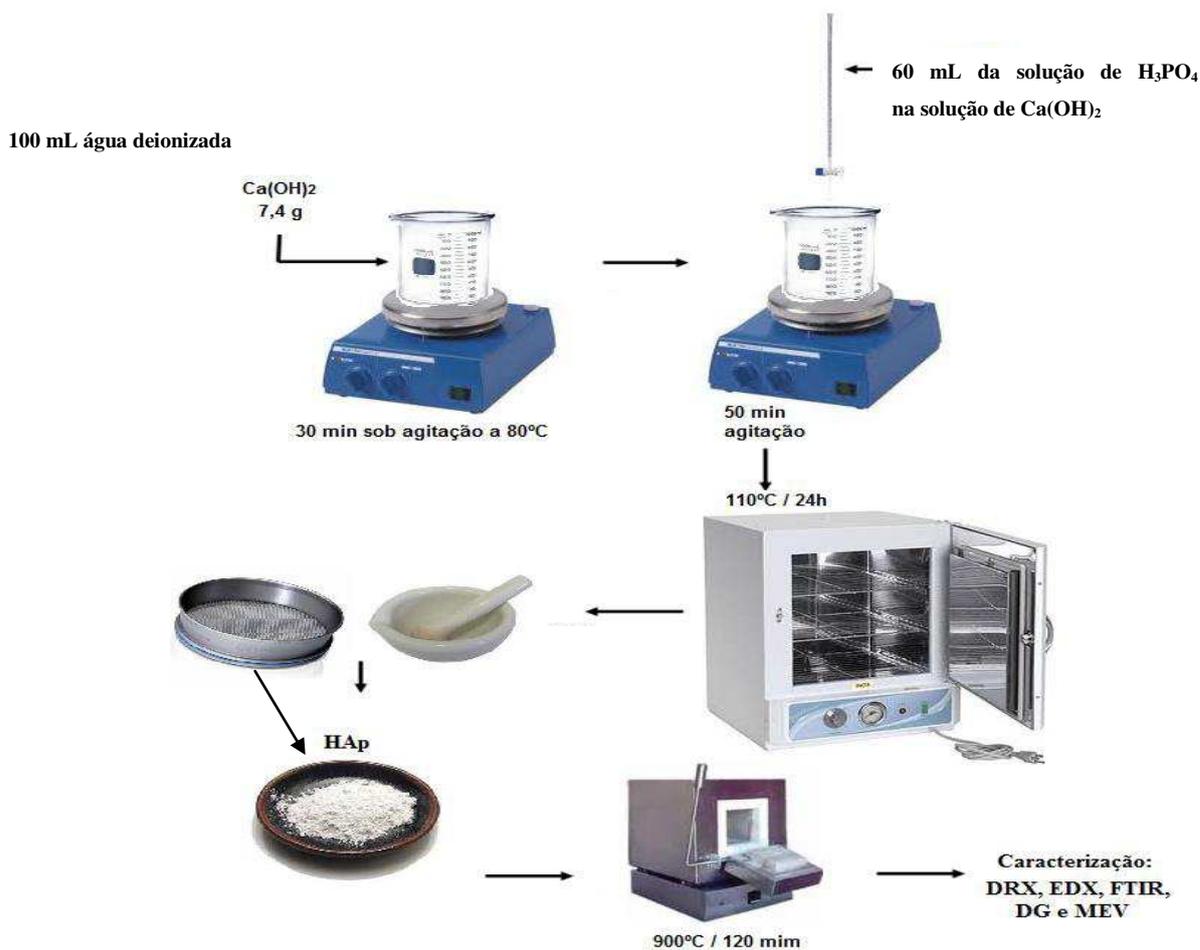
##### 3.1.2 Obtenção do Fosfato de Cálcio (CaPs)

O fosfato de cálcio (CaPs) foi sintetizado pelo método de precipitação (SAERI et al., 2003; RIGO et al., 2007; BARROS et al., 2012; MEDVECKY et al., 2013; TEIXEIRA, 2013) envolvendo uma reação ácido-base denominada neutralização entre as soluções de ácido fosfórico ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) e hidróxido de cálcio [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ] com concentração 1M, obedecendo a relação de fósforo/cálcio = 1,67. A Figura 7 apresenta o fluxograma da sequência de obtenção dos CaPs.

A solução de hidróxido de cálcio foi submetida à agitação constante em um misturador/aquecedor IKA®RH basic KT/C até atingir a temperatura de 80 °C. Em seguida a esta solução, adicionou-se gota a gota a solução de  $\text{H}_3\text{PO}_4$  previamente preparada, agitando constantemente, até atingir viscosidade de uma pasta que propicie um meio adequado para

manter em suspensão as partículas do CaPs. Depois de atingida a consistência da viscosidade desejada, a solução permaneceu em estufa FANEM Modelo 315 a 110 °C por 24 horas.

**Figura 7** - Fluxograma para obtenção do CaPs pelo método de precipitação.



Fonte: Teixeira, 2013.

O produto resultante da secagem foi triturado em almofariz ágata, peneirado em malha 100 mesh (150 µm) e, então calcinado 900 °C por 120 min em forno marca EDG modelo 3000. O produto final foi caracterizado e utilizado para preparar as formulações dos compósitos. A temperatura de 900 °C por 120 min foi escolhida com base nos estudos reportados por Camargo et al., 2007, que mostra que a partir desta temperatura o fosfato de cálcio adquire estabilidade térmica e tamanho de partícula adequado para fornecer interporosidade, o que favorece a osteocondução necessária para aplicações biomédicas.

Outra explicação para a calcinação do CaPs na temperatura de 900 °C por 120 min, reside no fato que na temperatura em que é sintetizada, permanece resíduos de ácido e outros

materiais que são citotóxicos. Então em alta temperatura além da estabilidade térmica e porosidade adequada para aplicações biológicas temos também a garantia que os resíduos foram todos eliminados, tendo-se assim uma amostra não citotóxica (BICALHO et al., 2011).

Também, nesta temperatura o tamanho de partícula do fosfato permite uma boa adesão a alumina de característica micrométrica favorecendo a obtenção de compósito de alumina/HAp porosos e com boa resistência mecânica que possa ser utilizado na cirurgia bucomaxilofacial, objeto de estudo desta tese.

### 3.1.3 Preparação dos Compósitos $Al_2O_3$ /CaPs

Os compósitos de  $Al_2O_3$ /CaPs foram obtidos usando percentual de 0, 5, 10, 15, 20 e 30 % em massa de CaPs em relação a massa total da  $Al_2O_3$ . Os compósitos obtidos foram designados conforme descrito na Tabela 4.

**Tabela 4** - Nomenclatura adotada para designar os compósitos de  $Al_2O_3$ /CaPs.

Nomenclatura	% Mássica
AC	100 % de $Al_2O_3$ comercial
5C	95 % de $Al_2O_3$ e 5 % de CaPs
10C	90 % de $Al_2O_3$ e 10 % de CaPs
15C	85 % de $Al_2O_3$ e 15 % de CaPs
20C	80 % de $Al_2O_3$ e 20 % de CaPs
30C	70 % de $Al_2O_3$ e 30 % de CaPs

Fonte: Própria, 2013.

Para obtenção das formulações dos compósitos de  $Al_2O_3$ /CaPs descritos na Tabela 4, utilizou-se o seguinte procedimento:

- i) Em um becker de 100 mL foi colocado 60 mL de água deionizada e adicionado 30 g do pó da mistura de alumina e do CaPs, previamente pesados conforme as quantidades estabelecidas na Tabela 6 mantendo-se sob agitação constante durante 30 minutos em um agitador magnético modelo IKA®RH *basic* KT/C, a temperatura ambiente.
- ii) A mistura resultante da formulação de cada compósito foi levada à estufa FANEM Modelo 315 por 24 horas a uma temperatura de 60 °C.
- iii) Após a secagem a mistura na forma de pó de  $Al_2O_3$ /CaPs, foram desaglomerados em almofariz de ágata e passado em peneira ABNT N<sup>o</sup> 100 (150 µm) e, então reservadas para conformação dos compósitos.

- iv) A mistura  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  de cada formulação foram compactadas na forma de pastilha com 10,0 mm de diâmetro e espessura em torno de 5 mm em um molde de aço tratado termicamente por meio de prensagem uniaxial 75 MPa. Após a prensagem uniaxial as amostras foram prensadas isostaticamente com pressão de 260 MPa em prensa isostática marca AIP modelo CP 360.
- v) Os compósitos foram sinterizados a 1350 °C/2h em um forno MAITEC, fabricação INTI, modelo FE1600. As condições de sinterização foram: taxa de aquecimento 2 °C/min até 400 °C/1h; taxa de aquecimento de 10 °C/min até 1350 °C/2h. A temperatura de 1350 °C/2h foi tomada como referência a temperatura de máxima densificação (taxa de retração linear máxima) obtida para a alumina comercial utilizada neste estudo (CHINELATTO et al., 2008).

A Figura 8 mostra o fluxograma do processo de obtenção dos compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  de forma simplificada.

**Figura 8** - Fluxograma do processo de obtenção dos compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ .



Fonte: Própria, 2013.

### 3.1.4 Caracterização

#### 3.1.4.1 Difração de Raios X

As amostras e os compósitos foram caracterizados quanto à estrutura cristalina por difração de raios X. A partir dos dados de difração foi realizada a identificação das fases formadas, cálculo do tamanho de cristalito, e da cristalinidade. O equipamento utilizado foi LAB X Ray Diffractometer 6000 da Shimadzu, com radiação monocromática de cobre. A varredura foi realizada na região de  $2\theta = 5$  a  $75^\circ$ , usando uma velocidade de  $2^\circ \cdot \text{min}^{-1}$  e radiação  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ ) gerada aplicando-se voltagem e corrente de 35 KV e 15 mA, respectivamente. O ensaio foi realizado no Laboratório de Caracterização de Materiais (LCM) da UAEMA/UFCG.

Para identificação das fases foi utilizado o programa (Pmgr) da Shimadzu e para obtenção das fichas cristalográficas padrões foi acessado o banco de dados JCPDS. A cristalinidade foi obtida no programa PDF-2, o qual utiliza o coeficiente de correção de Lorentz, onde foi possível calcular a percentagem de fase cristalina.

A análise do tamanho de cristalito  $D_{hkl}$  para cada conjunto de planos [hkl] foi realizada pelo uso da equação (1) de Scherrer (AZÁROFF, 1968),

$$D_{hkl} = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

Onde  $k$  é o coeficiente de forma do ponto da rede recíproca (0,9 - 1,0),  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação utilizada (1,54  $\text{\AA}$ ),  $\beta$  é a largura a meia altura do pico (FWHM) e  $\theta$  o ângulo de difração. O parâmetro  $\beta$  foi corrigido utilizando a equação (2):

$$\beta = \sqrt{\beta_{\text{exp}}^2 - \beta_{\text{inst}}^2} \quad (2)$$

Onde  $\beta_{\text{inst}}$  é a largura instrumental extraída de um pó padrão com tamanho de partícula muito grande ( $\sim 6 \mu\text{m}$ ), para este propósito foi usado  $\text{LaB}_6$  (NIST), e  $\beta_{\text{exp}}$  é a largura experimental da amostras a ser analisada.

#### 3.1.4.2 Espectroscopia de Fluorescência de Raios X (EDX)

A análise semiquantitativa dos óxidos e elementos presentes nas amostras e compósitos foi determinada por espectroscopia de fluorescência de raios X, num equipamento

modelo EDX-720, da marca SHIMADZU. O ensaio foi realizado no Laboratório de Caracterização de Materiais (LCM) da UAEMa/UFCG.

#### 3.1.4.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectros de FTIR foram coletados em pastilhas de 3 mm de diâmetro preparadas usando 1 % (m/m) de KBr, usando um espectrômetro Nicolet modelo Avatar, entre 4000 e 400  $\text{m}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 20 varreduras. A espectroscopia de infravermelho foi utilizada para atestar a identidade dos compostos, dando informações estruturais sobre as bandas dos agrupamentos da molécula. A presença de bandas localizadas na região de um comprimento de onda indica o tipo de ligação presente na estrutura de uma molécula. O ensaio foi realizado no Laboratório de Certificação de Biomateriais (CTERBIO) da UAEMa/UFCG.

#### 3.1.4.4 Distribuição Granulométrica

Para a realização deste tipo de caracterização, as amostras de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e CaPs foram desaglomeradas em peneira ABNT N<sup>o</sup> 325 (abertura de 44  $\mu\text{m}$ ), dispersa em água destilada com ultrassom durante 5 minutos, em seguida analisado em uma fase líquida associado com um processo de medida a laser. Esse método foi utilizado para determinar a distribuição e o tamanho médio dos aglomerados. Para a realização deste tipo de caracterização foi utilizado um equipamento da marca CILAS 1064L. O ensaio foi realizado no Laboratório de Caracterização de Materiais (LCM) da UAEMa/UFCG.

#### 3.1.4.5 Análise Textural (BET)

A determinação da área superficial para as amostras de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e CaPs foi realizada pelo método de adsorção de nitrogênio/hélio desenvolvido por Brunauer, Emmett e Teller (BET). Foi utilizado um equipamento modelo NOVA 3200. Esta técnica também foi usada para determinar o tamanho de partículas por meio da equação (3) proposta por Reed (1999), considerando a partícula esférica e sem rugosidade,

$$D_{\text{BET}} = \frac{6}{D_t \times S_{\text{BET}}} \quad (3)$$

Em que:  $D_{\text{BET}}$  = diâmetro esférico equivalente ( $\mu\text{m}$ );  $D_t$  = densidade teórica ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ); e  $S_{\text{BET}}$  = área superficial ( $\text{m}^2/\text{g}$ ).

A densidade teórica ( $D_t$ ) para a alumina foi  $5,361 \text{ g}/\text{cm}^3$  obtida a partir da ficha JCPDS (52-0278) e para o pirofosfato de cálcio foi de  $3,121 \text{ g}/\text{cm}^3$  obtida a partir da ficha JCPDS (09-0346), contidas no pacote de dados do programa da SHIMADZU. O ensaio foi realizado no Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC) da UAEMa/UFCG.

#### *3.1.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

Os aspectos morfológicos das amostras e a microestrutura dos compósitos foram analisados por meio de um microscópio eletrônico de varredura (MEV, marca Philips, modelo FEG-XL30), equipado com microanálise da Universidade de São Paulo (USP).

#### *3.1.4.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)*

O tamanho e a morfologia das partículas e/ou aglomerados das amostras de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e CaPs foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Para a análise foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão modelo EM420, marca Philips (voltagem de 120 KV). Este ensaio foi realizado no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE) do DEMa/UFSCar.

#### *3.1.4.8 Medidas Físicas*

A densidade a verde ( $\text{g}/\text{cm}^3$ ) das amostras foi determinada pelo método geométrico, usando a medição da massa (g) por volume ( $\text{cm}^3$ ). A densidade das amostras após sinterização também foi determinada pelo método de imersão, de acordo com o princípio de Arquimedes, segundo a norma ABNT NBR 6220:2011. O ensaio foi realizado no Laboratório de Síntese de Materiais Cerâmicos (LabSMaC) da UAEMa/UFCG.

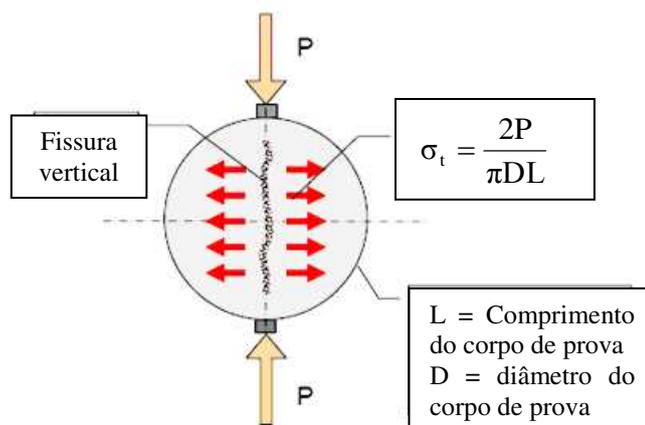
#### *3.1.4.9 Compressão Diametral*

O ensaio de compressão diametral consistiu na aplicação de um carregamento por compressão em amostras cilíndricas de 10 mm de diâmetro e 5 mm espessura cuja relação

comprimento/diâmetro entre 1 e 2, de modo, que o diâmetro da amostra (corpo de prova) é o dobro da altura. O carregamento foi aplicado em planos paralelos, diametralmente opostos.

Esta configuração de carga gera um plano de tensões de tração, razoavelmente uniforme no plano perpendicular ao da aplicação da carga. O ensaio de resistência à tração por compressão diametral seguiu a norma ASTM 384-02. A Figura 9 ilustra o teste realizado no corpo de prova (SCHALCH, 2003).

**Figura 9** - Representação esquemática do ensaio de compressão diametral até a fissura.



Fonte: Schalch, 2003.

A resistência à tração por compressão diametral foi calculada pela equação (4). Onde,  $\sigma$  é a resistência à tração por compressão diametral (MPa),  $P$  é a carga máxima obtida no ensaio (kN),  $D$  é o diâmetro do corpo-de-prova (mm),  $L$  é a altura do corpo-de-prova (mm). Os ensaios foram realizados no Laboratório de Construção e ambiência do Departamento de Engenharia de Biocompósitos, Pirassununga/USP.

$$\sigma_t = \frac{2P}{\pi DL} . \quad (4)$$

### 3.2 ETAPA II – Materiais e Métodos Utilizados para os Ensaio *In Vitro* e *In Vivo* para Implante dos Compósitos $Al_2O_3/CaPs$ em Coelhos (*Oryctolagus Cuniculus*).

#### 3.2.1 Materiais

- Células odontoblastóides MDPC-23
- Fibroblastos de ratos - CLL I NCTC (ATCC) clone 929 - clone da linhagem L
- Soro fetal bovino (SFB),

- Antibiótico e antimicótico (Gibco)
- Meio mínimo essencial (MEM) (Gibco)
- Solução tampão de fosfato de sódio (PBS)
- MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio],
- Formazana
- Solvente dimetilsulfóxido (DMSO)
- Acetona PA
- Álcool etílico PA
- Anestésico (Xilazina (3 mg/kg IM) e cetamina (2mg/kg IM))
- Cobaias do tipo coelho (*Oryctolagus Cuniculus*), da raça Nova Zelândia
- Antisséptico (clorexedina alcoólica a 0,5 %)
- Solução fisiológica a 0,9 %
- Analgésicos, antiinflamatórios e antibióticos
- Cloreto de potássio (100 mg/kg, IV).

### 3.2.2 Procedimento *In Vitro* - Citotoxicidade

Buscando avaliar a viabilidade do uso dos compósitos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs como substituto de perdas óssea na odontologia bucomaxilofacial foi averiguado a análise *in vitro* por meio de ensaios de citotoxicidade. Este método representa uma simulação *in vitro* da filtração e difusão dos compósitos na forma de disco em placas de cultivo celular. Foi utilizada uma câmara pulpar laboratorial, “*In Vitro Pulp Device*” (IVPD), fazendo o cultivo de células odontoblastóides MDPC-23.

Para quantificar o material e/ou seus componentes que se difundem através do compósito (disco), foram utilizados radioisótopos para marcar o material experimental e medir a concentração do material difundido por calorimetria, espectrofotometria, ou cromatografia (COSTA e SOUZA, 2005).

#### 3.2.2.1 Preparação e Manutenção das Culturas Celulares

A linhagem celular utilizada foi fibroblastos de ratos - CLL I NCTC (ATCC) clone 929 - clone da linhagem L, tecido conjuntivo de camundongo, designado L-929. As células foram cultivadas em Meio Mínimo Essencial (MEM) (Gibco) suplementado com 10 % de

Soro Fetal Bovino (SFB), 1 % de antibiótico e antimicótico (Gibco) e incubadas em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C, em garrafas plásticas Nunc de 25 cm<sup>2</sup>. As células foram adquiridas do Laboratório de Cultura de Células do Instituto Adolfo Lutz. Após serem adquiridas foram cultivadas no Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares, da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP).

As células foram mantidas, como estoque, em nitrogênio líquido. Partindo deste, foi preparada uma garrafa de cultura de 25 cm<sup>3</sup>, contendo 1 mL de cultura de células (10<sup>6</sup> células/mL), adicionando-se 2 mL de meio de cultura MEM, enriquecido com 10 % SFB. As células foram mantidas em estufa com controle automático de temperatura 37 °C e atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. O crescimento celular foi acompanhado por meio de observação e contagem em microscópio invertido Olympus CK40. Estas células foram subcultivadas após tripsinização, quando formada uma monocamada confluenta.

Após o período de 3 minutos com 2 mL de tripsina as mesmas foram retiradas, adicionando-se 3 mL de meio de cultura MEM suplementado com 10 % de SFB. Deste volume foram retiradas alíquotas de 1 mL e passados para novas garrafas, adicionando-se mais 2 mL de meio MEM suplementado com 10 % SFB e incubadas em atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub> a 37 °C.

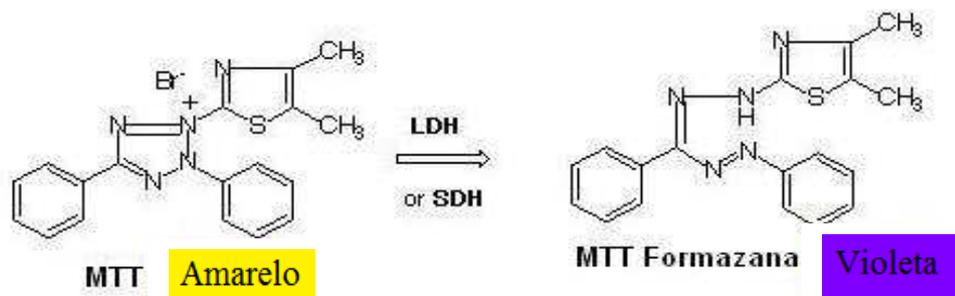
### 3.2.2.2 *Análise da Viabilidade Celular Utilizando MTT*

Para avaliação da viabilidade celular dos macrófagos foi utilizado o método de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio], baseado na capacidade que as células viáveis têm de clivar o anel tetrazólico presente no MTT pela ação de enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria ativa das células, formando cristais de formazana (sal de coloração arroxeadada e insolúvel em água), a partir da redução do tetrazólio MTT (COSTA e SOUZA, 2005). Dessa forma, a redução do MTT a formazana, será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular. A Figura 10 mostra a representação esquemática da reação de redução do MTT a formazana (PEDROSA, 2013).

Avalia-se a viabilidade celular partindo do princípio que as células viáveis, uma vez em contato com o MTT, metabolizam o tetrazólio de metiltiazol na mitocôndria, utilizando enzimas ativas, havendo um acúmulo de cristais de tetrazólio ou formazana, e estes se acumulam no interior da célula e após a lise celular confere ao meio uma coloração azul, que pode ser detectado pela leitura da absorbância em 540 nm, com filtro de referência em 620 nm, conforme recomendado por Mosmann (1983), utilizando-se a técnica de espectroscopia de

absorção na região do visível. Sendo assim, quanto maior a leitura no espectrofotômetro maior o percentual de células viáveis, em relação às não viáveis.

**Figura 10** - Representação esquemática da reação de redução do MTT a formazana.



Fonte: Pedrosa, 2013.

Para realização dos testes de citotoxicidade foram prensadas amostras dos compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  na forma de disco com 4 mm de diâmetro em prensa hidráulica marca Carver com 5 toneladas de modo a se obter o tamanho adequado para ser inseridos em placas de 24 poços de fundo chato para cultura celular. Foram utilizados um controle positivo (látex com  $1 \text{ cm}^2$ ) material citotóxico, e controle negativo (papel de filtro com  $1 \text{ cm}^2$ ) com 100 % de viabilidade celular (não citotóxico). O crescimento celular sem a imersão dos compósitos foi monitorado, para a validação do teste. Todas as amostras usadas como controle positivo e controle negativo apresentaram a mesma área das amostras de  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ . Todas as amostras foram esterilizadas utilizando luz ultravioleta por um período de 24 horas antes da realização dos testes. Os tempos de incubação das amostras variaram entre 24 e 48 horas.

Suspensões das linhagens celulares L-929 nas concentrações de  $1 \times 10^5$  células/mL foram semeadas em volumes de 0,3 mL nas placas de cultura de 24 poços de fundo chato e 0,47 mL de MEM. As placas foram incubadas por 24 horas, a  $37^\circ\text{C}$  em atmosfera úmida com 5 % de  $\text{CO}_2$  para a formação da monocamada celular. Depois deste período, foram adicionadas as amostras dos compósitos, o controle positivo e o controle negativo. Os testes foram realizados em quintuplicata.

Para a leitura do MTT, após o período de incubação (24 e 48 horas), os poços foram lavados com 300  $\mu\text{L}$  de solução tampão de fosfato de sódio (PBS). Em seguida colocaram 200  $\mu\text{L}$  de MTT, numa concentração final de 0,5 mg/mL de MTT-formazana, deixando-as incubadas por um período de 1 hora em estufa, sobre proteção da luz. Após esta etapa, retirou-se o MTT, e colocou-se 400  $\mu\text{L}$  do solvente dimetilsulfóxido (DMSO, Merck, Alemanha)

sobre os precipitados de formazana. Em seguida, a placa foi mantida em agitação por 30 minutos para a solubilização dos cristais de formazana.

A leitura da absorbância dos cristais de formazana, diretamente proporcionais à quantidade de células viáveis, foram medidas utilizando um leitor de ELISA *Spectra Count* com comprimento de onda de 570 nm. Leituras do branco foram também realizadas para determinação do sinal de fundo (*background*). Os dados foram normalizados conforme a fórmula especificada na equação (5) para o cálculo da viabilidade celular (VC):

$$\% \text{ VC} = \frac{\text{AC} - \text{AB}}{\text{ACCP} - \text{AB}} \times 100 \quad (5)$$

Onde: VC é a viabilidade celular; AC a absorbância das células dos compósitos; AB a absorbância do branco e ACCP a absorbância das células do controle positivo.

### 3.2.2.3 Análise Estatística para Citotoxicidade

Os dados estão apresentados nos gráficos com médias e desvios padrão utilizando um número total de cinco amostras. Para a análise estatística do estudo de citotoxicidade foi utilizado o programa *Graph Pad Prism*<sup>®</sup>, onde se utiliza a análise de variância a 2 critérios (2-way Anova), comparando as amostras com o controle negativo para a citotoxicidade (papel de filtro) material com 100 % de viabilidade celular (não citotóxico) e em relação aos seus respectivos tempos de incubação. As diferenças foram consideradas significantes entre os grupos quando apresentaram valores de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ), 1% ( $p < 0,01$ ) ou 0,1 % ( $p < 0,001$ ), onde  $p$  é o erro considerado no programa.

A partir dos resultados de citotoxicidade foram escolhidas as amostras de compósitos mais viáveis para o estudo *in vivo*.

## 3.2.3 Procedimento *In Vivo*

### 3.2.3.1 Animais

A implantação *in vivo* foi realizada pela introdução dos compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  com concentração de 10 % (10C) e 30 % (30C) do CaPs em cobaias do tipo coelho (*Oryctolagus Cuniculus*), da raça Nova Zelândia, sendo utilizados 18 coelhos hípidos, adultos, machos, procedentes do coelhário particular do próprio pesquisador. A idade variou entre 7 e 9 meses (média  $8,1 \pm 1,11$  meses) e o peso entre 1.800 e 3.500 g, com média de  $2,511 \pm 586$  g). Todos

foram mantidos em gaiolas (dois animais/gaiola), recebendo ração comercial balanceada, cenoura (betacaroteno), capim elefante (*Pennisetum Purpureum*), folhas verdes e água potável *ad libitum* e mantidos em quarentena antes do início do procedimento. A desvermifugação foi realizada com ivermectina (0,5 mg/kg) por via subcutânea. A Figura 11 e Tabela 5 ilustram a localização e uma descrição detalhada do cronograma de onde foi implantado cada um dos compósitos estudados, respectivamente.

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

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

**Figura 11** - Localização da posição onde foram implantados os compósitos 10C, 30C e controle.



Fonte: Própria, 2013.

**Tabela 5** - Implantação dos compósitos.

Grupo I			Grupo II		
10C	30C	Controle	10C	30C	Controle
Orifício médio	Orifício superior	Orifício inferior	Orifício médio	Orifício superior	Orifício inferior
Período de Eutanásia					
30 dias (9 coelhos)			60 dias (9 coelhos)		

Fonte: Própria, 2013.

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

### *3.2.2.2 Preparação dos Compósitos para Implante*

Os compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  (10C e 30C) foram usinados na Unidade Odontológica Marques de Almeida Lima Ltda, situada na Avenida Rio Branco 37- térreo, centro, Campina Grande - PB), nas dimensões entre 1 - 2 mm de diâmetro, e altura aproximadamente de 5 mm, para evitar fraturas nas metáfises dos coelhos, quando da realização das trepanações produzidas por brocas cirúrgicas sequenciadas com dimensões aproximadas de 0,9 a 1,5 mm de diâmetro. As trepanações óssea foi executada com um mandril comercial e um perfurador manual desenvolvido exclusivamente para esta pesquisa, com o objetivo que a temperatura de trepanação óssea não ultrapassar os 40 °C.

Os compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  (10C e 30C) antes de serem implantados foram desengordurados em ultrassom modelo 712 da marca FISATOM XE 100 rpm com acetona PA e álcool etílico PA por 10 minutos (cada compósito) e em seguida foram secos em estufa FANEM modelo 315 a 100 °C por 30 minutos e acondicionados individualmente em tubos de ensaio estéril, hermeticamente fechados e então submetidos ao processo de esterilização usando uma autoclave em Autoclave (Dabi-Atlante D 700 – 19 litros) a 121°C por 20 minutos da Unidade Odontológica Marques de Almeida Lima Ltda, sendo acondicionada até o momento das implantações cirúrgicas nos coelhos.

### *3.2.2.3 Procedimento Cirúrgico*

O procedimento cirúrgico foi realizado conforme os padrões estabelecidos de Cirurgia na Policlínica Veterinária de Campina Grande, sob a supervisão do médico veterinário Rodrigo Tavares Jordão de Vasconcelos CRMV 0828 - PB. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da UFCG (ANEXO III).

Cada animal recebeu de forma padronizada dois implantes (compósitos 10C e 30C) e um orifício controle (C) situado na metáfise proximal da tíbia direita, face interna, conforme ilustrado na Figura 11 e Tabela 5. No pré-operatório cada animal foi submetido a jejum sólido por seis horas e líquido por uma hora A tricotomia foi feita com aparelho de tricotomia com

lâmina nº 0, sendo compreendida desde a região femoral distal até o calcâneo. Aproximadamente 30 minutos antes do ato operatório foi feita a administração de cefalosporina na dose de (22 mg/kg via intravenosa IV). A medicação anestésica consistiu na associação de xilazina 10 mg/kg via intramuscular (IM) com cloridrato de quetamina de 10 mg/kg, misturadas na mesma seringa.

Depois de anestesiado, cada animal foi colocado em decúbito lateral direito sobre colchão térmico. A antisepsia da área operatória foi realizada com clorexedina alcoólica a 0,5%. Após a delimitação da área operatória com campos cirúrgicos, uma incisão cutânea foi realizada ao nível da face medial da crista da tíbia direita (Figura 11).

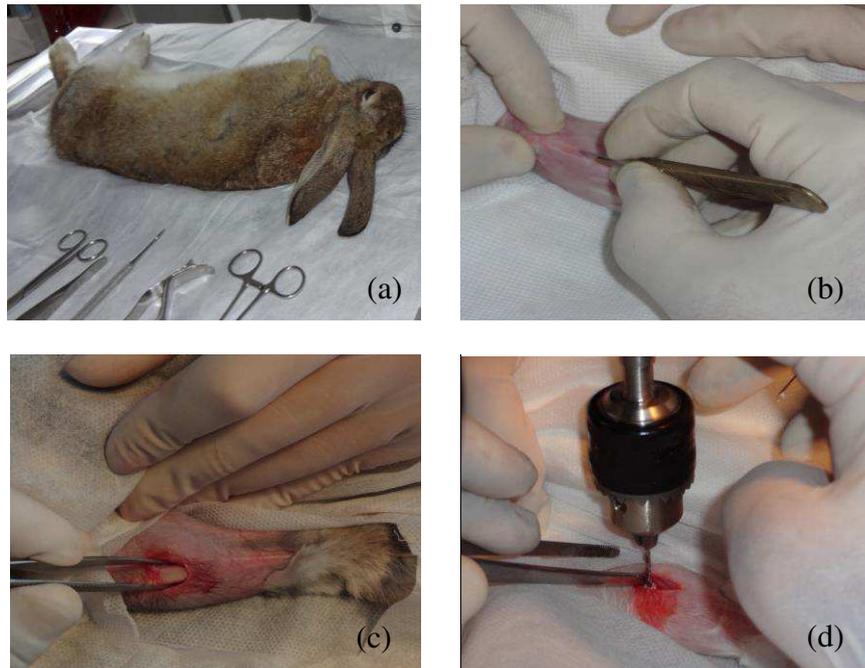
Realizou-se divulsão do tecido celular subcutâneo e músculo com tesoura curva de Metzembaun e elevador de periósteo, expondo-se a tíbia. A seguir, foi realizado três orifícios cortiço medulares com broca de 1,5 mm, irrigando-se constantemente com solução salina isotônica. No sentido cranial para caudal, o primeiro orifício (superior) foi preenchido com o implante 30C, o segundo orifício (médio) com implante 10C e o terceiro orifício (inferior) permaneceu sem preenchimento, para controle (Figura 11). Realizou-se sutura em bloco dos tecidos incisados com fio de náilon 3 - 0, com o objetivo de reduzir espaço morto e fazer a dermorrafia.

#### *3.2.2.4 Cuidados Pós-Cirúrgicos*

Os animais foram, colocados nas gaiolas para a recuperação da anestesia, em ambiente silencioso, com pouca luz, com um mínimo de manipulação, evitando assim estresse dos animais. A temperatura local foi a ambiente e foram envolvidos em compressas cirúrgicas. Outros cuidados foram tomados, tais como: limpeza das gaiolas, proteção nos fundos das gaiolas gradeadas para evitar fraturas o controle do consumo de água e administração de analgésicos, antiinflamatórios e antibióticos no período pós-operatório quando necessário.

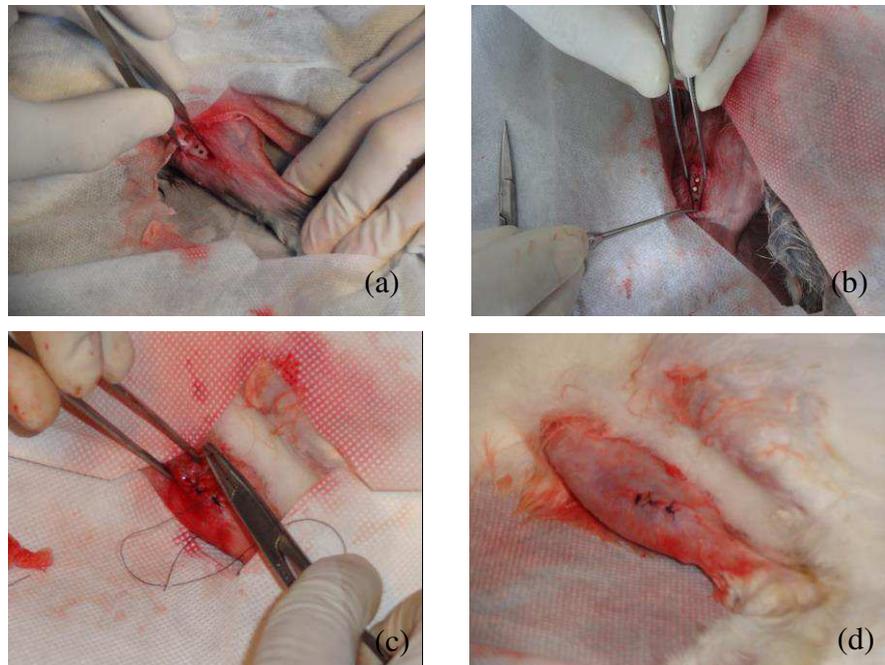
Nos primeiros dias foi feita antisepsia da ferida cirúrgica com solução fisiológica a 0,9% até a remoção dos pontos de pele, realizada entre o décimo e o décimo segundo dias de pós-operatório. A Figura 12, 13 e 14 ilustra o fluxograma de todo o procedimento cirúrgico e o pós-operatório.

**Figura 12** - Procedimento cirúrgico: (a) coelho anestesiado, (b) incisão, (c) exposição óssea, e (d) trepanação.



Fonte: Própria, 2013.

**Figura 13** - Procedimento cirúrgico: (a) confecção do defeito, (b) implantação, (c) sutura, e (d) finalização da sutura.



Fonte: Própria, 2013.

**Figura 14** - Pós-operatório: (a) curativo, (b) pós-operatório e (c) retirada dos pontos.



Fonte: Própria, 2013.

Durante o pós-operatório não ocorreu nenhuma perda de cobaias (coelhos) nos dois grupos operados, graças à técnica cirúrgica adequada e cuidados gerais acurados.

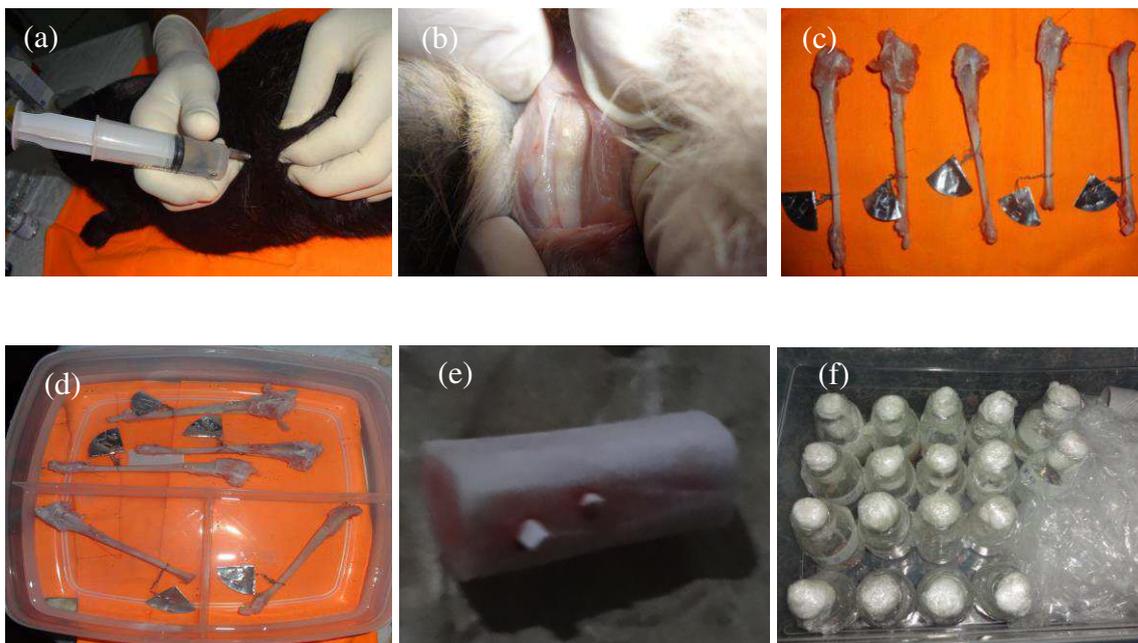
#### 3.2.2.5 Protocolo de Eutanásia

Após os procedimentos cirúrgicos foram sacrificados por eutanásia 9 coelhos com 30 (Grupo I) e 9 coelhos com 60 dias (Grupo II) A eutanásia foi realizada através da administração de anestésico em dose letal, conforme previsto pela Comissão de Ética em Pesquisa – CEP da UFCG (ANEXO III) projeto aprovado em reunião extraordinária nº 2/2011 em 16 de agosto de 2011. Os animais foram submetidos à após o procedimento cirúrgico. Inicialmente foi feita a administração de xilazina (3 mg/kg, IM) e cetamina (2 mg/kg, IM). Depois de dois minutos após a indução anestésica foi induzida a parada cardíaca por administração de cloreto de potássio (100 mg/kg, IV). Confirmada a morte, foi removido o membro inferior direito de cada coelho, que foram radiografadas, realizando-se em seguida remoção das tíbias. O descarte dos coelhos após eutanásia foi feito por incineração no setor de patologia do Hospital Veterinário da UFCG.

#### 3.2.2.6 Remoção das Tíbias

Após a parada cardiorrespiratória dos coelhos, foi desarticulado o membro inferior direito de cada animal, e em seguida radiografado. Posteriormente as partes moles foram dessecadas e extraído-se as tíbias, que foram avaliadas macroscopicamente, fotografando-se os implantes. As tíbias foram imersas em frascos de vidro contendo solução de formalina tamponada a 10 % e enviadas ao laboratório para análise histológica. A Figura 15 ilustra o fluxograma da eutanásia e remoção das tíbias.

**Figura 15** - Eutanásia e remoção das tíbias dos coelhos: (a) anestesia, (b) exposição da tíbia, (c) tíbias removidas, (d) tíbias no formol, (e) tíbia removida e (f) acondicionamento.



Fonte: Própria, 2013.

### 3.2.2.7 Colheita e Processamento do Sítio Cirúrgico Pós-Eutanásia

A preparação das lâminas foi realizada no Laboratório da Pós-Graduação em Anatomia Patológica da Universidade Federal de Pernambuco, procedendo-se inicialmente à descalcificação para posterior inclusão em parafina, corte em micrótomo e coloração.

O processo de descalcificação das tíbias foi realizado inicialmente através da imersão em solução de ácido nítrico a 10 % por seis horas, que foi trocada em seguida por ácido nítrico a 2 % por mais 10 horas. Procedeu-se então à lavagem das peças em água de torneira, com posterior imersão em carbonato de cálcio por 20 minutos. Testou-se o corte do osso com navalha de micrótomo, verificando-se sua adequação para o processamento histológico.

Terminada essa etapa, os fragmentos de tíbias foram colocados em álcool a 70 % por 24 horas, em seguida álcool a 80 % por 30 minutos, depois álcool a 90 % mais 30 minutos e finalmente álcool a 100 % por 30 minutos e álcool xilol nos últimos 30 minutos. Em seguida, os fragmentos foram imersos em parafina líquida a 60 % por 40 minutos, incluindo-se o material em blocos de parafina para corte posterior em micrótomo.

Posteriormente, os blocos de parafina foram cortados em fatias sagitais de cinco micrômetros de espessura, obtendo-se de cada bloco de parafina pelo menos duas lâminas

submetidas à técnica de coloração com hematoxilina-eosina. A coloração nuclear (hematoxilina) é progressiva, enquanto a coloração citoplasmática (eosina) é regressiva, sendo a técnica de coloração mais utilizada universalmente (RIBEIRO e LIMA, 2000). Seu protocolo segue os seguintes passos: desparafinização e hidratação; solução de hematoxilina – dois a cinco minutos; lavagem em água corrente – um a cinco minutos; solução de eosina – um minuto; lavagem em água corrente – três banhos; álcoois gradativos: 70 %, 80 %, 90 % e 100 % - cinco banhos, cada; xilol para clarificação; montagem em lamínula e ENTELAN. Resultado: núcleos em azul e citoplasma em rosa laranja.

### 3.2.2.8 Caracterização Após Implante

#### Avaliação Radiológica – RX

As radiografias foram realizadas na posição média lateral (ML) do membro operado, com 30 e 60 dias de pós-operatório, visando acompanhar o processo de reparação óssea em torno do implante. Foi utilizado o equipamento de raios X Chemetron Universal X Ray Easymatic Super 325 da Clínica Radiológica Dr. Saturnino Nóbrega de Campina Grande, com auxílio da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Denise Nobrega Diniz, chefe do setor de radiologia. O aparelho para emissão de raios X perpendicularmente mantinha a distância foco filme padronizada de 30 cm.

Cada uma das 18 radiografias foi analisada separadamente e em conjunto com o seu referido grupo, onde foram avaliados a neoformação óssea, reabsorção óssea e fratura óssea em torno do implante, de acordo com os parâmetros descritos na Tabela 6.

**Tabela 6** - Escala gradual para avaliação do grau de radiopacidade da lesão óssea produzida experimentalmente na tibia de coelhos.

<b>Graus de Radiopacidade</b>	<b>Valores atribuídos</b>	<b>Descrição da reação óssea</b>
Radiopacidade ausente	0	Ausência de reação periosteal
Radiopacidade discreta	1	Reação periosteal apenas nas bordas da lesão óssea
Radiopacidade moderada	2	Reação periosteal nas bordas da lesão com radiopacidade evoluindo concentricamente sem consolidação completa da lesão óssea
Radiopacidade acentuada	3	Consolidação completa da lesão óssea

Fonte: Azevedo, 2011.

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

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

#### *Avaliação Histológica por Microscopia Óptica – MO*

A análise histológica foi realizada através de microscópio óptico de luz nas lentes com aumento de 10x e 40x NIKONECLIPSE E200 do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Pernambuco (FOP) da Universidade de Pernambuco (UPE). Utilizou-se um compósito de captura e análise de imagem por um conjunto de pixels –Image-Pro Plus®. A análise histológica foi realizada pelo Prof. Emanuel Sávio de Souza Andrade, avaliando-se a interface osso-implante através dos seguintes parâmetros:

- Infiltrado e reação Inflamatória.
- Atividade osteoblástica
- Neoformação óssea
- Área de fibrose
- Características do implante

#### *Análise Estatística para Análise Radiográfica*

A análise estatística dos resultados do experimento *in vivo* foi realizada utilizando-se o *Medcalc software bvba*, versão 12.7 (MEDCALC®, 2013). Para descrição de idade e peso dos coelhos, foram utilizados as médias e seus respectivos desvios-padrão.

Para comparação do grau de radiopacidade de acordo com o tipo de compósito em relação ao orifício controle, utilizou-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney (ALVES, 2013), o qual é usado para a comparação de dois grupos independentes. Neste trabalho, se comparou inicialmente os escores dos implantes 10C e 30C e em seguida cada um desses com o orifício controle. Também foram comparados os mesmos parâmetros de acordo com o tempo de eutanásia (30 *versus* 60 dias).

Foram descritas a variação, a mediana e o intervalo interquartil (é aquele que tem por extremo inferior o primeiro quartil e, por extremo superior, o terceiro quartil e abrange metade dos elementos do conjunto) para cada grupo e se adotou a margem de erro U (p) nas decisões dos testes estatísticos de 5 %, sendo o percentual de credibilidade significativamente maior, uma vez que  $p < 0,05$ . O valor p indica que há diferença entre os grupos comparados.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

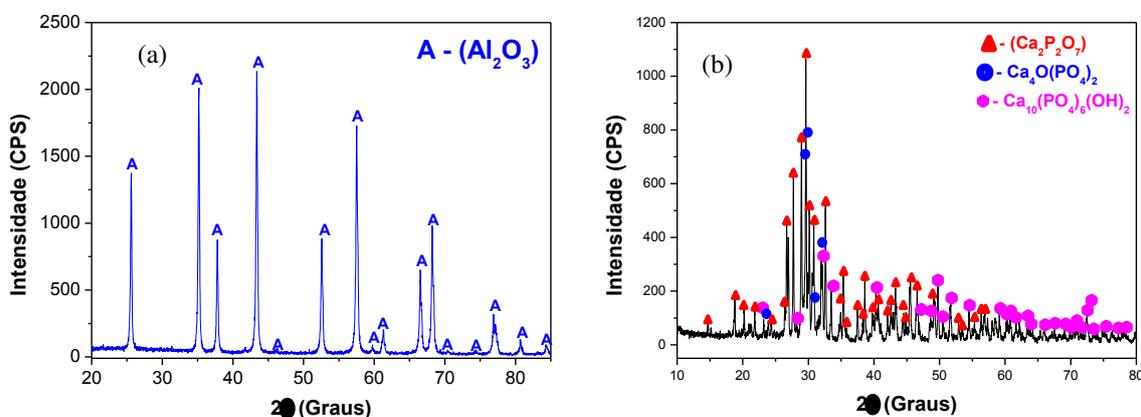
Os resultados e discussões apresentados nesta tese foram descrito em três etapas, para maior clareza e entendimento da mesma. A primeira etapa consistiu na discussão sobre os resultados da caracterização da  $\text{Al}_2\text{O}_3$  comercial (AC) e do fosfato de cálcio (CaPs) sintetizado. A segunda etapa, enfatizamos a discussão dos resultados de caracterização dos compósitos de  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  e por fim, na terceira etapa foi discutido os resultados referentes ao estudo *in vitro* e *in vivo* dos compósitos visando a aplicação na odontologia bucomaxilofacial.

### 4.1 ETAPA I - Caracterização da $\text{Al}_2\text{O}_3$ Comercial e do Fosfato de Cálcio (CaPs)

#### 4.1.1 Difração de Raios X

Na Figura 16 encontram-se os difratogramas de raios X para amostra de  $\alpha$  – alumina comercial (AC) e da amostra de fosfato de cálcio (CaPs) sintetizado e calcinado a  $900\text{ }^\circ\text{C}$ .

**Figura 16** - Difratogramas de raios X: (a) AC e (b) CaPs.



Fonte: Própria, 2013.

Observa-se na Figura 16a, a presença da fase cristalina majoritária romboédrica da alumina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) (ficha JCPDS 75 – 0783) sob a forma do mineral coríndon. Estes resultados confirmam a característica do material fornecido pela empresa Sumitomo Co. Japan. A fase coríndon é conhecida como a fase mais estável da alumina, que é encontrada em temperaturas acima de  $1290\text{ }^\circ\text{C}$  (BAGWELL et al., 2001).

De acordo com o difratograma de raios X apresentado na Figura 16b, observa-se a formação da fase tetragonal do pirofosfato de cálcio ( $\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ) (ficha padrão JCPDS 09-

0346) como fase majoritária, além da presença da hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ] (ficha JCPDS 86-0740) e do fosfato tetracálcio [ $\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$ ] (ficha JCPDS 25-1137) como fases secundárias. A presença da fase pirofosfato de cálcio como fase majoritária possivelmente foi consequência em virtude de excesso de ácido fosfórico, pois durante a preparação o  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (60 mL) deve ser adicionado lentamente a solução de hidróxido de cálcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) (100 mL) para atingir a relação  $\text{Ca/P} = 1,67$ .

Se durante a adição do  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ocorre um excesso desta quantidade a relação  $\text{Ca/P}$  reduz favorecendo a formação de outra fase de fosfato de cálcio, no caso deste trabalho foi o pirofosfato de cálcio cuja relação teórica de  $\text{Ca/P} = 1,0$ . Então mesmo após a calcinação a  $900^\circ\text{C}$ , a fase do pirofosfato de cálcio manteve-se presente, havendo início de transformação de fase para as fases secundária da hidroxiapatita e do fosfato tetracálcio.

Este mesmo comportamento foi observado por Rigo et al. (2007) quando estudaram a obtenção de hidroxiapatita, visando o uso como biocerâmicas na formação de cimentos ósseos. Os autores indicaram que o excesso de ácido fosfórico na síntese por precipitação leva ao surgimento de outros sistemas de fosfatos de cálcio.

Fook (2005), por sua vez, obteve a HAp como fase majoritária, usando o método de precipitação e calcinando as amostras a  $700^\circ\text{C}$ , e mostrou que como a adição do ácido fosfórico foi feita com precisão na quantidade prevista nos cálculos estequiométrico foi possível obter fosfato de cálcio na relação  $\text{Ca/P} = 1,67$ . Fook (2008), também relatou a síntese da HAp por precipitação e calcinação posterior a  $1100^\circ\text{C}$ . O autor reportou a presença da HAp, e traços de fosfato tricálcio (TPC). O autor indicou que neste processo possivelmente houve excesso de ácido fosfórico durante a síntese.

Outros autores como Cunha et al. (2006) e Nair et al. (2009) estudaram também a síntese de fosfatos de cálcio por precipitação e também reportaram presença de outras fases de fosfatos de cálcio além da HAp. Teixeira (2013) sintetizou a HAp por precipitação para uso como material de preenchimento facial. Os resultados mostraram que tanto como sintetizado como após sinterização a  $900^\circ\text{C}$  por 2 h houve apenas a formação da fase única da HAp, sem presença de nenhum outro sistema de fosfato de cálcio. Barros, (2012) também usou o método de precipitação para obtenção de HAP para obtenção de cimentos endodônticos. Os resultados indicaram que a HAP sinterizada a  $1300^\circ\text{C}$  por 2 h favoreceu apenas a fase única da HAp.

Todos estes trabalhos permitem concluir que o método de precipitação é simples, rápido, e eficiente para obter uma grande variedade de fosfatos de cálcio. Porém para obter a estequiometria da fase com exatidão após a síntese é necessário um controle rigoroso da

forma e quantidade de como o ácido fosfórico é adicionado a solução de hidróxido de cálcio (COSTA et al., 2009).

#### 4.1.2 Espectroscopia de Fluorescência de Raios X (EDX)

Por meio da fluorescência de raios X foi possível obter dados semi-quantitativos da composição elementar da alumina comercial e do CaPs (Tabela 7). Observa-se que, os valores encontrados por meio da análise de EDX para a amostra alumina comercial foram próximos aos valores teóricos calculados para o óxido  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , cujos cálculos estão contidos no APÊNDICE A.

**Tabela 7** - Fluorescência de raios X da alumina comercial e do CaPs calcinado a 900 °C/120 min.

	<b>Óxidos</b>	<b>% Teórica</b>	<b>% Experimental</b>
<b><math>\text{Al}_2\text{O}_3</math></b>	$\text{Al}_2\text{O}_3$	100	99,852
	BaO	-	0,106
	$\text{SO}_3$	-	0,015
	$\text{Fe}_2\text{O}_3$	-	0,013
	NiO	-	0,005
	ZnO	-	0,009
<b>CaPs</b>	$\text{P}_2\text{O}_5$	42,38	56,713
	CaO	55,83	38,120
	$\text{H}_2\text{O}$	1,79	n.d.
	$\text{SiO}_2$	-	3,886
	$\text{Al}_2\text{O}_3$	-	0,985
	$\text{K}_2\text{O}$	-	0,153
	SrO	-	0,094
	$\text{Fe}_2\text{O}_3$	-	0,049

Fonte: Própria, 2013.

Observa-se que os valores encontrados por meio da análise de EDX para CaPs sintetizado e calcinado a 900 °C por 120 min foram distintos dos valores teóricos calculados para a hidroxiapatita  $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , cujo cálculos estão contidos no APENDICE B. A quantidade de óxido de fósforo ( $\text{P}_2\text{O}_5$ ) experimental foi 25,27 % superior ao valor teórico, enquanto que o percentual experimental de óxido de cálcio (CaO) foi 31,12 % inferior ao estimado teoricamente.

Deste modo, como a percentagem experimental de óxido de fósforo foi maior quando comparado com o óxido de cálcio experimental, mostra que a fase da HAp não foi alcançada. Para obter HAp experimentalmente a percentagem de CaO deve ser superior a percentagem de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , por isso que a fase obtida reportada nos difratogramas de raios X da Figura 16b foi o

pirofosfato de cálcio, cuja a quantidade de foi maior de que a quantidade de CaO relatada na análise de EDX.

Os demais óxidos observados experimentalmente e que não constam na composição teórica do CaPs provavelmente são proveniente das impurezas. A presença destas impurezas também foi reportada por Barros et al. (2012) e Teixeira (2013) quando estudaram a síntese da HAp por precipitação usando os mesmos reagentes químicos. A descrição das impurezas contidas nos reagentes utilizados encontra-se no ANEXO I.

#### 4.1.3 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 17 encontram-se os espectros vibracionais na região do infravermelho na faixa de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$  da alumina e do fosfato de cálcio (CaPs) sintetizado. Observa-se no espectro da Figura 17a, uma larga banda de absorção em torno de  $3500 \text{ cm}^{-1}$  correspondente às vibrações de estiramento do grupo O-H devido à água fisicamente adsorvida e às hidroxilas superficiais, e bandas de vibração de deformação do grupo O-H em torno de  $1630 \text{ cm}^{-1}$  e  $654 \text{ cm}^{-1}$ . Estas bandas também foram reportadas por Li et al., (2006); Hassanzadeh-Tabrizi e Taheri-Nassaj, (2009) quando analisaram pós ultrafinos de alumina pelo método sol-gel e co-precipitação, respectivamente.

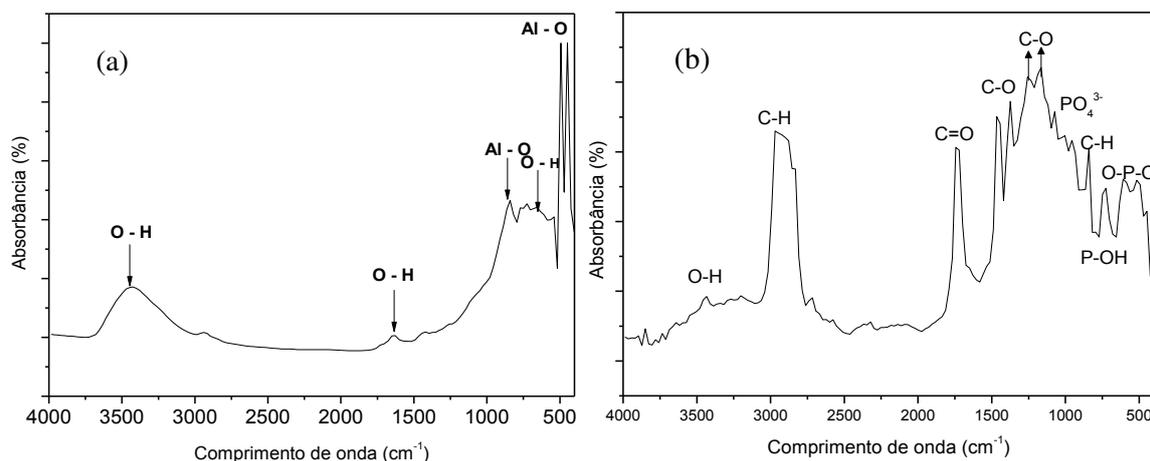
O aparecimento de uma sobreposição de picos na região de baixa frequência ( $1000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ), com três máximos distintos a  $842$ ,  $492$  e  $448 \text{ cm}^{-1}$ , correspondem às vibrações de estiramento do grupo Al-O devido à existência de  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ .

A Figura 17b apresenta o espectro vibracional na região do infravermelho, na faixa de  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ , do fosfato de cálcio (CaPs) obtido por via úmida. As bandas de energia situadas a  $450$  e  $523 \text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas às vibrações de estiramento P-OH ( $\nu_7$ ) do grupo  $\text{HPO}_4^{2-}$ , enquanto que a banda situada a  $610 \text{ cm}^{-1}$  corresponde à vibração de deformação O-P-O ( $\nu_4$ ) do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  ou do grupo  $\text{HPO}_4^{2-}$ . A banda por volta de  $962 \text{ cm}^{-1}$  está relacionada às vibrações de estiramento simétrico do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\nu_1$ ). A banda a  $1080 \text{ cm}^{-1}$  indica vibrações de estiramento assimétrico do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  ( $\nu_3$ ). Em  $842 \text{ cm}^{-1}$  situa-se uma banda correspondente às vibrações de estiramento antissimétrico do grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  ( $\nu_2$ ). Em  $1466 \text{ cm}^{-1}$  está uma banda de estiramento simétrico do grupo  $\text{CO}_3^{2-}$  ( $\nu_1$ ).

As bandas em torno de  $2925 \text{ cm}^{-1}$  e na faixa de  $715$  a  $750 \text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas às vibrações de estiramento do grupo C-H, a banda por volta de  $1735 \text{ cm}^{-1}$  as vibrações do grupo C = O, e as bandas situadas a  $1165$ ,  $1257$  e  $1377 \text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas a vibrações do grupo C - O. A banda larga em torno de  $3440 \text{ cm}^{-1}$  corresponde às vibrações dos grupos  $\gamma(\text{O-H})$ , dos

grupos hidroxilas livres ou ligados a hidrogênio, resultante da água fisicamente adsorvida, a qual ocorre como resultado do uso de KBr higroscópico durante a preparação das amostra para a análise de infravermelho.

**Figura 17** - Espectro vibracional na região do infravermelho: (a) AC e (b) CaPs.



Fonte: Própria, 2013.

As bandas que ocorrem nas regiões de 1500-1400  $\text{cm}^{-1}$  e em 875  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuídas ao estiramento assimétrico e deformação fora do plano, respectivamente da ligação C-O, dos grupos  $\text{CO}_3^{2-}$ , incorporados à rede cristalina do fosfato. A banda em 875  $\text{cm}^{-1}$  também pode ser resultado da incorporação de íons  $\text{HPO}_4^{2-}$ . Outras bandas observadas em 1090, 1030 e 963  $\text{cm}^{-1}$  correspondem à deformação assimétrica do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$ . A banda visualizada próxima a 605  $\text{cm}^{-1}$  corresponde à deformação assimétrica da ligação P-O do grupo  $\text{PO}_4^{3-}$  e as bandas em 566 e 478  $\text{cm}^{-1}$  foram atribuída à deformação assimétrica P-O(H) do grupo  $\text{HPO}_4^{2-}$ .

As bandas observadas para o CAPs calcinado a 900 °C por 2 h foram semelhantes as bandas reportadas por Fernandes (2007), quando sintetizou fosfatos de cálcio puros, partindo das razões molares Ca/P de 0,5; 1,0; 1,3 e 1,5 e modificou quimicamente a superfície por meio de reação de silanização com o agente silante 3- mercaptopropiltrimetoxissilano, visando aplicá-lo na adsorção de  $\text{Cu}^{2+}$  em solução. O autor observou as seguintes bandas: em 3570  $\text{cm}^{-1}$  atribuída à vibração de estiramento de grupos ( $\text{OH}^-$ ), tanto da água adsorvida, quanto dos grupos ( $\text{OH}^-$ ) dos fosfatos, e sua deformação apareceu em 1637  $\text{cm}^{-1}$ ; entre 3700 e 2600  $\text{cm}^{-1}$ , a qual foi atribuída à água fisicamente adsorvida; em 2916  $\text{cm}^{-1}$  apareceu uma banda correspondente ao estiramento do grupo P-O(H).

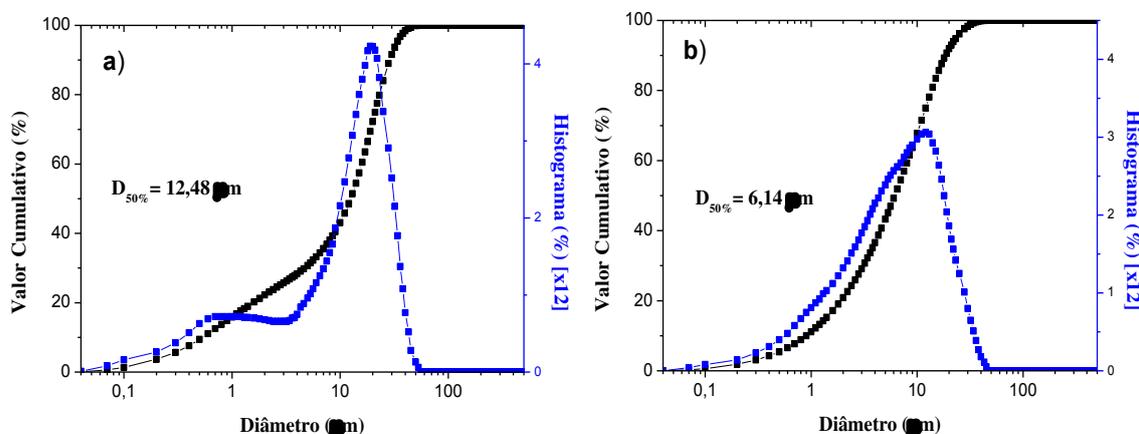
Rigo et al., (2007) quando estudaram a obtenção da HAp por precipitação reportaram estas mesmas bandas sendo nas faixas de:  $491\text{ cm}^{-1}$ ,  $563\text{ cm}^{-1}$ ,  $603\text{ cm}^{-1}$ ,  $1043\text{ cm}^{-1}$  e  $1088\text{ cm}^{-1}$  tem-se os picos referentes ao grupamento  $\text{PO}_4^{3-}$ ,  $636\text{ cm}^{-1}$  e  $3574\text{ cm}^{-1}$ , referentes ao grupamento OH. A banda em  $871\text{ cm}^{-1}$  representa vibrações moleculares do grupo  $\text{CO}_3^{2-}$ , o que indica a presença deste grupo na fase, sendo, portanto, hidroxiapatita carbonatada, devido à substituição iônica do carbonato, na estrutura da HA.

Todas as bandas encontradas nas amostras estão de acordo com as observadas por Barros et al. (2012) e Teixeira (2013), quando estudaram a síntese de hidroxiapatita nanocristalina pelo método da precipitação. Também as bandas encontradas nas amostras estão de acordo com a literatura especializada de caracterização de materiais por FTIR (SILVERSTEIN et al., 2007).

#### 4.1.4 Distribuição Granulométrica

Na Figura 18 se encontra os resultados de distribuição granulométrica da alumina e fosfatos de cálcio, respectivamente. Observou-se que a alumina comercial (Figura 18a) apresenta uma distribuição estreita bimodal com tamanho mediano de aglomerados de  $12,48\text{ }\mu\text{m}$ . Enquanto que os CaPs (Figura 18b) apresenta uma distribuição monomodal, um pouco mais larga, e com tamanho mediano de aglomerados de  $6,14\text{ }\mu\text{m}$ . A alumina comercial apresentou tamanho mediano de aglomerados duas vezes maior quando comparado com o CaPs.

**Figura 18** - Distribuição de tamanho de aglomerados: a) alumina comercial e, b) CaPs.



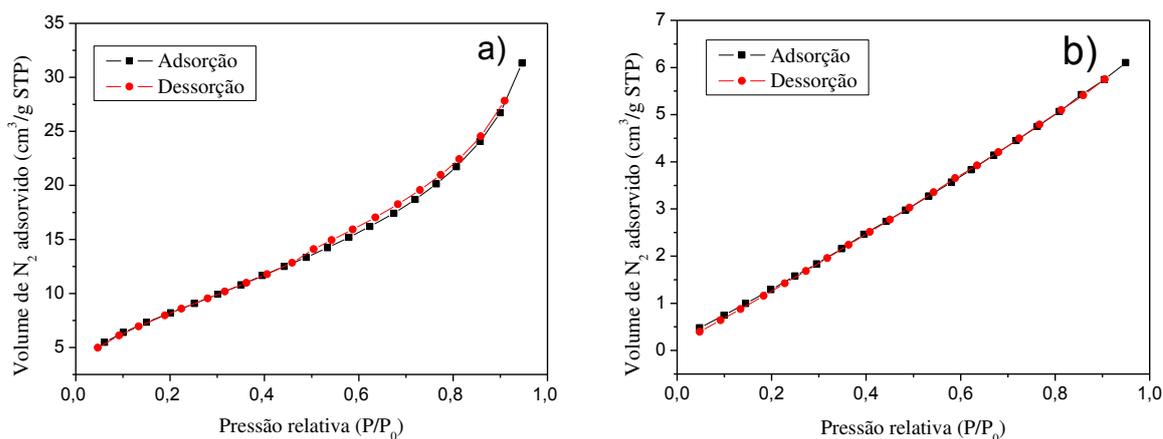
Fonte: Própria, 2013.

Este formato da distribuição de partículas monodal e tamanho de aglomerado de 6,14  $\mu\text{m}$  do CaPs obtido neste trabalho foi diferenciado do formato e tamanho de aglomerados mediano reportado por Teixeira (2013) para as amostras de HAp sintetizadas por precipitação e calcinada a 900°C por 2h, cuja distribuição foi bimodal, com tamanho de aglomerado mediano de 10  $\mu\text{m}$ . Isto mostra que o tipo de fase obtida alterou a morfologia e tamanho de aglomerados formados. Porém, estes valores de tamanho de aglomerado foram semelhantes aos valores reportados por Leeke et al. (2012), quando estudaram o efeito das condições de processamento na obtenção de nanopartículas de hidroxiapatita pelo método sol-gel e obtiveram aglomerados de 5  $\mu\text{m}$ .

#### 4.1.5 Adsorção de Nitrogênio (BET)

Na Figura 19 se encontra representado pela isoterma de adsorção/dessorção de  $\text{N}_2$  o resultado da caracterização textural da alumina pura e do fosfato de cálcio. De acordo com a classificação da IUPAC (GREGG e SING, 1982), observa-se para a alumina (Figura 19a) um perfil de isoterma do tipo IV, que é característico de materiais mesoporosos (dimensão de poros entre 2 e 50 nm), e, também, um discreto *loop* de histerese do tipo H3, característicos de poros em fendas originários de agregados de partículas.

**Figura 19** - Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio: (a) alumina e (b) fosfato de cálcio.



Fonte: Própria, 2013.

Observa-se mediante a Figura 19b, um perfil de isoterma do tipo II, que é característico de materiais macroporosos (dimensão de poros de 50 nm). Porém o *loop* de histerese foi do tipo H3, característicos de poros em fendas originários de agregados de partículas, semelhante ao observado para a amostra de alumina comercial.

Na Tabela 8 encontram-se os valores de área superficial ( $S_{\text{BET}}$ ), raio de poro ( $R_{\text{P}}$ ), volume de poro ( $V_{\text{P}}$ ) e tamanho de partícula ( $D_{\text{BET}}$ ) referente à alumina e ao fosfato de cálcio. Observa-se que a alumina possui uma área superficial cerca de 76,3 % maior que a área superficial do fosfato de cálcio, resultando em um volume de poro ( $V_{\text{P}}$ ) e raio de poro ( $R_{\text{P}}$ ), também 80 e 19,52 % superior que o do fosfato de cálcio. Conseqüentemente, o tamanho de partícula da alumina, cujo valor foi 99 nm, foi inferior 81,35 % que o do fosfato de cálcio, cujo valor foi 531 nm.

**Tabela 8** - Valores de área superficial ( $S_{\text{BET}}$ ), raio de poro ( $R_{\text{P}}$ ), volume de poro ( $V_{\text{P}}$ ) e tamanho de partícula ( $D_{\text{BET}}$ ).

Amostras	$S_{\text{BET}}$ (m <sup>2</sup> /g)	$R_{\text{P}}$ (Å)	$V_{\text{P}}$ (cm <sup>3</sup> /g)	$D_{\text{BET}}$ (nm)
AC	15,25	19,41	0,020	99
CaPs	3,62	15,62	0,004	531

Fonte: Própria, 2013.

Kikawa et al. (2009) quando obtiveram hidroxiapatita e fosfato octacálcio utilizando o mixer de cálcio e fosfato, observaram valores de área superficial 22,84 e 86,6 m<sup>2</sup>/g, para o fosfato octacálcio e hidroxiapatita, respectivamente. O valor de área superficial para o CaPs obtido neste trabalho, foi inferior ao valor observado por Kikawa et al. (2009). Os autores observaram um volume de poros maior quando comparado com o CaPs.

Para a amostra de alumina comercial AC verifica-se que o resultado de área superficial foi semelhante ao valor de 13,6 m<sup>2</sup>/g reportado pelo fabricante Sumitomo Co. Japan, e por Chinelatto et al., (2009) que foi de 12,10 m<sup>2</sup>/g.

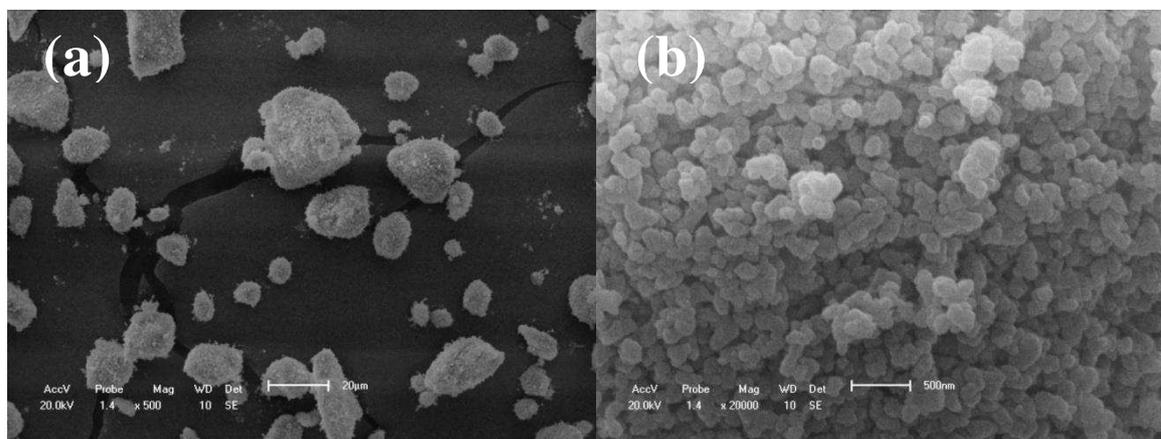
#### 4.1.6 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 20 e 21 apresenta as micrografias da alumina comercial (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e do CaPs sintetizado obtidas a partir da microscopia eletrônica de varredura (MEV). Mediante a micrografia Figura 20a, pode-se observar a formação de aglomerados na forma de flocos porosos ovulares, de tamanho inferior a 20 μm, com uma distribuição de tamanho relativamente pequeno, constituídos de partículas finas. Por meio da Figura 20b, se observa em aumentos maiores que as partículas têm formatos aproximadamente esféricos e são menores que 130 nm, com porosidade interpartícula.

Estes valores são bastante próximo ao tamanho de partícula reportado pelo fabricante Sumitomo Co. Japan para a alumina AKP-53 que foi 2 μm (200 nm) e também semelhante ao resultado reportado por Chinelatto et al., (2009) quando investigaram a influência do

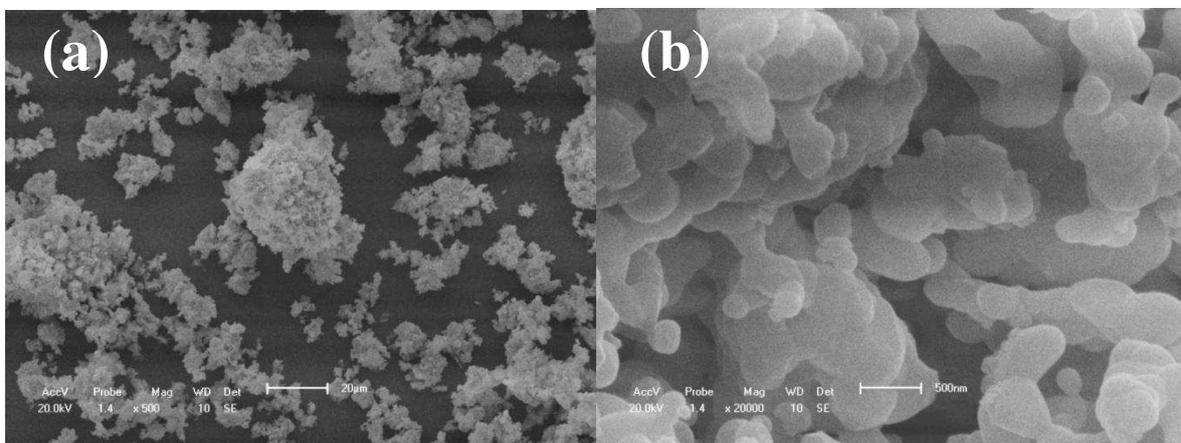
tratamento térmico em amostra de alumina submetida a moagem de alta energia que foi de 135 nm.

**Figura 20** - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da alumina: (a) escala 20  $\mu\text{m}$  e; (b) escala 500 nm.



Fonte: Própria, 2013.

**Figura 21** - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do CaPs: (a) escala 20  $\mu\text{m}$  e; (b) escala 500 nm.



Fonte: Própria, 2013.

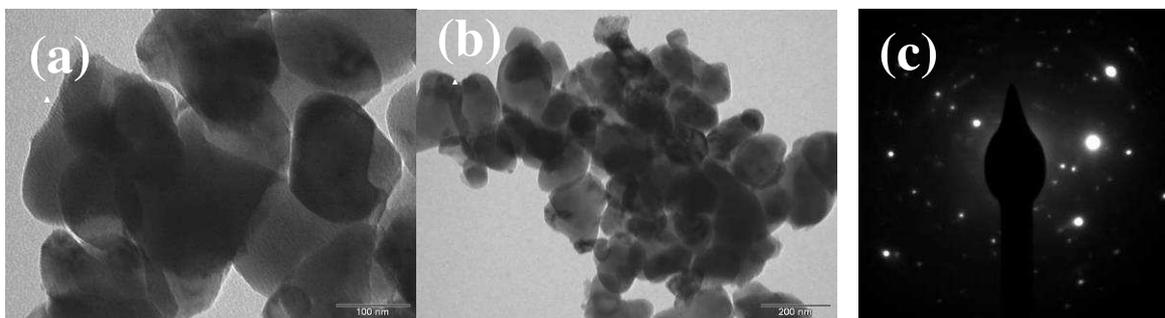
Mediante a Figura 21a, se observa a formação de aglomerados na forma de esponja irregulares, e com uma larga distribuição de tamanho e na Figura 21b, se verifica que estes aglomerados são constituídos de partículas com início de pré-sinterização e em torno de 500 nm, e com baixa porosidade interpartícula.

#### 4.1.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A Figura 22 e 23 apresenta as micrografias em campo claro obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e o padrão de difração para  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> comercial e para o CaPs sintetizado, respectivamente. Observa-se mediante a Figura 22a e 22b, uma morfologia homogênea, constituída de partículas com formato aproximadamente esférico com tamanho variando de 67 a 175 nm, e tamanho médio de 128 nm. No padrão de difração de elétrons observam-se anéis com orientação desordenada, sugerindo a presença de partículas nanométrica. A abertura selecionada permitiu revelar os principais anéis correspondentes a estrutura da alumina. Esta característica também foi reportada por Toniolo (2004), quando avaliaram a síntese de pós de alumina nanocristalina por combustão em solução.

Chinellato et al., (2009) quando investigaram a influência do tratamento térmico em amostra de alumina AKP-53 fornecida Sumitomo Co. Japan e submetida a moagem de alta energia revelaram a presença de pós muito fino com tamanho de partícula variando de 10 – 50 nm mais também partículas largas de 120 nm. Estes resultados mostraram ser semelhantes ao reportado neste trabalho de tese.

**Figura 22** - (a) e (b) MET em campo claro, (c) padrão de difração da alumina comercial.



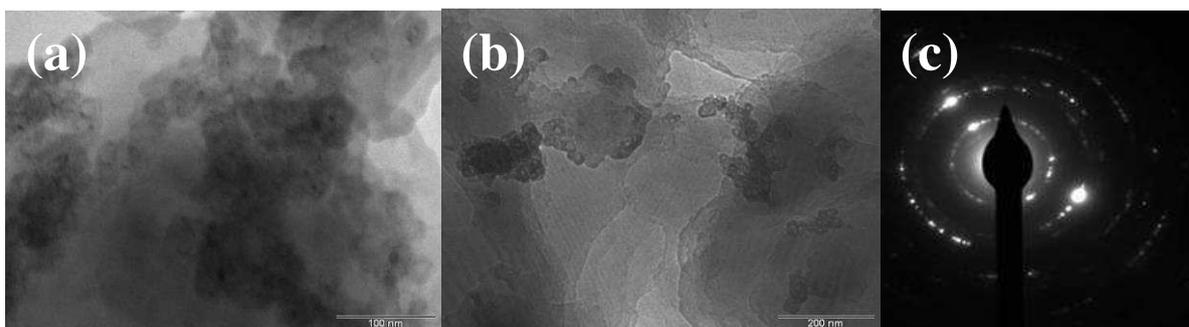
Fonte: Própria, 2013.

Nas micrografias do CaPs (Figura 23a e 23b) observa-se partículas com formato irregular, pré-sinterizadas (sem porosidade interpartícula) e aglomerada. No padrão de difração (Figura 21c) se observa anéis concêntricos, bem definidos que correspondem a família de planos  $\{hkl\}$  pertencentes à fase do CaPs, comprovando que o material é cristalino. Segundo Toniolo (2004), quanto mais contínuos os anéis do padrão de difração, é de se esperar que mais cristalino e maior o tamanho de cristalito da amostra.

As partículas dos CaPs obtido via método direto apresentaram tamanho 58,67% inferior ao tamanho de partícula reportado por Volkmer et al. (2007), quando obtiveram pós

de  $\alpha$ -fosfato tricálcio por meio do método de síntese por combustão, tendo como precursores de reação o nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) e o fosfato de amônia bibásico ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ), que foi de 60 nm. Desta forma, verifica-se que pelo método de via direta foi mais eficiente na obtenção de partículas nanométricas.

**Figura 23** - (a) e (b) MET, e (c) padrão de difração para CaPs.



Fonte: Própria, 2013.

## 4.2 ETAPA II – Conformação, Sinterização e Caracterização dos Compósitos $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$

Nesta etapa é apresentado o resultado da caracterização por medidas físicas, DRX, EDX, MEV e compressão diametral dos compósitos obtidos após sinterização a  $1350^\circ\text{C}$ .

### 4.2.1 Medidas Físicas

Os parâmetros de massa úmida, massa seca e massa imersa dos compósitos sinterizados para determinação da densidade e porosidade aparente pelo método de Arquimedes encontram-se no APÊNDICE H. Os cálculos da densidade teórica para cada compósito obtido estão contidos no APÊNDICE I.

A Tabela 9 exhibe os resultados de densidade teórica ( $D_t$ ), densidade aparente ( $D_a$ ), porosidade aparente ( $P_a$ ) e sua respectiva densidade relativa ( $D_a/D_t$ ) para os compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  sinterizados  $1350^\circ\text{C}$ . Pode-se observar que a densidade aparente, para  $\text{Al}_2\text{O}_3$  foi 95 % da densidade teórica reportada na ficha cristalográfica JCPDS 75-0783, indicando uma boa densificação (sinterização acompanhada por retração do corpo-de-prova) da amostra, com baixa presença de porosidade intergranular, em torno de 6,2 %.

Por outro lado, observa-se que à medida que se aumentou a percentagem do CaPs na matriz da  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , houve uma redução de 6,7 % na densidade aparente e conseqüentemente um

aumento de 76 % na porosidade aparente, quando comparamos alumina pura (AC) com o compósito com maior concentração de CaPs (30C ou seja, 30 % de CaPs). A menor densidade aparente de 2,36 g/cm<sup>3</sup> e maior porosidade aparente de 26,0 % foram para o compósito 30C.

**Tabela 9** - Resultados de densidade aparente ( $D_a$ ), densidade relativa ( $D_a/D_t$ ) e porosidade aparente ( $P_a$ ) para os compósitos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs sinterizados 1350 °C.

Amostras	$D_t$ (g/cm <sup>3</sup> )	$D_a$ (g/cm <sup>3</sup> )	$D_a/D_t$ (%)	$P_a$ (%)
AC	4,01	3,81	95	6,2
5C	3,96	3,66	92	9,4
10C	3,92	3,05	77	15,8
15C	3,87	2,79	72	16,2
20C	3,82	2,56	67	14,5
30C	3,74	2,36	63	26,0

$D_t$  = densidade teórica de cada compósito encontra-se detalhado no APÊNDICE I.

Fonte: Própria, 2013.

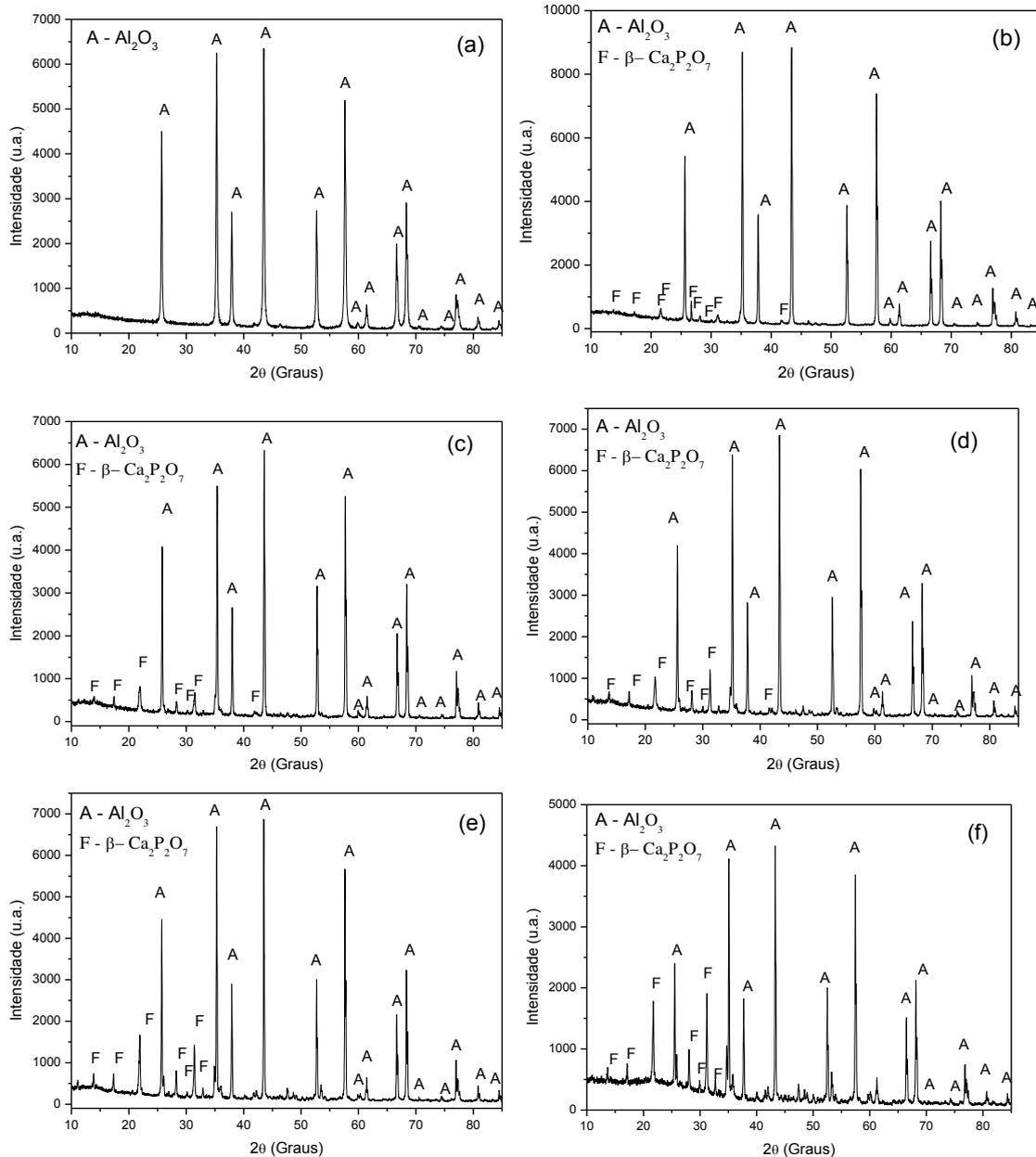
A redução na densidade aparente dos compósitos com o aumento da concentração do CaPs na Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> é justificado principalmente pela morfologia do CaPs sintetizado. Na Tabela 8, observa-se que o tamanho de partícula do CaPs foi 531 nm, o que corresponde a aproximadamente 5 vezes superior ao valor do tamanho de partícula da Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (99 nm). Estes valores também estão em concordância com os valores de tamanho de partícula calculado pelo MET, onde se observa que as partículas do CaPs estão aglomeradas e formada por partículas de tamanho superior ao da Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Esta diferença na morfologia do CaPs em relação a Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, proporciona maior dificuldade para densificação dos compósitos durante a sinterização, visto que os aglomerados do CaPs por serem grandes possuem baixa energia superficial, e podem se alojar entre grãos de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> impedindo o crescimento de grãos e eliminação da porosidade intergranular. Desta forma, a introdução do CaPs na matriz da Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> proporcionou uma redução na densidade aparente, por consequência da presença de poros não eliminados na microestrutura durante a sinterização

#### 4.2.2 Difração de Raios X

Na Figura 24 encontra-se ilustrado os difratogramas de raios X dos compósitos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs sinterizados a 1350°C. Observa-se na Figura 24a, a presença da fase cristalina romboédrica da  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> identificada pela ficha cristalográfica JCPDS 75 – 0783, sob a forma do mineral coríndon.

**Figura 24** - Difratomogramas de raios X dos compósitos sinterizados a 1350°C: (a) AC, (b) 5C, (c) 10C, (d) 15C, (e) 20C e (f) 30C.



Fonte: Própria, 2013.

Para as Figuras 24b a 24f, compósitos com adição do CaPs, observou-se a presença da fase  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e presença da fase  $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> identificado de acordo com a ficha JCPDS 09 - 0346. Importante ressaltar que o CaPs identificado pela fase  $\beta$ -Ca<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> foi a fase majoritária presente na amostra de CaPs sintetizada reportado na Figura 16b, indicando que a sinterização a 1350 °C, não alterou a estrutura do CaPs.

#### 4.2.3 Fluorescência de Raios X (EDX)

Na Tabela 10 encontram-se os resultados dos percentuais de óxidos presente teórico e determinado por fluorescência de raios X (EDX) em todas as amostras de compósitos estudadas. Os cálculos teóricos do percentual de cada óxido presente para cada compósito com as diferentes concentrações utilizadas encontram-se nos APÊNDICES A ao G. Os cálculos foram feitos considerando o grau de pureza dos reagentes utilizados na síntese do fosfato de cálcio 98 %, ou seja, 2 % correspondem às impurezas. No ANEXO I encontra-se a relação das impurezas presentes nos reagentes químicos utilizados.

Observa-se que, para a alumina comercial pura (sem presença de fosfato de cálcio) a percentagem de óxido experimental é bem próxima do valor teórico. A diferença observada foi de apenas 0,148 %, que possivelmente pode ser atribuída devido à presença de impurezas contidas no equipamento durante a análise.

**Tabela 10** - Percentuais de óxido presente teórico e determinado por fluorescência de raios X (EDX) para os compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  sinterizados a 1350 °C e para 100 % do CaPs. T – teórico; E – experimental; D – diferença entre o percentual teórico e experimental; e I – percentagem total de impurezas detectadas por EDX.

Óxidos	$\text{Al}_2\text{O}_3$			CaO			$\text{P}_2\text{O}_5$			$\text{H}_2\text{O}^*$	Impurezas
	T	E	D	T	E	D	T	E	D	T	
Proporção $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{CaPs}$											
AC	100	99,852	0,148	0	0	0	0	0	0	0	0,148
CaPs	0	0	0	55,83	38,12	17,71	42,38	56,71	14,33	1,79	5,17
5C	95	93,66	1,34	2,80	2,36	0,44	2,12	3,17	-1,05	0,090	0,81
10C	90	87,26	2,74	5,59	3,82	1,77	4,24	7,11	-2,87	0,179	1,81
15C	85	81,31	3,69	8,38	7,43	0,95	6,36	10,32	-3,96	0,269	0,94
20C	80	82,40	-2,40	11,17	5,28	5,89	8,48	10,95	-2,47	0,358	1,37
30C	70	74,15	-4,15	16,75	8,84	7,91	12,72	14,83	-2,11	0,537	2,18

I – impurezas detectadas no FRX: NiO,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Sm}_2\text{O}_3$ , ZnO,  $\text{K}_2\text{O}$ ,  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Co}_2\text{O}_3$

\* - O cálculo teórico experimental para  $\text{H}_2\text{O}$  não foi determinado.

Fonte: Própria, 2013.

Para os demais compósitos, no qual foi avaliada a introdução do fosfato de cálcio, observou-se que, a percentagem experimental de óxido de fósforo foi maior quando comparado com o óxido de cálcio. Para os cálculos teóricos da hidroxiapatita, observa-se que a percentagem de óxido de cálcio é maior em relação ao fosfato, para obter a relação Ca/P igual a 1,67. E para obter a relação Ca/P igual a 1,67 seria necessário que a percentagem de cálcio fosse maior em relação à percentagem de fósforo. Isso mostra que, íons de fósforo

reagiram mais em relação a íons de cálcio. Estes resultados estão compatível com os resultados reportados na Tabela 7 para o CaPs como sintetizado e a  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (AC).

Observou-se para o compósito 20C, com 20 % de fosfato de cálcio, que a percentagem experimental de óxido de alumina que era pra ser em torno de 80 %, apresentou um aumento 2,39 %. O mesmo ocorreu com o compósito 30C, com 30 % de fosfato de cálcio, a percentagem experimental de óxido de alumina que era pra ser em torno de 70 %, apresentou um aumento 4,15 %.

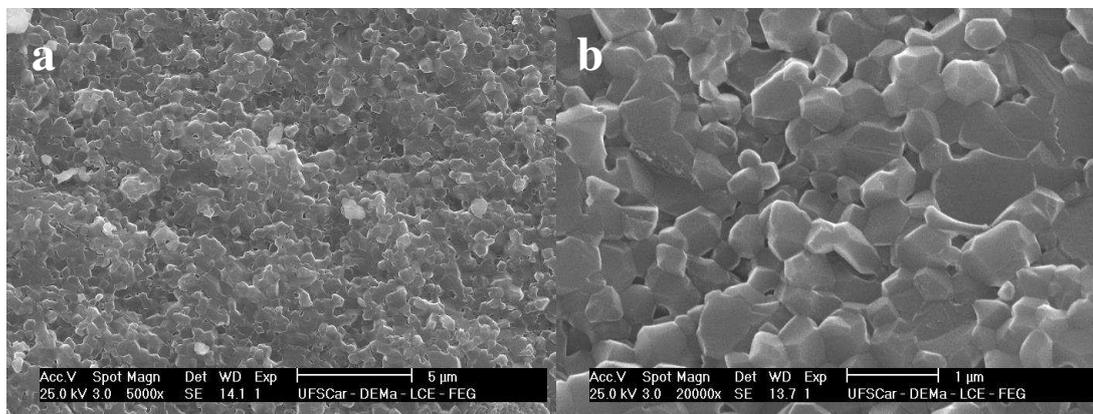
Os demais óxidos observados experimentalmente e que não constam na composição teórica do CaPs provavelmente são proveniente das impurezas contidas nos reagentes para obtenção do fosfato de cálcio. A descrição das impurezas contidas nos reagentes utilizados encontra-se no ANEXO I.

#### 4.2.4 Microscopia Eletrônica de Varredura

As Figuras 25 a 30 exibem as micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) da superfície fraturada para a amostra de alumina (AC) e para os compósitos 5C, 10C, 15c, 20C e 30C, respectivamente, sinterizados a 1350 °C.

Na Figura 25 observa-se uma microestrutura homogênea com partículas de formato aproximadamente hexagonais com tamanho variando de 0,5 a 0,19  $\mu\text{m}$  e tamanho médio de 0,34  $\mu\text{m}$ . Pela Figura 25b, observa-se presença de poros de formato esférico intergranular.

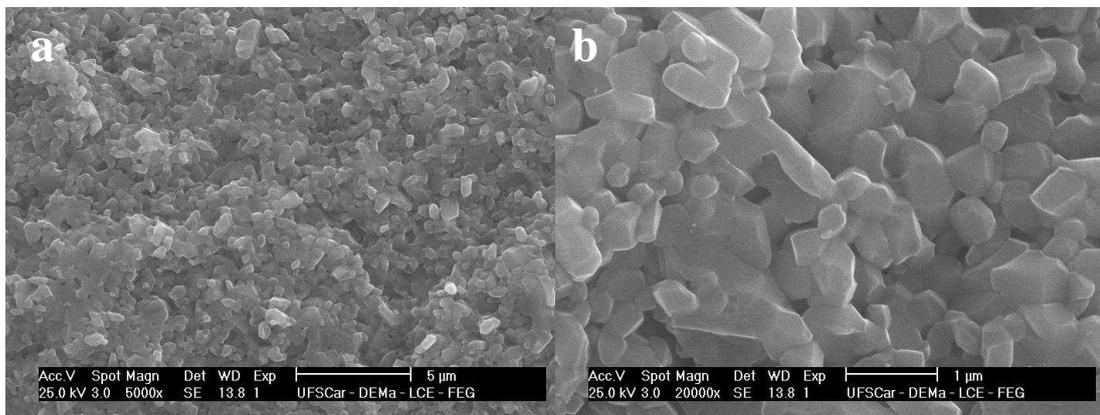
**Figura 25 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura da alumina AC; (a) escala 5  $\mu\text{m}$  e; (b) escala 1  $\mu\text{m}$ .**



Fonte: Própria, 2013.

Na Figura 26a observa-se uma microestrutura heterogênea com duas regiões distintas, uma região com grãos maiores e outra de grãos menores, com grãos de formato aproximadamente hexagonais com tamanho variando de 0,3 a 0,8  $\mu\text{m}$  e tamanho médio de 0,53  $\mu\text{m}$ . Na Figura 26b, observa-se ainda a presença de poros de formato esférico intergranular.

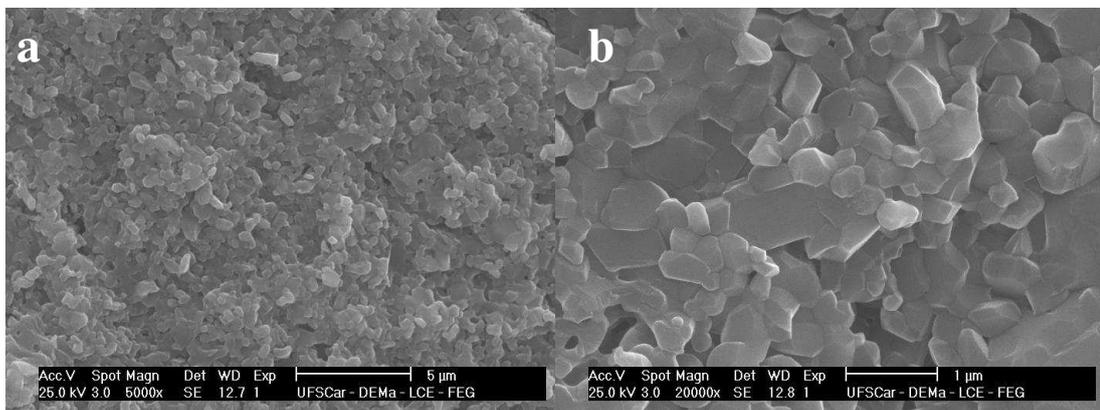
**Figura 26 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 5C; (a) escala 5  $\mu\text{m}$  e; (b) escala 1  $\mu\text{m}$ .**



Fonte: Própria, 2013.

Na Figura 27a observa-se uma microestrutura heterogênea com partículas de formato aproximadamente hexagonais com tamanho variando de 0,28 a 0,77  $\mu\text{m}$  e tamanho médio de 0,57  $\mu\text{m}$ . Na Figura 27b, observa-se ainda a presença de poros de formato esférico intergranular.

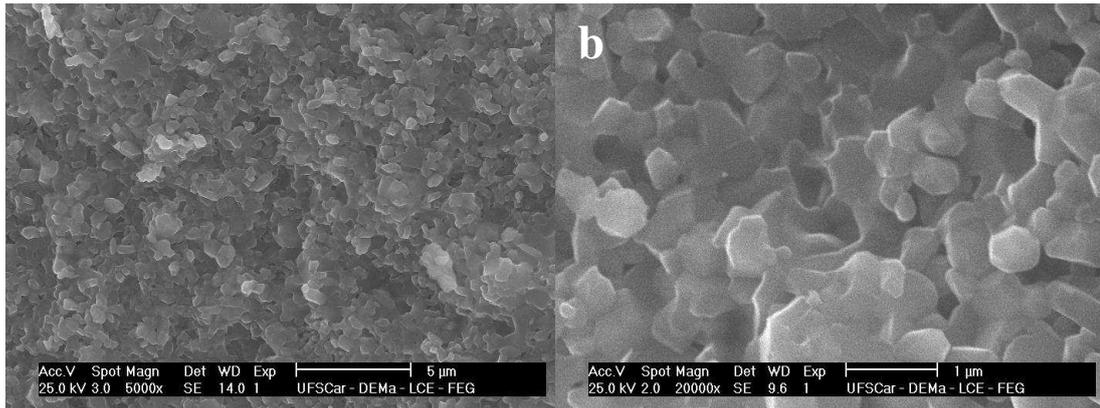
**Figura 27 - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 10C; (a) escala 5  $\mu\text{m}$  e; (b) escala 1  $\mu\text{m}$ .**



Fonte: Própria, 2013.

Na Figura 28a, observa-se uma microestrutura heterogênea com partículas de formato aproximadamente hexagonais com tamanho variando de 0,4 a 0,76  $\mu\text{m}$  e tamanho médio de 0,59  $\mu\text{m}$  e presença de poros de formato esférico intergranular. Observa-se ainda que, o aumento de CaPs na matriz  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , causou um aumento do crescimento de grãos e poros.

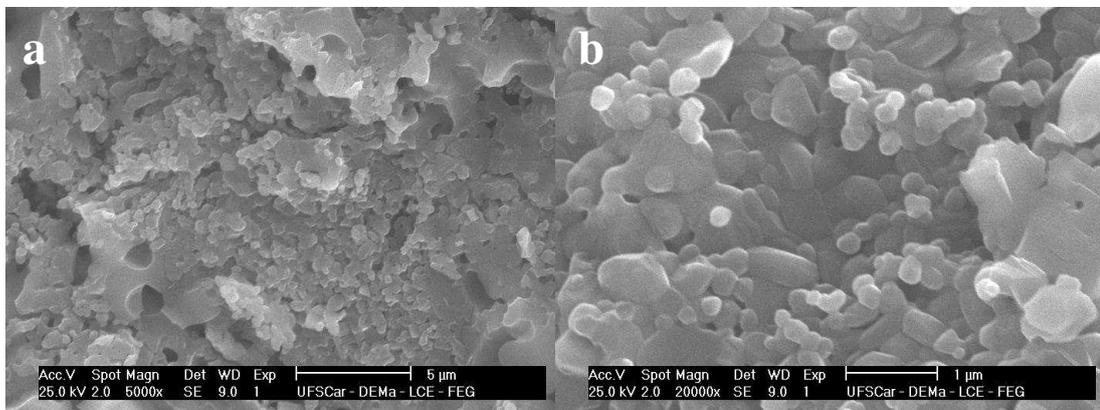
**Figura 28** - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 15C; (a) escala 5  $\mu\text{m}$  e; (b) escala 1  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Própria, 2013.

Na Figura 29a, observa-se uma microestrutura heterogênea com partículas de formato aproximadamente hexagonais com tamanho variando de 0,23 a 1,04  $\mu\text{m}$  e tamanho médio de 0,73  $\mu\text{m}$  e presença de poros de formato esférico intergranular e presença de poros também intragranular. Observa-se ainda que, o aumento de CaPs na matriz  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , causou um aumento irregular no crescimento de grãos e poros.

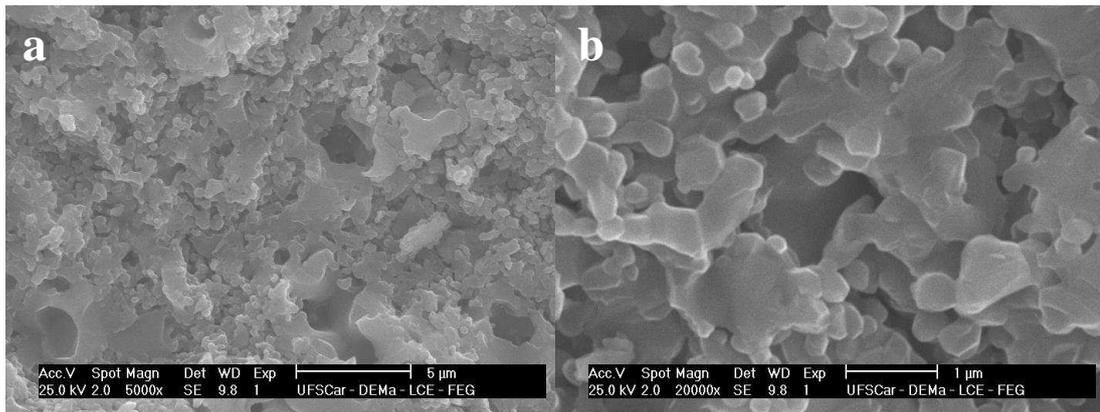
**Figura 29** - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 20C; (a) escala 5  $\mu\text{m}$  e; (b) escala 1  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Própria, 2013.

Na Figura 30a, observa-se uma microestrutura heterogênea com partículas de formato aproximadamente hexagonais com tamanho variando de 0,41 a 1,43  $\mu\text{m}$  e tamanho médio de 0,85  $\mu\text{m}$  e presença de poros de formato esférico intergranular e intragranular. Observa-se ainda que, o aumento de CaPs na matriz  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , causou um aumento irregular no crescimento de grãos e poros.

**Figura 30** - Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura do compósito 30C; (a) escala 5  $\mu\text{m}$  e; (b) escala 1  $\mu\text{m}$ .



Fonte: Própria, 2013.

Analisando conjuntamente as Figuras de 25 a 30 observa-se que a introdução do fosfato na matriz alumina causou um aumento no tamanho de grão e na porosidade, e observa-se que nos compósitos 20C (Figura 29) e 30C (Figura 30) existe a presença de porosidade intergranular e intragranular. As micrografias dos compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  confirmam o aumento da porosidade aparente reportado na Tabela 9. O crescimento irregular dos poros causou um decréscimo na resistência mecânica do compósito, ou seja, com o aumento da concentração do CaPs na matriz alumina, observou-se maior crescimento dos poros e isso possivelmente afetou a resistência mecânica do compósito.

De modo geral, a introdução do fosfato de cálcio na alumina proporcionou um aumento no tamanho de grão e da porosidade, além de se observar um aumento na heterogeneidade da microestrutura. As formações dos poros são benéficas no aspecto de aplicações biotecnológicas, visto que os poros permitem a circulação do fluido fisiológico quando é usado na superfície de um biomaterial.

Zhang e Zhang (2002) quando estudaram compósitos de fosfatos de cálcio com quitosana, observaram que a macroporosidade presente nas amostras promovia caminhos de acesso para o crescimento do tecido ósseo, que facilmente penetrava pelos poros, estabelecendo o processo de osteocondução. E que o preenchimento dos poros pelo novo

tecido ósseo pode promover um forte entrelaçamento osso-implante, conferindo um aumento da resistência mecânica do implante.

A fração de poros pequenos detectada nos compósitos pode contribuir para o efeito de rugosidade superficial que influencia de maneira positiva na dinâmica de adsorção celular e resposta celular osteogênica. Poros com dimensões próximas de 5  $\mu\text{m}$ , ainda podem facilitar a difusão iônica que ocorre inicialmente entre a superfície do implante e o plasma sanguíneo, estabelecendo a formação de cargas que definirão o tipo de interface formada (MEREDITH et al., 2007).

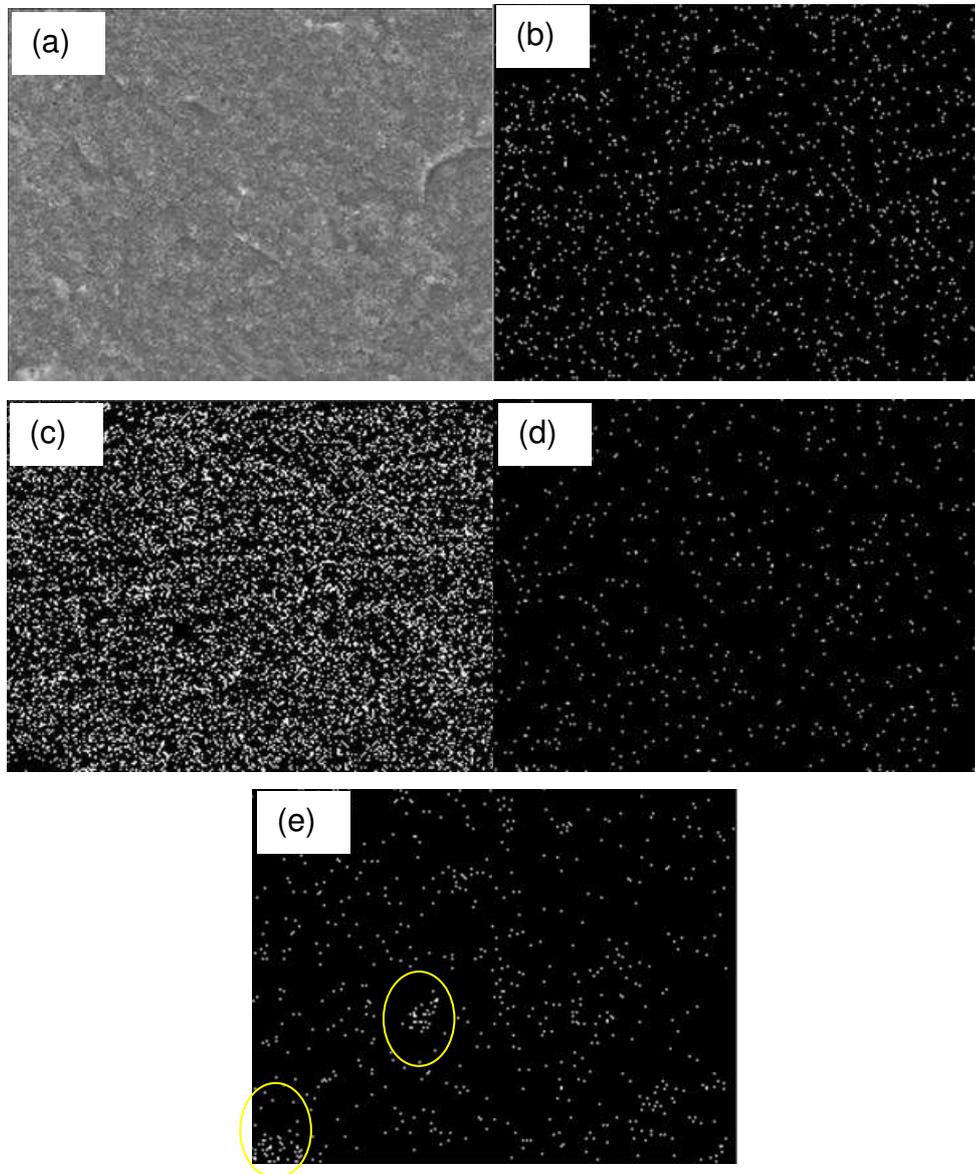
As Figuras 31 a 35 ilustram o mapeamento dos íons presentes na estrutura dos compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  nas concentrações de CaPs de 5, 10, 15, 20 e 30 % em peso sinterizado a 1350 °C. Para todos os compósitos avaliados, observou-se a presença dos íons de Al, O, P, e Ca presentes na composição dos compósitos contendo CaPs.

Para o compósito 5C, observa-se que os íons de Al, O, e P (Figura 31b, 31c e 31d) estão bem distribuídos. Porém para o íon Ca (Figura 31e), o qual foi observado em menor concentração verificam-se regiões com formação de *clusters* (aglomerados) destes íons.

Para todos os demais compósitos (10C, 15C, 20C e 30C, Figuras 32, 33, 34 e 35) verificou-se um comportamento semelhante, ou seja, a distribuição dos íons de Al, O e P bem uniformes mostrando uma boa dissolução do CaPs na  $\text{Al}_2\text{O}_3$  para formar o compósito, enquanto que para o íon de Ca observou-se a formação de *clusters* (aglomerados). Apenas o compósito 20C, com 20 % de CaPs, Figura 34, mostrou um comportamento diferenciado dos demais. Isto é, para este compósito os íons de Al mostraram uma distribuição não uniforme, o que ocasionou também uma não uniformidade da distribuição dos íons de O.

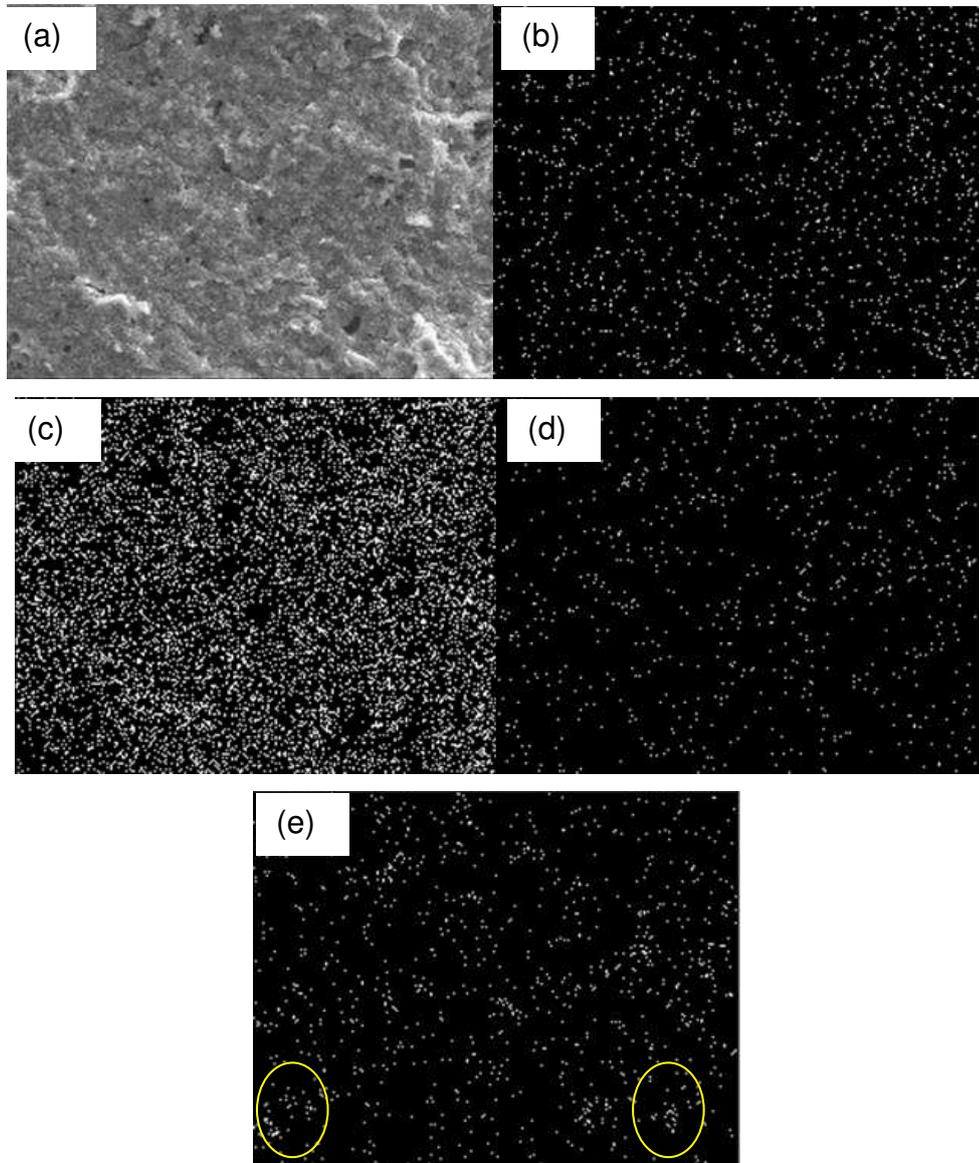
Para os íons de fósforo (P) observou-se uma boa uniformidade, enquanto que o cálcio (Ca) foi observado à formação de *clusters* (aglomerados) mostrando uma não uniformidade na distribuição. Este comportamento diferenciado dos demais compósitos pode ter sido causado durante o processo de mistura e compactação das amostras. O que pode ter levado, a diferenças na microestrutura e na densidade e porosidade final das amostras, assim, como alterar o comportamento mecânico. De forma geral, verificou-se que o aumento do CaPs levou a um aumento na formação de *clusters* de íons de cálcio.

**Figura 31** - Mapeamento dos íons presentes no compósito 5C: (a) micrografia da região da amostra onde foi realizado o mapeamento; (b) íons de oxigênio (O); (c) íons de alumínio (Al); (d) íons de fósforo (P); (e) íons de cálcio (Ca).



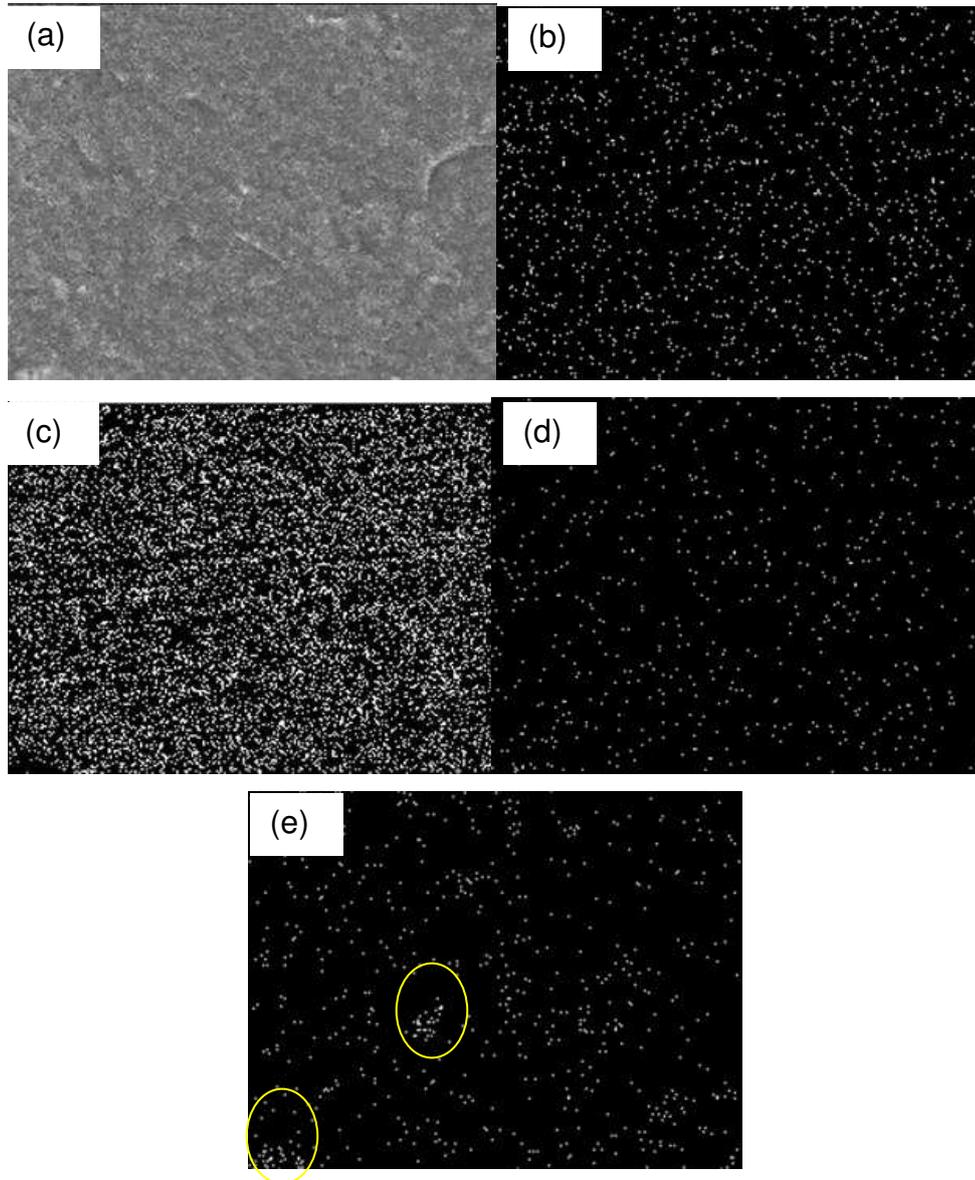
Fonte: Própria, 2013.

**Figura 32** - Mapeamento dos íons presentes no compósito10C: (a) região da amostra onde foi realizado o mapeamento; (b) íons de oxigênio (O); (c) íons de alumínio (Al); (d) íons de fósforo (P); (e) íons de cálcio (Ca).



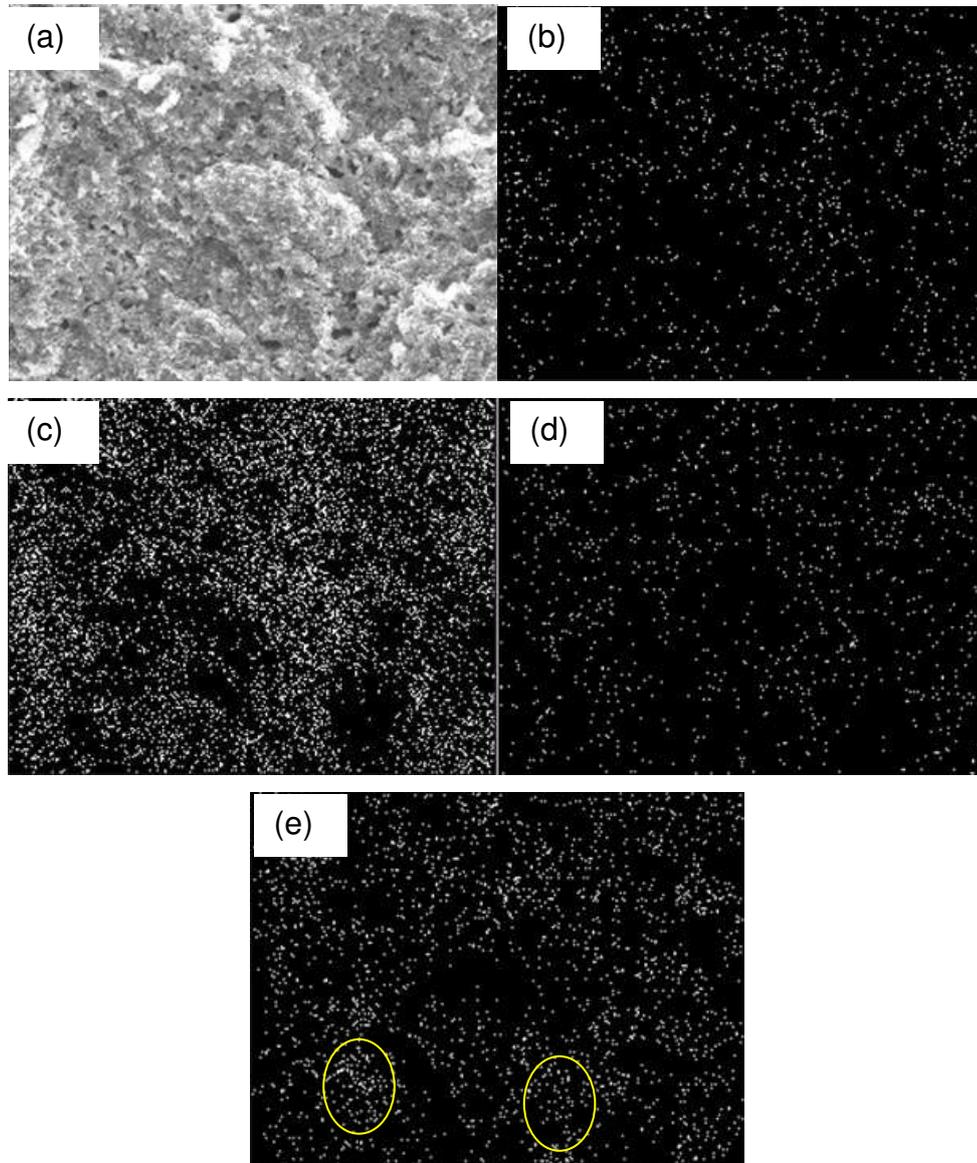
Fonte: Própria, 2013.

**Figura 33** - Mapeamento dos íons presentes no compósito15C: (a) Região da amostra onde foi realizado o mapeamento; (b) íons de oxigênio (O); (c) íons de alumínio (Al); (d) íons de fósforo (P); (e) íons de cálcio (Ca).



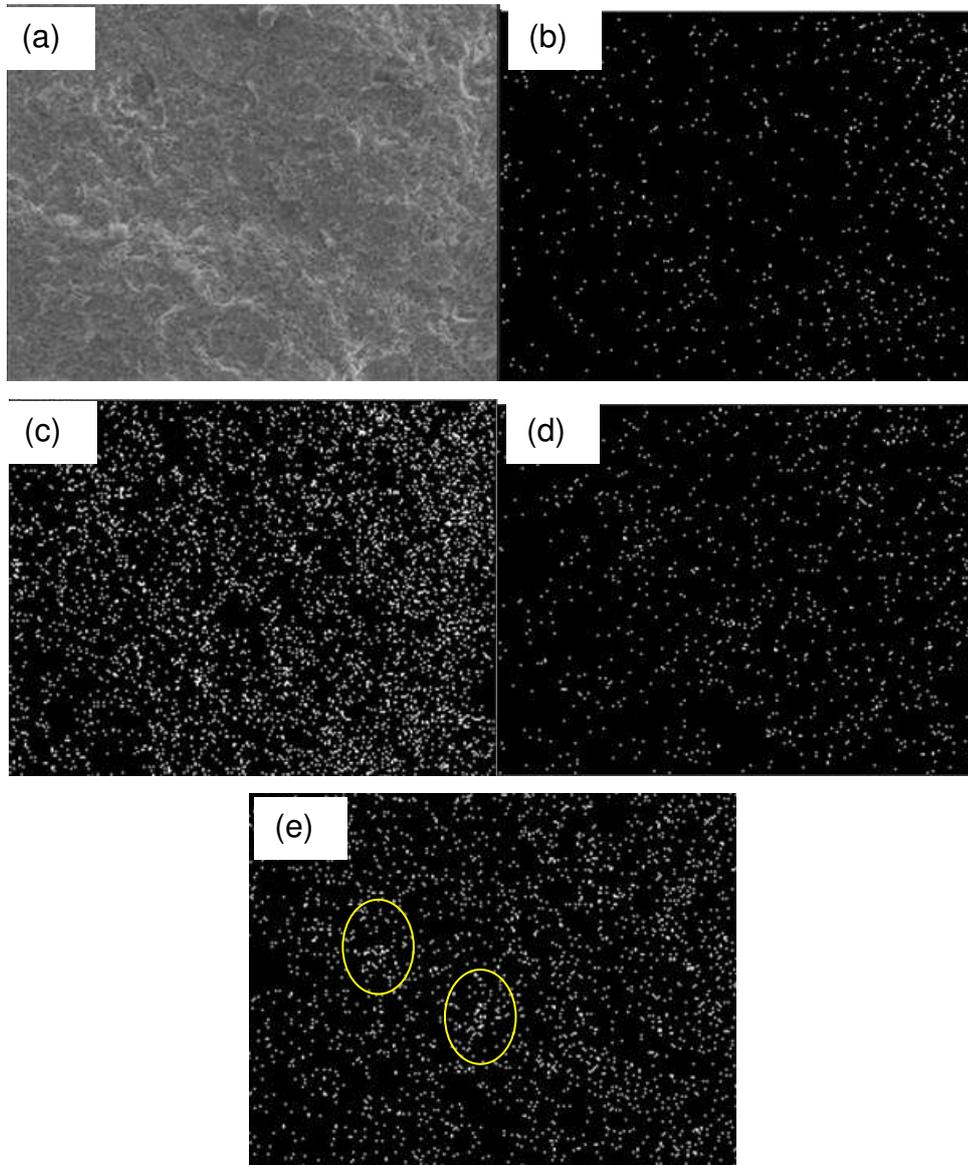
Fonte: Própria, 2013.

**Figura 34** - Mapeamento dos íons presentes no compósito20C: (a) Região da amostra onde foi realizado o mapeamento; (b) íons de oxigênio (O); (c) íons de alumínio (Al); (d) íons de fósforo (P); (e) íons de cálcio (Ca).



Fonte: Própria, 2013.

**Figura 35** - Mapeamento dos íons presentes no compósito30C: (a) Região da amostra onde foi realizado o mapeamento; (b) íons de oxigênio (O); (c) íons de alumínio (Al); (d) íons de fósforo (P); (e) íons de cálcio (Ca).



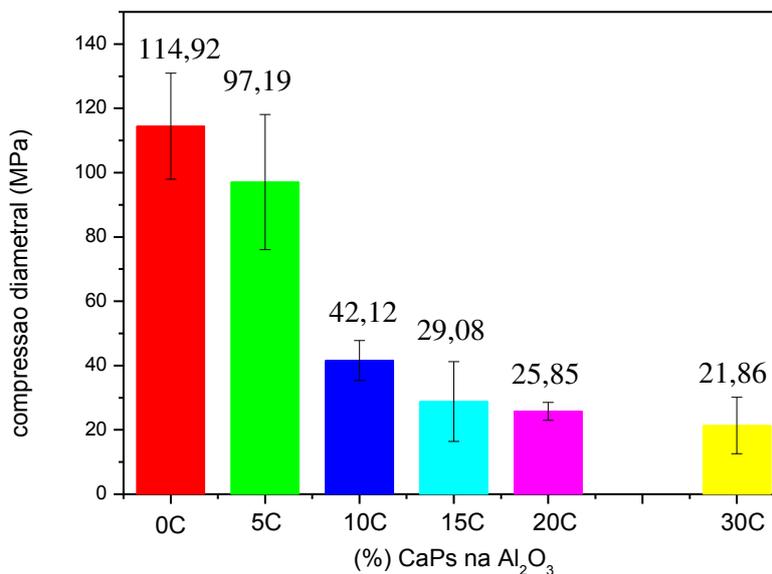
Fonte: Própria, 2013.

#### 4.2.5 Compressão Diametral

A Figura 36 ilustra os valores de resistência á compressão da alumina comercial (AC) e dos compósitos (5C, 10C, 15C, 20C e 30C)  $Al_2O_3/CaPs$  sinterizados a  $1350^\circ C$ . Observa-se que a alumina, amostra designada AC, apresentou compressão diametral de  $114,92 \pm 16,5$  MPa, e que a introdução do CaPs na matriz alumina proporcionou uma redução nos valores da compressão diametral para  $97,19 \pm 20,99$ ;  $42,12 \pm 6,24$ ;  $29,08 \pm 12,39$ ;  $25,85 \pm 2,8$  e  $21,86 \pm 8,8$  MPa, respectivamente. Comparando-se os valores de compressão diametral da amostra AC com os demais compósitos, ou seja, quando da introdução do CaPs, verificou-se uma

queda na compressão diametral 15; 63; 75; 77 e 81 %, para os compósitos 5C, 10C, 15C, 20C e 30C, respectivamente.

**Figura 36** - Valores experimentais médios da resistência mecânica à compressão referente aos compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ .



Fonte: Própria, 2013.

Esta redução acentuada, observada na compressão diametral com a introdução do CaPs, pode ser explicada pelo aumento da porosidade, assim como pelo aumento no tamanho de grão e heterogeneidade na microestrutura com o aumento do CaPs na matriz de alumina. Os resultados de medidas físicas comprovam e colaboram com os resultados morfológicos e mecânicos.

O compósito com maior concentração de CaPs, 30C, apresentou menor valor de compressão diametral de  $21,86 \pm 8,8$  MPa, essa redução era esperada devido a característica morfológica do CaPs que foi muito diferente da morfologia da alumina. Porém, mesmo com esta redução o valor de resistência mecânica à compressão obtido para o compósito 30C foi adequado para uso em aplicação para implantes em área densas onde necessita da propriedade do CaPs associado a uma boa resistência mecânica do material. Essa redução pode ter se dado em virtude da presença de poros presentes nos compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ .

Comparando o valor de resistência a compressão dos compósitos verifica-se que se encontra dentro da faixa de valores reportados para biocerâmica HAp porosa (2-100 MPa) reportado por Suchanek e Yoshimura, (1998). Estes valores também se encontram dentro da faixa de valores de resistência a compressão reportados por Stok et al., (2011), quando

estudaram substitutos ósseos registrado na Holanda para uso no trauma e cirurgia ortopédica. Os valores reportados pelos autores foram na faixa de 1 – 55 MPa dependendo do tipo de fosfato de cálcio no material comercial.

Avaliando em termos de resistência mecânica a compressão do osso humano trabecular, pode-se dizer que os valores encontrados neste trabalho para os compósitos 15C, 20C e 30C em estudo estão dentro da faixa de valores de resistência a compressão por cisalhamento reportada por Sanyal et al., 2012 que foi de 1 – 30 MPa. Os demais compósitos 5C e 10C apresentaram valor superior de resistência a compressão comparado com do osso humano.

Os valores encontrados neste estudo para os compósitos de  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{HAp}$  com menores teores de HAp (AC, 5C e 10C) estão também compatíveis com os valores de resistência a compressão encontrados para o osso cortical de crianças e adultos reportados por Öhman et al., (2011) que foram entre 50 e 180 MPa para crianças, e na faixa de 120 a 250 MPa para os adultos.

Com base nestes estudos pode-se dizer que os compósitos em estudo são todos promissores para aplicação na traumatologia bucomaxilofacial, visto terem apresentada resistência mecânica compatível com a resistência mecânica à compressão apresentado pelo osso humano.

### **4.3 ETAPA III – Procedimento *In Vitro* e *In Vivo* para Implante dos Compósitos $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$**

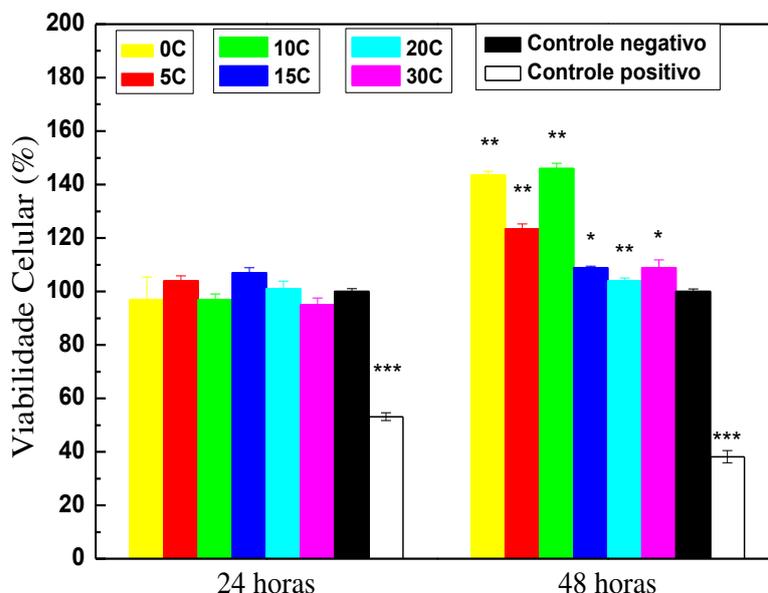
#### **4.3.1 Procedimento *In Vitro* – Citotoxicidade**

Na Figura 37 ilustra a análise MTT dos compósitos, controle negativo e controle positivo para citotoxicidade. Os dados foram normalizados de acordo com a equação 7 citada no item 3.2.2.2 da metodologia .

Mediante a Figura 37 percebe-se que os grupos contendo compósito 0C (correspondente a  $\text{Al}_2\text{O}_3$  pura sem adição de CaPs) ou com os respectivas adição de CaPs, compósitos 5C, 10C, 15C, 20C e 30C não apresentam citotoxicidade se comparados ao controle negativo (papel de filtro). No entanto, para validar o teste MTT, verifica-se claramente que o controle positivo para a citotoxicidade (luva de látex) apresentou citotoxicidade, ocorrendo morte celular. Após 24 horas de incubação o controle positivo, ocorreu um decréscimo de 47 % no número de células viáveis, valor este que aumentou para

62 % após 48 horas. Estes valores se comparados ao controle negativo, observa-se uma diferença estatística extremamente significativa ( $p < 0,001$ ).

**Figura 37** - Viabilidade celular apresentada para os compósitos. Como controle positivo para a citotoxicidade - luva de látex. Para o controle negativo para a citotoxicidade - papel de filtro. Amostras coletadas com o  $n = 5$ . \*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ .



Fonte: Própria, 2013.

A amostra correspondente a  $Al_2O_3$  pura sem adição de CaPs, assim como os compósitos com adição de CaPs, não apresentaram diferenças estatísticas significantes em relação ao controle após 24 horas de exposição, mesmo verificando que os compósitos 5C, 15C e 20C apresentaram viabilidade celular acima do controle negativo. No entanto, após 48 horas de incubação, verificaram-se diferenças estatísticas significantes para todos os grupos analisados, sendo mais significativa ( $p < 0,01$ ) para a amostra AC e os compósitos 5C, e 10C. Para os compósitos 15C, 20C e 30C a viabilidade foi superior mais próxima à viabilidade celular apresentada pelo controle negativo. Todos os compósitos, de forma geral, apresentaram valores maiores de viabilidade celular em relação ao controle negativo, podendo ser sugerido que os compósitos em estudo possam estar estimulando a proliferação celular.

A Tabela 11 mostra os valores de viabilidade celular determinados para os compósitos usando como controle positivo para a citotoxicidade a luva de látex e para o controle negativo para a citotoxicidade o papel de filtro para período de incubação de 24 e 48 horas. Pode-se verificar que para o tempo de incubação de 24 horas todos os compósitos apresentaram

viabilidade celular, visto que estatisticamente foram próximos ao valor de viabilidade celular do controle negativo. Ressaltando um aumento de 4,0; 6,0 e 4,0 % para os compósitos 5C, 15C e 20C, comparando ao controle negativo.

**Tabela 11** - Valores de viabilidade celular (VC) para os compósitos, controle positivo (CP) e controle negativo (CN) para período de incubação de 24 e 48 horas.

Compósitos	VC - período de 24 horas (%)	VC- período de 48 horas (%)	% VC em relação ao CN- período de 24 horas	% VC em relação ao CN - período de 48 horas
AC	97 ± 8,33	143 ± 1,39	- 3,0	30,0
5C	104 ± 1,81	123 ± 1,87	4,0	19,0
10C	97 ± 2,02	146 ± 2,02	-3,0	32,0
15C	107 ± 1,88	109 ± 0,55	6,0	8,0
20C	100 ± 2,88	104 ± 1,00	4,0	4,0
30C	95 ± 2,54	109 ± 2,99	-5,0	8,0
Controle negativo	100 ± 1,05	100 ± 0,97	0,0	0,0
Controle positivo	53 ± 1,51	38 ± 2,29	47,0	-62,0

Fonte: Própria, 2013.

Analisando o tempo de incubação de 48 horas, verifica-se que todos compósitos apresentaram viabilidade celular superior ao controle negativo, destacando-se a amostra AC e os compósitos 5C e 10C com percentual de aumento de viabilidade celular em relação ao controle negativo de 30; 19 e 32 %, respectivamente.

Os estudos de viabilidade celular realizada na amostra de alumina (AC) e nos compósitos foram semelhante aos resultados reportados por Afzal et al., 2012, quando avaliaram a viabilidade celular de biocompósitos de HAp-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-YSZ sinterizados por spark plasma, avaliada utilizando fibroblasto de células L929 e também semelhantes aos resultados .

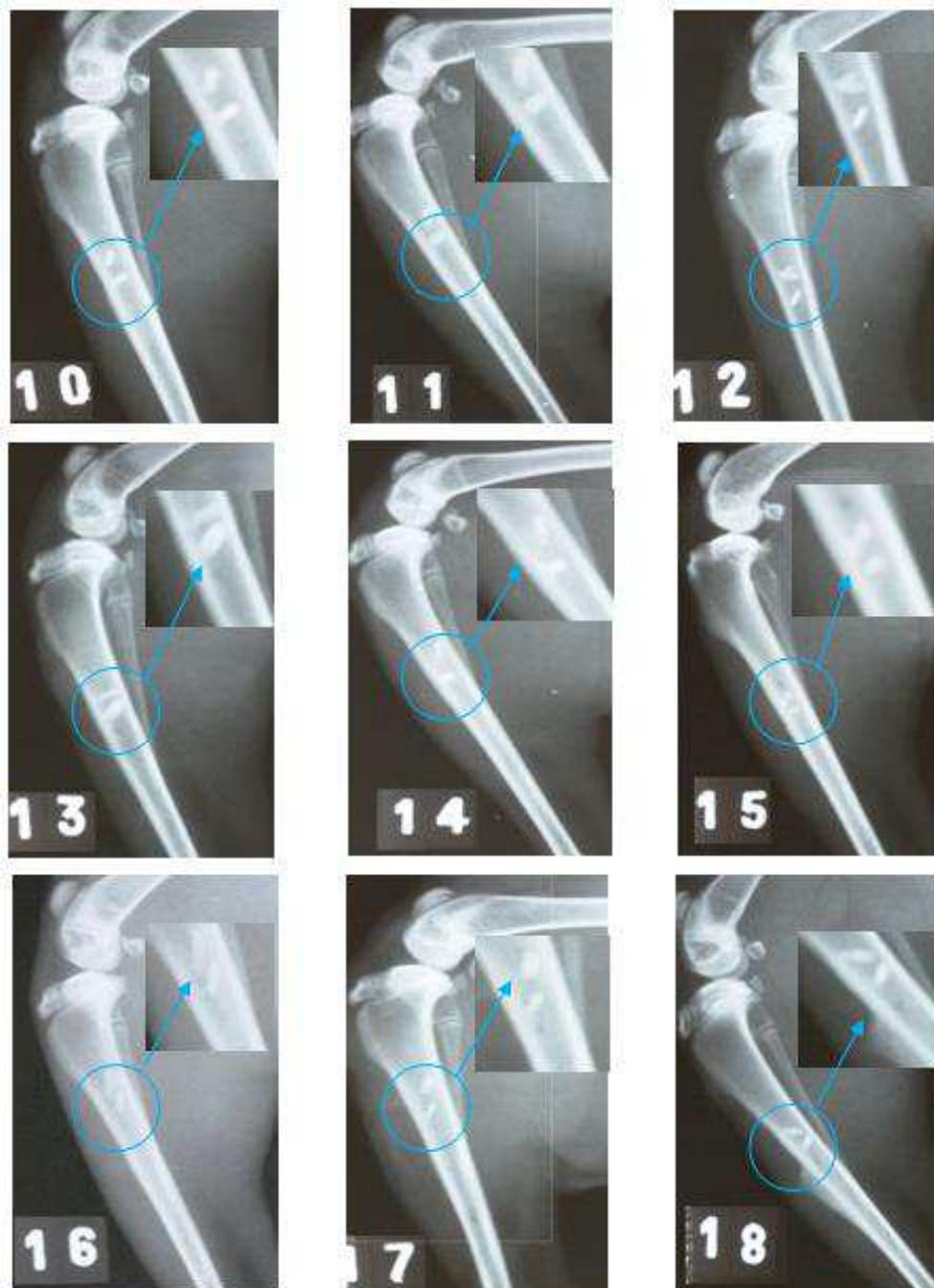
Estes resultados nos mostram também que a Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> é um material não citotóxico assim como a mistura dos fosfatos sintetizadas (CaPs), com predominância da fase pirofosfato de cálcio utilizadas para obtenção dos compósitos Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/CaPs.

Com base nos resultado de viabilidade celular mediante o ensaio de citotoxicidade *in vitro* que mostrou que todos os compósitos são não citotóxicos, escolheu-se para o estudo *in vivo* o compósito 10C que apresentou maior viabilidade celular e a maior resistência mecânica a compressão, com intuito de se observar que ambos estes parâmetros indiquem uma boa biocompatibilidade e osteointegração do compósito quando implantado em tíbias de coelhos.

#### 4.3.2 Ensaios *In Vivo*: Aspecto Radiográfico

A Figura 38 e 39 ilustram os aspectos radiográficos na metáfise proximal das tíbias de 9 coelhos para período de eutanásia 30 e 60 dias da realização do implante, respectivamente.

**Figura 38** - Aspecto radiográfico das tíbias dos coelhos após 30 dias da realização do implante.



Fonte: Própria, 2013.

Mediante as radiografias da Figura 38, observa-se para os implantes 10C que todas as imagens radiográficas das tíbias dos nove (9) coelhos apresentaram escore com grau 3, ou seja, com radiopacidade semelhante a radiopacidade apresentada pelo osso cortical remanescente. Para o implante 30C, observa-se escore com grau de radiopacidade 3 para todos os coelhos, exceto o coelho N<sup>o</sup> 17, que apresentou escore com grau 2, indicando que a reparação óssea ainda se encontra em fase de neoformação óssea.

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

Apenas para o coelho N<sup>o</sup> 15 foi observado para o orifício controle escore de grau 1 (radiopacidade discreta) indicando que houve uma discreta reação periosteal em torno do implante, sendo visualizado por uma região preta difusa. A Tabela 12 mostra o resultado dos escores apresentados pelos implantes 10C e 30C, e o orifício controle para o período de eutanásia de 30 dias (grupo I).

**Tabela 12** - Grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 30 dias de pós-operatório.

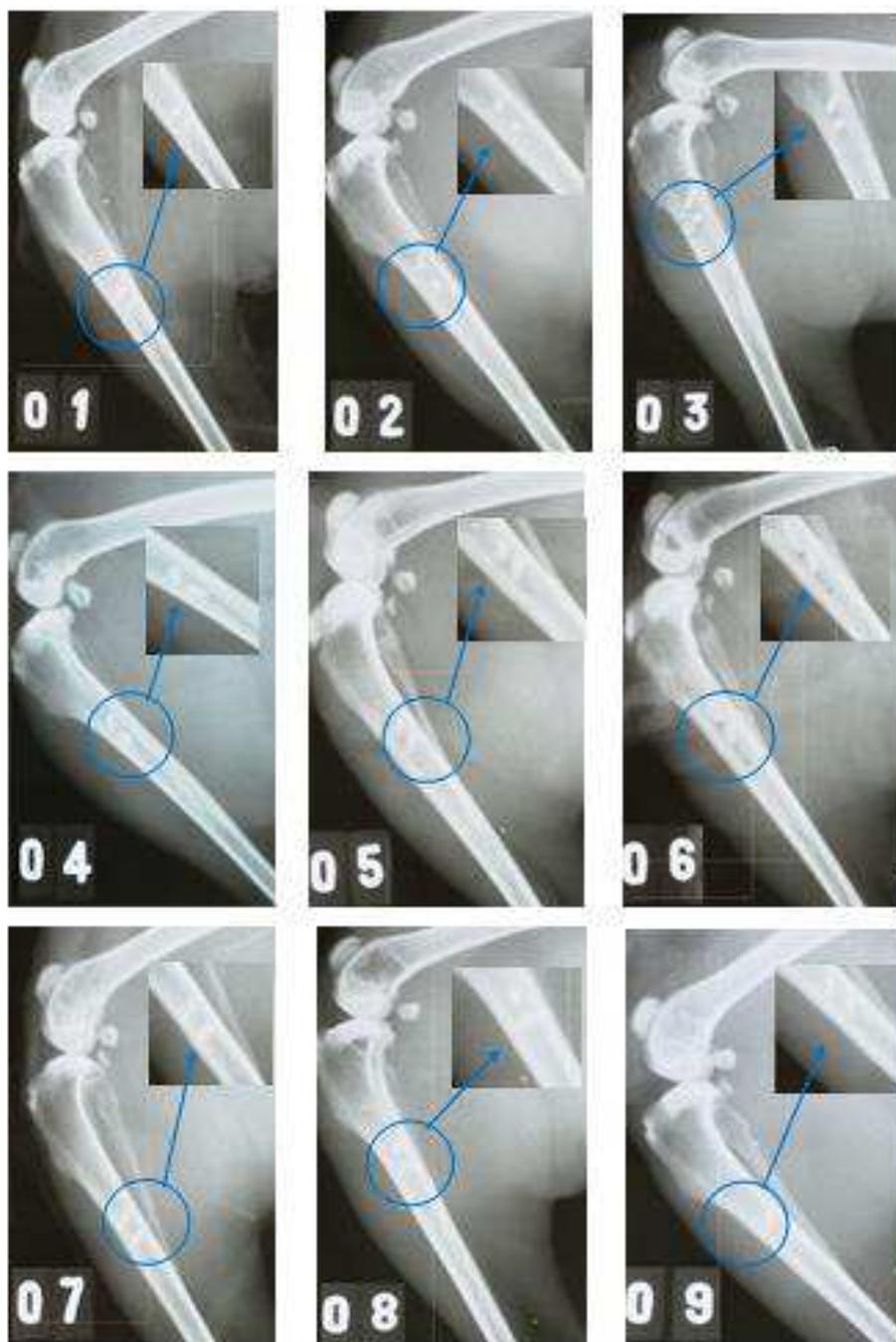
Coelhos	10C	30C	Controle
10	3	3	2
11	3	3	2
12	3	3	3
13	3	3	2
14	3	3	3
15	3	3	1
16	3	3	3
17	3	2	2
18	3	3	2

Mediante as radiografias da Figura 39, observa-se para os implantes 10C que todas as imagens radiográficas das tíbias dos 9 coelhos apresentaram escore com grau 3, ou seja, com radiopacidade semelhante a radiopacidade apresentada pelo osso cortical remanescente. Para o implante 30C, observa-se escore com grau de radiopacidade 3 para todos os coelhos, exceto o coelho N<sup>o</sup> 17, que apresentou escore com grau 2, indicando que a reparação óssea ainda se encontra em fase de neoformação óssea.

Para o orifício controle, verifica-se que só ocorreu neoformação óssea total, escore de grau 3, apenas para os coelhos N<sup>o</sup> 12, 14, 16 e 18. Nos coelhos N<sup>o</sup> 10, 11, 13 e 17 foi

observado escore de grau 2, indicando que a reparação óssea ainda se encontra em fase de neoformação óssea. Apenas para o coelho N<sup>o</sup>15 foi observado para o orifício controle escore de grau 1 (radiopacidade discreta) indicando que houve uma discreta reação periosteal em torno do implante, sendo visualizado por uma região preta difusa. A Tabela 13 mostra o resultado dos escores apresentados pelos implantes 10C e 30C, e o orifício controle para o período de eutanásia de 60 dias (grupo II).

**Figura 39** - Aspecto radiográfico das tíbias dos coelhos após 60 dias da realização do implante.



Como reportado nas Tabelas 12 e 13, e Figuras 38 e 39, observou-se na incidência médio lateral dos raios X para os implantes 10C, tanto no grupo I quanto o grupo II, radiopacidade com escore grau 3, indicando a total neoformação óssea. Para os implante 30C também foi observada a radiopacidade de grau 3 para os grupo I e II, exceto o coelho N<sup>o</sup> 17 com período de eutanásia de 30 dias que apresentou uma discreta radiopacidade com escore de grau 2.

**Tabela 13** - Grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 60 dias de pós-operatório.

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

Em relação ao orifício controle evidenciou-se uma considerável variação nos escores desde o grau 1 ao grau 3, tanto para o grupo I quanto para o grupo II, indicando presença de neoformação óssea. A análise estatística das tomadas radiográficas das tíbias dos coelhos para o período de eutanásia de 30 e 60 dias encontra-se descrita nas Tabelas 14 e 15.

**Tabela 14** - Avaliação do grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 30 dias de pós-operatório\*.

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

p implante 30C e 10C = 0,47

p implante 30C com controle = 0,006

p implante 10C com controle = 0,02

\* em nenhum grupo houve diferença dos parâmetros comparando-se 30 com 60 dias de pós-operatório

Comparando os escores de radiopacidade nos coelhos submetidos à eutanásia com 30 e 60 dias, não se evidenciou nenhuma diferença significativa entre esses, motivo pelo qual não se apresenta a comparação de acordo com o tempo de sacrifício. Tanto com 30 como com

60 dias a mediana de radiopacidade foi de 3 nos orifícios preenchidos com os implantes 10C e 30C e de 2 no orifício controle. Não observamos áreas radiolúcida no entorno das implantações, apenas parcialmente no orifício controle, o que pode ter ocorrido em função do posicionamento do membro no momento da incidência do feixe de raios X.

**Tabela 15** - Avaliação do grau de radiopacidade da lesão óssea provocada experimentalmente em tíbias de coelhos preenchida com os implantes 10C e 30C e não preenchida (controle) com 60 dias de pós-operatório\*.

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

p implante 30C e 10C = 1,00

p implante 30C com controle = 0,006

p implante 10C com controle = 0,02

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

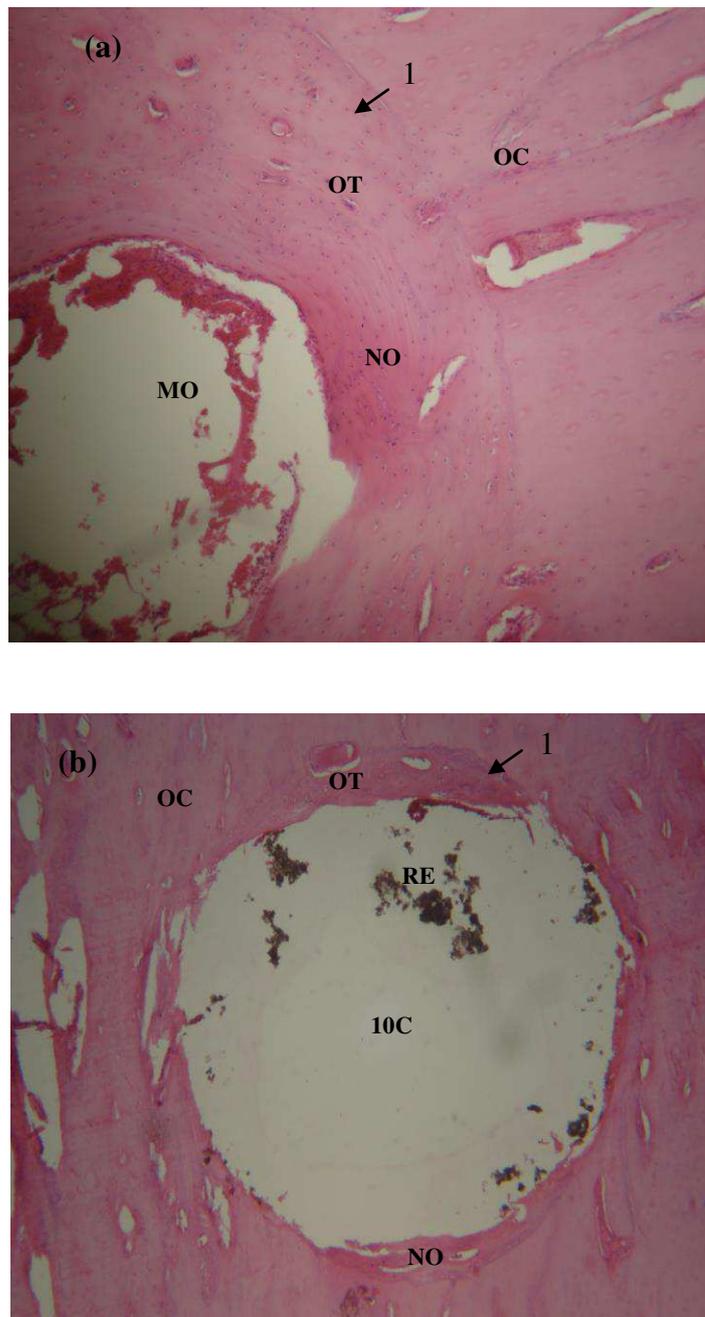
No entanto, não houve diferença no grau de radiopacidade dos orifícios preenchidos com os implantes 10C e 30C, ambos com mediana de escore de 3 ( $p = 0,47$ ), mostrando que o valor de p foi muito próximo ao valor do método de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ) (Tabela 14). Isto indica que entre os implantes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

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

#### 4.3.3 Ensaio *In Vivo*: Aspecto Histomorfológico

A Figura 40 ilustra a análise histomorfológica para o compósito 10C implantado no orifício médio metáfise da tíbia do coelho n° 9 com 60 dias (Grupo II) e grupo controle implantado no orifício inferior da metáfise das tíbias dos coelhos n° 18 e 7 com 30 e 60 dias (grupo I e II, respectivamente).

**Figura 40** - Aspecto histomorfológico dos coelhos após 30 0 dias dos implantes: (a) orifício controle, aumento de 40x e (b) compósito 10C aumento de 40x.



Mediante a Figura 40a, observa-se para o grupo controle (orifício sem compósito) presença de neoformação óssea (NO) que se prolifera da periferia (região 1) para o centro da perfuração (→), indicando que ocorreu regeneração óssea. Observa-se cavidade circular exibindo neoformação óssea (NO) e presença de medula óssea (MO), regiões brancas circulares em formato de colmeia.

Mediante a Figura 40b, observa-se cavidade circular preenchida por osso neoformado (NO) nas proliferando-se em torno das bordas do material exógeno (compósito 10C), indicando que o material com 30 dias de implante apresentou biocompatibilidade, não provocando reação inflamatória. As regiões escuras (RE) são referentes ao resíduo das lamina do micrótomo utilizado para os cortes dos implantes produzido pelo atrito no ato do corte.

Foi observada importante atividade osteoblástica, com formação de osso trabecular (OT) nas bordas da lesão, e área de neoformação óssea (NO) mais evidente no orifício preenchido com o grupo-controle em relação ao compósito. Também foi evidenciado que as tíbias dos coelhos com o implante 10C mostraram a presença de material exógeno (compósito), bem delimitado, com neoformação óssea e proliferação óssea em torno dos implantes.

Nos local onde foi implantado o compósito, no tempo de sacrifício de 30 dias, não foi observado nenhum sinal de infecção, uma vez que não se observaram nenhum infiltrado celular, nem de rejeição ao implante, concluindo que o compósito estudado foi biocompatível.

Este comportamento indicando a biocompatibilidade do compósito em estudo está em concordância com os resultados reportados por Azevedo (2011), quando estudou o uso de diferentes fosfatos de cálcio na correção de defeitos ósseos na metáfise femoral de coelhos, e avaliou que o uso da hidroxiapatita, associada ou não ao trifosfato de cálcio, estimulou a formação de osso (neoformação óssea). O autor reportou que o fato de com 30 dias já se encontrar neoformação óssea importante possivelmente decorre de o experimento ter sido realizado com coelhos, visto que a atividade histofisiológica dos coelhos ocorre de forma mais acelerada em comparação aos cães.

Outros autores reportaram também resultados semelhantes ao estudo de biocompatibilidade do compósito  $Al_2O_3/CaPs$ , como pode ser observado nos estudos a seguir:

- Vital (2005) reportou que na presença de hidroxiapatita a neoformação óssea e a neovascularização são muito mais evidentes, sugerindo atividade osteocondutora do compósito estudado.

- Carlo et al. (2009) mostraram que compósitos contendo 10% de hidroxiapatita (HAP-91®) e 90% de polihidroxibutirato após implantação em defeitos ósseos em coelhos apresentaram biocompatibilidade, osseointegração e a reabsorção óssea.
- Cheng et al., (2010) reportaram que ocorreu a osteoindução quando estudaram compósitos de hidroxiapatita porosa / $\beta$ -fosfato tricálcico implantadas em ratos.
- Filgueira (2012), quando avaliou a hidroxiapatita associada à quitosana na reparação óssea em tíbias de coelhos relatou o mesmo comportamento da biocompatibilidade.

## 5 CONCLUSÕES

- O método de precipitação possibilitou a obtenção de fosfatos de cálcio com sucesso, apresentando área superficial ( $3,62 \text{ m}^2/\text{g}$ ), tamanho de partícula médio de  $24,8 \text{ nm}$  e tamanho de aglomerado em torno de  $500 \text{ nm}$ , sendo a fase majoritária o pirofosfato de cálcio, e hidroxiapatita e fosfato tetracálcio presentes como fases secundárias.
- Os resultados das caracterizações para  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  estão coerentes com os resultados fornecidos pelo fabricante,  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  coríndon, com área superficial  $15,25 \text{ m}^2/\text{g}$ , tamanho de partícula médio  $128 \text{ nm}$  (aproximadamente  $0,13 \text{ }\mu\text{m}$ ) e tamanho de aglomerado de  $20 \text{ }\mu\text{m}$ .
- Todos os compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$  apresentaram fase majoritária da alumina e segunda fase pirofosfato de cálcio.
- O aumento da concentração de CaPs nos na alumina favoreceu a uma redução na densidade e aumento na porosidade, assim como, um aumento no tamanho de grão e heterogeneidade na microestrutura, o que contribuiu diretamente para uma redução nos valores de compressão diametral.
- O compósito com maior concentração de CaPs ( $30 \%$ ) mesmo apresentando o menor valor de resistência a compressão diametral de  $21,86 \text{ MPa}$  em relação aos outros compósitos, indica ainda valor promissor para utilização em implantes na região bucomaxilofacial, que são áreas densas e que necessita de valores relativamente bons de resistência mecânica para evitar a fratura do implante por impacto.
- O estudo *in vitro* (citotoxicidade) indicou crescimento celular para todos os implantes avaliados, sendo o compósito com  $10 \%$  de CaPs o de maior viabilidade celular ( $32 \%$  em comparação ao controle negativo).
- O estudo *in vivo* indicou que o implante na concentração de  $10 \%$  de CaPs foi biocompatível.
- Os compósitos estudados mostram-se viáveis para utilização na traumatologia bucomaxilofacial como substituto de perda óssea.

### **SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS**

- Estudo in vivo dos compósitos em forma particulado.
- Estudo histomorfométrico na forma particulada
- Avaliar as amostras particuladas como carreador de fármacos
- Estudar o processamento dos compósitos como prototipagem para utilização in vivo.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAMS, J. J.; HAYT, M. W.; ROCK, R. Sinus lift procedure the maxilla in patients with inadequate bone for dental implants: radiographic appearance. **American Journal of Roentgenology**, v. 174, p.1289-1292, 2000.
- AFFATATO, S.; TADDEI, P.; CARMIGNATO, S.; MODENA, E.; TONI, A. Severe damage of alumina-on-alumina hip implants: Wear assessments at a microscopic level. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 32, p. 3647–3657, 2012.
- AFZAL, M. A. F.; KESARWANI, P.; REDDY, K. M.; KALMODIA, S.; BASU, B.; BALANI, K. Functionally graded hydroxyapatite-alumina-zirconia biocomposite: Synergy of toughness and biocompatibility. **Materials Science and Engineering: C**, v. 32 (5), p. 1164–1173, 2012.
- ANMIN, H.; MING, L.; DALI, M., Preparation and characterization of a titanium-substituted hydroxyapatite photocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 267, p. 79, 2007.
- AMINZARE, M.; ESKANDARI, A.; BAROONIAN, M. H.; BERENOV, A.; RAZAVI HESABI, Z.; TAHERI, M.; SADRNEZHAAD, S. K. Hydroxyapatite nanocomposites: Synthesis, sintering and mechanical properties. **Ceramics International**, v. 39, p. 2197–2206, 2013.
- ANDERSSON, J.; AREVA, S.; SPLIETHOFF, B.; LINDÉN M. Sol-gel synthesis of a multifunctional, hierarchically porous silica/apatite composite. **Biomaterials**, v. 26, p. 6827, 2005.
- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. **Biomaterials**, v. 21, p. 667–81, 2000.
- APARECIDA, A. H.; FOOK, M. V. L.; SANTOS, M. L.; GUASTALDI, A. C. Estudo da influência dos íons  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $SO_4^{2-}$  e  $CO_3^{2-}$  na cristalização biomimética de fosfato de cálcio amorfo (ACP) e conversão a fosfato octacálcico (OCP). **Eclética Química**, v. 30 (4), p. 892-896, 2007.
- ARACIL, L.; RODRIGO, D.; ALONSO, A.; BLANCO, J.; SANZ, J. Utilização de osso congelado proveniente de bancos para enxertos prévios à colocação de implantes ósseo - integrados - estudo prospectivo de 3 anos (resultados clínicos e histológicos). In: **Congresso Ibérico I.T.I.** Lisboa, 2003.
- ASTM 384-02 - Diametral Tensile Strength, p.1-18, 2002.
- ABNT NBR 6220:2011 - Materiais refratários densos conformados — Determinação do volume aparente, densidade de massa aparente, porosidade aparente, absorção e densidade aparente da parte sólida, p. 1 - 4, 2011.

ALVES, I. F. Teste Mann-Whitney - Contrapartida não-paramétrica para Teste-t para amostras independentes. FCUL/DEIO - Estatística Aplicada: Métodos Não-Paramétricos. [http://moodle.fc.ul.pt/pluginfile.php/60267/mod\\_resource/content/1/MNP\\_110\\_132.pdf](http://moodle.fc.ul.pt/pluginfile.php/60267/mod_resource/content/1/MNP_110_132.pdf). Acesso 18 de julho de 2013.

AUROUX, A.; GERVASINI, A. Infrared spectroscopy study of the acidic character of modified alumina surfaces. **Adsorptions Science & Technology**, v. 21, p. 721-737, 2003.

AZÁROFF, L. V, Elements of X-ray crystallography, McGraw-Hill Book Company, 1968.

AZEVEDO, V. V. C. AZEVEDO; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; COSTA, A. C. F. M. – Materiais cerâmicos utilizados para implantes. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2 (3), p. 35-42, 2007.

AZEVEDO A. S. Utilização de fosfatos de cálcio, quitosana e medula óssea no reparo ósseo em coelhos. Estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico. 60f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, 2011.

BAGWELL, R. B.; MESSING, G. L.; HOWELL, P. R. The formation of alpha-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> from theta- Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: The relevance of a critical size and: diffusional nucleation or synchro-shear. **Journal of Materials Science**, v. 36, p. 1833-1841, 2001.

BALDASSARRI, M.; ZHANG, Y.; THOMPSON, V. P. ; REKOWC, E. D., STAPPERT, C. F.J. Reliability and failure modes of implant-supported zirconium-oxide fixed dental prostheses related to veneering techniques. **Journal of Dentistry**, v. 39, p. 489-498, 2011.

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

BARROS, C. M. B.; OLIVEIRA, S. V.; MARQUES, J. B.; COSTA, A. C. F. M.; VIANA, K. M. S. Analysis of the hydroxyapatite incorporate MTA dental application. **Materials Science Forum**, v. 727-728, p. 1381-1386, 2012.

BARROS, C. M. B. Estudo *in vivo* da hidroxiapatita no cimento endodôntico e seu efeito osteocondutor em ratos Wistar (*rattus norvegicus*). 172f. Tese (doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, 2012.

BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials. An overview of the basic science. **Clinical Orthopedics**, v. 371, p. 10-27, 2000.

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

BEHNIA, H.; KHOJASTEH, A.; KIANI, M. T.; KHOSHZABAN, A.; ABBAS, F. M.; BASHTAR, M.; DASHTI, S. G. Bone regeneration with a combination of nanocrystalline hydroxyapatite silica gel, platelet-rich growth factor, and mesenchymal stem cells: a

histologic study in rabbit calvaria. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 115 (2), p.e7-15, 2013.

BEST, S. M.; PORTER, A. E.; THIAN, E. S.; HUANG, J. Bioceramics: past, present and for the future. **Journal European Ceramic Society**, v. 28, p. 1319 – 1327, 2008.

BEZZI, G.; CELOTTI, G.; LANDI, E.; LA TORRETTA, T. M. G.; SOPYAN, I.; TAMPIERI, A. A novel sol-gel technique for hydroxyapatite preparation. **Materials Chemistry and Physics**, v. 78, p. 816–824, 2003.

BICALHO S. M. C. M.; BORGES, A. P. B.; REZENDE, C. F. HAP-91<sup>®</sup> e COL.HAP-9<sup>®</sup> Casuísticas e estudos científicos. Editora JHS Laboratório Químico Ltda, 4<sup>o</sup> Edição, Sabará – MG, 2011.

BOHNER, M.; GALEA, L.; DOEBELIN, N. Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 32, p. 2663–2671, 2012.

BYELI, A. V.; KUKAREKO, V. A., KONONOV, A. G. Titanium and zirconium based alloys modified by intensive plastic deformation and nitrogen ion implantation for biocompatible implants. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 6, p. 89-64, 2012.

BUDDY, D.; RATNER, A. S. H.; FREDERICK, J. S. AND JACK, E. L. Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor, 2013.

CANULLO, L.; DELLAVIA, C.; HEINEMANN, F. Maxillary sinus floor augmentation using a nano-crystalline hydroxyapatite silica gel: Case series and 3-month preliminary histological results. **Annals of Anatomy**, v. 194, p. 174 – 178, 2012.

CARLO, E. C.; BORGES, A. P. B.; POMPERMAYER, L. G.; MARTINEZ, M. M. M.; ELEOTÉRIO, R. B.; NEHME, R. C.; MORATO, G. O. Compósito para fabricação de implantes reabsorvíveis para osteossíntese: avaliação da biocompatibilidade em coelhos. **Ciência Rural**, v. 39 (1), p.135-140, 2009.

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

CHEN, Q.; LIANG, S.; THOUAS, G. A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering. **Progress in Polymer Science**, v. 38, p. 584– 671, 2013.

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

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

COMBES, C.; REY, C. Amorphous calcium phosphates: Synthesis, properties and uses in biomaterials. **Acta Biomaterialia**, v. 6, p. 3362–3378, 2010.

COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUZA, C. V.; H. L. LIRA. Hidroxiapatita: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4.3, p. 29-38. ISSN 1809-8797, 2009.

COSTA, C. A. S., SOUZA, P. P. C. Teste de Citotoxicidade em cultura de células. In: ESTRELA, C. **Metodologia Científica**, 2.ed. Artes Médicas, p. 213-230, 2005.

CROISIER, F.; JÉRÔME, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. **European Polymer Journal**, v. 49 (4), p. 780-792, 2013.

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

CUNHA, S. M.; LAZAR, D. R. R.; USSUI, V.; FANCIO, E.; DE LIMA, N. B.; BRESSIANI, A. H. A. Influência da Relação Ca/P na Formação de Fosfatos de Cálcio Sintetizados por Precipitação Homogênea **17º CBECIMat - Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, Foz do Iguaçu, 2006.

DONG, Z.; LI, B.; ZHAO, J.; MA, Q.; BAI, S.; YANG, W.; LI, G.; MA, G.; LIU, Y. Prefabrication of vascularized bone grafts using a combination of bone marrow mesenchymal stem cells and vascular bundles with  $\beta$ -tricalcium phosphate ceramics. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 114 (5), p. S153-S159, 2012.

DOROZHKIN, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. **Biomaterials**, v. 3, p. 1465 – 1486, 2010.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphate cements for biomedical application. **Journal Material Science**, v.43, p. 3028 – 3057, 2008.

DOROZHKIN, S. V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine. **Materials**, v. 2, p. 399–498, 2009.

EDRISSI, M.; NOROUZBEIGI, R. Synthesis and characterization of alumina nanopowders by combustion of nitrate-amino acid gels. **Materials Science-Poland**, v. 25, p. 1029-1040, 2007.

ENDERLE, R., GÖTZ-NEUNHOEFFER, F., GÖBBELS, M., MÜLLER, F. A. and GREIL, P. Influence of magnesium doping on the phase transformation temperature of  $\beta$ -TCP ceramics examined by Rietveld refinement. **Biomaterials**, v. 26, p. 3379-3384, 2005.

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

FERREIRA, J. R. M.; DALAPICULA, S. S.; CONZ, M. B.; VIDIGAL JUNIOR, G. M. Xenogenic bone grafts used in oral. **Implantology Implant News**, v. 4 (3), p. 303-306, 2007.

FILGUEIRA, F. G. F. Hidroxiapatita Associada à quitosana na reparação óssea – Revisão de literatura e estudo experimental em coelhos. 69f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Campina Grande, Patos, PB, 2012.

FILE: CORUNDUM. <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Corundum.GIF>, acesso maio de 2013.

FOOK, M. V. L. Desenvolvimento da técnica de deposição de hidroxiapatita na superfície de polietileno de ultra alto peso molecular para aplicação como biomaterial. Tese (doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista. Instituto de Química. Araraquara, 2005.

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

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

GERGELY, G.; SAHIN, F. C.; GÖLLER, G.; YÜCEL, O.; BALÁZSI, C. Microstructural and mechanical investigation of hydroxyapatite-zirconia nanocompósitos prepared by spark plasma sintering. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 33, p. 2313–2319, 2013.

GHOSH, S. K.; ROY, S. K.; KUNDU, B.; DATTA, S.; BASU, D. Synthesis of nano-sized hydroxyapatite powders through solution combustion route under different reaction conditions. **Materials Science and Engineering B**, v. 176, p. 14–21, 2011.

GOLLER, G.; OKTAR, F. N.; OZYEGIN, L. S.; KAYALI, E. S.; DEMIRKESEN, E. Plasma-sprayed human bone-derived hydroxyapatite coatings: effective and reliable. **Materials Letters**, v. 58, p. 2599– 2604, 2004.

GOMIDE V. S., ZAVAGLIA, C. A. C. Desenvolvimento e caracterização mecânica e estrutural do compósito hidroxiapatita- alumina para fins biomédicos. **17º CBECIMat- Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais**, Foz do Iguaçu, PR, Brasil, p. 37-48, 2006.

GREGG, S. J.; SING, K. S. W. Adsorption, Surface and Porosity, 2ª Edition, Academic Press, London, 1982.

GROVER, L. M.; GBURECK, U.; YOUNG, A. M.; WRIGHT, A. J.; BARRALET, J. E. Temperature dependent setting kinetics and mechanical properties of beta-TCP pyrophosphoric acid bone cement. **Journal of Materials Chemistry**, v. 15, p. 4955 – 4962, 2005.

GROVER, L. M.; WRIGHT, A. J.; GBURECK, U.; BOLARINWA, .; SONG, J.; LIU, Y.; FARRAR, D. F.; HOWLING, G.; ROSE, J.; DARRALET, J. E. The effect of amorphous pyrophosphate on calcium phosphate cement resorption and bone generation. **Biomaterials**, v. 34, p. 6631 – 6637, 2013.

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

HALOUANI, R.; BERNACHE-ASSOLANT, D.; CHAMPION, E.; ABABOU, A. Microstructure and related mechanical properties of hot pressed hydroxyapatite ceramics. **Journal Materials Science Materials Medicine**, v. 5, p. 563 – 8, 1995.

HASSANZADEH-TABRIZI, S. A.; TAHERI-NASSAJ, E. Economical synthesis of  $Al_2O_3$  nanopowder using a precipitation method. **Materials Letters**, v. 63, p.2274–2276, 2009.

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

HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal American Ceramic Society**, v. 81, p. 1705–28, 1998.

HU, C.; GUO, J.; QU, J.; HU, X. Efficient destruction of bacteria with Ti (IV) and antibacterial ions in co-substituted hydroxyapatite films. **Applied Catalysis B**, v. 73, p. 345, 2007.

KALITA, S. J.; VERMA, S. Nanocrystalline hydroxyapatite bioceramic using microwave radiation: Synthesis and characterization. **Materials Science and Engineering C**, v. 30, p. 295–303, 2010.

KARLSSON, M., PÅLSGÅRD, E., WILSHAW, P. R., DI SILVIO, L. Initial in vitro interaction of osteoblasts with nano-porous alumina. **Biomaterials**, v. 24 (18), p. 3039-3046, 2003.

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

KIKAWA, T.; KASHIMOTO, O.; IMAIZUMI, H.; KOKUBUN, S.; SUZUKI, O. Intramembranous bone tissue response to biodegradable octacalcium phosphate implant. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 1756–1766, 2009.

KIM, H. M.; KISHIMOTO, K.; MIYAJI, T.; KOKUBO, T.; YAO, T.; SUETSUNGU, Y.; TANAKA, J.; NAKAMURA, T. Composition and structure of the apatite formed on PET substrates in SBF modified with various ionic activity products. **Journal Biomedical Materials Research**, v. 46, p. 228-235, 1999.

KIM, B. J.; KWON, T. K.; BAEK, H. S.; HWANG, D. S.; KIM, C. H.; CHUNG, I. K.; JEONG, J. S.; SHIN, S. H. A comparative study of the effectiveness of sinus bone grafting with recombinant human bone morphogenetic protein 2-coated tricalcium phosphate and platelet-rich fibrin-mixed tricalcium phosphate in rabbits. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 113, p. 583-592, 2012.

KIM, J. J.; GREGORY, R. D.; EVANS, M. D. Applications of Biomaterials in Plastic Surgery. **Clinic Plastic Surgery**, v. 39, p. 359–376, 2012.

KOLK, A.; HANDSCHEL, J.; DRESCHER, W.; ROTHAMEL, D.; KLOSS, F.; BLESSMANN, M.; HEILAND, M.; Wolff, K.-D.; Smeets, R. Current trends and future perspectives of bone substitute materials e From space holders to innovative biomaterials. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 40 (8), p. 706-718, 2012.

KRÜGER, R.; GROLL, J. Fiber reinforced calcium phosphate cements e on the way to degradable load bearing bone substitutes? **Biomaterials**, v. 33, p. 5887 – 5900, 2012.

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

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

LARSSON, S.; HANNINK, G. Injectable bone graft substitutes: current products, their characteristics and indications, and new developments. **Injury**, v. 42, p. 30 – 34, 2011.

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

LEE, S. W.; KIM, S. G.; BALÁZSI, C.; CHAE, W. S.; LEE, H". O. Comparative study of hydroxyapatite from eggshells and synthetic hydroxyapatite for bone regeneration. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 113 (3), p. 348-355, 2012.

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

LEEKE, G. A.; SALIMI, M. N.; BRIDSON, R. H.; GROVER, L. M. Effect of processing conditions on the formation of hydroxyapatite nanoparticles. **Powder Technology**, v. 218, p. 109–118, 2012.

LI, J.; PAN, Y.; XIANG, C.; GE, Q.; GUO, J., Low temperature synthesis of ultrafine  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  powder by a simple aqueous sol–gel process. **Ceramics International**, v. 32, p. 587–591, 2006.

LI, B.; LIAO, X.; ZHENG, L.; ZHU, X.; WANG, Z.; FAN, H.; ZHANG, X. Effect of nanostructure on osteoinduction of porous biphasic calcium phosphate ceramics. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 3794–3804, 2012.

LINEARES, C. F.; BRIKGI, M., Interaction between antimicrobial drugs and antiacid base on cancrinite-type zeolite. **Microporous and Mesoporous Materials**, v. 96, p.141, 2006.

MARTÍNEZ-PÉREZ, C. A.; GARCÍA-MONTELONGO, J.; CASILLAS, P. E. G.; FARIAS-MANCILLA, J. R.; ROMERO, H. M. Preparation of hydroxyapatite nanoparticles facilitated

by the presence of  $\beta$ -cyclodextrin. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 536S, p. S432–S436, 2012.

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

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

MEDVECKY, L.; SOPCAK, T.; GIRMAN, V.; BRIANCIN, J. Amorphous calcium phosphates Synthesized by precipitation from calcium D –gluconate Solutions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects**, v. 417, p. 191– 200, 2013.

MEDCALC<sup>®</sup> - Statistics for biomedical research. Software manual. Copyright<sup>®</sup> - 1993-2013 *MedCalc Software bvba*. Acacialaan 22, B-8400 Ostend - Belgium. info@medcalc.org; www.medcalc.org, 2013.

MEREDITH, D. O.; RIEHLE, M. O.; CURTIS, A. S. G.; RICHARDS, R. G. Is surface chemical composition important for orthopedic implant materials? **Materials Science: Materials Medicine**, v. 18, p. 405 - 413, 2007.

MOCHALES, C.; BRIAK-BENABDESLAM, H. E.; GINEBRA, M. P.; TEROL, A.; PLANELL, J. A.; BOUDEVILLE, P. Dry mechanochemical synthesis of hydroxyapatites from DCPD and CaO: influence of instrumental parameters on the reaction kinetics. **Biomaterials**, v. 25, p. 1151–1158, 2004.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.

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

NAIR, M. B.; VARMA, H. K.; MENON, K. V.; SHENOY, S. J. ; JOHN, A. Reconstruction of goat femur segmental defects using triphasic ceramic-coated hydroxyapatite in combination with autologous cells and platelet-rich plasma. **Acta Biomaterialia**, v. 5, p. 1742–1755, 2009.

NATHANAEL, A. J.; HONG, S. I.; MANGALARAJ, D.; CHEN, P. C. Large scale synthesis of hydroxyapatite nanospheres by high gravity method. **Chemical Engineering Journal**, v. 173, p. 846– 854, 2011.

NAUDI, K. B.; AYOUB, A.; MCMAHON, J.; Di SILVIO, L.; LAPPIN, D.; HUNTER, K. D.; BARBENEL, J. Mandibular reconstruction in the rabbit using beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) scaffolding and recombinant bone morphogenetic protein 7 (rhBMP-7) e Histological, radiographic and mechanical evaluations. **Journal of CranioMaxillo Facial Surgery**, v. 40 (8), p. e461 - 469, 2012.

NEZAFATI, N.; MOZTARZADEH, F.; HESARAKI, S.; MOZTARZADEH, Z.; MOZAFARI, M. Biological response of a recently developed nanocomposite based on calcium phosphate cement and sol-gel derived bioactive glass fibers as substitution of bone tissues. **Ceramics International**, v. 39 (1), p. 289 - 297, 2013.

ÖHMAN, C.; BALEANI, M.; PANI, C.; TADDEI, F.; ALBERGHINI, M.; VICECONTI, M.; MANFRINI, M. Compressive behavior of child and adult cortical bone. **Bone**, v. 49 (4), p. 769-776, 2011.

ONER, M., YETIZ, E., AY, E., UYSAL, U. Ibuprofen release from porous hydroxyapatite tablets. **Ceramics International**, v. 37, p. 2117–2125, 2011.

OHBA, S.; WANG, W.; ITOH, S.; TAKAGI, Y.; NAGAI, A.; YAMASHITA, K. Acceleration of new bone formation by an electrically polarized hydroxyapatite microgranule/platelet-rich plasma composite. **Acta Biomaterialia**, v. 8, p. 2778–2787, 2012.

ONG, J. L.; CHAN, D. C. N. Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: a review. **Critical Reviews in Biomedical Engineering**, v. 28, p. 667–707, 1999.

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

PEDROZA, R. C. Protocolo para Células Aderentes - Avaliação da viabilidade celular pela técnica do MTT. <http://ppgbqa.ufsc.br/files/2011/06/protocolo-MTT.docx>, acesso maio 2013.

PEKKAN, G.; AKTAS, A.; PEKKAN, K. Comparative radiopacity of bone graft materials. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, v. 40, p. e1- e4, 2012.

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

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

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

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

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

RAHAMAN, M. N.; YAO, A.; BAL, B. S.; GARINO, J. P.; RIES, M. D. Ceramics for prosthetic hip and knee joint replacement. **Journal American Ceramic Society**, v. 90, p. 1965–1988, 2007.

RAMESH, S.; AW, K. L.; TOLOUEI, R.; AMIRIYAN, M.; TAN, C. Y.; HAMDI, M.; PURBOLAKSONO, J.; HASSAN, M. A.; TENG, W. D. Sintering properties of hydroxyapatite powders prepared using different methods. **Ceramics International**, v. 39, p. 111–119, 2013.

RAVARIAN, R.; MOZTARZADEH, F.; HASHJIN, M. S.; RABIEE, S. M.; KHOSHAKHLAGH, P.; TAHRIRI, M. Synthesis, characterization and bioactivity investigation of bioglass/hydroxyapatite composite. **Ceramics International**, v. 36, p. 291–297, 2010.

REED, J. S. Principles of Ceramics Processing. 2ª Ed. New York: John Wiley & Sons, 1999.

REIS, P. C. Estudo da remoção e fixação de mercúrio usando hidroxiapatitas modificadas como adsorventes específicos. Tese – Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

RIGO, E. C. S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Revista Dental Press Periodontia Implantologia**, Maringá, v. 1 (3), p. 39-50, 2007.

RYU, H.S., YOUN, H.J., HONG, K.S., CHANG. B.S, LEE, C.K., CHUNG, S.S., An improvement in Sintering property of  $\beta$ -Tricalcium Phosphate by addition of calcium pyrophosphate. **Biomaterials**, v. 14 (23), p. 909-914, 2002.

SÁ, M. J. C. Compósito zircônia-hidroxiapatita na metafise femoral distal e no músculo longíssimo dorsi de cães: estudo clínico-cirúrgico, radiológico e histológico. Tese (doutorado em Ciência Animal). 79f. Universidade Federal de Minas – MG, 2005.

SANYAL, A.; GUPTA, A.; BAYRAKTAR, H. H.; KWON, R. Y.; KEAVENY, T. M. Shear strength behavior of human trabecular bone. **Journal of Biomechanics**, v. 45 (15), p. 2513-2519, 2012.

SCHALCH, M. V. Resistência à flexão, resistência à tração diametral e dureza de compósitos cerâmicos para infra-estrutura. Dissertação de Mestrado em Odontologia, FOAr-UNESP, Araraquara, 2003.

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

SILVA, O. G. Síntese e caracterização de híbridos inorgânicos-orgânicos formados a partir de reações de sinalização da hidroxiapatita e monetita. 2006. 06f. Dissertação (Mestrado em Química), Centro de Ciências e Tecnologia. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Editora LTC, 7ª edição, 2007.

SOMMERVILLE, S. M.; JOHNSON, N.; BRYCE, S. L.; JOURNEAUX, S. F.; MORGAN, D. A. Contamination of banked femoral head allograft: incidence, bacteriology and donor follow up. Australian and New Zealand. **Journal of Surgery**, v. 70, p. 480 - 484, 2000.

SONODA, K.; FURUZONO, T.; WALSH, D.; SATO, K.; TANAKA, J. Influence of emulsion on crystal growth of hydroxyapatite. **Solid State Ionics**, v. 151, p. 321 – 327, 2002.

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

SOPYAN, I.; FADLI, A.; MEL, M. Porous alumina– hydroxyapatite composites through protein foaming–consolidation method. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 8, p. 86 – 98, 2012.

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

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

STOK, J. V. D.; LIESHOUT, E. M. M. V., EL-MASSOUDI, Y.; KRALINGEN, G. H. V.; PATKA, P. Bone substitutes in the Netherlands – A systematic literature review. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 739 – 750, 2011.

SUCHANEK, W. L.; YOSHIMURA, M. Processing and properties of hydroxyapatite based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. **Journal Materials Research**, v. 13, p. 94 – 117, 1998.

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

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

TANCRET, F.; BOULER, J. M.; CHAMOUSSET, J.; MINOIS, L. M. Modelling the mechanical properties of microporous and macroporous biphasic calcium phosphate bioceramics. **Journal European Ceramic Society**, v. 26, p. 3647–3656, 2006.

TEIXEIRA, C. M. L. C. Obtenção e caracterização de compósitos hidrogel/hidroxiapatita para uso dermatológico. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais). Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande – PB, 2013.

THEIN-HAN, W. W.; LIU, J.; XU, H. H. K. Calcium phosphate cement with biofunctional agents and stem cell seeding for dental and craniofacial bone repair. **Dental Materials**, v. 28, p. 1059–1070, 2012.

TIAINEN, H.; WIEDMER, D.; HAUGEN, H. J. Processing of highly porous TiO<sub>2</sub> bone scaffolds with improved compressive strength Original Research. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 33 (1), p. 15 – 24, 2013.

TONIOLO, J. C. Síntese de pós de alumina nanocristalina por combustão em solução. (Dissertação de Mestrado) Programa de Pós Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

TOKER, H.; OZDEMI, H.; OZER, H.; EREN, K. A comparative evaluation of the systemic and local alendronate treatment in synthetic bone graft: a histologic and histomorphometric study in a rat calvarial defect model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 114 (5), p. S146-52, 2012.

VALLET-REGI, M. and GONZÁLEZ-CALBET, J. M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. **Progress in Solid State Chemistry**, v. 32, p. 1-31, 2004.

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

VAL, J. E. M. S.; CALVO-GUIRADO, J. L.; DELGADO-RUIZ, R. A.; RAMIREZ-FERNANDEZ, M. P.; MARTINEZ, I. M.; GRANERO-MARIN, J. M.; NEGRI, B.; CHIVA-GARCIA, F.; MARTINEZ-GONZALEZ, J. M. AZA, P. N. New block graft of  $\alpha$ -TCP with silicon in critical size defects in rabbits: Chemical characterization, histological, histomorphometric and micro-CT study. **Ceramics International**, v. 38, p. 1563–1570, 2012.

VALLET-REGÍ, M. Bioceramics: where do we come from and which are the future expectations. **Key Engineering Materials**, v. 377, p. 1 – 18, 2008.

VITAL, C. C. Hidroxiapatita associada à lignina no preenchimento de falha óssea experimental na tíbia de coelhos. 57f. Tese de doutorado apresentada à Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal de Viçosa, 2005.

VOLKMER, T. M.; LENGLER, F.; SOUSA, V. C.; SANTOS, L. A. dos. Synthesis of calcium phosphates by self-propagating combustion synthesis. **Congress SAM/CONAMET**, San Nicolás, 2007.

WANG, J., YANG, H., CHEN, G. Preparation of lightweight alumina ceramic with in-situ synthesis of nanometer alumina powders as sintering agent. **Journal of the Chinese Ceramic Society**, v. 31 (2), p. 133-137, 2003.

WILLIAMS, D. F. The Williams dictionary of biomaterials. Liverpool, UK: Liverpool University Press; 1999. 368 pp.

WILLIAMS, D. F. Definitions in Biomaterials. Proceedings of a Consensus Conference of the European Society for Biomaterials, v. 4. New York: Elsevier, Chester, England, March 3-5 1986.

WILLIAMS, D. F. On the nature of biomaterials. **Biomaterials**, v. 30, p. 5897 – 909, 2009.

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

WU, Q.; ZHANG, X.; WU, B.; HUANG, W. Effects of microwave sintering on the properties of porous hydroxyapatite scaffolds. **Ceramics International**, v. 39 (3), p. 2389-2395 (2013).

YELTEN, A.; YILMAZ, S.; OKTAR, F. N. Sol-gel derived alumina-hydroxyapatite-tricalcium phosphate porous composite powders. **Ceramics International**, v. 38, p. 2659 – 2665, 2012.

YANG, Y.C.; CHOU, B.Y. Bonding strength investigation of plasma-sprayed HA coatings on alumina substrate with porcelain intermediate layer. **Materials Chemistry and Physics**, v. 104, p. 312 – 319, 2007.

ZHAO, Y.-Z.; ZHU, J.; ZHU, S.-H.; HUANG, Y.-Y.; LI, Z.-Y.; ZHOU, K.-C. Synthesis and characterization of arginine-modified and europium-doped hydroxyapatite nanoparticle and its cell viability. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v. 21 (8), p. 1773 - 1778, 2011.

ZHANG, Y.; ZHANG, M. Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. **Journal Biomedicine Materials Research**, v. 61, p. 1-8, 2002.

APÊNDICES

## APENDICE A - Cálculos do percentual teórico da Alumina

1ª Etapa: com base nos dados das massas molares de cada componente, calculou-se a massa molecular total da alumina  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , como descrito abaixo.

$$\text{Al}_2\text{O}_3 = 1 \text{ mol } (2 \times 26,982 + 3 \times 15,999) \text{ g/mol} = 101,961 \text{ g/mol}$$

$$M_t = 101,961 \text{ g/mol}$$

2ª Etapa: calcula-se o valor percentual do óxido que compõem a composição da alumina.

$$\% \text{Al}_2\text{O}_3 = \frac{M_{\text{Al}_2\text{O}_3}}{M_t} \times 100 = \frac{101,961}{101,961} = 100 \%$$

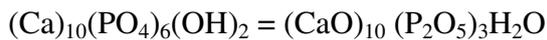
$\% \text{Al}_2\text{O}_3$  = percentual do composto óxido

M = massa do composto óxido

$M_t$  = massa total da composição

APENDICE B - Cálculos do percentual teórico do CaPs

1ª Etapa: com base nos dados das massas molares de cada componente, calculou-se a massa molecular total do CaPs que para este trabalho considerou-se a hidroxiapatita  $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , como descrito abaixo.



$$\text{CaO} = 1 \text{ mol } (40,078 + 15,999) \text{ g/mol} = 56,077 \times 10 = 560,77 \text{ g/mol.}$$

$$\text{P}_2\text{O}_5 = 1 \text{ mol } (2 \times 30,9737 + 5 \times 15,999) \text{ g/mol} = 141,9424 \times 3 = 425,8272 \text{ g/mol}$$

$$\text{H}_2\text{O} = 1 \text{ mol } (2 \times 1,00794 + 15,999) \text{ g/mol} = 18,0148 \text{ g/mol}$$

$$M_t = 1004,612 \text{ g/mol}$$

2ª Etapa:

Calcula-se o valor percentual de cada óxido que compõem a composição da hidroxiapatita.

$$\% X_o = \frac{M_x}{M_t} \times 100 \text{ Temos que:}$$

$\%X_o$  = percentual do composto óxido

$M_x$  = massa do composto óxido

$M_t$  = massa total da composição

Logo temos os seguintes resultados:

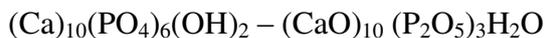
$$\text{P/ CaO} - \% X_o = \frac{560,77 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 55,83\%$$

$$\text{P/ P}_2\text{O}_5 - \% X_o = \frac{425,8272 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 42,38\%$$

$$\text{P/ H}_2\text{O} - \% X_o = \frac{18,0148 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 1,79\%$$

APENDICE C - Cálculos do percentual teórico do compósito 95% de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e 5% do CaPs

1ª Etapa: com base nos dados das massas molares de cada componente, calculou-se a massa molecular total do CaPs que para este trabalho considerou-se a hidroxiapatita  $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , como descrito abaixo.



$$\text{CaO} = 1 \text{ mol } (40,078+15,999) \text{ g/mol} = 56,077 \times 10 = 560,77 \text{ g/mol.}$$

$$\text{P}_2\text{O}_5 = 1 \text{ mol } (2 \times 30,9737 + 5 \times 15,999) \text{ g/mol} = 141,9424 \times 3 = 425,8272 \text{ g/mol}$$

$$\text{H}_2\text{O} = 1 \text{ mol } (2 \times 1,00794 + 15,999) \text{ g/mol} = 18,0148 \text{ g/mol}$$

$$M_t = 1004,612 \text{ g/mol}$$

2ª Etapa:

Calcula-se o valor percentual de cada óxido que compõem a composição da hidroxiapatita.

$$\% X_O = \frac{M_x}{M_t} \times 100 \text{ Temos que:}$$

$\%X_O$  = percentual do composto óxido

$M_x$  = massa do composto óxido

$M_t$  = massa total da composição

Logo, temos os seguintes resultados.

$$\text{P/ CaO} - \%X_O = \frac{560,77 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 55,83\%$$

$$\text{P/ P}_2\text{O}_5 - \%X_O = \frac{425,8272 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 42,38\%$$

$$\text{P/ H}_2\text{O} - \%X_O = \frac{18,0148 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 1,79\%$$

Considerando que o compósito 95% de alumina e 5% de hidroxiapatita, calculou-se a percentagem de cada óxido que compõe a hidroxiapatita.

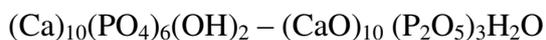
$$\text{P/ CaO} = 5 \times 0,5583 = 2,7915\%$$

$$\text{P/ P}_2\text{O}_5 = 5 \times 0,4238 = 2,119\%$$

$$\text{P/ H}_2\text{O} = 5 \times 0,0179 = 0,0895\%$$

APENDICE D - Cálculos do percentual teórico do compósito 90% de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>e 10% doCaPs

1ª Etapa: com base nos dados das massas molares de cada componente, calculou-se a massa molecular total do CaPs que para este trabalho considerou-se a hidroxiapatita (Ca)<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>, como descrito abaixo.



$$CaO = 1 \text{ mol } (40,078+15,999) \text{ g/mol} = 56,077 \times 10 = 560,77 \text{ g/mol.}$$

$$P_2O_5 = 1 \text{ mol } (2 \times 30,9737 + 5 \times 15,999) \text{ g/mol} = 141,9424 \times 3 = 425,8272 \text{ g/mol}$$

$$H_2O = 1 \text{ mol } (2 \times 1,00794 + 15,999) \text{ g/mol} = 18,0148 \text{ g/mol}$$

$$M_t = 1004,612 \text{ g/mol}$$

2ª Etapa:

Calcula-se o valor percentual de cada óxido que compõem a composição da hidroxiapatita.

$$\% X_o = \frac{M_x}{M_t} \times 100 \text{ Temos que:}$$

%X<sub>o</sub> = percentual do composto óxido

M<sub>x</sub> = massa do composto óxido

M<sub>t</sub> = massa total da composição

Logo temos os seguintes resultados:

$$P/ CaO - \%X_o = \frac{560,77 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 55,83\%$$

$$P/ P_2O_5 - \%X_o = \frac{425,8272 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 42,38\%$$

$$P/ H_2O - \%X_o = \frac{18,0148 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 1,79\%$$

Considerando que o compósito 90% de alumina e 10% de CaPs, calculou-se a percentagem de cada óxido que compõe o CaPs.

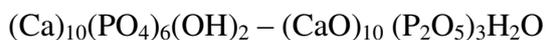
$$P/ CaO - 10 \times 0,5583 = 5,583 \%$$

$$P/ P_2O_5 - 10 \times 0,4238 = 4,238 \%$$

$$P/ H_2O - 10 \times 0,0179 = 0,179 \%$$

APENDICE E - Cálculos do percentual teórico do compósito 85% de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e 15% do CaPs

1ª Etapa: com base nos dados das massas molares de cada componente, calculou-se a massa molecular total do CaPs que para este trabalho considerou-se a hidroxiapatita  $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , como descrito abaixo.



$$\text{CaO} = 1 \text{ mol } (40,078+15,999) \text{ g/mol} = 56,077 \times 10 = 560,77 \text{ g/mol.}$$

$$\text{P}_2\text{O}_5 = 1 \text{ mol } (2 \times 30,9737 + 5 \times 15,999) \text{ g/mol} = 141,9424 \times 3 = 425,8272 \text{ g/mol}$$

$$\text{H}_2\text{O} = 1 \text{ mol } (2 \times 1,00794 + 15,999) \text{ g/mol} = 18,0148 \text{ g/mol}$$

$$M_t = 1004,612 \text{ g/mol}$$

2ª Etapa:

Calcula-se o valor percentual de cada óxido que compõem a composição da hidroxiapatita.

$$\% X_O = \frac{M_x}{M_t} \times 100 \text{ Temos que:}$$

$\%X_O$  = percentual do composto óxido

$M_x$  = massa do composto óxido

$M_t$  = massa total da composição

Logo, temos os seguintes resultados.

$$\text{P/ CaO} - \%X_O = \frac{560,77 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 55,83\%$$

$$\text{P/ P}_2\text{O}_5 - \%X_O = \frac{425,8272 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 42,38\%$$

$$\text{P/ H}_2\text{O} - \%X_O = \frac{18,0148 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 1,79\%$$

Considerando que o compósito 85% de alumina e 15% de hidroxiapatita, calculou-se a percentagem de cada óxido que compõe a hidroxiapatita.

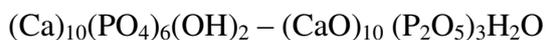
$$\text{P/ CaO} - 15 \times 0,5583 = 8,3745 \%$$

$$\text{P/ P}_2\text{O}_5 - 15 \times 0,4238 = 6,357 \%$$

$$\text{P/ H}_2\text{O} - 15 \times 0,0179 = 0,2685 \%$$

APENDICE F - Cálculos do percentual teórico do compósito 80% de  $Al_2O_3$  e 20% do CaPs

1ª Etapa: com base nos dados das massas molares de cada componente, calculou-se a massa molecular total do CaPs que para este trabalho considerou-se a hidroxiapatita  $(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ , como descrito abaixo.



$$CaO = 1 \text{ mol } (40,078+15,999) \text{ g/mol} = 56,077 \times 10 = 560,77 \text{ g/mol.}$$

$$P_2O_5 = 1 \text{ mol } (2 \times 30,9737 + 5 \times 15,999) \text{ g/mol} = 141,9424 \times 3 = 425,8272 \text{ g/mol}$$

$$H_2O = 1 \text{ mol } (2 \times 1,00794 + 15,999) \text{ g/mol} = 18,0148 \text{ g/mol}$$

$$M_t = 1004,612 \text{ g/mol}$$

2ª Etapa:

Calcula-se o valor percentual de cada óxido que compõem a composição da hidroxiapatita.

$$\% X_O = \frac{M_x}{M_t} \times 100 \text{ Temos que:}$$

$\%X_O$  = percentual do composto óxido

$M_x$  = massa do composto óxido

$M_t$  = massa total da composição

Logo, temos os seguintes resultados.

$$P/ CaO - \%X_O = \frac{560,77 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 55,83\%$$

$$P/ P_2O_5 - \%X_O = \frac{425,8272 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 42,38\%$$

$$P/ H_2O - \%X_O = \frac{18,0148 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 1,79\%$$

Considerando que o compósito 80% de alumina e 20% de hidroxiapatita, calculou-se a percentagem de cada óxido que compõe a hidroxiapatita.

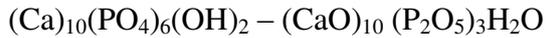
$$P/ CaO - 20 \times 0,5583 = 11,166 \%$$

$$P/ P_2O_5 - 20 \times 0,4238 = 8,476 \%$$

$$P/ H_2O - 20 \times 0,0179 = 0,358 \%$$

APENDICE G - Cálculos do percentual teórico do compósito 70% de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e 30% do CaPs.

1ª Etapa: com base nos dados das massas molares de cada componente, calculou-se a massa molecular total do CaPs que para este trabalho considerou-se a hidroxiapatita  $(\text{Ca})_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , como descrito abaixo.



$$\text{CaO} = 1 \text{ mol } (40,078+15,999) \text{ g/mol} = 56,077 \times 10 = 560,77 \text{ g/mol.}$$

$$\text{P}_2\text{O}_5 = 1 \text{ mol } (2 \times 30,9737 + 5 \times 15,999) \text{ g/mol} = 141,9424 \times 3 = 425,8272 \text{ g/mol}$$

$$\text{H}_2\text{O} = 1 \text{ mol } (2 \times 1,00794 + 15,999) \text{ g/mol} = 18,0148 \text{ g/mol}$$

$$M_t = 1004,612 \text{ g/mol}$$

2ª Etapa:

Calcula-se o valor percentual de cada óxido que compõem a composição da hidroxiapatita.

$$\% X_O = \frac{M_x}{M_t} \times 100 \text{ Temos que:}$$

$\%X_O$  = percentual do composto óxido

$M_x$  = massa do composto óxido

$M_t$  = massa total da composição

Logo, temos os seguintes resultados.

$$\text{P/ CaO} - \%X_O = \frac{560,77 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 55,83\%$$

$$\text{P/ P}_2\text{O}_5 - \%X_O = \frac{425,8272 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 42,38\%$$

$$\text{P/ H}_2\text{O} - \%X_O = \frac{18,0148 \text{ g/mol}}{1004,612 \text{ g/mol}} \times 100 = 1,79\%$$

Considerando que o compósito 70% de alumina e 30% de hidroxiapatita, calculou-se a percentagem de cada óxido que compõe a hidroxiapatita.

$$\text{P/ CaO} - 30 \times 0,5583 = 16,749 \%$$

$$\text{P/ P}_2\text{O}_5 - 30 \times 0,4238 = 12,714 \%$$

$$\text{P/ H}_2\text{O} - 30 \times 0,0179 = 0,537 \%$$

APENDICE H - Ensaio de Arquimedes para as amostras dos compósitos com diferentes concentrações  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaP}$  sinterizadas a  $1350^\circ\text{C}$ .

Tabela H1- Resultados do ensaio de Arquimedes para os compósitos  $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaP}$  sinterizadas  $1350^\circ\text{C}$ .

Amostras	$M_s$	$M_i$	$M_u$
0C	1,22	0,92	1,24
5C	1,17	0,88	1,20
10C	1,16	0,84	1,22
15C	1,20	0,84	1,27
20C	1,23	0,82	1,30
30C	1,18	0,81	1,31

Onde:

$M_s$  – Massa seca

$M$  – Massa imersa

$M_u$  – Massa úmida

APENDICE I - Cálculos da densidade teóricas calculados a partir dos valores de densidade teórica encontrados nas fichas cristalográficas referente à fase majoritária do Anexo II.

Para a  $\text{Al}_2\text{O}_3$  a densidade teórica é  $4,007 \text{ g/cm}^3$

Para o CaPs a densidade teórica é  $3,121 \text{ g/cm}^3$

Para o compósito 5C, temos:

$$0,95 \times 4,007 \text{ g/cm}^3 + 0,05 \times 3,121 \text{ g/cm}^3 = 3,96 \text{ g/cm}^3$$

Para o compósito 10C, temos:

$$0,90 \times 4,007 \text{ g/cm}^3 + 0,10 \times 3,121 \text{ g/cm}^3 = 3,91 \text{ g/cm}^3$$

Para o compósito 15C, temos:

$$0,85 \times 4,007 \text{ g/cm}^3 + 0,15 \times 3,121 \text{ g/cm}^3 = 3,87 \text{ g/cm}^3$$

Para o compósito 20C, temos:

$$0,80 \times 4,007 \text{ g/cm}^3 + 0,20 \times 3,121 \text{ g/cm}^3 = 3,82 \text{ g/cm}^3$$

Para o compósito 30C, temos:

$$0,70 \times 4,007 \text{ g/cm}^3 + 0,30 \times 3,121 \text{ g/cm}^3 = 3,82 \text{ g/cm}^3$$

ANEXOS

## ANEXO I - Reagentes utilizados na obtenção do CaPs

**i) Vetec Química Fina – hidróxido de cálcio**Hidróxido de cálcio PA – Ca(OH)<sub>2</sub>

Cod 363 ONU 3262 Sólido Corrosivo, Básico, Orgânico, N.E.

Contéudo: 500g

Boletim de Garantia

Substâncias	Quantidades (%)
Ca(OH) <sub>2</sub>	95,0
CaCO <sub>3</sub>	3,0
HCl	0,1
Cl	0,03
Sulfato	0,1
Ferro	0,05
Metais pesados (como Pb)	0,003
Magnésio e sais básicos (como sulfatos)	1,0

**i) Vetec Química Fina – Ácido Fosfórico**Ácido Fosfórico PA ACS ISO – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Cod 1529 ONU 1805 Ácido Fosfórico Líquido

Contéudo: 1000 mL

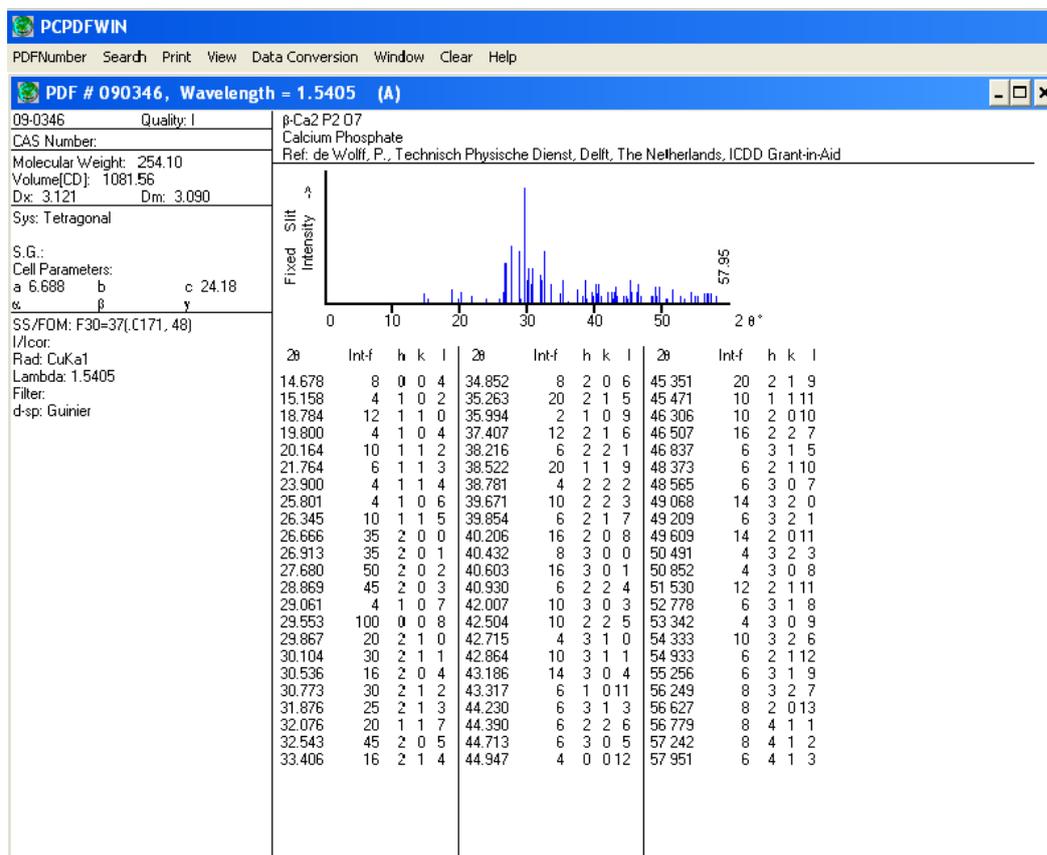
PM = 98,0 g/mol

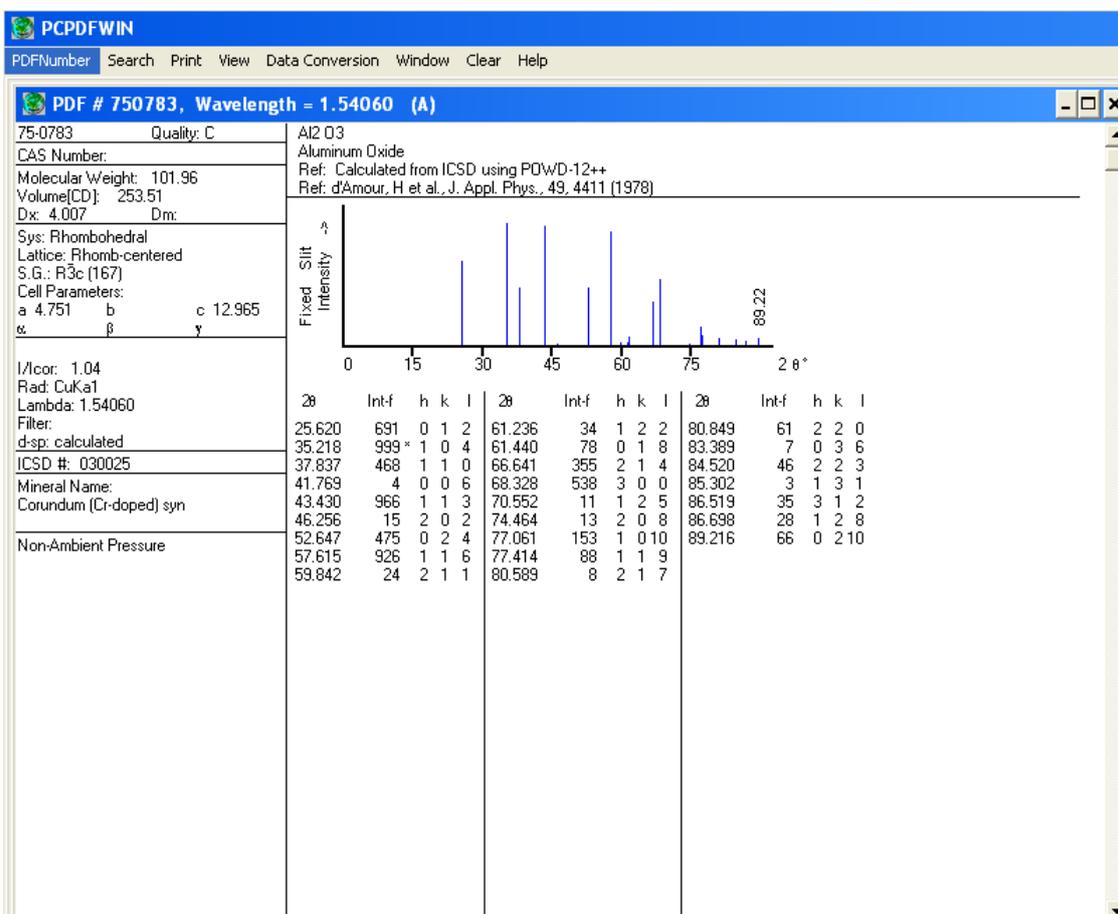
1L = 1,71 Kg

Boletim de garantia

Substâncias	Quantidades (%)
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	85
Cloreto	0,0003
Sulfato	0,005
Arsênio	0,0001
Cádmio	0,0005
Cobre	0,0005
Ferro	0,001
Chumbo	0,001
Manganês	0,0005
Níquel	0,0005
Potássio	0,005
Sódio	0,05
Zinco	0,001
Ácidos voláteis (m Mol H <sup>+</sup> )	0,02/100

## ANEXO II - Ficha cristalográfica dos CaPs



ANEXO III - Ficha cristalográfica da  $\text{Al}_2\text{O}_3$ 

## ANEXO IV – Aprovação do Comitê de Ética



Universidade Federal de Campina Grande  
Centro de Saúde e Tecnologia Rural  
Comissão de Ética em Pesquisa  
Av. Sta Cecília, s/n, Bairro Jatobá, Rodovia Patos.  
CEP: 58700-970, Cx postal 64. Tel. (83) 3511-3045

Ao: Ana Cristina Figueiredo de Mello

Sr<sup>a</sup>. Mello;

Protocolo CEP nº 05-2011

## CERTIDÃO

ASSUNTO: Solicitação de aprovação do projeto de pesquisa intitulado "Desenvolvimento de compostos  $Al_2O_3$ /fosfato de cálcio para o uso como material na odontologia bucomaxilofacial".

Cientificamos a V.Sa. que seu projeto teve parecer consubstanciado orientado pelo regulamento interno deste comitê e foi **APROVADO** em reunião Extraordinária nº 2/2011, em 16 de agosto, estando à luz das normas e regulamentos vigentes no país atendidas as especificações para a pesquisa científica.

Secretaria do Comitê de ética em Pesquisa – CEP da UFCG  
Patos, 17 de agosto de 2011.

Onaldo Guedes Rodrigues  
Coordenador do CEP

Pedimos encaminhar resposta com a maior brevidade ao CEP