

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA

HÉLIO DE JESUS KIYOCHI JÚNIOR

ESTUDO *EX VIVO* DA CERÂMICA BIFÁSICA COMPOSTA DE HIDROXIAPATITA-  
BETA FOSFATO TRICÁLCIO (HA -  $\beta$ -TCP) E PENTÓXIDO DE NIÓBIO ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ )  
COMO BIOMATERIAL EMPREGADO PARA O REPARO ÓSSEO EM DEFEITOS DE  
CALVÁRIA

MARINGÁ

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA INTEGRADA

HÉLIO DE JESUS KIYOCHI JÚNIOR

ESTUDO *EX VIVO* DA CERÂMICA BIFÁSICA COMPOSTA DE HIDROXIAPATITA-  
BETA FOSFATO TRICÁLCIO (HA -  $\beta$ -TCP) E PENTÓXIDO DE NIÓBIO (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)  
COMO BIOMATERIAL EMPREGADO PARA O REPARO ÓSSEO EM DEFEITOS DE  
CALVÁRIA

Dissertação apresentada à Universidade  
Estadual de Maringá como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de Mestre  
em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luzmarina Hernandes

MARINGÁ

2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

K62e Kiyochi Júnior, Hélio de Jesus  
Estudo ex vivo da cerâmica bifásica composta de hidroxapatita-beta fosfato tricálcio (HA- $\beta$ -TCP) e pentóxido de nióbio (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) como biomaterial empregado para o reparo ósseo em defeitos de calvária / Hélio de Jesus Kiyochi Júnior. -- Maringá, 2013.  
49 f. : il. col., figs.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luzmarina Hernandes.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, 2013.

1. Enxerto ósseo. 2. Biomateriais. 3. Histopatologia. 4. Reparo ósseo. 5. Compósito hidroxapatita-beta fosfato tricálcio - Pentóxido de nióbio. 6. Defeito de tamanho crítico. I. Hernandes, Luzmarina, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada. III. Título.

CDD 21.ed. 617.522

MN-0001098

HÉLIO DE JESUS KIYOCHI JÚNIOR

ESTUDO *EX VIVO* DA CERÂMICA BIFÁSICA COMPOSTA DE HIDROXIAPATITA-  
BETA FOSFATO TRICÁLCIO (HA -  $\beta$ -TCP) E PENTÓXIDO DE NIÓBIO (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>)  
COMO BIOMATERIAL EMPREGADO PARA O REPARO ÓSSEO EM DEFEITOS DE  
CALVÁRIA

Dissertação apresentada à Universidade  
Estadual de Maringá como parte dos  
requisitos para obtenção do grau de Mestre  
em Odontologia.

Aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Cleverson Oliveira e Silva  
Faculdade Ingá – Uningá

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Raquel Marçal Natali  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Luzmarina Hernandes (Orientadora)  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Dedico este trabalho

Aos meus pais, Hélio e Cleuza, por seu apoio, força, suporte, incentivo e amor sempre mostrados e à Professora Luzmarina Hernandes, pelo seu exemplo, dedicação e orientação em seu sentido mais amplo, sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível.

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha orientadora, Professora Luzmarina Hernandes, por todo o tempo e atenção dedicados à minha pessoa durante o desenvolvimento deste trabalho e também pelos seus conselhos, conversas, enfim, pela sua abertura, amizade e ótimo companheirismo durante esses meses de convivência.

Agradeço também imensamente aos meus pais, Hélio e Cleuza Kiyochi, e a minha irmã, Sabine Kiyochi, por me darem todo o suporte e estrutura para que este trabalho pudesse ter sido realizado e também pelo seu amor e amizade incondicionais, mesmo quando eu não pude estar à altura destes.

Agradeço a Graciela Candido, pelo incentivo e ajuda nas fases iniciais deste Mestrado e a Aline Candido, por toda a ajuda e todo o companheirismo que tivemos durante o desenvolvimento deste trabalho, algumas vezes em momentos e horários difíceis, mas que certamente nos uniram ainda mais e fortaleceram esta grande amizade.

Agradeço a professora Fernanda Losi, pela ajuda com as lâminas e por sua amizade e disponibilidade mostradas sempre quando precisei. Também agradeço as técnicas do laboratório, Maria Eurides, Maria dos Anjos e Maria Ângela, por toda a ajuda demonstrada em diversos aspectos laboratoriais, além das conversas e do companheirismo sempre presentes, e aos estagiários do projeto Jonathan Ferezini e Bruno Viotto pela disposição e ajuda durante as cirurgias e com os cuidados dos animais.

Agradeço aos membros do Grupo de Estudos dos Fenômenos Fototérmicos (GEFF), os professores Wilson Weinand, Mauro Baesso e Franciele Sato e, em especial, a doutoranda Taiana Bonadio pela ajuda e orientação nos experimentos físicos, pela confecção dos materiais e por sempre responder prontamente às nossas solicitações de ajuda.

Agradeço aos professores, funcionários e colegas do Programa de Mestrado em Odontologia Integrada da UEM, os colegas do Departamento de Ciências Morfológicas, em especial ao meu amigo Jean Besson, e aos meus amigos pessoais e de trabalho pela compreensão, suporte e apoio emocional concedidos.

Agradeço também a CAPES pela concessão de bolsa de estudos e apoio financeiro.

Um trabalho deste porte envolve muitas pessoas que com certeza não citei acima. Por isso, a todos que de uma forma ou de outra contribuíram para este trabalho, meu sincero e profundo agradecimento.

A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,  
mas pensar o que ninguém ainda pensou  
sobre aquilo que todo mundo vê.

*Arthur Schopenhauer*

## Resumo

Os biomateriais, de origem natural ou sintética, compostos de uma só substância ou de associação de duas ou mais, têm sido cada vez mais utilizados com a finalidade de auxiliar no reparo ou substituição óssea. O objetivo desse trabalho foi avaliar *ex vivo* a biocompatibilidade, a bioatividade e a atividade osteocondutora de um compósito constituído por hidroxiapatita -  $\beta$ -fosfato tricalcio ( $\beta$ -TCP) e pentóxido de nióbio no reparo de defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos. Defeitos de 8 mm de diâmetro foram confeccionados na calvária de ratos Wistar machos. Nos animais do grupo experimental os defeitos foram preenchidos com uma pastilha constituída pelo compósito (HA $\beta$ -NbO) e, nos animais do grupo controle, foram preenchidos com uma pastilha de cerâmica bifásica composta por hidroxiapatita pura e  $\beta$ -fosfato tricálcio (HA $\beta$ ). Previamente ao implante, as características físico-químicas das pastilhas foram determinadas por difração de raios X (DRX) e por microscopia eletrônica de varredura (MEV), além de terem sido testadas quanto à microdureza. Os animais foram mortos 7, 15, 30, 45 e 60 dias após o procedimento cirúrgico. As amostras da calota craniana foram coletadas e processadas para inclusão em parafina e os cortes corados com H&E e Azan para estudo histopatológico ou para estudo em MEV. Os resultados mostraram que as pastilhas de ambos os materiais apresentaram micro poros. Após a sinterização o compósito apresentou três fases cristalinas distintas, com predominância de  $\beta$ -fosfato tricálcio ( $\beta$ -TCP) (47,43%), e microdureza Vickers 66% maior que a da HA $\beta$ . As pastilhas do compósito mantiveram-se mais bem encaixadas nos defeitos após os períodos de observação. Apresentou ainda biocompatibilidade, bioatividade e osteocondutividade semelhante àquela da HA $\beta$ . Não houve desenvolvimento de fibrose e tampouco de reação inflamatória. Concluímos que o compósito apresenta características de biocompatibilidade, bioatividade e atividade osteocondutora semelhantes às da hidroxiapatita, tendo em sua composição química maior quantidade de  $\beta$ -TCP e com microdureza superior.

Palavras chave: biomateriais; compósito hidroxiapatita -  $\beta$ -fosfato tricalcio-pentóxido de nióbio ; histopatologia; defeito de tamanho crítico; reparo ósseo.



## Abstract

Biomaterials, of natural or synthetic origin, composed of one or an association of two or more substances, have been increasingly used for the purpose of aiding in the repair or replacement of bone. The aim of this study was to evaluate *ex vivo* biocompatibility, bioactivity and osteoconductive activity of a composite consisting of hydroxyapatite- $\beta$ -tricalcium phosphate and niobium pentoxide in the repair of critical size defects in the calvaria of rats. Calvarial defects of 8 mm diameter were made in male Wistar rats. In the animals of the experimental group, the defects were filled with a tablet comprising the composite (HA $\beta$ -NbO) and in the control group, they were filled with a tablet of a biphasic ceramic composed by pure hydroxyapatite and  $\beta$ -tricalcium phosphate (HA $\beta$ ). Prior to implantation, the physico-chemical properties of the tablets were determined by X-ray diffraction (XRD) and scanning electron microscopy (SEM), and have been tested for microhardness. The animals were killed 7, 15, 30, 45 and 60 days after surgery. Samples of the skull were collected and processed for paraffin inclusion and then stained with H&E and Azan for histopathological study or SEM. Results indicated that both materials showed micropores. After sintering, the composite showed three distinct crystalline phases, with a predominance of  $\beta$ -tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) (47.43%), and Vickers microhardness 66% higher when compared to HA $\beta$ . The tablets of the composite remained more securely clicked into the defects after all the observation periods. They also presented biocompatibility, bioactivity and osteoconductivity activity similar to that of HA $\beta$ . There was no development of fibrosis nor inflammatory reaction. We conclude that the composite has biocompatibility, bioactivity and osteoconductive activity similar to that of hydroxyapatite, having a chemical composition with greater amount of  $\beta$ -TCP and higher microhardness.

Keywords: biomaterials; hydroxyapatite -  $\beta$ -tricalcium phosphate-niobium pentoxide composite; histopathology; critical size defect; bone repair.

## Sumário

<b>Introdução</b> .....	9
<b>Objetivos Gerais</b> .....	12
<b>Objetivos Específicos</b> .....	12
<b>Materiais e Métodos</b>	
Obtenção de hidroxiapatita e nióbio .....	13
Preparação das pastilhas de hidroxiapatita e do compósito HA $\beta$ -NbO .....	13
Microdureza Vickers .....	14
Análise por Difração de raios X (DRX) .....	14
Procedimento experimental em animais .....	16
Microscopia de luz .....	17
Microscopia eletrônica de varredura (MEV) .....	18
<b>Resultados</b>	
Caracterização estrutural das pastilhas de HA $\beta$ e HA $\beta$ -NbO por MEV e por DRX .....	19
Microdureza Vickers .....	20
Análise quantitativa de fases – Método Rietveld .....	20
Avaliação clínica e <i>post-mortem</i> dos animais .....	21
Crescimento ósseo nos defeitos de tamanho crítico .....	22
Estudo histológico – Microscopia de luz .....	22
Análises das margens dos defeitos: interface osso-biomaterial .....	31
<b>Discussão</b> .....	36
<b>Conclusões</b> .....	43
<b>Referências</b> .....	44

## Introdução

O aumento da expectativa de vida da população tem provocado grandes mudanças na medicina e odontologia, demandando o uso de novas técnicas e materiais visto que a perda óssea decorrente da idade aumenta o risco de fraturas (Gisep, 2002). Os biomateriais, de origem natural ou sintética, compostos de uma só substância, ou associação de duas ou mais substâncias têm sido cada vez mais utilizados com a finalidade de auxiliar no reparo ou substituição óssea (Williams, 1987; Moraes, 2002). Apresentam as vantagens de serem imunologicamente inertes, podem ser fabricados em quantidades ilimitadas e são bem tolerados pelo organismo (Piecuch, 1982; Hattar *et al.*, 2005) razões pelas quais são rotineiramente empregados como enxertos ou implantes nas áreas de cirurgia, ortopedia e implantodontia.

Os substitutos ósseos considerados como padrão ouro são os enxertos autógenos (Teixeira, 2009), entretanto, as restrições para a sua obtenção estimulam a pesquisa por outros materiais. Os materiais sintéticos diferem muito uns dos outros em sua composição e estrutura, e um único material nunca apresentará todas as características desejáveis como substituto ósseo (Murugan e Ramakrishna, 2005). Também não é raro que os materiais artificiais implantados em reparos ósseos sejam encapsulados por tecido fibroso (Kokubo *et al.*, 2004; Moreschi *et al.*, 2010) que os isola, impedindo sua adesão ao osso adjacente.

Para o desenvolvimento de biomateriais com ótimo desempenho, é extremamente importante compreender as interações osso-biomaterial. Esta interação, somada à presença de fatores de crescimento, tem se constituído no cerne das estratégias empregadas para alcançar a regeneração do tecido ósseo danificado (Service, 2000). A engenharia própria do tecido ósseo oferece uma estratégia promissora para o reparo de injúrias ósseas porque utiliza a resposta biológica natural do corpo em conjunto com os princípios da engenharia (Tamai *et al.*, 2007).

O titânio e o nióbio, além de suas ligas, estão entre os materiais mais utilizados em restaurações e próteses ósseas. De modo geral, estes materiais são biocompatíveis e pouco citotóxicos (Okazaki, 2001; Yamamoto *et al.*, 2004). Destacam-se porque possuem excelentes propriedades mecânicas. No entanto, essas ligas são materiais biotoleráveis, não sendo capazes de ligar-se ao tecido ósseo. Por outro lado, os materiais bioativos, como as

cerâmicas de fosfato de cálcio, criam ligações químicas fortes com o tecido ósseo, mas não resistem a altas tensões mecânicas (Rigo *et al.*, 1999).

A hidroxiapatita (HA)  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  (Long *et al.*, 1998; Ramírez *et al.*, 2011) é um dos materiais que apresenta maior biocompatibilidade e bioatividade, porque sua composição química e estrutura cristalina se assemelham à fase mineral do tecido ósseo (Legeros, 2002; Vital *et al.*, 2006). É um material esterilizável, relativamente não absorvível e possui uma composição uniforme (Ono *et al.*, 2000). Considerada um material aloplástico (Fleckenstein, 2006; Teixeira, 2009), e, portanto, osteocondutor, possui a capacidade de formar um arcabouço para a migração de células angiogênicas e osteogênicas (Teixeira, 2009).

A HA $\beta$  pode ser associada com materiais de propriedades mecânicas superiores de forma a aumentar suas propriedades benéficas. Entre as suas indicações de uso está o reparo de defeitos ósseos em aplicações odontológicas e ortopédicas, aumento de rebordo alveolar, regeneração guiada de tecidos ósseos, reconstrução bucomaxilofacial, reparo e substituição de paredes orbitais e substituição do globo ocular (Aoki, 1991; Legeros, 1988).

A HA $\beta$  pode ser associada com o nióbio (Nb), um metal que apresenta baixa toxicidade (Yamamoto *et al.*, 2004), promove a calcificação de células NHOst (*Normal Human Osteoblasts*) e estimula atividade da fosfatase alcalina, um importante fator na geração de osso novo (Isama e Tsuchiya, 2003; Tamai *et al.*, 2007). Quando associado ao titânio constitui uma liga que possui módulo de *Young* (módulo de elasticidade) semelhante ao osso humano (Müller *et al.*, 2008). Esta propriedade física deve ser levada em consideração pois ajuda a evitar o fenômeno de *stress* ósseo decorrente da incompatibilidade mecânica entre o material de implante e o tecido ósseo, que retarda o reparo e a remodelação óssea (Murugan e Ramakrishna, 2005).

O Brasil tem as maiores reservas minerais de nióbio do mundo, de mais de 90% do total (Brasil, 2012), no entanto, o número de publicações nacionais e internacionais explorando a biocompatibilidade do nióbio ainda é muito menor do que o do titânio. Além disso, o nióbio apresenta afinidade por oxigênio, formando facilmente o pentóxido de nióbio (Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>). Esse óxido é biocompatível, resistente à corrosão e possui o grupo funcional Nb-OH, em sua superfície, que induz a nucleação de apatita tornando-o bioativo (Bonadio, 2011).

Os estudos com o  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  podem ser uma alternativa para redução dos custos de produção, porque sua síntese é realizada em atmosfera de ar, em temperaturas menores que a dos metais. Além disso, o pentóxido de nióbio pode ser moído junto com a hidroxiapatita. Este processo possibilita a formação de reações de estado sólido, facilitando as transições de fase na formação dos compósitos (Nascimento *et al.*, 2011). Finalmente, um compósito constituído por hidroxiapatita e pentóxido de nióbio ( $\text{HA}\beta\text{-NbO}$ ) pode trazer a vantagem de associar as qualidades necessárias a um bom biomaterial: biocompatibilidade, bioatividade e resistência.

Trabalhos anteriores já comprovaram que é possível desenvolver um compósito nanoestruturado com o  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  e a  $\text{HA}\beta$  pelo método de metalurgia do pó apontando para um desenvolvimento promissor de novos materiais bioativos (Nascimento *et al.*, 2011).

Não existem estudos em animais analisando o comportamento dos tecidos frente ao compósito  $\text{HA}\beta\text{-NbO}$  e tampouco avaliando seu potencial no processo de reparo ósseo, por este motivo o objetivo deste trabalho é avaliar *ex vivo* a biocompatibilidade, a bioatividade e a propriedade osteocondutora do compósito  $\text{HA}\beta\text{-NbO}$  no reparo de defeitos ósseos na calvária de ratos.

## **Objetivos gerais**

Avaliar *ex vivo* a biocompatibilidade, bioatividade e a atividade osteocondutora do compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio (HA $\beta$ -NbO) no reparo de defeitos ósseos na calvária de ratos.

## **Objetivos Específicos**

- 1) Caracterizar a composição química e estrutura física do compósito por meio de difração de raios X (DRX) e de microscopia eletrônica de varredura associada com espectroscopia de raios x por dispersão de energia (MEV-EDS);
- 2) Avaliar a histopatologia da calvária de ratos após implante do compósito no defeito ósseo.
- 3) Avaliar a regeneração óssea no defeito após implante do compósito em diferentes períodos de tempo.
- 4) Observar morfológicamente a interface biomaterial-osso.

## **Materiais e métodos**

### *Obtenção de hidroxiapatita e nióbio*

Para a obtenção da hidroxiapatita- $\beta$ TCP foram utilizados ossos de peixe jovem *Pseudoplatystoma corruscans*, conhecido como “pintado”. Os ossos foram cedidos pelo Núcleo de Pesquisas em Limnologia Ictiologia e Aquicultura da Universidade Estadual de Maringá (NUPELIA-UEM). O processamento dos ossos, preparação e confecção das pastilhas foi realizado no Departamento de Física da Universidade Estadual de Maringá.

Inicialmente os ossos foram limpos em água quente e lavados para a remoção dos tecidos moles. O material restante foi seco ao ar e calcinado por 8 horas a 900 °C para que todos os resíduos orgânicos fossem eliminados, restando apenas a fase mineral dos ossos. A seguir o material foi moído por 8 horas em moinho (Retsch® PM 100, Haan, Alemanha), utilizando-se vaso de moagem e esferas de aço inox em razão de massa esfera/massa pó igual a 6/1.

O pentóxido de nióbio ( $\text{Nb}_2\text{O}_5$ ) foi produzido a partir do tratamento de cavacos de nióbio metálico cedidos pela Companhia Brasileira de Metalurgia e Mineração (CBMM, Araxá, Brasil). O material foi tratado termicamente em atmosfera de ar a 1000°C por uma hora e então submetido a processo de moagem para que houvesse a redução do tamanho das partículas.

### *Preparação das pastilhas de hidroxiapatita e do compósito HA $\beta$ -NbO*

Para a produção do compósito HA $\beta$ -NbO, os pós dos precursores foram misturados na proporção de 1:1 em volume percentual e moídos em moinho de bolas por 3 horas com razão massa esfera/massa pó igual a 6/1. Após o processo de moagem o material resultante foi compactado uniaxialmente a 40 MPa, em forma de pastilha, e prensado isostaticamente a 117 MPa.

Foram utilizadas como molde para a confecção das pastilhas calotas cranianas de ratos, com 8 mm de diâmetro e 1 mm de profundidade. O modo de obtenção das calotas será descrito no item procedimento cirúrgico.

As pastilhas foram sinterizadas em atmosfera de ar a 1000 °C por uma hora obtendo-se amostras cilíndricas com diâmetros de 8 mm e espessura de 1 mm. A seguir, as peças sinterizadas foram lixadas até atingirem uma espessura de 0,65 mm e lavadas em ultrassom em três etapas: acetona, água e álcool, e esterilizadas em autoclave. Para a produção de pastilhas de HA $\beta$ , usadas como controle, o procedimento adotado foi semelhante, exceto pela etapa de mistura e moagem. A porosidade das pastilhas foi avaliada comparando a densidade do material sinterizado com a densidade teórica da HA estequiométrica (3,156 g/cm<sup>3</sup>).

#### *Microdureza Vickers*

As medidas de microdureza foram realizadas em uma máquina de ensaios (UMT-2 *Multi-Specimen Test System*, CETR, Campbell, EUA). Foram realizadas 10 indentações em cada pastilha sinterizada a 1000°C (HA $\beta$  e HA $\beta$ -NbO) utilizando uma carga crescente de zero a 5N. Os valores de microdureza Vickers foram calculados por meio das curvas de carregamento e descarregamento, seguindo o modelo proposto por Oliver-Pharr (Oliver e Pharr, 1992).

Esta técnica fornece informação sobre a resistência superficial do material à deformação plástica localizada, devido à penetração de uma ponta, ou indentador. Nessa técnica, utiliza-se um penetrador de diamante, piramidal, que deixa uma marca na forma de um losango na amostra. A força aplicada na direção da amostra faz com que haja uma impressão na mesma. Quanto mais resistente for o material, menor será a penetração e, conseqüentemente, menor a marca deixada na amostra.

#### *Análise por difração de raios X (DRX)*

As fases cristalinas presentes nos pós precursores e nas pastilhas foram observadas por difração de raios X. As medidas foram conduzidas utilizando um difratômetro (Shimadzu® XRD-7000, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) com radiação CuK $\alpha$ . Os difratogramas foram obtidos no intervalo (2 $\theta$ ) de 10 a 80° com velocidade de 2°/min. A identificação das fases foi realizada utilizando um banco de dados do comitê internacional *Joint Committee of Powder Diffraction Standards* (JCPDS), no qual podem ser



encontrados os registros (fichas) dos padrões de difração que podem ser comparadas aos resultados experimentais por meio do programa *X'Pert HighScore*.

Para a análise quantitativa das fases cristalinas foi realizado um refinamento estrutural pelo método de Rietveld (Young, 1995), que é empregado na caracterização de materiais estudados por difração de raios X. Com esse método é possível fazer um ajuste dos parâmetros da estrutura cristalina dos materiais medidos por difração de raios X. Desta forma, é possível obter informações estruturais da amostra como posições atômicas, parâmetro de rede, proporção entre as fases cristalinas, entre outros. Esses parâmetros são ajustados minimizando a diferença entre as intensidades calculada e experimental dos picos obtidos no difratograma.

Matematicamente, o método dos mínimos quadrados minimiza a quantidade:

$$S = \sum_{i=1}^n w_i (I_{\text{exp}} - I_{\text{calc}})^2$$

Sendo,

$I_{\text{exp}}$  : intensidade experimental;

$I_{\text{calc}}$  : intensidade calculada;

$w_i$  :  $1/I_{\text{obs}}$ , ou seja,  $w_i$  é o “peso” para cada ponto medido, conhecido também como o inverso da variância.

Um bom refinamento deve ser feito analisando principalmente a concordância gráfica entre os valores experimentais e calculados e indicadores matemáticos que avaliam a qualidade do refinamento.

Neste trabalho, a fração de volume (%) das fases HA e  $\beta$ -TCP das pastilhas de HA/ $\beta$  e das fases  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$ ,  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$  e  $\beta$ -TCP das pastilhas do compósito, foi determinada mediante o refinamento Rietveld utilizando-se o programa *FullProf*.

### *Procedimento experimental em animais*

Foram utilizados ratos Wistar machos (*Rattus norvegicus*, variedade *albinus*), adultos, com 90 dias de idade, com peso corporal entre 250 e 300 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá. Todos os procedimentos envolvendo o uso de animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em experimentação Animal da Universidade Estadual de Maringá (Parecer no 079/2010).

Os animais foram anestesiados por via intramuscular com uma associação 1:1 de 0,1ml/100g de cloridrato de cetamina 10% (Ketamina<sup>®</sup>, Agener União, Brasília, Brasil) e 0,1ml/100g de cloridrato de xilazina 2% (Rompum<sup>®</sup>, Bayer AG, Leverkusen, Alemanha). Após tricotomia da região da cabeça e antissepsia com iodo tópico foi realizada incisão transversal da pele até o periósteo, na região da calota craniana. Os tecidos moles foram afastados até a visualização da área a ser removida.

Na calvária de cada animal foi produzido um defeito ósseo com 8 mm de diâmetro (tamanho crítico) (Schmitz e Hollinger, 1986), utilizando-se uma broca do tipo trefina (Neodent<sup>®</sup>, Curitiba, Brasil) montada em peça-reta (Kavo<sup>®</sup>, Joinville, Brasil) acoplada a um motor elétrico cirúrgico (Branemarck System<sup>®</sup>, Nobel Biocare, Zurique, Suíça) sob rotação de 1500 r.p.m. com abundante irrigação com soro fisiológico estéril.

Os animais foram divididos em dois grupos: (1) grupo HA $\beta$ , controle, no qual os defeitos na calvária foram preenchidos com a pastilha de hidroxiapatita e (2) grupo HA $\beta$ -NbO, teste, no qual os defeitos foram preenchidos com uma pastilha de compósito (Figura 1).

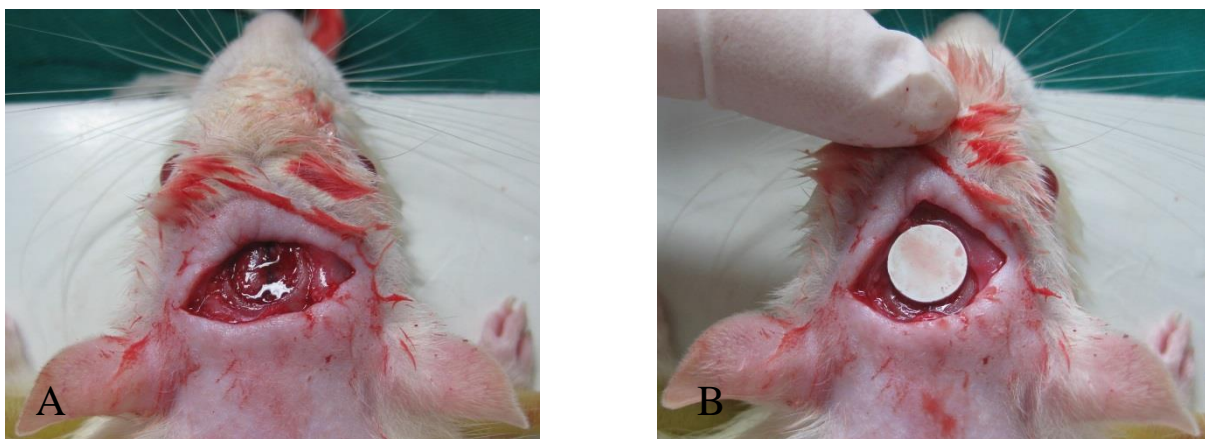


Figura 1: Calvária de rato Wistar após a confecção de defeito de tamanho crítico (8 mm). Em (A) defeito sem a pastilha e em (B) a pastilha de biomaterial posicionada sobre o defeito.

Após a colocação das pastilhas o retalho foi suturado com pontos descontínuos de Mononylon 4-0 (Ethicon<sup>®</sup>, Johnson & Johnson, New Brunswick, EUA) e a região recebeu aplicação tópica da solução alcoólica de polivinilpirrolidona iodada, como medida antisséptica local.

Os animais foram observados no período inicial da recuperação anestésica e em seguida mantidos em gaiolas individuais em condições ambientais apropriadas, ciclo claro/escuro de 12/12 horas e temperatura de 20°C, com ração e água ad libitum. Antes de sua morte foi realizada a avaliação clínica, observando-se a ocorrência ou não de edema e eritema.

Após os períodos de 7, 15, 30, 45 e 60 dias (n=7 animais/período/grupo), os animais foram mortos por meio da injeção do triplo da dose anestésica da mistura 1:1 de cloridrato de cetamina e cloridrato de xilazina. As amostras da calota craniana foram coletadas e processadas para estudo microscópico em microscópio de luz e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

### *Estudo microscópico*

#### *Microscopia de luz*

Amostras da calvária (n=5 animais/período/grupo) contendo os defeitos com as pastilhas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 24 horas e descalcificadas em solução de Morse (ácido fórmico 50% e citrato de sódio 20%) por 8 dias. As amostras foram divididas em duas partes iguais que foram processadas para inclusão em parafina.

A partir do centro da amostra foram feitos cortes transversais, seriados, de 7 µm. A seqüência dos cortes foi montada em cinco lâminas diferentes, de modo que em cada lâmina obteve-se uma seqüência semi-seriada. As lâminas um e três foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E) e as lâminas dois e quatro com Azan.

A análise das lâminas foi realizada em microscópio óptico Nikon<sup>®</sup> (Eclipse 80i, Shimjuku, Japão) acoplado com câmera de alta resolução Nikon<sup>®</sup> (DS-Fi1c, Shimjuku, Japão).

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

Para o estudo em MEV foram utilizadas as amostras íntegras (preparados totais) e cortes histológicos previamente utilizados para estudo em microscópio óptico.

Amostras da calvária (n=2 animais/período) contendo os defeitos com as pastilhas foram fixadas em paraformaldeído 4% por 24 horas e mantidas em álcool 70%. Os tecidos moles e as pastilhas foram cuidadosamente removidos do defeito. Previamente à preparação para a MEV, os preparados totais dos períodos de 15, 45 e 60 dias foram fotografados para a obtenção de imagens das margens do defeito em microscópio óptico Nikon® (Eclipse 80i, Shimjuku, Japão) acoplada com câmera de alta resolução Nikon® (DS-Fi1c, Shimjuku, Japão), a fim de verificar as margens dos defeitos.

Algumas lâminas coradas com H&E foram desmontadas (remoção da lamínula) e metalizadas para estudo em MEV para verificar em detalhes estruturas ou áreas observadas no limite de resolução da microscopia óptica.

As amostras foram fixadas com uma fita dupla face em suporte metálico e recobertas com filme condutor de ouro pelo processo de Sputtering em um metalizador (Shimadzu® IC-50 Ion Coater, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) para aumentar a condutividade do material.

Foram avaliadas amostras de pastilhas de HA $\beta$  e do compósito HA $\beta$ -NbO, sem uso e de pastilhas pós-implante. Também foram avaliados os preparados totais, com e sem pastilha.

Foi utilizado microscópio eletrônico de varredura (Shimadzu® SSX550, Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Conjuntamente foi realizado o mapeamento de algumas áreas por espectroscopia de raios x por dispersão de energia (EDS) para avaliar sua composição química. Todas as imagens foram obtidas com a aceleração de feixe de 15 kV em diferentes ampliações e capturadas digitalmente utilizando-se o programa *Superscan* SS-550 do microscópio.

## Resultados

### *Caracterização estrutural das pastilhas de HA $\beta$ e HA $\beta$ -NbO por MEV e por DRX*

As pastilhas de hidroxiapatita apresentaram partículas de formato arredondado e com variação dimensional. O tamanho dos poros variou de 0,3 $\mu$ m a 1,6  $\mu$ m no seu maior eixo (Figura 2A).

As partículas do compósito formadas após o processo de sinterização apresentaram um formato de bastão e poros irregulares, cujo maior eixo variou entre 1 e 2,5  $\mu$ m (Figura 2B).

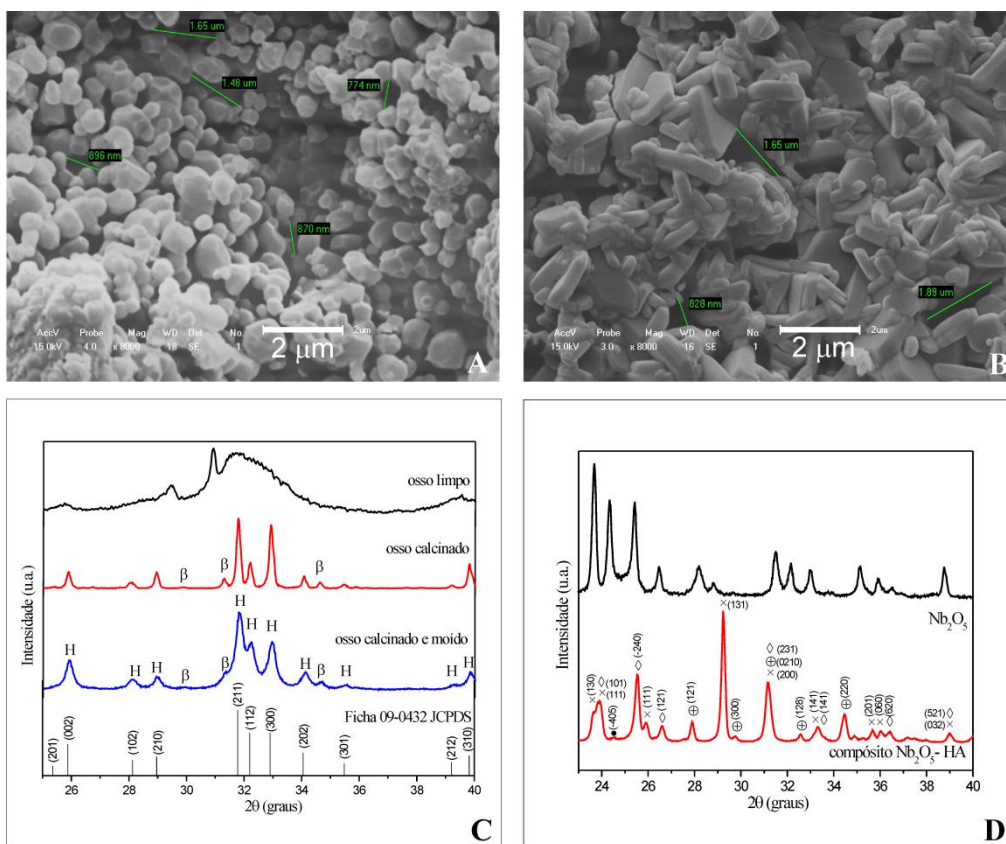


Figura 2: Eletromicrografia das pastilhas de hidroxiapatita (A) e do compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio (B) mostrando o formato das partículas e o tamanho aproximado dos poros. Em (C e D) os difratogramas dos materiais precursores e das pastilhas de hidroxiapatita e do compósito, respectivamente.

Na figura 2C estão apresentados os difratogramas de raios-X das amostras de ossos após as etapas de limpeza, calcinação e moagem. Na parte baixa da figura é possível observar o padrão de difração correspondente à ficha padrão 09-0432-JCPDS da hidroxiapatita. O osso limpo apresenta um difratograma com uma fase predominantemente amorfa. Foram

observados picos de difração na região de fosfatos de cálcio presentes nos tecidos ósseos:  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (hidroxiapatita - HA),  $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$  ( $\beta$ -pirofosfato de cálcio) e  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ( $\beta$ -tricalcário fosfato –  $\beta$ -TCP), correspondentes às fichas padrão 09-0432-JCPDS, 09-0346-JCPDS e 09-0169-JCPDS, respectivamente. No difratograma da amostra calcinada foram identificadas as fases cristalinas da HA e do  $\beta$ -TCP, correspondentes às fichas 09-0432-JCPDS e 09-0169-JCPDS, respectivamente.

A figura 2D mostra o difratograma de raios-X do  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  utilizado na produção das pastilhas. As reflexões na parte baixa da figura são referentes à ficha padrão 37-1468-JCPDS. A identificação da fase foi realizada por comparação com a ficha. Desta maneira, observa-se que o material é bastante cristalino e monofásico, ou seja, são observados apenas picos do  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , referente à estrutura monoclinica de grupo espacial  $P2/m$ . Também estão representadas nesta figura as fases identificadas após a sinterização, que mostram que o processo produziu a decomposição da  $\text{HA}\beta$ . As reações químicas que ocorreram no processo de sinterização produziram também três novas fases que foram indentificadas: (X) óxido de cálcio nióbio  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$  (Fersmita), ( $\diamond$ ) óxido de fósforo nióbio  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$  e (+)  $\beta$ -trifosfato de cálcio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , que correspondem às fichas padrão 39-1392-JCPDS, 81-1304-JCPDS e 09-0169-JCPDS, respectivamente. Além destas fases majoritárias, foi observada uma pequena reflexão, relacionada à fase do precursor ( $\bullet$ )  $\text{Nb}_2\text{O}_5$ , conforme ficha 37-1468-JCPDS.

#### *Microdureza Vickers*

O valor de microdureza Vickers obtido para a amostra controle foi de  $0,47 \pm 0,1$  GPa enquanto que para a amostra do compósito  $\text{HA}\beta$ -NbO foi de  $0,78 \pm 0,2$  GPa, ou seja, houve um aumento relativo de 66% nessa propriedade.

#### *Análise quantitativa de fases - Método Rietveld*

Nas figuras 3A e B são apresentados os perfis experimentais e calculados e suas diferenças (erro) para as pastilhas de  $\text{HA}\beta$  e HA-NbO, respectivamente.

A concordância entre os perfis calculado e experimental permitiu determinar a fração de volume (%) das fases cristalinas das pastilhas de  $\text{HA}\beta$  e HA-NbO.

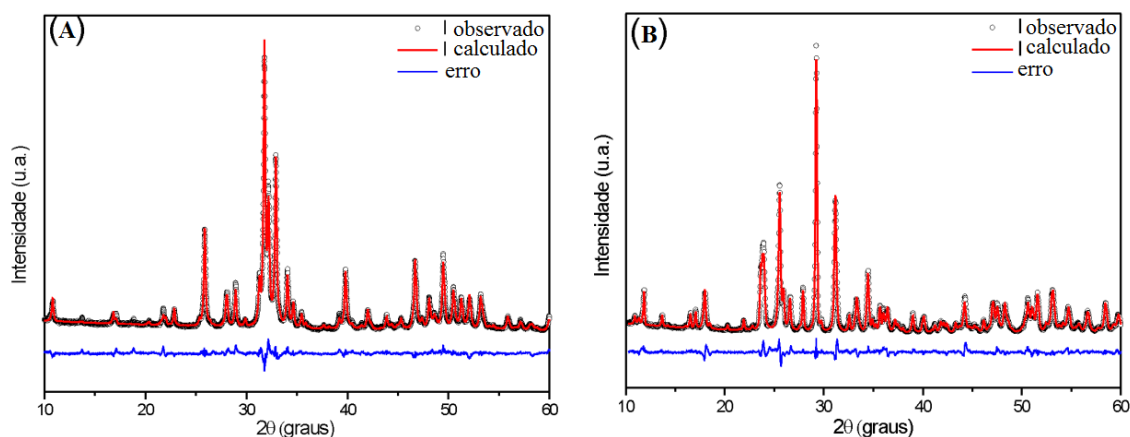


Figura 3: Perfis experimentais e calculados das fases cristalinas e suas diferenças (erro) das pastilhas de (A) hidroxiapatita e (B) do compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio. Os padrões foram obtidos a partir do refinamento dos difratogramas das pastilhas após o processo de sinterização.

Após a sinterização, a pastilha de HA $\beta$  apresentou 87,61% de HA e 12,39% de  $\beta$ -TCP. Na pastilha do compósito ocorreu a formação de três fases cristalinas: CaNb<sub>2</sub>O<sub>6</sub> (35,36%), PNb<sub>9</sub>O<sub>25</sub> (17,21%) e  $\beta$ -TCP (47,43%).

#### *Avaliação clínica e post-mortem dos animais*

Os ratos foram observados durante o período pós-operatório até a recuperação da anestesia, e acompanhados diariamente até o dia da morte. Nos primeiros dias houve formação de edema que desapareceu após a cerca de 72 horas. Não houve sinal visível de inflamação na linha de sutura e a cicatrização ocorreu normalmente.

Após a morte dos animais, nos defeitos preenchidos com o compósito, os tecidos adjacentes à pastilha apresentaram-se hiperêmicos, especialmente aos 60 dias. Tais amostras apresentaram importante crescimento ósseo.

### *Crescimento ósseo nos defeitos de tamanho crítico*

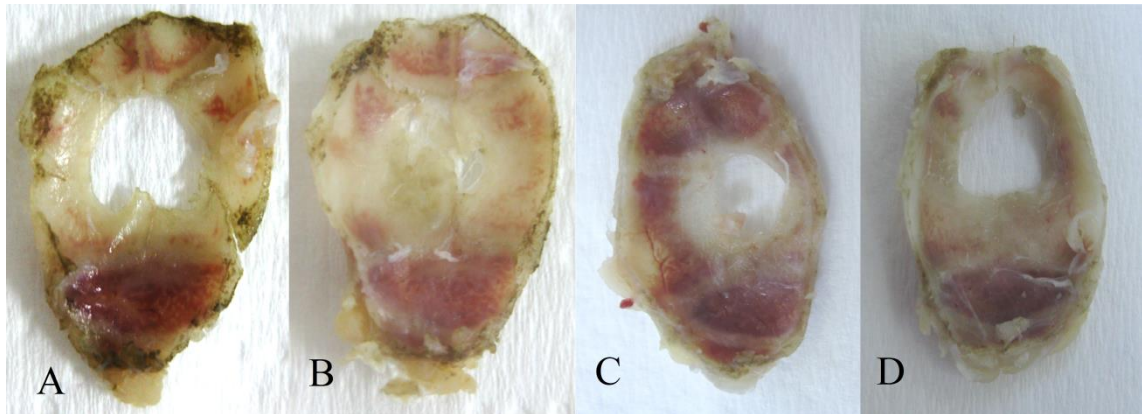


Figura 4: Fotografia da face dural da calvária de ratos Wistar com defeito crítico, 45 (A/B) e 60 (C/D) dias após o implante das pastilhas de hidroxiapatita ( $HA\beta$ ) (A/C) e do compósito  $HA\beta-NbO$  (B/D).

A observação da margem óssea dos preparados totais dos defeitos, após a remoção das pastilhas, mostrou que o crescimento ósseo ao longo da circunferência dos defeitos foi variável, entretanto, o período de 60 dias não foi suficiente para que houvesse a regeneração total do defeito em nenhum dos animais. As bordas mais desenvolvidas foram observadas aos 45 e 60 dias quando, em algumas amostras, quase todo o espaço havia sido preenchido por osso neoformado (Figura 4). Nesses períodos de observação, vários animais que tiveram os defeitos preenchidos com o compósito apresentaram no periósteo um tecido hemático.

### *Estudo histológico - Microscopia de luz*

A avaliação histológica demonstrou que as pastilhas do compósito se mantiveram mais bem encaixadas nos defeitos do que as de  $HA\beta$ . Em ambos os grupos desenvolveu-se um tecido conjuntivo frouxo bastante celularizado e vascularizado na área próxima à margem do defeito e das bordas das pastilhas. Exceto pela maior frequência de fibras colágenas nos vértices, não houve nenhum caso de encapsulamento. O crescimento ósseo a partir das margens foi progressivo, ao longo do tempo, nos grupos teste e controle. Foram observadas células multinucleadas em todos os períodos, entretanto não foi possível diferenciar, na microscopia de luz, osteoclastos de macrófagos. Não houve formação de infiltrado inflamatório polimorfonuclear em nenhum dos animais.



Aos 7 dias (Figura 5), nas margens dos defeitos preenchidos com HA $\beta$ -NbO e com HA $\beta$  houve uma pequena formação de tecido ósseo além dos limites do defeito, entretanto, nas superfícies dorsal e ventral da tábua óssea remanescente houve crescimento aposicional. Em contato direto com as pastilhas constatou-se a presença de vasos sanguíneos e de células osteogênicas na superfície dos biomateriais. Nos defeitos preenchidos com o compósito, foi observado um leve edema no perióstio da face dorsal.

Aos 15 dias de observação (Figuras 6 e 7), houve redução do edema e os reparos de ambos os grupos se assemelharam. Neste período houve formação óssea no centro do defeito, em pontos descontínuos com as margens. A estrutura mais compacta do compósito dificultou a passagem de luz transmitida pelo microscópio limitando a visualização de estruturas no interior da pastilha, mas foi possível identificar diretamente sobre a pastilha a deposição de uma camada acelular de matriz, semelhante à linha de cimento, e a presença de células osteogênicas e vasos sanguíneos percorrendo a superfície do biomaterial. Nos reparos preenchidos com HA $\beta$  as mesmas características foram observadas, acrescidas da presença de vasos e células também no interior da pastilha. Também houve formação aposicional de matriz diretamente sobre a pastilha e um importante crescimento da margem óssea, em ambos os grupos. Pela técnica de Azan, as fibras colágenas mais antigas apresentaram coloração vermelha, enquanto as mais novas, coloração azul.

Aos 30 dias (Figura 8), na superfície dos biomateriais, foram vistos diferentes aspectos do reparo: vasos sanguíneos acompanhados de células osteogênicas, linhas de cimento, células multinucleadas e deposição de fina camada de matriz óssea com osteoblastos na superfície. Nos defeitos preenchidos com a hidroxiapatita, a integração entre o biomaterial, as células osteogênicas, vasos e a matriz recém sintetizada foi mais facilmente visualizada do que naqueles preenchidos com o compósito.

Aos 45 dias (Figura 9) os reparos de ambos os grupos também apresentaram semelhanças, exceto pelo fato de que as pastilhas do compósito apresentaram-se bem encaixadas nos defeitos. De modo geral, os defeitos apresentaram-se quase completamente fechados por osso neoformado, proveniente das margens, e por centros de ossificação intramembranosa, isolados das margens, que formavam nucleações de tamanhos variados. A interação biomaterial-osso foi evidente.

No período de 60 dias (Figura 10), apesar da microporosidade do material, foram observados vasos sanguíneos inseridos na periferia das pastilhas do compósito, que também apresentaram o tecido conjuntivo envolvente hemático, além de macrófagos contendo fragmentos de material em seu interior. Uma fina camada de osso recobria quase toda a superfície dos implantes de ambos os grupos. Nas pastilhas de hidroxiapatita, a entrada de vasos pelos poros do material foi observada desde o 15º dia. Neste período, também haviam células e matriz depositada.

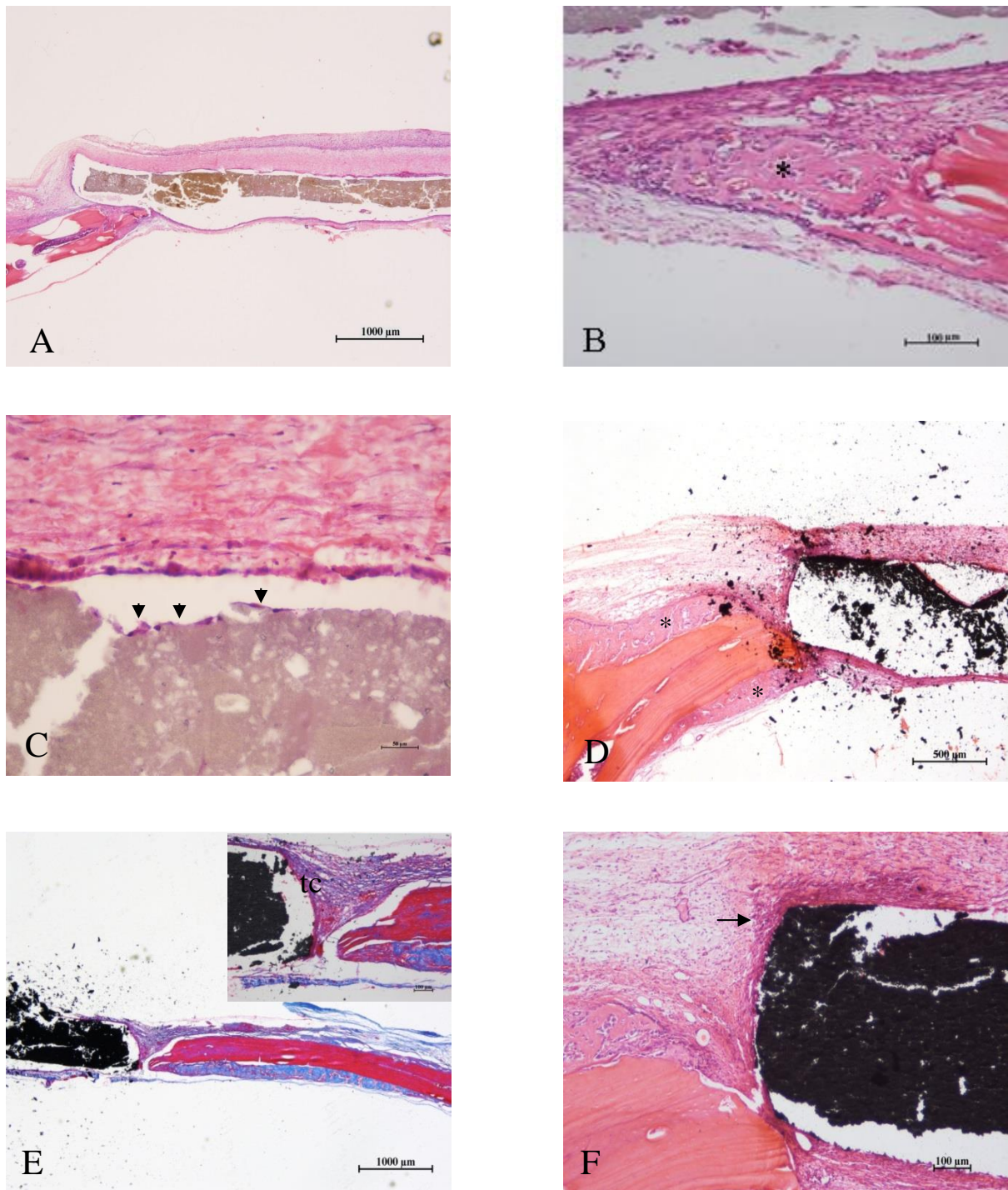


Figura 5. Fotomicrografia do defeito ósseo produzido na calvária de ratos sete dias após o preenchimento do espaço com uma pastilha composta por hidroxiapatita (A-C) ou pelo compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio (D-F). (A) Vista panorâmica da pastilha ocupando o espaço do defeito; (B) asterisco indicando crescimento ósseo a partir das margens do defeito; (C) presença de células (osteogênicas) do periósteo em íntima justaposição à pastilha (cabeças de seta); (D e E) Defeito preenchido pelo compósito onde se nota que a pastilha ficou bem posicionada e onde se observa crescimento ósseo aposicional na superfície do osso antigo (\*); detalhe em (E) mostra tecido conjuntivo (tc) preenchendo o espaço entre o compósito e a margem óssea; (F) pastilha bem posicionada envolvida por tecido conjuntivo. Nos vértices observa-se a formação de um tecido mais fibroso (seta). Em (A-F) H&E, (E) Azan.

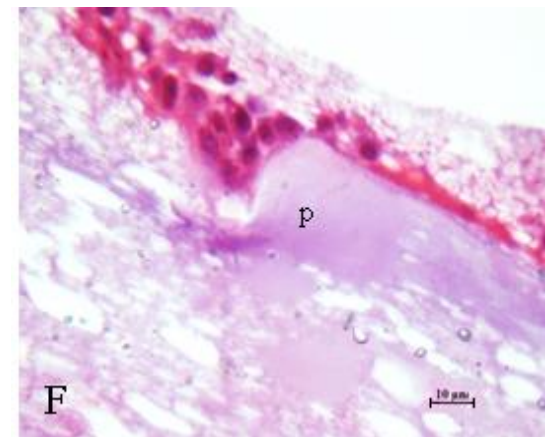
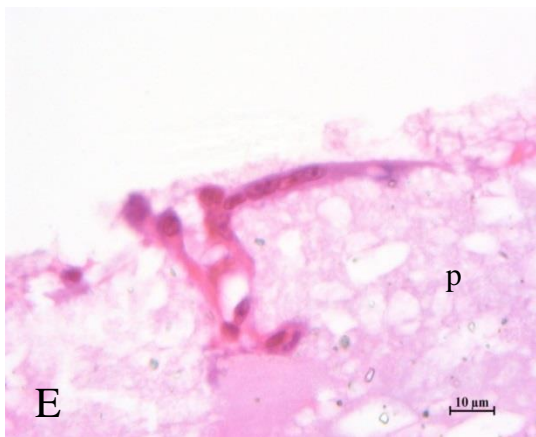
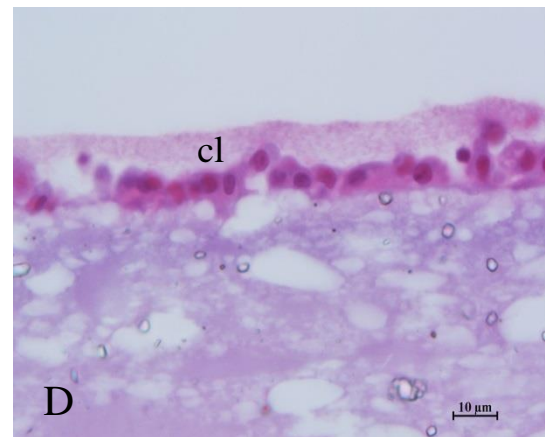
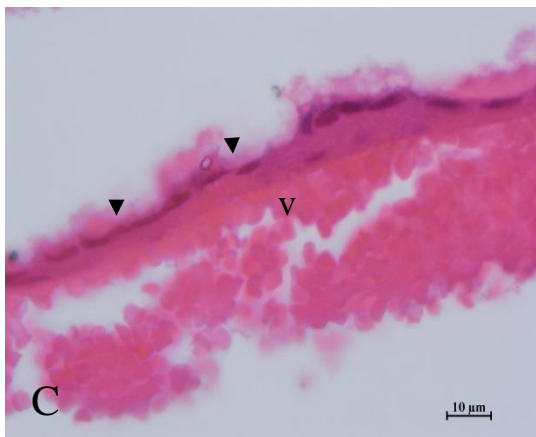
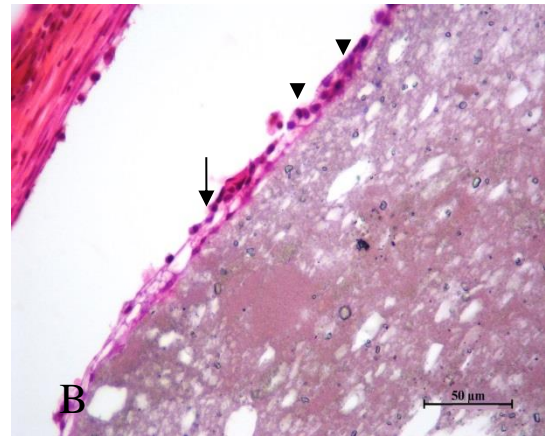
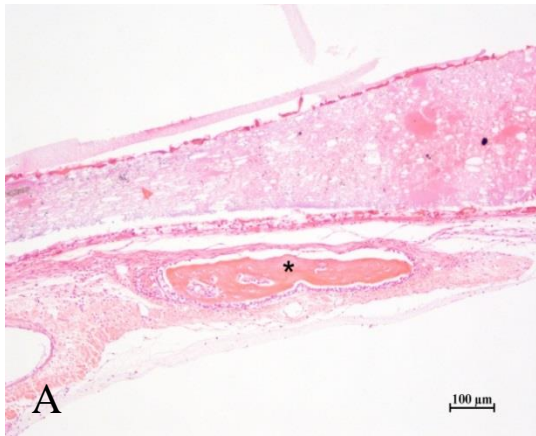


Figura 6. Fotomicrografia do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 15 dias após o preenchimento do espaço com uma pastilha composta por hidroxiapatita. (A) Neste período houve formação óssea intramembranosa (\*) em pontos distantes da margem do defeito; (B) Era comum a presença de um vaso sanguíneo (seta) acompanhado de células osteogênicas (cabeças de seta) localizados entre o periósteo e a superfície da pastilha; em (C) notar uma camada de osteoblastos (cabeças de seta) sobre um tabique ósseo localizado entre a pastilha e um grande vaso sanguíneo (v); em (D) observar a matriz acelular (linha de cimento) (cl) que repousa sobre uma camada de células localizados na superfície da hidroxiapatita. Observar a presença de vasos sanguíneos em (E) e células osteogênicas em (F) penetrando o interior da pastilha (p). H&E.



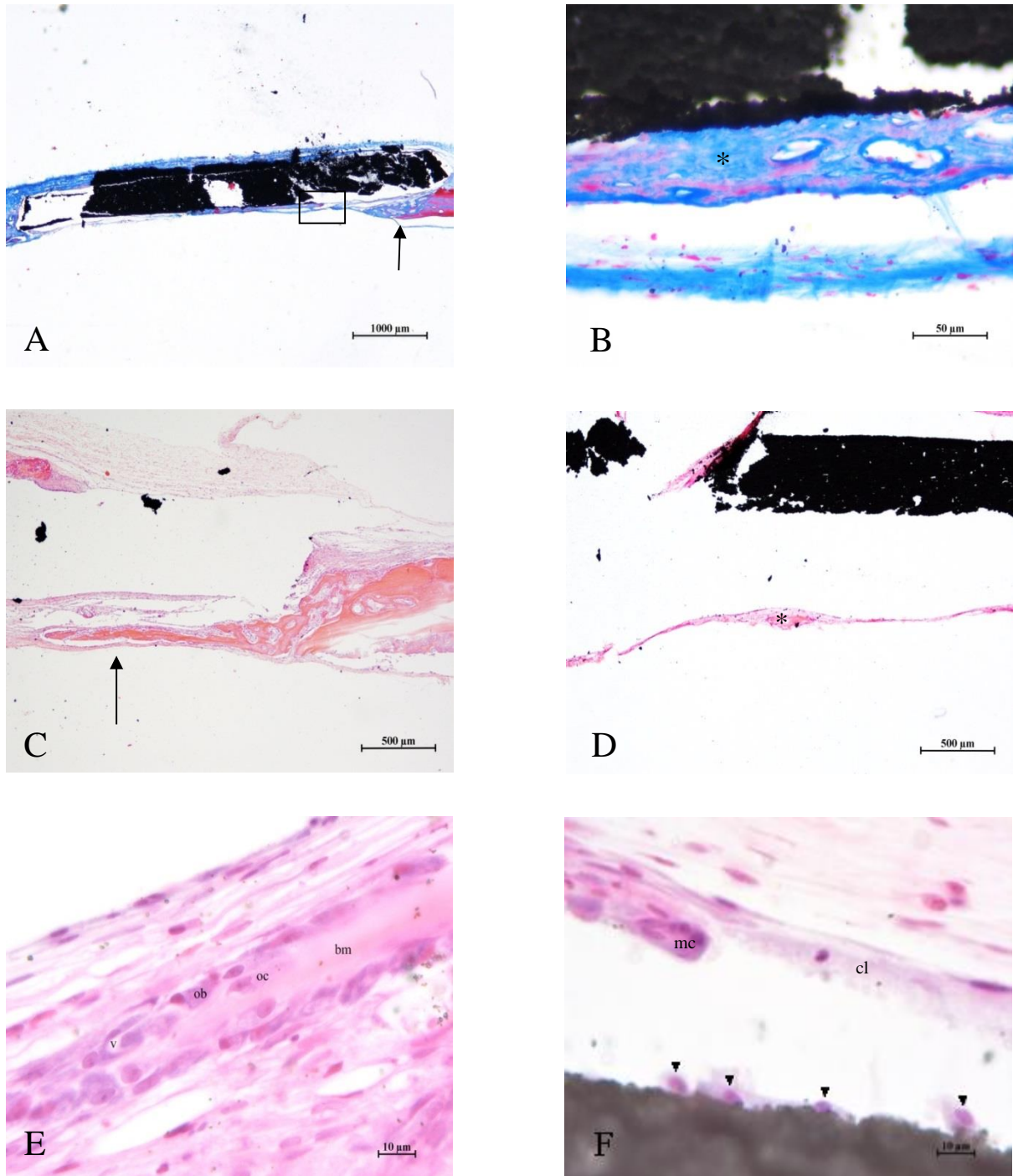


Figura 7. Fotomicrografia do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 15 dias após o preenchimento do espaço com o compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio. (A) Pequeno crescimento a partir da margem do defeito (seta). O detalhe da área demarcada está representado em (B) onde a matriz óssea, corada em azul (\*), aparece em contato direto com o compósito. Em (C) nota-se, neste animal, uma maior superfície de osso neoformado; (D) também houve formação óssea (\*) em pontos distantes da margem do defeito; (E) tabique ósseo envolvido por osteoblastos (ob). Observar os osteócitos (oc), a matriz óssea (bm) e a presença de vaso sanguíneo (v); Em (F) observar a ocorrência de células osteogênicas (setas) e células multinucleadas (mc) localizados na superfície do compósito. (cl) linha de cimento. (A e B) Azan; (C-F) H&E.

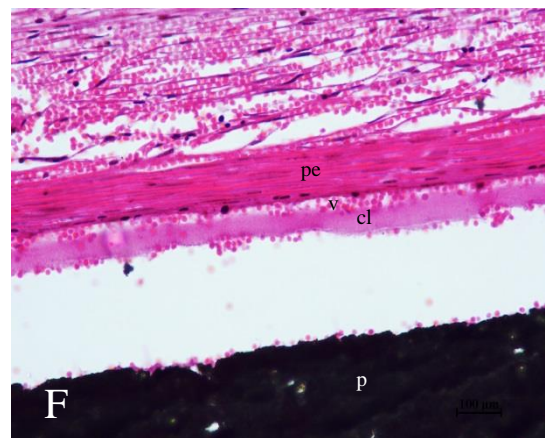
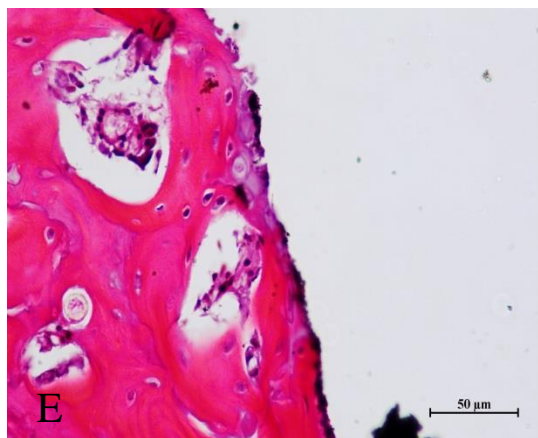
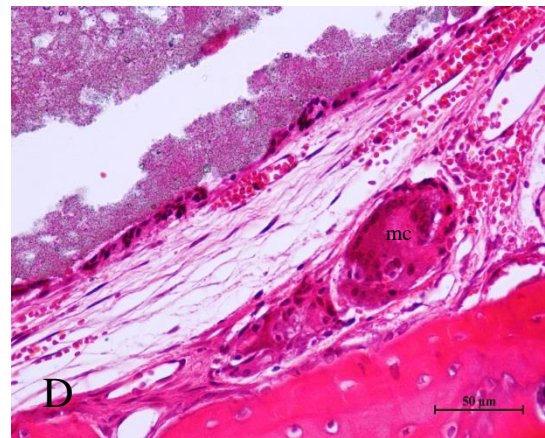
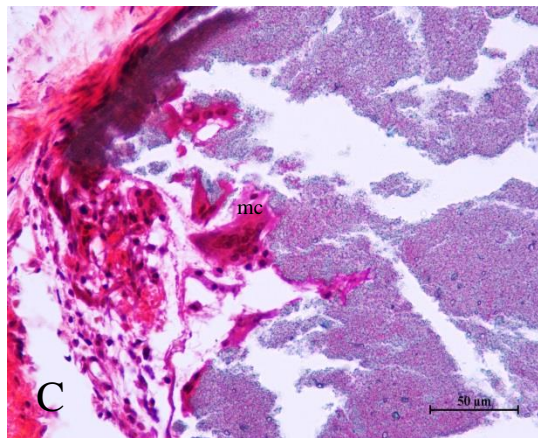
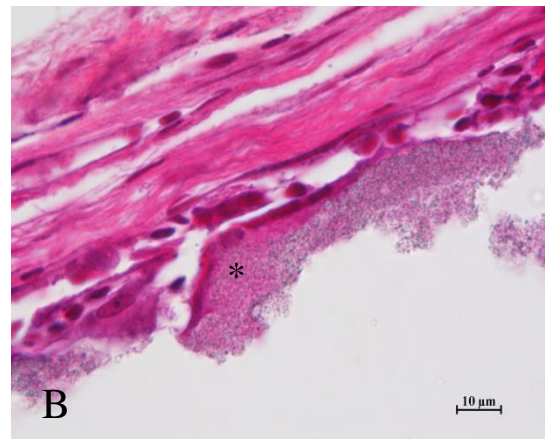
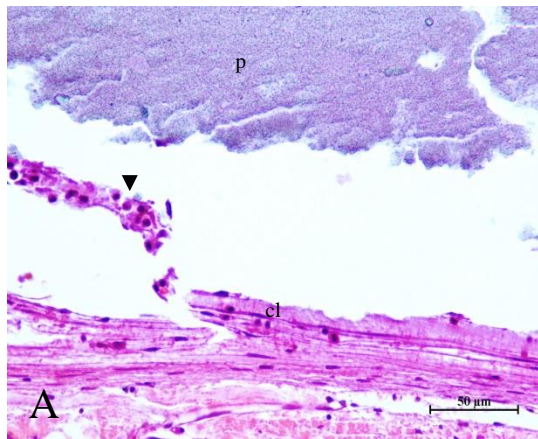


Figura 8: Fotomicrografia do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 30 dias após o preenchimento do espaço com uma pastilha composta por hidroxiapatita (A-D) e pelo compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio (E-F). Em (A) observar a presença da linha de cimento (cl), vasos sanguíneos e células osteogênicas (cabeça de seta) na superfície da pastilha (p); em (B), notar a deposição de matriz (\*) diretamente sobre o biomaterial; em (C) notar a reabsorção da hidroxiapatita por células multinucleadas (mc). Neste período (D), o periósteo apresentou-se hiperêmico e com um grande número de células multinucleadas (mc). Nos defeitos preenchidos com o compósito, notou-se o íntimo contato entre o osso e o compósito (E). Em (F), observar a grande quantidade de hemáceas localizadas na região mais superficial do periósteo (pe) e a disposição: periósteo, vaso sanguíneo (v), linha de cimento (cl), pastilha (p), frequentemente observada.



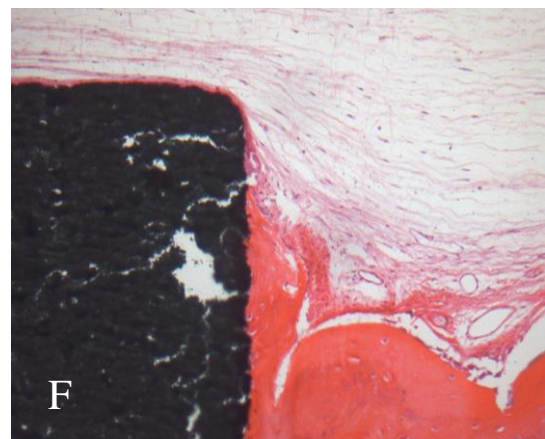
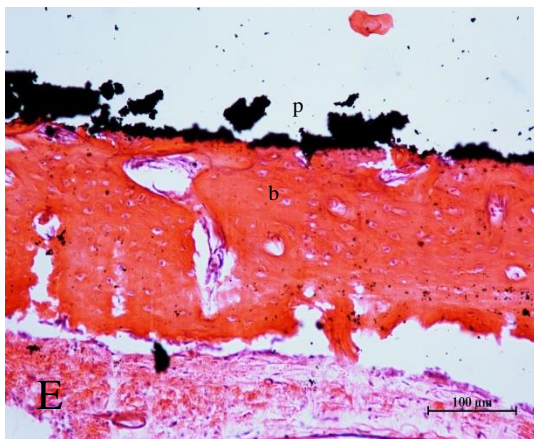
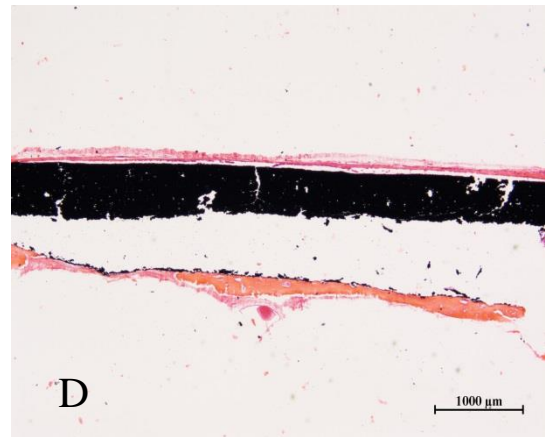
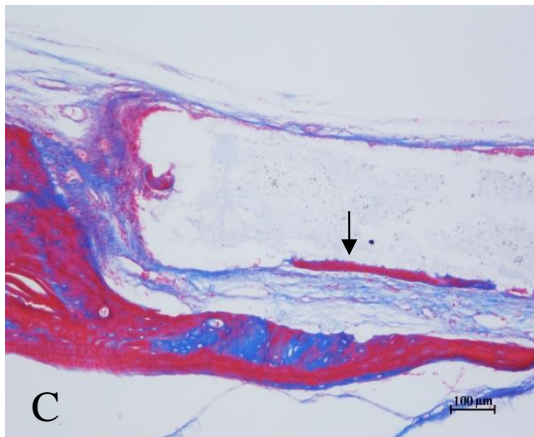
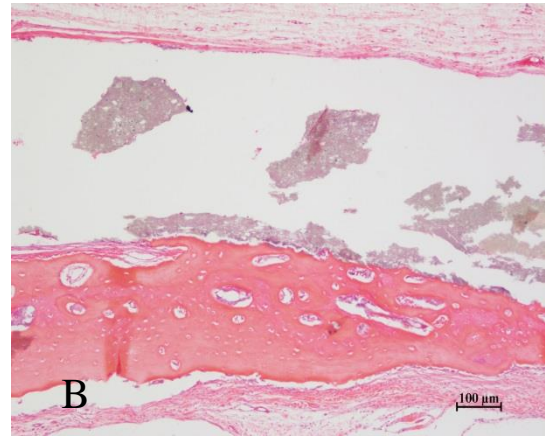
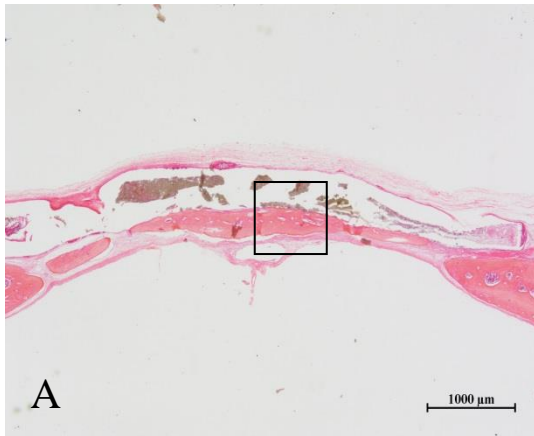


Figura 9: Fotomicrografia do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 45 dias após o preenchimento do espaço com uma pastilha composta por hidroxiapatita (A-C) e pelo compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio (D-F). Em (A), numa vista panorâmica, pode-se observar o defeito quase completamente preenchido por osso localizado sob o biomaterial. Em (B), um detalhe de (A) mostrando no osso neoformado área recoberta pelo perióstio e área em contato direto com a pastilha. Em (C) observar a deposição de matriz óssea diretamente sobre a superfície da pastilha (seta). Nos defeitos preenchidos com o compósito, (D) alguns defeitos apresentaram-se quase completamente fechados e observou-se (E) o contato direto do osso neoformado (b) com a pastilha (p) do compósito. Em (F) notar que a pastilha encontra-se bem encaixada no defeito. (A, B, D-F) H&E, (C) Azan.

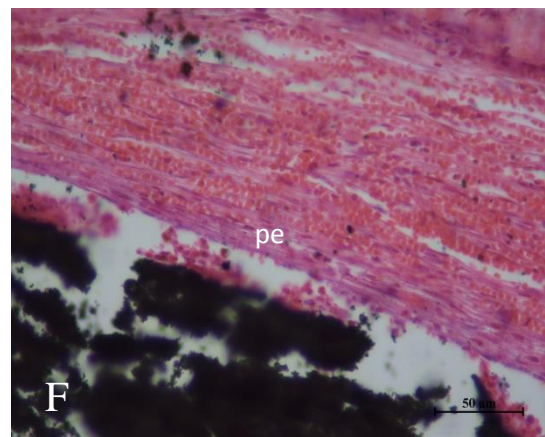
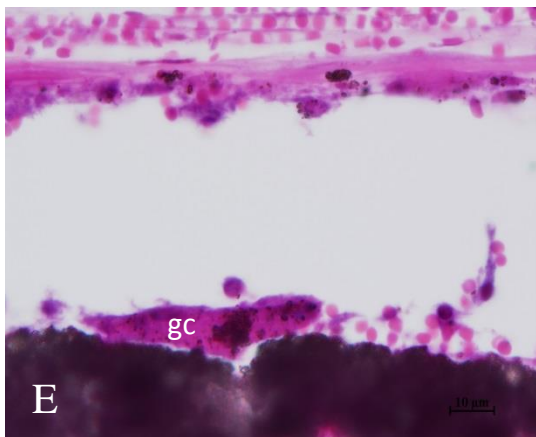
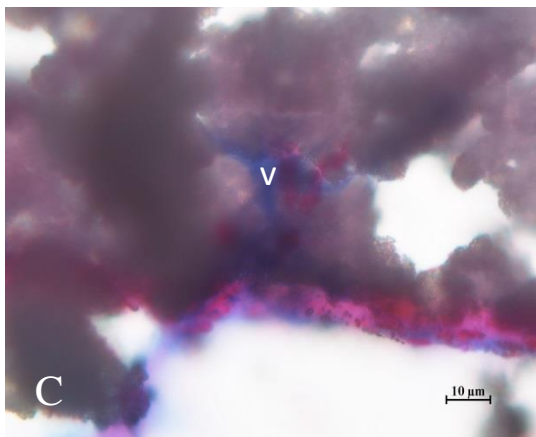
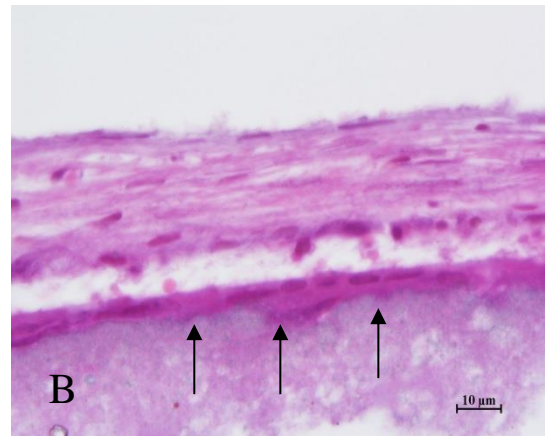
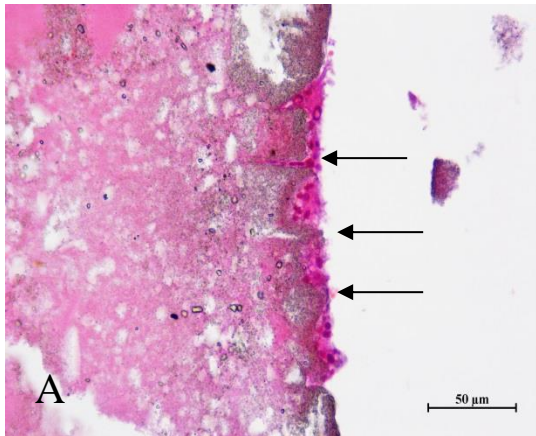


Figura 10: Fotomicrografia do defeito ósseo produzido na calvária de ratos 60 dias após o preenchimento do espaço com uma pastilha composta por hidroxiapatita (A e B) e pelo compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio (C-F). As setas indicam a presença de vasos sanguíneos, células e matriz no interior (A) e na superfície (B) da pastilha de hidroxiapatita. Os defeitos preenchidos com compósito apresentaram (C) vasos sanguíneos penetrando a pastilha (v), (D) a disposição periósteo (pe), vaso sanguíneo (v), matriz óssea (bm) e pastilha (p), (E) células gigantes multinucleadas (gc) com partículas de compósito em seu interior e (F) o periósteo (pe) hemático. (A, B, D-F) H&E, (C) Azan.



### *Análises das margens dos defeitos: interface osso-biomaterial*

Previamente à preparação e análises em MEV, os preparados totais dos defeitos foram observados em microscópio de luz, após a remoção das pastilhas. Aos 15 dias (Figura 11) nota-se uma margem com algumas áreas algumas circulares mais opacas (nucleações) e outras mais translúcidas em ambos os grupos. O mapeamento destas áreas por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) mostrou uma maior quantidade de cálcio do que outras regiões menos opacas. O formato dessas estruturas e suas superfícies indicam que este pode ser um ponto de contato entre o osso e o biomaterial. Estruturas como estas foram observadas também aos 30 e 45 dias. A análise semi-quantitativa composicional do EDS dos elementos químicos presentes nesta região, aos 15 dias, está representada na Figura 11D. Os principais picos obtidos nesse espectro indicam a presença dos elementos químicos: Carbono (C), Fósforo (P) e Oxigênio (O). O pico intenso na região de energia do ouro resulta da metalização realizada antes da análise de MEV.

As figuras 12, 13 e 14 representam as observações feitas em MEV aos 30, 45 e 60 dias de observação. Aos 30 e 45 dias as imagens mostram a presença de acrescências globulares, estruturas que representam uma das etapas da fase de mineralização óssea.

No período de 45 dias, além dos preparados totais, alguns cortes histológicos foram analisados ao MEV. Nos cortes foi possível observar a presença de matriz na interface osso-biomaterial. Aos 60 dias as superfícies das pastilhas de HA $\beta$  e do compósito encontravam-se quase completamente recobertas por matriz óssea. As análises em EDS confirmam a presença de C (carbono) nas áreas cobertas por matriz e o predomínio de Ca (cálcio) nas descobertas.

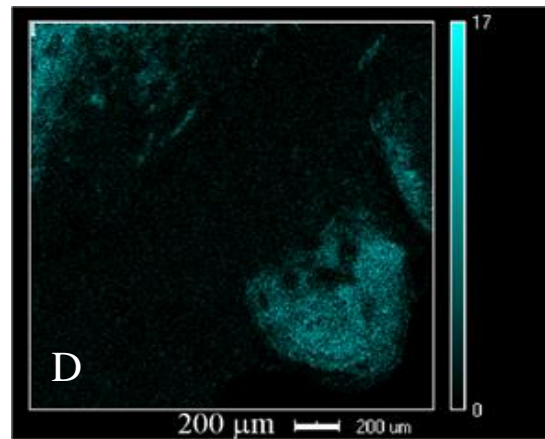
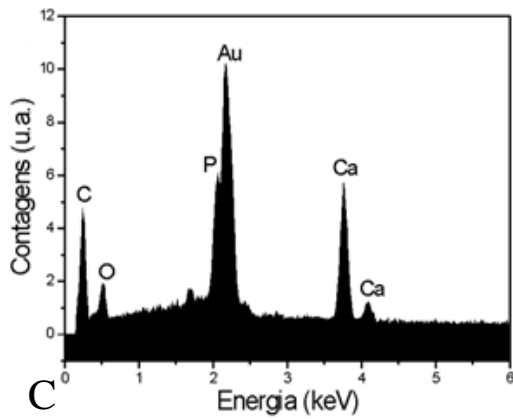
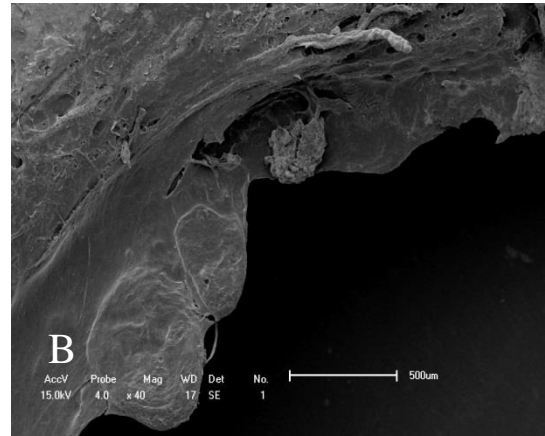
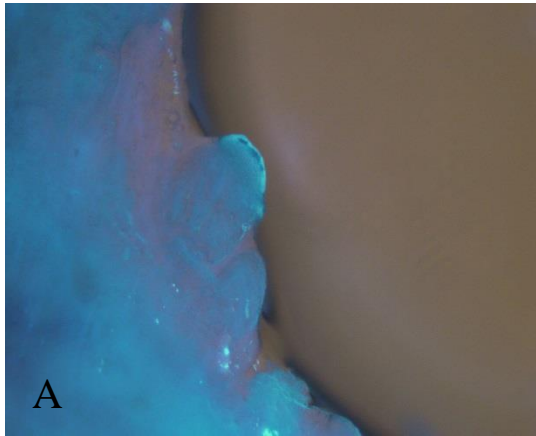


Figura 11: (A) Fotografia da borda de um preparado total de um defeito ósseo após a remoção da pastilha do composto hidroxiapatita-pentóxido de nióbio, na calvária de ratos Wistar, após 15 dias do implante. Notar a presença de três nucleações. Em (B), a mesma área vista em microscopia eletrônica de varredura. O resultado da análise desta área por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) pode ser visto em (C) e no mapeamento em (D).

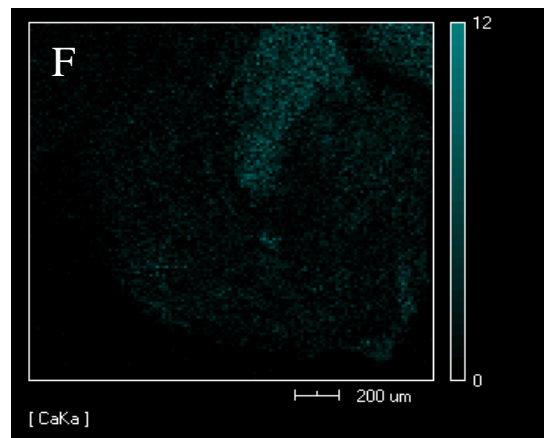
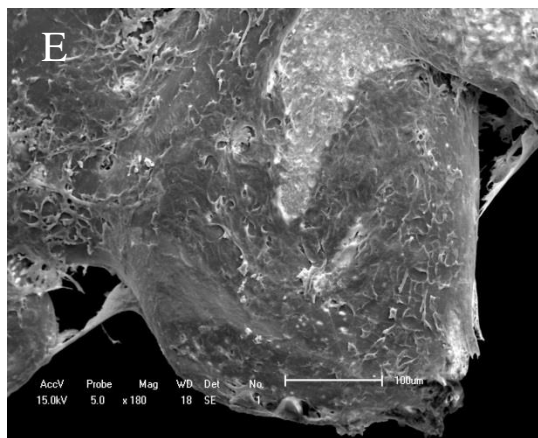
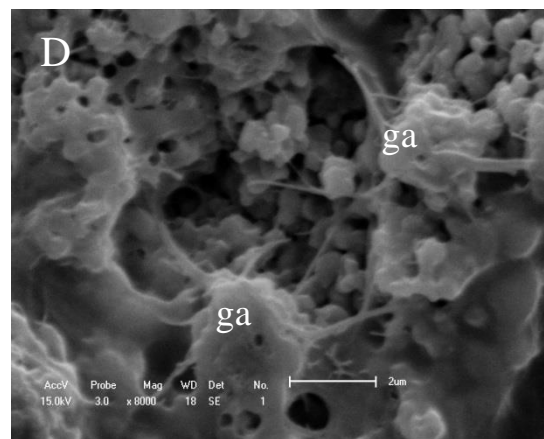
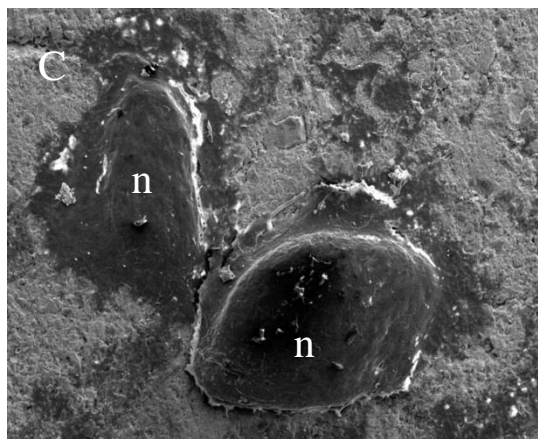
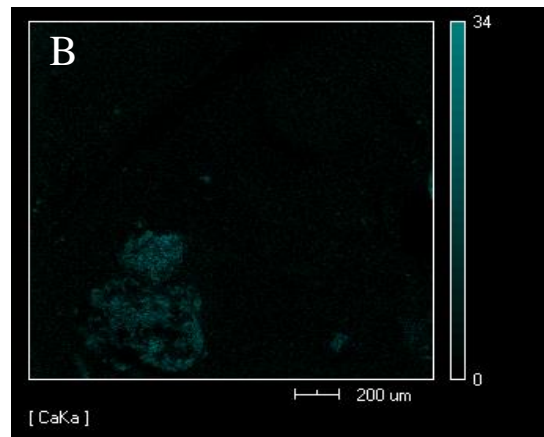
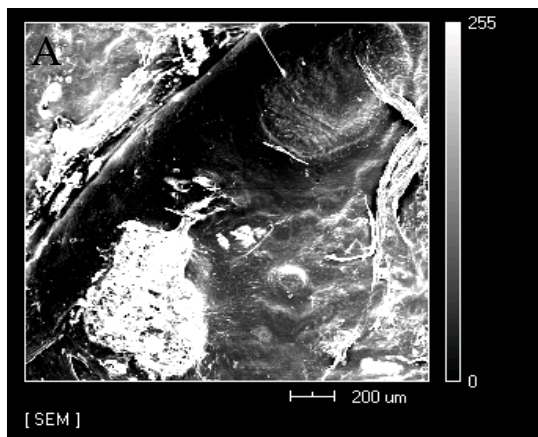


Figura 12: Eletromicrografia de varredura: margens de defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos Wistar 30 dias após serem preenchidos com uma pastilha de um (A) compósito hidroxiapatita pentóxido de nióbio, de (E) hidroxiapatita pura; em (B) e (F), as análises por espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) das áreas de (A) e (E), respectivamente. Em (B), observar o maior conteúdo de cálcio numa região onde a pastilha do compósito teve maior contato com a margem óssea; (C) pastilha de hidroxiapatita com nucleações (n). Observar a cobertura lisa sobre a superfície das nucleações; (D) acrescências globulares (ga) sobre a pastilha de hidroxiapatita.

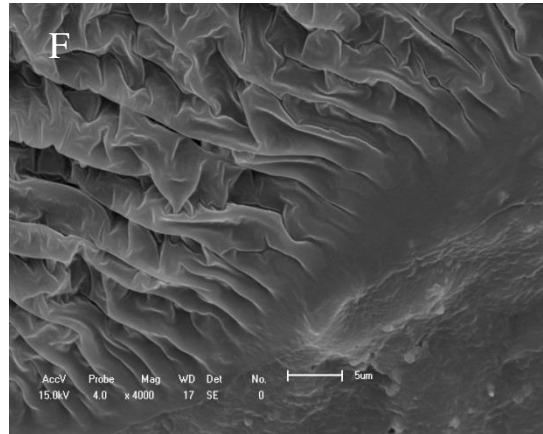
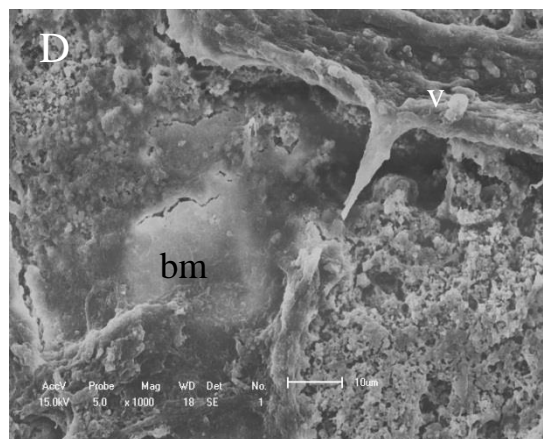
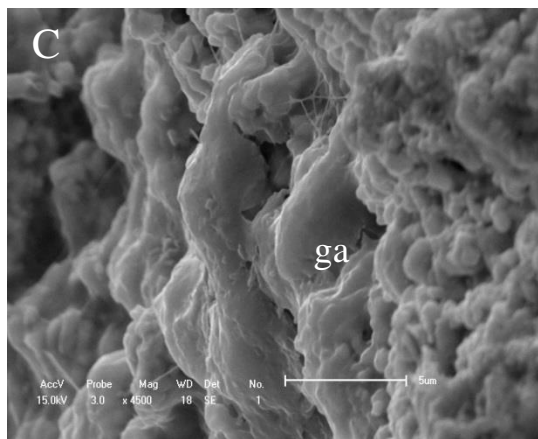
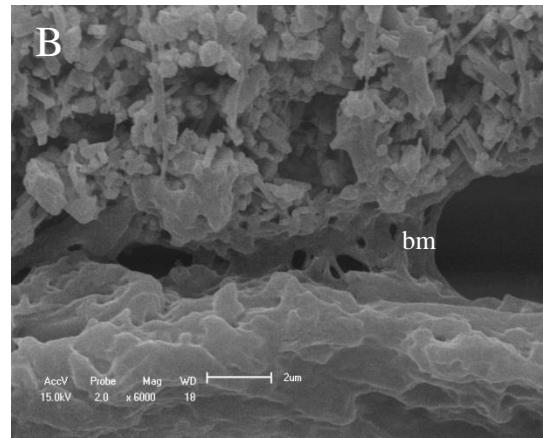
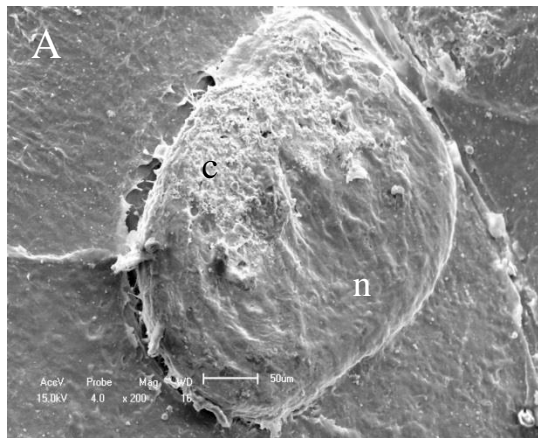


Figura 13: Eletromicrografia de varredura da margem de um preparado total (A), (C), (E) e (F) e de um corte histológico (B) e (D) da interface osso-biomaterial em defeitos de tamanho crítico 45 dias após o preenchimento com uma pastilha de hidroxiapatita ou do compósito hidroxiapatita-pentóxido de nióbio, na calvária de ratos Wistar. Em (A) uma nucleação (n) onde se observam resíduos do compósito (c); a observação detalhada desta área (C) mostra a presença de acrescências globulares (ga). Em (B) observar a presença de matriz óssea (bm) na interface osso-compósito. A imagem em (D) mostra a deposição de matriz óssea (bm) na superfície da pastilha de hidroxiapatita e a presença de um vaso sanguíneo (v). Em (E) um osteoclasto ativo na superfície do osso neoformado; em (F) detalhe da borda em escova.



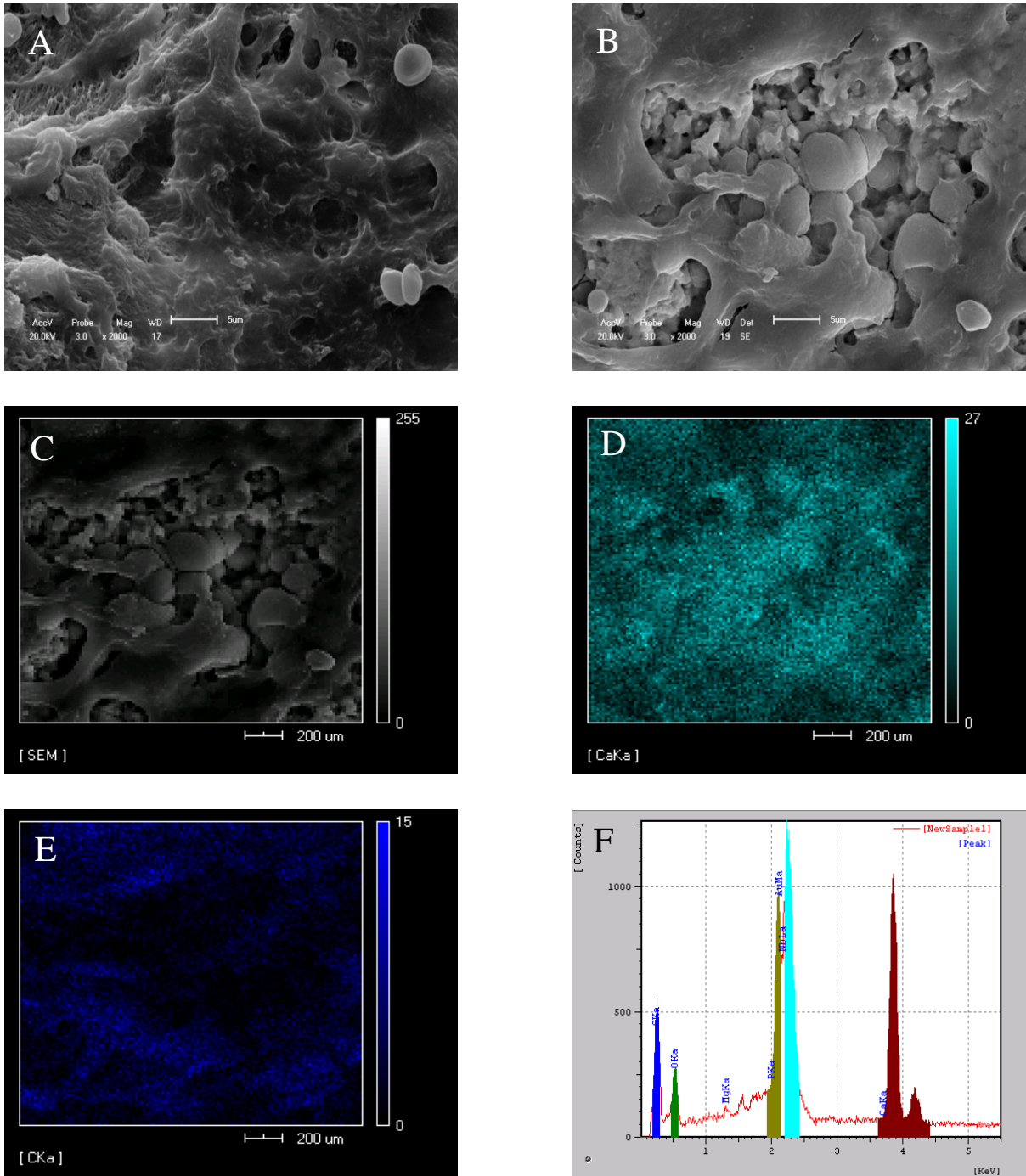


Figura 14: Eletromicrografia de varredura da superfície da pastilha de (A) hidroxiapatita e de (B) hidroxiapatita-pentóxido de nióbio 60 dias após a remoção das pastilhas dos defeitos. Notar a deposição de matriz óssea. Em (C), (D), (E) e (F), espectroscopia por dispersão de energia (EDS) do compósito. A figura (C) serve de referência para a localização dos depósitos de cálcio (Ca) e carbono (C) nas imagens (D) e (E), respectivamente. Em (F), o mapeamento dos elementos encontrados nesta região.

## Discussão

Com a finalidade de associar a resistência do nióbio e a biocompatibilidade da hidroxiapatita, foi desenvolvido um compósito elaborado pela mistura de hidroxiapatita ( $HA\beta$ ), extraída de ossos de *Pseudoplatystoma corruscans* (pintado) com o pentóxido de nióbio ( $Nb_2O_5$ ). Foram realizados estudos físico-químicos, para caracterizar a composição química e estrutural do compósito e estudos morfológico para avaliar a interação biomaterial-osso durante a regeneração óssea, em defeito de tamanho crítico produzido na calvária de ratos. Os resultados foram comparados àqueles obtidos em defeitos preenchidos com pastilhas de  $HA\beta$ .

A calvária pode ser definida como a porção do crânio que se estende do arco supra-orbital até a protuberância occipital externa, possuindo uma origem embrionária intramembranosa. Anatomicamente, a calvária de ratos apresenta duas camadas corticais paralelas separadas por um tecido esponjoso com uma média de espessura de 0,68mm variando de 0,3 a 1,2mm (Strong e Moulthrop, 2000).

Defeitos ósseos de tamanho crítico são definidos como o “menor defeito intra-ósseo, em determinada espécie animal, que não se regenera completamente e espontaneamente durante o seu ciclo de vida” (Schmitz e Hollinger, 1986). Tais defeitos não podem cicatrizar sem auxílio terapêutico ou de materiais que estimulem a regeneração óssea (Cameron *et al.*, 2013). Apesar de um período de 60 dias não ter sido suficiente para que ocorresse o selamento completo das cavidades preenchidas com o compósito, e tampouco daquelas preenchidas com a  $HA\beta$ , notou-se que quase todo o espaço estava ocupado por osso aos 45 e 60 dias, em ambos os grupos.

A associação da  $HA\beta$  com o  $Nb_2O_5$  nas proporções 1:1 resultou num produto bioativo, biocompatível e 66% mais resistente do que a  $HA\beta$  pura. Demirkol *et al.*, (2013) avaliaram a adição de 5 e 10 *wt%* de  $Nb_2O_5$  em hidroxiapatita sintética (comercial) e também em hidroxiapatita obtida via calcinação de ossos de ovelha e obtiveram aumento no valor da microdureza para todas as composições estudadas. Para uma sinterização a 1000°C, a adição de 5 e 10 *wt%* de  $Nb_2O_5$  na hidroxiapatita de ossos de ovelha, produziu um aumento relativo na dureza, de 6 e 81%, respectivamente, enquanto que, para a hidroxiapatita sintética o aumento foi de 45 e 73%, respectivamente. Estes resultados indicam que a adição de  $Nb_2O_5$  melhorou a propriedade mecânica de microdureza da hidroxiapatita e que diferentes

proporções de  $\text{Nb}_2\text{O}_5$  resultarão em valores distintos de microdureza. Desta forma, a proporção ideal deverá ser ajustada até que se consiga associar as propriedades mecânicas, químicas e biológicas desejadas (Nascimento *et al.*, 2011).

Neste estudo o difratograma dos ossos após o processo de limpeza apresentou uma fase predominantemente amorfa, característica de estruturas ósseas com material orgânico, como o colágeno (Sena, 2004). Após calcinação e moagem não houve a formação de novas fases cristalinas. Todavia o alargamento dos picos de difração indicou uma redução do tamanho do cristalito, pois este é inversamente proporcional à largura a meia altura do pico de difração (Suryanarayana, 2001).

Para testar esses materiais foram confeccionadas peças únicas (amostras em *bulk*), com formato de pastilha, com tamanho e forma ajustadas para encaixar nos defeitos. Como controle positivo foram utilizadas pastilhas de hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) pura, natural, obtidas de peixes, jovens, contendo  $\beta$ -tricálcio fosfato ( $\beta$ -TCP) ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) e elementos como  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{SO}^-$  (Lacerda, 2005), ausentes na maioria das hidroxiapatitas sintéticas, como a produzida pelo método sol-gel (Liu *et al.*, 2001; Qaisar *et al.*, 2010). A hidroxiapatita possui reconhecida biocompatibilidade, atividade osteocondutora (Gutierrez *et al.*, 2006; Velard *et al.*, 2013) e osteoindutora (Bhumiratana *et al.*, 2011). A biocompatibilidade, bioatividade e osteocondução da HA sintética foram constatadas na HA natural visto que nos defeitos controle não houve resposta inflamatória, os tecidos apresentaram-se muito celularizados e vascularizados. Em alguns defeitos houve formação intramembranosa de osso, na forma de nucleações isoladas das margens, a partir do 15º dia de observação. A pastilha controle apresentou picos de difração na região do fosfato de cálcio presentes nos tecidos ósseos: hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) e  $\beta$ -TCP. Sendo 12,39% de  $\beta$ -TCP e 87,61 de HA (Bonadio, 2011).

Os defeitos preenchidos com o compósito também apresentaram as mesmas características morfológicas observadas naqueles controles, com a ressalva de que na presença do compósito a resposta pareceu mais exacerbada. A análise do compósito por DRX revelou a formação de três novas fases após a sinterização: óxido de cálcio e nióbio, óxido de fósforo e nióbio e  $\beta$ -TCP. A proporção de  $\beta$ -TCP do compósito foi de cerca de 47,43%. O favorecimento da formação da fase  $\beta$ -TCP no compósito pode ter sido devido à decomposição da hidroxiapatita que não reagiu com o pentóxido de nióbio, já que este foi totalmente consumido na formação das fases  $\text{CaNb}_2\text{O}_6$  e  $\text{PNb}_9\text{O}_{25}$ . A utilização de peixes

jovens parece ter sido o fator que determinou tais proporções, uma vez que estudos realizados com ossos calcinados de peixes mais velhos da mesma espécie produziram somente a fase da hidroxiapatita (Lima *et al.*, 2005).

O  $\beta$ -TCP pode ser considerado uma variação da HA, com menor quantidade de cálcio (Lin *et al.*, 2001); é reabsorvido numa razão relativamente balanceada com a neoformação óssea, além disso libera grande quantidade de íons cálcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) e sulfato ( $\text{SO}_4^{--}$ ), sais inorgânicos indispensáveis para o desenvolvimento do osso (Liu e Lun, 2012). Em implantes, estas características do  $\beta$ -TCP favorecem a resposta do tecido, levando a um crescimento ósseo mais rápido e em uma taxa maior em comparação com implantes com maior quantidade de HA (Galois e Mainard, 2004).

A HA é pobremente absorvida pelo organismo (Gutierrez *et al.*, 2006), o que dificulta a formação e remodelação de osso novo resultando em pobre estabilidade local ou permanente *stress* mecânico entre o osso e o implante (Liu e Lun 2012). Num modelo de defeito ósseo produzido no côndilo femoral de coelhos e preenchido com um cilindro de 6 x 10mm constituído por HA ou  $\beta$ -TCP, houve a reabsorção de 60% de  $\beta$ -TCP e de apenas 10% de HA, 12 meses após o implante (Galois e Mainard, 2004).

Para que a interface osso-biomaterial pudesse ser analisada, as pastilhas não foram fixadas nas bordas do defeito. As peças foram encaixadas no defeito durante o procedimento cirúrgico e mantidas em posição após recolocação e sutura do periósteo superficial. Posteriormente observou-se, nos cortes histológicos, que algumas peças, especialmente de HA $\beta$ , sofreram algum deslocamento, enquanto que as pastilhas do compósito se mantiveram encaixadas na maioria dos animais. Esta característica pode estar relacionada com a dureza dos materiais, mensurada pela técnica de microdureza Vickers. As amostras do compósito apresentaram maior dureza e supostamente maior resistência às forças exercidas pelos ossos da calvária adjacentes ao defeito, o que sugere que houve uma maior estabilidade destes implantes, mesmo sem a fixação, em comparação com aqueles de hidroxiapatita pura.

A quantidade e distribuição de poros nos materiais cerâmicos influenciam fortemente a resistência, o módulo de elasticidade, a resistência à oxidação e ao desgaste e outras propriedades importantes (Gomide, 2005). A porosidade obtida nas pastilhas do compósito e de HA $\beta$  foi baixa. O tamanho dos poros variou de 1,0 a 2,5 $\mu\text{m}$  e 0,3 $\mu\text{m}$  a 1,6 $\mu\text{m}$ , respectivamente.



Nos materiais cerâmicos, quanto maior o tamanho do poro, menor o tempo necessário para que ocorra o crescimento de vasos (Klenke *et al.*, 2008). O tamanho ideal de poro deve variar entre um mínimo de 70 a 100 $\mu$ m, que permite a ocorrência de migração e transporte celular (Galois e Mainard, 2004), até 300 $\mu$ m, tamanho que permite o desenvolvimento de um sistema de capilares, essencial para a neoformação óssea (Zaner e Yukna, 1984; Fleckenstein *et al.*, 2006; Teixeira, 2009). Entretanto partículas de cerâmica densa com microporos de 0,1 a 10 $\mu$ m apresentaram crescimento de vasos (Klenke *et al.*, 2008).

Galois e Mainard (2004), relataram que, após quatro meses de observação, houve um crescimento ósseo de cerca de 76% em implantes cilíndricos de hidroxiapatita, com poros de 45 a 80 $\mu$ m, implantados em fêmur de coelhos, e este mesmo percentual de crescimento foi observado aos dois meses em poros de 200 a 250 $\mu$ m. Por outro lado, nos implantes compostos por  $\beta$ -TCP, com poros de 45 a 80  $\mu$ m, a colonização foi mais rápida e em uma maior proporção (cerca de 80%) em comparação com a HA. Estes estudos mostram que não somente o tamanho do poro influencia diretamente o crescimento vascular e ósseo, mas também que o tipo de material empregado influenciará no percentual de crescimento.

Nos defeitos preenchidos com o compósito os tecidos adjacentes à pastilha apresentaram-se muito vascularizados, especialmente aos 60 dias. Aos 45 e 60 dias, vários animais apresentaram, na região do defeito preenchido com o compósito, um tecido hemático. Curiosamente essas amostras foram as que apresentaram maior crescimento ósseo. Apesar da microporosidade do material, foram observados vasos sanguíneos inseridos na periferia da pastilha neste período. Hipoteticamente, o percentual de  $\beta$ -TCP em ambas as pastilhas poderia favorecer um maior percentual de reabsorção (Galois e Mainard, 2004), consequentemente promovendo um aumento nos espaços existentes em seu interior, favorecendo a penetração dos vasos sanguíneos.

A interface biomaterial osso foi estudada por meio de microscopia óptica e microscopia eletrônica de varredura. Não houve o encapsulamento das pastilhas por tecido conjuntivo fibroso em nenhum período. Uma pequena quantidade de tecido fibroso se desenvolveu próximo aos vértices das pastilhas, em ambos os grupos, provavelmente em função do atrito. Os tecidos periféricos aos implantes apresentaram-se muito vascularizados e com a presença de células osteogênicas e macrófagos, isolados ou na forma de células gigantes. Não houve o desenvolvimento de resposta inflamatória típica, entretanto células

polimorfonucleares foram eventualmente observadas. Essas características demonstram que o compósito foi bioativo e osteocondutor, visto que ocorreu “uma ligação interfacial entre o tecido ósseo e o implante” (Hench, 1993).

O local de um implante em um sítio cirúrgico dispara uma cascata de atividades moleculares e celulares que levam à formação de um novo tecido sobre a superfície do biomaterial. De forma simplificada: as plaquetas do sangue extravasado se aderem à superfície do implante onde, uma vez ativadas, liberam citocinas que recrutam células indiferenciadas ao local dando início à diferenciação osteogênica (osteoindução). A combinação de recrutamento e migração de células osteogênicas e a formação óssea por essas células (osteocondução) na superfície do implante é conhecida como osteogênese de contato (Davies, 1998; Kikuchi *et al.*, 2005; Kark *et al.*, 2006; Kushwaha, 2012).

Nos cortes histológicos corados com HE uma fina camada acelular, caracterizada como linha de cimento (Ko, 2010) foi observada na superfície da HA $\beta$  e do compósito. Com esta coloração a linha de cimento pode ser visualizada como uma banda basofílica, não colagenosa (Davies e Hosseini, 2000), de osso descalcificado. Originalmente foi descrita como uma linha encontrada em sítios de remodelação, na interface entre o osso novo e o velho (von Ebner, 1875; Davies, 1996). É produzida pelas células osteogênicas em diferenciação e é composta de duas proteínas não colagenosas, a osteopontina e a sialoproteína óssea, que fornecem locais específicos para deposição de fosfato de cálcio (Davies, 1998).

Na microscopia eletrônica de varredura a linha de cimento pode ser vista como crescências globulares (*globular accretions*) livres de colágeno que cobrem a superfície de reabsorção do osso velho antes da deposição de matriz de colágeno do osso novo (Zhou *et al.*, 1994). As crescências globulares também acontecem na superfície osso-implante (Orr *et al.*, 1992). Neste estudo constatamos ao MEV, a ocorrência de estruturas semelhantes à crescências globulares em alguns pontos, na superfície do compósito.

As análises em MEV foram cruciais para comprovar que houve interação entre os biomateriais. As análises foram feitas de várias formas: nas pastilhas novas, sem uso, nas pastilhas removidas do defeito, após o período de implante e também análises nos defeitos, com e sem a pastilha. Algumas lâminas coradas com H&E foram desmontadas e metalizadas para observação ao MEV, de modo que algumas áreas identificadas na microscopia de luz

puderem ser selecionadas para análises na varredura. Esta versatilidade de formas de análise foi uma das vantagens encontradas no emprego de amostras na forma de pastilha, o que não seria possível com o emprego de escafoldes ou de grãos. Por outro lado, uma das desvantagens observadas com o emprego das pastilhas foi que o osso neoformado nem sempre tocava a superfície do implante. As áreas de contato em geral apresentavam uma anatomia característica e maior concentração de minerais, detectados na análise por EDS.

As características microscópicas da interface osso-HA $\beta$  e osso-compósito descritas neste trabalho foram compatíveis com aquelas de um biomaterial que apresenta biocompatibilidade, bioatividade e atividade osteocondutora. A biocompatibilidade dos biomateriais está intimamente relacionada ao comportamento celular no contato e particularmente na adesão celular a sua superfície (Anselme, 2000). Neste estudo, várias amostras, de ambos os grupos, apresentaram áreas de adesão osso-biomaterial que foram reconhecidas após a remoção das pastilhas, quando pequenos fragmentos permaneceram aderidos ao osso. A observação detalhada dessas áreas indicou a presença de depósitos de material amorfo, cujas análises em EDS acusaram ser material orgânico, e a presença de prolongamentos de osteócitos em contato direto com as cerâmicas. Estes achados demonstram que a topografia dos materiais favoreceu a adesão celular às superfícies. Esta característica do contato inicial é importante pois refletirá na capacidade celular para proliferação e diferenciação ao contato com o material enxertado. Isto é essencial para a eficácia dos enxertos no sentido de se estabelecer uma interface mecanicamente sólida com completa fusão entre a superfície do material e o tecido ósseo sem a presença de uma interface fibrosa (Anselme, 2000)

Embora a biocompatibilidade seja um pré-requisito para o sucesso clínico, é a propriedade osteocondutora que determina a cinética da osteointegração. O potencial osteocondutor de biomateriais de enxertos tem sido amplamente estudado utilizando defeitos de tamanho crítico na calvária de ratos (Dupoirieux *et al.*, 2001; Braz *et al.*, 2003; Fleckenstein *et al.*, 2006; Moreschi *et al.*, 2010). Neste trabalho pudemos constatar que o compósito apresentou atividade osteocondutora visto que permitiu a migração de células osteogênicas e a formação de tecido ósseo na superfície do implante.

Os resultados obtidos neste trabalho foram positivos porque demonstraram que a associação HA $\beta$  e Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> produziu um compósito com características químicas e biológicas

desejáveis em um bom biomaterial. Essas características apontam o composto HA $\beta$ -NbO como um material promissor para atuar como substituto ósseo.

## **Conclusões**

Concluimos que o compósito HA $\beta$ -NbO na forma de pastilha apresentou as características desejáveis para um bom biomaterial: biocompatibilidade, bioatividade e propriedade osteocondutora, semelhantes àsquelas observadas na hidroxiapatita pura, já considerada um bom biomaterial. Apresentou ainda as vantagens de não induzir o desenvolvimento de fibrose, apresentar composição química com maior percentual de  $\beta$ -TCP e possuir dureza superior à hidroxiapatita.

## Referências

- ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*, v. 21, p. 652-67, 2000.
- AOKI, H. Science and medical applications of hydroxyapatite. *Japanese Association of Apatite Science*, 1991.
- BHUMIRATANA, S; GRAYSON, WL; CASTANEDA, A; ROCKWOOD, DN; GIL, ES; KAPLAN, DL; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Nucleation and growth of mineralized bone matrix on silk-hydroxyapatite composite scaffolds. *Biomaterials*, v. 32, p. 2812-20, 2011.
- BONADIO, TGM. *Estudos dos compósitos TiO<sub>2</sub>-hidroxiapatita e Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-hidroxiapatita: Comportamento físico-mecânico, estrutural e de bioatividade*. Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, 2011.
- BOSE, S; ROY, M; BANDYOPADHYAY, A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*, v. 30, n. 10, p. 546-54, 2012.
- BRASIL, Departamento Nacional de Produção Mineral. *Sumário Mineral*, v. 32, p. 93-4, 2012.
- BRAZ, F; RAHAL, SC; ROCHA, NS; TAGA, E; BIASI, F. Emprego de matriz óssea orgânica bovina e hidroxiapatita no reparo de defeito induzido em crânio de ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, v. 18, n. 1, p. 19-24, 2003.
- CAMERON, JA; MILNER, DJ; LEE, JS; CHENG, J; FANG, NX; JASIUK, IM. Employing the biology of successful fracture repair to heal critical size bone defects. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, n. 367, p. 113-32, 2013.
- COOPER, GM; MOONEY, MP; GOSAIN, AK; CAMPBELL, PG; LOSEE, JE; HUARD, J. Testing the “critical-size” in calvarial bone defects: revisiting the concept of a critical-sized defect (CSD). *Plast Reconstr Surg*, v. 125, n. 6, p. 1685-92, 2010.
- DAVIES, JE. *In vitro* modeling of the bone/implant interface. *The Anatomical Record*, v. 245, n. 2, p. 426-45, 1996.
- DAVIES, JE. Mechanisms of endosseous integration. *International Journal of Prosthodontics*, v. 11, p. 391-401, 1998.
- DAVIES, JE; HOSSEINI, MM. Histodynamics of endosseous wound healing. *Bone Engineering*, p. 1-14, 2000.
- DEMIRKOL, N; OKTAR, FN; KAYALI, ES. Influence of niobium oxide on the mechanical properties of hydroxyapatite. *Key Engineering Materials*, v. 529-30, p. 29-33, 2013.
- DINOPOULOS, H; DIMITRIOU, R; GIANNOUDIS, PV. Bone graft substitutes: What are the options? *The Surgeon*, v. 10, p. 230-39, 2012.

DUPOIRIEUX, L; POURQUIER, D; PICOT, MC; NEVES, M. Comparative study of three different membranes for guided bone regeneration of rat cranial defects. *International Journal Oral Maxillofacial Surgery*, v. 30, n. 1, p. 58-62, 2001.

FLECKENSTEIN, KB; CUENIN, MF; PEACOCK, ME; BILLMAN, MA; SWIEC, GD; BUXTON, TB; SINGH, BB; MCPHERSON III, JC. Effect of a Hydroxiapatite Tricalcium Phosphate Alloplast on Osseous Repair in the Rat Calvarium. *J Periodontol*, v. 77, n. 1, p. 39-45, 2006.

GALOIS, L; MAINARD, D. Bone ingrowth into two porous ceramics with different pore sizes: An experimental study. *Acta Orthop Belg*, n. 70, p. 598-603, 2004.

GISEP, A. Research on ceramic bone substitutes: current status. *Int J Care Injured*, v. 33, p. 88-92, 2002.

GOMIDE, VS. Caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânia para fins biomédicos. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

GUTIERRES, M; LOPES, MA; HUSSAIN, NS; CABRAL, AT; ALMEIDA, L; SANTOS, JD. Substitutos ósseos – Conceitos gerais e estado actual. *Arquivos de Medicina*, v. 19, n. 4, p. 153-62, 2006.

HATTAR, S; ASSELIN, A; GREENSPAN, D; OBOEUF, M; BERDAL, A; SAUTIER, JM. Potential of biomimetic surfaces to promote *in vitro* osteoblast-like cell differentiation. *Biomaterials*, v. 26, p. 839-48, 2005.

HENCH, LL. Characterization of bioceramics. In: HENCH, LL; WILSON, J, editores: *An introduction to bioceramics*. River Edge, EUA: World Scientific Publishing, 1993.

ISAMA, K; TSUCHIYA, T. Safety evaluation of metallic biocompatible materials by their effect on cell differentiation of human osteoblasts. *Bulletin of National Institute of Health Sciences*, n. 121, p. 111-2, 2003.

KARK, LR; KARP, JM; DAVIES, JE. Platelet releasate increases the proliferation and migration of bone marrow-derived cells cultured under osteogenic conditions. *Clinical Oral Implants Research*, v. 17, p. 321-7, 2006.

KIKUCHI, L; PARK, JY; VICTOR, C; DAVIES, JE. Platelet interactions with calcium-phosphate-coated surfaces. *Biomaterials*, v. 26, p. 5285-95, 2005.

KLENKE, FM; LIU, Y; YUAN, H; HUNZIKER, EB; SIEBENROCK, KA; HOFSTETTER, W. Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes *in vivo*. *J Biomed Mater Res A*, v. 85, n. 3, p. 87-108, 2008.

KO, JCH. *Investigating the process of cement line maturation on substrate surfaces with submicron undercuts*. Dissertação (Mestrado)-Graduate Faculty of Dentistry, University of Toronto, Toronto, Canada, 2010.

KOKUBO, T; KIM, HM; KAWASHITA, M; NAKAMURA, T. Bioactive metals: preparation and properties. *Journal of Materials Science in Medicine*, v. 15, p. 99-107, 2004.

KUSHWAHA, M; PAN, X; HOLLOWAY, JA; DENRY, IL. Differentiation of human mesenchymal stem cells on niobium-doped fluorapatite glass-ceramics. *Dental Materials*, v. 28, p. 252-60, 2012.

LACERDA, KA. Obtenção de matrizes bioabsorvíveis à base de hidroxiapatita para aplicação em braquiterapia. Dissertação (Mestrado)-Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear, Belo Horizonte, MG, 2005.

LEGEROS, RZ. Calcium phosphate materials in restorative dentistry: a review. *Advances in Dental Research*, v. 2, n. 1, p. 164-80, 1988.

LEGEROS, RZ. Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, v.395, p. 81-98, 2002.

LIEBSCHNER, MAK. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*, v. 25, p. 1697-1714, 2004.

LIMA, WM; WEINAND, WR; PAESANO JÚNIOR, A; ORTEGA, FHM. Effect of the calcination time of fish bones in the synthesis of hydroxyapatite. *Materials Science Forum*, v. 498, p. 600-5, 2005.

LIN, FH; LIAO, CJ; CHEN, KS; SU, JS; LIN, CP. Petal-like apatite formed on the surface of tricalcium phosphate ceramic after soaking in distilled water. *Biomaterials*, v. 22, p. 2981-92, 2001.

LIU, B; LUN, D. Current application of  $\beta$ -tricalcium phosphate composites in orthopaedics. *Orthop Surg*, n. 4, p. 139-44, 2012.

LIU, DM; TROCZYNSKI, T; TSENG, WJ. Water-based sol-gel synthesis of hydroxyapatite: process development. *Biomaterials*, v. 22, p. 1721-30, 2001.

LONG, M; RACK, HJ. Titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective. *Biomaterials*, v. 19, p. 1621-39, 1998.

MORAES, PC. *Biocompatibilidade e comportamento do cimento de fosfato de cálcio, reforçado com diferentes tipos de fibras, implantado no rádio de coelhos*. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2002.



- MORESCHI, E; HERNANDES, L; DANTAS, JA; SILVA, MARCP; CASAROTO, AR; BERSANI-AMADO, CA. Effect of dolomite on the repair of bone defects in rats: histological study. *Histology and Histopathology*, v. 25, p. 1547-56, 2010.
- MURUGAN, R; RAMAKRISHNA, S. Development of nanocomposites for bone grafting. *Composites Science and Technology*, v. 65, p. 2385-2406, 2005.
- MÜLLER, FA; BOTTINO, MC; MÜLLER, L; HENRIQUES, VA; LOHBAUER, U; BRESSIANI, AH; BRESSIANI, JC. In vitro apatite formation on chemically treated (P/M) Ti-13Nb-13Zr. *Dental Materials*, v. 24, n. 1, p. 50-6, 2008.
- NASCIMENTO, WJ; BONADIO, TGM; FREITAS, VF; WEINAND, WR; BAESSO, ML; LIMA, WM. Nanostructured Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-natural hydroxyapatite formed by the mechanical alloying method: A bulk composite. *Materials Chemistry and Physics*, v. 130, p. 84-89, 2011.
- OKAZAKI, Y; NISHIMURA, E; NAKADA, H; KOBAYASHI, K. Surface analysis of Ti-15Zr-4Nb-4Ta alloy after implantation in rat tibia. *Biomaterials*, v. 22, p. 599-607, 2001.
- OLIVER, WC; PHARR, GM. An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments. *Journal of Materials Research*, v. 7, n. 6, p. 1564-83, 1992.
- ONO, I; TATESHITA, T; NAKAJIMA, T. Evaluation of a high density polyethylene fixing system for hydroxyapatite ceramic implants. *Biomaterials*, v. 21, p. 143-51, 2000.
- ORR, RD; DE BRUJIN, JD; DAVIES, JE. Scanning electron microscopy of the bone interface with titanium, titanium alloy and hydroxyapatite. *Cells and Materials*, v. 2, p. 241, 1992.
- PIECUCH, JF. Extraskelatal of a Porous Hydroxyapatite Ceramic. *J Dent Res*, v. 61, n. 12, p. 1458-60, 1982.
- QAISAR, SA; BILTON, M; WALLACE, R; BRYDSON, R; BROWN, AP; WARD, M; MILNE, SJ. Sol-gel synthesis and TEM-EDX characterization of hydroxyapatite nanoscale powders modified by Mg, Sr or Ti. *Journal of Physics: Conference Series* 241, p. 1-4, 2010.
- RAMÍREZ, G; RODIL, SE; ARZATE, H; MUHL, S; OLAYA, LL. Niobium based coatings for dental implants. *Applied Surface Science*, v. 257, n. 7, p. 2555-59, 2011.
- RIGO, ECS; OLIVEIRA, LC; SANTOS, LA; BOSCH, AO; CARRODEGUAS, RG. Implantes metálicos recobertos com hidroxiapatita. *Revista Brasileira de Engenharia Biomédica*, v. 15, n. 1-2, p. 21-9, 1999.
- SCHMITZ, JP; HOLLINGER, JO. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions. *Clin Orthop Rel Res*, v. 205, p. 299-308, 1986.

SCHMITZ, JP; HOLLINGER, JO; MILAM, SB. Reconstruction of bone using calcium phosphate bone cements: a critical review. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 57, n. 9, p. 1122-26, 1999.

SENA, LA. *Produção e caracterização de compósitos hidroxiapatita-colágeno para aplicações biomédicas*. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2004.

SERVICE, FR. Tissue engineers build new bone. *Science*, v. 289, p. 1498-1500, 2000.

STRONG, E; MOULTHROP, T. Calvarial bone graft harvest: a new technique. *Otolaryngology Head and Neck Surgery*, v. 123, n. 5, p. 547-52, 2000.

SURYANARAYANA, C. Mechanical alloying and milling. *Progress in Materials Science*, v. 46, p. 39-42, 2001.

TAMAI, M; NAKAOKA, KIR; TSUCHIYIA, T. Synthesis of a novel  $\beta$ -tricalcium phosphate/hydroxiapatite biphasic calcium phosphate containing niobium ions and evaluation of its osteogenic properties. *J Artif Organs*, n. 10, p. 22-28, 2007.

TEIXEIRA, LJC. *Potencial osteocondutor de grânulos de hidroxiapatita em defeitos críticos na calvária de ratos*. Tese (Doutorado) – Universidade do Grande Rio “Prof. José de Souza Herdy”, Duque de Caxias, RJ, 2009.

VELARD, F; BRAUX, J; AMEDEE, J; LAQUERRIERE, P. Inflammatory cell response to calcium phosphate biomaterial particles: An overview. *Acta Biomaterialia*, v. 9, p. 4956-63, 2013.

VITAL, CC; BORGES, APB; FONSECA, CC *et al*. Biocompatibilidade e comportamento de compósitos de hidroxiapatita em falha óssea na ulna de coelhos. *Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 58, p. 175-83, 2006.

VON EBNER, V. Ueber den feineren Bau der Knochensubstanz. *Sber Akad Wiss Wien*, v. 3, p. 72, 1875.

WILLIAMS, DF. *Definitions in biomaterials*. Amsterdam: Elsevier, 1987.

YAMAMOTO, A; HONMA, R; SUMITA, M; HANAWA, T. Cytotoxicity evaluation of ceramic particles of different sizes and shapes. *Journal of Biomedical Materials Research A*, v. 68, n. 2, p. 244-56, 2004.

YOUNG, RA. *The Rietveld Method*. New York: Oxford University Press, 1995.

ZANER, DJ; YUKNA, RA. Particle size of periodontal bone grafting materials. *J Periodontol*, v. 55, p. 406-09, 1984.

ZHOU, H; CHERNECKY, R; DAVIES, JE. Deposition of cement at reversal lines in rat femoral bone. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 9, n. 3, p. 367-74, 1994.

ZWINGERBERGER, S; NICH, C; VALLADARES, RD; YAO, Z; STIEHLER, M; GOODMAN, SB. Recommendations and considerations for the use of biologics in orthopedic surgery. *Biodrugs*, v. 26, n. 4, p. 245-56, 2012.