



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E DA
BIOATIVIDADE DO SULFATO DE CÁLCIO MISTURADO COM
DIFERENTES SOLUÇÕES**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

THIAGO MODOLO AZEVEDO MARTINS

MARINGÁ

2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E DA
BIOATIVIDADE DO SULFATO DE CÁLCIO MISTURADO COM
DIFERENTES SOLUÇÕES**

THIAGO MODOLO AZEVEDO MARTINS

MARINGÁ
2013

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

Martins, Thiago Modolo Azevedo

M386a Análise das propriedades físico-químicas e da bioatividade do sulfato de cálcio misturado com diferentes soluções / Thiago Modolo Azevedo Martins. - Maringá, 2013.

40 f. : il., color., figs., tabs., fotos.

Orientador: Prof. Dr. Ângelo José Pavan.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada, 2013.

1. Sulfato de Cálcio. 2. Propriedades de superfície. 3. Concentração de Íons de Hidrogênio. 4. Dureza Vickers. 5. Espectroscopia infravermelho transformada de Fourier. 6. Enxerto ósseo. 7. Biomateriais. 8. Flúido corpóreo simulado. I. Pavan, Ângelo José, oriente. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia Integrada. III. Título.

CDD 21.ed. 617.5

AHS



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E DA
BIOATIVIDADE DO SULFATO DE CÁLCIO MISTURADO COM
DIFERENTES SOLUÇÕES**

THIAGO MODOLO AZEVEDO MARTINS

Orientador:

Prof. Dr. Ângelo José Pavan

MARINGÁ

2013

THIAGO MODOLO AZEVEDO MARTINS

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E DA
BIOATIVIDADE DO SULFATO DE CÁLCIO MISTURADO COM
DIFERENTES SOLUÇÕES**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para conclusão do curso de Mestrado em Odontologia Integrada da Universidade Estadual de Maringá (UEM), orientado pelo Professor Dr. Ângelo José Pavan.

Profº Dr. Ângelo José Pavan

Universidade Estadual de Maringá

Profº Dr. Rafael Santos Silva

Universidade Estadual de Maringá

Profª Drª. Luciana Reis Azevedo Alanis

Pontifícia Universidade Católica do Paraná - Curitiba

**ANÁLISE DAS PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E DA
BIOATIVIDADE DO SULFATO DE CÁLCIO MISTURADO COM
DIFERENTES SOLUÇÕES¹**

**ANALYSIS OF PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES AND
BIOACTIVITY OF CALCIUM SULFATE PA MIXED WITH DIFFERENT
SOLUTIONS**

MARTINS, Thiago Modolo Azevedo*
PAVAN, Ângelo José**

¹Trabalho como requisito de Conclusão do Curso de pós-graduação de Mestrado em Odontologia Integrada da Universidade Estadual de Maringá

*Pós-Graduando em Odontologia pela Universidade Estadual de Maringá

**Professor Associado da Área de Cirurgia do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual de Maringá

AGRADECIMENTOS

À Deus, que faz infinitamente mais do que tudo quanto pedimos ou pensamos (Ef 3:20), e me conduziu em toda esta difícil jornada (Dt 8:15).

Especialmente ao Professor Doutor Ângelo José Pavan pela orientação, amizade, atenção, confiança, dedicação e disponibilidade a qualquer momento do dia ou da noite.

À Mestre Taiana Gabriela Moretti Bonadio, pela dedicação, disponibilidade, amizade, apoio, sugestões ao longo do trabalho, orientação e participação indispensável à execução do trabalho.

Ao Professor Wilson Ricardo Weinand, pelas sugestões, soluções, ideias e apoio nos experimentos.

Ao amigo Alessandro Gavazzoni, pela ajuda do início ao fim do trabalho, nas pesquisas e na elaboração dos testes laboratoriais.

Ao aluno do departamento de Química Tiago Detomini, pela disponibilização dos equipamentos e auxílio nos testes de compressão.

À Professora de Estatística Isolde Previdelli.

À minha esposa Simone, pelo companheirismo, carinho, apoio e compreensão em todos os momentos em que estive ausente neste trabalho.

À minha filha Luana que nasceu no decorrer deste trabalho e me deu muita força para prosseguir.

À minha família por ter acreditado em mim até nos momentos mais difíceis.

À Universidade Estadual de Maringá que tornou tudo isso possível.

RESUMO

O objetivo do estudo foi avaliar as propriedades mecânicas, físico-químicas e estruturais do sulfato de cálcio misturado com diferentes soluções, para fornecer bases para utilização em meio bucal como barreira óssea. Sessenta e nove (69) corpos de prova foram preparados em matrizes de Polyvinyl Chloride (PVC) circulares, misturando-se o sulfato de cálcio, nas proporções líquido-pó recomendadas pelo fabricante, com os seguintes fluidos: água destilada (controle), clorexidina, anestésico, soro fisiológico, saliva e sangue, formando, assim, seis (6) grupos. As propriedades mecânicas foram avaliadas por meio dos testes de resistência a compressão, deformação e dureza Vickers; as propriedades físico-químicas e estruturais foram avaliadas por meio do pH e Difração de Raios X (DRX), respectivamente, em cada uma dos diferentes grupos de sulfato de cálcio. A bioatividade foi verificada pela Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) nas amostras do grupo controle. Os valores observados de compressão variaram entre 26 ± 5 e 63 ± 19 MPa. Todos os grupos apresentaram deformação menor que 0.5mm. Além disso, os resultados de dureza Vickers variaram de 0,184 até 0,467 GPa. As amostras apresentaram um valor de pH entre 7,0 e 8,2. No teste de bioatividade *in vitro*, observou-se pelo FTIR a deposição de uma espessa camada de apatita sobre o substrato de sulfato de cálcio demonstrando se tratar de um material bioativo. Por essa mesma técnica, foram apurados os grupos funcionais presentes nos materiais analisados. As mudanças que ocorreram entre as duas estruturas monoclinicas observadas foram apuradas por difração de raios X. A estrutura cristalina do sulfato de cálcio após a mistura foi composta por duas fases cristalinas, demonstrando que não houve total transformação do sulfato de cálcio hemi-hidratado para o di-hidratado. Os autores concluíram, levando em consideração as limitações do presente estudo, que sulfato de cálcio é bioativo, rapidamente reabsorvível, possui resistência suficiente para manutenção tridimensional óssea, tanto superficial como estruturalmente, possui um valor de pH que permite seu uso em meio fisiológico e não se deforma com a incidência das possíveis forças exercidas pelas estruturas bucais.

PALAVRAS-CHAVES

Sulfato de Cálcio, Propriedades de Superfície, Concentração de Íons de Hidrogênio, Dureza, Espectroscopia Infravermelho Transformada de Fourier, Enxerto ósseo, Biomateriais, Flúido corpóreo simulado.

ABSTRACT

The aim of the study was to evaluate the mechanical, physicochemical and structural properties of the calcium sulfate PA mixed with different solutions, to provide bases for its use in the oral environment as a barrier bone. Sixty-nine (69) samples were prepared in matrices of circular Polyvinyl Chloride (PVC) when the calcium sulphate powder was mixed according the manufacture's liquid-powder proportions, with the following fluids: distilled water (control), chlorhexidine, anesthetic, saline, saliva and blood, resulting in six (6) groups. Mechanical properties were evaluated using the test of compression resistance, deformation and hardness Vickers; the physicochemical properties and structure were assessed by pH and X-Ray Diffraction (XRD), respectively, in each of the different groups of calcium sulfate. The bioactivity was determined by spectroscopy in Fourier Transform Infrared (FTIR) in samples from control groups. The observed values of compression ranged between 26 ± 5 and 63 ± 19 MPa. All groups showed deformation less than 0.5mm. Furthermore, the results of Vickers hardness ranged from 0.184 to 0.467 GPa. Samples showed a pH value between 7.0 and 8.2. *In vitro* bioactivity test was observed by FTIR deposition of a thick apatite layer on the substrate calcium sulfate demonstrating it is a bioactive material. For this same technique, were determined the functional groups present in the material analyzed. The changes that were observed between the two structures were determined by X-ray diffraction. The crystalline structure of calcium sulphate after mixing was composed of two crystalline phases, indicating that no full conversion of calcium sulfate hemihydrate to the dihydrate. The authors concluded, taking into account the limitations of this study, calcium sulfate is bioactive, resorbable quickly, has enough strength to maintain dimensional bone surface as both structurally, has a pH value which allows its use in physiological environment and not deforms with the incidence of possible forces exerted by oral structures.

KEYWORDS

Calcium Sulfate, Surface Properties, Hydrogen-Ion Concentration, Hardness, Spectroscopy, Fourier Transform Infrared, Bone graft, Biomaterials, simulated body fluid.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	2
3. MATERIAL E MÉTODOS	3
3.1. Divisão de Grupos	3
3.2. Obtenção de Corpos de Prova	3
3.3. Proporção Gesso e Solvente	6
3.4. Teste de Compressão e Deformação.....	7
3.5. Teste de Dureza Vickers	7
3.6. Teste de pH	8
3.7. Difração de raios X	9
3.8. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	10
3.9. Testes de Bioatividade <i>in vitro</i>	10
4. RESULTADOS	12
4.1. Teste resistência à compressão e deformação	15
4.2. Teste de Dureza Vickers.....	12
4.3. Teste de de pH.....	14
4.4. Difração de raios X	15
4.5. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	18
4.6. Testes de bioatividade <i>in vitro</i>	20
5. Discussão dos resultados.....	21
6. Conclusão	25
7. Referências Bibliograficas	26

1. INTRODUÇÃO

O tratamento com implante osseointegrável é uma alternativa para a reabilitação de áreas edêntulas totais ou parciais com uma taxa de sucesso consistente^{1,2,3}, com sobrevida variando de 93,75 a 100%^{1,4,5,6}. Após o processo de reparo pós-exodontia a colocação de implante numa posição adequada pode ficar dificultada, o que afeta o resultado estético e funcional de próteses suportadas por implantes dentários osseointegráveis^{7,8}. Todavia, em determinadas regiões, o resultado funcional e estético do tratamento com implante relaciona-se, em grande parte, com a manutenção da estrutura tridimensional do tecido ósseo^{9,10,11, 12,13}.

Após a remoção cirúrgica de dentes ocorre reabsorção do tecido ósseo circundante ao local da extração. Para corrigir este defeito, diversas técnicas cirúrgicas foram propostas para proporcionar um volume ósseo nestas regiões com diferentes graus de sucesso e de complexidade, tais como a reparação óssea guiada^{14,15} e os enxertos ósseos aloplásticos¹⁶, autógenos¹⁷ e xenógenos^{18,19,20,21,22}. Estas técnicas, no entanto, são usadas para reparação posterior de uma falha óssea já desenvolvida, pois os materiais biológicos utilizados para manutenção imediata do osso alveolar pós-cirúrgico não são economicamente viáveis para uso preventivo em todos os casos.

Para esta reparação, o uso de materiais sintéticos substitutos de tecido ósseo é uma alternativa interessante, pois diminui a morbidade, não limita em termos de quantidade de material fornecido para ser enxertado, além de diminuir a possibilidade de transmissão de doenças.

O restrito uso destes tipos de tratamento ocorre, também, devido ao custo excessivo dos materiais comercializados, indica a necessidade de utilização um material comumente utilizado em odontologia, sem qualquer modificação. Dentre os diversos materiais sintéticos pode-se destacar o Sulfato de Cálcio pela sua rápida reabsorção, biocompatibilidade, capacidade de estimular a osteogênese²³ e bioatividade^{24,25}. Somado a isso, este material não induz resposta inflamatória significativa e promove cicatrização óssea²⁶, possui uma matriz com propriedades osteocondutoras que permite a proliferação de vasos sanguíneos, fibras colágenas e osso²⁷. O sulfato de cálcio pode servir como

material de preenchimento em procedimentos de enxerto ósseo, como material de reparo, barreira mecânica ou como agente de hemostasia. Possui, ainda, propriedade de liberação de antibióticos e outros tipos de medicamentos de forma lenta e local.

Por esse motivo, o objetivo desse trabalho é caracterizar a bioatividade do sulfato de cálcio e as suas propriedades físico-químicas, mecânicas e estruturais quando misturado com seis soluções presentes no meio bucal e cirúrgico. Apesar da pasta de sulfato de cálcio ter apenas contato superficial com tais substâncias na aplicação sugerida, acredita-se que a agregação uniformemente integral acentuaria as alterações das suas características próprias, por este motivo essas amostras foram escolhidas.

2. OBJETIVOS

1. Avaliar a resistência à compressão e a deformação do material após o tempo de presa final;
2. Avaliar a micro dureza Vickers do material após o tempo de presa final;
3. Verificar a concentração de hidrogênio iônico (pH) nos diferentes grupos;
4. Caracterizar os materiais conforme suas estruturas cristalinas;
5. Caracterizar os grupos funcionais presentes nos materiais;
6. Avaliar a bioatividade *in vitro* do material.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Divisão de Grupos

Foram separados 6 grupos nomeados pelas soluções adicionadas ao sulfato de cálcio de acordo com a tabela abaixo:

Tabela 1: Relação dos Grupos e Quantidade de Corpos de Prova

Grupos	Solventes	Bioatividade	Vickers	pH	Comp/Def
1	Água Destilada	3	2	1	8
2	Clorexidina	0	2	1	8
3	Anestésico	0	2	1	8
4	Soro Fisiológico	0	2	1	8
5	Saliva	0	2	1	8
6	Sangue	0	2	1	8

O Grupo 2, denominado Clorexidina, teve como solvente o Digluconato de clorexidina 2%, (Riohex 2%-Rioquímica[®], Rio de Janeiro, Brasil), no Grupo 3 foi utilizado cloridrato de lidocaína a 20mg/mL com fenilefrina a 0,01mg/mL (Novocol 100 - SSWhite[®], Rio de Janeiro, Brasil), no Grupo 4 foi utilizado solução isotônica de cloreto de sódio a 0,9% (Linhamax[®] – Sistema Fechado, Brasil). A saliva e o sangue foram colhidos dos membros da equipe no momento da confecção dos corpos de prova.

3.2. Obtenção de Corpos de Prova

As matrizes para obtenção dos corpos de prova foram obtidas através da secção transversal de um tubo de PVC nas dimensões de 2 cm de diâmetro e 4 cm de altura (Figura 1). Tais matrizes foram preenchidas manualmente, em porções mínimas, pelo mesmo operador, com pasta de gesso tipo IV, obtidas pela mistura do mesmo com cada um dos solventes, com espátula 24, sob vibração de um vibrador de bancada (Odonto Larcon, Maringá, Brasil). As matrizes foram colocadas longitudinalmente sobre uma placa de vidro, cobertas

pelas pastas e pressionadas firmemente contra outra placa de vidro para garantir a planicidade exigida para os ensaios mecânicos.

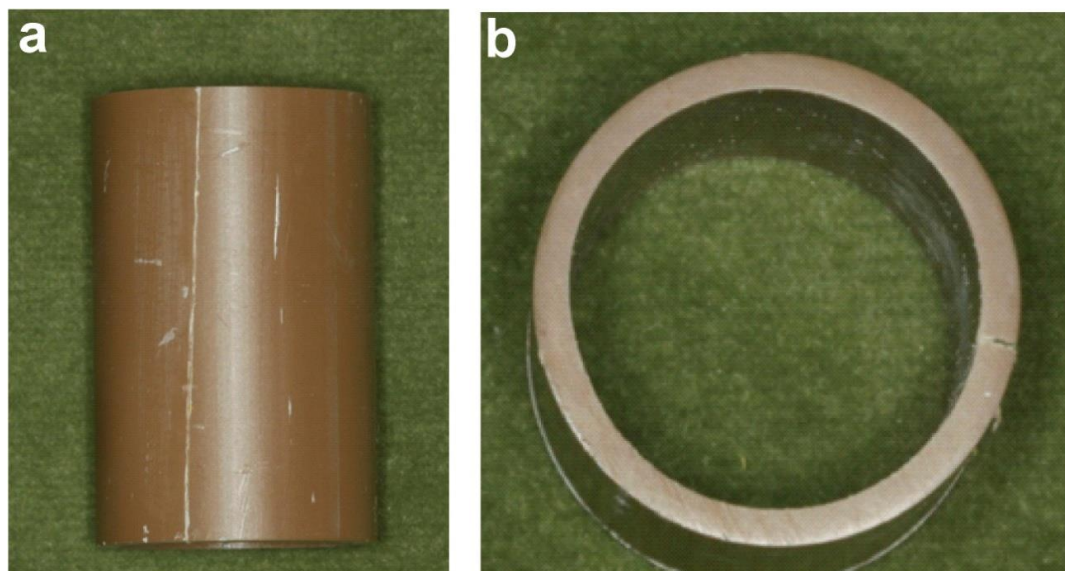


Figura 1. Molde de PVC utilizado na confecção dos corpos de prova. (a) Visão lateral. (b) Visão superior.

Para limitar a expansão radial de presa dos corpos de prova no interior das matrizes plásticas, alterando assim as dimensões dos espécimes, foram confeccionadas presilhas utilizando o mesmo modelo de tubo de PVC, com comprimento de arco de aproximadamente 2 cm. Estas presilhas foram adaptadas à parte externa das matrizes de PVC previamente a colocação dos diferentes materiais que deram origem aos corpos de prova.

Para os testes de dureza Vickers e de pH cada matriz de PVC utilizada tinha 1 cm de diâmetro e 2 cm de altura. Foram feitas nestas medidas para possibilitar a colocação no equipamento específico para os testes de dureza Vickers e para facilitar a trituração necessária para o teste de pH.

Todas estas matrizes receberam um corte longitudinal para facilitar a remoção dos corpos de prova e foram utilizadas presilhas metálicas circulares (abraçadeira metálica) atarraxadas com parafusos próprios.

Para os testes de bioatividade *in vitro*, foram confeccionadas amostras do grupo controle (água), pois a bioatividade é inerente do material analisado, não sendo anulada pelo solvente. Inicialmente, foram confeccionados dois corpos

de prova, através de um molde polimérico de amida (technyl-Rhodia®), do grupo água destilada, obtidos a partir da secção transversal de um modelo de formato circular com 10 mm de diâmetro e 1 mm de altura. Posteriormente, foi confeccionado outro corpo de prova com 1 centímetro de diâmetro e 3 mm de altura, para melhor observação dos resultados.

Depois do tempo de presa final, foi utilizada uma lixa d'água para planificar as bordas a fim de se obter superfícies regulares, planas e paralelas. Após a remoção dos corpos de prova das respectivas matrizes de PVC, todos eles foram colocados em equipamento de lixamento automático para refinamento das características e aferidos com micrômetro (Mitutoyo, Suzano, Brasil) com precisão de 0,01mm, como observado na Figura 2.

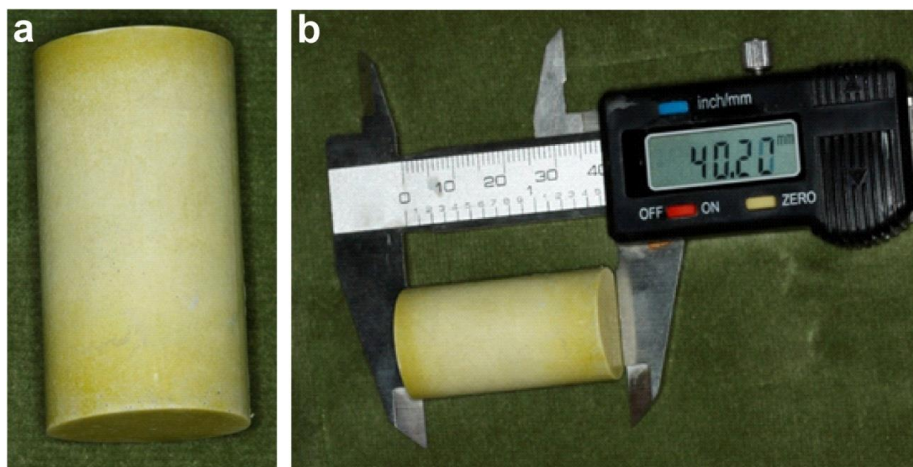


Figura 2. (a) e (b) Corpo de prova de aproximadamente 20 mm de diâmetro e 40 mm de altura que foram utilizados nos testes de compressão e deformação.

Cada um dos testes foi executado em momentos diferentes, sendo assim, todos os corpos de prova foram deixados estocados em dessecador hermético (Pyrex 200 MM, Charleroi, Estados Unidos - Figura 3), sob temperatura de 23 ± 2 °C e umidade relativa de $50 \pm 10\%$ controlada utilizando solução saturada de nitrato de magnésio hexa-hidratado ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) a $50 \pm 10\%$, conforme a norma nº 25 da Associação Dentária Americana ²⁸.

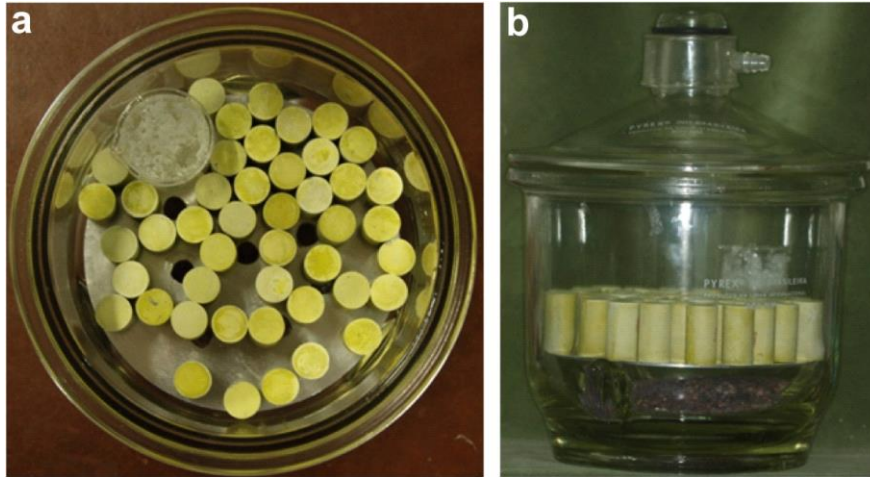


Figura 3. (a) e (b) Espécimes colocados no dessecador com o $(\text{Mg}(\text{NO}_3)_2) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ para controle de umidade.

3.3. Proporção Gesso e Solvente

De acordo com as proporções recomendadas pelo fabricante, para cada porção de 100 gramas de Gesso Tipo IV (Durone IV – Dentsply, Petrópolis, Brasil - Figura 4(a)), medida em balança digital com precisão de 0,00001g (Shimadzu AUD220D, Kyoto, Japão - Figura 4(b)), foi medida, em pipeta milimetrada, 19 mL de cada uma das soluções utilizadas na confecção dos corpos de prova.



Figura 4. (a) Rótulo do Sulfato de Cálcio DURONE IV utilizado nas análises. (b) Balança Shimadzu AUD220D utilizada nas medidas de massa.

3.4. Teste de Compressão e Deformação

Os corpos de prova foram submetidos individualmente a testes de compressão na máquina de ensaio universal (Emic DL10000, São José dos Pinhais, Brasil - Figura 5(a)) com célula de carga de 100 kN, sob compressão axial constantemente crescente até a fratura. Dessa forma, foi obtida a força máxima suportada pelo corpo de prova na eminência da fratura em megaPascal (mPa), bem como a deformação axial do corpo de prova em milímetros (Figuras 5 (b) (c) e (d)). Os valores de deformação são obtidos a partir da razão entre a variação do comprimento do corpo de prova pelo seu comprimento inicial.

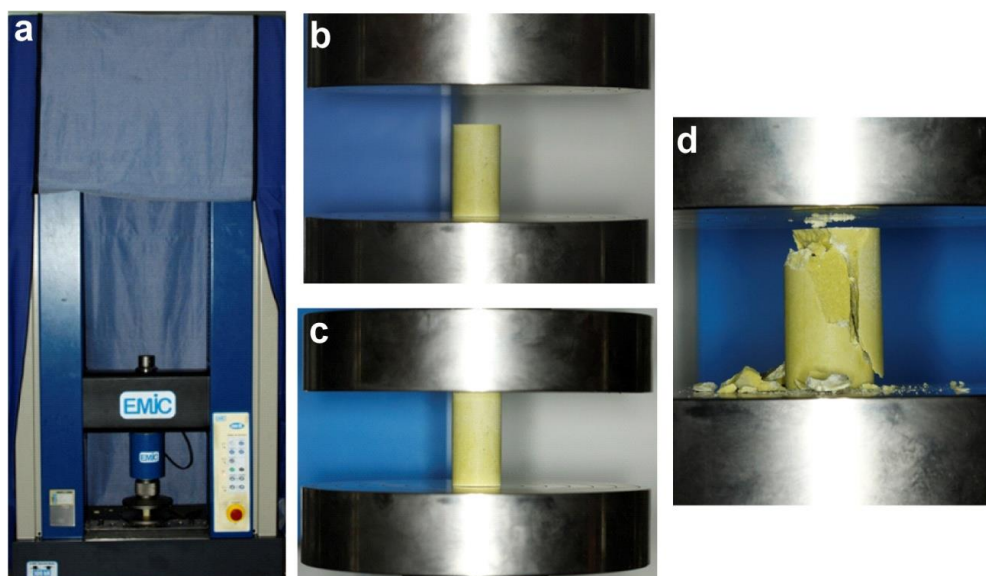
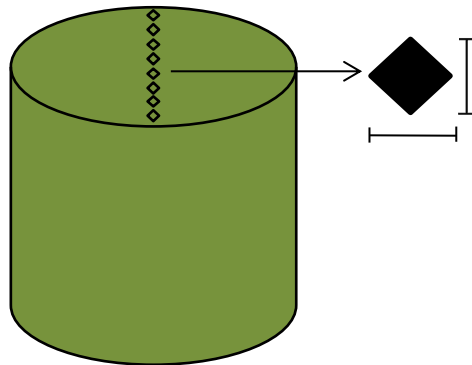


Figura 5. (a) Máquina EMIC DL1000 utilizada nos testes de compressão. (b) Espécimes colocada entre os pratos paralelos para início dos testes de compressão. (c) Amostra sendo comprimida pelos pratos paralelos. (d) Ruptura da amostra provocada pela compressão.

3.5. Teste de Dureza Vickers

Foram feitas 15 (perfurações) em cada corpo de prova de todos os grupos com o micro durômetro (UMT-2 Multi-Specimen Test System, CETR, USA). Nos testes, foi utilizada uma carga crescente de zero a 5N. O valor da micro dureza corresponde ao valor médio de 15 indentações realizadas em cada amostra. Cada indentação gerou um orifício de forma semelhante a um losango

os quais foram analisados automaticamente pelo equipamento por meio das curvas de carregamento e descarregamento, seguindo o modelo proposto por Oliver-Pharr²⁹. A importância deste teste é a verificação da resistência superficial do material quando submetido a deformações plásticas por meio das incidências de forças bucais.



Esquema 1. Desenho esquemático do teste de dureza Vickers



Figura 6. Equipamento utilizado para medição de dureza Vickers.

3.6. Teste de pH

As amostras feitas para este teste foram trituradas em almofariz de ágata e o pó gerado foi dissolvido em solução aquosa na proporção 1:2,5, ou seja, 10cm³ de pó para 25 ml de água milli-Q¹.

As soluções foram colocadas individualmente dentro de um Becker e permaneceram sob constante agitação com barra magnética. O pH foi medido utilizando-se um pHmetro (Hena HI-2223-01, Buenos Aires, Argentina) imergindo-se um eletrodo de vidro (Hena ML-1036, Buenos Aires, Argentina) dentro da soluções (Figura 7).

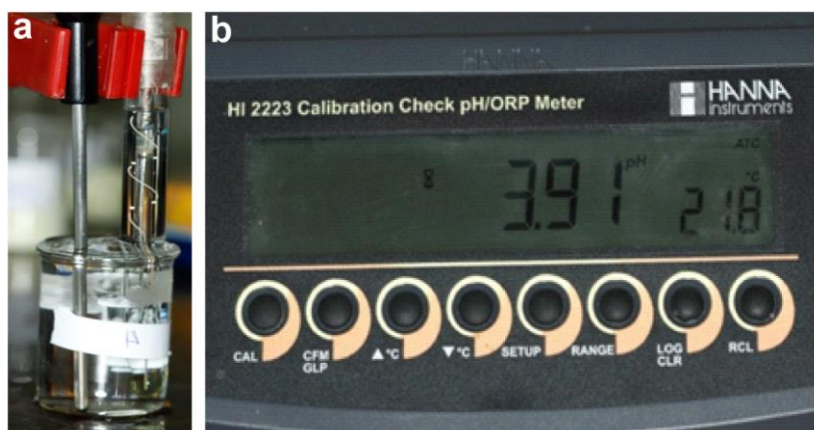


Figura 7. (a) Ilustração das medidas de pH. Observa-se o termômetro e o sensor do pHmetro imersos na solução tampão. (b) Visor do pHmetro Hena HI 2223.

3.7. Difração de raios x

As análises por difratometria de raios x foram conduzidas utilizando um difratômetro (Shimadzu XRD 7000, Kyoto, Japão) com radiação Cu K α . Os espectros foram obtidos no intervalo (2 θ) de 10 a 50 ° com velocidade de 2°/min. Os difratogramas obtidos foram utilizados para a identificação das fases cristalinas, que determinam a pureza do material, antes e após a espatulação. Este teste é importante para se verificar a ocorrência apenas da esperada

¹ A água milli-Q tem pureza monitorada pela medida da condutividade. Ela é importante para muitas aplicações químicas de quantificação sem a influência de impurezas. A qualidade da água deionizada pode ser detectada através da resistência em condições bem definidas. Além disso, a água é normalmente dispensada através de uma membrana filtradora de 0,22 μ m.

alteração estrutural ou a ocorrência de alguma alteração química na reação de presa ou na agregação dos diferentes solventes.

3.8. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

As medidas de FTIR foram realizadas em um espectrômetro Bruker Vertex 70V no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} com resolução de 4 cm^{-1} . Cada espectro corresponde a uma média de 64 espectros coletados. O método de medida utilizado foi a transmitância através de pastilha de KBr (brometo de potássio). Para isso, um espécime de cada grupo foi triturado e transformado em pó. Este pó do material a ser analisado foi misturado em pó de KBr na proporção de 2 para 100 mg e, em seguida, compactado sob pressão de 10 ton, transformando-se em uma pastilha compacta. O espectro foi obtido pela diferença entre o espectro da mistura (amostra+KBr) e o espectro do KBr. Este teste tem a intenção de fornecer os espectros do sulfato de cálcio hemi-hidratado obtidos antes da espatulação, os espectros de cada um dos materiais formados nos diferentes grupos e verificar a possível formação de apatita após o ensaio de bioatividade.

3.9. Testes de Bioatividade *in vitro*

Os testes de bioatividade foram realizados utilizando um fluido corpóreo simulado, o SBF (simulated body fluid) desenvolvido por Kokubo³⁰, em 2006. O fluido é uma solução sintética de concentração iônica semelhante à do plasma sanguíneo. Na Tabela 2 estão relacionados os reagentes utilizados na preparação de 1000 mL de SBF convencional bem como suas respectivas quantidades.

Tabela2. Relação dos reagentes e suas quantidades para a preparação do SBF³⁰.

Ordem	Reagente	Fórmula Química	SBF
1°	Cloreto de sódio	NaCl	8,035 g
2°	Bicarbonato de sódio	NaHCO ₃	0,355 g
3°	Cloreto de Potássio	KCl	0,225 g
4°	Potássio fosfato dibásico trihidrato	K ₂ HPO ₄ . 3H ₂ O	0,231 g
5°	Cloreto de magnésio	MgCl ₂ .6H ₂ O	0,311 g
6°	Ácido clorídrico	HCl- 1M	39 mL
7°	Cloreto de cálcio	CaCl ₂	0,292 g
8°	Sulfato de sódio	Na ₂ SO ₄	0,072 g
9°	Tris-hidroximetil amino metano	((HOCH ₂) ₃ CNH ₂)	6,118 g

Para preparar o SBF, as massas dos reagentes foram medidas em uma balança analítica (Shimadzu AUW220D, Kyoto, Japão) e dissolvidas em um Becker de polipropileno com água deionizada a 36,5°C (temperatura média do corpo humano). O procedimento é dividido basicamente em três etapas. Na primeira, os reagentes do 1° ao 8° são dissolvidos um a um dentro da solução. Na segunda, utiliza-se o Tris hidroximetil amino metano (TRIS) e o *HCl* para ajustar o pH da solução em 7,4 (pH do sangue). Na terceira, por fim, o SBF é filtrado em uma membrana com poros de 0,2 µm com auxílio de uma seringa. Depois de preparado o SBF deve ser conservado em um refrigerador entre 5 e 10°C por até 28 dias.

As amostras, no formato de semi-disco, foram imersas em 50 mL de SBF em um frasco de polipropileno sendo mantidas constantemente a 36,5°C. A solução foi renovada a cada três dias.

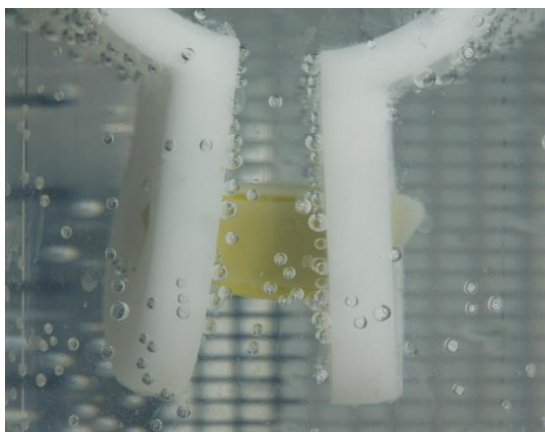


Figura 8. Amostra de sulfato de cálcio imersa em SBF a 36,5°C no teste de bioatividade.

Após 8 dias de imersão, a amostra de maior volume, que permaneceu no SBF, foi retirada da solução e armazenada em estufa a 40°C, para posterior análise, a fim de verificar a bioatividade do material.

4. RESULTADOS

4.1. Teste de resistência à compressão e deformação

Os valores obtidos de força máxima de compressão, resistência a compressão e deformação dos espécimes na eminência da fratura não apresentaram uma distribuição Normal e, sim, uma distribuição Gama. Desta forma, foi utilizado o teste ANODEV para análise estatística dos dados, com $p < 0,05$.

Os valores médios de resistência à compressão e deformação obtidos para os grupos experimentais estão mostrados na Figura 9. Pode-se notar que o maior valor de resistência à compressão axial foi registrado para o grupo 4 (soro) correspondendo a 63 ± 19 MPa. Em contrapartida, o menor valor observado foi para o grupo 2 (clorexidina) correspondendo a 26 ± 5 MPa. Tendo-se como referência o grupo recomendado pelo fabricante (gesso/água), que apresentou um valor de resistência à compressão de 39 ± 11 MPa, verificou-se que há variação significativa apenas entre os grupos 4 e 5, para maior e o grupo 2, para menor.

O aumento relativo da resistência à compressão dos grupos 4 e 5 em relação ao grupo referência é de 61,4% e 50,7%, respectivamente. Em contrapartida a diminuição relativa do grupo 2 em comparação ao grupo 1 é de 50,2%. A diferença entre os grupos 1, 3 e 6 foi menos expressiva para este requisito sendo que a variação entre elas não ultrapassa 15%. Observa-se que a mistura do gesso com as diferentes fases líquidas pode causar variações significantes quanto à característica avaliada neste ensaio, podendo chegar à ordem de 142,7% se comparados os grupos 2 e 4.

Os valores de deformação são obtidos a partir da razão entre a variação do comprimento do corpo de prova pelo seu comprimento inicial. No momento da fratura os valores de deformação foram relativamente baixos, sendo que nenhum deles deformou mais do que 0,5 mm, ou seja, não ultrapassou 0,13% do tamanho original do material. Comparando-se os valores de deformação entre os grupos, vemos que a maior diferença ocorre entre os grupos sangue e água visto que a variação percentual entre os mesmos é de 42,4, porém não houve diferença significativa entres os grupos.

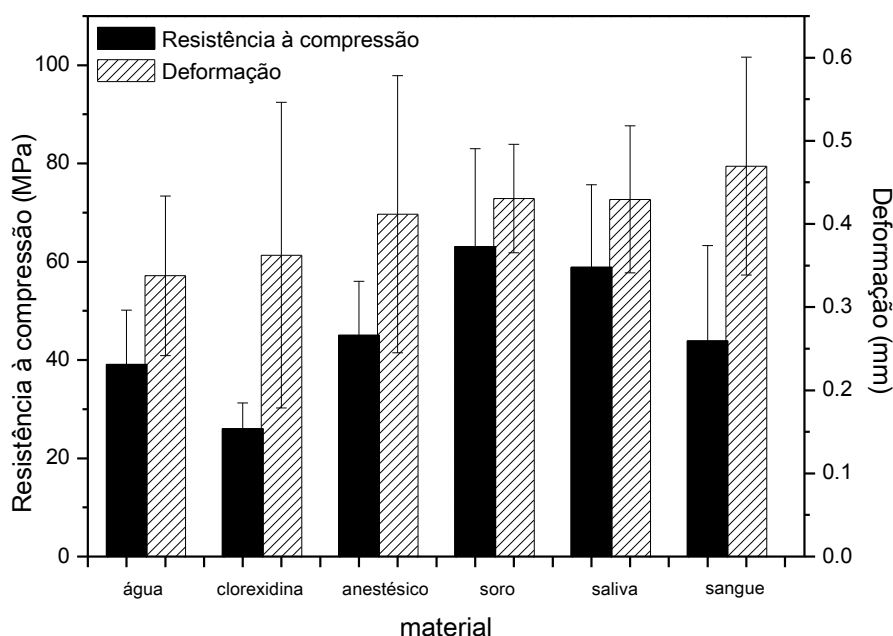


Figura 9. Valores de compressão e deformação do sulfato de cálcio para os grupos analisados após a espatulação (água, clorexidina, anestésico, soro, saliva e sangue).

4.2. Teste de Dureza Vickers

Os valores médios de dureza Vickers obtidos para os grupos experimentais estão mostrados na Tabela 3 e Figura 10. Pode-se notar que o maior valor de dureza superficial Vickers foi registrado para o grupo 1 (água destilada), correspondendo a $0,467 \pm 0,092$ GPa. Em contrapartida, o menor valor observado foi para o grupo 2 (clorexidina), correspondendo a $0,184 \pm 0,035$ GPa. Tendo-se como referência o grupo recomendado pelo fabricante (gesso/água) que apresentou um valor de dureza Vickers de $0,467 \pm 0,092$ GPa, verifica-se que há variação significativa entre os grupos. Comparando-se o grupo 1 (água) com os grupos 3, 4, 5 e 6, que correspondem ao anestésico, soro fisiológico, saliva e sangue, respectivamente, observa-se que estes possuem menos dureza superficial do que o grupo referência (água).

A diminuição relativa da dureza dos grupos 3, 4, 5 e 6 em relação ao grupo referência varia de 27,9% a 50,1%. Em contrapartida, o valor obtido para o grupo 2 é equivalente a 39% ao do grupo 1, ou seja, o grupo 1 tem um valor de dureza 152,7% maior do que o grupo 2.

Tabela 3: Valores de dureza Vickers para os grupos analisados.

Amostra	Hardness Vickers (GPa)	Hardness Vickers (HV)
Água	$0,467 \pm 0,092$	$47,65283 \pm 9,362$
Clorexidina	$0,184 \pm 0,035$	$18,7840 \pm 3,597053$
Anestésico	$0,365 \pm 0,054$	$37,2496 \pm 5,591454$
Soro fisiológico	$0,356 \pm 0,084$	$36,30558 \pm 8,550026$
Saliva	$0,342 \pm 0,073$	$34,88476 \pm 7,490411$
Sangue	$0,311 \pm 0,011$	$31,74293 \pm 9,900612$

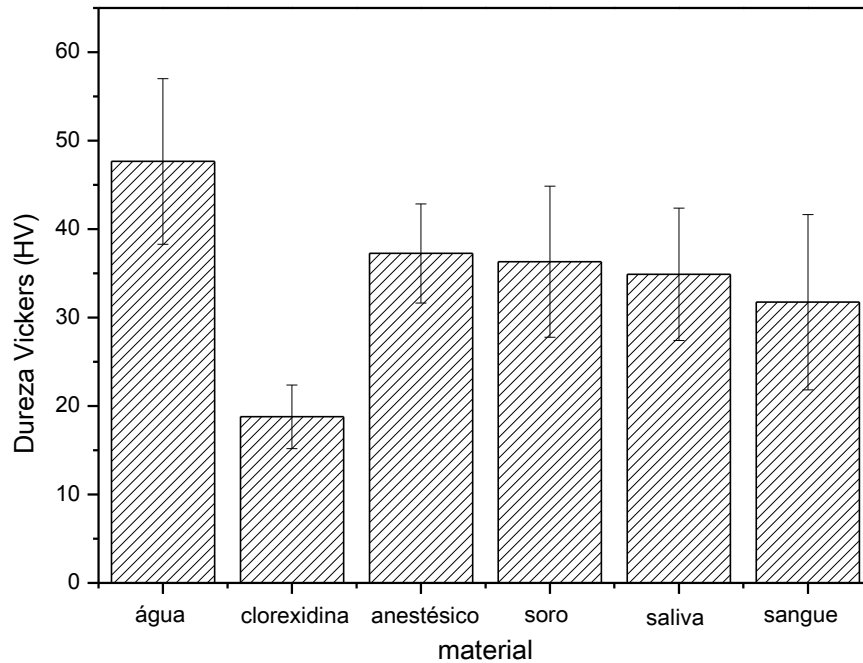


Figura 10. Valores de micro dureza Vickers (*Hv*) do sulfato de cálcio para os grupos analisados após a espatulação (água, clorexidina, anestésico, soro, saliva e sangue).

4.3. Teste de pH

Os valores de pH obtidos para os grupos experimentais utilizando-se 10cm^3 de pó para cada 25mL de água estão mostrados na Tabela 4. Podemos observar que houve uma pequena diferença entre os grupos medidos. A variação máxima, da ordem de 14,5%, se deu na comparação entre a amostra de Água e de Sangue. Todas as amostras apresentam pH entre 7,1 e 8,13 em uma temperatura em torno de 23 °C.

Tabela 4. Medidas do pH dos materiais obtidos por grupos na proporção pó/água de 1:2,5.

Grupo	Amostra	pH
G1	Água	8,13 a 22,7°C
G2	Clorexidina	7,30 a 22,6 °C
G3	Anestésico	7,58 a 22,8 °C
G4	Soro	7,42 a 23,3 °C
G5	Saliva	8,05 a 22,7 °C
G6	Sangue	7,10 a 22,7 °C

4.4. Difração de raios x

A Figura 11 mostra os difratogramas obtidos para o sulfato de cálcio antes da espatulação ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$) e após a espatulação para os diferentes grupos (água, clorexidina, anestésico, soro, saliva e sangue). Em todos os difratogramas observa-se a presença de picos de difração estreitos, que é uma característica de materiais cristalinos, ou seja, que possui ordem cristalina de longo alcance. A identificação de fases cristalinas foi feita a partir do banco de dados JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) utilizando o programa “X’ Pert HighScore” observando-se os padrões de raios x que mais se assemelhavam ao padrão obtido nesse trabalho e fazendo uma comparação entre os mesmos. Dessa maneira, foram identificadas as fases cristalinas do (*) $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$ e (\diamond) $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, correspondentes às fichas 83-438-JCPDS e 72-0596 - JCPDS, respectivamente. Pode-se perceber que mesmo após a espatulação, permanecem picos referentes à fase inicial $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$. Isso demonstra que a transição estrutural não ocorreu em 100% do material.

Ambas as fases cristalinas encontradas correspondem à estrutura cristalina monoclinica, porém, o sulfato de cálcio hemi-hidratado pertence ao grupo espacial I121 e o sulfato de cálcio di-hidratado pertence ao grupo espacial C12/c³¹. A Figura 12 mostra um desenho esquemático das estruturas cristalinas monoclinicas I121 e C12/c.

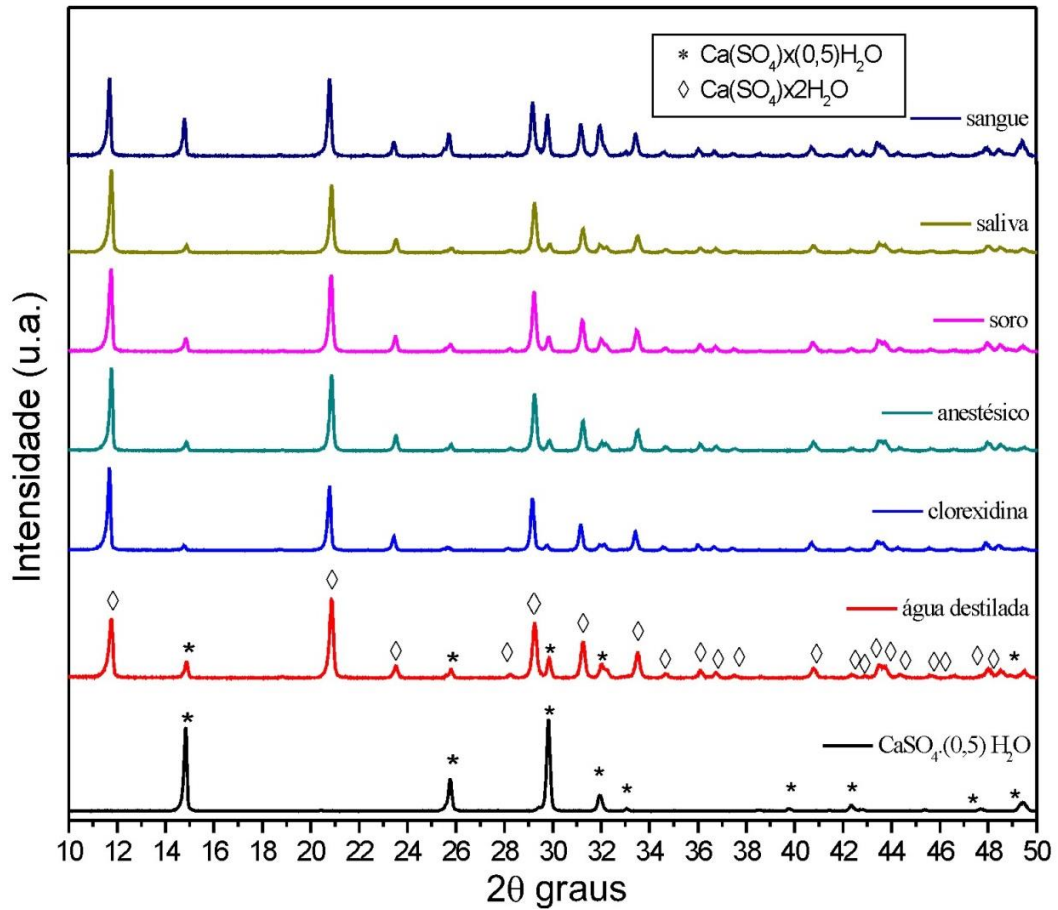


Figura 11. Difratogramas do sulfato de cálcio antes da espatulação $\text{CaSO}_4 \cdot (0,5) \text{H}_2\text{O}$ e após a espatulação (grupos: água destilada, clorexidina, anestésico, soro, saliva e sangue).

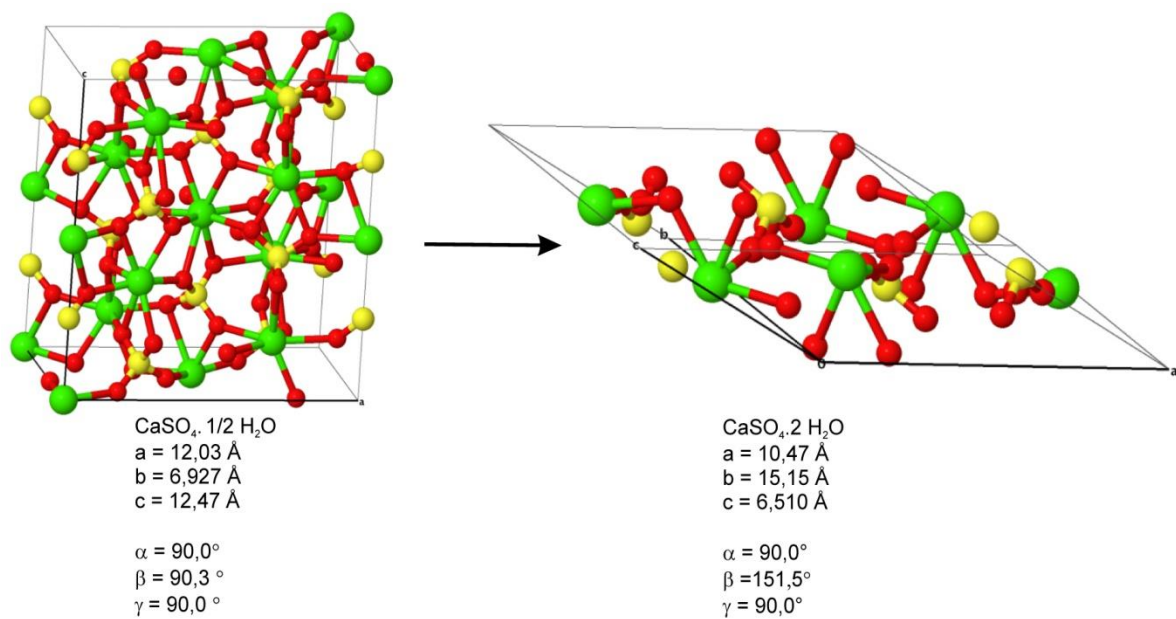


Figura 12. Figura ilustrativa da mudança estrutural que ocorre após a espatulação do sulfato de cálcio.

Obviamente, uma análise estrutural mais apurada é necessária para definir absolutamente o grupo espacial, mas, com os padrões JCPDS, observa-se claramente que há uma mudança estrutural entre o sulfato de cálcio antes e após a espatulação, isto é, os átomos do sulfato de cálcio se organizam de forma diferente a anterior incorporando moléculas de água em sua estrutura cristalina como ilustra a figura 12. No entanto, em todos os grupos de sulfato de cálcio di-hidratado verificou-se padrões semelhantes de estrutura, assim como a presença da fase líquida, mostrando a incorporação incompleta após a espatulação.

Pode-se, também, notar uma mudança tanto nos parâmetros de rede quanto nos ângulos entre eles na estrutura cristalina, mas não uma alteração química que altere as características desejadas do material para a finalidade deste estudo.

4.5. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

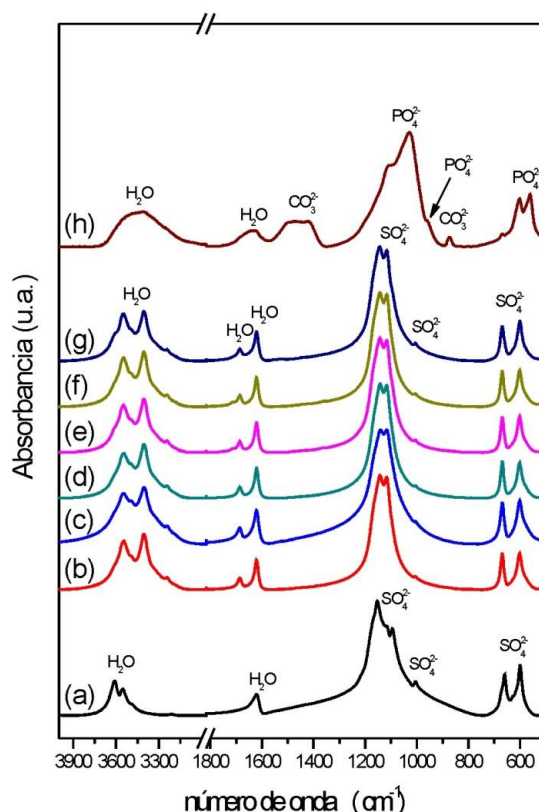


Figura 13. Espectros na região do infravermelho (FTIR), (a) Sulfato de cálcio hemi-hidratado obtido antes da espatulação. (b), (c), (d), (e), (f) e (g) correspondem aos espectros das misturas referentes aos grupos água, clorexidina, anestésico, soro, saliva e sangue respectivamente. (h) Espectro da camada de apatita formada no sulfato de cálcio.

Os espectros obtidos na região do infravermelho para o sulfato de cálcio antes e após a espatulação e após a imersão em SBF estão mostrados na Figura 13. O espectro (a) corresponde ao sulfato de cálcio hemi-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2}\text{H}_2\text{O}$), ou seja, antes da espatulação. Neste espectro foram observadas bandas referentes aos grupos funcionais SO_4^{2-} e OH^- . As bandas em $599, 659 \text{ cm}^{-1}$ são referentes a vibrações de dobramento do grupo SO_4^{2-} v4. Aparece uma fraca banda de estiramento simétrico v1 (SO_4) localizada em 1005 cm^{-1} . As bandas que ocorrem em $1095, 1116$ e 1153 cm^{-1} podem ser atribuídas a vibrações de estiramento da região de v3^{32,33}. Em 1621 cm^{-1} pode-se observar uma banda de dobramento da molécula de H_2O (δ (O-H))³³. Vibrações de estiramento desta molécula ocorrem também em 3546 e 3609 cm^{-1} que podem ser consideradas antissimétrica (v3) e simétrica (v1)³².

Os espectros (b), (c), (d), (e), (f) e (g) foram obtidos para o sulfato de cálcio di-hidratado ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), ou seja, após a espatulação. As bandas em 601 e 669 cm^{-1} são vibrações de dobramento v4 do grupo sulfato. Em 1004 cm^{-1} há uma banda fraca característica ao modo de vibração v1 e em 1116 e 1143 cm^{-1} aparecem as bandas de estiramento na região de v3^{32,34}. Os estiramentos na região do OH aparecem no modo de dobramento (v2) em 1620 e 1685 cm^{-1} e no modo de estiramento em uma complexa banda composta por pelo menos quatro bandas sendo elas $3243, 3403, 3490$ e 3548 cm^{-1} . As bandas obtidas da película de apatita formada no sulfato de cálcio após oito dias de imersão em SBF estão mostradas no espectro (h). A presença das bandas localizadas em 562 e 601 cm^{-1} é característica do modo de vibração de dobramento (O – P – O). Vibrações de estiramento (P – O) podem ser observadas na sobreposição de bandas fortes na região entre 1200 e 900 cm^{-1} ^{34,35}. Tanto essas vibrações de dobramento como as de estiramento confirmam a formação de apatita na superfície do sulfato de cálcio, pois ambas são atribuídas ao grupo fosfato (PO_4^{3-}). Bandas relacionadas ao grupo carbonato (CO_3^{2-}) são observadas em 873 cm^{-1} e entre 1573 a 1346 cm^{-1} ³⁶. Muitos autores atribuem as bandas em 1423 e 1454 cm^{-1} e a banda 873 cm^{-1} à substituição do tipo B, ou seja, quando os íons CO_3 são localizados nos sítios do PO_4 na estrutura da apatita^{35,36}. A banda larga entre 3700 a 3129 e as bandas nas regiões de 1620 e 1639 cm^{-1} indicam a presença de água absorvida na camada de apatita. Bandas de absorção para os grupos estruturais OH em 630 e 3570 cm^{-1} não foram

detectadas na apatita. Isso ocorre porque a apatita é carbonatada e amorfa após 8 dias de imersão^{37,38}. Provavelmente, deve ter ocorrido substituição do tipo A, ou seja, em que CO_3 são localizados nos sítios do OH estrutura da apatita^{36,38}.

4.6. Testes de bioatividade *in vitro*

Na Figura 14 são mostradas as amostras de sulfato de cálcio pertencentes ao grupo 1 (água destilada) que foram imersas em SBF. Após 8 dias de imersão, observou-se uma densa camada esbranquiçada sobre a superfície do mesmo (Figura 14 (a) e (b)). Conforme mostrado nos resultados de FTIR, as bandas de fosfato confirmaram que essa camada se trata da formação de apatita sobre a amostra do grupo 1. As Figuras 14 (c) e (d) correspondem à amostra que ficou imersa por 21 dias em SBF. Observa-se uma redução expressiva do tamanho da mesma bem como películas de fosfato de cálcio encontradas sobre o material. As Figuras 14 (e) e (f) são as amostras de 8 dias de imersão após sua retirada do SBF.

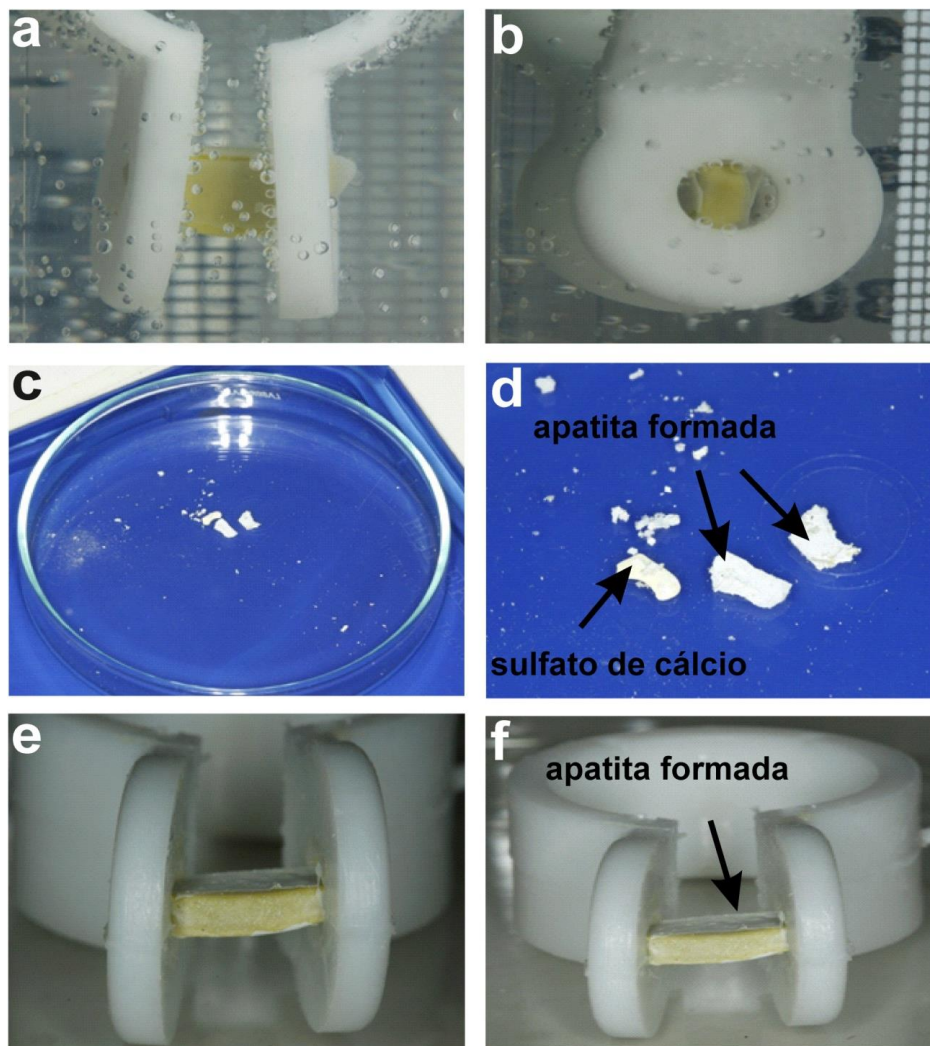


Figura 14. (a) e (b) Amostra de sulfato de cálcio do grupo 1 imersa em SBF por 8 dias com a formação de película de apatita. (c) e (d) sulfato de cálcio restante após 21 dias de imersão e películas de apatita. (e) e (f) Amostra de sulfato de cálcio, com camada de apatita, retirada do SBF após 8 dias de imersão.

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Neste trabalho, o propósito foi avaliar a possibilidade de uso da pasta do sulfato de cálcio em áreas cirúrgicas, assim como alvéolos frescos, seios maxilares e preenchimento de demais cavidades ou defeitos ósseos. Para tanto, fez-se necessário, primeiramente, o conhecimento das propriedades físico-químicas do material, tais como, biocompatibilidade, bioatividade, resistência mecânica, pH e estrutura química e molecular. Após essas

caracterizações, faz-se necessário os experimentos *in vivo* com cobaias animais para viabilizar o seu uso em humanos. Seguindo essa linha de uso cirúrgico, deve-se levar em consideração que no meio cirúrgico bucal estão presentes várias substâncias na fase líquida que podem ser agregadas intencionalmente ou não ao sulfato de cálcio durante sua reação química de presa. Dentre esses meios, comumente estão presentes a clorexidina, para antissepsia, o anestésico para analgesia, o soro fisiológico para irrigação do campo operatório, o sangue presente em todo ato cirúrgico, a saliva sendo produzida durante todo procedimento e a água destilada para agregação ao sulfato de cálcio. Apesar da pasta de sulfato de cálcio ter apenas contato superficial com tais substâncias nesta aplicação, acredita-se que a agregação uniformemente integral acentuaria as alterações das suas características próprias, por este motivo essas amostras foram escolhidas. Uma das características importantes e determinantes para o sucesso deste uso específico do material é a resistência à compressão, uma vez que no meio bucal ele estará sujeito a pressões constantes com incidências variáveis.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que ocorreu variação da resistência para as diferentes substâncias. Verificou-se que, para que ocorra fratura do material, foi necessária uma pressão, para o material observadamente mais friável (Clorexidina) de 26 MPa, que equivale a uma força de 8200 N ou aproximadamente 836 kgf. Nesta condição de força a deformação plástica presente no material foi de 0,36 mm, não apresentando significância. O estudo realizado por Jain (2012) mostra que a força de mordida habitual para indivíduos saudáveis está entre 550 e 790 N, e a força máxima registrada nesse estudo foi de 978,5 N. Mesmo o último valor é superado em 8 vezes pelo resultado obtido para a clorexidina, o grupo mais friável. Levando em consideração o uso do material no trans-cirúrgico espera-se que a força de mastigação seja diminuída consideravelmente durante o período pós-cirúrgico³⁹.

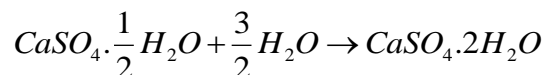
Para que ocorra a manutenção do arcabouço é necessário que o material apresente uma dureza de superfície adequada. Foi verificado que dentre todas as combinações de materiais o valor mínimo deste parâmetro ocorreu no grupo 2 (Clorexidina) chegando a 0,184 GPa, ou seja, 18.400 N/cm². O grupo que apresentou maior valor de dureza Vickers foi o recomendado pelo fabricante

que alcançou valor de 46.700 N/cm². Todas as amostras estão neste intervalo demonstrando que o material utilizado não sofreria deformação superficial para esta aplicação.

Com o intuito de permitir sua utilização *in vivo* é essencial que se conheça o pH do material obtido e suas possíveis alterações com as agregações das diferentes fases líquidas. Neste sentido, seria interessante que o material possuía uma concentração de hidrogênio iônico próximo aos valores dos tecidos circundantes, sendo, porém, aceitos valores distantes do fisiológico uma vez que os anestésicos locais com adrenalina tem pH de 3,3⁴⁰.

Neste estudo, o pH variou de 7,1 a 8,1 estando menos distante do pH fisiológico do que o pH dos anestésicos locais. É importante ser citado que o sulfato de cálcio hemi-hidratado, devido à sua concentração de hidrogênio iônico próximo ao fisiológico, deve ser esterilizado antes da aplicação clínica pois pode ocorrer proliferação bacteriana durante seu armazenamento. De acordo com estudos, a variabilidade bacteriana é restringida em valores de pH extremos, inferiores a 2 ou superiores a 10⁴¹.

No caso das análises de difratometria de raios X podemos perceber que após a hidratação do sulfato de cálcio hemi-hidratado, surgem novos picos de difração. Isso deve ocorrer, pois a reação química



faz com que os átomos se reorganizem e se estabilizem em uma nova estrutura cristalina devido à absorção de água na estrutura. O material formado desta transição, $CaSO_4 \cdot 2H_2O$, pertence à estrutura cristalina monoclinica de grupo espacial C12/c. No entanto, observa-se a presença de picos que não são provenientes da fase di-hidratada do sulfato de cálcio. Esses picos são provenientes da fase precursora hemi-hidratada.

Outro fato interessante a se observar é que em todos os grupos surgem os mesmos picos de difração. Assim, para todos os grupos, temos a mesma estrutura mineral que é formada pelas duas fases cristalinas. Diferenças entre as larguras dos picos também são observadas. Isso é apenas um indicativo de mudanças no tamanho dos cristalitos do material. Quanto mais estreito é o pico, maior é o tamanho do cristalito, ou seja, mais cristalino é o material⁴².

Nos espectros de FTIR observa-se uma grande diferença entre a amostra antes da espatulação e após a mesma, isso se deve à absorção de moléculas de água na estrutura do material alterando-se também a sua estrutura molecular. Para as misturas (grupos 1 a 6) observa-se as mesmas vibrações de grupos moleculares em todas as amostras, ou seja, para todas as amostras são detectadas vibrações nos mesmos valores de números de onda. Um alargamento das bandas é observado para a amostra do grupo 2 (clorexidina). No trabalho de Lins e colaboradores⁴³ sobre filmes de quitosana foi observado um comportamento semelhante, isto é, à medida que se adicionava clorexidina nos materiais, as bandas eram alargadas. A suposição da autora neste trabalho foi de que apesar dessa mudança na largura da banda, não houve alteração química do material. No grupo 6 (sangue) houve um pequeno alargamento principalmente nas bandas de estiramento ν_3 do SO_4 . Nos outros grupos, os espectros ficaram semelhantes entre si. Supõe-se que o alargamento nos grupos 2 e 6 pode ser devido à menor cristalinidade nesses grupos e não a uma alteração estrutural do material.

Em 1991, Kokubo e colaboradores afirmaram que o requisito essencial para um material se unir ao osso vivo é a formação de apatita em sua superfície quando em contato com o tecido vivo, e que a formação de apatita pode ser reproduzida em um fluido corpóreo simulado (SBF)³⁰. A formação da densa camada de apatita sobre a superfície do sulfato de cálcio confirma, portanto, a altíssima bioatividade desse material. Além disso, na Figura 13 (c) e (d), pode-se observar uma redução expressiva do tamanho do espécime o que implica em um material altamente reabsorvível nesse meio. Essa afirmação pode ser corroborada pelo fato de uma das amostras, confeccionada anteriormente com dimensões reduzidas, ter sido reabsorvida totalmente em 8 dias, permanecendo apenas uma grande deposição de hidroxiapatita no fundo do recipiente. No estudo de Bonadio (2011), o compósito bioativo TiO_2 – hidroxiapatita em imersão⁴⁴ em SBF, conclui-se que o material estudado era bioativo por ter formado uma camada de apatita na superfície do material. Esta camada, na sua maior espessura apresentava $13\mu\text{m}$. A camada de apatita formada no sulfato de cálcio após 8 dias de imersão em SBF foi significativamente maior, visto que pôde ser observada a olho nu.

Apesar dos resultados promissores, novos estudos laboratoriais mais abrangentes, amplos e específicos, além de estudos experimentais em animais (em andamento) e clínicos são necessários para se saber a total viabilidade do material para o uso proposto. Este trabalho forneceu perspectivas para novos estudos, tais como a utilização de gesso esterilizado, outras formas de aglutinação, propiciando apenas contato superficial com os líquidos presentes na cavidade bucal, ou, até mesmo, misturando todos eles na mesma amostra. Poder-se-ia verificar as diferenças entre o uso experimental do sulfato de cálcio hemi-hidratado, sem a fase líquida, ou o di-hidratado após a presa.

6. CONCLUSÃO

Esse trabalho demonstra que o sulfato de cálcio possui características físico-químicas promissoras para o seu uso clínico como agente de preenchimento de tecido ósseo. Nos vários testes realizados verificou-se que o sulfato de cálcio é bioativo, rapidamente reabsorvido, possui resistência suficiente para manutenção tridimensional óssea pós-cirúrgica imediata, tanto superficial como estruturalmente, possui um valor de pH que permite seu uso em meio fisiológico e não se deforma com a incidência das possíveis forças exercidas pelas estruturas bucais.

Todos os grupos elaborados para este trabalho apresentaram comportamentos similares para estas características, mostrando que o contato do sulfato de cálcio com os diferentes materiais, de fase líquida, presentes no meio bucal e no loco cirúrgico não causariam alterações que inviabilizassem seu uso para o fim proposto. Mais estudos experimentais, laboratoriais e clínicos fazem-se necessários para comprovar a eficácia do material.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

-
- [1] Buser D, Ingimarsson S, Dula K, Lussi A, Hirt HP, Belser UC. "Long-term stability of osseointegrated implants in augmented bone: a 5-year prospective study in partially edentulous patients". *Int J Periodont Restor Dent* 22 (2002) 109.
- [2] Leonhardt A et al. "Long-term follow-up of osseointegrated titanium implants using clinical, radiographic and microbiological parameters". *Clin Oral Implants Res*, 13 (2002)127.
- [3] Weber HP, Crohin CC, Fiorellini JP. "A 5-year prospective clinical and radiographic study of non-submerged dental implants". *Clin Oral Implants Res*;11 (2000) 144.
- [4] Juodzbaly G, Raustia AM, Kubilius R. "A 5- year follow-up study on one-stage implants inserted concomitantly with localized alveolar ridge augmentation". *J Oral Rehabil* 34 (2007) 781.
- [5] Simion M, Jovanovic SA, Tinti C, Benfenati SP. "Long-term evaluation of osseointegrated implants inserted at the time or after vertical ridge augmentation. A retrospective study on 123 implants with 1–5 year follow-up". *Clin Oral Implants Res*;12 (2001)35.
- [6] Chiapasco M, Zaniboni M, Boisco M. Augmentation procedures for the rehabilitation of deficient edentulous ridges with oral implants. *Clin. Oral Impl. Res.* 17 (2006) 136.
- [7] "Belser UC, Buser D, Hess D, Schmid B, Bernard JP, Lang NP. Aesthetic implant restorations in partially edentulous patients: A critical appraisal." *Periodontol* 2000 17 (1998)132.
- [8] Buser D, Dula K, Hirt HP, Schenk RK. Lateral ridge augmentation using autografts and barrier membranes: A clinical study with 40 partially edentulous patients. *J Oral Maxillofac Surg* 54 (1996) 420.
- [9] Mecall RA, Rosenfeld AL. "The influence of residual ridge resorption patterns on implant fixture placement and tooth position". Part I. *Int J Periodontics Restorative Dent* 11 (1991) 9.
- [10] Pietrokovski J, Massler M. "Alveolar ridge resorption following tooth extraction." *J Prosthet Dent* 17 (1967) 21.
- [11] Araújo MG, Lindhe J." Dimensional ridge alteration following tooth extraction. An experimental study in the dog." *J Clin Periodontol* 32 (2005) 212.
- [12] Hürzeler MB, Kohál RJ, Naghshbandi J, et al. "Evaluation of a new bioresorbable barrier to facilitate guided bone regeneration around exposed implant threads. An experimental study in the monkey." *Int J Oral Maxillofac Surg* 27 (1998) 315.
- [13] Okamoto T, Onofre Da Silva A. "Histological study on the healing of rat dental sockets after partial removal of the buccal bony plate." *J Nihon Univ Sch Dent* 25 (1983)202.
- [14] Becker W et al. "The use of e- PTFE barrier membranes for bone promotion around titanium implants placed into extraction sockets: A prospective multicenter study." *Int J Oral Maxillofac Implants* 9 (1994)31.
- [15] Nevins M, Mellonig JT. "Enhancement of the damaged edentulous ridge to receive dental implants: A combination of allografts and the Gore-Tex membrane." *Int J Periodontics Restorative Dent* 12 (1992) 96.

-
- [16] Moore WR, Graves SE, Bain GI. "Synthetic bone graft substitutes." *ANZ J Surg* 71 (2001) 354.
- [17] Wood RM, Moore DL. "Grafting of the maxillary sinus with intraorally harvested autogenous bone prior to implant placement." *Int J Oral Maxillofac Implants*. 3 (1988) 209.
- [18] Cammack, G.V 2nd, Nevins M, Clem DS 3rd, Hatch JP, Mellonig JT. "Histologic evaluation of mineralized and demineralized freeze-dried bone allograft for ridge and sinus augmentations". *Int J Periodontics Restorative Dent* 25 (2005) 231.
- [19] Artzi, Z, Tal, H and Dayan D. "Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets. Part I. Histomorphometric evaluation at 9 months." *J Periodontol* 71 (2000) 1015.
- [20] Benque EP, Gineste M, Heughebaert M. "Histological study of the biocompatibility of hydroxyapatite crystals in periodontal surgery. *J Biol Buccale*" 13 (1985) 271.
- [21] Small SA, Zinner ID, Panno FV, Shapiro HJ, Stein JI. "Augmenting the maxillary sinus for implants: report of 27 patients." *Int J Oral Maxillofac Implants*. 8 (1993) 523.
- [22] Scarano, A et al. "Maxillary sinus augmentation with different biomaterials: a comparative histologic and histomorphometric study in man." *Implant Dent* 2006;15(2):197–207.
- [23] McKee, JC, Bailey BJ. "Calcium sulphate as a mandibular implant. *Otolaryngol Head Neck Surg*" 92 (1984) 277.
- [24] Stubbs, D et al "In vivo evaluation of resorbable bone graft substitutes in a rabbit tibial defect model". *Biomaterials*, 25, (2004) 5037.
- [25] Lazary. A et al "Effect of gypsum on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells." *Biomaterials*, 28 (2007) 393.
- [26] Coetzee, A.S. "Regeneration of bone in the presence of calcium-sulfate." *Arch Otolaryngol Head Neck surg*, 106 (1980) 405.
- [27] Bell WH. "Resorption rates of bone and bone substitutes." *Oral Surgery* 17 (1964) 650.
- [28] American Dental Association. *Guide to dental materials and devices*. Chicago: ADA; 1976-78.
- [29] Oliver, W.C and Pharr, G.M "An improved technique for determining hardness and elastic modulus using load and displacement sensing indentation experiments". *J. Mater. Res.* 7 (1992) 1564.
- [30] Kokubo, Tand Takadama, H "How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity?" *Biomaterials* 27 (2006) 2907.
- [31] <http://www.portaldapesquisa.com.br/databases/sites>
- [32] Rosi. F et al. "On the use of overtone and combination bands for the analysis of the CaSO₄-H₂O system by mid-infrared reflection spectroscopy." *Applied Spectroscopy* 64 (2012) 956.
- [33] Mandal. P.K and Mandal T.K. "Anion water in gypsum (CaSO₄ . 2 H₂O) and hemihydrates (CaSO₄ . ½ H₂O). *Cement and concrete research* 32 (2002) 313.
- [34] Cromme. P et al. "Biomimetic mineralization of apatite on Ca²⁺ activated cellulose templates" *Materials Science Engineering C* 27 (2007) 1.
- [35] Muller. L et al. "Biomimetic apatite coatings—Carbonate substitution and preferred growth orientation" *Biomolecular Engineering* 24 (2007) 462.

[36] Stanciu G.A. et al. "Investigation of the Hydroxyapatite Growth on Bioactive Glass Surface" Journal of Biomedical & Pharmaceutical Engineering 1 (2007) 34.

[37] Stoch. A et al. "FTIR absorption–reflection study of biomimetic growth of phosphates on titanium implants." Journal of Molecular Structure 555 (2000) 375.

[38]Sun. L.J. et al."Synthesis and Characterization of Tb-incorporated Apatite Nano-scale Powders". J. Matter. Sci. Technol., 2012, 28(9), 773.

[39] Jain V, et al. Effect of occlusal splint therapy on maximum bite force in individuals with moderate to severe attrition of teeth. J Prosthodont Res (2012), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2012.05.002>.

[40]Malamed, S. F. Neurofisiologia. In: Manual de anestesia local. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 18, 2005.

[41]Madingan, M. T.; Martinko, J. M. & Parker, J. Microbiologia de Brock.10ª ed.São Paulo: Prentice Hall. 2004, 608 p.

[42]Bleocher L e Sasaki J.M. "Introdução à Difração de Raios x em Cristais" Apostila Universidade Federal do Ceará, 2000.

[43] Lins, CEC " Estudo *in vitro* da liberação controlada de clorexidina, incorporada em filme de quitosana, para potencial aplicação na cavidade oral." Dissertação de mestrado UFMG 2011.

[44] Bonadio, T.G.M. "Estudos dos Compósitos TiO₂-Hidroxiapatita e Nb₂O₅-Hidroxiapatita: Comportamento Físicomecânico, Estrutural e de Bioatividade". Dissertação de mestrado UEM (2011).