

Caracterização físico-química de biomateriais para enxerto ósseo de origem alógena e xenógena

Physicochemical characterization of biomaterials for bone graft of allogenic and xenogenous origin

Sabrina Serrão Dalapicula*
Márcio Baltazar Conz**

RESUMO

A Implantodontia vem apresentando excelentes resultados clínicos ao longo do tempo. Um bom planejamento está relacionado com o capital ósseo disponível. Entretanto, em locais onde temos a necessidade de utilizar enxertos ósseos, cabe ao profissional selecionar, dentre os vários biomateriais disponíveis, o que apresenta características ideais. Este trabalho tem como objetivo, caracterizar seis biomateriais de enxerto ósseo, sendo cinco de origem xenógena e um de origem alógena. A caracterização físico-química englobou análise granulométrica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), difração de raios-X (DRX), determinação da área superficial específica e cristalinidade das amostras. O resultado demonstrou que todas as amostras, exceto uma, eram constituídas de hidroxiapatita com diferentes intensidades de incorporação de carbonatos, com diferentes faixas granulométricas, área de superfície variando de 0,18 m²/g a 81,4 m²/g e cristalinidade variando de baixa a alta, demonstrando que apesar da semelhança de suas composições, os biomateriais analisados apresentaram grande diferença de parâmetros físico-químicos.

Unitermos - Biomateriais; Enxerto ósseo; Caracterização físico-química.

ABSTRACT

The Implantodontia comes presenting excellent clinical results throughout the time. The importance of a good planning this related with the available osseous capital, however in places where we have the necessity to use bone graft, fits to the professional to select, amongst the some available biomaterials, what it presents ideal characteristics. The aim of this work was to characterize six biomaterials of bone grafts five of xenogenous origin and one of allogeneic origin. Physicochemical characterization was carried out by using electron microscopy (SEM), X-ray diffraction (XRD), surface area (BET) measurement and crystallinity of sample. The result reported that all the samples, except the D, were constituted of hydroxyapatite with different intensities of carbonate incorporation, with different grain size bands, area of surface varying of 0,18 to 81,4 and crystallinity varying of low to high, demonstrating that although the similarity of its compositions the analyzed biomaterials present a big difference of physicochemical parameters.

Key Words - Biomaterials; Bone graft; Physicochemical characterization.

Recebido em: mai/2007
Aprovado em: fev/2008

* Especialista em Periodontia pela Universidade do Grande Rio; Mestre em Implantodontia Oral pela Unigranrio.

** Mestre em Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Coppe; Doutor em Engenharia Metalúrgica e de Materiais pela UFRJ; Professor de Implantodontia Oral da Unigranrio.

Introdução

A regeneração de defeitos ósseos com perda de tecido ósseo, resultante de traumas ou doenças, permanece como um desafio terapêutico na Odontologia, porque o rápido crescimento de tecido conjuntivo impede ou dificulta a formação de tecido ósseo novo entre os limites da lesão; e a alteração morfofuncional resultante do processo regenerativo pode levar à necessidade de vários procedimentos operatórios para sua adequada correção¹⁻².

Os tratamentos regenerativos dos defeitos ósseos podem apresentar dois tipos de resultado: cicatrização, que é caracterizada pelo reparo da ferida por um tipo de tecido diferente do tecido originalmente perdido no que diz respeito à morfologia e função; e regeneração, onde o reparo ocorre por um tecido idêntico ao tecido original preexistente³.

O objetivo primordial do tratamento cirúrgico é o preenchimento do defeito com um material que possa promover osteoindução e/ou osteocondução e a conseqüente osteogênese reparativa. No estágio atual do conhecimento, é consenso que o osso autógeno é o biomaterial mais adequado para alcançar esse objetivo. A sua integração aos tecidos vizinhos e sua capacidade de osteogênese têm se mostrado superiores a numerosos outros materiais utilizados com o mesmo propósito⁴. Entretanto, sua aplicação está limitada a cada caso em particular, ao estado do paciente, à localização e ao tamanho do defeito. Além disso, apresentam inconvenientes que limitam seu uso na prática clínica, exigindo, em alguns casos, procedimentos em ambiente hospitalar, com aumento de tempo e custo cirúrgico, a necessidade de outro sítio cirúrgico seja intra ou extrabucal, além de alguma resistência por parte dos pacientes⁵. Com a finalidade de superar tais limitações e também devido aos grandes desenvolvimentos científico e tecnológico, é cada vez mais crescente a utilização de biomateriais de origem sintética que possibilitam, em muitos casos, a diminuição ou a eliminação do uso de materiais de origem biológica.

Os biomateriais são materiais de origem natural ou sintética, que podem ser utilizados com o objetivo de tratar, aumentar ou restabelecer a função de qualquer tecido biológico que tenha sido lesionado ou perdido⁶. Os biomateriais são classificados usualmente de acordo com sua origem, quanto ao seu mecanismo de ação e de acordo com seu comportamento fisiológico. Quanto à sua origem podem ser classificados como: **a.** Autógeno: obtido do próprio paciente, quer seja de sítios doadores intra ou extrabucais⁷; **b.** Aloenxerto ou enxertos homogêneos: derivados da mesma espécie; **c.** Xenoenxerto ou enxertos heterogêneos: provêm de doadores de outra espécie, como exemplo osso de origem bovina⁸; **d.** Aloplásticos: são dispositivos de origem sintética⁹.

Quanto ao mecanismo de ação, podem ser:

Osteoindutores: quando possuem a capacidade de atrair células mesenquimais, que mais tarde se diferenciaram em osteoblastos; isto ocorre em virtude da presença de proteínas ósseas morfogenéticas (BPM) entre seus componentes¹⁰;

Osteocondutores: servem como arcabouço, sustentando uma estrutura por onde proliferam vasos sanguíneos, trazendo então os componentes necessários à formação óssea¹¹⁻¹²;

Osteogênico: o crescimento ósseo se dá em função das células viáveis, transferidas dentro do osso¹³;

Osteopromotores: caracterizado pelo uso de meios físicos que promovem o isolamento anatômico de um local, permitindo a seleção e proliferação de um grupo de células, predominantemente osteoblastos a partir do leito receptor e, simultaneamente, impedem a ação de fatores concorrentes inibitórios ao processo de regeneração¹⁴.

Por fim, os biomateriais podem ser classificados pela forma que interagem com os tecidos adjacentes: **a.** Biotoleráveis: não estabelecem uma osseointegração verdadeira, levando à formação de uma cápsula fibrosa, geralmente delgada, acelular e contínua, sendo que a formação de tecido fibroso é interpretada como uma resposta do tecido ao material, que estimula as células adjacentes a sintetizar, secretar e manter um tecido conjuntivo na interface¹⁵; **b.** Bioinertes: ao contrário, estabelecem contato direto com o tecido ósseo circundante; **c.** Bioativo: como as cerâmicas de fosfato de cálcio e os vidros bioativos, não só estabelecem osseointegração direta, como também interagem com os tecidos vizinhos de forma a estimular a proliferação de células, a síntese de produtos específicos e a adesão celular¹⁶.

Idealmente, os biomateriais não devem causar modificações físicas no tecido; devem ser farmacologicamente inertes, não devem causar reações alérgicas ou tipo corpo estranho, além de serem obtidos em quantidades e formas necessárias para o preenchimento do defeito ósseo¹⁷. Além disso, devem apresentar propriedades biomecânicas, biológicas e físico-químicas apropriadas.

As propriedades físico-químicas são responsáveis pela integração dos biomateriais ao tecido vivo e devem ser sempre avaliadas antes de serem utilizados em pacientes, após a realização de testes em laboratórios e, preferencialmente, em animais¹⁸⁻²⁰. As propriedades físicas são específicas à área de superfície ou formato (bloco, partícula), à porosidade (denso, macro ou microporoso) e à cristalinidade (cristalino ou amorfo) do produto. As propriedades químicas incluem a composição química, a substituição iônica e as impurezas dos elementos. Essas propriedades, somadas ao ambiente mecânico, influenciam na velocidade e extensão do processo de reabsorção do material enxertado, assim como na indicação ou restrição da sua aplicação clínica^{11,21}.

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar

seis biomateriais de enxerto ósseo utilizados na área odontológica, sendo cinco de origem xenógena e um de origem alógena, na forma de grânulos. A caracterização das amostras incluiu a análise granulométrica através do peneiramento do material, a razão molar Ca/P, forma das partículas através de microscopia eletrônica de varredura, cristalinidade, área superficial específica de amostra, além da identificação de fases presentes pela difração de raios-X.

Materiais e Métodos

Foram utilizados seis tipos de biomateriais de enxerto ósseo, que foram classificados em: A, B, C, D, E e F. Para este estudo foram selecionadas amostras dos seguintes materiais: **a.** Enxerto ósseo de matriz inorgânica de osso bovino cortical; **b.** Enxerto ósseo composto bovino microgranular; **c.** Enxerto ósseo humano cortical liofilizado desmineralizado; **d.** Enxerto ósseo de matriz orgânica de osso bovino cortical em grânulos; **e.** Enxerto ósseo bovino desproteínizado cortical em grânulos; **f.** Enxerto ósseo bovino desproteínizado medular em grânulos.

Todos os materiais utilizados na pesquisa foram produzidos por três diferentes fabricantes. A caracterização físico-química foi realizada por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV), peneiramento, difração de raios-X e área superficial específica (BET).

A análise da distribuição granulométrica das amostras foi realizada pelo peneiramento em peneiras Granulotest (Telastem Peneiras para Análises Ltda.) com passagem de 125 µm, 250 µm, 350 µm, 420 µm, 600 µm e 1.000 µm. Após a passagem nas peneiras descritas, foi realizada a pesagem dos biomateriais dentro da faixa granulométrica, utilizando uma balança digital de precisão, possibilitando a verificação da distribuição granulométrica das amostras.

A morfologia dos grânulos foi visualizada por microscopia eletrônica de varredura no laboratório de microscopia eletrônica da Coppe/UFRJ (Zeiss, modelo DSM 940 A). Utilizou-se 15 kV de aceleração de elétrons. O objetivo de se utilizar essa técnica foi o de obter uma imagem mais detalhada dos grânulos. Foram utilizados aumentos de 50 vezes, 100 vezes, 1.000 vezes e 5.000 vezes para visualização dos grânulos.

A caracterização estrutural foi realizada por difração de raios-X, no laboratório de química da Universidade Federal do Espírito Santo; utilizou-se um difratômetro de raios-x (DRX-Miniflex, Rigaku, Tóquio, Jactam), operado em 15 kV, 15 mA e radiação CuK α . Os dados foram obtidos de 5°-100° 2 θ . Os difratogramas obtidos foram comparados com padrões difratométricos de fases individuais disponíveis no JCPDS – Joint Committee of Powder Diffraction Standards para os vários fosfatos de cálcio.

O índice de cristalinidade das amostras foi determi-

nado utilizando a técnica preconizada por um pesquisador²², que avaliou a cristalinidade do material através dos espectros de raios-x, aplicando a seguinte fórmula: $X_c = 1 - (V_{112/300} / I_{300}) \times 100$, onde X_c é o índice de cristalinidade da amostra, $V_{112/300}$ corresponde ao vale existente no espectro de raios-x entre os planos (112) e (300); e I_{300} corresponde ao valor da intensidade do plano 300.

Resultados

Os resultados da avaliação granulométrica das amostras após o teste de peneiramento e também a faixa granulométrica indicada pelo fabricante estão apresentadas na Tabela 1.

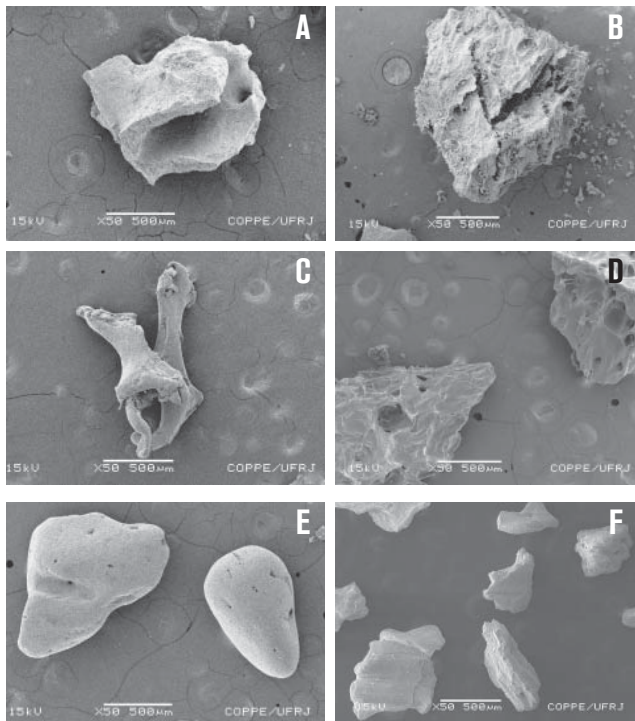
TABELA 1 - GRANULOMETRIA ENCONTRADA NESTE ESTUDO E A INDICADA PELOS FABRICANTES

Amostras	Granulometria Real (µm)	Granulometria Fabricante (µm)
A	< 125 a >1000	250-1000
B	< 125 a >1000	250-1000
C	125 a 600	250-710
D	125 a 1000	250-1000
E	< 125 a 600	250-1000
F	< 125 a 600	250-1000

Podemos observar na Tabela 1, que as amostras apresentaram diferentes resultados na variação granulométrica. Na Tabela 2, observa-se a massa de grânulos dentro da faixa granulométrica de cada uma das amostras.

Nas amostras A, B, C e D podemos observar que a maior parte dos grânulos se apresentava na faixa granulométrica entre 420 µm-1.000 µm, apesar da presença de partículas com diâmetro inferior a 250 µm com percentual não significativa. Essas partículas, inferiores a 125 µm, podem ser resíduos decorrentes do manuseio dos frascos no transporte dos biomateriais. Nas amostras E e F, verificamos um valor considerável na faixa granulométrica inferior ao informado pelo fabricante. Todas as amostras, com exceção da F, apresentaram mais de 65% de suas partículas entre as faixas granulométricas de 420 µm a 1.000 µm, enquanto que, na amostra F, a maioria dos grânulos apresentaram diâmetro de partícula na faixa entre 250 µm-420 µm. Observou-se que o peso da amostra A relatada pelo fabricante não foi equivalente ao encontrado após a pesagem das mesmas em balança digital. Essa diferença pode ter ocorrido devido à perda de material durante o processo de peneiramento.

A morfologia das partículas encontradas nas amostras dos biomateriais de enxerto ósseo foi observada através de microscopia eletrônica de varredura com aumentos de 50 vezes, 100 vezes, 1.000 vezes e 5.000 vezes e estão apresentadas nas Figuras 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f.



Figuras 1a, 1b, 1c, 1d, 1e, 1f
 Micrografias (MEV) das partículas dos biomateriais de enxerto ósseo com aumento de 50 vezes para as respectivas amostras: a. amostra A; b. amostra B; c. amostra C; d. amostra D; e. amostra E; f. amostra F.

Os grânulos apresentaram diferentes formas e tamanhos, além da presença de porosidade na superfície. Os poros são regiões nas quais os componentes do sangue e os materiais orgânicos podem residir, quando inseridos no osso, e representam as regiões onde existia um material vivo antes do processamento do biomaterial²¹.

A medida de área superficial realizada nos grânulos dos biomateriais de enxerto ósseo está apresentada na Tabela 3.

Na análise da área superficial específica das amostras apresentadas na Tabela 3, foi observada uma correlação dos resultados relacionados com os diferentes tamanhos de partículas e com a presença de porosidades na estrutura das amostras. As amostras B, C, D e F apresentam uma pequena área de superfície devido à presença de partículas maiores. As amostras A e E apresentaram uma maior área de superfície, apesar de suas partículas serem relativamente grandes. A razão do aumento da área de superfície dessas amostras decorre da presença de macro e microporosidades na estrutura dessas duas amostras. O resultado da amostra F, por ser comercializada como osso bovino mineralizado medular, deveria apresentar valor de área superficial maior que a amostra E, que é comercializada pelo mesmo fabricante como osso bovino mineralizado cortical.

TABELA 2 - MASSA DOS GRÂNULOS DENTRO DA FAIXA GRANULOMÉTRICA DAS AMOSTRAS

Amostra	<125 μm	(125<250) μm	(250<350) μm	350 μm	420 μm	600 μm	1.000 μm
A	0,0015g 0,31%	0,00068g 0,14%	0,0450g 9,20%	0,0946g 19,33%	0,1880g 38,42%	0,1585g 32,40%	0,0010g 0,20%
B	0,0032g 0,40%	0,0094g 1,17%	0,1038g 12,93%	0,0941g 11,72%	0,1837g 22,89%	0,3834g 47,76%	0,0251g 3,13%
C	0,0 g 0,00%	0,0183g 4,28%	0,0751g 17,55%	0,0658g 15,37%	0,1674g 39,11%	0,1014g 23,69%	0,0 g 0,00%
D	0,0g 0,00%	0,0075g 3,37%	0,0272g 12,21%	0,0192g 8,62%	0,0414g 18,59%	0,1181g 53,03%	0,0093g 4,18%
E	0,0190g 3,82%	0,0495g 9,95%	0,0620g 12,46%	0,0478g 9,60%	0,1316g 26,44%	0,1878g 37,73%	0,0g 0,00%
F	0,0019g 0,31%	0,0299g 4,88%	0,2782g 45,41%	0,1257g 20,52%	0,1053g 17,19%	0,0716g 11,69%	0,0g 0,00%

TABELA 3 - VALORES DA ÁREA SUPERFICIAL DAS AMOSTRAS

Amostras	Área Superficial (m ² /g)
A	81,4
B	2,45
C	0,18
D	0,89
E	77,3
F	3,18

TABELA 4 - ÍNDICE DE CRISTALINIDADE DAS AMOSTRAS

Amostras	Cristalinidade
A	Média
B	Média
C	Baixa
D	-
E	Alta
F	Alta

Os difratogramas de raios-x das amostras analisadas estão apresentados nas Figuras 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f. As amostras A, E, F apresentam os picos principais referentes à hidroxiapatita pura sintética, comparadas junto à faixa JCPDS-ICDD cartão 9-432. As amostras B e C apresentaram picos referentes à hidroxiapatita, porém, com a presença de outros componentes em sua composição. A amostra C, apesar de ser comercializada como osso humano desmineralizado, apresentou picos nos espectros referentes à fase inorgânica do tecido ósseo. A amostra D não apresentou picos no espectro analisado, devido à mesma tratar-se de matriz orgânica de osso bovino. A cristalinidade das amostras dos biomateriais de enxerto ósseo, analisadas no presente estudo, foi calculada através dos espectros de difração de raios-x e apresentada na Tabela 4. Foi utilizada como parâmetros para a classificação dos valores de cristalinidade a seguinte relação: cristalinidade baixa, < 20%; cristalinidade média, entre 20% a 35%; e a cristalinidade alta, > 35%.

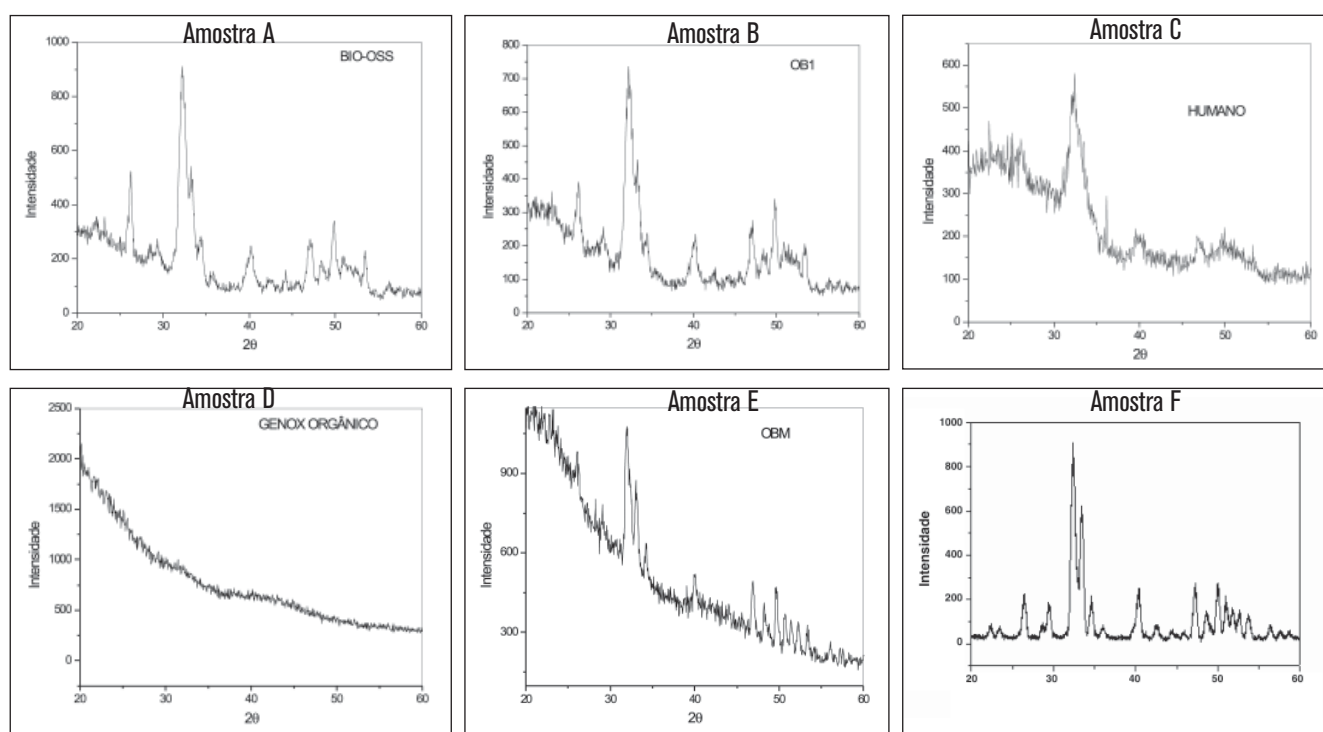
Discussão

O comportamento dos materiais de enxertos particulados depende, em parte, do tamanho e da sua distribuição granulométrica²³. A preocupação com a forma e o tamanho das partículas dos biomateriais tem sido uma preocupação constante. Entretanto, ainda é muito controverso o real papel do tamanho de partículas na resposta celular e tecidual aos enxertos ósseos²⁴. Alguns autores²⁵, após avaliarem o efeito da reatividade das superfícies das cerâmicas bioativas na

formação e na função das células ósseas, relataram que uma variação estreita no tamanho das partículas é importante para a promoção da diferenciação celular através do defeito ósseo, possibilitando, assim, uma vascularização adequada. Quando ocorre uma variação muito grande do tamanho das partículas, o espaço entre as partículas maiores tende a ser, rapidamente, preenchido pelas partículas menores, obstruindo o tecido reparador. Segundo a Academia Americana de Periodontia²⁶, o tamanho ideal da partícula dos materiais de enxerto deve estar entre 100 μm a 300 μm ²⁶. O tamanho reduzido da partícula do biomaterial permite rapidez de reabsorção por osteoclastos e conseqüente nova formação óssea²⁷. Porém, alguns autores²⁸ discordam dos autores acima, pois, um estudo clínico realizado em humanos, com o intuito de verificar o efeito do tamanho da partícula de um biomaterial de enxerto ósseo, no reparo de defeitos ósseos periodontais, observou resultados semelhantes, utilizando partículas de diferentes tamanhos (entre 250 μm e 500 μm e 850 μm e 1.000 μm).

Para ocorrer crescimento ósseo no interior dos biomateriais de enxerto ósseo, os poros devem apresentar um diâmetro de, no mínimo, 100 μm ²⁹⁻³⁰. A presença de poros na superfície da hidroxiapatita aumenta a área de superfície do material de enxerto, permitindo formação óssea no interior dos poros³¹; portanto, quanto maior a porosidade, mais rápida será a dissolução do material de enxerto³².

Pesquisadores³³ relatam que a presença de poros no material permite a colonização por células do tecido ósseo com as mesmas características do tecido periimplantar. Os



Figuras 2a, 2b, 2c, 2d, 2e, 2f
Difratogramas das amostras: A, B, C, D, E e F.

autores relatam que os poros devem apresentar tamanho entre 50 μm e 100 μm ou entre 250 μm e 300 μm para que ocorra colonização celular. Alguns autores³⁴ relataram que não ocorre formação óssea em poros com tamanho menor que 50 μm . No entanto, segundo outros autores, a presença de poros é importante^{24,35-47}, pois aumenta a área de superfície, resultando em aumento de atividade osteoblástica, diferenciação e nova deposição óssea. O aumento da área de superfície resulta em alta tendência para reabsorção, que induz a alta bioatividade celular. A intercomunicação entre poros proporciona um arcabouço para o crescimento ósseo dentro da matriz do implante, podendo prevenir a perda do mesmo. Os poros permitem o crescimento de canais vasculares que garantem a nutrição do enxerto. Houve relatos³³ de que o processo de formação óssea, no interior do poro, ocorre da parede do poro em direção ao centro, de forma centrípeta, sendo que alguns poros são preenchidos por novo osso após 16 semanas de implantação.

Sabe-se que os organismos degradam os fosfatos de cálcio implantados através da absorção realizada pelos osteoclastos e que, para essa absorção (dissolução), se utilizam de ácido clorídrico (HCl)²⁵. Assim, quanto maior a área superficial, maior será a facilidade de dissolução dos fosfatos de cálcio, o que representa uma maior degradação. A estrutura e reatividade dos materiais sólidos determinam a maneira como sua superfície interage com o meio. Assim, quanto maior a área de superfície das amostras, maior será a quantidade de células em contato com o material de enxerto²¹.

As amostras A e B apresentaram cristalinidade média comparada com as amostras C e D. A amostra E apresentou alta cristalinidade. Essa característica do material afeta a taxa de reabsorção, a dissolução do material e a sua estabilidade à alta temperatura⁴⁸. Estruturas cristalinas são mais resistentes

à alteração e à reabsorção em longo prazo e, por outro lado, os materiais que apresentam baixa cristalinidade são mais susceptíveis à decomposição em outras fases cristalinas^{21,25,49}.

Conclusão

As análises dos resultados obtidos das caracterizações físico-químicas dos biomateriais utilizados neste estudo permitiram que se chegassem às seguintes conclusões:

- Os biomateriais analisados apresentam diferente distribuição granulométrica e morfologia.
- As amostras A, B, C, E, F apresentaram, na difração de raios-x, picos referentes à hidroxiapatita com diferentes intensidades.
- As amostras analisadas revelaram valores diferentes de cristalinidade (baixa, média e alta) e da área de superfície (de 0,18 m^2/g a 81,4 m^2/g).
- O comportamento dos diferentes biomateriais utilizados como substitutos ósseos, quando inseridos no tecido ósseo, serão dependentes de suas propriedades físicas e químicas e devem ser sempre analisadas e levadas em consideração antes de sua aplicação. Dentre essas, destacaríamos como mais importantes à composição química, a cristalinidade, bem como, a área superficial.

As amostras apresentaram uma grande variabilidade nos resultados de suas características físico-químicas, apesar de serem empregadas para o mesmo propósito, segundo seus fabricantes.

Endereço para correspondência:

Sabrina Serrão Dalapicula

Av. Saturnino de Brito, 887/502 - Praia do Canto

29055-235 - Vitória - ES

sasaserrao@hotmail.com

Referências

1. Figueiredo AS, Takita LC, Goldenberg S - Comparação entre a hidroxiapatita porosa de coral e o enxerto ósseo autólogo em coelhos. *Acta Cir Bras* 1998;12(2):84-8.
2. Figueiredo AS - Estudo morfológico comparativo entre implantes de osso bovino desvitalizado, hidroxiapatita de coral, poliuretano de mamona e enxerto ósseo bovino autógeno, em coelhos. Dissertação (Doutorado em Técnica Operatória e Cirurgia Experimental). São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2000. 75p.
3. Carvalho PSP, Bassia APF, Violin LA. "Revisão e proposta de nomenclatura para os biomateriais". *Implant News* 2004;1(3):255-9.
4. Tsonis PA - Regenerative biology: the emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation* 2002; 70(8):397-409.
5. Shapoff CA, Alexander DC, Clark AE. Clinical use of a bioaction glass particulate in the treatment of human osseous defects. *Compendium Continuing Edu Dent* 1997; 18: 352-8
6. Helmus MN, Tweden K. "Materials Selection". In: *Encyclopedic HandBook of Biomaterials and Bioengineering*. 1995. Part A, v.1, pp. 27-59.
7. Garg AK. "Grafting Materials in Repair and Restoration". *Tissue Engineering Application in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Quintessence Books.
8. Bauer TC, Muschler GF. *Bonegrafts Materials In. Clinical Orthopedics and Related Research* 2000;21:10-27.
9. Bowers GM et al. Histological Evaluation of New Attachment Apparatus Formation in Humans. *J Periodontol* 1985;56:381-96.
10. Lindhe J, Karring T, Lang NP. *Tratado de periodontia clínica e implantologia oral*, 4a ed. São Paulo: Guanabara Koogan; 2005.
11. Burg KJL, Parter S, Kellan JF. *Biomaterial Developments for Bone Tissue Engineering*. *Biomaterials* 2000;21:2347-59.
12. Gatti AM, Monari E, Poli G et al. *Clinical Long-Term Evaluation of Hidroxyapatite Granules Implantation in Periodontal Defects*. *Key Engineering Materials* 2002;192-5: 921-4.
13. Mellonig JT et al. Comparison of Descalcified Freeze-Dried Bone Allograft and Porous Particulate Hydroxyapatite in Human Periodontal Osseous Defects. *J Periodontol* 1989; 60:647-54

14. Novaes JR et al. Recursos e soluções em implantes. In *Periodontia/Cirurgia/Cirurgia para Implantes*. São Paulo: Artes Médicas; 2000. p.447-66.
15. Kieswetter K, Schwartz Z, Dean DD, Boryan BD. The Role of Implants Surface Characteristics in the Healing of Bone. *Crit Rev Oral Biolmech* 1996;7(4):329-45.
16. Kirkpatrick CJ, Mitter Mayer C. Theoretical and Practical Aspects of Testing Potential Biomaterials in Vitro. *J Mater Sci Mater Med* 1990;1:9-13.
17. Zheng L, Wang Q - The current situation and future of extracellular matrix materials bone tissue engineering. *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi* 200118(3):470-4.
18. Legeros RZ et al. Calcium Phosphate Biomaterial: preparation, properties and biodegradation". In: *Encyclopedic Handbook of Biomaterials Anal. Part A*. Nova York: Ed Marcel 1995; v.1, 1429-63.
19. Conz MB, Soares GA, Granjeiro JMN. "Physicochemical characterization of six commercial hydroxyapatite for medical-dental applications as bone graft". *J Appl Oral Sci* 2005;13(2):136-40.
20. Dalapicula SS, Vidgal Jr GM, Conz MB et al. Characteristics physicochemical of the biomaterials used of bone grafts. *A critical review. Implant News* 2006;3(5): 487-91
21. Misch CE. Biomateriais Utilizados em Implantes Dentários. *Implantes Dentários Contemporâneos*. 2a edição. São Paulo: Editora Santos, 2000; 271-302.
22. Landi L, et al. Maxillary sinus floor elevation using a combination of DFDBA and bovine derived porous hydroxyapatite: a preliminary histologic and histomorphometric report. *Int J Periodont Res Dent* 2000; 20(6):574-83.
23. Misch CE. *Prótese sobre Implantes*. São Paulo: Editora Santos; 2004.
24. Sicca CM, Silva TL, Oliveira DT et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. *Rev FOB* 2000;8(1/2):1-10126
25. Ducheyne P, Qiu Q. Bioactive ceramics: the effect of surface reactivity on bone formation and bone cell function. *Biomaterials* 1999 Dec;20(23-24):2287-303.
26. American Academy Periodontology. Position Paper. Tissue banking of bone allograft used in periodontal regeneration. *J Periodontol* 2001;72(6):834-8.
27. Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. *Periodontology* 2000 1997;14:158-72.
28. Fucini ES, Quintero G, Gher ME et al. Small versus large particles of demineralized freeze-dried bone allografts in human intrabony periodontal defects. *J Periodontol* 1993; 64(9):844-84.
29. Carotenudo G et al. "Macroporous hydroxyapatite as alloplastic material for dental applications". *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 1999;10:671-6.
30. Tampieri A et al. "Porosity - graded hydroxyapatite ceramics to replace natural bone". *Biomaterials* 2001;22 (12):1365-70.
31. Werner J et al. Mechanical properties and in vivo cell compatibility of hydroxyapatite ceramics with graded pore structure. *Biomaterials* 2002;23:4285-94.
32. Legeros RZ. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. *Clin Ortho Res* 2002;395:81-98.
33. Engin NO, Tas AC. Manufacture of macroporous calcium hydroxyapatite bioceramics. *J European Ceramic Society* 1999;19:2569-72.
34. Ikeda N, Kawanabe K, Nakamura T. Quantitative comparison of osteoconduction of porous, dense A-W glass ceramic and hydroxyapatite granules (effects of granules and pore size). *Biomaterials* 1999;20(12):1087-9.
35. Nabers CL, O'Leary TJ. Autogenous bone transplants in the treatment of osseous defect. *J Periodontol* 1965;36:5-14.
36. Hiatt WH, Schallhorn RG, Aaronian AJ. The induction of new bone and cementum formation. IV Microscopic examination of the periodontium following human bone and marrow allograft, autograft and nongraft periodontal regenerative procedures. *J Periodontol* 1978;49(10):495-11.
37. Listgarten MA, Rosenberg MM. Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. *J Periodontol* 1979;50(7):333-44.
38. Kenney EB, Lekovic V, Han T, Carranza Jr FA, Dimitrijevic B. The use of a porous hydroxyapatite implant in periodontal defects. I. Clinical results after six months. *J Periodontol* 1985;56(2):82-8.
39. Bowers GM, Vargo JW, Levy B et al. Histologic observations following the placement of tricalcium phosphate implants in human intrabony defects. *J Periodontol* 1986;57(5):286-7.
40. Frank RM, Klewansky P, Hemmerle J, Tenenbaum H. Ultra structural demonstration of the importance of crystal size of bioceramic powders implanted into human periodontal lesions. *J Clin Periodontol* 1991;18(9):669-80.
41. Shi D, Jiang G, Wen X. In vitro bioactive behavior of hydroxyapatite-coated porous Al₂O₃. *J Biomed Mater Res (Appl Biomater)* 2000;53:457-66.
42. Cordioli G, Mazzocco C, Schepers E et al. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. *Clin Oral Impl Res* 2001;12(3):270-8.
43. Suh H, Han D, Park J, Lee DH, Han CD. A bone replaceable artificial bone substitute: osteoinduction by combining with bone inducing agent. *Artificial Organs* 2001;25(6): 459-66.
44. Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets: 2. Histochemical observations at 9 months. *J Periodontol* 2001;72(2):152-9.
45. Artzi Z, Nemcovsky CE, Dayan D. Bovine-HA spongiosa blocks and immediate implant placement in sinus augmentation procedures. Histopathological and histomorphometric observations on different histological staining in 10 consecutive patients. *Clin Oral Impl Res* 2002;13(4):420-7.
46. Betz RR. Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. *Orthopedics* 2002;25(5):561-70
47. Vaccaro AR. The role of osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. *Orthopedic* 2002;25(5):571-8.
48. Fulmer MT, Ison IC, Hankermayer CR, Constantz BR, Ross J. "Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatite. *Biomaterials* 2002;23:751-5.
49. Chang YL, Lew D, Park JB, Keller JC. Biomechanical and morphometric analysis of hydroxyapatite-coated implants with varying crystallinity. *J Oral Maxillofac Surg* 1999;57:1096-108.
50. Shapoff CA, Browsers GM, Levy B, Melloning JT, Yukna RA. The effect of particle size on the osteogenic activity of composite grafts of allogenic freeze-dried bone and autogenous marrow. *J Periodontol* 1980;51(11):625-30.