

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM COMPÓSITO $Al_2O_3/CaPs$ VISANDO USO NA CIRURGIA BUCOMAXILOFACIAL

Marcelino Guedes de Lima¹

Adriano Lima da Silva²

Elíria Maria de Jesus Agnolon Pallone³

Ana Cristina Figueiredo de Melo Costa⁴

INTRODUÇÃO

A investigação das biocerâmicas por cientistas das mais diferentes áreas tornou-se intensa a partir dos anos 70, com a necessidade de obtenção de novos materiais para substituição de partes do corpo humano que foram destruídas ou danificadas, por consequência dos materiais metálicos até então em uso, começarem mostrar problemas no implante. As biocerâmicas apesar da baixa propriedade mecânica quando comparada aos metais, possuem vantagem de serem os materiais que mais se assimilam com o tecido do osso [1].

O tipo de cerâmica aplicada a biomateriais são aquelas de baixa densidade, consequentemente de alta porosidade que são utilizadas em casos onde se necessita de enxertos que acelerem a recuperação do tecido removido ou danificado. Isso ocorre porque a porosidade do material permite que o tecido invada os poros. Fosfatos de cálcio (CaPs), do tipo tricálcio, tetracálcio, octacálcico e hidroxiapatita e a alumina são exemplos de biomateriais que foram investigados quanto suas reações *in vitro* e *in vivo*, revelando uma boa compatibilidade com células vivas [2].

No campo de desenvolvimento de implantes e/ ou preenchimentos ósseos, os fosfatos de cálcio (CaPs) possuem um perfil biológico altamente atrativo, pois apresentam composição química muito semelhante à fase mineral dos ossos e dentes (íons fosfato e cálcio). Podem, então, participar ativamente do equilíbrio iônico entre o fluido biológico e a cerâmica apresentando grande habilidade em formar ligações com o tecido hospedeiro sem, no entanto, apresentar toxicidade local ou sistêmica, resposta inflamatória ao implante e formação de um tecido fibroso envoltório [1].

A alumina, por sua vez, é um dos representantes mais destacados do grupo dos materiais cerâmicos especiais. Apresenta uma série de propriedades favoráveis, tais como: alta dureza, boa resistência ao desgaste, excelente estabilidade contra o ataque químico e oxidação e boa estabilidade térmica. Estas propriedades permitem a utilização da alumina como material abrasivo, revestimento de fornos, componentes para implantes ortopédicos e odontológicos, pedras preciosas e aplicações nas áreas espaciais e aeroespaciais. Outra aplicação da alumina com tamanhos de partículas na escala nanométrica visa atender às solicitações do crescente mercado de cerâmicas porosas usadas em membranas de

¹Professor Titular CCBS-UEPB, Doutor, Pesquisador, E-mail: marcelino.lima@hotmail.com;

²Mestre, Doutorando do Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais - UFCG, E-mail: adrianolimadasilva@hotmail.com;

³ Professora Titular, DCB/USP, Doutora e Co-Orientadora, E-mail: eliria@usp.br;

⁴Professora Titular, UAEMa-UFCG, Doutora e Orientadora, E-mail: ana.costa@ufcg.edu.br;

ultrafiltração e suportes de catalisador. Nestas aplicações, a alumina na fase cristalina alfa (α - Al_2O_3) é a preferida, uma vez que este material é quimicamente muito mais resistente do que as outras fases de transição da alumina [3-5].

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

Estes aspectos justificam, em si, a relevância deste trabalho, aliados ao crescimento no desenvolvimento de novos materiais para aplicações já existentes e também novas aplicações e com custo relativamente baixo, especificamente quando relacionados a área da odontologia. Assim este trabalho tem como objetivo a preparação de compósitos de alumina/fosfato de cálcio ($\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$) e avaliar sua citotoxicidade com a finalidade de se obter um possível biomaterial que possa ser utilizado como substituto de perdas óssea na traumatologia bucomaxilofacial.

DESENVOLVIMENTO

Biomateriais

Biomateriais são materiais artificiais desenvolvidos para uso em áreas de saúde com finalidade de substituir a matéria viva cuja função foi perdida. Inclui qualquer substância sintética ou natural que pode ser usada como tratamento para substituição total ou parcial de qualquer tecido, órgão ou organismo. Dentre as características essenciais desses materiais estão a biocompatibilidade com o tecido, atoxidade, pouco peso e baixo custo. Os mais requisitados no mercado atual são os polímeros e os cerâmicos pois podem tanto substituir o tecido vivo sem função como também estimular o crescimento de um novo tecido [6].

Características dos Biomateriais

As principais características que influenciam na escolha do biomaterial são a biocompatibilidade, exigências físicas e exigências químicas.

- Biocompatibilidade: O corpo tem uma extraordinária capacidade em determinar se um objeto é material do próprio corpo ou não. Qualquer substância estranha ao corpo tem o potencial de gerar uma resposta do sistema imunológico, podendo causar reações inflamatórias. Alguns materiais são mais biocompatíveis, isto é, eles são mais rapidamente integrados ao organismo sem reações inflamatórias. Os fatores determinantes mais importantes são a natureza química e a textura física da superfície de um objeto [5].

- Exigências Físicas: Um biomaterial deve satisfazer demandas severas. Os tubos que são utilizados para substituir uma artéria defeituosa devem ser flexíveis e não podem fechar quando dobrados ou sofrer distorções. Os materiais usados nas substituições de juntas devem ser resistentes ao desgaste. Uma válvula cardíaca artificial deve abrir e fechar 70 a 80 vezes por minuto, dia após dia, por muitos anos. Lembrando que qualquer defeito que ocorra nesses materiais põe em risco a vida das pessoas que os recebem.

-Exigências Químicas: Os biomateriais devem ser aprovados para serem usados em qualquer aplicação médica. Diante disto todas substâncias presentes no biomaterial deve permanecer inócuos durante toda a vida, ou seja, devem ser inofensivos por toda vida, já que poderão ficar dentro do organismo por um longo período de tempo [8].

Biocerâmicas

A utilização de cerâmicas como biomateriais remonta a 1894, quando Dreesman relatou o uso de gesso ($\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$) como um possível substituto para ossos. Este material apresenta uma resistência mecânica muito baixa e é completamente reabsorvido pelo organismo, resultando em uma rápida fragmentação e degradação. Tais propriedades pouco atrativas praticamente excluíram a utilização do gesso como biocerâmica implantável [9].

A década de 70 marcou o início do uso mais intenso de materiais cerâmicos com propriedades que possibilitam a sua classificação como biocerâmicas. A primeira biocerâmica com uso muito difundido neste período foi a alumina densa ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), que se apresenta como bioinerte. Este material, devido a sua boa biocompatibilidade e elevada resistência mecânica, vem sendo usado com frequência até hoje em próteses ortopédicas que substituam ossos ou parte deles que são submetidos, na sua atividade funcional, a esforços elevados. Exemplos típicos do emprego de alumina são as próteses para a substituição da cabeça do fêmur que faz a articulação com o íliaco e a substituição de dentes por dentes artificiais implantáveis [10].

As biocerâmicas de ortofosfato de cálcio são utilizadas em uma série de aplicações diferentes em todo o corpo, cobrindo todas as áreas do esqueleto. As aplicações incluem implantes dentários, dispositivos percutâneos e uso no tratamento periodontal, tratamento de defeitos ósseos, tratamento de fratura, substituição total da articulação (aumento de osso), ortopedia, reconstrução craniomaxilofacial, otorrinolaringologia e cirurgia da coluna vertebral [13].

METODOLOGIA

Materiais

- a) Alumina comercial: Al_2O_3 AKP – 53 Sumitomo Co. Japan, com 99,995% de pureza, tamanho de partícula de $0,2 \mu\text{m}$ e área superficial de $13,6 \text{ m}^2/\text{g}$;
- b) Hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) P.A. fabricado pela VETEC;
- c) Ácido fosfórico (H_3PO_4) P.A. fabricado pela VETEC;
- d) Água deionizada (H_2O).

Métodos

Obtenção do Fosfato de Cálcio (CaPs)

O fosfato de cálcio (CaPs) foi sintetizado pelo método de precipitação, envolvendo uma reação ácido-base denominada neutralização entre as soluções de ácido fosfórico (H_3PO_4) e hidróxido de cálcio [$\text{Ca}(\text{OH})_2$] com concentração 1M, obedecendo a relação de fósforo/cálcio = 1,67 [11]. A solução de hidróxido de cálcio foi submetida à agitação constante em um misturador/aquecedor IKA®RH *basic* KT/C até atingir a temperatura de 80°C . Em seguida a esta solução, adicionou-se gota a gota a solução de H_3PO_4 previamente preparada, agitando constantemente, até atingir viscosidade de uma pasta que propicie um meio adequado para manter em suspensão as partículas do CaPs. Depois de atingida a consistência da viscosidade desejada, a solução permaneceu em estufa FANEM Modelo 315 a 110°C por 24 horas.

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

Preparação dos Compósitos $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$

Os compósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ foram obtidos usando percentual de 0, 5, 10, 15, 20 e 30 % em massa de CaPs em relação a massa total da Al_2O_3 . Os compósitos obtidos foram designados conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Nomenclatura adotada para designar os compósitos de $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$. Fonte: Pesquisa, 2013.

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

Ensaio de Citotoxicidade

Buscando avaliar a viabilidade do uso dos compósitos $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{CaPs}$ como substituto de perdas óssea na odontologia bucomaxilofacial foi averiguado a análise *in vitro* por meio de ensaios de citotoxicidade. Este método representa uma simulação *in vitro* da filtração e difusão dos compósitos na forma de disco em placas de cultivo celular. Foi utilizada uma câmara pulpar laboratorial, “*In Vitro Pulp Device*” (IVPD), fazendo o cultivo de células odontoblastóides MDPC-23 [12].

Para quantificar o material e/ou seus componentes que se difundem através do compósito (disco), foram utilizados radioisótopos para marcar o material experimental e medir a concentração do material difundido por calorimetria, espectrofotometria, ou cromatografia [12].

Análise Estatística para Citotoxicidade

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

A partir dos resultados de citotoxicidade foram escolhidas as amostras de compósitos com resultados apreciáveis.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Figura 1 encontram-se ilustrados os difratogramas de raios X para amostra de α -alumina comercial (AC) e da amostra de fosfato de cálcio (CaPs) sintetizado e calcinado a 900 °C.

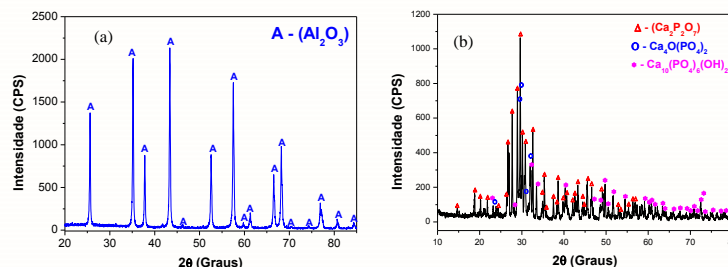


Figura 1 - Difratogramas de raios X: (a) AC e (b) CaPs.

Observa-se na Figura 1a, a presença da fase cristalina majoritária romboédrica da alumina (Al_2O_3) (ficha JCPDS 75 – 0783) sob a forma do mineral coríndon. Estes resultados confirmam a característica do material fornecido pela empresa Sumitomo Co. Japan. A fase coríndon é conhecida como a fase mais estável da alumina, que é encontrada em temperaturas acima de 1290 °C [14].

De acordo com o difratograma de raios X apresentado na Figura 1b, observa-se a formação da fase tetragonal do pirofosfato de cálcio ($\beta\text{-Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$) (ficha padrão JCPDS 09-0346) como fase majoritária, além da presença da hidroxiapatita [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$] (ficha JCPDS 86-0740) e do fosfato tetracálcio [$\text{Ca}_4\text{O}(\text{PO}_4)_2$] (ficha JCPDS 25-1137) como fases secundárias. A presença da fase pirofosfato de cálcio como fase majoritária possivelmente foi consequência em virtude de excesso de ácido fosfórico, pois durante a preparação o H_3PO_4 (60 mL) deve ser adicionado lentamente a solução de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) (100 mL) para atingir a relação $\text{Ca}/\text{P} = 1,67$.

Na Figura 2 ilustra as isotermas de adsorção/dessorção de N_2 como resultado da caracterização textural da alumina pura e do fosfato de cálcio. De acordo com a classificação da IUPAC, observa-se para a alumina (Figura 2a) um perfil de isoterma do tipo IV, que é característico de materiais mesoporosos (dimensão de poros entre 2 e 50 nm), e, também, um discreto *loop* de histerese do tipo H3, característicos de poros em fendas originários de agregados de partículas.

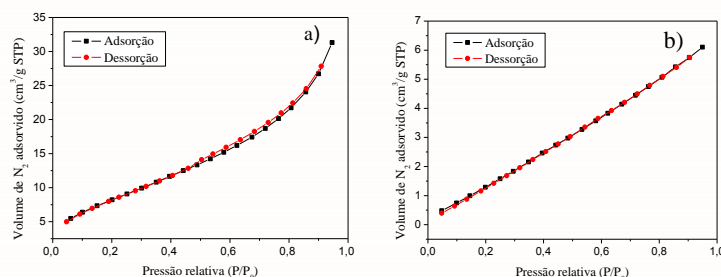


Figura 2 - Isotermas de adsorção/dessorção de nitrogênio: (a) alumina e (b) fosfato de cálcio.

Observa-se mediante a Figura 2b, um perfil de isoterma do tipo II, que é característico de materiais macroporosos (dimensão de poros de 50 nm). Porém o *loop* de histerese foi do tipo H3, característicos de poros em fendas originários de agregados de partículas, semelhante ao observado para a amostra de alumina comercial.

Na Tabela 2 encontram-se os valores de área superficial (S_{BET}), raio de poro (R_p), volume de poro (V_p) e tamanho de partícula (D_{BET}) referente à alumina e ao fosfato de cálcio.

Tabela 2 - Valores de área superficial (S_{BET}), raio de poro (R_P), volume de poro (V_P) e tamanho de partícula (D_{BET}). **Fonte:** Pesquisa, 2013.

Amostras	S_{BET} (m^2/g)	R_P (Å)	V_P (cm^3/g)	D_{BET} (nm)
AC	15,25	19,41	0,020	99
CaPs	3,62	15,62	0,004	531

Observa-se que a alumina possui uma área superficial cerca de 76,3 % maior que a área superficial do fosfato de cálcio, resultando em um volume de poro (V_P) e raio de poro (R_P), também 80 e 19,52 % superior que o do fosfato de cálcio. Conseqüentemente, o tamanho de partícula da alumina, cujo valor foi 99 nm, foi inferior 81,35 % que o do fosfato de cálcio, cujo valor foi 531 nm.

A Figura 3 e 4 apresentam as micrografias em campo claro obtidas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e o padrão de difração para α - Al_2O_3 comercial e para o CaPs sintetizado, respectivamente.

Observa-se mediante a Figura 3a e 3b, uma morfologia homogênea, constituída de partículas com formato aproximadamente esférico com tamanho variando de 67 a 175 nm, e tamanho médio de 128 nm. No padrão de difração de elétrons observam-se anéis com orientação desordenada, sugerindo a presença de partículas nanométrica. A abertura selecionada permitiu revelar os principais anéis correspondentes a estrutura da alumina.

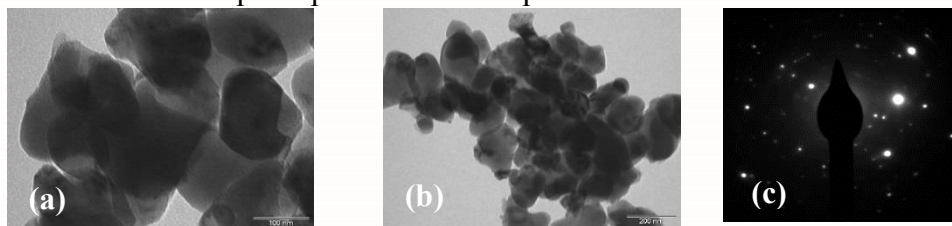


Figura 3 - (a) e (b) MET em campo claro, (c) padrão de difração da alumina comercial. **Fonte:** Pesquisa, 2013.

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

Nas micrografias do CaPs (Figura 4a e 4b) observa-se partículas com formato irregular, pré-sinterizadas (sem porosidade interpartícula) e aglomerada.

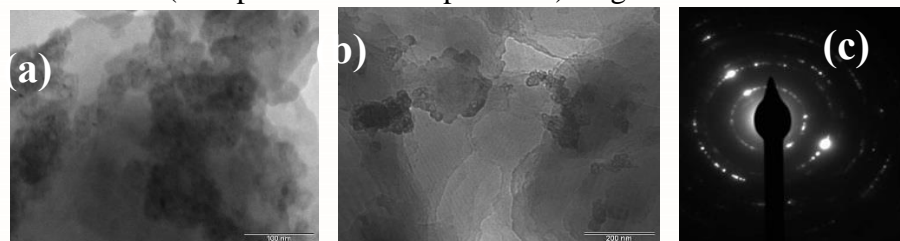


Figura 4 - (a) e (b) MET, e (c) padrão de difração para CaPs. **Fonte:** Pesquisa, 2013.

As partículas dos CaPs obtido via método direto apresentaram tamanho 58,67% inferior ao tamanho de partícula reportado por Volkmer et al. (2007), quando obtiveram pós de α -fosfato tricálcio por meio do método de síntese por combustão, tendo como precursores de reação o nitrato de cálcio ($Ca(NO_3)_2$) e o fosfato de amônia bibásico ($(NH_4)_2HPO_4$), que foi de 60 nm. Desta forma, verifica-se que pelo método de via direta foi mais eficiente na obtenção de partículas nanométricas.

Na Figura 5 ilustra a análise MTT dos compósitos, controle negativo e controle positivo para citotoxicidade. Os dados foram normalizados de acordo com a equação (1), para o cálculo da viabilidade celular (VC):

$$\% VC = \frac{AC-AB}{ACCP-AB} \times 100 \quad (1)$$

Mediante a Figura 5 percebe-se que os grupos contendo compósito 0C (correspondente a Al_2O_3 pura sem adição de CaPs) ou com os respectivas adição de CaPs, compósitos 5C, 10C, 15C, 20C e 30C não apresentam citotoxicidade se comparados ao controle negativo (papel de filtro). No entanto, para validar o teste MTT, verifica-se claramente que o controle positivo para a citotoxicidade (luva de látex) apresentou citotoxicidade, ocorrendo morte celular. Após 24 horas de incubação o controle positivo, ocorreu um decréscimo de 47 % no número de células viáveis, valor este que aumentou para 62 % após 48 horas.

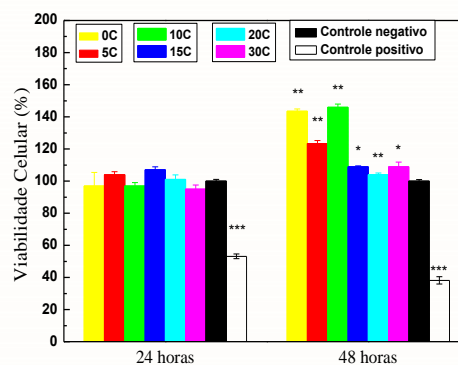


Figura 5 - Viabilidade celular apresentada para os compósitos. Como controle positivo para a citotoxicidade - luva de látex. Para o controle negativo para a citotoxicidade - papel de filtro. Amostras coletadas com o n = 5. * p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001. **Fonte:** Pesquisa, 2013.

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

A Tabela 3 evidencia os valores de viabilidade celular determinados para os compósitos usando como controle positivo para a citotoxicidade a luva de látex e para o controle negativo para a citotoxicidade o papel de filtro para período de incubação de 24 e 48 horas. Pode-se verificar que para o tempo de incubação de 24 horas todos os compósitos apresentaram viabilidade celular, visto que estatisticamente foram próximos ao valor de viabilidade celular do controle negativo. Ressaltando um aumento de 4,0; 6,0 e 4,0 % para os compósitos 5C, 15C e 20C, comparando ao controle negativo. Analisando o tempo de incubação de 48 horas, verifica-se que todos compósitos apresentaram viabilidade celular superior ao controle negativo, destacando-se a amostra AC e os compósitos 5C e 10C com percentual de aumento de viabilidade celular em relação ao controle negativo de 30; 19 e 32 %, respectivamente.

Tabela 3 - Valores de viabilidade celular (VC) para os compósitos, controle positivo (CP) e controle negativo (CN) para período de incubação de 24 e 48 horas. **Fonte:** Pesquisa 2013.

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

Os estudos de viabilidade celular realizada na amostra de alumina (AC) e nos compósitos foram semelhante aos resultados reportados por Afzal et al., 2012, quando avaliaram a viabilidade celular de biocompósitos de HAp-Al₂O₃-YSZ sinterizados por spark plasma, avaliada utilizando fibroblasto de células L929 e também semelhantes aos resultados. Estes resultados nos mostram também que a Al₂O₃ é um material não citotóxico assim como a mistura dos fosfatos sintetizadas (CaPs), com predominância da fase pirofosfato de cálcio utilizadas para obtenção dos compósitos Al₂O₃/CaPs.

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

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O método de precipitação possibilitou a obtenção de fosfatos de cálcio com sucesso, apresentando área superficial (3,62 m²/g), tamanho de partícula médio de 24,8 nm e tamanho de aglomerado em torno de 500 nm, sendo a fase majoritária o pirofosfato de cálcio, e hidroxapatita e fosfato tetracálcio presentes como fases secundárias;
- Os resultados das caracterizações para α -Al₂O₃ estão coerentes com os resultados fornecidos pelo fabricante, α -Al₂O₃ coríndon, com área superficial 15,25 m²/g, tamanho de partícula médio 128 nm (aproximadamente 0,13 μ m) e tamanho de aglomerado de 20 μ m;
- O estudo *in vitro* (citotoxicidade) indicou crescimento celular para todos os implantes avaliados, sendo o compósito com 10 % de CaPs foi biocompatível e apresentou maior viabilidade celular (32 % em comparação ao controle negativo);
- O compósito 10% de CaPs, estudado mostrou-se viável para utilização na traumatologia bucomaxilofacial como substituto de perda óssea.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem o apoio financeiro das agências de fomento, CNPQ, CAPES/Rede Nanobiotec-Brasil; Inct-INAMI e JHs Biomateriais;

REFERÊNCIAS

- [1] KAWACHI, E. Y., BERTRAN, C. A., REIS, R. R., ALVES, O. L., Biocerâmicas: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. *Química Nova*, v. 23, n.4, p. 518-522, 2000.
- [2] VANDERSCHOOT, P. Treatment Options and Development of a Vertebral Replacement. Implant, Tese de Doutorado. Holanda: Universidade Católica de Leuven, 2002.
- [3] TAN, F.; NACIRI, M.; DOWLING, D.; AL -RUBEAI, MOHAME. *In vitro* and *in vivo* bioactivity of CoBlast hydroxyapatite coating and the effect of impaction on its osteoconductivity. *Biotechnology Advances*, v. 30, p. 352–362, 2012.
- [4] NOELIA L.; D'ELÍA, A.; GRAVINA, N.; RUSO, J. M.; LAIUPPA, J. A. SANTILLÁN, G. E. MESSINA, P. V. Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: Effects on mineral coating morphology and growth kinetic. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v.1830, p. 5014-5026, 2013.
- [5] PON-ON, W.; CHAROENPHANDHU, N.; TANG, I-M.; JONGWATTANAPISAN, P.; KRISHNAMRA, N.; HOONSAWATF, R. Encapsulation of magnetic CoFe_2O_4 in SiO_2 nanocomposites using hydroxyapatite as templates: A drug delivery system. *Materials Chemistry and Physics*, v. 131, p. 485–494, 2011.
- [6] WIJESINGHE, W.P.S.L.; MANTILAKA, M.M.M.G.P.G.; PREMALAR, E.V.A.; HERATH, H.M.T.U.; MAHALINGAM, S.; EDIRISINGHE, M.; RAJAPAKSE, R.P.V.J.; RAJAPAKSE, R.M.G. Facile synthesis of both needle-like and spherical hydroxyapatite nanoparticles: Effect of synthetic temperature and calcination on morphology, crystallite size and crystallinity. *Materials Science and Engineering: C*, v.42, p.83-90, 2014.
- [7] SAERI, M. R.; AFSHAR, A.; GHORBANI, M.; EHSANI, N.; SORRELL, C. C. The wet precipitation process of hydroxyapatite. *Materials Letters*, 57, 4064–4069, 2003.
- [8] WIJESINGHE, W. et al. Facile synthesis of both needle-like and spherical hydroxyapatite nanoparticles: Effect of synthetic temperature and calcination on morphology, crystallite size and crystallinity. **Materials Science and Engineering: C**, v. 42, p. 83-90, 2014. ISSN 0928-4931.
- [9] Dreesman, H.; *Beitr. Klin. Chir.* 1894, 9, 804.
- [10] HULBERT, S. et al. Attachment of prostheses to the musculo-skeletal system by tissue ingrowth and mechanical interlocking. **Journal of biomedical materials research**, v. 7, n. 3, p. 1-23, 1973. ISSN 0021-9304.
- [11] LEITE, R. B.; ARAÚJO, P.; BATISTA, H.; SANTOS, P.; BEZERRA, D.; COSTA, A. Avaliação da Temperatura de Aquecimento Externo na Síntese por Reação de Combustão para Obtenção da Hidroxiapatita. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 13, n. 2, 2018.
- [12] DE SALES REIS, B.; BARBOSA, C. C. N.; DE CASTRO SOARES, L.; BRUM, S. C.; CECILIO, O. L.; MARQUES, M. M. Análise “in vitro” da atividade antimicrobiana da pasta ctz utilizada como material obturador na terapia pulpar de dentes deciduos. **Revista Pró-UniversUS**, v. 7, n. 3, p. 39-42, 2016.
- [13] GROVER, L. M.; WRIGHT, A. J.; GBURECK, U.; BOLARINWA, .; SONG, J.; LIU, Y.; FARRAR, D. F.; HOWLING, G.; ROSE, J.; DARRALET, J. E. The effect of amorphous pyrophosphate on calcium phosphate cement resorption and bone generation. **Biomaterials**, v. 34, p. 6631 – 6637, 2013.
- [14] BAGWELL, R. B.; MESSING, G. L.; HOWELL, P. R. The formation of alpha- Al_2O_3 from theta- Al_2O_3 : The relevance of a critical size and: diffusional nucleation or synchro-shear. **Journal of Materials Science**, v. 36, p. 1833-1841, 2001.
- [15] CHINELATTO, A. S. A.; PALLONE, E. M. J. A.; TROMBINIC, V. ; TOMASI, R. Influence of heating curve on the sintering of alumina subjected to high-energy milling. **Ceramics International**, v. 34, p. 2121–2127, 2008.
- [16] TONIOLO, J. C. Síntese de pós de alumina nanocristalina por combustão em solução. (**Dissertação de Mestrado**) Programa de Pós Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.
- [17] VOLKMER, T. M.; LENGELER, F.; SOUSA, V. C.; SANTOS, L. A. dos. Synthesis of calcium phosphates by self-propagating combustion synthesis. **Congress SAM/CONAMET**, San Nicolás, 2007.