

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE TRÊS XENOENXERTOS UTILIZADOS NA IMPLANTODONTIA

Physicochemical characterization of three xenografts used in
implant dentistry

Marcos Alexandre Nunes da Silva

Cirurgião-Dentista em estágio probatório para o Mestrado em Odontologia da Universidade Federal Fluminense

Suelen Cristina Sartoretto

Professora de Cirurgia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Iguazu - UNIG.

Debora Ferreira Barreto-Vieira

Pesquisador titular do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral, Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz Brasil

Jose Mauro Granjeiro

Especialista Sênior em Metrologia e Qualidade do Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro). Professor Associado da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense.

Monica Diuana Calasans-Maia

Professora titular da disciplina de Cirurgia Oral Menor da Universidade Federal Fluminense - UFF.

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade Fluminense de Odontologia

Categoria: Artigo Original

Informações do autor principal: Marcos Alexandre Nunes da Silva, Rua Marques de Muritiba n°. 310, Cocotá, CEP 21910-280, Rio de Janeiro-RJ. marquinhosans@gmail.com

Resumo:

Os biomateriais de origem xenógena, utilizados como substitutos ósseos, têm sido alvo de grande interesse clínico, devido às suas propriedades de biocompatibilidade e osteocondução. As propriedades físico-químicas dos biomateriais exercem uma grande influência sobre sua interação com as células e subsequentemente desempenham um papel importante na resposta biológica *in vivo* dos materiais. As características físicas envolvem características microestruturais de forma e tamanho das partículas, porosidade, densidade e área de superfície. A caracterização em termos da química envolve a determinação da composição química e a distribuição dos elementos no biomaterial. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar comparativamente as propriedades físico-químicas de três xenoenxertos de origem bovina comercialmente disponíveis no mercado nacional para tratamento de perdas ósseas na Odontologia. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) evidenciou discrepâncias no tamanho das partículas dos biomateriais estudados quando relacionados com os dados fornecidos pelo fabricante. Os difratogramas obtidos pela Difração de Raios X (DRX), apontaram dois biomateriais mais amorfos, Bio-Oss[®] e Lumina-Bone Porous[®], e um mais cristalino Extra Graft XG13[®], corroborando com a análise Termogravimétrica que evidenciou significativa perda de massa nos dois biomateriais amorfos. O biomaterial Extra Graft XG13[®] não apresentou porosidade detectável pelo método de análise Área superficial específica e porosidade (Brunauer, Emmett and Teller BET). Os materiais Bio-Oss[®] e Lumina Bone[®], mostraram presença significativa do grupo hidroxila na análise do infravermelho, confirmando a presença de água no biomaterial. Os biomateriais estudados apresentaram grandes discrepâncias quanto a cristalinidade, porosidade e área superficial entre si, essas características impactam na resposta biológica após a implantação e, por isso, devem ser avaliadas de acordo com a indicação clínica.

Palavras Chave: Biomaterial Xenógeno, Caracterização Físico-Química, Odontologia, Reparo ósseo

Abstract:

Xenogen biomaterials used as bone substitutes, have been of great clinical interest due to their biocompatibility and osteoconduction properties. The physicochemical characteristics of biomaterials influence the biological response that occurs during the regenerative process. Therefore, the objective of this study was to comparatively evaluate the physicochemical properties of three bovine xenografts commercially available in the national market for the treatment of bone loss in dentistry. The biomaterials analyzed were: Bio-Oss[®], Extra Graft XG13[®] and Lumina-Bone Porous[®]. Scanning Electron Microscopy (SEM) showed discrepancy in particle size of the biomaterials studied when related to the data provided by the manufacturer. The X-ray Diffraction (XRD) diffractograms showed two more amorphous biomaterials, Bio-Oss[®] e Lumina-Bone Porous[®], and one more crystalline Extra Graft XG13[®], corroborating the thermogravimetric analysis, that showed significant loss of mass in the two amorphous biomaterials. Extra Graft XG13[®] biomaterial showed no detectable porosity by the specific surface area and porosity analysis method (Brunauer, Emmett and Teller BET). Bio-Oss[®] and Lumina Bone[®] biomaterials showed significant presence of hydroxyl group in infrared analysis. The bovine biomaterials studied showed large discrepancies regarding crystallinity, porosity and surface area. These characteristics impact on the biological response after implantation and therefore should be evaluated according to the clinical indication advising.

Key words: Xenograft, physicochemical characteristics, dentistry, Bone Repair.

INTRODUÇÃO

O osso é um tecido dinâmico que sofre remodelação constante, mesmo que o crescimento e a modelagem do esqueleto tenham terminado (HILL, P. A.; ORTH, M., 1998). Paralelamente ao excelente comportamento mecânico, o osso exibe um potencial inigualável para a regeneração, com organização estrutural muito semelhante, sem deixar cicatriz (KATCHBURIAN, E.; ARANA, V., 1999). O reparo de perdas ósseas severas é, ainda, um grande desafio na medicina regenerativa, onde o osso autógeno continua sendo o padrão-ouro, porém apresenta desvantagens como necessidade de um segundo sítio cirúrgico, maior morbidade e imprevisibilidade na quantidade de osso enxertado.

A enxertia óssea é um procedimento cirúrgico com o objetivo de preencher áreas de tecido ósseo perdido. São utilizados como substitutos ósseos biomateriais autógenos, alógenos, xenógenos ou sintéticos (MASHIRO, Y., 2017). Os xenoenxertos produzidos a partir da porção inorgânica do tecido ósseo de origem animal são classificados como osteocondutores (CALASANS-MAIA, 2013, 2014), permitindo o crescimento ósseo sobre a superfície do biomaterial. Os xenoenxertos possuem características físico-químicas similares ao osso humano e são tratados termicamente para remoção da matéria orgânica e prevenção de respostas imunológicas ou inflamatórias adversas, por isso, possuem reabsorção e degradação bastante lentos (WENZ., 2001, CONZ M. B., 2010). A previsibilidade de resultados clínicos com a utilização de substitutos ósseos alógenos, xenógenos e aloplásticos levam o profissional de saúde a considerar essas opções como válidas para o processo de reparo tecidual, devido a ausência de reabsorção em volume, ao sítio cirúrgico unitário e ao melhor pós-operatório.

A hidroxiapatita, principal componente inorgânico do osso, é o material de maior versatilidade para uso em implantes devido a sua similaridade com o osso natural e sua habilidade de adesão a esse tecido. A solubilidade controlada desse biomaterial permite a gradual degradação e/ou absorção do mesmo por células do sítio receptor permitindo, posteriormente, a substituição por osso neoformado. De forma geral, quanto

maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade e mais cristalino será o material (GUASTALDI, A. C. 2010). A principal restrição de uso desse material é sua baixa resistência, não indicada para grandes defeitos ósseos, o que permite sua aplicação apenas em dispositivos que suportem baixos carregamentos (RODRIGUES, L., 2013).

Baseado no exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar comparativamente as propriedades físico-químicas de três xenoenxertos de origem bovina comercialmente disponíveis no mercado brasileiro para o tratamento de perdas ósseas na Odontologia.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL:

Três biomateriais xenógenos particulados de origem bovina utilizados como substitutos ósseos Odontologia foram caracterizados físico-quimicamente de forma comparativa. Os biomateriais foram descritos conforme a bula do fabricante:

Bio-Oss®: osso bovino medular produzido por Geistlich Pharma Ag (Switzerland). Sua desproteinização ocorre após um tratamento térmico de cerca de 300°C.

Extra Graft XG13®: substituto ósseo natural composto por 75% de hidroxiapatita bovina e 25% de colágeno do tipo I ambos de origem bovina. Partículas da hidroxiapatita de 200 a 400 µm.

Lumin-Bone Porous®: produto obtido da matéria-prima natural da estrutura óssea de bovinos.

MÉTODOS:

Caracterização Físico-química:

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV): A topografia foi inferida através da técnica de microscopia eletrônica de varredura, para isso a amostra foi recoberta por deposição de íons metálicos de ouro (Au), liga de ouro-paládio (Au-Pd) ou platina (Pt). No processo de metalização, as amostras foram posicionadas em uma

câmara com pressão variando de 0,1 a 0,05 mbar e o alvo metálico foi bombardeado com átomos de gás inerte, permitindo uma melhor interação do feixe de elétrons com a amostra. Foram utilizados aumentos de 27Xe 9500X no microscópio eletrônico de varredura (JEOL-JSM-6390-LV plataforma de microscopia eletrônica Rudolf Barth IOC Fiocruz).

Difração de Raios X (DRX): Uma porção da amostra foi macerada vigorosamente e submetida à análise de difração de raios-x. O DRX foi realizado utilizando o equipamento XPert-Pro da PANalytical, operado em 30 Kv, 15 mA e radiação $\text{CuK}\alpha$, localizado no Laboratório de Cristalografia e Difração de Raios-X do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF). As medidas foram feitas de 10° - 80° utilizando-se passo de $0,05^\circ$ e tempo de 160 segundos/passo. Com essas medidas obteve-se os difratogramas das amostras e, através deles, informações sobre as fases cristalinas presentes nos materiais. Os difratogramas dos três biomateriais foram analisados com base no JCPDS-ICDD cartão 9-432.

Análise de espectroscopia no Infravermelho – (FTIR): As análises de espectroscopia no infravermelho com Transformada de Fourier foram realizadas utilizando o método de transmissão com o uso de pastilhas de Brometo de Potássio (KBr). As pastilhas de KBr foram preparadas misturando 100 mg de KBr e 0,5 mg de amostras e submetendo tal mistura a 8,0 toneladas por um intervalo de tempo de 3 minutos. As pastilhas obtidas foram posteriormente analisadas de $4000\text{-}400\text{cm}^{-1}$ com resolução de 4.0 e 128 scans no espectrofotômetro IRPrestige-21, da Shimadzu localizado no CBPF. Os espectros de infravermelho obtidos forneceram informações sobre os grupos funcionais presentes na estrutura das amostras.

Área superficial específica e porosidade (Brunauer, Emmett and Teller BET): A área superficial específica e porosidade das amostras foi determinada utilizando o equipamento analisador de área superficial e porosidade ASAP 2020 da Micromeritics no CBPF. Os dados referentes a área superficial e porosidade foram obtidos através da adsorção de nitrogênio gasoso de alta pureza nas amostras. O

processo de adsorção ocorreu variando a pressão parcial (P/P₀) deste gás de 0.05 a 0,998. Durante o processo de adsorção, o porta-amostra, contendo a amostra, ficou imerso em nitrogênio líquido com temperatura em torno de -196°C.

Análise Termogravimétrica: A análise térmica foi realizada utilizando o analisador térmico DTG-60 da Shimadzu no (CBPF). Durante a análise, as amostras foram aquecidas de 27°C a 900°C com taxa de aquecimento de 6°C/min e imersa em atmosfera de Nitrogênio com fluxo de 30 mL/min. A partir da análise foram obtidas as curvas de perdas de massa das amostras ao longo do aquecimento.

Absorção Atômica: Para a avaliação da razão molar de cálcio e fósforo, foi realizada uma análise quantitativa do cálcio inicial através da pesagem de 50 mg de cada biomaterial em pó e dissolvendo-os em 1 mL de ácido nítrico a 5%, em balão volumétrico de 50 mL, em água bidestilada. Uma alíquota de 250 µL desta solução foi transferido para outro frasco volumétrico de 50 mL para fazer uma diluição de 200X em água bidestilada. O cloreto de potássio a 0,2% foi utilizado para suprimir a ionização na absorção atômica. O cálcio liberado foi medido por absorção atômica. Os mesmos passos na análise do cálcio foram seguidos para a análise do fósforo inicial. (Shimadzu, modelo AA 6800; CBPF Brasil, Rio de Janeiro, RJP, Brasil). A razão cálcio fósforo foi obtida dividindo o valor de cálcio obtido pelo de fósforo.

RESULTADOS

Na **Tabela 1** são apresentados os seguintes resultados: (1) tamanho dos grânulos obtidos através da microscopia eletrônica de varredura e comparados aos valores fornecidos pelos fabricantes; (2) perda de massa do material (%) com o aumento progressivo da temperatura de 27 °C até 900 °C pela técnica de termogravimetria; (3) tamanho dos poros pelo método de Área superficial específica e porosidade (Brunauer, Emmett and Teller BET) e (4) razão molar Ca/P pela técnica de absorção atômica (obtida dividindo os valores estequiométricos do cálcio pelo fósforo de cada amostra).

Tabela 1. Tamanho dos grânulos comparados aos dados dos fabricantes, perda de massa por termogravimetria em (%), tamanho dos poros, área superficial e razão Ca/P dos diferentes biomateriais estudados.

Análises / Biomateriais	Tamanho MEV (μm)	Tamanho fabricante (μm)	Perda de massa (%)	Tamanho do poro (μm)	Área superficial (m^2/g)	Razão Ca/P
Bio-Oss®	549 - 1700	250 - 1000	11 - 0,943 mg	129,9	80,250	1,67
Extra-Graft®	232 - 768	200 - 400	8 - 0,967 mg	ND	0,262	1,64
Lumina Bone®	289 - 1000	300-425	22 - 2,065 mg	111,9	57,888	1,62

Foram observadas diferenças na morfologia das partículas dos diferentes biomateriais. O tamanho dos grânulos variaram entre 549 μm - 1700 μm no biomaterial Bio-Oss®; 232 μm - 768 μm no biomaterial Extra-Graft®; 289 μm - 1000 μm no biomaterial Lumina Bone Porus® (FIGURA 1, micrografias A; C; E). A geometria do grânulo do biomaterial Bio-Oss® exibiu maior irregularidade na forma das partículas, dispondo de poros maiores que 100 μm , sendo este aspecto não detectado no biomaterial Extra-Graft® (FIGURA 1C) que mostrou-se menos poroso, com área superficial de 0,262 m^2/g . Foram detectados arranjos similares à hidroxiapatita na ultraestrutura do Bio-Oss® e do Lumina Bone Porus® (FIGURA 1, micrografias B e F); no Extra-Graft® observou-se presença de material hidrocolóide, impedindo o acesso à estrutura mineral deste biomaterial. (FIGURA 1, micrografia D).

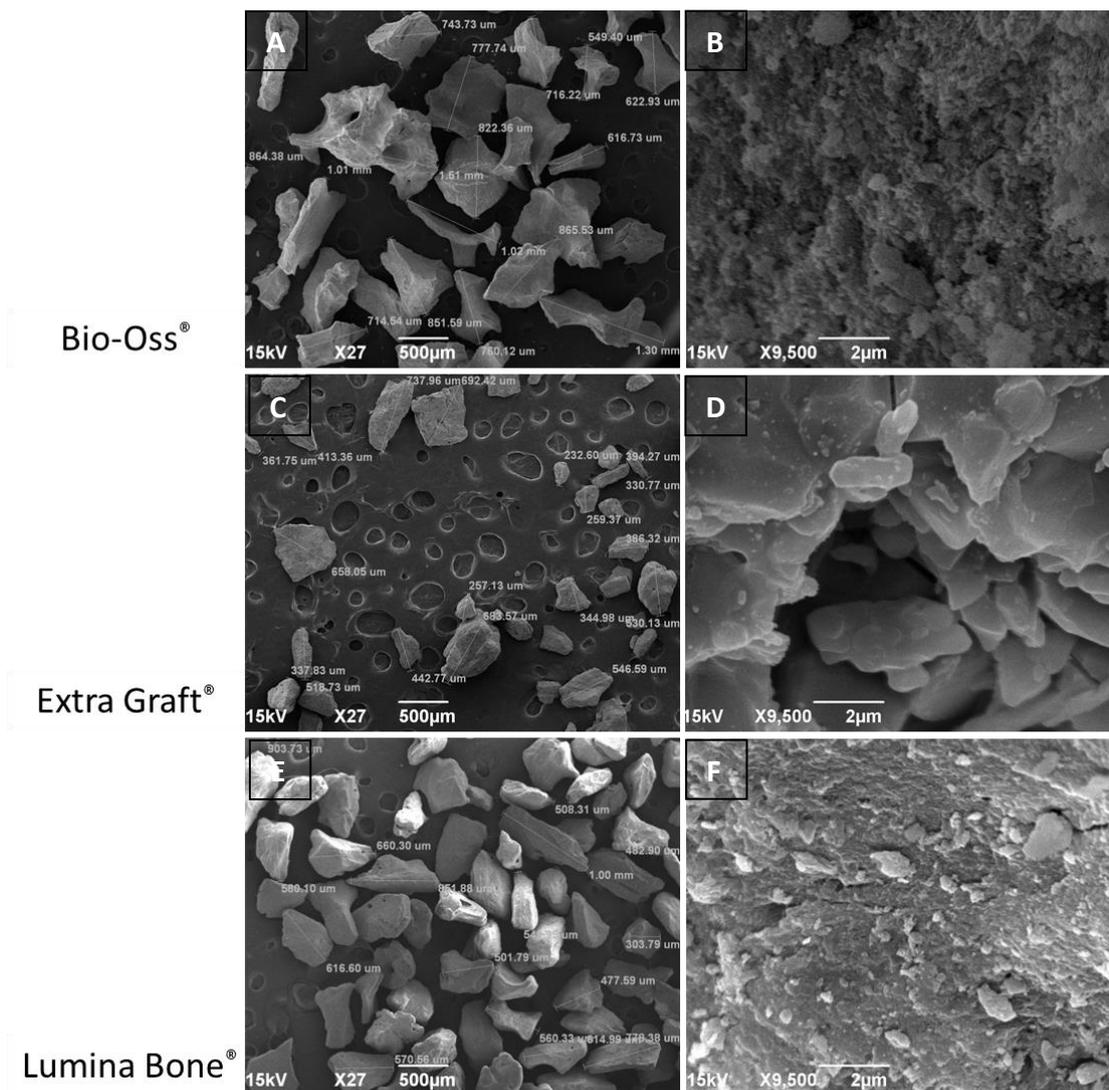


Figura 1. Eletromicrografia dos três biomateriais avaliados dispostas em aumentos progressivos de 27x para aferição do tamanho das partículas (FIGURA 1A, FIGURA 1C, FIGURA 1E) e 9.500x mostrando a ultraestrutura e arranjo da hidroxiapatita bovina (FIGURA 1B, FIGURA 1D, FIGURA 1F). Metalização partículas ouro coloidal.

A presença dos picos principais referentes à hidroxiapatita pura sintética foi identificada em todos os biomateriais analisados. As diferenças nos padrões de cristalinidade dos biomateriais são apresentadas na Figura 2 A, B e C). O biomaterial Extra Graft® apresentou no seu difratograma pico na região correspondente a hidroxiapatita (211), segundo dados dispostos na JCPDSICDD/cartão 9-432, caracterizando maior cristalinidade desse biomaterial.

Os resultados de FTIR dos biomateriais Bio-Oss® e Lumina Bone® (Figura 2 D e F) apresentaram presença significativa de grupos hidroxila, incorporados e não incorporados a estrutura cristalina. Grupos químicos fosfato e Carbonato foram identificados em todos os biomateriais analisados.

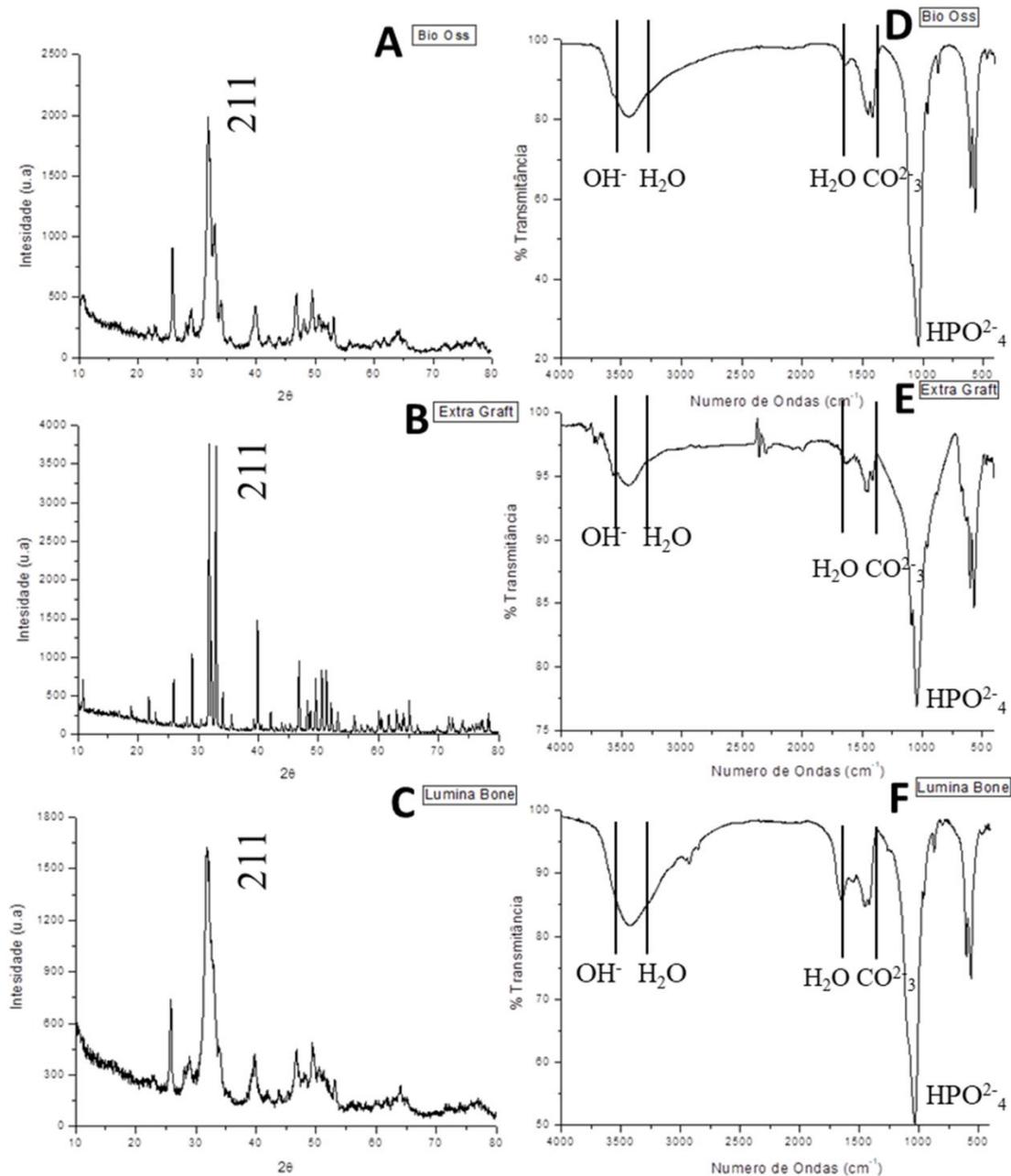


Figura 2. Difratoograma dos biomateriais Bio-Oss® (A), Extra graft® (B), Lumina bone®(C). Observar a intensidade do pico de HA (211), identificada em todos os biomateriais analisados e condição menos cristalina dos materiais Bio-Oss® e Lumina

Bone. Espectro do infra-vermelho dos seguintes biomateriais respectivamente: Bio-Oss[®](D), Extra graft[®](E), Lumina bone[®](F) com a presença dos picos de hidroxila nos biomateriais Extra-Graft[®] e Lumina Bone[®]

Os valores de perda de massa dos biomateriais obtidos por análise termogravimétrica evidenciaram uma perda significativa nos biomateriais mais amorfos, cerca de 11% no biomaterial Bio-Oss[®] e 22% no Lumina Bone Porus[®]. O biomaterial Extra-graft[®] apresentou uma perda de massa de cerca de 8% (Tabela 1).

O biomaterial Extra-Graft[®] não apresentou porosidade detectável pelo método de BET, apresentando também, uma área superficial baixa quando comparada aos outros dois biomateriais. O biomaterial Bio-Oss[®] apresentou maior porosidade, seguido da maior área superficial.

Os elementos químicos cálcio e fósforo foram rastreados pela técnica de Absorção Atômica: A razão molar foi inferida calculando a relação cálcio/fósforo de cada biomaterial. Foi identificada uma relação molar cálcio/fósforo de 1,62 à 1,67, valores que se assemelham a hidroxiapatita estequiométrica 1,67. Sendo os resultados individuais de cada biomaterial de 1,67 (Bio-Oss[®]), 1,64 (Extra Graft[®]) e 1,62 (Lumina Bone[®]).

DISCUSSÃO

Todos os biomateriais utilizados apresentaram uma morfologia de grânulos entre 200 µm e 1.700 µm e essas características são promissoras quanto à molhabilidade, capilaridade, adesão e proliferação celular na superfície de grãos e de microporos, confirmadas por diferentes autores (LEVANDOWSKI JUNIOR 2014, REGALIN 2014, DALMÔNICO 2015). A área da superfície disponível para reagir com células e fluidos biológicos, esta ligada diretamente a biocompatibilidade do biomaterial (BURG K.J.L., 2000), na avaliação da área de superfície disponível os biomateriais Bio-Oss[®] e Lumina Bone[®] apresentaram uma grande área superficial quando comparada aos outros materiais estudados. Poros com diâmetro 100 µm são necessários para a migração e o transporte celular; entretanto, poros maiores que 300 µm permitem o desenvolvimento

de um sistema de capilares, favorecendo a neoformação óssea (WERNER, J. 2002), nenhum dos biomateriais estudados apresentaram poros superiores a 130 μm .

Segundo (BOHNER, M. & BAUMGART, F., 2004), poros com tamanhos igual ou maiores que 300 μm são classificados como de tamanho ideal para o bom desempenho das características de fixação, diferenciação e crescimento de osteoblastos e vascularização, permitindo que essa rede de capilares neoformados possam nutrir a enxertia óssea, transformando o biomaterial em osso. Esses autores desenvolveram um modelo teórico da relação entre a taxa de reabsorção e tamanho do poro. A grande variação no tamanho entre as partículas tende a não deixar espaço residual, obstruindo a passagem de células e vasos, dificultando a reparação. A reabsorção será maior com a diminuição do tamanho das partículas do biomaterial, isto é, com o aumento da área superficial específica, se biomateriais de composição química idêntica (HA), o material com partículas maiores permanecerá mais tempo no local implantado (MISCH, C.E 2000) auxiliando a preservação da arquitetura local. O tamanho das partículas, sua forma e a rugosidade da superfície também podem afetar a adesão e a proliferação celular sobre o material (VAL, 2016, 2018).

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. A cristalinidade é uma propriedade que altera o índice de dissolução do biomaterial e é dependente da temperatura de sinterização (AOKI, H., 1999). Neste estudo podemos observar que o biomaterial Extra-graft® apresentou-se mais cristalino quando comparados aos outros. Cabe salientar que o mesmo biomaterial apresentava na bula cerca de 25% de colágeno do tipo I bovino envolvendo a estrutura cristalina do biomaterial.

A caracterização físico-química teve por objetivo avaliar os constituintes dos biomateriais comerciais e as características morfológicas dos materiais. A termogravimetria permitiu analisar a perda de massa em função do aquecimento da amostra sobre uma balança de precisão. O biomaterial Extra Graft® mesmo tendo um difratograma que indicaria um material mais cristalino apresentou perda de massa, decorrente de sua parte orgânica descrita pelo fabricante. O biomaterial foi sintetizado com 25% de matriz colágena envolvendo o material inorgânico. Variantes de

armazenamento e umidade relativa do ambiente podem variar os resultados dessa técnica. O biomaterial Lumina Bone® apresentou significativa perda de massa, correspondendo a 22%, indicando uma porção orgânica, ou água incorporada à matriz inorgânica.

CONCLUSÃO

Após a caracterização físico-química dos três biomateriais estudados concluímos que, apesar de todos os biomateriais serem de origem bovina, diferenças na morfologia, tamanho das partículas, cristalinidade, área de superfície e porosidade foram observadas entre eles, e essas diferenças interferem na biologia da osseointegração e na neoformação óssea.

REFERÊNCIAS

- 1- AOKI H. Medical application of hydroxyapatite. Tóquio: Ishiyaku, Euro Americana; 1994
- 2- BOHNER M. & BAUMGART F.. Theoretical model to determine the effects of geometrical factors on the resorption of calcium phosphate bone substitutes. *Biomaterials* 25(17):3569-3582. 2004
- 3- BURG K.J.L.; PORTER S.; KELLAM J.F.; Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomaterials*;21:2347-59 2000
- 4- CALASANS-MAIA, M. D.; ROSSI, A. M.; DIAS, E. P.; SANTOS, S. R. A.; ÁSCOLI, F.; GRANJEIRO, J. M. Stimulatory Effect on Osseous Repair of ZincSubstituted Hydroxyapatite: Histological Study in Rabbit's Tibia. *Key Eng Mater.* 361-363: 1269-1272, 2008
- 5- Calasans-Maia M, Resende R, Fernandes G, Calasans-Maia J, Alves AT, Granjeiro JM. A randomized controlled clinical trial to evaluate a new xenograft for alveolar socket preservation. *Clin. Oral Impl. Res.* 00, 2013, 1–6 doi: 10.1111/clr.12237.
- 6- CASTRO-SILVA I.I.; ZAMBUZZI W.F.; GRANJEIRO J.M.; Panorama atual do uso de xenoenxertos na prática odontológica, *Innov Implant J, Biomater Esthet*, São Paulo, v. 4, n. 3, p. 70-75, set./dez. 2009.

- 7- CONZ M. B.; CAMPOS C. N., SERRÃO S. D., GUARACILEI G. A. S.; VIDIGAL JR M.; Caracterização físico-química de 12 biomateriais utilizados como enxertos ósseos na Implantodontia REVISTA IMPLANTNEWS;7(4):541-6, 2010
- 8- FERNANDES, G. V. O.; CALASANS-MAIA, M. D.; MITRI, F. F.; BERNARDO, V. G.; ROSSI, A. M.; ALMEIDA, G. D. S.; GRANJEIRO, J. M. Histomorphometric Analysis of Bone Repair in Critical Size Defect in Rats Calvaria Treated with Hydroxyapatite and Zinc-Containing Hydroxyapatite 5%. Key Eng Mater. 396-398: 15-18, 2009
- 9- GUASTALDI, A. C.; APARECIDA, A. H.; Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. Quím. Nova, São Paulo , v. 33, n. 6, p. 1352-1358, 2010
- 10- HILL, P. A.; ORTH, M. Bone Remodelling. J Orthod, 25: (2):101-107, 1998.
- 11- KATCHBURIAN, E.; ARANA, V. Tecido Ósseo. In: Katchburian, E.; Arana, V. Histologia e Embriologia Oral. Texto- Atlas- Correlações Clínicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 21-38 p
- 12- MASAHIRO Y.; HIROSHI E.; Current bone substitutes for implant dentistry. Journal of Prosthodontic Research. 2018;62(2):152–161. doi: 10.1016/j.jpor..08.010. 2017
- 13- MISCH C.E.; Biomateriais utilizados em implantes dentários. In: Misch CE. Implantes dentários contemporâneos. 2ª Ed. São Paulo: Ed. Santos; p.271-302. 2000.
- 14- MISCH C.E., DIETSH F.; How to select, use bone substitute materials in conjunction with root-form implants. Dent Implantol Update. Dec;4(12):93-7. 1993
- 15- MATÉ SÁNCHEZ DE VAL, J. E., CALVO-GUIRADO, J. L., GÓMEZ-MORENO, G., PÉREZ-ALBACETE MARTÍNEZ, C., MAZÓN, P., & DE AZA, P. N.. Influence of hydroxyapatite granule size, porosity, and crystallinity on tissue reaction in vivo . Part A: synthesis, characterization of the materials, and SEM analysis. Clinical Oral Implants Research, 27(11), 1331–1338. doi:10.1111/clr.12722(2015)

- 16- MATÉ SÁNCHEZ DE VAL, J. E., CALVO-GUIRADO, J. L., GÓMEZ-MORENO, G., GEHRKE, S., MAZÓN, P., & DE AZA, P. N.. Influence of hydroxyapatite granule size, porosity, and crystallinity on tissue reaction in vivo. Part B: a comparative study with biphasic synthetic biomaterials. *Clinical Oral Implants Research*. doi:10.1111/clr.12880 (2016)
- 17- RODRIGUES L.; Aplicações de biomateriais em ortopedia. *Estudos Tecnológicos em Engenharia*. 9. 10.4013/ete.2013.92.02. (2013).
- 18- SILVA, I. I. C.; PIMENTEL-SOARES, S.; BITTENCOURT, R. C.; GRANJEIRO, J. M. Natural bovine anorganic apatite and collagen presents osteoconductivity and contribute to bone repair of rat calvaria critical size defect. *Key Eng Mater*. 396-398: 249-252, 2009
- 19- WENZ, B., OESCH, B. & HORST, M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 22: 1599–1606. (2001).
- 20- WERNER J.; LINNEN B.; FRIESS W.; GREIL P.; **Mechanical properties and in vivo cell compatibility of hydroxyapatite ceramics with graded pore structure**. *Biomaterials*;23:4285-94. 2002.
- 21- RAKHMATIA, Y.D AYUKAWA, Y. FURUHASHI, A. KOYANO K.; Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications *J Prosthodont Res*, 57 , pp. 3-14, 2013.