

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Filipe Martins Vono

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICAS DE BIOMATERIAIS XENÓGENOS DE
ORIGEM BOVINA**

Belo Horizonte

2023

Filipe Martins Vono

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICAS DE BIOMATERIAIS XENÓGENOS DE
ORIGEM BOVINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração: Implantodontia.

Linha de Pesquisa: Propriedades biomecânicas, físico-químicas e biocompatibilidade dos biomateriais e materiais odontológicos.

Orientador: Profa. Dra. Vânia Eloisa de Araújo Silva

Belo Horizonte

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

V948c Vono, Filipe Martins
Caracterização físico-químicas de biomateriais xenógenos de origem bovina / Filipe Martins Vono. Belo Horizonte, 2023.
64 f. : il.

Orientadora: Vânia Eloisa de Araújo Silva
Dissertação (Mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

1. Materiais biocompatíveis. 2. Substitutos ósseos. 3. Osseointegração. 4. Teste de materiais (Odontologia). 5. Propriedades Físicas. 6. Propriedades Químicas. 7. Microscopia eletrônica de varredura. I. Silva, Vânia Eloisa de Araújo. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

SIB PUC MINAS

CDU: 616.314-089.843

Ficha catalográfica elaborada por Fabiana Marques de Souza e Silva - CRB 6/2086

Filipe Martins Vono

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO QUÍMICAS DE BIOMATERIAIS XENÓGENOS DE ORIGEM BOVINA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Implantodontia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Prof. Dr. Luiz Felipe Cardoso Lehman - Centro Universitário Newton Paiva
- 2- Prof. Dr. Fernando Antônio Mauad de Abreu – PUC Minas
- 3- Profa. Dra. Vânia Eloísa de Araújo Silva – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 30 de agosto de 2023

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Profa. Dra. Vânia Eloísa de Araújo Silva
Orientadora

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
Coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia

*Dedico este trabalho aos meus pais,
à minha amada esposa, aos meus familiares e amigos,
cujo amor, apoio e encorajamento
foram fundamentais em minha jornada acadêmica.*

AGRADECIMENTOS

Ao iniciar este agradecimento, sinto uma imensa gratidão a Deus por ter iluminado meu caminho e por Sua constante orientação e cuidado em todos os momentos de minha vida.

Um agradecimento especial à Prof. Dra. Vânia Eloisa de Araújo Silva, minha orientadora, cujo conhecimento, paciência e dedicação foram essenciais para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho. Sua experiência e perspicácia foram guias constantes em minha jornada acadêmica.

Estendo minha gratidão ao Prof. Dr. Fernando Mauad e a todos os professores que, com sua sabedoria e ensinamentos, contribuíram para o aprimoramento desta pesquisa e para o meu crescimento pessoal e profissional.

A Edilene Braga Carvalho, expresso minha profunda gratidão pela realização das análises microscópicas e pelo inestimável apoio que prestou em momentos cruciais desta pesquisa.

Não posso deixar de mencionar o amor, carinho e apoio incondicional de meus pais, minha esposa e demais familiares. Seu encorajamento constante foi a força motriz que me impulsionou a seguir em frente, mesmo nos momentos mais desafiadores.

Aos amigos e colegas de turma, agradeço por tornarem o ambiente acadêmico colaborativo e enriquecedor. As trocas de conhecimento e as experiências compartilhadas foram vitais para moldar este trabalho e minha visão acadêmica.

Por fim, mas não menos importante, agradeço à instituição que me acolheu e me proporcionou todas as ferramentas e recursos necessários para alcançar este marco em minha carreira acadêmica.

"O importante é não parar de questionar. A curiosidade tem sua própria razão de existir." (ALBERT EINSTEIN).

RESUMO

A importância clínica do uso de biomateriais xenógenos como substitutos ósseos tem tido grande destaque na pesquisa odontológica, sendo estes valorizados por suas propriedades biocompatíveis e osteocondutoras. As características físico-químicas dos biomateriais desempenham um papel crucial na determinação de sua interação com as células e sua resposta biológica *in vivo*. O objetivo deste estudo foi avaliar as características físico-químicas e estruturais de dois biomateriais xenógenos de origem bovina: um preparado pela técnica de desproteínização (Bio-Oss, Geistlich Sons Ltd, Suíça) e outro por liofilização a alta temperatura (Cerabone, Straumann, Suíça). Essas técnicas distintas podem influenciar as características dos biomateriais. As amostras foram categorizadas em quatro grupos: Bio-Oss Small (grupo A), Bios-Oss Large (grupo B), Cerabone Small (grupo C) e Cerabone Large (grupo D). Cada amostra foi preparada em triplicata e avaliada quanto à superfície por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As características físico-químicas e estruturais destes biomateriais xenógenos foram analisadas em relação à sua granulometria, porosidade, composição e distribuição química, utilizando Espectroscopia de Dispersão em Energia (EDS) e MAPA, e comparadas com os dados fornecidos pelos fabricantes. Ao elucidar os principais atributos químicos e físicos destes biomateriais, este estudo fornece informações que podem auxiliar os dentistas na seleção eficaz do material mais adequado para diferentes cenários clínicos. Os resultados indicaram diferenças significativas nas características dos biomateriais dependendo da técnica de preparação. Em geral, as amostras preparadas pela técnica de desproteínização apresentaram maior porosidade e granulometria mais uniforme em comparação com as preparadas por liofilização. Conclui-se que a escolha do biomaterial adequado deve considerar as características específicas do material e o cenário clínico em questão, e que mais estudos são necessários para entender a influência desses fatores no sucesso clínico a longo prazo.

Palavras-chave: Enxerto ósseo. Materiais biocompatíveis. Biomateriais. Propriedades físico-químicas.

ABSTRACT

The clinical significance of using xenogeneic biomaterials as bone substitutes has been highlighted in dental research, valued for their biocompatible and osteoconductive properties. The physico-chemical properties of biomaterials play a pivotal role in determining their interaction with cells and *in vivo* biological response. This study aimed to assess the physico-chemical and structural properties of two bovine-derived xenogeneic biomaterials: one prepared using the deproteinization technique (Bio-Oss, Geistlich Sons Ltd, Switzerland) and another through high-temperature lyophilization (Cerabone, Straumann, Switzerland). These distinct techniques can influence the characteristics of the biomaterials. Samples were categorized into four groups: Bio-Oss Small (Group A), Bios-Oss Large (Group B), Cerabone Small (Group C), and Cerabone Large (Group D). Each sample was prepared in triplicate and its surface was evaluated using Scanning Electron Microscopy (SEM). The physico-chemical and structural features of these xenogeneic biomaterials were analyzed concerning their granularity, porosity, composition, and chemical distribution, employing Energy Dispersive Spectroscopy (EDS) and MAPA, and compared with manufacturer-provided data. By elucidating the main chemical and physical attributes of these biomaterials, this study provides insights that can assist dentists in effectively selecting the most appropriate material for different clinical scenarios. The results indicated significant differences in the properties of the biomaterials depending on the preparation technique. In general, samples prepared using the deproteinization technique showed higher porosity and more uniform granulometry compared to those prepared by lyophilization. It is concluded that the choice of the appropriate biomaterial should take into account the specific characteristics of the material and the clinical scenario in question, and that further studies are needed to understand the influence of these factors on long-term clinical success.

Keywords: Bone graft. Biocompatible materials. Biomaterials. Physical-chemical properties.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C	Carbono
Ca	Cálcio
EDS	Espectroscopia de Dispersão em Energia
Grupo A	Cerabone®Small
Grupo B	Cerabone®Large
Grupo C	Bio-Oss® small
Grupo D	Bio-Oss® Large
MAPA	Mapa Composicional
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
N	Nitrogênio
O	Oxigênio
P	Fósforo
Wt%	Peso molecular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Características físico-químicas e estruturais dos biomateriais xenógenos de origem animal	21
1.1.1	<i>Granulometria</i>	21
1.1.2	<i>Porosidade</i>	22
1.1.3	<i>Morfologia</i>	22
1.1.4	<i>Composição química</i>	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	Preparação das amostras	27
3.2	Desenho do estudo	28
3.3	Caracterização dos biomateriais	29
3.3.1	<i>Análises morfológica e química</i>	29
3.4	Metalização das amostras	29
3.5	Descrição dos resultados	31
4	ARTIGO CIENTÍFICO	33
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
	REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Biomateriais são substâncias projetadas para assumir uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, controlando as interações com componentes de sistemas vivos (WILLIAMS, 2008). A demanda por biomateriais para substituição ou aumento dos tecidos biológicos é uma preocupação constante na área da saúde. Para atender a essa demanda, são produzidos diversos biomateriais a partir de metais, cerâmicas, polímeros e compósitos (DALAPICULA *et al.*, 2006).

Os biomateriais usados como substitutos ósseos podem ser classificados com base em sua origem e mecanismo de ação. Quanto à sua origem, podem ser classificados em: autógenos, obtidos do próprio indivíduo; homogêneos ou aloenxertos, obtidos de doadores da mesma espécie; xenógenos ou enxertos heterogêneos, provenientes de doadores de espécies diferentes; e enxertos aloplásticos, que possuem origem sintética (BAUER; MUSCHLER, 2000).

Quando classificados pelo seu mecanismo de ação, os biomateriais são divididos em: osteogênicos, onde o crescimento ósseo se dá em função das células viáveis transferidas do interior do enxerto (MELLONIG *et al.*, 1993); osteoindutores, que possuem a capacidade de atrair células mesenquimais que mais tarde se diferenciarão em osteoblastos (DALAPICULA *et al.*, 2006), e osteocondutores, que servem como arcabouço, sustentando uma estrutura por onde proliferam vasos sanguíneos, trazendo então os componentes necessários à formação óssea (GATTI; RIVASI, 2002).

Os biomateriais possuem características físico-químicas que são responsáveis pela sua integração ao tecido vivo e que devem ser consideradas antes da sua aplicação (DALAPICULA *et al.*, 2006). A osteocondutividade e osteoindutividade de biomateriais estão intimamente relacionadas com suas características físicas e químicas (JEONG *et al.*, 2019). As características físicas são específicas à área de superfície ou formato (bloco, partícula) e à porosidade (denso, macro ou micro poroso) (MISCH, 2000). As características químicas estão ligadas à razão molar cálcio/fosfato, composição química, grau de impureza e substituição iônica na estrutura atômica (BURG; PARTER; KELLAN, 2000).

As características estruturais dos biomateriais utilizados como substitutos ósseos em odontologia estão ligadas à sua organização interna, observando desde a

organização atômica, relacionada em seus arranjos espaciais em escala nanométrica, até o nível da macroestrutura em escala milimétrica (TURRER; FERREIRA, 2008). Esta estrutura pode ser ordenada formando uma estrutura cristalina ou desordenada (amorfa não-cristalina), e determina o comportamento de cada material na neoformação óssea (SHEIKH *et al.*, 2016).

Os biomateriais xenógenos são produzidos a partir de ossos de origem bovina, porcina e equina. Através de processos termoquímicos, a porção orgânica do osso é removida, resultando em um biomaterial inorgânico composto principalmente de apatita, carbonatos e grupos hidroxílicos reduzidos. Este material distinto possui propriedades osteocondutoras e serve como arcabouço para a neoformação óssea (RODOLFO *et al.* 2017).

Para criar enxertos ósseos xenogênicos, o processo começa com a desproteinização, seguida da sinterização a 300 ou 1250 °C por várias horas. Este processo elimina efetivamente a maioria das fases orgânicas, tornando os enxertos não imunogênicos e extremamente biocompatíveis (BARBECK *et al.*, 2017). No entanto, esse processo de sinterização como o realizado no cerabone aumenta significativamente a cristalinidade do grão, o que leva a uma diminuição dramática da degradabilidade (XU *et al.*, 2023). Conseqüentemente, essa redução na degradabilidade faz com que o volume do biomaterial permaneça inalterado por um período mais prolongado.

Este estudo pretende detalhar as características físico-químicas e estruturais dos biomateriais xenógenos Bio-Oss® e Cerabone® nas apresentações Small e Large. A suposição é que as características dos materiais de enxerto utilizados nos procedimentos de elevação dos seios da face possam modular a qualidade e a quantidade de osso recém-formado (RAMÍREZ *et al.*, 2017). Os métodos de produção de substitutos ósseos podem afetar a porosidade, a área de superfície e a resistência mecânica, o que pode interferir na nova formação óssea e na bioreposição do enxerto (TRAJKOVSKI *et al.*, 2018).

1.1 Características físico-químicas e estruturais dos biomateriais xenógenos de origem animal

1.1.1 Granulometria

Os biomateriais são apresentados de diversas formas, variando desde granulados com tamanhos de partículas que vão de algumas centenas de micrômetros a milímetros, até pastas fluidas com partículas de apatita nanoscópica em dispersão aquosa. Além disso, existem biomateriais que são apresentados em blocos, produzidos por meio de prensagem isostática a frio, seguida de perfuração mecânica para criar furos milimétricos (TRAJKOVSKI *et al.*, 2018).

Diversos estudos têm explorado a influência do tamanho dos grânulos de biomateriais na indução de nova formação óssea. O estudo de Oonishi *et al.* (1999) avaliou diferentes hidroxiapatitas de origem animal (xenógenas) e sintéticas (aloplásticas), introduzindo esses biomateriais em orifícios de 6 mm de diâmetro feitos nos côndilos femorais de coelhos adultos. Utilizaram grânulos de tamanhos diferentes (100-300 μm , 10 μm e 1-3 μm) e concluíram que o tamanho dos grânulos influencia a indução de uma nova formação óssea iniciada através da atividade reabsortiva de células osteoclásticas.

Carvalho *et al.* (2007) avaliaram duas hidroxiapatitas bovinas e duas hidroxiapatitas sintéticas, comparando sua eficácia na reparação de defeitos ósseos circunferenciais em cães por meio de análises histológicas e histomorfométricas. Eles concluíram que os grânulos de hidroxiapatita exibiram contato ósseo direto, independentemente de sua origem e tamanho.

No estudo conduzido por Cruz *et al.* (2006), foi destacada a relevância do tamanho das partículas e da uniformidade entre elas no que tange à osteogênese. Os autores sugeriram que, para uma ótima eficácia dos biomateriais na regeneração óssea, as partículas devem ter um tamanho mais uniforme e intermediário. Além disso, foi observado que quando uma mistura de partículas grandes e pequenas está presente, as menores tendem a preencher excessivamente os espaços vazios criados pelas maiores. Esta superlotação pode ser prejudicial para a neoformação óssea e a vascularização, uma vez que espaços adequados são necessários para permitir a angiogênese adequada.

1.1.2 Porosidade

A porosidade é uma característica morfológica dos biomateriais, definida como a porcentagem de espaço vazio em um sólido. Os poros são essenciais para a formação do tecido ósseo, pois facilitam a migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, além de permitir a vascularização (KUBOKI *et al.*, 1998).

Uma revisão de literatura realizada por Karageorgiou e Kaplan (2005) avaliaram o estado do conhecimento sobre a relação entre a porosidade e o tamanho dos poros de diferentes biomateriais utilizados na regeneração óssea, incluindo xenógenos, aloplásticos e alógenos. Os autores concluíram que, independentemente do biomaterial utilizado, existe um requisito mínimo para o tamanho dos poros, de 100 μm , para obter resultados satisfatórios na nova formação óssea. Isso se deve ao tamanho das células que colonizarão o biomaterial. Os autores recomendaram que os poros devem ser maiores que 300 μm , pois o tamanho dos poros afeta a progressão da osteogênese. Poros pequenos favorecem condições hipóxicas e a formação osteocondral induzida antes da osteogênese, enquanto poros grandes, bem vascularizados, levam à osteogênese direta.

No estudo de Kuboki *et al.* (2009) foram avaliadas partículas sólidas e porosas de hidroxiapatita para correlacionar os poros do material com a osteogênese induzida por proteínas morfogenéticas ósseas. Eles observaram que nenhuma formação óssea ocorreu em partículas sólidas, enquanto em partículas porosas houve osteogênese direta. Esses estudos destacam a importância da porosidade na eficácia dos biomateriais como substitutos ósseos.

1.1.3 Morfologia

Um componente importante na engenharia de tecidos para a regeneração óssea é a macroestrutura formada pelo biomaterial, servindo como modelo para interações celulares e formação da matriz extracelular óssea para fornecer suporte estrutural ao tecido recém-formado. A estrutura de um biomaterial para regeneração óssea deve atender certos critérios para desempenhar essa função, incluindo características mecânicas semelhantes às do local de reparo ósseo, biocompatibilidade e biodegradabilidade a uma taxa proporcional à remodelação (KARAGEORGIU; KAPLAN, 2005).

Figueiredo *et al.* (2013) compararam as características físico-químicas de dois biomateriais, um aloplástico e outro xenógeno, em testes *in vivo* (em 15 ratos) e *in vitro*, e revelou que as partículas de substitutos ósseos aloplásticos são menores, 326 μm , regulares, aproximadamente cilíndricas com contornos redondos e mais uniformes em tamanho. Em oposição, partículas dos substitutos ósseos xenógenos, além de serem maiores, 672 μm , são irregulares e apresentam pontas pontiagudas (refletindo a origem natural desse material, constituído por fragmentos de osso esponjoso e cortical). Podendo, a partir destas características, esses dois biomateriais apresentarem respostas diferentes na neoformação óssea. Análises utilizando técnicas de microscopia eletrônica de varredura e estudos histológicos têm evidenciado a morfologia de partículas em substitutos ósseos, destacando a relevância das dimensões das partículas. Há indícios de que a magnitude da partícula pode influenciar a atividade reabsortiva de células osteoclásticas (CRUZ *et al.*, 2007).

1.1.4 Composição química

A análise da composição química dos biomateriais desempenha um papel fundamental na pesquisa e desenvolvimento de materiais para aplicações biomédicas.

Através da análise química, é possível identificar a presença de elementos de interesse nos biomateriais, o que desempenha um papel crucial na avaliação de sua biocompatibilidade. Essa avaliação é importante para garantir que os biomateriais não causem reações adversas no ambiente biológico em que serão implantados (PIRES *et al.*, 2015)

Uma abordagem comumente utilizada na análise da composição química de biomateriais é a espectroscopia de raios X por dispersão de energia. Essa técnica permite a identificação e quantificação dos elementos presentes nos materiais, fornecendo informações precisas sobre sua composição química (DALAPICULA *et al.*, 2006).

É importante ressaltar que a análise química dos biomateriais não se limita à identificação dos elementos presentes, mas também engloba a avaliação da pureza e uniformidade do material. A presença de impurezas ou variações na composição química pode afetar significativamente as propriedades e o desempenho dos biomateriais, sendo essencial o controle de qualidade durante sua fabricação e utilização (BURG; PARTER; KELLAN, 2000).

Em conclusão, a análise química dos biomateriais desempenha um papel crucial na pesquisa, desenvolvimento e aplicação de materiais para terapias regenerativas. Essa análise fornece informações valiosas sobre a composição dos biomateriais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as características físico-químicas e estruturais de dois biomateriais xenógenos de origem bovina.

2.2 Objetivos específicos

- a) realizar a análise da granulometria dos biomateriais xenógenos Bio-Oss® e Cerabone® nas apresentações Small e Large, utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV) para medições dos grânulos nas imagens;
- b) investigar a porosidade dos biomateriais xenógenos Bio-Oss® e Cerabone® nas apresentações Small e Large, empregando a microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- c) examinar a composição química da superfície dos biomateriais xenógenos Bio-Oss® e Cerabone® nas apresentações Small e Large, utilizando a espectroscopia por energia dispersiva (EDS);
- d) analisar a distribuição química nos mesmos por meio do MAPA;
- e) avaliar a morfologia das partículas dos biomateriais xenógenos Bio-Oss® e Cerabone® nas apresentações Small e Large, aplicando a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Para este estudo foram selecionados dois biomateriais xenógenos comercialmente disponíveis, foram utilizadas amostras comerciais dos biomateriais Bio-Oss® preparado pela técnica de desproteínização e Cerabone® por liofilização a alta temperatura em duas formas de apresentação cada um se diferenciando em tamanho dos grânulos apresentados. Cada forma de apresentação foi analisada separadamente:

- a) Bio-Oss® small com grânulos de (0,25-1 mm) de acordo com o fabricante;
- b) Bio-Oss® Large com grânulos (1 mm-2 mm) de acordo com o fabricante;
- c) Cerabone® com grânulos de (0,5-1 mm) de acordo com o fabricante;
- d) Cerabone® com grânulos de (1 mm-2 mm) de acordo com o fabricante.

Tabela 1. Biomateriais utilizados no estudo e suas características conforme o fabricante

Marca comercial	Fabricante/Origem	Tamanho da partícula informada pelo fabricante (µm)
erabone®Large	Straumann/Suíça	1000-2000
Cerabone®small	Straumann/Suíça	500-1000
Bio-Oss® small	Geistlich /Suíça	250-1000
Bio-Oss® Large	Geistlich /Suíça	1000-2000

Fonte: Elaborado pelo autor

3.1 Preparação das amostras

As amostras foram fixadas em suportes de metal usando adesivo condutivo de carbono, que garante uma boa condutividade elétrica entre a amostra e o suporte para a realização da análise. Os grânulos foram cuidadosamente depositados para minimizar o contato entre eles, permitindo a diferenciação de cada um, enquanto se evitava deixar grandes espaços vazios. Após a fixação, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro usando um evaporador de metal *Denton Vacuum*. O revestimento de ouro aumenta a condutividade elétrica da amostra e melhora a qualidade da imagem obtida pelo MEV.

O *Denton Vacuum* é um tipo de evaporador de metal que utiliza o método de

pulverização catódica para depositar camadas finas de ouro em substratos. O funcionamento da máquina (Denton Vacuum Desk V, Denton Vacuum, Moorestown, USA) é baseado na criação de um vácuo na câmara de deposição, que é preenchida com um gás inerte, como o argônio. Em seguida, o metal é colocado em um cátodo, que é um eletrodo negativo. Ao aplicar uma corrente elétrica ao cátodo, ocorre um processo onde as partículas do material são ionizadas e bombardeiam o substrato, depositando-se em sua superfície. O material utilizado para bombardear a amostra foi o ouro. Após o revestimento, as amostras são armazenadas em um desumidificador contendo sílica em gel. As amostras são então posicionadas no microscópio eletrônico, cuja porta é fechada e é estabelecido um vácuo. Imagens digitais foram obtidas detectando os elétrons secundários emitidos pelas amostras após serem expostas ao feixe de elétrons do equipamento.

Para analisar a composição atômica das amostras, foi utilizado um espectrômetro. Durante a observação da superfície da amostra no microscópio eletrônico de varredura (MEV), são gerados diversos sinais que podem ser detectados para fornecer informações sobre a amostra. Um desses sinais é representado pelos raios X, que podem ser utilizados para determinar a composição elementar da amostra. A espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS) é uma técnica que emprega os raios X gerados no MEV para fornecer informações sobre a composição elementar do material. O EDS funciona detectando os raios X característicos que são emitidos quando os elétrons do MEV interagem com os átomos da amostra. Um detector de energia é utilizado para medir essas emissões. Durante o processo de dispersão, o aparelho absorve e separa os diferentes espectros de raios X associados a elementos específicos. Por meio de um software, é possível realizar uma análise semiquantitativa para determinar a porcentagem de cada átomo presente em uma determinada amostra

3.2 Desenho do estudo

Para este estudo, foram realizados ensaios *in vitro*. As amostras foram divididas em quatro grupos: Bio-Oss Small (grupo A), Bios-Oss Large (grupo B), Cerabone Small (grupo C), e Cerabone Large (grupo D). As amostras analisadas foram preparadas em triplicata e avaliadas quanto à superfície por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), composição e distribuição química por Espectroscopia de Dispersão

em Energia (EDS) e MAPA.

Tabela 2. Desenho do estudo

Grupo	
Cerabone ®Small	A
Cerabone ®Large	B
Bio-Oss® small	C
Bios-Oss® Large	D

Fonte: Elaborado pelo autor

3.3 Caracterização dos biomateriais

3.3.1 Análises morfológica e química

As amostras analisadas foram preparadas em triplicata e avaliadas quanto à superfície por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Os aumentos de 35x, 50x, 100x , 250x e 500x foram utilizados para análise da forma dos grânulos, identificação de poros e reentrâncias. Os aumentos de 1000x, 2500x e 5000x forneceram uma visão morfológica da superfície dos biomateriais analisados. Em cada aumento, foram obtidas 4 imagens de sítios aleatórios, totalizando 12 imagens para cada grupo avaliado. A análise química foi realizada por meio da EDS. Foram selecionados três campos aleatórios de cada amostra no aumento de 100x para a avaliação das composições químicas presentes. Além disso, foi realizada a análise de Mapeamento de Elementos Químicos (MAPA) nos mesmos campos para verificar a distribuição superficial dos elementos químicos encontrados.

As imagens para as avaliações foram realizadas por meio do aparelho JSM-6400 Electron Microscope (JEOL) equipado com NORAN 6 X-ray Microanalysis System and Semafore Digitizer, do Departamento de Engenharia Metalúrgica da PUC Minas.

3.4 Metalização das amostras

As amostras foram fixadas em suportes de metal usando adesivo condutivo de carbono, que garante uma boa condutividade elétrica entre a amostra e o suporte para

a realização da análise. Os grânulos foram cuidadosamente depositados para minimizar o contato entre eles, permitindo a diferenciação de cada um, enquanto se evitava deixar grandes espaços vazios. Após a fixação, as amostras foram recobertas com uma fina camada de ouro usando um evaporador de metal *Denton Vacuum*. O revestimento de ouro aumenta a condutividade elétrica da amostra e melhora a qualidade da imagem obtida pelo MEV.

O *Denton Vacuum* é um tipo de evaporador de metal que utiliza o método de pulverização catódica para depositar camadas finas de ouro em substratos. O funcionamento da máquina (*Denton Vacuum Desk V, Denton Vacuum, Moorestown, USA*) é baseado na criação de um vácuo na câmara de deposição, que é preenchida com um gás inerte, como o argônio. Em seguida, o metal é colocado em um cátodo, que é um eletrodo negativo. Ao aplicar uma corrente elétrica ao cátodo, ocorre um processo onde as partículas do material são ionizadas e bombardeiam o substrato, depositando-se em sua superfície. O material utilizado para bombardear a amostra foi o ouro. Após o revestimento, as amostras são armazenadas em um desumidificador contendo sílica em gel. As amostras são então posicionadas no microscópio eletrônico, cuja porta é fechada e é estabelecido um vácuo. Imagens digitais foram obtidas detectando os elétrons secundários emitidos pelas amostras após serem expostas ao feixe de elétrons do equipamento.

Para analisar a composição atômica das amostras, foi utilizado um espectrômetro. Durante a observação da superfície da amostra no microscópio eletrônico de varredura (MEV), são gerados diversos sinais que podem ser detectados para fornecer informações sobre a amostra. Um desses sinais é representado pelos raios X, que podem ser utilizados para determinar a composição elementar da amostra. A espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS) é uma técnica que emprega os raios X gerados no MEV para fornecer informações sobre a composição elementar do material. O EDS funciona detectando os raios X característicos que são emitidos quando os elétrons do MEV interagem com os átomos da amostra. Um detector de energia é utilizado para medir essas emissões. Durante o processo de dispersão, o aparelho absorve e separa os diferentes espectros de raios X associados a elementos específicos. Por meio de um software, é possível realizar uma análise semiquantitativa para determinar a porcentagem de cada átomo presente em uma determinada amostra

3.5 Descrição dos resultados

Os resultados e a discussão deste estudo estão descritos no artigo, que será submetido a uma revista científica.

4 ARTIGO CIENTÍFICO

Caracterização físico-químicas de biomateriais xenógenos de origem bovina por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva

Artigo a ser submetido ao periódico **Brazilian Oral Research** (Qualis B1).

As normas para submissão encontram-se no link abaixo:

https://www.sbpqo.org.br/brazilian_research.asp

Caracterização físico-químicas de biomateriais xenógenos de origem bovina por microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia por energia dispersiva

Filipe Martins Vono¹, Gianfilippo Machado Cornacchia², Elton Gonçalves Zenóbio³,
Fernando Antônio Mauad de Abreu³, Vânia Eloisa de Araújo Silva³

¹ Mestrando, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

² Doutorando, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

³ Professor Adjunto, Departamento de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil

Correspondência ao autor:

Filipe Martins Vono, Programa de Pós-graduação em Odontologia, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Rua Paulo Piedade Campos, 665/202 – Estoril, CEP: 30421-566, Belo Horizonte/MG, Brasil, Telefone: +55 31 99150-8789 , E-mail: filipemvono@hotmail.com

RESUMO

Este estudo tem como objetivo avaliar as características físico-químicas e estruturais de dois biomateriais xenógenos de origem bovina amplamente utilizados em regeneração óssea: Bio-Oss e Cerabone. Ambos os biomateriais possuem propriedades biocompatíveis e osteocondutoras, mas diferem em suas técnicas de preparação, sendo o Bio-Oss desproteínizado e o Cerabone liofilizado a alta temperatura. As amostras foram categorizadas em quatro grupos distintos: Bio-Oss Small (grupo A), Bios-Oss Large (grupo B), Cerabone Small (grupo C) e Cerabone Large (grupo D). Cada uma destas amostras foi preparada em triplicata e submetida a análises detalhadas através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Emissão de Raios-X por Energia Dispersiva (EDS). Foram investigados aspectos como tamanho dos grânulos, porosidade e morfologia, bem como a composição química da superfície. Esses dados são essenciais para auxiliar os dentistas na seleção adequada dos biomateriais para diferentes cenários clínicos. Os resultados mostraram que o Cerabone apresenta uma estrutura mais definida, com ângulos vivos e linhas retas, enquanto o Bio-Oss possui uma morfologia mais porosa e amorfa, com uma maior quantidade de poros, picos, vales e fendas. Em termos de composição química, ambos os biomateriais demonstraram a presença de oxigênio, cálcio, fósforo, sódio e magnésio. O Cerabone apresentou teores mais elevados de cálcio em comparação com o Bio-Oss, enquanto este último mostrou maiores teores de sódio e magnésio. A razão Ca/P foi semelhante entre os biomateriais, indicando uma proporção adequada desses elementos essenciais para a regeneração óssea. Essas informações são fundamentais para os profissionais de odontologia na escolha do biomaterial mais adequado para cada caso clínico, levando em consideração as características físico-químicas e estruturais dos materiais. Compreender essas características dos biomateriais permite um planejamento mais eficiente e preciso, contribuindo para o sucesso dos procedimentos de regeneração óssea e, conseqüentemente, para a qualidade de vida dos pacientes.

Palavras-chave: Enxerto ósseo, Materiais biocompatíveis, Biomateriais, Propriedades físico-químicas.

INTRODUÇÃO

Biomateriais são substâncias projetadas para assumir uma forma que, sozinha ou como parte de um sistema complexo, é usada para direcionar o curso de qualquer procedimento terapêutico ou diagnóstico, controlando as interações com componentes de sistemas vivos.¹ A demanda por biomateriais para substituição ou aumento dos tecidos biológicos é uma preocupação constante na área da saúde.² Diversos biomateriais são produzidos a partir de metais, cerâmicas, polímeros e compósitos.²

Os biomateriais usados como substitutos ósseos podem ser classificados com base em sua origem e mecanismo de ação. Quanto à origem, podem ser autógenos, homogêneos, xenógenos ou aloplásticos.³ Quanto ao mecanismo de ação, são classificados como osteogênicos, osteoindutores ou osteocondutores.^{2,4,5}

As características físico-químicas e estruturais dos biomateriais são fundamentais para sua integração ao tecido vivo e devem ser consideradas antes de sua aplicação.^{2,6} As características físicas, como tamanho dos grânulos, porosidade e morfologia, e as características químicas, como a razão molar cálcio/fosfato e a composição química, estão relacionadas à osteocondutividade e osteoindutividade dos biomateriais.⁶⁻⁸

Os biomateriais xenógenos, como o Bio-Oss® e o Cerabone®, são produzidos a partir de ossos de origem bovina e passam por processos termoquímicos para remoção da porção orgânica, resultando em um biomaterial inorgânico composto principalmente de apatita, carbonatos e grupos hidroxílicos.⁹ A porosidade, a área de superfície e a resistência mecânica desses biomateriais podem ser afetadas pelo processo de produção, o que influencia sua eficácia como substituto ósseo.^{10,11}

Este estudo tem como objetivo avaliar as características físico-químicas e

estruturais dos biomateriais xenógenos Bio-Oss® e Cerabone® nas apresentações Small e Large,- A compreensão dessas características é essencial para a seleção adequada de biomateriais em cenários clínicos específicos na regeneração óssea.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para este estudo foram selecionados biomateriais xenógenos comercialmente disponíveis, foram utilizadas amostras comerciais dos biomateriais Bio-Oss® preparado pela técnica de desproteinização e Cerabone® por liofilização a alta temperatura em duas formas de apresentação cada um se diferenciando em tamanho dos grânulos apresentados. Cada forma de apresentação foi analisada separadamente: Bio-Oss® small com grânulos de (0,25-1 mm); Bio-Oss® Large com grânulos (1 mm-2 mm); Cerabone® com grânulos de (0,5-1 mm); Cerabone® com grânulos de (1 mm-2 mm) (Tabela 1).

Tabela 1. Biomateriais utilizados no estudo e suas características conforme o fabricante

Marca comercial	Fabricante/Origem	Tamanho da partícula informada pelo fabricante (m)
A Cerabone®Small	Straumann/Suíça	500-1000
B Cerabone®Large	Straumann/Suíça	1000-2000
C Bio-Oss® small	Geistlich /Suíça	250-1000
D Bio-Oss® Large	Geistlich /Suíça	1000-2000

Desenho do Estudo

Para este estudo, foram realizados ensaios in vitro. As amostras foram divididas em quatro grupos: Bio-Oss Small (grupo A), Bios-Oss Large (grupo B), Cerabone Small (grupo C), e Cerabone Large (grupo D). As amostras analisadas foram preparadas em triplicata e avaliadas quanto à superfície por Microscopia Eletrônica de

Varredura (MEV), composição e distribuição química por Espectroscopia de Dispersão em Energia (EDS) e MAPA.

Morfologia dos biomateriais

A morfologia dos biomateriais foi avaliada utilizando microscopia eletrônica de varredura, com aumentos variando de 50x a 250x. O Cerabone apresentou uma estrutura caracterizada por ângulos vivos, linhas retas e uma quantidade reduzida de poros. Esta estrutura contrastou com a do Bio-Oss, que possui uma morfologia mais amorfa e uma quantidade maior de poros, observada tanto na versão small quanto na large.

Ao aumentar a ampliação para o intervalo de 500x a 5000x, a superfície dos dois biomateriais tornou-se mais evidente. Apesar de ambos os produtos terem origem xenógena (osso bovino), foram identificadas diferenças em suas superfícies. Essas diferenças foram provavelmente o resultado do processo de fabricação específico de cada um.

Com um aumento de 500x, a estrutura do Cerabone apareceu mais lisa e regular, enquanto o Bio-Oss exibiu uma maior quantidade de microporos e reentrâncias. Com aumentos de 1000x, 2500x e 5000x, ambas as superfícies mostraram estruturas globulares, mas em diferentes escalas de tamanho e com picos irregulares pontiagudos.

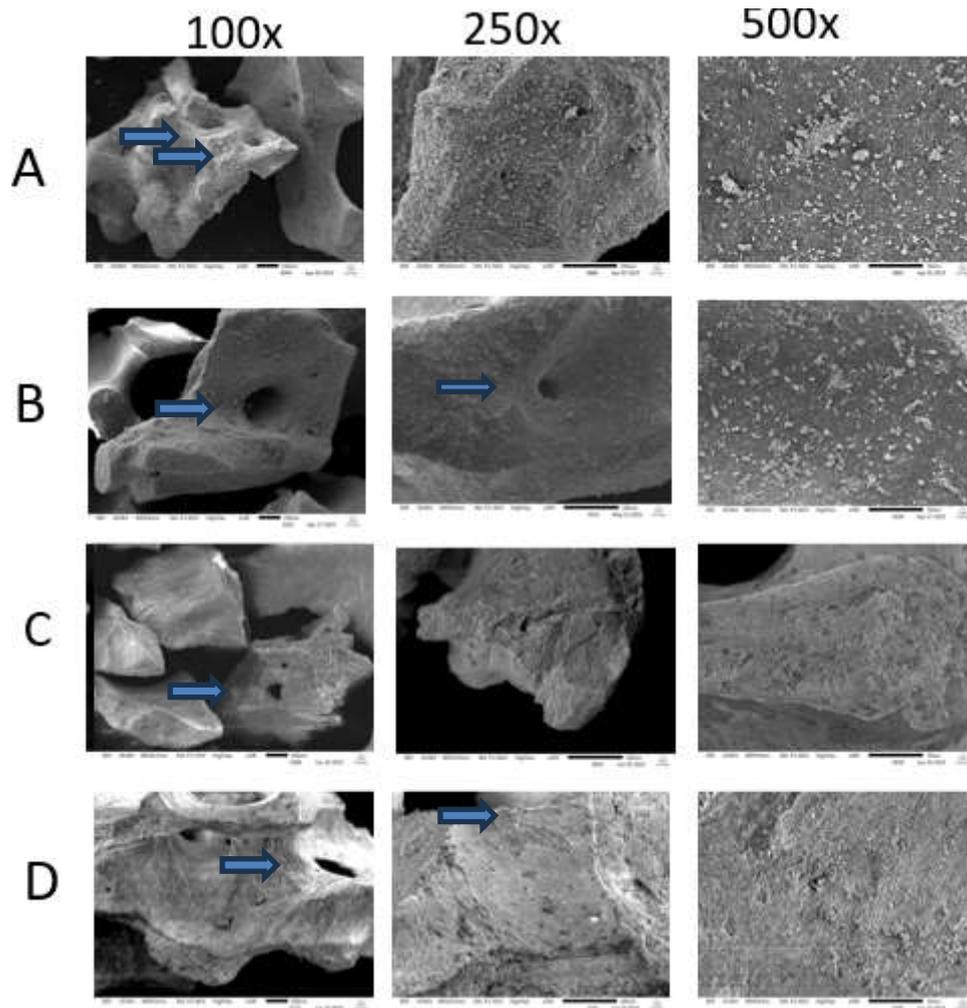


Figura 1. Imagens de MEV do Cerabone e Bio-Oss nos aumentos de 100x, 250x e 500x, com poros e cavidades indicados pelas setas

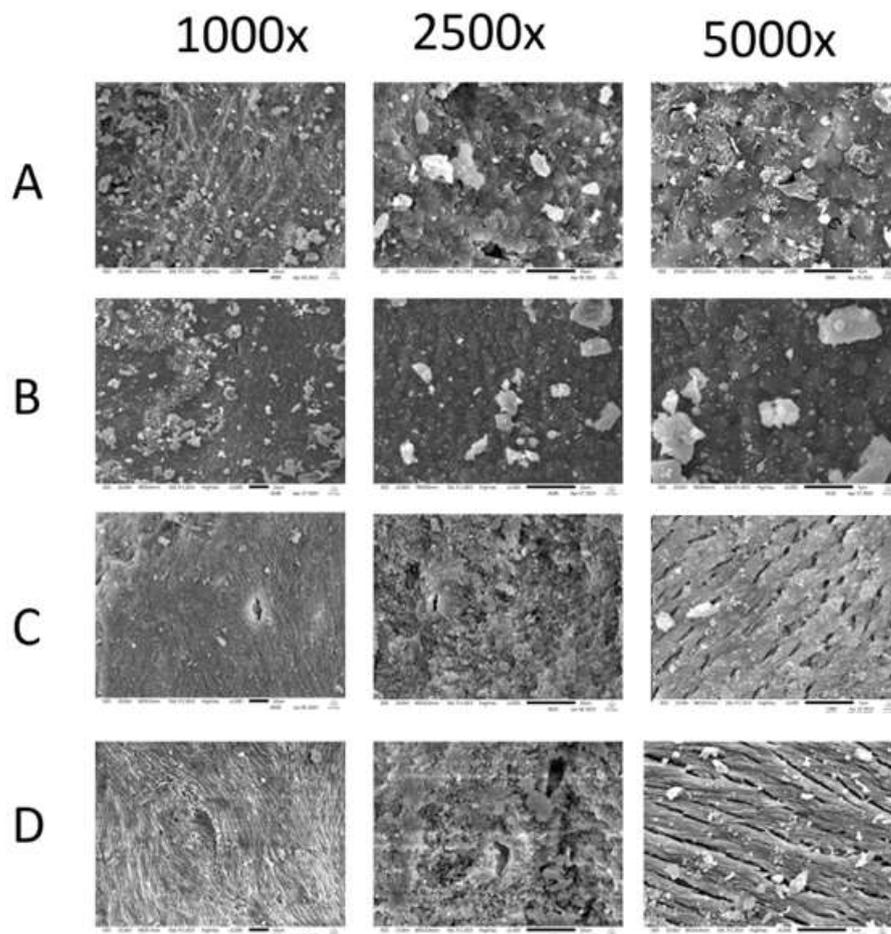


Figura 2. Cerabone e Bio-oss nos aumentos 1000x, 2500x e 5000x

Em uma inspeção visual, o Bio-Oss apresentou uma forma granular de cor branca, e alguns grânulos exibiam poros de tamanho considerável, atribuídos à sua origem em osso esponjoso. As imagens obtidas por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV) neste estudo revelaram que as superfícies do Bio-Oss possuem uma morfologia ramificada e sulcada. Essa característica pode ser resultado da distribuição mineral conduzida por fibras de colágeno. Os tamanhos dos grãos dos cristais variaram entre 50 e 100 nm, com uma presença notável de poros em nanoescala (70-160 nm de diâmetro) entre os cristais.

Na análise do cerabone, observado com um aumento de 100x, foi identificada uma superfície homogênea e lisa, sem a presença de poros.

Ao ampliar as amostras em 1000x, é possível distinguir características singulares na morfologia do Bio-Oss e do Cerabone. O Bio-Oss exibiu uma textura filamentosa, indicando uma porosidade mais alta. Em contrapartida, o Cerabone mostrou uma superfície mais compacta e uniforme, salpicada com pequenas partículas aderidas.

Análise do tamanho dos granulos

Utilizando um aumento de 50x, os grânulos foram medidos em locais aleatórios da amostra e comparados com as informações fornecidas pelo fabricante.

Em relação ao Cerabone, foi realizada uma análise dos tamanhos dos grânulos divididos em duas categorias de granulometria: grânulos com tamanhos variando entre 0,5-1 mm e grânulos com tamanhos entre 1-2 mm. Para avaliar a precisão das especificações fornecidas pelo fabricante, os grânulos foram medidos e seus tamanhos máximos (altura ou largura) foram registrados na figura – Aumento de 50x dos grupos cerabone Small e Large com medidas.

Na primeira categoria, denominada 'Cerabone Small', foram analisados grânulos com tamanhos que variaram de 583 μm a 1,189 mm. A maioria deles encaixou-se dentro da faixa de tamanho especificada pelo fabricante, embora alguns tenham excedido ligeiramente o limite superior de 1 mm. A distribuição dos tamanhos dos grânulos pode ser vista na tabela subsequente.

Para a segunda categoria, 'Cerabone Large', os grânulos analisados variaram de 324 μm a 2,201 mm. Foi constatado que a maioria dos grânulos se encaixa na faixa de tamanho especificada pelo fabricante, apesar de alguns grânulos excederem ligeiramente o limite superior de 2 mm. Os resultados sugerem que, em geral, o fabricante fornece grânulos dentro das faixas de tamanho indicadas, embora sejam

observadas algumas exceções. No entanto, essas exceções são marginais.

Para o produto Bio-Oss® Small, que o fabricante indica como tendo tamanhos de grânulo de 0,25-1 mm (ou 250-1000 μm), as medições revelaram que os tamanhos máximos variam de 407 μm a 1,085 mm. Embora a maior parte dos grânulos se enquadre na faixa fornecida pelo fabricante, foi notado que alguns grânulos ultrapassam o limite superior de 1000 μm .

No caso do produto Bio-Oss® Large, cujos tamanhos de grânulo são listados pelo fabricante como variando de 1-2 mm (ou 1000-2000 μm), os valores máximos registrados no estudo variam de 1,154 mm a 2,433 mm. Também foi constatado que a maioria dos grânulos se enquadra na faixa fornecida pelo fabricante, embora alguns grânulos excedam o limite superior de 2000 μm .

Os resultados sugerem que, embora a maioria dos grânulos esteja dentro dos limites especificados pelo fabricante, há uma variabilidade considerável no tamanho dos grânulos em ambas as categorias de produtos.

Na análise estatística do tamanho das partículas dos quatro biomateriais, foram observadas variabilidades distintas entre eles. O Cerabone® Large apresentou a maior variabilidade com um coeficiente de variação de 38,28%, indicando uma maior dispersão dos tamanhos de partículas em relação à média. Em contraste, o Cerabone® Small apresentou um coeficiente de variação de 20,32%. As análises para Bio-Oss® Small e Bio-Oss® Large revelaram coeficientes de variação de 26,64% e 21,48%, respectivamente. Os resultados sugerem que, enquanto todos os biomateriais têm algum grau de variabilidade em seus tamanhos de partículas, o Cerabone® Large destaca-se por ter a maior discrepância nos tamanhos. (Tabela 2)

Tabela 2. Estatística descritiva dos Tamanhos dos Grânulos dos Materiais Cerabone® e Bio-Oss®

N	Cerabone® Small	Bio-oss® Small	Cerabone® Large	Bio-Oss® Large
1	1.077	774	1.536	1800
2	939,2	504,5	811,3	1904
3	814,2	781,9	1.640	2079
4	583	949,6	1.066	2217
5	659,7	580	1.194	1438
6	875,4	818,4	323,9	1869
7	760,6	798,4	989,3	1532
8	747,1	643,3	928,2	1154
9	1.068	1051	1.513	1608
10	851	765,7	1.000	1548
11	1.139	1085	2.201	2082
12	745	553,2	1.111	1186
13	1.189	407,2	927,0	2433
14	863,1	795,9	1.180	1396
15	786	568	1.864	1832
16	-	441,4	1.204	1967
17	-	683,4	1.468	1378
18	-	603,5	1.646	2004
19	-	-	1.239	-
20	-	-	1.457	-
Min	583	407	324	1.154
Max	1.189	1.085	2.201	2.433
Média	873,2	738,4	1.239,8	1.738,5
DP	177,4	196,7	474,6	373,5
CV (%)	20,3	26,6	38,3	21,5

Análise dos Poros

A estrutura porosa dos biomateriais xenógenos desempenha um papel crucial na migração celular, vascularização e integração de tecidos. A análise neste estudo revelou grande variedade tanto na quantidade quanto no tamanho dos poros entre os materiais Bio-Oss® Large, Bio-Oss® Small, Cerabone® Small e Cerabone® Large. (Tabela 3).

O Bio-Oss® Small destaca-se como o material com a maior quantidade de poros medidos, totalizando 21 poros. Este material também apresenta uma média de tamanho de poro de 262,65 μm , indicando uma estrutura altamente porosa e com poros de tamanho considerável. Isso torna o Bio-Oss® Small particularmente adequado para aplicações onde a migração celular, a vascularização ou a integração de tecidos é desejada.

Em contraste, Cerabone® Small e Cerabone® Large apresentam quantidades menores de poros, com 2 e 4 poros medidos, respectivamente. O tamanho médio desses poros é de 107,44 μm para o Cerabone® Small e 67,52 μm para o Cerabone® Large. Essas características sugerem uma estrutura menos porosa e mais densa para esses dois materiais.

A importância do tamanho e da quantidade de poros em biomateriais xenógenos é amplamente documentada na literatura.

Com base nos resultados encontrados em neste estudo, pode-se observar que os biomateriais Bio-Oss® Small e Bio-Oss® Large apresentam uma quantidade significativa de poros, com tamanhos médios de aproximadamente 262,65 μm e 153,14 μm , respectivamente.

Tabela 3. Quantidade e média do tamanho dos poros

Marca comercial	Media do tamanho dos poros (μm)	Quantidade de poros encontrados
Cerabone®Small	107	2
Cerabone®Large	156	18
Bio-Oss® small	67	4
Bio-Oss® Large	262	21

Análise química dos biomateriais

A análise química foi realizada por meio da EDS. Foram selecionados três campos aleatórios de cada amostra no aumento de 100X para a avaliação das composições químicas presentes. Além disso, foi realizada a análise de Mapeamento de Elementos Químicos (MAPA) nos mesmos campos para verificar a distribuição superficial dos elementos químicos encontrados. Foram encontrados, em ambos os materiais, oxigênio, fósforo, cálcio, sódio e magnésio.

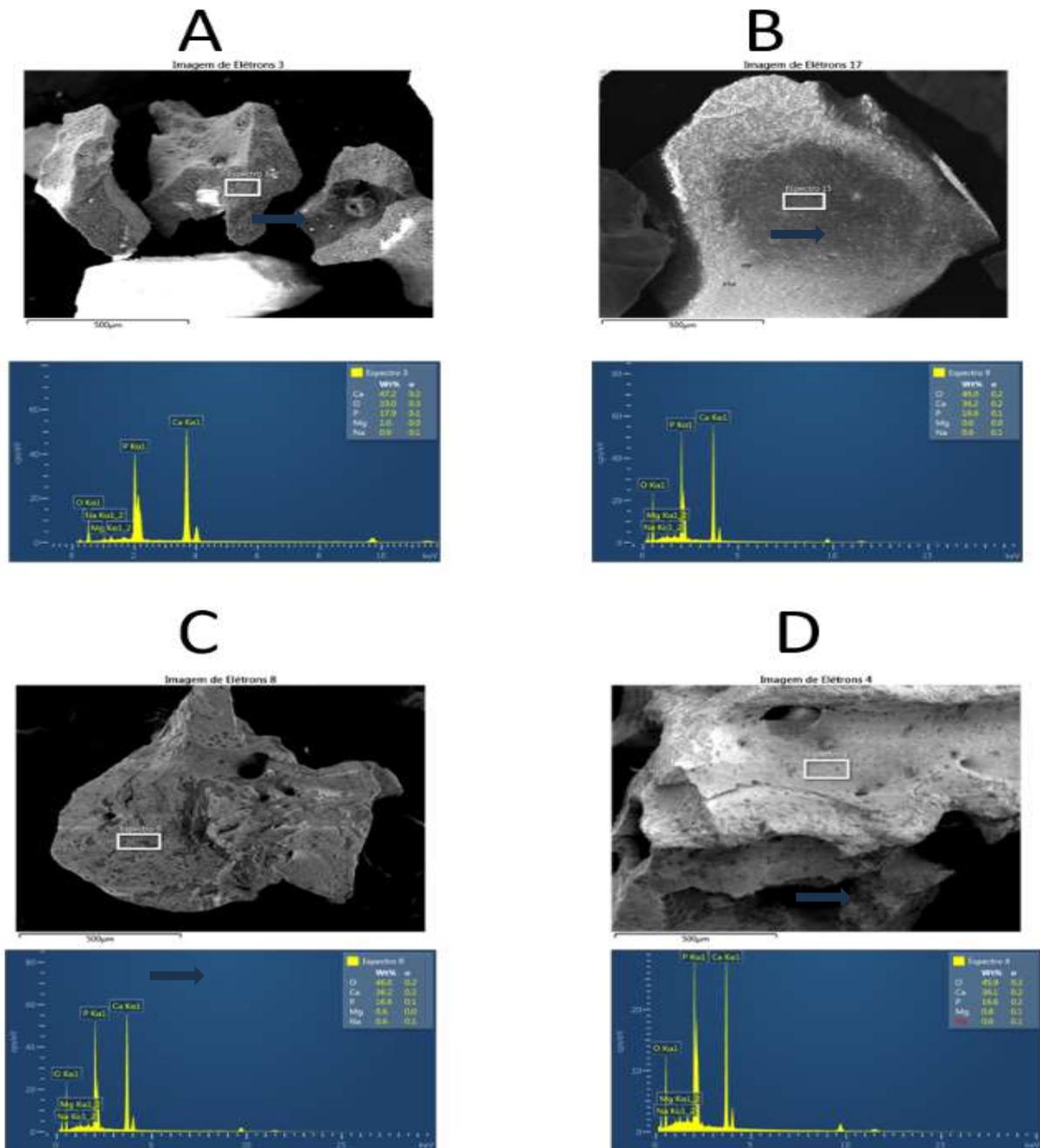


Figura 3. Seta azul indicando área delimitada para avaliação da composição química superficial

Tabela 4. Média do percentual em peso molecular (Wt%) das moléculas químicas observadas.

	Ca (Wt%)	P (Wt%)	O (Wt%)	Mg (Wt%)	Na (Wt%)
A	47,2	17,9	33,0	1,0	0,9
B	41,0	17,0	38,6	1,2	2,1
C	36,2	16,6	46,0	0,6	0,6
D	36,1	16,6	45,9	0,8	0,6

Os biomateriais Cerabone Small, Cerabone Large, Bio-Oss Small e Bio-Oss Large foram analisados quanto à sua composição química. O Cerabone Small apresentou o teor mais elevado de cálcio (47,2%), seguido pelo Cerabone Large (41,0%) e pelo Bio-Oss Small (36,2%). Todos os biomateriais possuem teores semelhantes de fósforo, em torno de 17%. No entanto, o Cerabone Large possui um teor ligeiramente menor de oxigênio (38,6%), enquanto o Cerabone Small (33,0%) e o Bio-Oss Small (46,0%) apresentam teores diferentes.

Em relação aos elementos minoritários, o Cerabone Large se destaca por ter os maiores teores de sódio (2,1%) e magnésio (1,2%), enquanto o Bio-Oss Small possui teores mais baixos de sódio (0,9%) e magnésio (1,0%). O Cerabone Small apresenta os menores teores de sódio (0,6%) e magnésio (0,6%).

É importante destacar que tanto o Bio-Oss Small quanto o Bio-Oss Large apresentaram uma variação mínima entre as amostras, o que evidencia um alto nível de padronização e excelência na sua composição. Esses resultados indicam variações na composição química dos biomateriais, especialmente nos teores de cálcio, oxigênio, sódio e magnésio. Essas diferenças podem influenciar nas propriedades e no desempenho dos biomateriais em aplicações de regeneração óssea. Além disso, a razão Ca/P foi descrita na tabela 6.

Tabela 5. Razão Ca/P das amostras analisadas.

	Ca (Wt%)	P (Wt%)	Ca/P
Cerabone Small	47,2	17,9	2,64
Cerabone Large	41,0	17,0	2,41
Bio-Oss Small	36,2	16,6	2,18
Bio-Oss Large	36,1	16,6	2,17

Observa-se que o Cerabone, tanto na versão Small quanto na Large, apresenta uma razão Ca/P mais alta em comparação com o Bio-Oss, tanto na versão Small quanto na Large. A razão Ca/P é uma medida que indica a proporção de cálcio (Ca) para fósforo (P) presente no biomaterial. Quanto maior a razão Ca/P, maior a quantidade de cálcio em relação ao fósforo e menor será sua solubilidade.

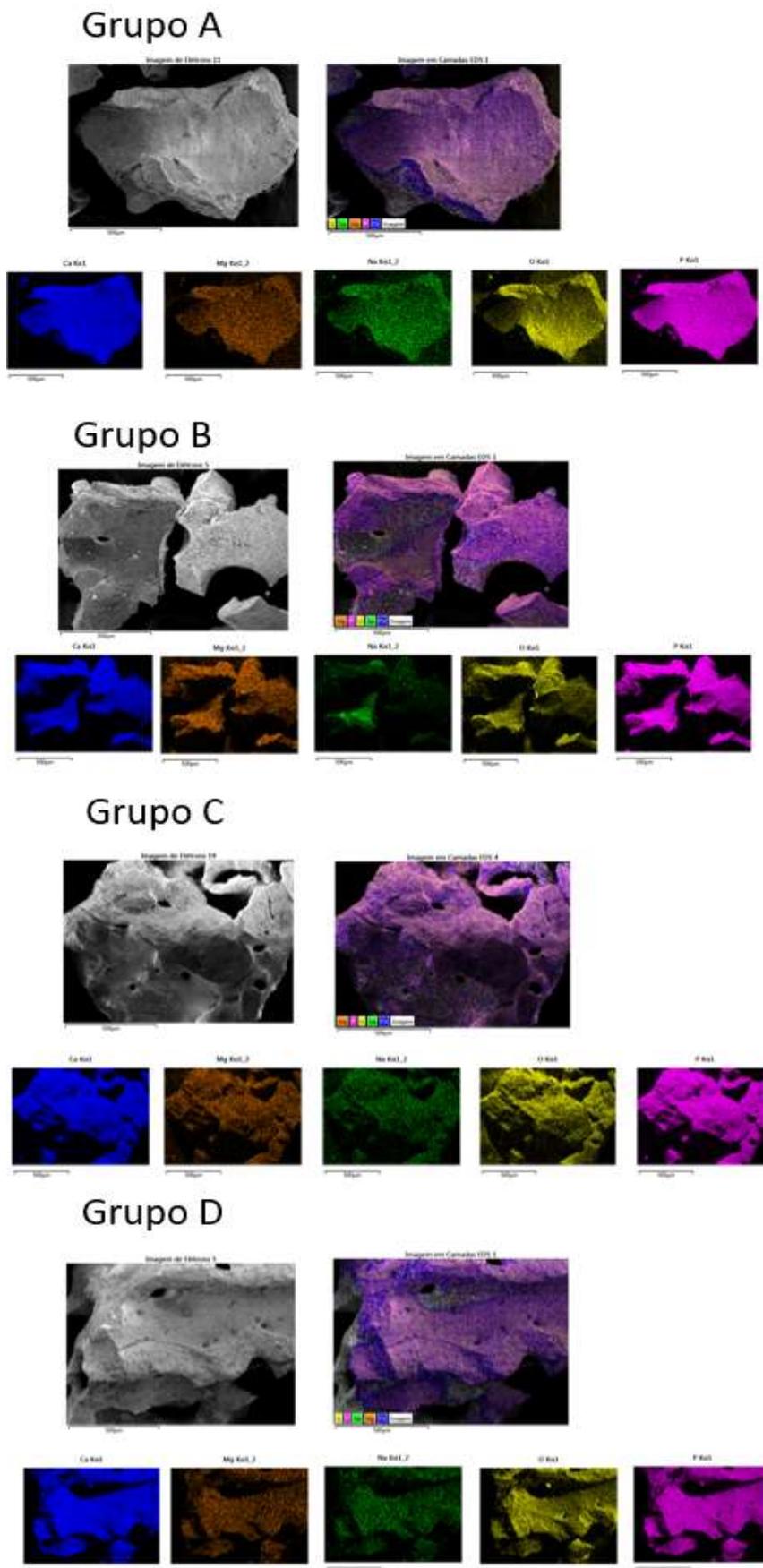


Figura 4. Análise por MAPA

A análise combinada de Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) possibilitou a determinação qualitativa e semiquantitativa da composição química na superfície da amostra. Ao avaliarmos três áreas distintas da mesma amostra, confirmamos a uniformidade do material. Os resultados mostraram uma distribuição homogênea da fase química do produto, com a presença mínima dos elementos magnésio (Mg) e sódio (Na). Adicionalmente, identificamos as concentrações esperadas de oxigênio (O), cálcio (Ca) e fósforo (P). A análise química revelou que o cálcio (Ca) foi o componente predominante nas amostras, seguido pelo fósforo (P) e oxigênio (O). Além disso, foram detectados traços de magnésio (Mg) e sódio (Na), que representavam apenas 0,6% a 2,1% da composição total.

DISCUSSÃO

A morfologia do Bio-Oss, conforme observada neste estudo, está em concordância com as observações feitas por Xu et al.¹¹, que também identificaram uma morfologia granular branca. Alguns grânulos exibiram poros grandes, derivados da natureza do osso esponjoso, em um aumento de 100x. As superfícies do Bio-Oss, conforme capturadas em nossas imagens de microscopia eletrônica de varredura, também apresentaram uma morfologia ramificada e sulcada. Isso pode ser atribuído à distribuição mineral mediada por fibras de colágeno. Ademais, os tamanhos dos cristais variaram de 50 a 100 nm, com uma presença significativa de poros em nanoescala (70-160 nm de diâmetro) entre os cristais.

Por outro lado, a morfologia do Cerabone, quando observada em um aumento de 100x, alinhou-se com os resultados encontrados por Lee et al.¹². A superfície homogênea e lisa, sem a presença de poros, e a identificação de ângulos vivos e

concauidades no material, foram consistentes com os achados de Lee et al.¹²

Ao analisar as amostras em um aumento de 1000x, identificamos características morfológicas distintas entre o Bio-Oss e o Cerabone. As diferenças observadas neste estudo também foram reportadas por Kacarevic et al.¹³, que observaram uma textura filamentosa e maior porosidade no Bio-Oss, enquanto o Cerabone exibiu uma superfície mais densa e uniforme, com a presença de pequenas partículas aderidas.

Devemos considerar a morfologia dos biomateriais ao selecioná-los para uso em diferentes aplicações clínicas. As diferenças morfológicas podem ter um impacto significativo nas propriedades mecânicas, na biocompatibilidade e no potencial de osteointegração dos biomateriais, influenciando diretamente no sucesso do procedimento de enxerto ósseo. O tamanho e a distribuição dos poros, juntamente com sua área superficial, desempenham um papel crucial na facilitação da absorção de nutrientes e na eliminação de detritos celulares (HABRAKEN et al., 2007). Os resultados do presente estudo evidenciam uma variação no tamanho dos grânulos fornecidos pelos fabricantes, tanto para o Cerabone quanto para o Bio-Oss. Embora a maioria dos grânulos esteja dentro do intervalo especificado pelos fabricantes, alguns excedem esses limites, indicando uma variabilidade no controle de qualidade desses produtos.

Este resultado está em consonância com o estudo de Schmitt et al.¹⁴, no qual também foram observadas variações no tamanho dos grânulos de biomateriais. Essas variações podem ter implicações clínicas importantes, uma vez que o tamanho dos grânulos pode afetar o processo de osseointegração e, conseqüentemente, o sucesso do enxerto ósseo.

Além disso, vale ressaltar que o estudo de Lee et al.¹² sugeriu que a

variabilidade no tamanho dos grânulos pode influenciar a velocidade e a qualidade do processo de cicatrização óssea. Portanto, a presença de grânulos que excedem os tamanhos especificados pelos fabricantes pode ter implicações no resultado clínico final do tratamento.

Entretanto, é importante considerar que as diferenças observadas neste estudo foram marginais e que, de maneira geral, os produtos analisados se mantiveram dentro dos limites estabelecidos pelos fabricantes. Assim, apesar da variabilidade observada, é razoável afirmar que os produtos analisados ainda apresentam uma adequada consistência no tamanho dos grânulos fornecidos.

Estes achados reforçam a importância de um rigoroso controle de qualidade por parte dos fabricantes, para assegurar que os tamanhos dos grânulos estejam sempre dentro dos limites especificados. Além disso, ressalta-se a necessidade de mais estudos sobre o impacto do tamanho dos grânulos nos resultados clínicos dos procedimentos de enxerto ósseo, a fim de otimizar esses tratamentos e garantir os melhores resultados possíveis para os pacientes.

A importância do tamanho e quantidade de poros em biomateriais xenógenos está bem documentada na literatura científica. Habraken et al.¹⁵, por exemplo, observaram que o tamanho dos poros pode influenciar na taxa de vascularização e migração celular. Lee et al.¹², por outro lado, sugeriram que uma maior quantidade de poros pode facilitar a integração do tecido.

Essas observações são corroboradas por Engin & Tas¹⁶, que afirmaram que a presença de poros no material é crucial para a colonização por células do tecido ósseo, pois fornecem um ambiente propício para a formação de tecido peri-implantar. De acordo com esses autores, os poros devem ter um tamanho adequado, geralmente entre 50 e 100 μm ou entre 250 μm e 300 μm , para permitir a colonização celular

efetiva.

Com base nos resultados encontrados, os biomateriais Bio-Oss Large e Cerabone Large, que apresentam uma quantidade significativa de poros com tamanhos médios de aproximadamente 272 μm e 131 μm , respectivamente, possuem dimensões dentro da faixa indicada por Engin & Tas¹⁶. Isso sugere que esses materiais podem ser propícios à colonização celular e à formação óssea. Do mesmo modo, os biomateriais Bio-Oss Small e Cerabone Small, que possuem tamanhos médios de poros de aproximadamente 67.5 μm e 107.4 μm , respectivamente, estão acima do limite de 50 μm mencionado por Ikeda et al.¹⁷ Isso indica que a formação óssea pode ser possível nos poros encontrados nesses materiais.

Nesse contexto, as análises químicas dos biomateriais também desempenham um papel importante. Nesse estudo, os materiais foram analisados por meio da Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS), selecionando-se três campos aleatórios de cada amostra para avaliar as composições químicas presentes. Além disso, foi realizada a análise de Mapeamento de Elementos Químicos (MAPA) nos mesmos campos para verificar a distribuição superficial dos elementos químicos encontrados. Em todos os materiais, foram identificados oxigênio, fósforo, cálcio, sódio e magnésio.

Os biomateriais Cerabone Small, Cerabone Large, Bio-Oss Small e Bio-Oss Large apresentaram variações na composição química, especialmente nos teores de cálcio, oxigênio, sódio e magnésio. Essas diferenças podem influenciar as propriedades e o desempenho dos biomateriais em aplicações de regeneração óssea pois alteram a razão Ca/P, uma medida que indica a proporção de cálcio (Ca) para fósforo (P) presente no biomaterial, foi calculada. Segundo Guastaldi¹⁸, quanto maior a razão Ca/P, menor será a solubilidade e mais cristalino será o material, resultando em uma reabsorção mais lenta. Essa afirmativa é corroborada pelo estudo de

Kacarevic et al.¹³, que observou que o Bio-Oss, devido à sua menor cristalinidade, apresentou uma maior taxa de reabsorção quando comparado a outros biomateriais.

Nesse estudo, foi observado que o Bio-Oss Large e o Bio-Oss Small apresentaram razões Ca/P de 2.14 e 2.12, respectivamente, enquanto o Cerabone Large e o Cerabone Small tiveram razões Ca/P de 1.92 e 1.89, respectivamente. Essas razões Ca/P indicam que o Bio-Oss tem uma cristalinidade um pouco maior que o Cerabone.

Além disso, as análises de MAPA realizadas no estudo permitiram observar a distribuição dos elementos químicos nos biomateriais. Em geral, foi observada uma distribuição homogênea de cálcio e fósforo em todos os biomateriais, enquanto a distribuição de sódio e magnésio apresentou variações entre os diferentes biomateriais. Estas observações sugerem que a composição química e a distribuição dos elementos nos biomateriais podem ter um papel importante na sua biocompatibilidade e na sua capacidade de promover a regeneração óssea.

Em suma, a estrutura porosa e a composição química dos biomateriais xenógenos Bio-Oss e Cerabone têm implicações importantes na sua capacidade de promover a regeneração óssea. Tanto a quantidade e tamanho dos poros quanto a composição química parecem desempenhar papéis fundamentais nesse processo. Assim, a escolha do biomaterial mais adequado pode depender das necessidades específicas de cada caso clínico.

CONCLUSÃO

Os biomateriais Cerabone e Bio-Oss, em suas versões small e large, foram analisados e comparados em termos de composição química e morfologia. A análise química revelou que todos os biomateriais continham elementos essenciais para a

regeneração óssea, como oxigênio (O), cálcio (Ca) e fósforo (P), conforme esperado. Além disso, foram detectados traços de magnésio (Mg) e sódio (Na), embora em proporções reduzidas.

Em relação à presença de magnésio, é interessante notar que o magnésio tem demonstrado desempenhar um papel crítico na adesão celular e subsequente remodelação óssea. Um estudo conduzido por Zreiqat et al. (2002) investigou os mecanismos pelos quais o magnésio estimula a adesão de células osteoblásticas a implantes ortopédicos comuns. Os resultados indicaram que o magnésio facilita a interação entre células ósseas e materiais de implante, promovendo uma melhor integração e, potencialmente, uma remodelação óssea mais eficaz. Esta observação reforça a relevância do magnésio, sugerindo que sua presença pode contribuir para uma melhor integração e funcionamento do enxerto no ambiente biológico.

No que diz respeito à morfologia, observou-se que o Cerabone possui uma estrutura com ângulos mais definidos, linhas retas e uma quantidade menor de poros. Em ampliações maiores, a superfície do Cerabone apresentou uma estrutura mais lisa e uniforme. Em contraste, o Bio-Oss Small exibiu poros de maior tamanho e uma quantidade maior de picos, vales, fendas e reentrâncias em sua estrutura, resultando em uma morfologia mais porosa e amorfa.

Esses resultados sugerem que o Cerabone possui uma estrutura mais regular e definida, enquanto o Bio-Oss Small apresenta uma morfologia mais porosa e complexa. Essas características distintas podem influenciar a interação com as células e o crescimento ósseo, tornando-se fatores relevantes na seleção e no desenvolvimento de biomateriais apropriados para aplicações clínicas de regeneração óssea. Notavelmente, o Cerabone apresenta uma razão Ca/P elevada, característica que pode resultar em uma reabsorção mais lenta. Essa característica permite que o

biomaterial permaneça *in situ* por períodos mais prolongados sem sofrer reduções significativas de volume. Por outro lado, o Bio-Oss destaca-se por possuir uma maior quantidade de poros e, adicionalmente, uma média de tamanho de poro superior em comparação ao Cerabone. Essas peculiaridades são cruciais para facilitar a migração celular, a vascularização e, conseqüentemente, a integração eficiente com o tecido circundante. É importante salientar que esta investigação representa um estudo fundamental e que mais estudos são necessários para esclarecer como essas características impactam no comportamento *in vivo* dos enxertos.

REFERÊNCIAS

1. Williams DF. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomater.* 2008; 29(20): 2941-53.
2. Dalapicula SS, Vidigal Júnior GC, Conz MB, Cardoso ES. Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas. Uma revisão crítica. *ImplantNews*, 2006; 3(5): 487-91.
3. Bauer TW, Muschler GF. Bone graft materials. *Clin Ortho Relat Res.* 2000; 371: 10-27.
4. Mellonig JT, Triplett RG. Guided tissue regeneration and endosseous dental implants. *Int J Periodontics Restor Dent.* 1993; 13(2):108-19.
5. Gatti A. Biocompatibility of micro- and nanoparticles. Part I: in liver and kidney. *Biomater.* 2002; 23(11): 2381-7.
6. Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomater Res.* 2019; 23(1): 4.
7. Misch CE. Biomateriais utilizados em implantes sentários. In: *Implantes dentários contemporâneos*. 2. ed. São Paulo: Editora Santos, 2000. p. 271- 302.
8. Burg KJL, Porter S, Kellam JF. Biomaterial developments for bone tissue engineering. *Biomater.* 2000; 21(23): 2347-59.
9. Rodolfo LM, Machado LG, Betoni Júnior W, Faeda RS, Queiroz TP, Faloni APS. Substitutos ósseos alógenos e xenógenos comparados ao enxerto autógeno: reações biológicas. *Rev Bras Multidisc.* 2017; 20(1): 94-105.
10. Barbeck M, Unger R, Witte F, Wenisch S, Schnettler R. Xenogeneic bone grafting materials. *Implants.* 2017; (3): 34-36.
11. Xu G, Wang T, Shen C, Zhou J, Wan B, Forouzanfar T, et al. In vitro physicochemical characterization of a novel type of bone-defect-filling granules—BpNcCaP in comparison to deproteinized bovine bone (Bio-Oss®). *Nano TransMed.* 2023; 2(1): e9130016–6.
12. Lee DH, Tripathy N, Shin JH, Song JE, Cha JG, Min KD, et al. Enhanced osteogenesis of β -tricalcium phosphate reinforced silk fibroin scaffold for bone tissue biofabrication. *International J Biol Macromol.* 2017; 95: 14-23.
13. Perić Kačarević Z, Kavehei F, Houshmand A, Franke J, Smeets R, Rimashevskiy D, et al. Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. *Int J Artif Organs.* 2018; 41(11): 789-800.

14. Schmitt CM, Doering H, Schmidt T, Lutz R, Neukam FW, Schlegel KA. Histological results after maxillary sinus augmentation with Straumann® BoneCeramic, Bio-Oss®, Puros®, and autologous bone. A randomized controlled clinical trial. *Clin Oral Implants Res.* 2013; 24(5): 576-85.
15. Habraken WJEM, Wolke JGC, Jansen JA. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007; 59(4-5): 234-48.
16. Engin NO, Tas AC. Manufacture of macroporus calcium hydroxyapatite bioceramics. *J Eur Ceram Soc.* 1999; 19: 2569-72.
17. Ikeda K, Takeshita S. The role of osteoclast differentiation and function in skeletal homeostasis. *J Biochem.* 2015; 159(1): 1-8.
18. Guastaldi AC, Aparecida AH. Fosfatos de cálcio de interesse biológico: importância como biomateriais, propriedades e métodos de obtenção de recobrimentos. *Química Nova.* 2010; 33(6): 1352-8.
19. Zreiqat, H., Howlett, C. R., Zannettino, A., Evans, P., Schulze-Tanzil, G., Knabe, C., & Shakibaei, M. (2002). Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. *J Biomed Mater Res.*, 62(2), 175-184.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os biomateriais Cerabone e Bio-Oss, em suas versões small e large, foram analisados e comparados em termos de composição química e morfologia. A análise química revelou que todos os biomateriais continham elementos essenciais para a regeneração óssea, como oxigênio (O), cálcio (Ca) e fósforo (P), conforme esperado. Além disso, foram detectados traços de magnésio (Mg) e sódio (Na), embora em proporções reduzidas.

No que diz respeito à morfologia, observou-se que o Cerabone possui uma estrutura com ângulos mais definidos, linhas retas e uma quantidade menor de poros. Em ampliações maiores, a superfície do Cerabone apresentou uma estrutura mais lisa e uniforme. Em contraste, o Bio-Oss Small exibiu poros de maior tamanho e uma quantidade maior de picos, vales, fendas e reentrâncias em sua estrutura, resultando em uma morfologia mais porosa e amorfa.

Esses resultados sugerem que o Cerabone possui uma estrutura mais regular e definida, enquanto o Bio-Oss Small apresenta uma morfologia mais porosa e complexa. Essas características distintas podem influenciar a interação com as células e o crescimento ósseo, tornando-se fatores relevantes na seleção e no desenvolvimento de biomateriais apropriados para aplicações clínicas de regeneração óssea.

REFERÊNCIAS

- BARBECK, M. *et al.* Xenogeneic bone grafting materials. **Implants**, v. 3. p. 34-36. 2017.
- BAUER, T. W.; MUSCHLER, G. F. Bone graft materials. An overview of the basic science. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 371, p. 10-27, Feb. 2000.
- BURG, K. J. L.; PARTER, S.; KELLAN, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 21, p. 2347-2359, 2000.
- CARVALHO, A. L. *et al.* Effects of granule size on the osteoconductivity of bovine and synthetic hydroxyapatite: a histologic and histometric study in dogs. **Journal of Oral Implantology**, v. 33, n. 5, p. 267-276, 2007.
- CRUZ, A. C. C. *et al.* Utilização de vidros como substitutos ósseos: revisão de literatura. **Revista de Odontologia da Universidade Cidade São Paulo**, v. 18, n. 3, p. 287-295, set./dez. 2006.
- DALAPICULA, S. S. *et al.* Características físico-químicas dos biomateriais utilizados em enxertias ósseas. Uma revisão crítica. **ImplantNews**, v. 3, n. 5, p. 487-491, 2006.
- FIGUEIREDO, A. *et al.* Comparison of a xenogeneic and an alloplastic material used in dental implants in terms of physico-chemical characteristics and in vivo inflammatory response. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 6, p. 3506-3513, 2013.
- GATTI, A. M.; RIVASI, F. Biocompatibility of micro-and nanoparticles. Part I: in liver and kidney. **Biomaterials**, v. 23, n. 11, p. 2381-2387, 2002.
- JEONG, J. *et al.* Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. **Biomaterials Research**, v. 23, n. 4, p. 1-11, 2019.
- KACAREVIC, Z. P. *et al.* Purification processes of xenogeneic bone substitutes and their impact on tissue reactions and regeneration. **The International Journal of Artificial Organs**, v. 105, n. 4, p. 1-12, Apr. 2018.
- KARAGEORGIU, V.; KAPLAN, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. **Biomaterials**, v. 26, n. 27, p. 5474-5491, 2005.
- KUBOKI, Y. *et al.* BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 39, n. 2, p. 190-199, 1998.
- KUBOKI, Y. *et al.* Laser-perforated membranous biomaterials induced pore size-dependent bone induction when used as a new BMP carrier. **Connective Tissue Research**, v. 44, n. 1, p. 318-325, 2009.

MELLONIG, J. T. *et al.* Guided tissue regeneration and endosseous dental implants. **International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry**, v. 13, n. 2, p. 108-119, 1993.

MISCH, C. E. Biomateriais utilizados em implantes sentários. *In: Implantes dentários contemporâneos*. 2. ed. São Paulo: Editora Santos; 2000. p. 271- 302.

OONISHI, H. *et al.* Comparative bone growth behavior in granules of bioceramic materials of various sizes. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 44, n. 1, p. 31-43, 1999.

PIRES, A. L. R.; BIERHALZ, A. C. K.; MORAES, Â. M. Biomaterials: types, applications, and market. **Química Nova**, v. 38, n. 7, p. 957-971, Aug. 2015.

RAMIREZ-FERNANDEZ, M. P. *et al.* Experimental model of bone response to xenografts of bovine origin (Endobon): A radiological and histomorphometric study. **Clinical Oral Implants Research**, v. 22, n. 7, p. 727-734, 2011.

RODOLFO, L. M. *et al.* Substitutos ósseos alógenos e xenógenos comparados ao enxerto autógeno: reações biológicas. **Revista Brasileira Multidisciplinar**, v. 20, n. 1, p. 94-105, 2017.

SHEIKH, Z. *et al.* Controlling Bone Graft Substitute Microstructure to Improve Bone Augmentation. **Advanced Healthcare Materials**, v.5, p. 1646-1655, 2016.

TRAJKOVSKI, B. *et al.* Hydrophilicity, viscoelastic and physicochemical properties variations in dental bone grafting substitutes. **Materials**, v. 11, n. 2, p. 215- 234, 2018.

TURRER, C. L.; FERREIRA, F. P. M. Biomateriais em cirurgia craniomaxilofacial: princípios básicos e aplicações - revisão de literatura. **Revista Brasileira de Cirurgia Plástica**, v. 23, n. 3, p. 234-239, 2008.

WILLIAMS, D. F. On the mechanisms of biocompatibility. **Biomaterials**, v. 29, n. 20, p. 2941-2953, 2008.

XU, G. *et al.* In-vitro physicochemical characterization of a novel type of bone-defect-filling granules—BpNcCaP in comparison to deproteinized bovine bone (Bio-Oss®). **Nano TransMed**, v. 2, n. 1, p. e9130016, 2023. doi: 10.26599/NTM.2023.9130016.

ZREIQAT, H. *et al.* Mechanisms of magnesium-stimulated adhesion of osteoblastic cells to commonly used orthopaedic implants. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 62, n. 2, p. 175-184, 2002.