

**UTILIZAÇÃO DE FOSFATO DE CÁLCIO AMORFO (ACP) NO
PROCESSO DE REPARAÇÃO TECIDUAL**

The use of amorphous calcium phosphate (ACP) in the tissue repair process

Sergio Allegrini Junior¹

Antonio Carlos da Silvas²

Marcelo Yoshimoto¹

Francisco José Correa Braga²

¹PhD. Universidade Ibirapuera (UNIB) – Av. Interlagos, 1329, São Paulo (SP), Brasil

²PhD. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN) – Av. Prof. Lineu Prestes, 2242, São Paulo (SP), Brasil

Autor para correspondência

Sérgio Allegrini Jr.

Universidade Ibirapuera (UNIB)

Av. Interlagos, 1329, Chácara Flora- CEP:04661-100

São Paulo, SP, Brasil

E-mail: sergiojr@usp.br

Artigos Científicos

RESUMO

Biomateriais sintéticos vem com o passar dos tempos se tornando ideais para a recuperação de tecidos ósseos traumatizados. Alguns substitutos ósseos com formato de algodão estão sendo utilizados em zonas de defeitos teciduais. O fosfato de cálcio Amorfo (ACP) em fibras foi confeccionado e testado in vitro por meio de um teste de citotoxicidade. Em um paciente caucasiano, com 62 anos, foi realizado procedimento cirúrgico com retirada de implante de titânio sem integração com o tecido ósseo. Após remoção e curetagem de tecido fibrosado da região, o leito ósseo remanescente foi preenchido com o biomaterial ACP deixando o local fechado por período de 15 semanas. Aguardado este período de reparação tecidual, foi realizado novo procedimento cirúrgico com instalação de novo implante de titânio. O teste de citotoxicidade preliminar apresentou resultado negativo. A análise radiográfica evidenciou formação tecidual consistente semelhante a tecido ósseo esponjoso. O biomaterial demonstrou ser eficiente na deposição e osteocondução óssea.

ABSTRACT

Synthetic biomaterials become, through the time ideal for the recovery of traumatized bone tissue. Some bone substitutes with cotton format are being used in areas of tissue defects. The amorphous calcium phosphate (ACP) fiber was made and tested in vitro using a cytotoxicity assay. In a Caucasian patient, aged 62, it was performed surgical procedure for removal of titanium implant without integration with bone tissue. After removal and curettage of fibrous tissue in the region, the remaining bone bed was filled with ACP biomaterial maintaining the area closed for 15 weeks. After this period of tissue repair, it was carried out new surgical procedure with new titanium implant installation. The preliminary cytotoxicity test presented negative result. Radiographic analysis showed consistent tissue formation similar to cancellous bone. The biomaterial proved to be effective in bone osteoconduction and deposition.

Descritores: Fosfato de cálcio amorfo, implante, citotoxicidade, osteocondução.

Descriptors: amorphous calcium phosphate, implant, cytotoxicity, osteoconduction.

INTRODUÇÃO

O tecido ósseo é composto por 70% em massa de componente inorgânico (apatita óssea) e 30% em massa componente orgânico (colágeno).¹ Embora enxertos autógenos tenham sido amplamente considerados como um excelente material para reparação em traumas de tecido ósseo, a sua retirada em leito doador promove grande desconforto para o paciente. Com intuito de reduzir a morbidade dos pacientes submetidos a retirada deste modelo de enxertia, muitos materiais sintéticos foram e estão sendo desenvolvidos para imitar as funções da enxertia autóloga. O problema para se conseguir características semelhantes se encontra na dificuldade em desempenhar os papéis de osteogenicidade e osteoindutividade existentes no biomaterial autólogo.

Os biomateriais sintéticos mais utilizados pela comunidade científica e pelos cirurgiões dentistas são biocerâmicas com composição química definida como um fosfato de cálcio (Ca-P). Estes dois componentes químicos Ca e P oferecem na forma de fosfato, estruturas bio-bsorvíveis com taxas de absorção diferentes e são considerados osteocondutores.

Considerando que o componente mineral do osso é um tipo

de fosfato de cálcio, vários modelos químicos baseados em CaP tais como hidroxiapatita (HA - $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$), fosfato tricálcico (TCP - $Ca_3(PO_4)_2$), e fosfatos de cálcio bifásico (HA + β -TCP),² estão sendo amplamente utilizados como substitutos de osso.^{3,4} A sua inserção em leito ósseo traumatizado favorece a migração vascular como uma ponte de união do tecido ósseo pré-existente e a parte central da massa de biomaterial, auxiliando na reparação tecidual local.^{5,6}

O biomaterial mais utilizado como material bioativo seria a HA devido à sua semelhante composição ao osso, contudo devido a sua baixíssima taxa de absorção, as células vivas sugerem ter dificuldades de penetração e interação entre as mesmas, o que pode restringir na nova formação óssea na área de enxertia.^{7,8} A resposta ideal seria a que os materiais implantados apresentem propriedades de bio- absorção e favoreçam a regeneração óssea, seguido por completa substituição por tecido ósseo natural depois da estimulação da formação óssea.

Alguns enxertos sintéticos têm a capacidade de promover o crescimento ósseo devido a sua adequada geometria promovendo a

Artigos Científicos

viabilidade celular. O β -fosfato tricálcico (TCP- β) é um excelente biomaterial devido a suas características de biocompatibilidade, osteocondução e bio-absorção ⁴ sendo considerado como modelo de eleição em cultura de tecidos, experimento in vivo e estudos clínicos. ^{9, 10}

A combinação de duas cerâmicas bioativas como a HA e o β TCP pode melhorar as propriedades físico-químicas do produto final. Os fosfatos de cálcio bifásicos (BCP) oferecem controlada bioatividade e equilibrada biodegradação. Esta combinação bifásica pode ser considerada como ideal para a regeneração óssea, pois a HA melhora o comportamento mecânico do material além de apresentar uma reabsorção mais lenta enquanto que o β -TCP atua nas fases iniciais da remodelação do biomaterial favorecendo o início da deposição óssea. ¹¹ Este processo é também conhecido como substituição rastejante onde um substituto de osso é caracterizado segundo sua funcionalidade entre a degradação e como substrato osteocondutor. ¹²

Um ideal substituto ósseo deveria auxiliar as células precursoras de osso no processo de diferenciação e proliferação de matriz extracelular, permitindo que os osteoblastos

migrem por entre as partículas com diferentes tamanhos formando-se pontes de sustentação e de interligação entre células, auxiliando na proliferação e diferenciação. ⁶ Para se conseguir um melhor resultando, os biomateriais devem apresentar diferenciadas propriedades químicas e físicas como composição química, formato, tamanho e dureza de suas partículas. Além disso a estrutura final deve apresentar porosidade com macroporos e microporos até nanoporos, resultando em diferentes estágios de absorção, adesão e deposição de tecido ósseo no interior e entre o material substituto ósseo. ¹³

A interação entre algumas desta propriedade pode modular a resposta inflamatória. ¹⁴⁻¹⁷ Após sua interação com os tecidos vivos, ocorre processo de quimiotaxia com a atração de células de defesa e com fagócitos / macrófagos e células gigantes multinucleadas, que podem controlar a dissolução do substituto de osso por intermédio da secreção de citocinas locais. ^{14, 16}

Apatita é a fase inorgânica na matriz óssea, configurando e proporcionando ao osso natural suas propriedades mecânicas. Esta apatita óssea é composta, predominantemente por hidroxiapatita (HA) ^{18, 19} contudo sua matéria prima é proveniente do

fosfato de cálcio amorfo (ACP).^{20, 21} O ACP pode ainda ser encontrado no tecido ósseo vivo porém este componente aparece nas fases iniciais ou intermediárias à formação de HA²². Durante o desenvolvimento humano entre a fase de adolescência até a adulta, o osso torna-se progressivamente mais cristalizado. Isso ocorre, pois (ACP) solúvel é convertido ao longo do tempo até se formar hidroxiapatita estável.²² Recentes trabalhos in vitro demonstraram que os ACPs podem suportar crescimento e diferenciação de células osteoblásticas.^{23, 24} Outros estudos utilizando biomateriais associados à ACP demonstraram auxílio deste componente na promoção de células preosteoblasticas apoiando a diferenciação celular.^{6, 23} Compostos nanoestruturados de ACP e HA apresentam excelente biocompatibilidade e bioatividade.^{6, 25}

A utilização de um biomaterial semelhante à apatita do osso natural, porém com características de rápida bio-absorção local auxiliar no processo de reparação tecidual. O intuito deste relato foi o de mostrar que biomateriais produzidos com fosfato de cálcio amorfo (ACP) confeccionados em formato de fibras pode auxiliar no processo de reparação tecidual local quanto

inserido em local de trauma ósseo. A associação entre mecânica e química de superfície pode acelerar o processo de cicatrização tecidual local.

MATERIAIS E MÉTODOS

O material de partida é obtido por reação hidrotérmica de CaO e P₂O₅ com Ca / P > 1 .O material foi seco e triturado e, em seguida, fundiu-se o composto à 1350 °C quando foi vasado para a base de rotação da máquina de Hager-Rosengarth formando as fibras com diâmetros que variam de 5 µm a 200 µm (Fig. 1). Este Material foi esterilizado em Radiação Gama e posteriormente testado in vitro.

"In Vitro" de ensaio: Teste de citotoxicidade (CT)

Para este ensaio foi utilizado o método de rastreio de toxicidade in vitro de materiais. O ensaio foi realizado seguindo International Standardization Organization - ISO 1099317 e da metodologia de acordo.²⁶ linha celular de monocamada de NCTC clone 929 obtida a partir de American Type Culture Collection (ATCC) sendo usados em 96 recipientes com microplaca que receberam extratos diluídos em série de amostras de fibra de ACP. O extrato foi obtido por fibras ACP de

Artigos Científicos

imersão num frasco com meio de cultura de células MEM (meio mínimo de Eagle's) com ácidos aminados, mais soro fetal de bezerro a 5% e incubadas a 37 ° C durante 24h. Placas de PVC foram utilizadas como controle negativo e o extrato foi obtido através da mesma maneira como as fibras de ACP. Uma solução de fenol a 0,02% foi utilizada como controle positivo e recebeu o mesmo tratamento de diluição do extrato. O objetivo de deste controle foi o de se verificar o desempenho do ensaio. O controle positivo tem que ser um material que demonstre a toxicidade enquanto o negativo tem de ser não tóxico.

O efeito citotóxico de cada material foi medida pela percentagem de viabilidade de células, quando em contato com extrato de material de teste e foi avaliada quantitativamente por medição da absorção de vermelho neutro pelas células viáveis. As densidades ópticas (DO) foram medidas em um leitor espectrofotômetro Sunrise - Tecan no filtro de 540 nm utilizando microplaca ELISA onde foi calculada a viabilidade celular (%) em relação ao controle de células. A impressão da viabilidade celular (%) versus concentração do extrato pode ser obtida com índice de citotoxicidade representado por IC

50% em curvas de viabilidade. O índice de citotoxicidade representa a concentração do extrato que mata ou promove uma lesão em 50% da população de células durante ensaio.

Implantação do biomaterial em um preenchimento de cavidade. In vivo.

O material de fibra ACP foi implantado em uma região de fibrose devido à periimplantite situada ao redor de um implante incidente em um paciente com 62 anos de idade. O objetivo principal foi observar a capacidade osteocondutora e suas características de absorção. Um implante com mais de 20 anos em função, formato cilíndrico e o recobrimento de sua superfície com pulverização de plasma de titânio, foi perdido devido a afrouxamento do componente protético e posterior contaminação por colonização bacteriana em sua rugosa superfície. Para o procedimento cirúrgico, o paciente foi tratado com o antibióticoterapia pré e pós operatória (Amoxicilina 875mg, Glaxosmithkline Brasil Ltda, Rio de Janeiro - RJ), anti-inflamatório não-esteróide pós-operatório (Nimesilda 100mg - Medley, São Paulo- SP) e analgésico pós-operatório (Dipirona sódica, 500mg, Neoquímica Anápolis - GO). Após anestesia na região de local em fundo

Artigos Científicos

de vestibulo e porção lingual de gengiva inserida e mucosa livre, o implante doente foi retirado com movimento de tração para o fora do local inserido. O tecido gengival foi então incisado e afastado para expor tecido fibrosado e contaminado. Com a utilização de curetas de Lucas e descola periosteio tipo Free, o tecido fibrosado foi lentamente descolado do tecido ósseo até seu total descolamento da loja afetada. O tecido duro local foi então lavado abundantemente com solução salina de NaCl (0,9%). Com o leito ósseo cirúrgico livre de tecido fibrótico, fibras de enxerto ACP foram delicadamente inseridos e condensados até a completa locopletação do alvéolo ósseo existente. Em seguida, o local foi suturada com fio de mononylon 5X0 (Ethicon, Jhonson & Jhonson).

RESULTADOS

Os dados de viabilidade celular (%) em função da concentração de extrato (%) projetada na Figura 2 mostram as curvas de viabilidade celular de ensaio de citotoxicidade. Todas as amostras testadas demonstraram o mesmo comportamento de controlo negativo, as curvas de viabilidade estão acima da linha de índice de citotoxicidade

(IC50%) indicando nenhum efeito tóxico. No outro lado, o controlo positivo apresentou comportamento citotóxico com IC 50% = 19 o que significa que o extrato de controlo positivo, em uma diluição de 19% de dano causado em 50% da população de células. As fibras ACP por meio da sua curva de viabilidade celular acima da linha de IC50% foram considerados não-citotóxico.

No ensaio realizado em ser humano "in vivo", a região de tecido fibrótico ao redor do implante doente pode ser visualizado na fig. 3. Após procedimento cirúrgico de remoção do elemento de implante cilíndrico e curetagem tecido fibrótico (Fig. 4) onde se podem notar as dimensões e proporções da lesão existente (Fig. 5), bem como no tecido duro restantes, realizou-se o alojamento do enxerto, como se mostra na radiografia periapical (Fig. 6). Após período de cicatrização tecidual com 15 semanas de espera, o local foi novamente acessado sendo instalado implante de titânio cônico, de titânio com superfície de duplo ataque ácido e dimensões de 5.0X11mm (Certain® - Biomet 3i) (Fig. 7).

Durante todo o processo de reparação dos tecidos, processo normal de interação entre o material de enxerto e osso hospedeiro foram

detectados em radiografias sequenciais. As imagens periapicais de acompanhamento demonstraram pequena perda de volume vertical, porém com o passar das semanas a região inicialmente mais radiopaca, representada pelo concentrado de material de enxertia, foram com o passar das semanas evidenciando aspecto de tecido cicatricial melhor organizado.

DISCUSSÃO

A reparação óssea em locais traumatizados, sem utilização de materiais condutores, pode dificultar a cicatrização local. Biomateriais são largamente utilizados como veículos auxiliares durante a reparação tecidual, contudo estes materiais devem apresentar uma osteocondução bem equilibrada para que paredes ósseas do leito receptor não sejam reabsorvidas de forma desordenada, alterando a morfologia do leito remanescente. Estes biomateriais devem ser bioativos favorecendo a aproximação de novas células auxiliando o processo de cicatrização local.

Materiais biocompatíveis demonstram suportar e auxiliar no crescimento celular.^{23, 24} Quando estes são incorporados com biomoléculas de cálcio e fósforo

favorecem sua bioatividade.²⁷ Estudo *in vitro* utilizando a ACP como substrato de enxertia, demonstrou excelente bioatividade.²⁸ Alguns substitutos ósseos em nanofibras podem incorporar tais biomoléculas. Quando submetidos à atividade celular, essas biomoléculas podem ser gradativamente liberadas auxiliando na regeneração óssea.²⁹⁻³²

Quando nos voltamos ao estado de degradação dos compostos ACP assim como velocidade de ocorrência deste fato, autores utilizando implantes de titânio revestidos com fosfato de cálcio amorfo observaram que a película de revestimento foi dissolvida e rapidamente absorvida no período de 4 semanas, durante processo de cicatrização tecidual.³¹ Além disso estes autores não observaram reações inflamatórias adversas e tão pouco perda anormal de estrutura óssea no leito ósseo receptor.³³ Baseados nestes resultados os autores concluíram que os implantes revestidos com ACP podem acelerar a formação óssea durante as fases iniciais da cicatrização logo após a dissolução do revestimento ACP.³¹

Segundo trabalhos utilizando implantes revestidos com ACP, os autores observaram que a película de biomaterial foi rapidamente absorvida

Artigos Científicos

pelo metabolismo local, criando espaço para a saturação de fluidos corporais.³¹ A alta reatividade associada à solubilidade de um biomaterial promove uma melhor reparação tecidual local. Segundo He 2013³⁴, partículas de ACP possuem partículas com pequenas dimensões e aumentada área de superfície o que pode favorecer sua degradação e favorecer a cicatrização tecidual. O ACP acelerou a cicatrização do tecido ósseo em torno de um implante de titânio promovendo um melhor contato osso/implante.³¹

Em nosso estudo, a remoção do implante de titânio doente resultou em um leito ósseo com 5 paredes, semelhante a um alvéolo fresco. O Processo de cicatrização tecidual em alvéolos frescos vem sendo bastante estudada em animais e humanos³⁵. Em cães, no processo de cicatrização foi observado depósitos de tecido ósseo em 8 semanas, enquanto em 16 foi evidenciado tecido ósseo mais organizado em formato lamelar. Em recente trabalho Liu³⁶, utilizando biomaterial em formato de algodão de fosfato de cálcio amorfo, os autores observaram resultados significativos na cicatrização tecidual quando comparado a não enxertados. Finas camadas de trabéculas ósseas direcionadas à parte central do alvéolo

de extração foram observadas. Estes resultados estão coincidentes com a literatura,³⁷ onde utilizaram nanocompositos de fosfato de cálcio amorfo em calota craniana de coelhos e fêmures de ovelhas. Após 4 e 8 semanas os autores ressaltaram formação de fina camada de tecido ósseo esponjoso em área enxertada. Acreditamos que nosso estudo também evidenciou formação de tecido ósseo organizado do ponto de vista radiográfico e que o biomaterial favoreceu a osteocondução e deposição de novas trabéculas ósseas.

A associação de Fosfato de cálcio amorfo com outros biomateriais também foram testados como alternativa para a reparação de tecido ósseo traumatizado. Alguns compostos de nanofibras ACP- PLA e HA- PLA foram utilizados como suporte para o crescimento e migração celular. Os autores comentam que compostos de ACP-PLA e HA-PLA podem ser degradados gradualmente através de um processo de hidrólise³², e íons de cálcio e fósforo seriam liberados para matriz extracelular.²⁹⁻³² A saturação de fluidos corporais e precipitação de proteínas associado a estes íons promove a formação de uma apatita biológica^{29, 30} acelerando a formação óssea.³¹

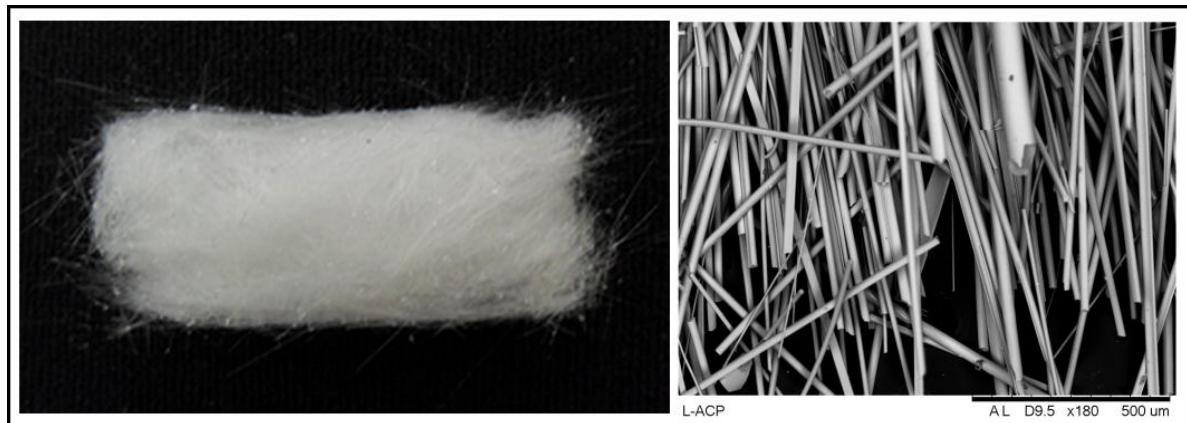


Fig. 1: Material produzido em ACP com fibras de diâmetros com 5 μm a 200 μm

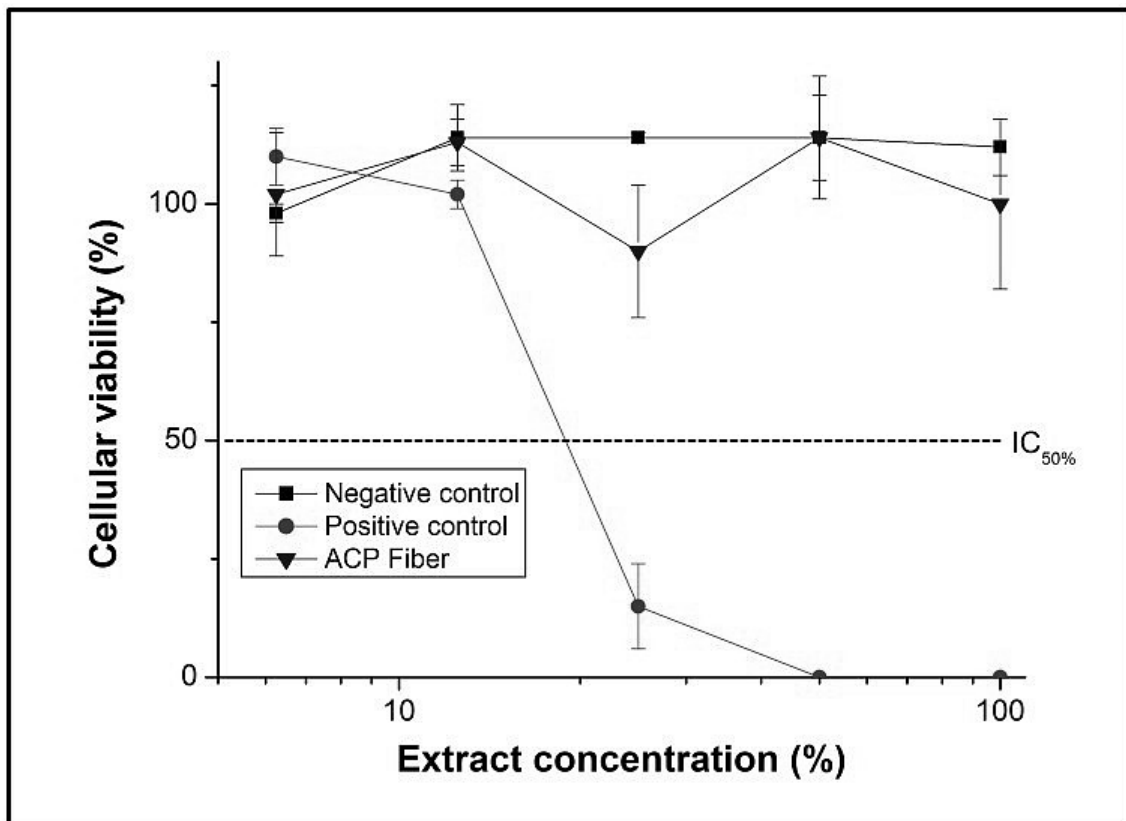


Fig. 2: Curva de viabilidade das fibras de ACP em ensaio de citotoxicidade in vitro.



Fig. 3: Radiografia periapical onde pode-se notar zona radiolúcia ao redor do implante cilíndrico representativo de tecido fibrotico.



Fig. 4: Remoção de implante doente e tecido fibrotico totalmente desinserido do local lesionado.



Fig. 5: Fibras de ACP selecionadas para inserção em leito cirúrgico preparado após curetagem e lavagem com solução salina.

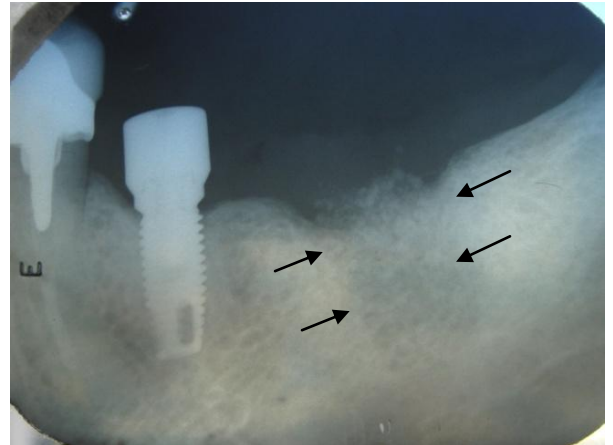


Fig.6: Radiografia Periapical demonstrando radiopacidade em local onde existia elemento de implante, representado pela existência de fibras de ACP. As setas representam a delimitação do óssea de tecido hospedeiro.

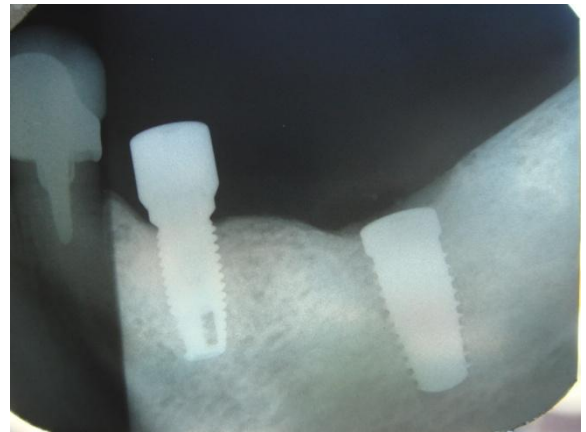


Fig. 7: Radiografia periapical realizada logo após a instalação do implante osteointegrado decorrido o período de 15 semanas da enxertia realizada.

CONCLUSÕES

As fibras de ACP foram facilmente inseridas no leito receptor e suas fibras favoreceram a cicatrização local. A reparação óssea foi beneficiada com a existência deste biomaterial e forma de algodão. A formação de novo tecido preenchendo o local de defeito ósseo demonstrou ser suficiente para a

Artigos Científicos

instalação de um novo implante de titânio. Este biomaterial permite a sua utilização em casos simples como alvéolos após a extração dental ou cavidades ósseas de pequenas proporções.

REFERENCIAS

1. Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL. Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *MAcromol Biosci*, 2004; 9;4(8):743-65.
2. Luvizuto E R, Tangl S, Zanoni G, Okamoto T, Sonoda C K, Gruber R and Okamoto R. The effect of BMP-2 on the osteoconductive properties of β -tricalcium phosphate in rat calvaria defects *Biomaterials* 2011; 32: 3855-61.
3. Vallet-Regi, M. and Gonzalez-Calbet, J.M. Calcium Phosphates as Substitution of Bone Tissues, *Prog. Solid State Chem.* 2004; 32: 1-31.
4. Dorozhkin S V. Bioceramics of calcium orthophosphates *Biomaterials*, 2010; 31: 1465-85
5. Somrani S, Rey C, Jemal M. Thermal evolution of amorphous tricalcium phosphate. *J Mater Chem* 2003;13:888-92.
6. Hoffman K, Skrtic D, Sun J, Tutak W. Airbrushed composite polymer Zr-ACP nanofiberscaffolds with improved cell penetration for bone tissue regeneration. *Tissue Eng Part C Methods*, 2015; 21(3): 284-91.
7. AlGhamdi AS, Shibly O, Ciancio SG. Osseous grafting: part II. Xenografts and alloplasts for periodontal regeneration—a literature review *J. Int. Acad. Periodontol.* 2010;12 (2): 39-44.
8. Rojbani H, Nyan M, Ohya K and Kasugai S. Evaluation of the osteoconductivity of α -tricalcium phosphate, β -tricalcium phosphate, and hydroxyapatite combined with or without simvastatin in rat calvarial defect *J. Biomed. Mater. Res. A*, 2011; 98: 488-98
9. Esposito M, Grusovin MG, Kwan S, Worthington HV, Coulthard P. Interventions for replacing missing teeth: Bone augmentation techniques for dental implant treatment. *Cochrane Database Syst Rev.* 2008;16;(3): doi: 10.1002/14651858.CD003607.pub3.
10. Chopra PM, Johnson M, Nagy TR, Lemons JE. Micro-computed tomographic analysis of bone healing subsequent to graft placement. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009;88:611-618.
11. MacMillan AK, Lamberti FV, Moulton JN, Geilich BM, Webster TJ. Similar healthy osteoclast and osteoblast activity on nanocrystalline hydroxyapatite and nanoparticles of tri-calcium phosphate compared to natural bone. *International Journal Nanomedicine*, 2014; 9: 5627-5637.
12. LeGeros RZ Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002; 395: 81-98
13. Rivera-Munoz E, Diaz JR, Rogelio Rodriguez J, Brostow W, Castano VM. Hydroxyapatite spheres with controlled porosity for eye ball prosthesis: Processing and characterization. *J Mater Sci Mater Med.* 2001;12:305-311.
14. Anderson JM, Rodriguez A, Chang DT. Foreign body reaction to biomaterials *Semin. Immunol.* 2008; 20: 86-100.
15. Hamada H, Ohshima H, Ito A, Higuchi WI, Otsuka M. Effect of geometrical structure on the biodegradation of a three-dimensionally perforated porous apatite/collagen composite bone cell scaffold *Biol. Pharm. Bull.* 2010; 33: 1228-32.
16. Ghanaati S, Barbeck M, Orth C, Willershausen I, Thimm BW, Hoffmann C, Rasic A, Sader RA, Unger RE, Peters F, Kirkpatrick CJ. Influence of β -tricalcium phosphate granule size and morphology on tissue reaction in vivo *Acta Biomater.* 2010; 6: 4476-87.
17. Anderson JM, McNally AK. Biocompatibility of implants: lymphocyte/macrophage interactions *Semin. Immunopathol.* 2011;33: 221-33.
18. Huang Y, Niu XF, Wang LY, Fan J, Li XM, Zhou G, Feng QL, Fan YB.

Artigos Científicos

- Effects of hydroxyapatite/collagen composite on osteogenic differentiation of rat bone marrow derived mesenchymal stem cells. *J. Compos. Mater.* 2014; 48: 1971-1980.
19. Zhou C, Deng C, Chen X, Zhao X, Chen Y, Fan Y, Zhang X. Mechanical and biological properties of the micro/nano-grain functionally graded hydroxyapatite bioceramics for bone tissue engineering. *J. Mech. Behav. Biomed.* 2015;48: 1-11
20. Liu Y, Li N, Qi YP, Dai L, Bryan TE, Mao J, Pashley DH, Tay FR. Intrafibrillar collagen mineralization produced by biomimetic hierarchical nanoapatite assembly. *Adv. Mater.* 2011;23: 975-980.
21. Boonrungsiman S, Gentleman E, Carzaniga R, Evans ND, McComb DW, Porter AE, Stevens MM. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2012; 109: 14170-14175.
22. Jie Zhao, Yu Liu, Wei-bin Sun, Hai Zhang. Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry. *Chem Cent J.* 2011; 5: 40.
23. Popp JR, Laflin KE, Love BJ, Goldstein AS. In vitro evaluation of osteoblastic differentiation on amorphous calcium phosphate-decorated poly (lactic-co-glycolic acid) scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011; 5: 780-9.
24. Ramalingam M, Young MF, Thomas V, Sun L, Chow LC, Tison CK, Chatterjee K, Miles WC, Simon CG Jr. Nanofiber scaffold gradients for interfacial tissue engineering. *J Biomater Appl.* 2013; 27: 695-705.
25. Yazaki Y, Oyane A, Tsurushima H, Araki H, Sogo Y, Ito A, Yamazaki A. Improved gene transfer efficiency of a DNA-lipid-apatite composite layer by controlling the layer molecular composition. *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2014;122: 465-71.
26. Rogero SO, Lugão AB, Ikeda TI, Cruz AS. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. *Materials Research.* 2003;6 (3): 317-320.
27. Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Mater Today.* 2008;11(5): 18-25.
28. Stark WJ, Brunner TJ, Grass RN, Bohner M. Effect of particle size, crystal phase and crystallinity on the reactivity of tricalcium phosphate cements for bone reconstruction *J. Mater. Chem.* 2007;17: 4072-8.
29. de Groot K, Wolke JG, Jansen JA. Calcium phosphate coatings for medical implants. *Proc Inst Mech Eng H.* 1998;212: 137-147.
30. Daculsi G, Laboux O, Malard O, et al.. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med.* 2003;14:195-200.
31. Yokota S, Nishiwaki N, Ueda K, Narushima T, Kawamura H, Takahashi T. Evaluation of thin amorphous calcium phosphate coatings on titanium dental implants deposited using magnetron sputtering. *Implant Dent.* 2014; 23(3):343-50.
32. Zhang H, Fu QW, Sun TW, Chen F, Qi C, Wu J, Cai ZY, Qian QR, Zhu YJ. Amorphous calcium phosphate, hydroxyapatite and poly(d,l-lactic acid) composite nanofibers: Electrospinning preparation, mineralization and in vivo bone defect repair. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2015;1(136):27-36.
33. Fögl A, Ulm C, Tangl S, et al.. Long-term effects of magnetron-sputtered calcium phosphate coating on osseointegration of dental implants in non-human primates. *Clin Oral Implants Res.* 2009;20:183-188.
34. He W, Andersson M, de Souza PP, de Souza Costa CA, Muñoz EM, Schwartz-Filho HO, Hayashi M, Hemdal A, Fredel A, Wennerberg A, Jimbo R. Osteogenesis-infection calcium phosphate nanoparticle precursors applied to titanium surfaces. *Biomed Mater.* 2013; 8(3):1-13.

Artigos Científicos

35. Cardaropoli G, Araujo M, Lindhe J. Dynamics of bone tissue formation in tooth extraction sites. *Journal of Clinical Periodontology*, 2003;30: 809–818.
36. Liu J, Schmidlin PR, Philipp A, Hild N, Tawse-Smith A, Duncan W. Novel bone substitute material in alveolar bone healing following tooth extraction: an experimental study in sheep. *Clin oral implants Res.* 2015; 22: 1-9.
37. Schneider OD, Mohn D, Fuhrer R, Klein K, Kampf K, Nuss KM, Sidler M, Zlinszky K, von Rechenberg B, Stark WJ. Biocompatibility and bone formation of flexible, cotton wool-like PLGA/calcium phosphate nanocomposites in sheep. *The Open Orthopaedics Journal*, 2011; 5: 63–71.