

GABRIELA ALESSANDRA DA CRUZ

**MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E MICROANÁLISE
DE RAIOS X APLICADA AO ESTUDO DE SUBSTITUTOS ÓSSEOS**

Dissertação apresentada à Faculdade
de Odontologia de Piracicaba,
Universidade Estadual de Campinas,
para a obtenção do Título de Mestre
em Clínica Odontológica, Área de
Periodontia.

PIRACICABA

2004

GABRIELA ALESSANDRA DA CRUZ

**MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E MICROANÁLISE
DE RAIOS X APLICADA AO ESTUDO DE SUBSTITUTOS ÓSSEOS**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Clínica Odontológica, Área de Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Toledo

PIRACICABA

2004

Ficha Catalográfica

C889m	Cruz, Gabriela Alessandra da. Microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raio X aplicada ao estudo de substitutos ossos. / Gabriela Alessandra da Cruz. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2004. xi, 58f. : il. Orientador : Prof. Dr. Sérgio de Toledo. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Ossos – Enxerto. 2. Hidroxiapatita. I. Toledo, Sérgio de. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.
-------	--

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Marilene Girello CRB/8–6159, da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais Reginaldo e Terezinha, e a toda minha família Daniela, Reginaldo Neto, Jenner e ao meu noivo Márcio José que compartilharam a realização deste ideal.

AGRADECIMENTOS

A DEUS

Que me apoiou em todos os momentos.

Aos meus pais,

Reginaldo e Terezinha,
pela compreensão e pelo incentivo.

Ao meu noivo,

Marcio José,
pelo amor, carinho e paciência.

À minha família,

Agradeço a minha irmã Daniela, ao meu sobrinho Reginaldo, aos meus tios e
primos que me incentivaram durante essa caminhada.

Ao meu orientador,

Prof. Dr. Antonio Fernando Martorelli de Lima,

A você deixo o meu agradecimento especial, pela idealização e realização deste trabalho que faz parte de um sonho que compartilhamos juntos. Agradeço também pela amizade, incentivo e dedicação não só durante o curso, mas durante os anos de convivência, que tive a felicidade de partilhar da sua sabedoria e experiência.

Ao meu orientador e co-orientador

Prof. Dr. Sérgio de Toledo e Prof. Dr. Enilson Antonio Sallum,
que me ajudaram a dar continuidade a esse trabalho, pelo apoio, amizade e
incentivo durante o curso.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique de Brito Cruz, magnífico reitor da Universidade Estadual de Campinas.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp nas pessoas do seu diretor, Prof. Dr. Thales Rocha de Mattos Filho e Diretor Associado Mario Fernando de Goes.

Ao Prof. Dr. Lourenço Correr Sobrinho, coordenador geral dos cursos de pós-graduação da FOP/Unicamp.

Ao Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo A. Gomes, Coordenadora do Curso de Pós Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp.

Ao Prof. Ivan Balducci da disciplina de Bioestatística da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista – Unesp, pela paciência e dedicação na realização da estatística desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Antonio Wilson Sallum, Prof. Dr. Getulio da Rocha Nogueira Filho, Prof. Dr. Francisco Humberto Nociti Jr da Área de Periodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp, pela participação na minha formação acadêmica.

Aos colegas de turma do curso de Pós-graduação em Clínica Odontológica – Área de Periodontia.

Aos funcionários Adriano Martins, Eliene Aparecida Orsini Narvaes Romani e Eliete Aparecida Ferreira Lima, pelo convívio e amizade, revelados na presteza e eficiência com que sempre me atenderam.

“Sábio é o homem que conhece alguma coisa sobre tudo; e tudo sobre alguma coisa. O mais sábio é aquele que estuda como se fosse viver eternamente, e vive como se fosse morrer amanhã”.

Anônimo

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	2
1 INTRODUÇÃO	3
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 Os materiais de enxerto e biomateriais	5
2.2 Microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raio X	11
3 PROPOSIÇÃO	17
4 MATERIAL E MÉTODO	18
4.1 Microscopia eletrônica de varredura	18
4.2 Microanálise de raio X	19
4.3 Análise estatística	21
5 RESULTADOS	22
5.1 Morfologia	22
5.2 Tamanho da partícula	28
5.3 Composição química	29
6 DISCUSSÃO	30
7 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36
ANEXOS	41

RESUMO

Os substitutos ósseos são materiais utilizados em procedimentos periodontais regenerativos como uma alternativa para tratamento de defeitos ósseos. Neste estudo foram avaliados a morfologia, o tamanho e a composição química das seguintes partículas: osso bovino orgânico cortical e esponjoso com partículas microgranular medindo entre 0,25 e 1,0 mm e macrogranular medindo entre 1,0 e 2,0 mm, osso bovino cortical inorgânico com partículas medindo entre 0,25 e 1,0 mm, hidroxiapatita com partículas medindo entre 0,75 e 1,0 mm e osso humano descalcificado, congelado e seco medindo entre 0,25 a 0,5 mm. Para a análise da morfologia e do tamanho das partículas, as amostras foram preparadas em porta-espécime, metalizadas em ouro e analisadas a vácuo em microscópio eletrônico de varredura (SEM). Para a análise da composição química, as partículas não foram metalizadas e foram analisadas por microanálise de raio X, por espectroscopia por dispersão de energia (EDS). A análise visual realizada por SEM, demonstrou que as partículas de osso bovino orgânico e inorgânico, osso humano e hidroxiapatita apresentaram formato irregular e tamanho variável, maior do que o mencionado no rótulo pelo fabricante. A análise da composição química realizada por microanálise (EDS) detectou a presença de elementos como: sódio, cálcio e fósforo, que são comuns à composição do tecido ósseo, porém revelaram a presença de elementos químicos nas partículas de osso bovino orgânico. Esses resultados sugerem que o osso bovino orgânico não é composto puramente por colágeno e proteína.

PALAVRAS-CHAVE: Osso bovino, osso humano, hidroxiapatita.

ABSTRACT

This article evaluates the morphologic and chemical composition of the following bone substitutes: cancellous and cortical organic bovine bone with micro and macro particles size ranging from 0,25 to 1,0 mm and 1,0 to 2,0 mm respectively, inorganic bovine bone with particles size ranging from 0,25 to 1,0 mm, hydroxyapatite with particles size ranging from 0,75 to 1,0 mm and demineralized freeze-dried bone allograft with particles size ranging from 0,25 to 0,5 mm. The samples were coated with gold in an ion coater, the morphology was observed and the measurements of particle size were performed on vacuum condition by scanning electron microscopy (SEM). The chemical composition was evaluated by microanalysis EDS using samples without covering. The SEM analyses provided visual evidence that all materials analyzed have irregular shape and the particle size values were larger than the values mentioned by the manufacturer. The microanalysis EDS detected the presence of sodium, calcium and phosphorus that are common elements of the bone tissue. However, mineral elements were detected in all analyzed particles of organic bovine bone excepting for macro cancellous organic bovine bone. These results suggest that the evaluated organic bovine bone could not be considered a pure organic material.

KEY-WORDS: Bovine bone, human bone, hydroxyapatite.

1 INTRODUÇÃO

Os substitutos ósseos são materiais utilizados em procedimentos regenerativos ao redor de dentes comprometidos pela doença periodontal. Estes substitutos ósseos podem ser de origem autógena, que são proveniente do próprio indivíduo, ou materiais comercialmente disponíveis obtidos de osso bovino ou humano, hidroxiapatita ou materiais bioativos.

Os materiais de enxerto e biomateriais utilizados na terapia periodontal podem ser divididos em quatro categorias: enxertos autógenos que são materiais transplantados de um sítio para outro em um mesmo indivíduo, podendo ser cortical ou trabeculado e obtidos de regiões intrabuciais ou extrabuciais; enxertos homogêneos que são materiais transplantados de um indivíduo para outro da mesma espécie, porém geneticamente diferente, são utilizados ossos cortical e trabeculado e estão disponíveis nas formas desmineralizado ou não; enxertos heterogêneos que são materiais retirados de doadores de espécie diferente, e os materiais aloplásticos que são implantes inertes (Cordioli *et al.*, 2001; Betz *et al.*, 2002).

Os materiais de enxerto podem apresentar-se na forma de osso orgânico, contendo colágeno tipo I e proteínas ou inorgânico, contendo íons minerais, cortical ou medular, em micro ou macropartículas, em forma de blocos, flocos e fragmentos. O preparo de substitutos ósseo segue normas de controle de qualidade para evitar riscos de contaminação e transmissão de doenças.

Os biomateriais possuem propriedades de osteogênese quando contém células formadoras de osso, de osteocondução quando tem capacidade para servir como suporte para formação óssea e de osteoindução quando são encontradas substâncias indutoras da formação óssea (American Academy of Periodontology, Position Paper, 2001; Suh *et al.* 2001; Tadjoeidin *et al.*, 2003).

O microscópio eletrônico de varredura é um aparelho que proporciona riqueza de detalhes na inspeção visual e precisão na realização de medidas. Portanto será o método selecionado para verificar a morfologia e o tamanho das

partículas. O estudo do tamanho das partículas permite verificar se a partícula contida no frasco corresponde ao tamanho mencionado no rótulo do material. Outro tipo de análise que será realizada é a microanálise de raio X por dispersão de energia (EDS), que proporciona avaliações qualitativas e quantitativas, quando esta acoplado ao Programa de Correção PROZA que considera o ZAF, número atômico (Z), absorção (A) e fluorescência (F) dos elementos presentes na amostra. Esse tipo de análise possui a vantagem de avaliar pequenas regiões sem a necessidade de separação física das fases de interesse (Goldstein *et al.* 1992).

A análise morfológica do tamanho das partículas dos substitutos ósseos é descrita na literatura por meio de análises histológica e por microscopia eletrônica de varredura (Zaner & Yukna 1984; Stephan *et al.*, 1999; Cordioli *et al.*, 2001; Artzi *et al.*, 2001, 2002; Tadjoeidin *et al.*, 2003). Os resultados sugerem que o tamanho da partícula pode interferir com a rapidez de reabsorção por osteoclasto e conseqüente nova formação óssea (Schwartz *et al.* 1997), porém existem poucos relatos de análise da composição química desses materiais.

Neste estudo a microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raio X por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) serão utilizados para avaliar a morfologia, o tamanho e a composição química dos elementos presentes nos materiais comercialmente disponíveis no formato de osso bovino e humano, orgânico e inorgânico, e hidroxiapatita natural de osso bovino.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os materiais de enxerto e biomateriais

Os enxertos e os substitutos ósseos são utilizados na reconstrução do tecido ósseo e seu desempenho depende da topografia dos defeitos, da composição e potencial osteogênico dos materiais. Esses materiais possuem propriedades definidas como osteogênese quando contém células formadoras de osso, osteoindução quando contém proteínas indutoras da formação óssea e osteocondução quando servem como suporte para formação óssea. (Kenney *et al.*, 1985; Fucini *et al.*, 1993; Ikeda *et al.*, 1999; American Academy of Periodontology, Position Paper, 2001; Suh *et al.*, 2001; Cordioli *et al.*, 2001; Tadjoeidin *et al.*, 2003).

Na doença periodontal a destruição óssea pode manifestar-se nas formas de defeitos horizontais e defeitos intra-ósseos, nestes casos limitados por uma, duas ou três paredes. Os defeitos intra-ósseos de duas e três paredes respondem melhor a terapia regenerativa do que defeitos de uma parede (Person *et al.*, 2000).

Os materiais de enxerto e os substitutos ósseos utilizados na terapia periodontal podem ser divididos em quatro categorias: enxertos autógenos que são obtidos e transplantados de um sítio para outro em um mesmo indivíduo; enxertos homógenos que são materiais obtidos de um indivíduo e transplantados em outro indivíduo da mesma espécie, porém geneticamente diferentes; enxertos heterógenos que são materiais obtidos de espécie diferente; e materiais aloplásticos que são implantes inertes (Cordioli *et al.*, 2001; Betz 2002). Os enxertos autógenos podem ser de osso cortical ou trabeculado, colhidos em sítios doadores intrabuciais ou extrabuciais e estão disponíveis nas formas desmineralizado ou não. Os enxertos e os substitutos ósseos podem ser disponibilizados em bloco ou particulados. Segundo Ellegaard & Løe (1971) o osso autógeno pode ser obtido de regiões edentadas da mandíbula, de regiões de

extração recente em processo de cicatrização, de tuberosidades maxilares ou de área retromolar da mandíbula, ou ainda de regiões extra-bucais como a crista ilíaca, calvária e tibia.

Os enxertos ósseos autógenos foram utilizados inicialmente por Nabers & O' Leary, em 1965. Esses autores relataram 8 casos de preenchimento de defeitos intra-ósseos de uma ou duas paredes com bloco de osso autógeno de tamanho variado proveniente de regiões próximas ao sítio receptor.

Robinson, em 1969, propôs a remoção óssea de locais distante do sítio receptor que necessitassem de recontorno ósseo. O autor triturou o bloco obtido justificando que o uso de partículas pequenas poderia ser mais eficiente para a osteogênese. Ainda hoje o enxerto autógeno é considerado o melhor material para terapia regenerativa, sendo considerado o “padrão ouro” quando comparado a outros materiais de enxerto (Tadjoedin *et al.*, 2003).

No entanto, Stephan *et al.* (1999) e Park *et al.* (2001) relataram que sua obtenção pode oferecer riscos para o indivíduo e o volume pode não ser suficiente para a necessidade clínica. Além disso, o osso autógeno pode induzir anquilose dento alveolar ou reabsorção radicular.

Tadjoedin *et al.* (2003) relataram que a remoção de osso da crista ilíaca é um procedimento de alto custo e pode gerar além de dor pós-operatória, riscos ainda maiores para o paciente.

Hiatt *et al.*, (1973) trataram 166 defeitos de uma, duas e três paredes com osso autógeno trabecular intrabucal e conseguiram aumento médio na altura de osso de 3,44 mm. Os autores concluíram que a maior formação óssea ocorreu nos defeitos com maior número de paredes. Em alguns cortes histológicos foram observadas nova formação de cemento, osso e de ligamento periodontal porém em outros cortes histológicos foram observados anquilose e reabsorção óssea. Listgarten & Rosenberg (1979) sugeriram que o tratamento de defeitos periodontais com enxertos ósseos intrabucais pode resultar na formação não previsível de nova inserção de tecido conjuntivo. Patur (1974) avaliou o efeito do osso medular obtido de regiões extra e intrabucal no tratamento de defeitos de

uma, duas e três paredes. O autor mostrou que os defeitos de três paredes apresentaram preenchimento ósseo, porém não ocorreu diferença entre os defeitos tratados com osso proveniente da crista ílica e os defeitos tratados com enxerto intrabucal.

A indicação de uso de enxertos extrabucalis esta relacionada com a morbidade associada à área doadora. Tadjoeidin *et al.*, em 2003, sugeriram que a mistura de osso autógeno com substitutos ósseos pode evitar a coleta de osso de regiões extrabucalis.

Já os enxertos homogêneos minimizam o desconforto causado pelo procedimento cirúrgico necessário à obtenção dos enxertos autógenos. Os enxertos homogêneos estão disponibilizados nas formas de osso humano descalcificado, congelado e seco (DFDBA) e o osso humano mineralizado, congelado e seco (FDBA). Esses materiais atuam por diferentes mecanismos. O FDBA possui propriedade osteocondutiva enquanto que o DFDBA possui propriedades osteocondutiva e osteoindutiva (Fucini *et al.* 1993; Schwartz *et al.*, 1996, 1997). O DFDBA pode perder a ação osteoindutora se houver falha no processamento do material, falta ou quantidade insuficiente de proteína indutora ou se a proteína estiver presente, porém inativa (American Academy of Periodontology, Position Paper, 2001). A opção de escolha entre esses materiais depende das condições clínicas.

Os bancos de ossos seguem as recomendações da Associação Americana de Bancos de Tecidos (American Association of Tissue Banks – AATB) que estabelece normas para controle de qualidade dos materiais de enxerto. Essa organização determinou os limites para a presença de resíduos e contaminantes que podem estar presentes nos materiais. Apesar disso não existe relato de contaminação ou transmissão de doenças infecciosas com o uso do DFDBA.

Alguns bancos de ossos não esterilizam os materiais de enxerto, apenas coletam e processam o material em condições estéreis, enquanto que outros bancos esterilizam o material por radiação com óxido de etileno (ETO), mas não identificam a condição de osso esterilizado na etiqueta do produto. A

esterilização com óxido de etileno pode diminuir a capacidade de indução do DFDBA e a exposição do material a temperaturas altas pode desnaturar proteínas. Além disso, as formas de esterilização podem não remover resíduos formados durante o próprio processo de esterilização (American Academy of Periodontology, Position Paper, 2001).

O banco de ossos tem preferência por doadores jovens que mantêm maior potencial osteoindutor (Stephan *et al.*, 1999). A Associação Americana de Bancos de Tecidos também estabelece normas de segurança para excluir doadores identificados como HIV positivo, portadores de hepatite B ou hepatite C vírus, sífilis e outras doenças bacterianas, assim como a limitação da idade dos doadores (American Academy of Periodontology, Position Paper, 2001).

O tamanho da partícula do DFDBA interfere no sucesso da terapia regenerativa. Aparentemente o tamanho ideal da partícula deve estar entre 100 a 300 microns, pois partículas menores que 125 microns são mais rapidamente reabsorvidas por macrófagos, entretanto, as partículas com tamanho entre 125 e 1.000 microns mostram maior potencial osteoindutor. (Zaner & Yukna, 1984, Vaccaro, 2002, American Academy of Periodontology, Position Paper, 2001).

O FDBA também é um material comumente utilizado. Embora não existam relatos de transmissão de doenças relacionadas a esse tipo de material, seu uso clínico deve estar associado à terapia antimicrobiana. Durante o processamento o FDBA é esterilizado com óxido de etileno que pode causar acúmulo de resíduos tóxicos para fibroblastos (American Academy of Periodontology, Position Paper, 2001).

Enxertos realizados com FDBA foram avaliados por Melloning, em 1991. Nesse estudo os sítios que foram tratados com FDBA mostraram 67% de formação óssea e os que receberam FDBA associado ao osso autógeno mostraram 78% de formação óssea. Esses resultados indicam que o efeito osteoindutor do FDBA é menor.

Os enxertos heterógenos mais comuns são produzidos a partir de osso bovino cortical ou medular. O enxerto é preparado com material de animais com

12 a 15 meses de idade. A matriz orgânica é lavada para eliminação de sangue, gorduras e impurezas, desproteinizada e descalcificada para eliminar todo componente inorgânico. A seguir, a matriz é desidratada pelo processo de liofilização que impede a desnaturação das proteínas preservando o princípio ativo da mesma. As indicações para utilização da matriz orgânica de osso bovino são as mesmas da matriz orgânica de osso humano (American Academy of Periodontology, Position Paper, 2001).

A matriz inorgânica de osso bovino é produzida a partir de osso cortical ou esponjoso. O material contém apatita carbonatada com composição química, porosidade e estruturas cristalinas compatíveis com o tecido ósseo humano. Segundo Tadjoeidin *et al.* (2003), este material é altamente osteocondutivo e química e fisicamente semelhante ao osso humano.

Merkx *et al.* (1999), compararam a resposta regenerativa de blocos de osso autógeno cortical e esponjoso e partículas de osso bovino mineral (RBM) em defeitos ósseos padronizados produzidos em seios paranasais de cabras. Os defeitos foram preenchidos com o bloco de osso cortical e esponjoso ou grânulos de RBM, e um defeito permaneceu vazio. Os autores concluíram que os blocos de osso esponjoso são os materiais de escolha para reconstrução desse tipo de defeito em regiões maxilofaciais, nos quais é necessário ganhar resistência a força mecânica. Os blocos de osso cortical e os grânulos de RBM não mostraram ser boa indicação para esses tipos de defeitos, pois estimularam atividade osteoclástica.

No estudo realizado em humanos, Tadjoeidin *et al.* (2003) avaliaram o desempenho do osso bovino esponjoso desproteinizado associado ao osso autógeno no tratamento de atrofia de maxila de cinco pacientes. Após 5 a 8 meses foram realizadas biópsias dos sítios tratados. Os autores sugerem que a associação de osso autógeno com osso bovino pode ser utilizado para o procedimento de elevação do seio maxilar em paciente com atrofia de maxila.

A matriz orgânica de osso bovino tem propriedade osteogênica reduzida, porém significativa. Isso ocorre pela capacidade deste biomaterial de

liberar para o meio tissular os fatores de crescimento ósseo ou proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) que são mantidas intactas durante o processo de produção do material. Na forma porosa, a matriz orgânica de osso bovino permite a proliferação de vasos sangüíneos e células para o interior das partículas.

Sicca *et al.* (2000) realizaram testes histopatológicos em amostra de tecido ósseo após a aplicação de osso bovino e mostraram que o mesmo induz a formação de tecido ósseo altamente celularizado e vascularizado, com todas as estruturas características de osso vivo. Do ponto de vista imunológico a matriz orgânica de osso bovino não induz o aparecimento de células linfocitárias no teste de biocompatibilidade. Este material é totalmente reabsorvido após 90 dias de implantação no tecido subcutâneo de ratos.

Os materiais aloplásticos mais utilizados são o fosfato beta tricálcico (reabsorvível) e a hidroxiapatita (não reabsorvível) (Kenney *et al.*, 1985, 1986; Barnett *et al.*, 1989; Frank *et al.*, 1991; Engin & Tas, 1999; Barralet *et al.*, 2002). Bowers *et al.* (1986) relataram formação óssea associada ao fosfato beta tricálcico, enquanto que, Stahl & Froum (1987), não conseguiram demonstrar formação óssea com o uso desse material.

A hidroxiapatita é um material disponível no formato granular sintético (Bioapatite[®], Pred. Levallois-Perret, France), granular não porosa (HA 500[®], Orthomatrix Inc., Dublin, Califórnia, USA), blocos porosos ou granulares, formados por conversão hidrotermal de corais marinhos, gênero *Porities* de carbonato de cálcio para hidroxiapatita (Interpore 200[®], Interpore International, Irvine, Califórnia, USA) β -fosfato tricalcium que é comercializado pela Synthograft[®] (Johson and Jhonson, East Windsor, N.J. USA) e hidroxiapatita de osso bovino (Bio-oss, Geistlich Pharmaceutical, Wolhausen, Switzerland). Segundo Frank *et al.* (1991), materiais sintéticos como as hidroxiapatitas e β -fosfatos tricalcium são utilizados para o tratamento de defeitos intra-ósseos periodontais durante décadas.

A hidroxiapatita é um dos principais componentes inorgânicos na matriz óssea humana Valdre *et al.* (1995). A maior subfase do mineral consiste em cristais microscópicos de apatita de cálcio e fosfato, semelhante à estrutura do

cristal de hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ (Shi *et al.*, 2000). As porosidades das partículas de hidroxiapatita funcionam como guia para o crescimento fibrovascular, direcionando a diferenciação de osteoblastos que resultará na deposição de novo osso lamelar. Resultados histológicos demonstram que a hidroxiapatita é um material não absorvível, sendo possível encontrar encapsulamento fibroso ao redor das partículas do material (Hallman *et al.*, 2001; Artzi *et al.*, 2001, 2002).

2.2 Microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raio X.

De Goldstein *et al.* (1992) comentaram os métodos de avaliação para microscopia eletrônica de varredura e de microanálise de raio X. Resumidamente, o microscópio eletrônico de varredura é uma ferramenta atual para avaliação da superfície das amostras. O equipamento utiliza um filamento de tungstênio em forma de V contido em cilindro metálico que possui um orifício na parte inferior. O filamento é aquecido com corrente auxiliar resultando na excitação dos átomos de tungstênio que liberam seus elétrons. Esse processo é conhecido como emissão termoiônica. A emissão termoiônica gera uma nuvem de elétrons que receberá voltagem negativa elevada, fazendo com que os elétrons sejam violentamente repelidos. Isso produz um feixe de elétrons com fluxo contínuo que sai pelo orifício do cilindro e segue pela coluna do instrumento.

O feixe de elétrons é condensado por duas lentes eletrônicas que produzem um pincel delgado que bombardeia a superfície da amostra, que por sua vez emite elétrons secundários. O diâmetro desse pincel é o que determina a resolução do equipamento.

O feixe de elétron primário não incide em uma única área da superfície da amostra, mas utiliza um circuito auxiliar conhecido como varredura que produz campo magnético pulsátil. Dessa forma, o feixe é obrigado a fazer uma varredura em zig-zag sobre o espécime de maneira intermitente.

Os elétrons secundários emitidos pela superfície da amostra são capturados por um coletor, que é uma grade com carga positiva com aproximadamente 500 V que atrai os elétrons. Os elétrons secundários, com energia mais baixa, atraídos ao coletor, incidem em um cintilador, que é uma pequena placa de plástico coberta com substância fluorescente. Cada elétron que incide sobre o coletor produz um sinal luminoso que é amplificado e convertido em sinal eletrônico. Os sinais produzidos pelos elétrons secundários modulam um tubo de raio catódico (TRC) que funciona como monitor para a visualização da imagem. A emissão de elétrons secundários pela superfície da amostra ocorre de acordo com a sua topografia que será fielmente reproduzida, ponto a ponto no TRC.

O interior da coluna e a câmara onde fica o espécime, ficam sobre alto vácuo, obtido com bombas de pré-vácuo e de alto vácuo. Usualmente, existe um segundo TRC acoplado a uma câmara fotográfica para registrar as imagens. Atualmente existem dispositivos para digitalizar a imagem e transferi-la ao computador.

A qualidade da imagem pode ser controlada variando o contraste, brilho, velocidade da varredura, foco e da correção do astigmatismo da lente, centralização do sistema óptico e voltagem de aceleração. A resolução da imagem será tanto melhor quanto maior for a voltagem e menor a distância entre a ponta da coluna do instrumento e a superfície da amostra.

Para grandes aumentos o diâmetro de feixe incidente é reduzido ao máximo. A redução no nível de sinal pode ser então compensada pela velocidade de varredura mais lenta.

A microscopia eletrônica de varredura permite avaliar a morfologia e o tamanho de partículas em amostras aderidas em porta espécime. A amostra necessita ser metalizada para evitar o aparecimento de “charging” ou efeito caracterizado pelo aparecimento de porções da superfície da amostra que se tornam intensamente brilhante.

Os raios X podem ser coletados e analisados indicando qual o elemento emitido. A técnica que permite identificar a composição química do elemento é conhecida como microanálise de raio X, e o instrumento que o faz é conhecido como microsonda.

A microanálise de raio X é utilizada em função das facilidades. Permite análises qualitativas e quantitativas dos elementos presentes na amostra observada. Este tipo de espectroscopia utiliza raios X característicos emitidos por uma região da amostra após bombardeamento por um feixe de elétrons. O bombardeamento de elétrons pode deslocar elétrons de camadas eletrônicas internas dos átomos da amostra. O átomo atingido (átomo ionizado) tende a voltar para o estado fundamental e passa por uma transição. Este estado de transição gera excesso de energia que é acompanhada de produção de raios X característicos que permitem a identificação de elementos da amostra.

Três tipos de equipamentos podem ser utilizados para a microanálise: microscópio eletrônico de varredura (MEV), microscópio eletrônico de transmissão (MET) ou microscópio eletrônico de transmissão-varredura (METV).

Dois tipos de espectrometria por raios X são comumente utilizados: por dispersão de energia (EDS) e por comprimento de onda (WDS). O espectrômetro por EDS trabalha sobre o princípio de que a energia de um fóton E esta relacionada com a frequência de onda eletromagnética ν , pela relação $E = h\nu$, onde h é a constante de Planck. A equação de Moseley, $V\alpha Z-C$ pode ser formulada em termos de energia $V(E/h) = Z-C$ e portanto a medida de um fóton identifica o elemento considerado.

Fótons com energias correspondentes a todo o espectro de raios X atingem o detector do EDS quase que simultaneamente e o processo de medida deve ser rápido, possibilitando analisar todos os comprimentos de onda também de modo simultâneo. Os pulsos de voltagens são transferidos para um analisador multicanal, que possui da ordem de 1000 canais, cada um correspondendo a uma faixa de voltagem. Quando um pulso de voltagem atinge um detector, ele é

alocado a um canal apropriado ao seu valor e o analisador armazena todo o espectro que pode ser obtido em segundos ou minutos.

Os sistemas de EDS e WDS podem ser considerados complementares. O EDS possibilita a observação do espectro inteiro de raios X de modo simultâneo, o que permite a análise qualitativa rápida dos principais constituintes, enquanto que o WDS deve ser mecanicamente varrido na faixa de comprimento de onda, sendo necessária à faixa de cristais para cobrir a mesma faixa de energia como o EDS, que é uma operação bastante demorada.

Para a análise de elementos leves, tanto o EDS como o WDS tem condições de detectar raios X de elementos com número atômico até 5 (boro). Entretanto a resolução superior do WDS torna-o mais adequado para trabalhos nesta região da tabela periódica, porque os elementos mais pesados ($Z > 20$) produzem raios X das famílias L ou M que freqüentemente interferem com as linhas K dos elementos leves. Após uma procura qualitativa de uma amostra com EDS, geralmente é necessário utilizar o WDS para determinar alguns dos picos de constituintes menores que estão escondidos nas vizinhanças dos picos principais.

A resolução do espectrômetro é limitada pelo espectro contínuo de raios X. A definição do limite de detecção é bastante difícil, uma vez que é baseada na definição e parâmetros estatísticos. Entretanto, para elementos com $Z > 10$, sob condições analíticas típicas, a menor quantidade que pode ser detectada varia entre 10 e 100 ppm para o WDS.

A intensidade e raios X emitidos de vários elementos da amostra são aproximadamente proporcionais as frações em peso de cada elemento emitindo radiação. Entretanto, a razão de intensidade, em relação a um padrão de composição conhecida, não necessariamente reflete a razão de concentração com precisão suficiente, sendo necessário à utilização de vários fatores de correção.

Apesar de ser possível a obtenção de resultados semi-quantitativos ou mesmo sem o uso de padrões, o procedimento normal consiste em se obter a concentração a partir de relações de intensidade de raios X da amostra de um padrão apropriado. Quando a composição da amostra é próxima do padrão, o

efeito da matriz sobre os raios X é insignificante e a análise se reduz a comparação das intensidades observadas. Entretanto, na maioria dos casos utilizam-se padrões de elementos puros, porque é possível caracteriza-los com bastante precisão, mas nesses casos a precisão da análise depende fortemente do modelo de correção.

O procedimento normal para a quantificação é a comparação da taxa de contagem de um dado elemento com um padrão de elemento puro ou de uma liga cuja composição é conhecida. A razão da intensidade entre o elemento e o padrão, K é a medida experimental básica a ser realizada. Na prática a precisão do valor de K é melhor que 0,5% para tempos de leitura da ordem de 100s e para valores de $K > 0,1\%$, o que implica uma correção do elemento da amostra acima de 10%. Fontes de erro estão associadas a incertezas sobre a voltagem e aceleração, desvios dos feixes, desvio do espectrômetro, perdas de contagem em taxas altas, desvio do porta-espécime etc, além da necessidade de fatores de correção.

A desaceleração de elétrons na amostra e a probabilidade de geração de raios X no processo são função da composição total da amostra e dependem principalmente do número atômico de seus componentes. Além disso, o retroespalhamento de elétrons também causa efeito na geração de raios X porque retira energia da amostra, que de outro modo contribuiria para a produção de raios X. A taxa de geração de elétrons retroespalhados depende do número atômico médio da amostra. Deve-se, portanto utilizar um fator de correção que englobe tanto a desaceleração como a emissão de elétrons retroespalhados.

Do mesmo modo, a absorção de raios X emitidos dentro da amostra deve ser compensada por uma correção devido à absorção. A perda dependerá da distância média percorrida pelos fótons de raios X e, portanto, do ângulo que o espectrômetro faz com a amostra e a distribuição em profundidade da geração de raios X. Esta distribuição é função da energia do feixe de elétrons e da composição da amostra. Além disso, a absorção varia fortemente com o coeficiente de absorção de raios X na amostra para a radiação de interesse e

depende da composição da amostra. Esta correção é geralmente realizada por expressões semi-empíricas.

Finalmente, deve se considerar que raios X também podem ser produzidos por mecanismos de fluorescência, ou seja, excitados por outros raios X. Neste processo, raios X primários gerados na amostra por bombardeamento de elétrons são absorvidos na amostra e causam ionização adicional das camadas interiores com produção indireta ou secundária de raios X característicos. Esses raios X excitadores podem ser tanto raios X característicos como parte do ruído de fundo contínuo. A correção devido à fluorescência deve ser incluída nos procedimentos de correção para a análise quantitativa.

A combinação das três correções mencionadas, ou seja, número atômico Z , a absorção A , e a fluorescência F , na forma de multiplicadores é conhecido como correção ZAF, utilizada rotineiramente em programas de microanálise.

3 PROPOSIÇÃO

O propósito desse estudo foi avaliar por microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raio X por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) a morfologia, o tamanho e a composição química dos elementos presentes em materiais de enxerto comercialmente disponíveis e utilizados como substitutos ósseos.

4 MATERIAL E MÉTODO

Para este estudo foram selecionados frascos dos seguintes materiais:

- matriz orgânica de osso bovino cortical com micropartículas medindo entre 0,25 e 1,0 mm (OBCMI) e matriz orgânica de osso bovino cortical macropartícula medindo entre 1,0 e 2,0 mm (OBCMA), (Gen-ox ®, Baumer S/A, Divisão Biomateriais, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil);
- matriz orgânica de osso bovino esponjoso com micropartículas medindo entre 0,25 e 1,0 mm (OBEMI) e matriz orgânica de osso bovino esponjoso macropartícula medindo entre 1,0 e 2,0 mm (OBEMA), (Gen-ox ®, Baumer S/A, Divisão Biomateriais, Mogi Mirim, São Paulo, Brasil);
- matriz inorgânica de osso bovino cortical (BIO-OSS) (Geistlich Pharmaceutical, Wolhausen, Switzerland) com partículas de 0,25 a 1,0 mm;
- osso humano descalcificado, congelado e seco com partículas de 0,25 a 0,5 mm (DFDBA) (DEMBONE, Pacif Coast Tissue Bank, Los Angeles);
- hidroxiapatita natural de osso bovino mineral com partículas de granulação grossa medindo entre 0,75 a 1,0 mm (HA) (Pro-Ha, Pró-line Serviços e Produtos Odontológicos e Ortopédicos Ltda, São Paulo, SP, Brasil).

Esses materiais foram adquiridos de representantes comerciais. Foram obtidos uma unidade de cada material.

4.1 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de osso bovino, osso humano e hidroxiapatita foram fixadas no porta espécime com auxílio de fita de carbono ou adesivo à base de nitrocelulose, tolueno sulfonamida, acetato de etila/butila, óleo de rícino, álcool iso-propílico e silicone (Ceil, Coml Exp. Ind. Ltda, São Paulo, SP, Brasil) misturado com grafite em pó. A seguir, as amostras foram metalizadas por evaporação de

ouro (Denton Vacuum, Desk II, New Jersey, USA) e avaliadas a vácuo em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM 5600LV, Japão).

A análise morfológica foi pelo método visual com auxílio de software (SEM Control User Interface, version 1.27, Jeol Technics Ltda), que aferiu o maior tamanho da partícula. (Figura 1).

O tamanho da partícula foi aferido de acordo com a maior dimensão longitudinal. Foram analisadas vinte partículas selecionadas aleatoriamente para cada substituto ósseo selecionado. Os resultados foram transformados em média e desvio padrão.

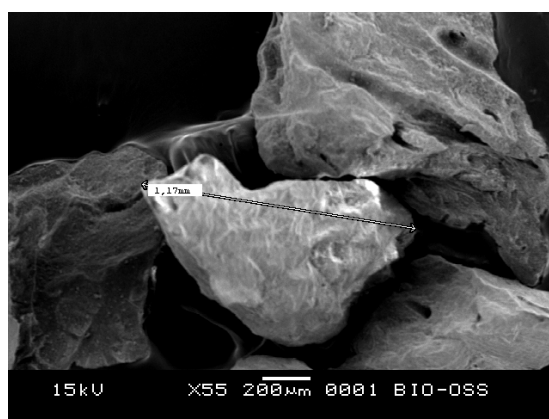


Figura 1 - Maior diâmetro da partícula de osso bovino inorgânico 1,17 mm.

4.2 Microanálise de raio X por espectroscopia por dispersão de energia (EDS)

As amostras de osso bovino, osso humano e hidroxiapatita foram fixadas em porta espécime com adesivo a base de nitrocelulose, tolueno sulfonamida, acetato de etila/butila, óleo de rícino álcool iso-propílico e silicone (Ceil, Coml Exp. Ind. Ltda, São Paulo, SP, Brasil) misturado com grafite em pó. As amostras de osso bovino orgânico e inorgânico, osso humano e hidroxiapatita não

foram metalizadas. A seguir as amostras foram analisadas a vácuo utilizando microanálise de raio X (Noran Vantage EDS version 1.4, Japão).

A microanálise de raio X foi realizada por EDS. Esse tipo de análise permite qualificar a composição química dos elementos. Para essa análise as imagens foram obtidas por microscópio eletrônico de varredura e padronizadas com 15 kVp, distância focal padronizada de 20 mm e *spot-size* de 33 de acordo com a área de interesse selecionada para o estudo.

A análise quantitativa dos materiais foi realizada com o auxílio do Programa de correção PROZA (Noran Vantage EDS version 1.4, Japão), que considera o ZAF, número atômico, absorção e fluorescência do material. O ZAF permite qualificar os elementos presentes na área selecionada. Os dados obtidos da análise qualitativa foram quantificados pelo sistema de correção PROZA que considera os elementos químicos presentes de acordo com a distribuição de energia do material durante o tempo de contagem (Figura 2).

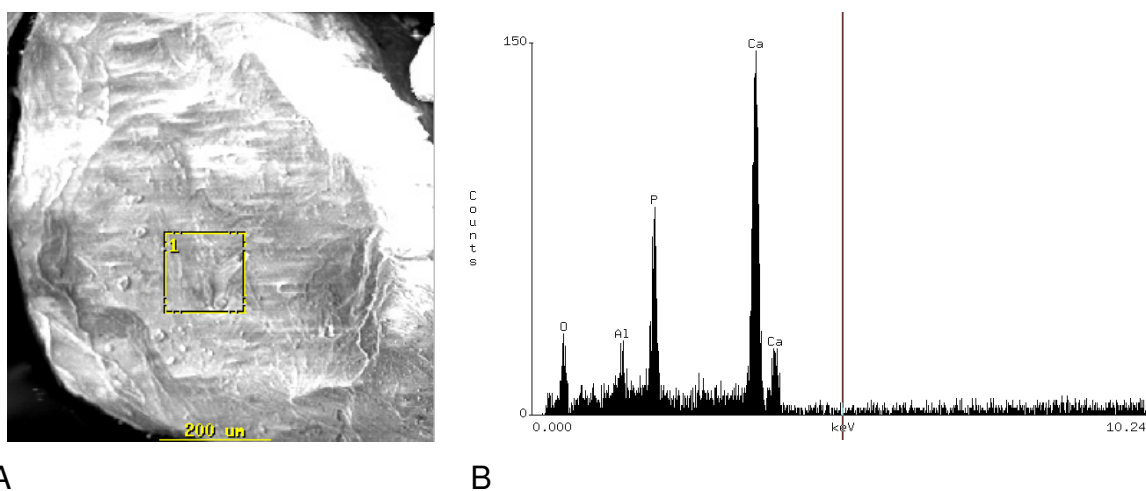


Figura 2 - (A) Micrografia eletrônica de varredura de osso cortical bovino inorgânico (BIO-OSS), aumento de 150X, 15 kVp, 20 mm de distância, 33 spot-size. (B) Espectrográfico mostrando os elementos químicos detectados na amostra obtido por microanálise de raio X considerando 150 seg de contagem e a distribuição de energia dos elementos.

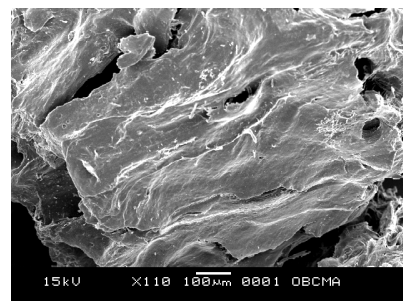
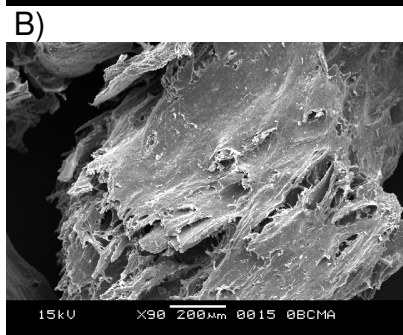
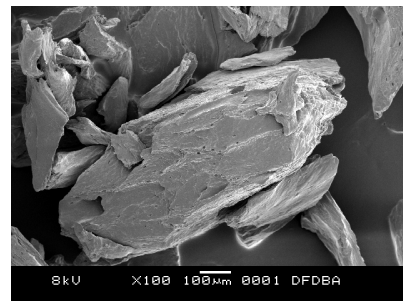
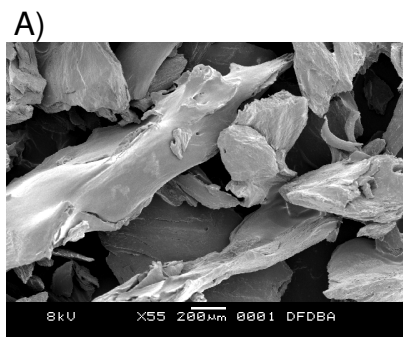
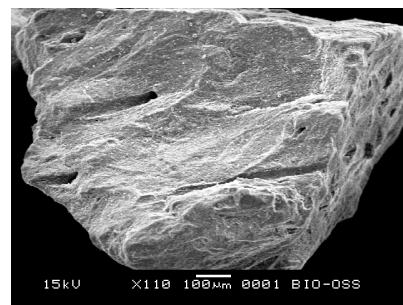
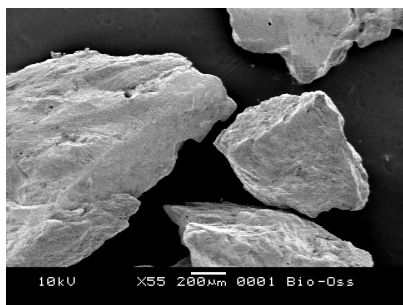
4.3 Análise estatística

Os dados referentes ao tamanho das partículas foram submetidos à análise estatística descritiva, para a obtenção de média e desvio padrão mediante os programas computacionais STATISTIX (Statistix for windows, versão 7.0, 2000, StatSoft South America , São Caetano do Sul, Brasil.) e MINITAB (Minitab *for windows*, versão 13.1, 2001, Minitab, Inc., Pennsylvania, USA).

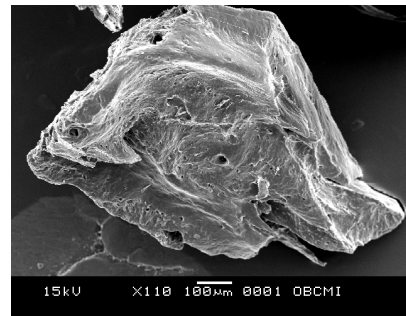
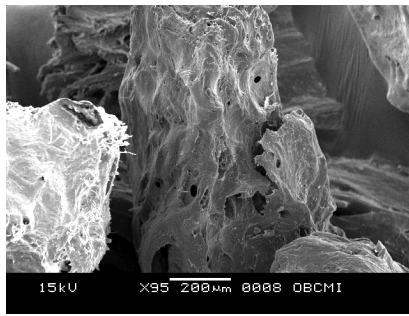
5 RESULTADOS

5.1 Morfologia

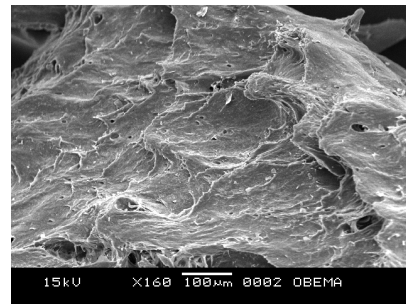
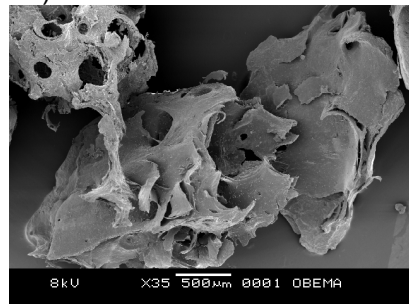
Na figura 3, pode-se observar a morfologia das partículas de substitutos ósseos.



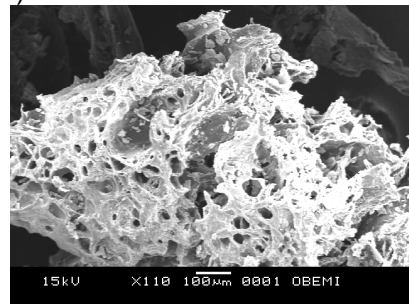
C)



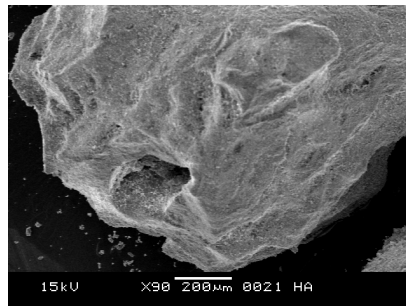
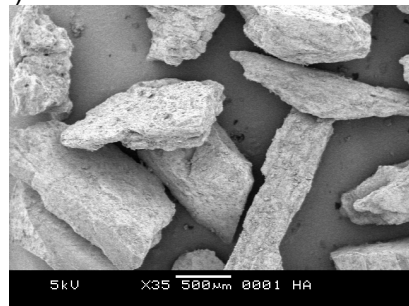
D)



E)



F)



G)

Figura 3 – Na linha podemos observar os substitutos ósseos em menor e maior aumento: A) osso cortical bovino inorgânico, B) osso humano descalcificado, congelado e seco (DFDBA), C) macropartícula de osso cortical bovino orgânico (OBCMA), D) micropartícula de osso cortical bovino orgânico (OBCMI), E) macropartícula de osso esponjoso bovino orgânico (OBEMA), F) micropartícula de osso esponjoso bovino orgânico (OBEMI), G) hidroxiapatita (HA).

A análise visual da morfologia das partículas de osso bovino, osso humano e hidroxiapatita revelaram partículas morfologicamente irregulares. As partículas de osso bovino orgânico esponjoso e osso humano (Figura 3: B, E e F) mostraram-se típicas de osso trabecular com maior porosidade do que as partículas de osso cortical (Figura 3: A, C e D). As partículas de hidroxiapatita (Figura 3: G) não apresentaram porosidade.

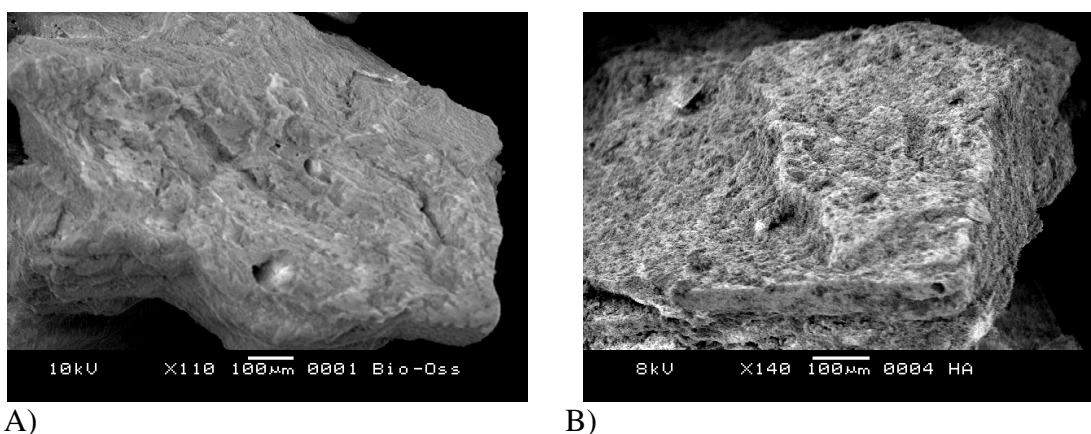
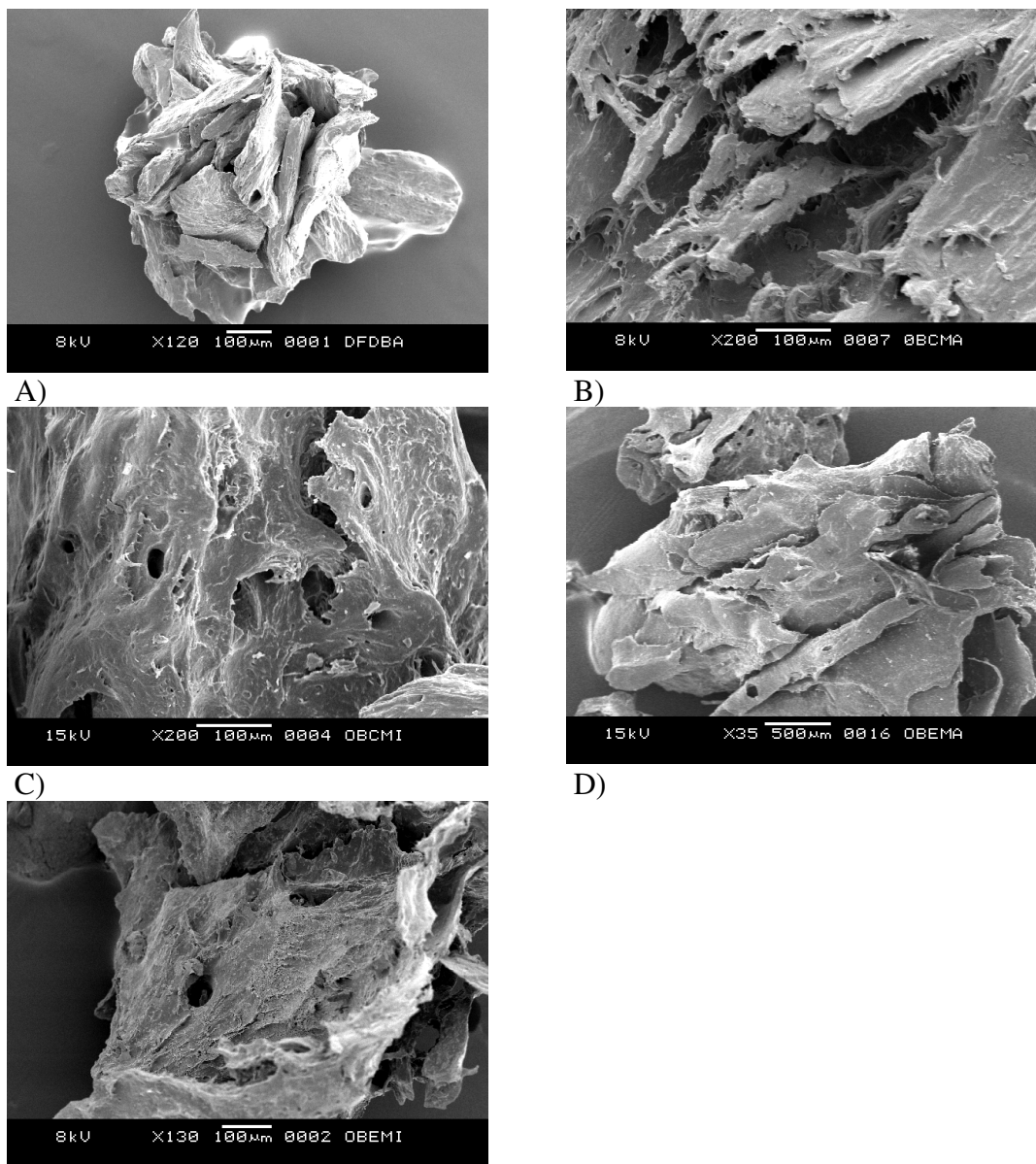


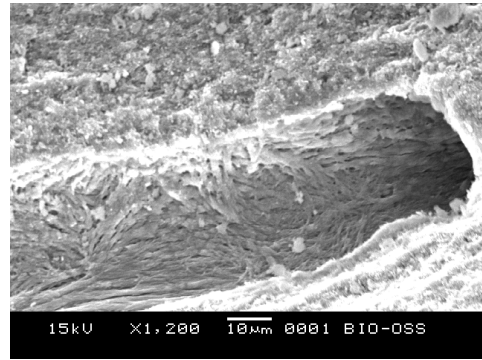
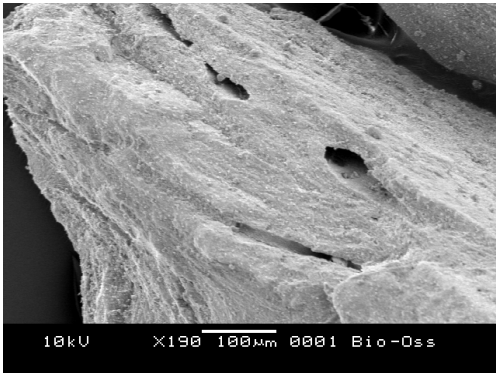
Figura 4 – Aspecto morfoestrutural semelhante dos substitutos ósseos: A) osso cortical bovino inorgânico, B) hidroxiapatita (HA).

Na figura 4 pode-se observar a semelhança morfológica entre a partícula de osso bovino cortical inorgânico e a hidroxiapatita, ambos os materiais com aspecto compacto e irregular.

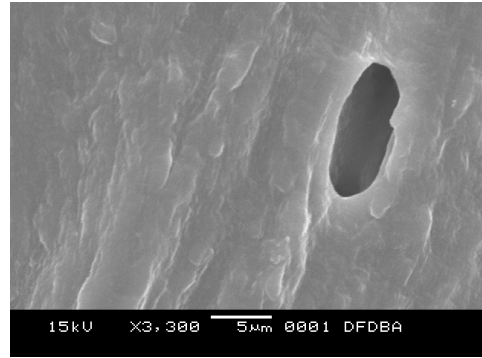
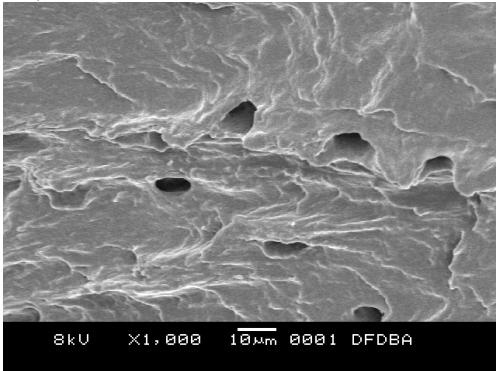


E)
 Figura 5 – Semelhanças entre a morfologia dos substitutos ósseos: A) osso humano descalcificado, congelado e seco (DFDBA), B) macropartícula de osso cortical bovino orgânico (OBCMA), C) micropartícula de osso cortical bovino orgânico (OBCMI), D) macropartícula de osso esponjoso bovino orgânico (OBEMA), E) micropartícula de osso esponjoso bovino orgânico esponjoso (OBEMI).

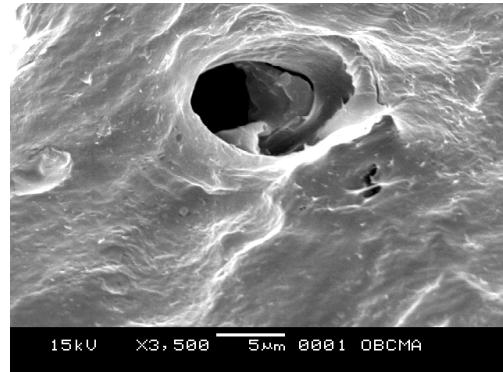
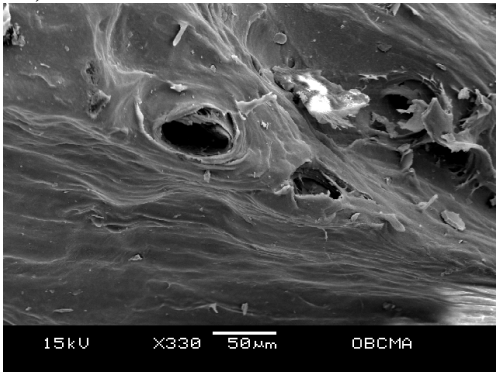
Na figura 5 pode-se observar a semelhança morfológica entre os materiais orgânicos e o osso humano, ambos apresentam maior quantidade de poros e aspecto irregular.



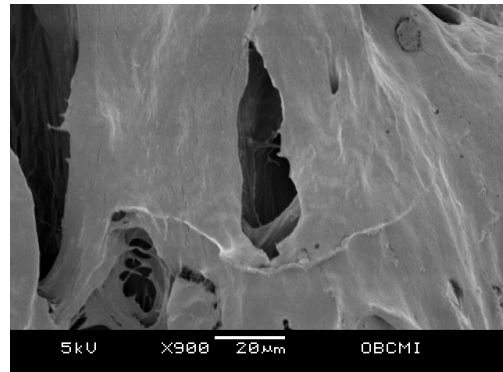
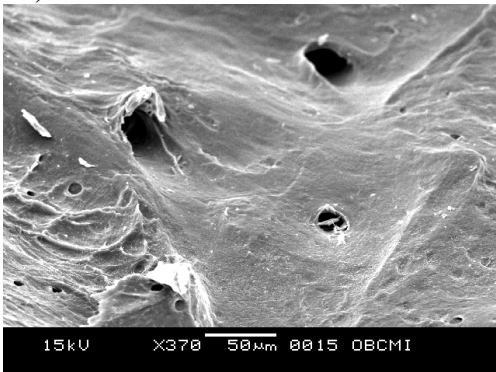
A)



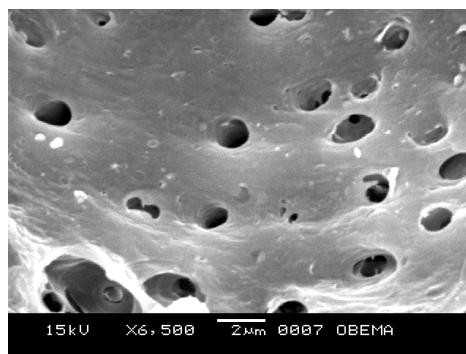
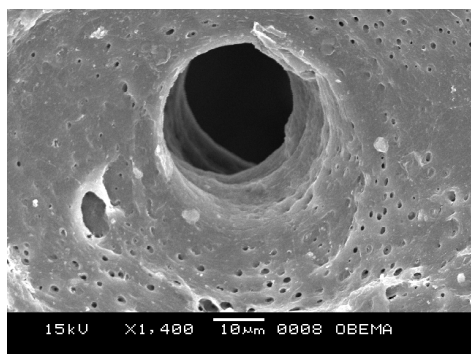
B)



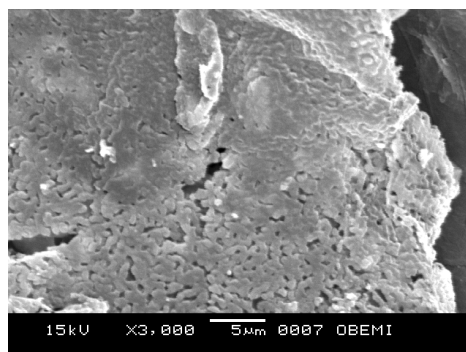
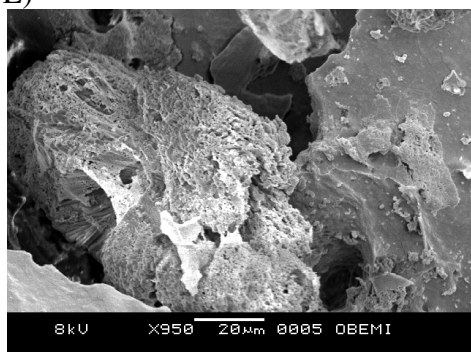
C)



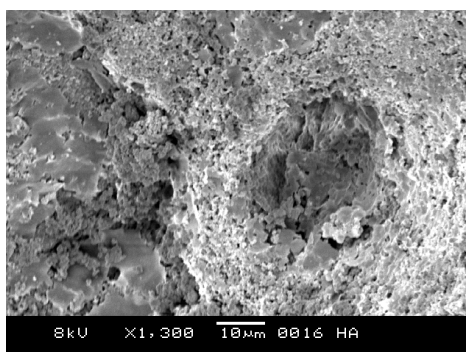
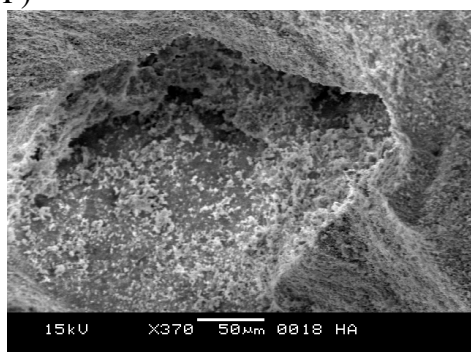
D)



E)



F)



G)

Figura 6 – Na linha menor e maior aumento, aspecto da porosidade dos substitutos ósseos: A) osso cortical bovino inorgânico, B) osso humano descalcificado, congelado e seco (DFDBA), C) macropartícula de osso cortical bovino orgânico (OBEMA), D) micropartícula de osso cortical bovino orgânico (OBEMI), E) macropartícula de osso esponjoso bovino orgânico (OBEMA), F) micropartícula de osso esponjoso bovino orgânico (OBEMI), G) hidroxiapatita (HA).

Na figura 6 pode-se observar na linha o mesmo material em menor e maior aumento. O aspecto da porosidade varia em quantidade e formato. A hidroxiapatita não apresenta poros, porém podemos observar reentrâncias no material.

5.2 Tamanho da partícula

Média, mediana e valores máximo e mínimo dos materiais utilizados como substitutos ósseos estão apresentados na Figura 7.

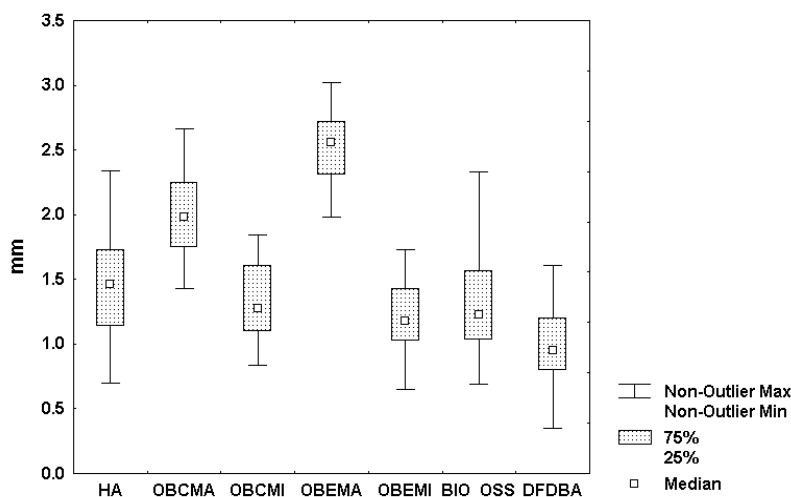


Figura 7 - Estatística descritiva dos dados de comprimento, em milímetro, das partículas de hidroxiapatita (HA), macropartícula de osso cortical bovino orgânico (OBCMA), micropartícula de osso cortical bovino orgânico (OBCMI), macropartícula de osso esponjoso bovino orgânico (OBEMA), micropartícula de osso esponjoso bovino orgânico (OBEMI), osso cortical bovino inorgânico (Bio-Oss), osso humano descalcificado, congelado e seco (DFDBA).

Tabela 1

Média (MD) e desvio padrão (DP) do tamanho das partículas em mm.

Materiais	MD ± DP	Medidas do fabricante
HA	1,43 ± 0,41	0,75 - 1,00
OBCMA	2,01 ± 0,35	1,00 - 2,00
OBCMI	1,33 ± 0,28	0,25 - 1,00
OBEMA	2,54 ± 0,31	1,00 - 2,00
OBEMI	1,19 ± 0,29	0,25 - 1,00
BIO-OSS	1,31 ± 0,41	0,25 - 1,00
DFDBA	0,97 ± 0,31	0,25 - 0,5

5.3 Composição química

Na tabela 2 pode-se observar a composição química dos materiais detectada na microanálise de raio X. Nesta análise são detectados os elementos químicos considerando o tempo de contagem de acordo com a energia dos materiais.

Tabela 2

Resultado da análise da composição química dos elementos realizada por dispersão de energia de acordo com o tempo de contagem para cada material.

Materiais	Tempo de Contagem (seg)	Elementos (%)				
		Na	P	Ca	S	Al
BIO-OSS	150	-	17,59	79,45	-	2,96
DFDBA	50	-	-	-	-	100,0
OBCMA	300	21,19	-	-	-	78,81
OBCMI	190	-	-	-	81,79	18,21
OBEMA	40	-	-	-	-	100,0
OBEMI	70	16,50	37,88	-	-	45,62
HA	200	-	22,08	26,39	-	44,40
Porta-espécime	11000	-	-	-	-	100,0
Fita de carbono	3000	-	-	-	-	100,0
Adesivo	800	-	-	-	100,0	-

Osso bovino inorgânico (BIO-OSS), osso humano descalcificado, congelado e seco (DFDBA), macropartícula de osso orgânico cortical (OBCMA), micropartícula de osso orgânico cortical (OBCMI), macropartícula de osso orgânico esponjoso (OBEMA), micropartícula de osso orgânico esponjoso (OBEMI), hidroxiapatita (HA), porta-espécime, fita de carbono e adesivo.

6 DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados a morfologia, o tamanho e a composição química das partículas de osso bovino orgânico e inorgânico, osso humano descalcificado, congelado e seco e de hidroxiapatita. Esses materiais estão disponíveis comercialmente e são utilizados como substitutos ósseos em tratamentos regenerativos da doença periodontal (Robinson 1969; Ellegard & Løe 1971; Patur 1974; Melloning *et al.*, 1991; Fucini *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 1996, 1997; Stephan *et al.*, 1999; Persson *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2001; Tadjoeidin *et al.*, 2003).

A análise visual da morfologia das partículas de osso bovino, osso humano e hidroxiapatita, foi realizada com o auxílio do microscópio eletrônico de varredura, que revelou partículas morfologicamente irregulares. As partículas de osso humano e osso bovino orgânico esponjoso mostraram-se típicas de osso trabecular com maior porosidade do que as partículas de osso cortical. As partículas de hidroxiapatita não apresentaram porosidade (figura 4), e esses resultados confirmam os achados de Frank *et al.* (1991) e Valdre *et al.* (1995). No entanto, Engin & Tas (1999) e Barralet *et al.* (2002) relataram que existe hidroxiapatita com poros e que é possível realizar modificações da sua estrutura aumentando-se a quantidade de poros.

Engin & Tas (1999) relatam que a presença de poros no material permite a colonização por células do tecido ósseo com as mesmas características do tecido peri-implantar. Os autores relatam que os poros devem apresentar tamanho entre 50 e 100µm ou entre 250 e 300µm para que ocorra colonização celular. Ikeda *et al.* (1999) relataram não ocorre formação óssea em poros com tamanho menor que 50µm. Na figura 5 e 6, pode-se observar a presença de poros com diversos formatos nos diferentes materiais.

No entanto, segundo os autores Nabers & O'Leary (1965), Hiatt *et al.* (1978), Listgarten & Rosenberg (1979), Kenney *et al.* (1984, 1986), Bowers *et al.*

(1986), Barnett *et al.* (1989), Frank *et al.* (1991), Sicca *et al.* (2000), Shi *et al.* (2000), Hallman *et al.* (2001), Cordioli *et al.* (2001), Suh *et al.* (2001), Artzi *et al.* (2001, 2002), Betz, (2002) e Vaccaro (2002) a presença de poros é importante, pois aumenta a área de superfície, resultando em aumento de atividade osteoblástica, diferenciação e nova deposição óssea. A larga superfície de área resulta em alta tendência para biorreabsorção, que induz a alta bioatividade celular. A intercomunicação entre poros proporciona um arcabouço para o crescimento ósseo dentro da matriz do implante, podendo prevenir a perda do mesmo. Os poros permitem o crescimento de canais vasculares que garantem a nutrição do implante. Ikeda *et al.* (1999) relataram que o processo de formação óssea no interior do poro ocorre da parede do poro em direção ao centro, de forma centrípeta, sendo que alguns poros são preenchidos por novo osso após 16 semanas de implantação.

A análise do tamanho da partícula, figura 7, revelou comprimento variável. As partículas do osso bovino orgânico esponjoso micro medem em média 1,19 mm e do osso humano descalcificado congelado e seco medem 0,97 mm. Schwartz *et al.* 1996 também encontrou tamanho e formato das partículas de DFDBA variável.

Os resultados da estatística descritiva dos materiais apresentados na tabela 1 mostram que as médias de comprimento das macropartículas, osso bovino orgânico cortical foi de 2,01 mm e osso bovino orgânico esponjoso foi de 2,53 mm, micropartícula, osso cortical bovino inorgânico foi de 1,31 mm e osso cortical bovino orgânico foi de 1,33 mm e hidroxiapatita foi de 1,42 mm. Esses resultados mostram que os materiais disponibilizados comercialmente têm tamanhos diferentes dos apresentados nas respectivas bulas divulgadas pelos fabricantes.

O tamanho da partícula é importante, pois pode interferir no sucesso da terapia regenerativa. Schwartz *et al.* 1996 mostraram que partículas de DFDBA que medem entre 0,2 e 0,5 mm possuem maior potencial osteoindutor.

Aparentemente o tamanho ideal da partícula deve estar entre 0,10 a 0,30 mm (American Academy of Periodontology, Position Papers, 2001). O tamanho reduzido da partícula de DFDBA permite rapidez de reabsorção por osteoclastos e conseqüente nova formação óssea (Schwartz *et al.*, 1996, 1997). Porém, Fucini *et al.* (1993) discordam dos autores acima, pois em seu estudo clínico demonstraram que o resultado obtido com enxertos de dois tamanhos de partículas de osso humano descalcificado, congelado e seco (entre 0,25 e 0,50 mm, e 0,85 e 1,00 mm) é o mesmo.

A microanálise de raio X por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) da matriz óssea bovina, osso humano e hidroxiapatita detectou a presença de sódio, fósforo, cálcio, alumínio e enxofre (Tabela 2). Nossos achados concordam com os achados de Guyton (1993) que relatou que os sais depositados na matriz orgânica dos ossos são, principalmente, o cálcio e o fosfato, sendo o principal sal cristalino a hidroxiapatita. A proporção relativa entre Ca/P pode variar acentuadamente em diferentes condições nutricionais. Os íons magnésio, sódio, potássio e carbonato também estão presentes entre os sais ósseos, embora o autor relate que estudo por difração de raios X não tenha conseguido mostrar cristais definidos formados por esses sais. Conseqüentemente, acredita-se que outros íons, como o estrôncio, urânio, plutônio, outros elementos transurânicos, chumbo, ouro, outros metais pesados e pelo menos 9 dos 14 produtos radioativos principais liberados pela bomba de hidrogênio possam estar presente e conjugados com os cristais de hidroxiapatita.

Na tabela 2 pode-se observar que as partículas de osso bovino orgânico cortical macro e micro, osso bovino orgânico esponjoso micro apresentaram íons minerais durante a microanálise de raio X por espectroscopia por dispersão de energia. Esse achado sugere que o osso bovino orgânico não apresenta somente colágeno e proteína como esperado, porém o osso bovino orgânico esponjoso macro não revelou a presença desses elementos. O osso bovino inorgânico e hidroxiapatita apresentaram cálcio e fósforo que são elementos químicos comuns

a sua composição. Esses últimos achados concordam com Merkx *et al.* (1999) que relataram que o osso bovino inorgânico (Bio-Oss) possui estrutura morfológica e composição química idêntica a do osso humano e composição inorgânica pura.

Na tabela 2 pode-se observar que a composição química do osso humano descalcificado, congelado e seco não foi diferente da achada para a macropartícula de osso bovino orgânico. A detecção de alumínio pode ter ocorrido devido à espessura delgada da amostra e é possível que a leitura tenha sido feita do material da base, ou seja do porta-espécime. Todos os materiais mostraram a presença de carbono e oxigênio, porém esses elementos não foram quantificados, porque são elementos de número atômico baixo inferior ao sódio e o equipamento não está calibrado para essa leitura (Goldstein *et al.*, 1992).

O espectro de raio X pode ser obtido para todos os elementos da tabela periódica com exceção do hidrogênio, porém a emissão dos dez primeiros elementos de baixo número atômica consiste em bandas na região de baixa energia, nas quais as perdas por absorção na amostra são grandes, requerendo a utilização de detectores especiais.

A grande vantagem da utilização de microsonda eletrônica em comparação a análise química convencional é a possibilidade de análise localizada em pequenas regiões, sem a necessidade de separação física das fases de interesse. Neste estudo a análise foi realizada para uma área selecionada aleatoriamente na partícula.

Os parâmetros avaliados por microscopia eletrônica de varredura revelam que os substitutos ósseos comercialmente disponíveis analisados apresentam característica morfológica irregular e partículas com dimensões maiores aquelas relatadas pelos fabricantes. A microanálise de raio X por espectroscopia por dispersão de energia revelou que a composição química dos materiais apresenta elementos como sódio, cálcio e fósforo que são elementos comuns à composição óssea, porém o osso orgânico apresentou elementos íons minerais na sua composição. Sugerimos que outros trabalhos clínicos e

histológicos sejam realizados em animais e humanos, para aumentar a segurança e confiabilidade do uso desses materiais nacionais em procedimentos regenerativos periodontais.

7 CONCLUSÃO

A análise por microscopia eletrônica de varredura e microanálise de raio X por espectroscopia por dispersão de energia (EDS) demonstram que as partículas dos substitutos ósseos são irregulares, apresentam tamanho maior do que o mencionado nos frascos pelo fabricante e possuem na sua composição química, elementos como o sódio, o cálcio e o fósforo que é comum à composição óssea inorgânica, porém o osso orgânico apresentou íons minerais na sua composição.

REFERÊNCIAS*

American Academy Periodontology. Position paper. Tissue banking of bone allografts used in periodontal regeneration. **J Periodontol.** 2001; 72(6): 834-8.

Artzi Z, Tal H, Dayan D. Porous bovine bone mineral in healing of human extraction sockets: 2. Histochemical observations at 9 months. **J Periodontol.** 2001; 72(2): 152-9.

Artzi Z, Nemcovsky CE, Dayan D. Bovine-HA spongiosa blocks and immediate implant placement in sinus augmentation procedures. Histopathological and histomorphometric observations on different histological staining in 10 consecutive patients. **Clin Oral Impl. Res.** 2002; 13(4): 420-7.

Barnett JD, Mellonig JT, Gray JL, Towle HJ. Comparison of freeze-dried bone allograft and porous hydroxyapatite in human periodontal defects. **J Periodontol.** 1989; 60(5): 231-7.

Barralet JE, Gaunt T, Wright AJ, Gibson IR, Knowles JC. Effect of porosity reduction by compaction on compressive strength and microstructure of calcium phosphate cement. **J Biomed Mater Res (Appl Biomater).** 2002; 63(1): 1-9.

Betz, RR. Limitations of autograft and allograft: new synthetic solutions. **Orthopedics.** 2002; 25(5): 561-70.

Bowers GM, Vargo JW, Levy B, Emerson JR, Bergquist JJ. Histologic observations following the placement of tricalcium phosphate implants in human intrabony defects. **J Periodontol.** 1986; 57(5): 286-7.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Cordioli G, Mazzocco C, Schepers E, Brugnolo E, Majzoub Z. Maxillary sinus floor augmentation using bioactive glass granules and autogenous bone with simultaneous implant placement. Clinical and histological findings. ***Clin Oral Impl. Res.*** 2001; 12(3): 270-8.

Ellegaard B, Løe H. New attachment of periodontal tissue after treatment of intrabony lesions. ***J Periodontol.*** 1971; 42(10): 648-52.

Engin NO, Tas AC. Manufacture of macroporus calcium hydroxyapatite bioceramics. ***J European Ceramic Society.*** 1999; 19: 2569-72.

Frank RM, Klewansky P, Hemmerle J, Tenenbaum H. Ultra structural demonstration of the importance of crystal size of bioceramic powders implanted into human periodontal lesions. ***J Clin Periodontol.*** 1991; 18(9): 669-80.

Fucini ES, Quintero G, Gher ME, Black BS, Richardson AC. Small versus large particles of demineralized freeze-dried bone allografts in human intrabony periodontal defects. ***J Periodontol.*** 1993; 64(9): 844-7.

Goldstein JI, Newbury DE, Echlin P, Joy DC, Roming Jr AD, Lyman CE *et al.* ***Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis.*** 2nd ed. New York: Plenum; 1992.

Guyton AC. ***Fisiologia humana e o mecanismo das doenças.*** 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1993.

Hallaman M, Cederlund A, Lindskog S, Lundgren S, Sennerby L. A clinical and histological study of bovine hydroxyapatite in combination with autogenous bone and fibrin glue for maxillary sinus floor augmentation. Results after 6 to 8 month of healing. ***Clin Oral Impl. Res.*** 2001; 12: 135-43.

Hiatt WH, Schallhorn RG, Aaronian AJ. The induction of new bone and cementum formation. IV Microscopic examination of the periodontium following human bone and marrow allograft, autograft and nongraft periodontal regenerative procedures. **J Periodontol.** 1978; 49(10): 495-11.

Ikeda N, Kawanabe K, Nakamura T. Quantitative comparison of osteoconduction of porous, dense A-W glass ceramic and hydroxyapatite granules (effects of granules and pore size). **Biomaterials.** 1999; 20(12): 1087-9.

Kenney EB, Lekovic V, Han T, Carranza Jr FA, Dimitrijevic B. The use of a porous hydroxyapatite implant in periodontal defects. I. Clinical results after six months. **J Periodontol.** 1985; 56(2): 82-8.

Kenney EB, Lekovic V, Ferreira JC, Han T, Dimitrijevic B, Carranza Jr FA. Bone formation within porous hydroxyapatite implants in human periodontal defects. **J Periodontol.** 1986; 57(2): 76-83.

Listgarten MA, Rosenberg MM. Histological study of repair following new attachment procedures in human periodontal lesions. **J Periodontol.** 1979; 50(7): 333-44.

Melloning JT. Freeze-dried bone allografts in periodontal reconstructive surgery. **Den Clin North Amer.** 1991; 35(3): 505-22.

Merkx AWM, Maltha JC, Freihofer MH, Kuijpers-Jagtman AM. Incorporation of particulated bone implants in the facial skeleton. **Biomaterials.** 1999; 20: 2029-35.

Nabers CL, O' Leary TJ. Autogenous bone transplants in the treatment of osseous defect. **J Periodontol.** 1965; 36: 5-14.

Park J, Suh J, Choi S, Moon I, Cho K, Kim C, *et al.* Effects of pretreatment on bioactive glass implantation in intrabony periodontal defects. **J Periodontol.** 2001; 72(6): 730-40.

Patur B. Osseous defects: evaluation of diagnostic and treatment methods. **J Periodontol.** 1974; 45(8): 523-41.

Persson GR, Falk H, Laurell L. A retrospective radiographic outcome assessment study of intra-bony defects treated by osseous surgery or by bone graft procedures. **J Periodontol.** 2000; 27(2): 104-8.

Robinson RE. Osseous coagulum for bone induction. **J Periodontol.** 1969; 40: 503-10.

Sicca CM, Silva TL, Oliveira DT, Buzalaf MAR, Taga R, Taga EM, *et al.* Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos. Efeito do tamanho da partícula. **Rev FOB.** 2000; 8(1/2): 1-10.

Stahl SS, Froum SJ. Histologic and clinical response to porous hydroxyapatite implants in human periodontal defects. Three to twelve months postimplantation. **J Periodontol.** 1987; 58(10): 698-95.

Schwartz Z, Goultschin J, Dean DD, Boyan BD. Mechanisms of alveolar bone destruction in periodontitis. **Periodontology 2000.** 1997; 14: 158-72.

Schwartz Z, Melloning JT, Carnes Jr DL, De La Fontaine J, Cochran DL, Dean DD, *et al.* Ability of commercial demineralized freeze-dried bone allograft to introduce new bone formation. **J Periodontol.** 1996; 67(4): 918-26.

Shi D, Jiang G, Wen X. In vitro bioactive behavior of hydroxyapatite- coated porous Al₂O₃. **J Biomed Mater Res (Appl Biomater)**. 2000; 53: 457-66.

Stephan EB, Jiang D, Lynch S, Bush P, Dziak R. Anorganic bovine bone supports osteoblastic cell attachment and proliferation. **J Periodontol**. 1999; 70(4): 364-9.

Suh H, Han D, Park J, Lee DH, Lee WS, Han CD. A bone replaceable artificial bone substitute: osteoinduction by combining with bone inducing agent. **Artificial Organs**. 2001; 25(6): 459-66.

Tadjoedin ES, De Lange GL, Bronkers ALJJ, Layaruu DM, Burger EH. Deproteinized cancelous bovine bone (Bio-OSS®) as bone substitute for sinus floor elevation. A retrospective, histomorphometrical study of five cases. **J Clin Periodontol**. 2003; 30(3): 261-70.

Vaccaro AR. The role of osteoconductive scaffold in synthetic bone graft. **Orthopedics**. 2002; 25(5 suppl.): 571-8.

Valdre G, Mongiorgi R, Ferrieri P, Corvo G, Cattaneo V, Tartaro GP. Scanning electron microscopy (SEM) and microanalysis (EDS) applied to the study of biomaterial for dental use. **Minerva Stomatol**. 1995; 44(1-2): 55-68.

Zaner DJ, Yukna RA. Particle size of periodontal bone grafting materials. **J Periodontol** 1984; 70(7): 406-9.

Anexo 1 – Análise da Morfologia

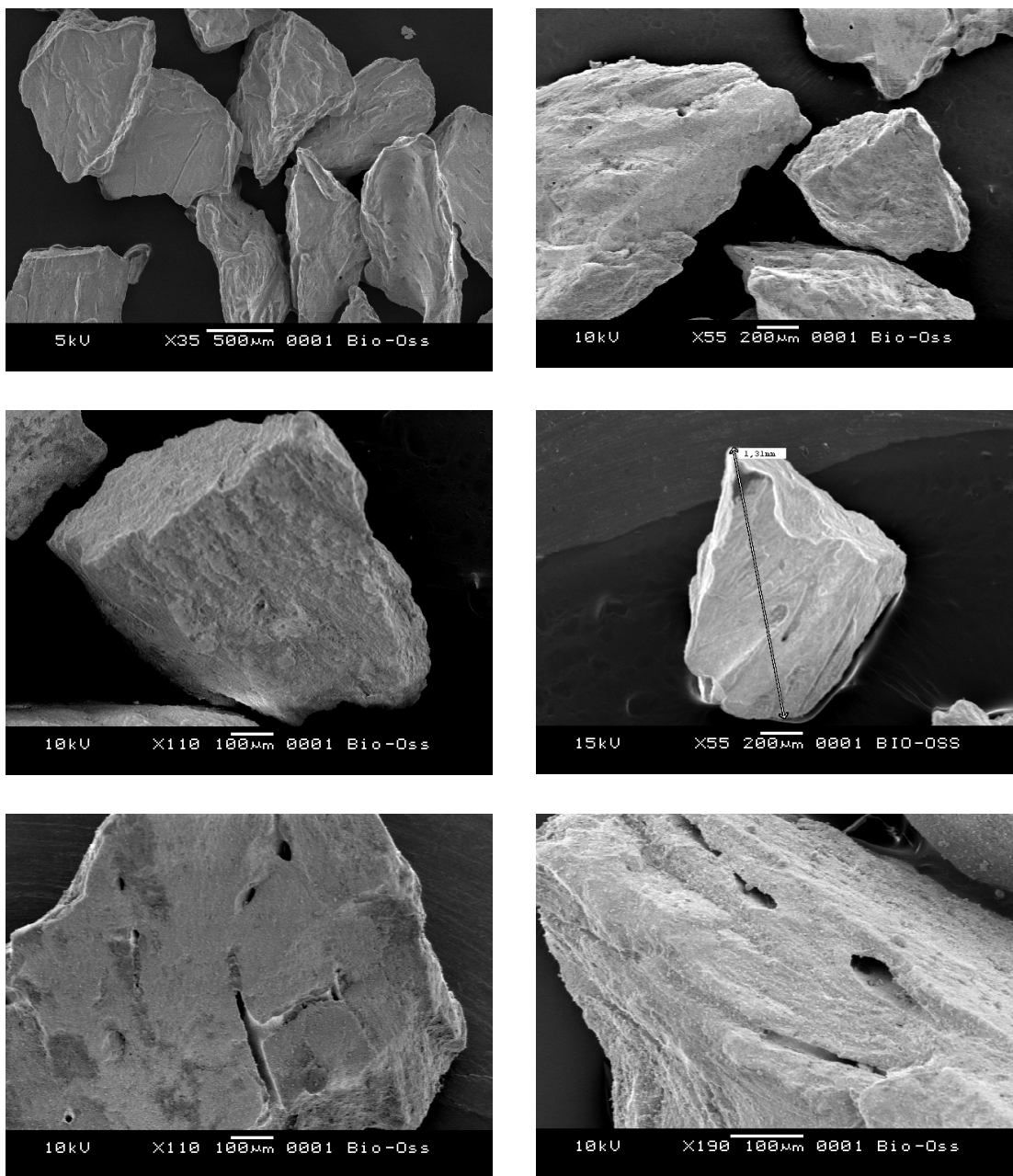


Figura 8 - Micrografias eletrônica de varredura do osso cortical bovino inorgânico (BIO-OSS).

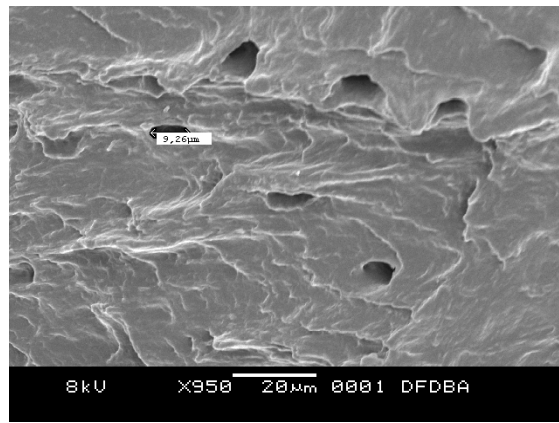
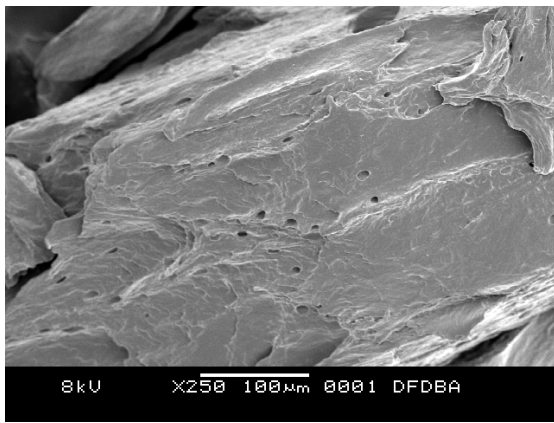
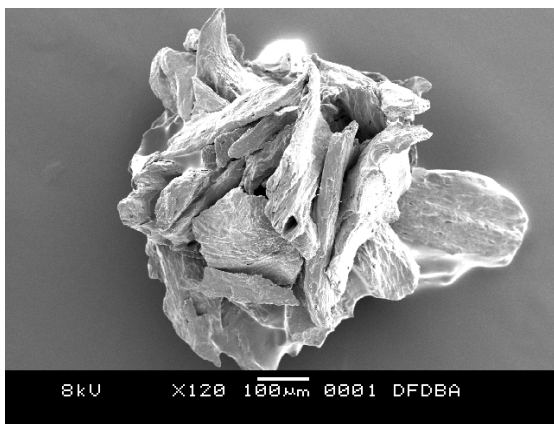
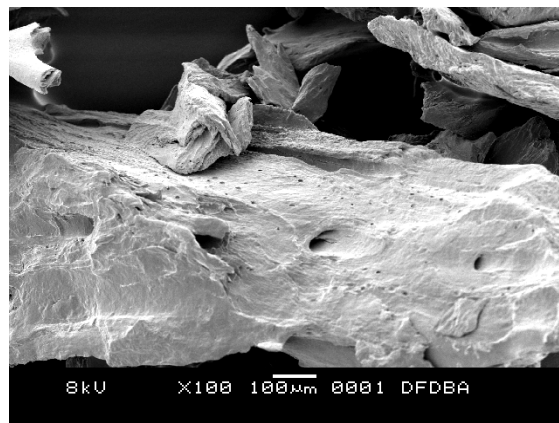


Figura 9 - Micrografias eletrônica de varredura do osso humano descalcificado, congelado e seco (DFDBA).

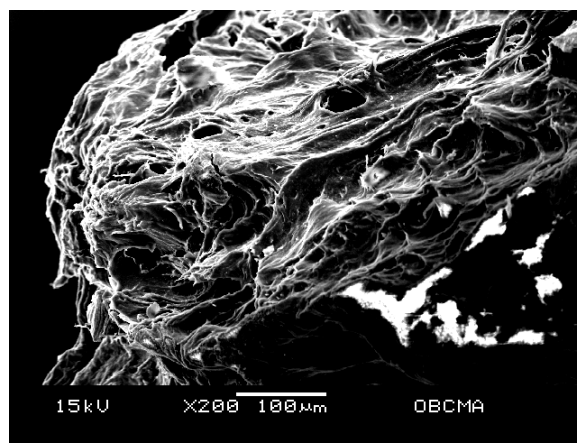
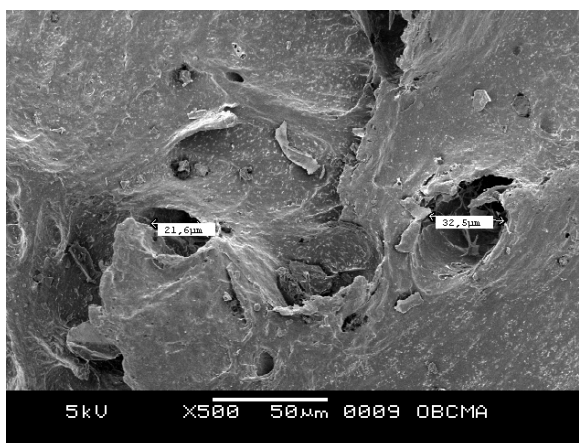
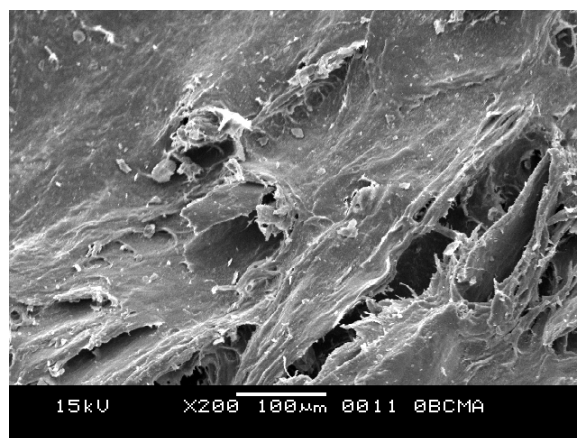
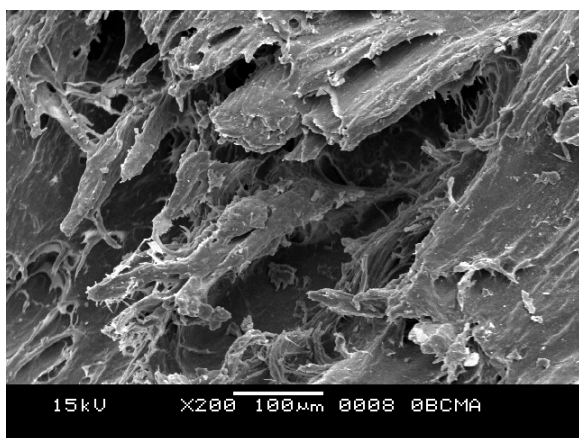
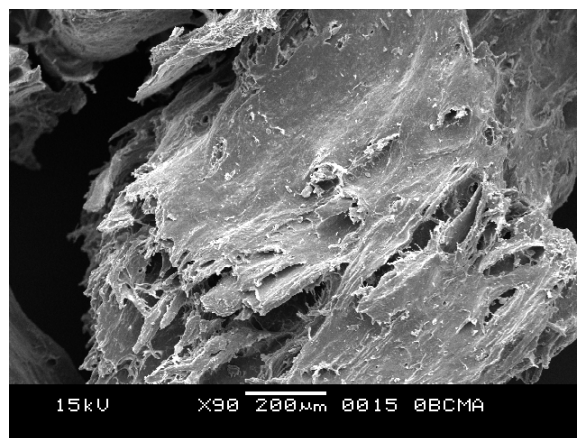
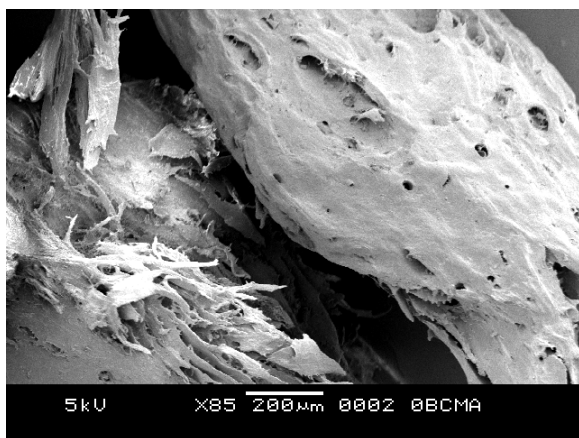


Figura 10 - Micrografias eletrônica de varredura de macropartícula de osso cortical bovino orgânico (OBCMA).

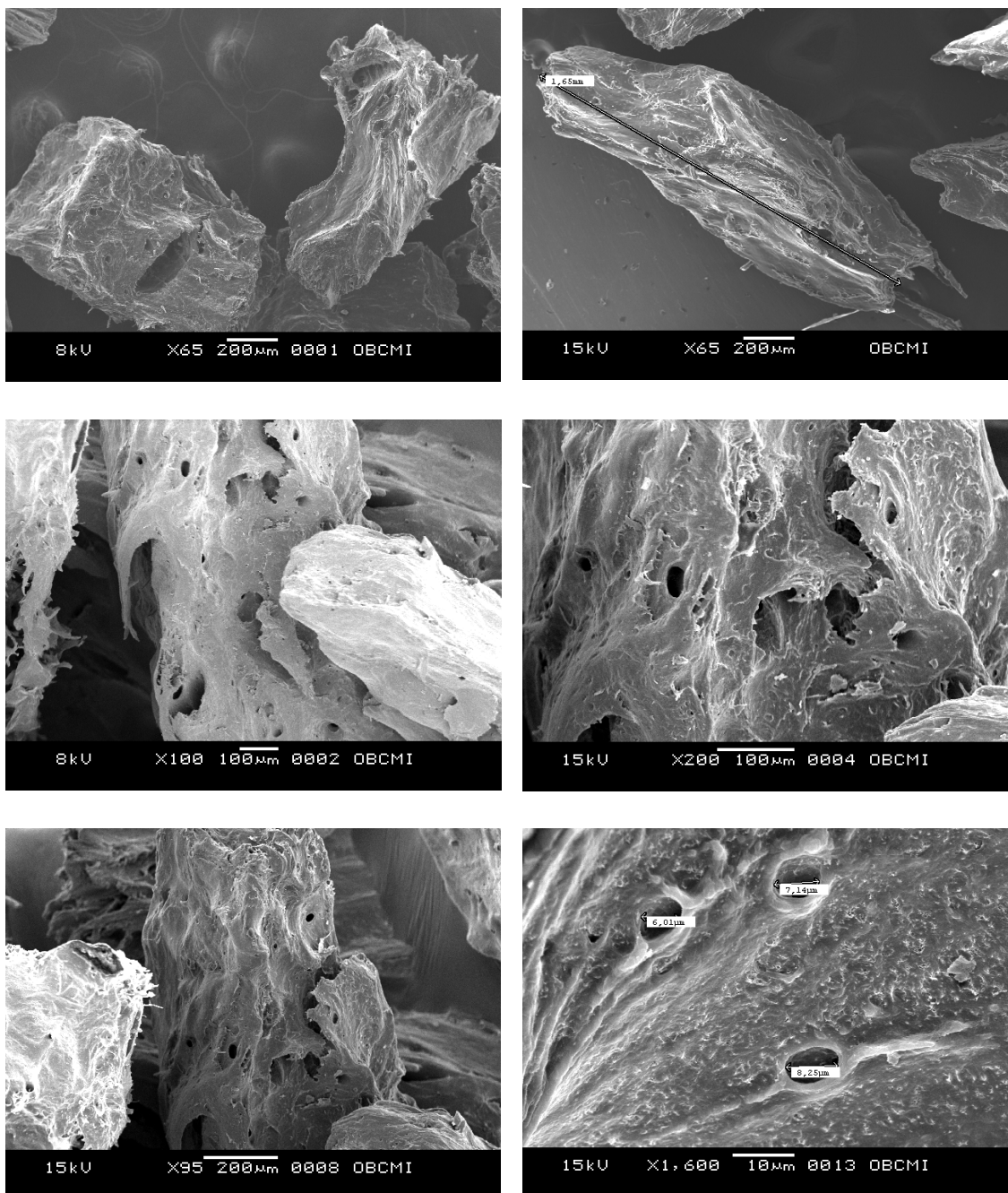


Figura 11 - Micrografias eletrônica de varredura de micropartícula osso cortical bovino orgânico (OBCMI).

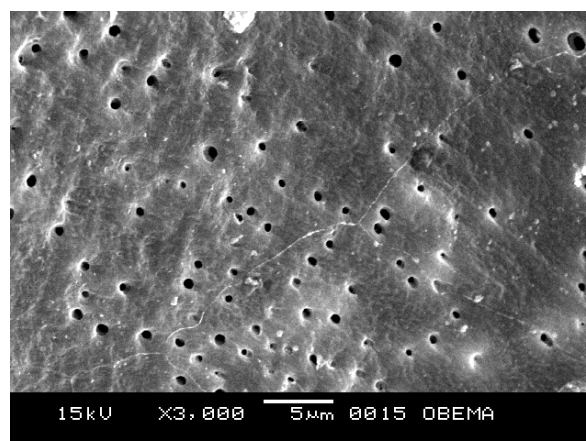
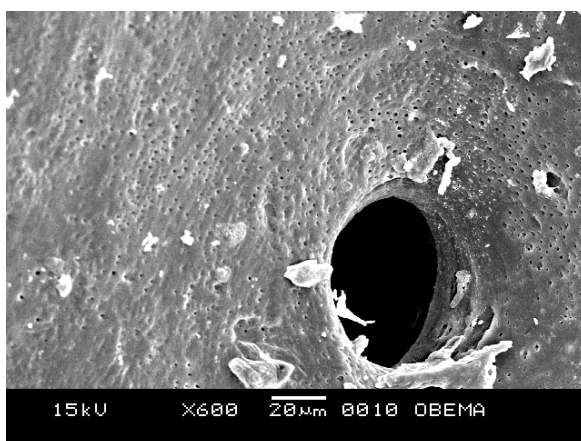
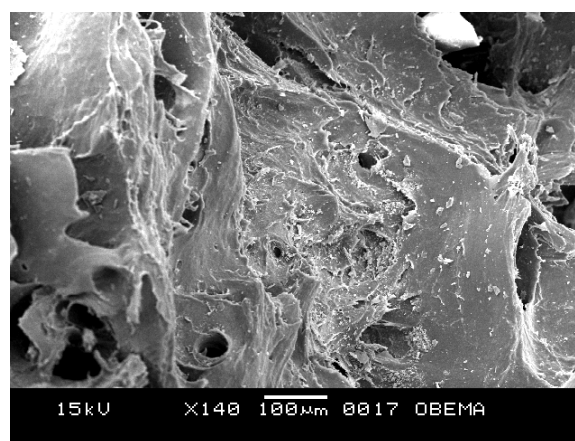
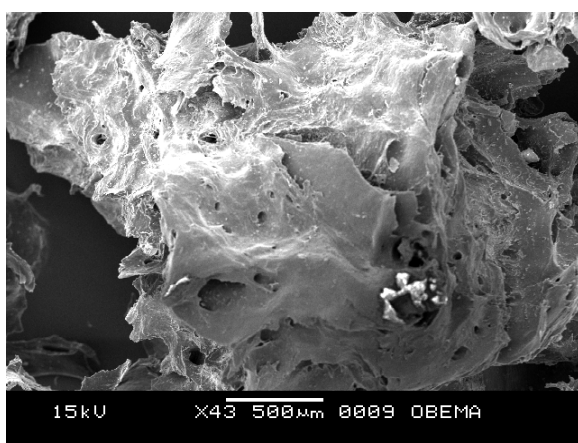
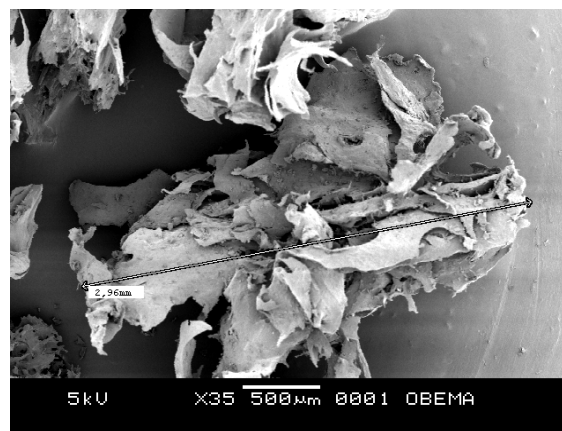
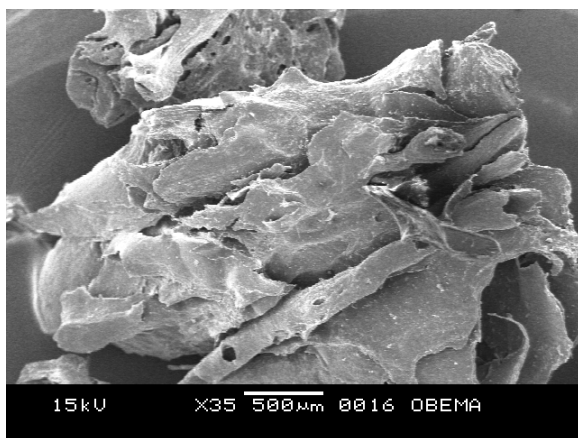


Figura 12 - Micrografias eletrônica de varredura de macropartícula osso esponjoso bovino orgânico (OBEMA).

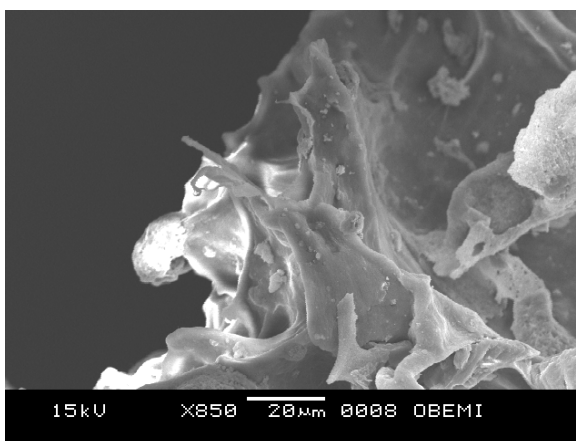
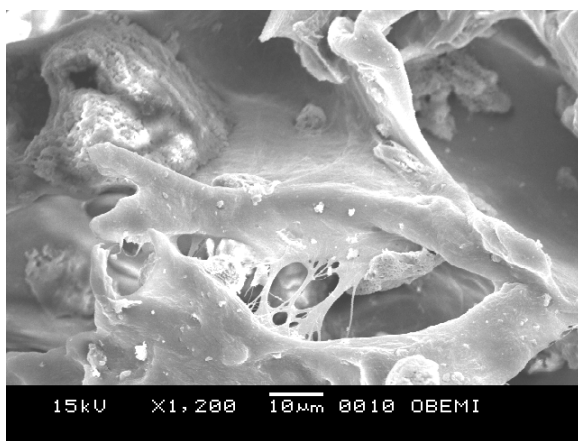
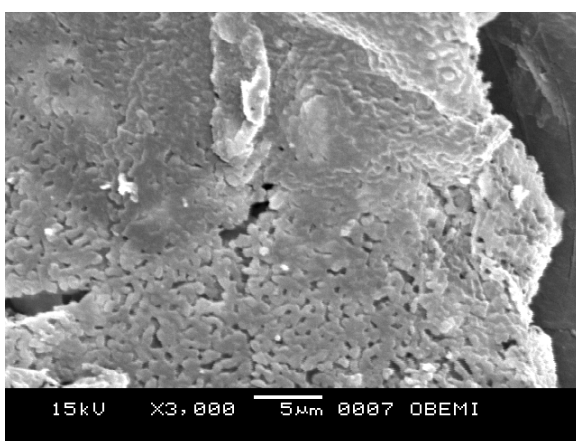
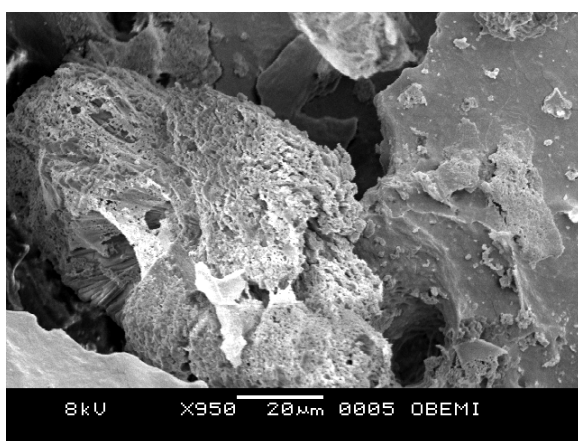
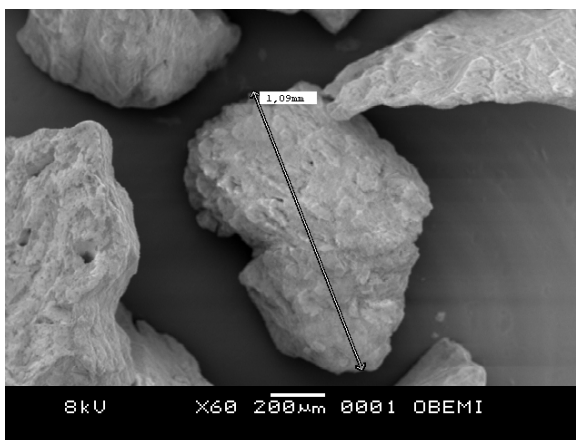
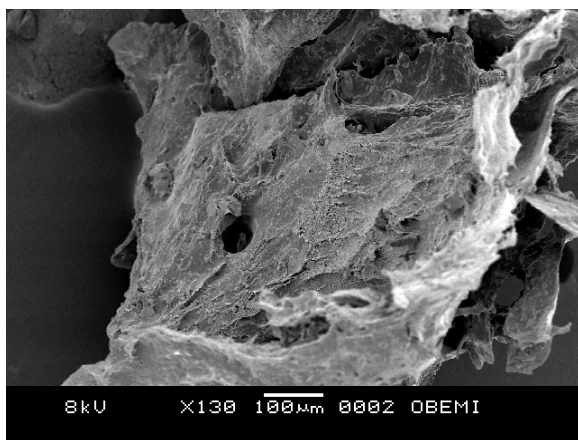


Figura 13 - Micrografias eletrônica de varredura de micropartícula osso esponjoso bovino orgânico (OBEMI).

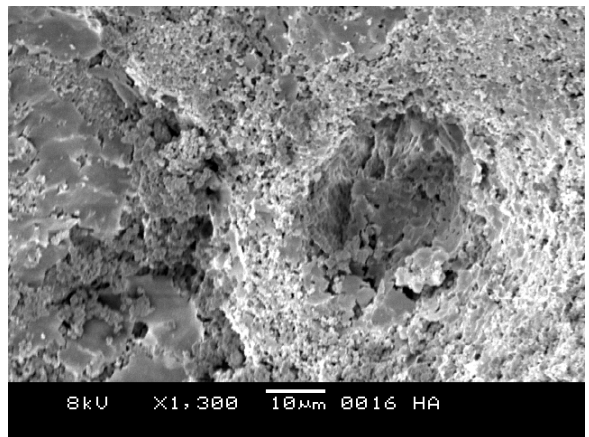
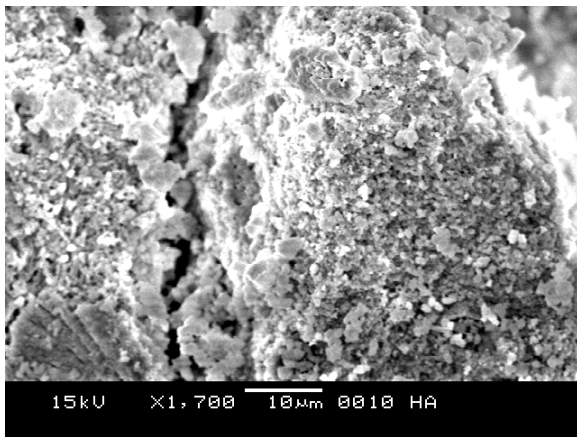
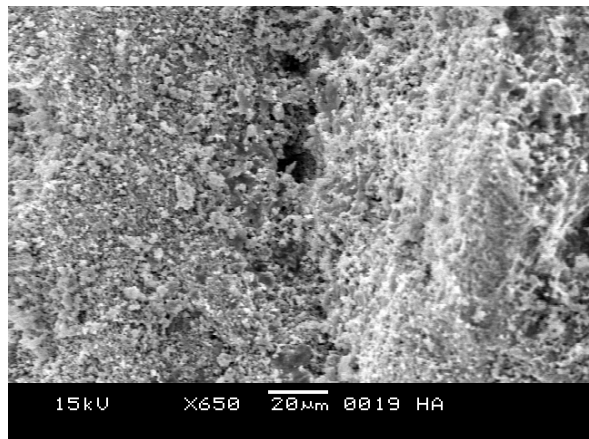
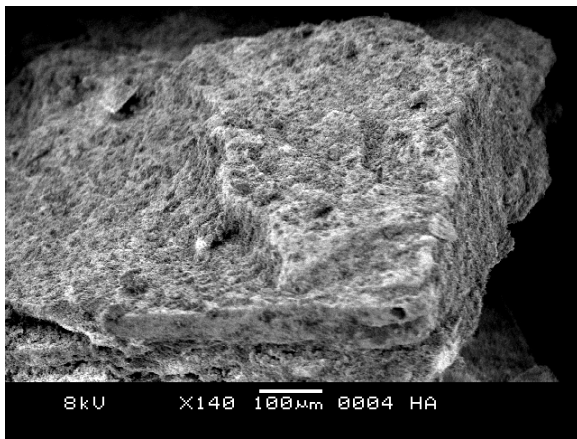
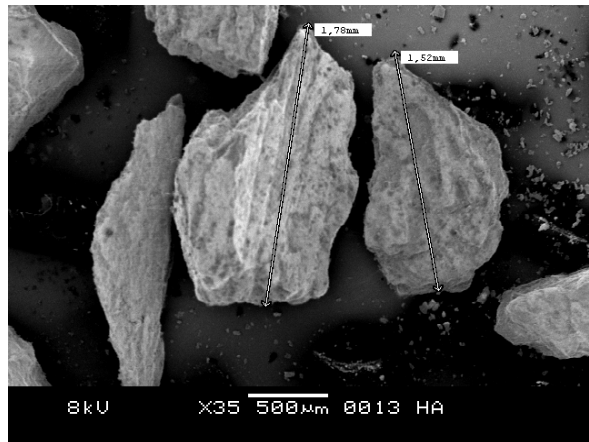
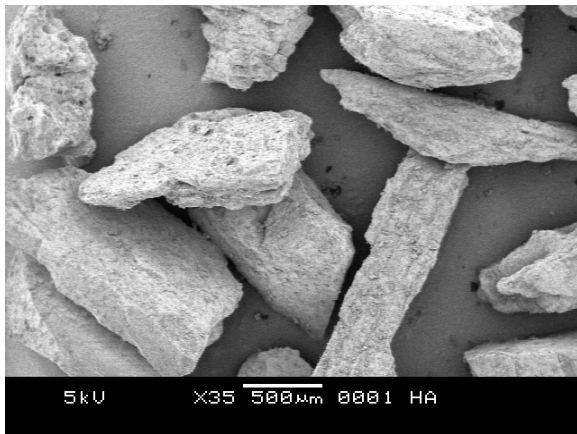
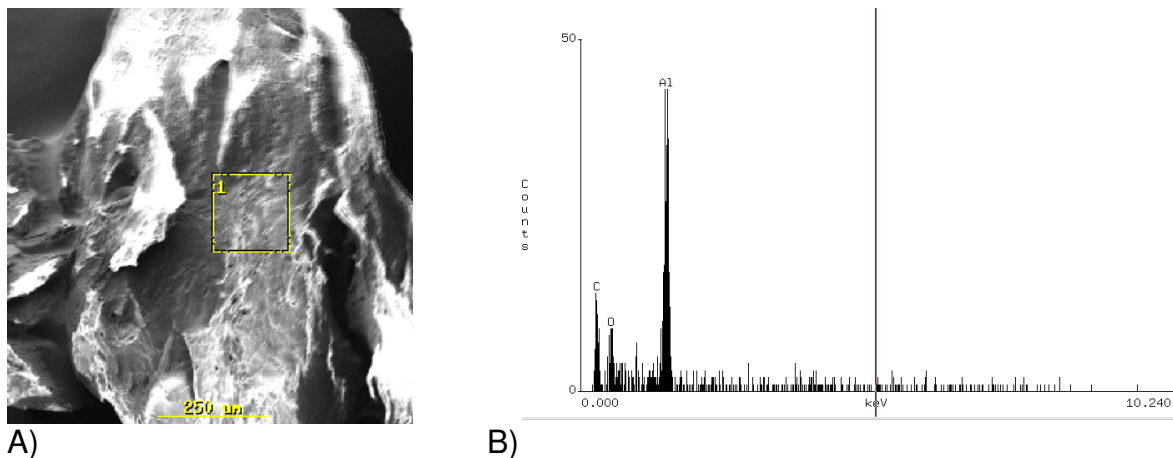
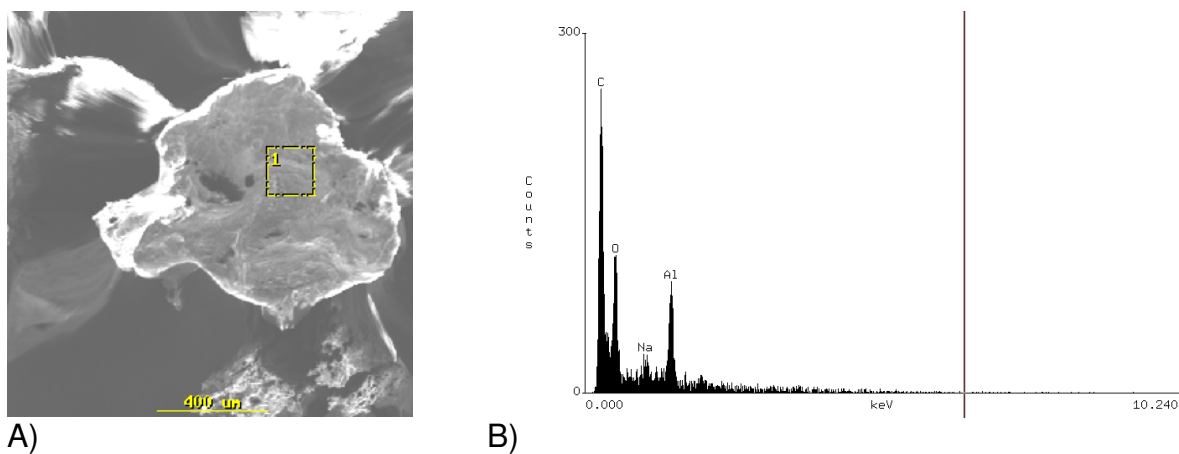


Figura 14 - Micrografias eletrônica de varredura de hidroxiapatita (HA).

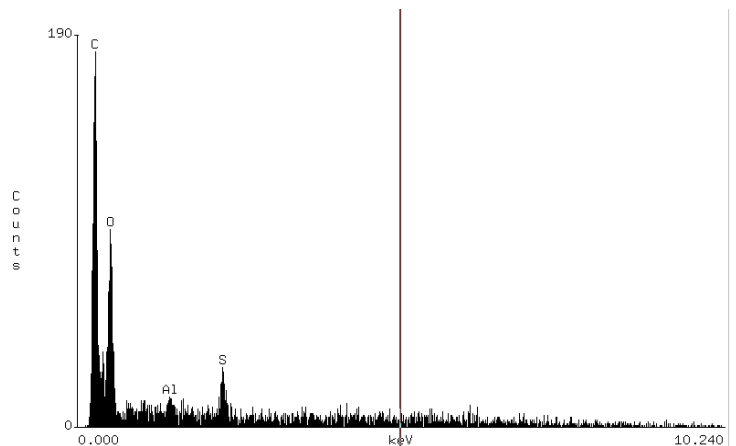
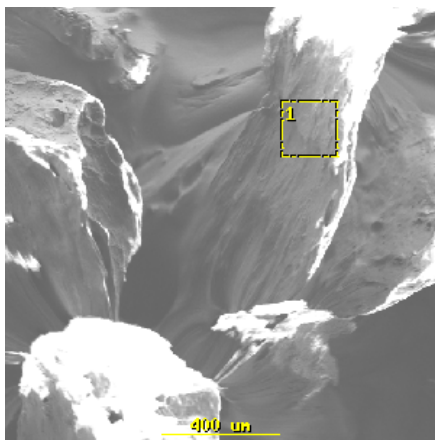
Anexo2 – Microanálise de raio X



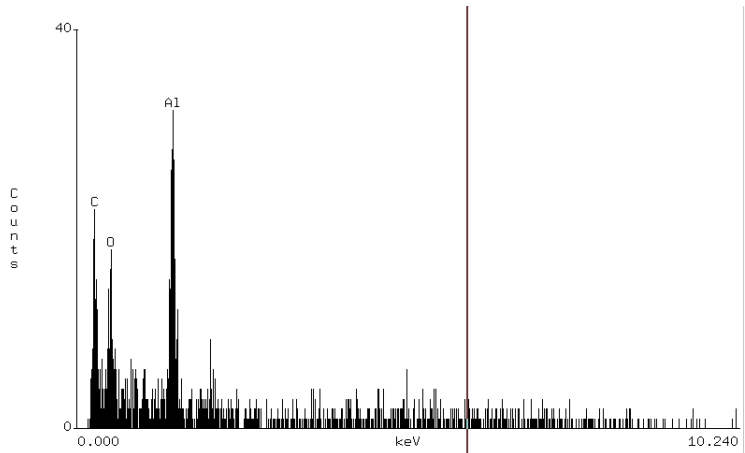
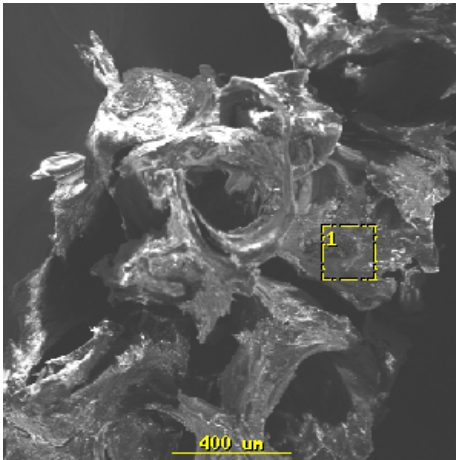
A)
 Figura 15 - (A) Micrografia eletrônica de varredura do osso humano descalcificado, congelado e seco (DFDBA) aumento de 130X, 15 kVp, 20 mm de distância, 33 spot-size. (B) Espectrográfico mostrando os elementos químicos detectados na amostra obtido por microanálise de raio X considerando 50 seg de contagem e a distribuição de energia dos elementos.



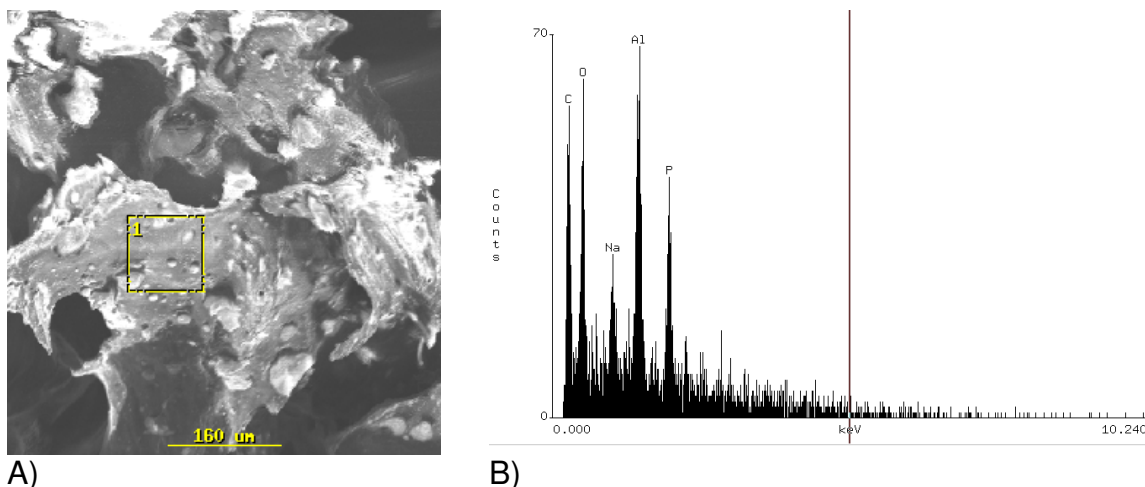
A)
 Figura 16 - (A) Micrografia eletrônica de varredura de macropartícula osso cortical bovino orgânico (OBCMA) aumento de 85X, 15 kVp, 20 mm de distância, 33 spot-size. (B) Espectrográfico mostrando os elementos químicos detectados na amostra obtido por microanálise de raio X considerando 300 seg de contagem e a distribuição de energia dos elementos.



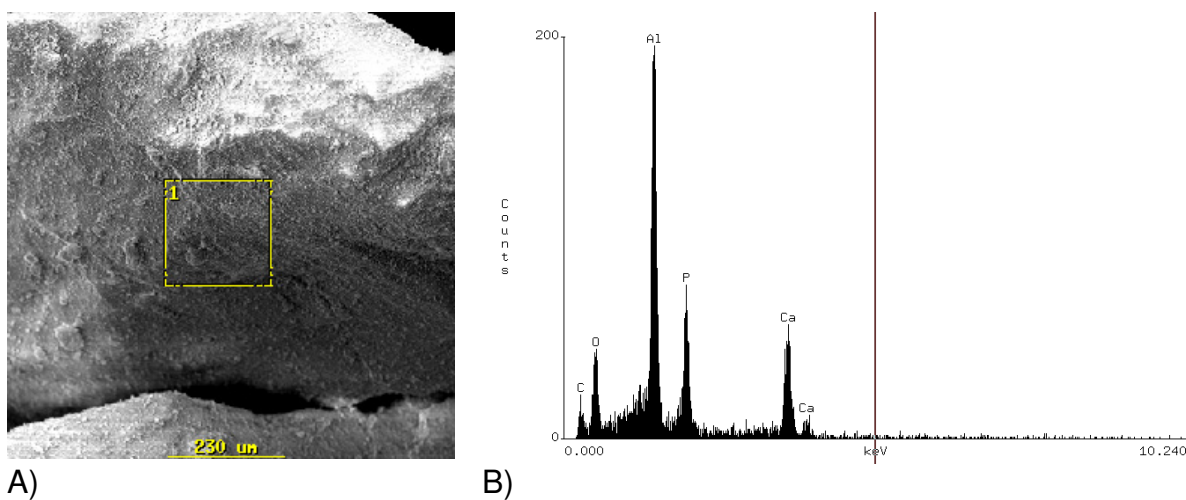
A) B)
 Figura 17 - (A) Micrografia eletrônica de varredura de micropartícula osso cortical bovino orgânico (OBCMI) aumento de 85X, 15 kVp, 20 mm de distância, 33 spot-size. (B) Espectrográfico mostrando os elementos químicos detectados na amostra obtido por microanálise de raio X considerando 190 seg de contagem e a distribuição de energia dos elementos.



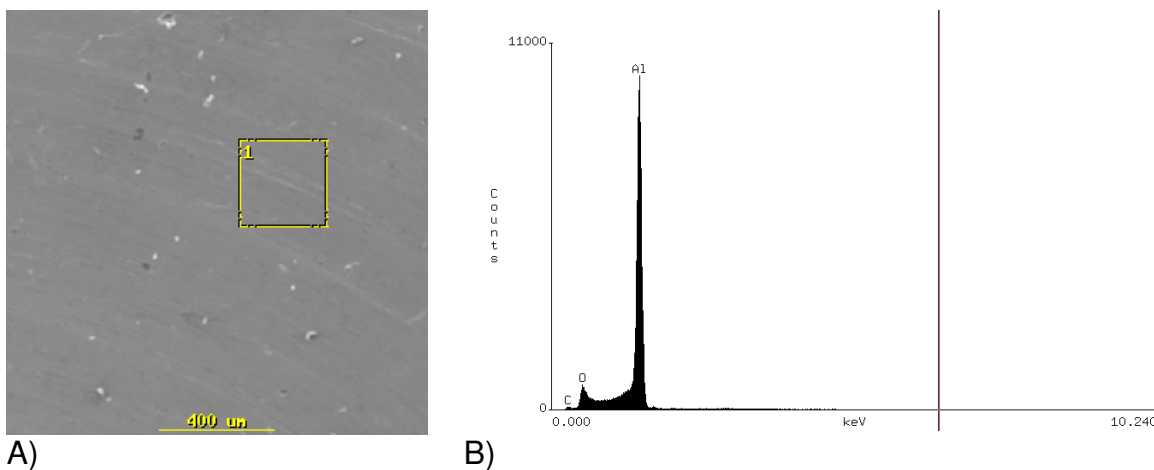
A) B)
 Figura 18 - (A) Micrografia eletrônica de varredura de macropartícula osso esponjoso bovino orgânico (OBEMA) aumento de 80X, 15 kVp, 20 mm de distância, 33 spot-size. (B) Espectrográfico mostrando os elementos químicos detectados na amostra obtido por microanálise de raio X considerando 40 seg de contagem e a distribuição de energia dos elementos.



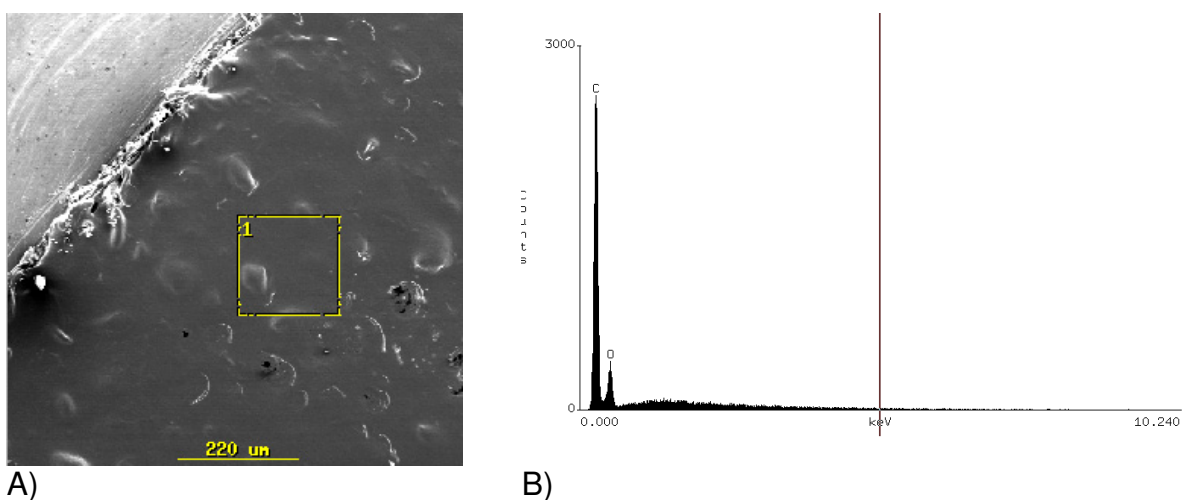
A)
 B)
 Figura 19 - (A) Micrografia eletrônica de varredura de micropartícula osso esponjoso bovino orgânico (OBEMI) aumento de 200X, 15 kVp, 20 mm de distância, 33 spot-size. (B) Espectrográfico mostrando os elementos químicos detectados na amostra obtido por microanálise de raio X considerando 70 seg de contagem e a distribuição de energia dos elementos.



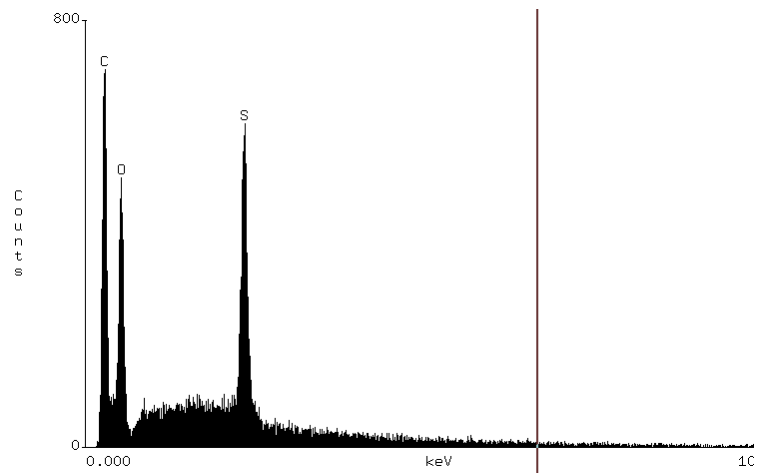
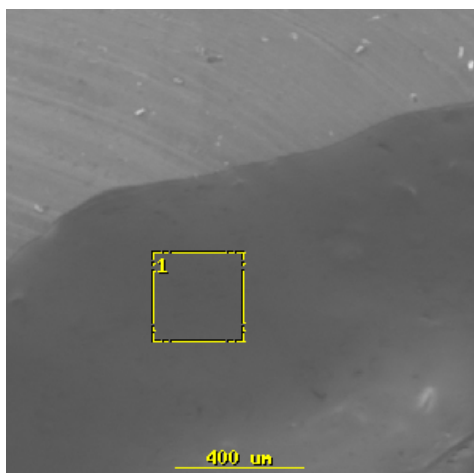
A)
 B)
 Figura 20 - (A) Micrografia eletrônica de varredura de hidroxiapatita (HA) aumento de 160X, 15 kVp, 20 mm de distância, 33 spot-size. (B) Espectrográfico mostrando os elementos químicos detectados na amostra obtido por microanálise de raio X considerando 200 seg de contagem e a distribuição de energia dos elementos.



A) B) **Figura 21 - (A)** Micrografia eletrônica de varredura do porta espécime aumento de 85X, 15 kVp, 20 mm de distância, 33 spot-size. **(B)** Espectrográfico mostrando os elementos químicos detectados na amostra obtido por microanálise de raio X considerando 11000 seg de contagem e a distribuição de energia dos elementos.



A) B) **Figura 22 - (A)** Micrografia eletrônica de varredura da fita de carbono aumento 35X, 15 kVp, 20 mm de distância, 33 spot-size. **(B)** Espectrográfico mostrando os elementos químicos detectados na amostra obtido por microanálise de raio X considerando 3000 seg de contagem e a distribuição de energia dos elementos.



A)

B)

Figura 23 - (A) Micrografia eletrônica de varredura do adesivo aumento 15X, 15 kVp, 20 mm de distância, 33 spot-size. (B) Espectrográfico mostrando os elementos químicos detectados na amostra obtido por microanálise de raio X considerando 800 seg de contagem e a distribuição de energia dos elementos.

Anexo 3 – Medidas das partículas

Tabela 3
Tamanho das partículas em mm.

	HA	OBCMA	OBCMI	OBEMA	OBEMI	Bio-Oss	DFDBA
1	1,77	2,24	1,37	2,66	1,03	1,26	1,40
2	2,08	2,64	1,05	2,23	1,09	1,72	0,97
3	1,17	1,97	1,08	2,73	0,88	1,84	1,25
4	1,24	2,19	1,10	2,43	1,47	0,99	0,93
5	1,03	2,26	1,65	2,71	1,25	0,91	0,81
6	1,0	1,69	1,27	3,02	1,73	1,11	0,35
7	1,20	1,90	0,84	2,70	1,15	1,13	0,90
8	1,78	1,56	1,09	2,42	1,55	1,06	0,41
9	1,52	2,30	1,57	2,60	1,02	1,37	0,80
10	1,69	2,66	1,32	2,51	0,86	1,20	0,68
11	1,84	1,73	1,17	2,97	0,65	0,74	1,20
12	1,50	1,61	1,19	2,89	1,15	1,92	1,61
13	1,29	1,77	1,84	2,71	1,20	1,68	1,26
14	1,57	1,43	1,74	2,17	0,70	1,34	1,13
15	1,10	2,00	1,20	2,44	1,20	0,69	1,20
16	1,50	2,15	1,28	1,98	1,27	1,45	1,04
17	0,80	1,77	1,67	2,96	1,55	2,33	0,92
18	0,70	2,12	1,08	2,22	1,08	1,00	0,75
19	2,34	2,42	1,51	2,38	1,50	1,35	0,79
20	1,42	1,81	1,67	1,99	1,39	1,17	0,98
M	1,43	2,01	1,33	2,54	1,19	1,31	0,97
DP	0,41	0,35	0,28	0,31	0,29	0,41	0,31

(HA) hidroxiapatita; (OBCMA) macropartícula de osso cortical bovino orgânico; (OBCMI) micropartícula osso cortical bovino orgânico; (OBEMA) macropartícula osso esponjoso bovino orgânico; (OBEMI) micropartícula osso esponjoso bovino orgânico; (BIO-OSS) osso cortical bovino inorgânico; (DFDBA) osso humano descalcificado, congelado e seco.

Anexo 4 - Resultado da micoanálise de raio X (EDS)

Livetime : 100,0 Sec.
Technique: Least Squares Fit

Elements Present:
O(8), Al(13), P(15), Ca(20)

Energy (keV)	Intensity (counts)	Elements Present
0,526	197	O Ka
1,481	112	Al Ka
2,012	670	P Ka
3,682	1474	Ca Ka
4,008	181	Ca Kb1

Refit _Al-K' _Al-K"
Refit _O -K' _O -K"
Filter Fit Method
Chi-sqd = 1,79 Livetime = 100,0 Sec.
Standardless Analysis

Element	Relative k-ratio	Error (1-Sigma)	Net Counts	Error (1-Sigma)
O -K	---	---	197 +/-	13
Al-K	0,02238 +/-	0,00323	111 +/-	16
P -K	0,16351 +/-	0,00937	751 +/-	43
Ca-K	0,81411 +/-	0,02966	1895 +/-	69

Adjustment Factors

	K	L	M
Z-Balance:	0,00000	0,00000	0,00000
Shell:	1,00000	1,00000	1,00000

PROZA Correction Acc.Volt.= 15 kV Take-off Angle=30,00 deg
Number of Iterations = 4

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element	Wt % Err. (1-Sigma)
Al-K	0,0210	1,405	4,12	2,96	+/- 0,43
P -K	0,1537	1,144	21,35	17,59	+/- 1,01
Ca-K	0,7854	1,038	74,53	79,45	+/- 2,89
Total			100,00	100,00	

A)

B)

Figura 24 - Resultado da microanálise de raio X para o osso cortical bovino inorgânico (Bio-Oss).

A) Relatório dos elementos presentes. B) Relatório da análise correção PROZA.

Livetime : 100,0 Sec.
Technique: Least Squares Fit

Elements Present:
C(6), O(8), Al(13)

Energy (keV)	Intensity (counts)	Elements Present
0,279	73	C Ka
0,528	47	O Ka
1,486	336	Al Ka

Refit _O -K' _O -K"
Filter Fit Method
Chi-sqd = 0,83 Livetime = 100,0 Sec.
Standardless Analysis

Element	Relative k-ratio	Error (1-Sigma)	Net Counts	Error (1-Sigma)
C -K	---	---	80 +/-	8
O -K	---	---	47 +/-	7
Al-K	1,00000 +/-	0,05307	359 +/-	19

Adjustment Factors

	K	L	M
Z-Balance:	0,00000	0,00000	0,00000
Shell:	1,00000	1,00000	1,00000

PROZA Correction Acc.Volt.= 15 kV Take-off Angle=30,00 deg
Number of Iterations = 2

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element	Wt % Err. (1-Sigma)
Al-K	0,9996	1,000	100,00	100,00	+/- 5,31
Total			100,00	100,00	

A)

B)

Figura 25 - Resultado da microanálise de raio X para o osso humano descalcificado, congelado e seco (DFDBA). A) Relatório dos elementos presentes. B) Relatório da análise correção PROZA.

ivetime : 100.0 Sec.
 echnique: Least Squares Fit

Elements Present:
 C(6), O(8), Na(11), Al(13)

Energy (keV)	Intensity (counts)	Elements Present
0.274	1562	C Ka
0.524	639	O Ka
1.047	134	Na Ka
1.486	678	Al Ka

Filter Fit Method
 Chi-sqd = 2.27 Livetime = 100.0 Sec.
 Standardless Analysis

Element	Relative k-ratio	Error (1-Sigma)	Net Counts	Error (1-Sigma)
C -K	---	---	1729 +/-	42
O -K	---	---	665 +/-	42
Na-K	0.23442 +/-	0.03331	191 +/-	27
Al-K	0.76558 +/-	0.03960	697 +/-	36

Adjustment Factors	K	L	M
Z-Balance:	0.00000	0.00000	0.00000
Shell:	1.00000	1.00000	1.00000

PROZA Correction Acc.Volt.= 15 kV Take-off Angle=30.00 deg
 Number of Iterations = 5

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %	Wt % Err. (1-Sigma)
Na-K	0.1899	1.116	23.99	21.19	+/- 3.01
Al-K	0.6201	1.271	76.01	78.81	+/- 4.08
Total			100.00	100.00	

A)

B)

Figura 26 - Resultado da microanálise de raio X para macropartícula de osso cortical orgânico (OBCMA). A) Relatório dos elementos presentes. B) Relatório da análise correção PROZA.

ivetime : 100.0 Sec.
 echnique: Least Squares Fit

Elements Present:
 C(6), O(8), Al(13), S(16)
 Possible Additional Elements:
 Mo(42)

Energy (keV)	Intensity (counts)	Elements Present	Elements Possible
0.275	1075	C Ka	
0.526	544	O Ka	
1.477	60	Al Ka	
*2.308	240	S Ka	

Mo La1

* Check peak labels manually, or acquire additional data for better statistics and re-run Automatic Ident.

Refit _Al-K' _Al-K"
 Refit _O -K' _S -K"
 Filter Fit Method
 Chi-sqd = 1.63 Livetime = 100.0 Sec.
 Standardless Analysis

Element	Relative k-ratio	Error (1-Sigma)	Net Counts	Error (1-Sigma)
C -K	---	---	1188 +/-	33
O -K	---	---	606 +/-	34
Al-K	0.17845 +/-	0.03932	60 +/-	13
S -K	0.82155 +/-	0.07572	218 +/-	20

Adjustment Factors	K	L	M
Z-Balance:	0.00000	0.00000	0.00000
Shell:	1.00000	1.00000	1.00000

PROZA Correction Acc.Volt.= 15 kV Take-off Angle=30.00 deg
 Number of Iterations = 4

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %	Wt % Err. (1-Sigma)
Al-K	0.1624	1.121	20.91	18.21	+/- 4.01
S -K	0.7475	1.094	79.09	81.79	+/- 7.54
Total			100.00	100.00	

A)

B)

Figura 27 - Resultado da microanálise de raio X para a micropartícula de osso cortical orgânico (OBCMI). A) Relatório dos elementos presentes. B) Relatório da análise correção PROZA.

Livetime : 100,0 Sec.
Technique: Least Squares Fit

Elements Present:
C(6), O(8), Al(13)

Energy (keV)	Intensity (counts)	Elements Present
0.278	100	C Ka
0.522	72	O Ka
1.484	226	Al Ka

Filter Fit Method
Chi-sqd = 0,51 Livetime = 100,0 Sec.
Standardless Analysis

Element	Relative k-ratio	Error (1-Sigma)	Net Counts	Error (1-Sigma)
C -K	---	---	114 +/-	11
O -K	---	---	87 +/-	15
Al-K	1,00000 +/-	0,07661	248 +/-	19

Adjustment Factors

	K	L	M
Z-Balance:	0,00000	0,00000	0,00000
Shell:	1,00000	1,00000	1,00000

PROZA Correction Acc.Volt.= 15 kV Take-off Angle=30,00 deg
Number of Iterations = 2

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %	Wt % Err. (1-Sigma)
Al-K	0,9996	1,000	100,00	100,00	+/- 7,66
Total			100,00	100,00	

A)

B)

Figura 28 - Resultado da microanálise de raio X para a macropartícula de osso esponjoso orgânico (OBEMA). A) Relatório dos elementos presentes. B) Relatório da análise correção PROZA.

Livetime : 100,0 Sec.
Technique: Least Squares Fit

Elements Present:
C(6), O(8), Na(11), Al(13), P(15)

Energy (keV)	Intensity (counts)	Elements Present
0.277	322	C Ka
0.524	282	O Ka
1.044	139	Na Ka
1.484	478	Al Ka
2.008	316	P Ka

Filter Fit Method
Chi-sqd = 0,98 Livetime = 100,0 Sec.
Standardless Analysis

Element	Relative k-ratio	Error (1-Sigma)	Net Counts	Error (1-Sigma)
C -K	---	---	360 +/-	20
O -K	---	---	274 +/-	27
Na-K	0,17833 +/-	0,02446	175 +/-	24
Al-K	0,48966 +/-	0,02907	539 +/-	32
P -K	0,33201 +/-	0,03242	338 +/-	33

Adjustment Factors

	K	L	M
Z-Balance:	0,00000	0,00000	0,00000
Shell:	1,00000	1,00000	1,00000

PROZA Correction Acc.Volt.= 15 kV Take-off Angle=30,00 deg
Number of Iterations = 5

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %	Wt % Err. (1-Sigma)
Na-K	0,1349	1,223	19,76	16,50	+/- 2,26
Al-K	0,3703	1,232	46,56	45,62	+/- 2,71
P -K	0,2511	1,509	33,68	37,88	+/- 3,70
Total			100,00	100,00	

A)

B)

Figura 29 - Resultado da microanálise de raio X para a micropartícula de osso esponjoso orgânico (OBEMI). A) Relatório dos elementos presentes. B) Relatório da análise correção PROZA.

Livetime : 100.0 Sec.
Technique: Least Squares Fit

Elements Present:
C(6), O(8), Al(13), P(15), Ca(20)

Energy (keV)	Intensity (counts)	Elements Present
0.277	98	C Ka
0.522	310	O Ka
1.482	1595	Al Ka
2.010	566	P Ka
3.681	536	Ca Ka
3.998	65	Ca Kb1

Filter Fit Method
Chi-sqd = 0.67 Livetime = 100.0 Sec.
Standardless Analysis

Element	Relative k-ratio	Error (1-Sigma)	Net Counts	Error (1-Sigma)
C -K	---	---	116 +/-	12
O -K	---	---	356 +/-	24
Al-K	0.45162 +/-	0.01250	1772 +/-	49
P -K	0.18253 +/-	0.01103	662 +/-	40
Ca-K	0.36585 +/-	0.02338	673 +/-	43

Adjustment Factors	K	L	M
Z-Balance:	0.00000	0.00000	0.00000
Shell:	1.00000	1.00000	1.00000

PROZA Correction Acc.Volt.= 15 kV Take-off Angle=30.00 deg
Number of Iterations = 5

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %	Wt % Err. (1-Sigma)
Al-K	0.3754	1.183	51.54	44.40	+/- 1.23
P -K	0.1517	1.439	22.08	21.83	+/- 1.32
Ca-K	0.3041	1.110	26.39	33.77	+/- 2.16
Total			100.00	100.00	

A)

B)

Figura 30 - Resultado da microanálise de raio X para a hidroxiapatita (HA). A) Relatório dos elementos presentes. B) Relatório da análise correção PROZA.

ivetime : 54.1 Sec.
echnique: Least Squares Fit

Elements Present:
C(6), O(8), Al(13)

Energy (keV)	Intensity (counts)	Elements Present
0.276	562	C Ka
0.529	3946	O Ka
1.484	85297	Al Ka
1.759	130	unidentified

Filter Fit Method
Chi-sqd = 22.60 Livetime = 54.1 Sec.
Standardless Analysis

Element	Relative k-ratio	Error (1-Sigma)	Net Counts	Error (1-Sigma)
C -K	---	---	639 +/-	33
O -K	---	---	4887 +/-	107
Al-K	1.00000 +/-	0.00485	94955 +/-	461

Adjustment Factors	K	L	M
Z-Balance:	0.00000	0.00000	0.00000
Shell:	1.00000	1.00000	1.00000

PROZA Correction Acc.Volt.= 15 kV Take-off Angle=30.00 deg
Number of Iterations = 2

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %	Wt % Err. (1-Sigma)
Al-K	0.9996	1.000	100.00	100.00	+/- 0.49
Total			100.00	100.00	

A)

B)

Figura 31 - Resultado da microanálise de raio X para o porta espécime. A) Relatório dos elementos presentes. B) Relatório da análise correção PROZA.

Livetime : 100,0 Sec.
Technique: Least Squares Fit

Elements Present:
C(6), O(8), S(16)

Energy (keV)	Intensity (counts)	Elements Present
0,275	4575	C Ka
0,521	3275	O Ka
2,303	5647	S Ka

Filter Fit Method
Chi-sqd = 2,71 Livetime = 100,0 Sec.
Standardless Analysis

Element	Relative k-ratio	Error (1-Sigma)	Net Counts	Error (1-Sigma)
C -K	---	---	5008 +/-	69
O -K	---	---	3666 +/-	79
S -K	1,00000 +/-	0,02051	6923 +/-	142

Adjustment Factors

	K	L	M
Z-Balance:	0,00000	0,00000	0,00000
Shell:	1,00000	1,00000	1,00000

PROZA Correction Acc.Volt.= 15 kV Take-off Angle=30,00 deg
Number of Iterations = 2

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %	Wt % Err. (1-Sigma)
S -K	0,9996	1,000	100,00	100,00	+/- 2,05
Total			100,00	100,00	

A)

B)

Figura 32 - Resultado da microanálise de raio X para o adesivo. A) Relatório dos elementos presentes. B) Relatório da análise correção PROZA.

Livetime : 100,0 Sec.
Technique: Least Squares Fit

Elements Present:
C(6), O(8)

Energy (keV)	Intensity (counts)	Elements Present
0,273	21343	C Ka
0,518	3237	O Ka

Filter Fit Method
Chi-sqd = 0,67 Livetime = 100,0 Sec.
Standardless Analysis

Element	Relative k-ratio	Error (1-Sigma)	Net Counts	Error (1-Sigma)
C -K	---	---	116 +/-	12
O -K	---	---	356 +/-	24
Al-K	0,45162 +/-	0,01250	1772 +/-	49
P -K	0,18253 +/-	0,01103	662 +/-	40
Ca-K	0,36585 +/-	0,02338	673 +/-	43

Adjustment Factors

	K	L	M
Z-Balance:	0,00000	0,00000	0,00000
Shell:	1,00000	1,00000	1,00000

PROZA Correction Acc.Volt.= 15 kV Take-off Angle=30,00 deg
Number of Iterations = 5

Element	k-ratio (calc.)	ZAF	Atom %	Element Wt %	Wt % Err. (1-Sigma)
Al-K	0,3754	1,183	51,54	44,40	+/- 1,23
P -K	0,1517	1,439	22,08	21,83	+/- 1,32
Ca-K	0,3041	1,110	26,39	33,77	+/- 2,16
Total			100,00	100,00	

A)

B)

Figura 33 - Resultado da microanálise de raio X para a fita de carbono. A) Relatório dos elementos presentes. B) Relatório da análise correção PROZA.