

TESE

1142

EFEI

**Escola Federal de Engenharia de Itajubá
Instituto de Engenharia Mecânica**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MORFOLOGIA DE RECOBRIMENTOS CERÂMICOS
E CULTURA DE CÉLULAS OSTEÓBLASTAS
PARA APLICAÇÕES CLÍNICAS**

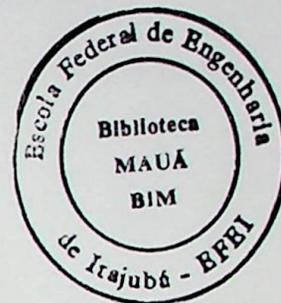
Autor : EDMAR DOS SANTOS NEVES

Orientador : PROF. DR. NECESIO GOMES COSTA

ITAJUBÁ • MG 2001

EFEI

**Escola Federal de Engenharia de Itajubá
Instituto de Engenharia Mecânica**



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**MORFOLOGIA DE RECOBRIMENTOS CERÂMICOS
E CULTURA DE CÉLULAS OSTEÓBLASTAS
PARA APLICAÇÕES CLÍNICAS**

Autor: EDMAR DOS SANTOS NEVES

Orientador: PROF. DR. NECESIO GOMES COSTA

Curso : Engenharia Mecânica

Área de Concentração : Projeto e Fabricação

Dissertação de mestrado apresentada à comissão de Pós Graduação do Instituto de Engenharia Mecânica, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Itajubá, 2001

Minas Gerais - BRASIL

CLASS. 669...693(043-2)

CIT. N511m

TOMBO. 1140



Escuela Federal de Ingenieros de Tránsito
Instituto de Investigaciones Científicas

DISERTACIÓN DE MAESTRADO

TECNOLOGÍA DE RECUBRIMIENTOS CERÁMICOS
E CULTURA DE CÉLULAS OSTEOBLASTAS
PARA APLICACIONES CLÍNICAS

QUE PRESENTA DON SAULOS VIVEROS

ORIENTADOR: PROF. DR. VICENTE CORREA COSTA

Curso: Ingeniería Mecánica

Área de Concentración: Proceso e Fabricación

Disertación de Maestrado en Ingeniería y Tecnología a cargo de Don Saúl Viveros
Instituto de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Universidad de Costa Rica
Área de Ingeniería Mecánica

Fecha: 2001

Almuerzo - BR 120

DEDICATÓRIA

Aos meus pais que nos momentos mais difíceis me socorreram com amor e compreensão.

A minha esposa e filho pela compreensão e por serem um marco de referência no meu viver.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por nos ter dado o dom da inteligência para vencermos mais uma etapa de nossas vidas e a minha família que sempre me apoiou nos momentos mais difíceis.

Ao Prof Dr. Necesio Gomes Costa, pelo apoio e orientação no decorrer deste trabalho.

Ao técnico do laboratório de Metalurgia e Materiais da EFEI Toninho (Antonio Benedito da Silva), pela ajuda prestada durante a realização dos experimentos.

A Rita Jacon (Unicamp-Dema) pela caracterização das amostras, ao Doutor Arnaldo R. Santos Jr. (Dept Biologia Celular-Unicamp) pela realização dos testes in vitro, a Prof. Dra Cecília Zavaglia (Unicamp-Dema) pelo apoio e orientação e a todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

RESUMO

NEVES, EDMAR DOS SANTOS – Morfologia de Recobrimentos Cerâmicos e Cultura de Células Osteoblastas para Aplicações Clínicas.

Dissertação de Mestrado, 2001 – Escola Federal de Engenharia de Itajubá

Componentes femurais de próteses de quadril e implantes dentários, fabricados a partir de ligas metálicas, devem ser revestidos com materiais cerâmicos. Atualmente, o processo empregado para produzir estes revestimentos é o plasma spray. Entretanto, os implantes fabricados por essa técnica não apresentam grande confiabilidade nos resultados. Isto se deve a má aderência entre a camada depositada e a liga metálica e a exposição do pó cerâmico a altas temperaturas envolvidas no processo de recobrimento, que pode causar alterações na estrutura da cerâmica, levando a falhas nos dispositivos implantados.

Outras técnicas, tais como a metalurgia do pó e aspersão térmica podem apresentar grande potencial para aplicações clínicas, pois estes métodos permitem o controle da espessura da camada depositada e as temperaturas envolvidas preservam as características originais da cerâmica sintetizada.

O presente trabalho tem como objetivo produzir revestimentos cerâmicos de hidroxiapatita, alumina, óxido de zircônio, óxido de cromo e hidroxiapatita com proporções em peso de pó de aço inoxidável AISI 316L. Os revestimentos foram obtidos pelas técnicas de sinterização e aspersão térmica. A caracterização do recobrimento, a citotoxicidade e a adesão de células osteoblastas na superfície foram realizadas neste trabalho via a Microscopia Ótica, Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada a sistema de Análise de Energia Dispersiva e pelo Teste de Absorbância.

A morfologia dos revestimentos acusou a presença de poros na sua superfície para os diversos revestimentos obtidos; sendo que este resultado indica o favorecimento da adesão celular. Para os ensaios de adesão celular observou-se que todas as amostras estudadas mostraram uma menor adesividade em relação aos controles positivos utilizados (polipropileno). Os ensaios de cultura de células osteoblastas mostraram que os revestimentos não apresentam citotoxicidade e o revestimento de hidroxiapatita foi aquele que melhor se comportou quanto à formação de osteócitos.

Palavras-chaves: Sinterização, biomateriais, hidroxiapatita, adesão celular, citotoxicidade.

ABSTRACT

NEVES, EDMAR DOS SANTOS – Ceramics Coatings Morphology and Osteoblasts Cells Culture for Clinical Applications.

Master Dissutation, 2001 – Escola Federal de Engenharia de Itajubá.

Hip prosthesis devices and dental implants, which are made of metallic alloy, need to be partially coated by a ceramic material. Nowadays, the used process to produce these coating is the plasma spray technique. However, the coating produced by this technique is not reliable regards to the results after implanting. This is due to the poor adherence between the deposited layer and the metallic substrate, besides the high temperature involved in the plasma spray technique can cause microstructure changes, which can lead to failure of the implant devices.

Other techniques such as sintering and thermal aspersion can present great coating potential for clinical application. Sintering technique permits to control the porosity of the deposited layer and the temperature involved does not cause micro structural changes, preserving the characteristics of the synthesised ceramic.

The aim of this work is to produce ceramics coating of hydroxyapatite, hydroxyapatite mixed with stainless steel AISI 316L, alumina and zirconium oxide. The coatings were produced by sintering and thermal aspersion technics. The coating characterization, the cytotoxicity and osteoblast cells adhesion were carried out using the following techniques Scanning Electron Microscopy-EDS, Optical Microscopy and Absorbance Test.

The morphology of all coating presented porous; which can be interpreted as favouring for cell adhesion. The cell adhesion tests showed that for all samples studied there was a smaller adhesion regards to the positive control used (polypropylene). The osteoblast cells culture showed that the hydroxyapatite coating was the one that formed more osteocites.

Keywords: Sintering, biomaterials, hydroxyapatite, citotoxicity, cells adhesion.

ÍNDICE

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Abreviações

CAPÍTULO 1

1 - Introdução 1

CAPÍTULO 2

2. - Revisão Bibliográfica 3
2.1 - Cultura de Células 3
2.2 - Biomaterias 7
2.3 - Características dos implantes de prótese de quadril 9
2.4 - Métodos de recobrimento 11
2.4.1 - Rokide 11
2.4.2 - Método por metalurgia do pó 13

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Materiais 17
3.1.1 - Hidroxiapatita (HA) 17
3.1.2 - Substrato metálico 17
3.1.3 - Pó de aço inoxidável AISI 316L 18
3.1.4 - Álcool etílico 19
3.1.5 - Parafina 19
3.1.6 - Alumina 19
3.2 - Materiais permanentes 19
3.3 - Metodologia 20
3.3.1 - Avaliação da rugosidade dos substratos metálicos 20
3.3.2 - Cálculo da pressão de compactação 20

3.3.3 - Compactação das amostras	20
3.3.4 - Sinterização dos corpos de prova	22
3.3.5 - Métodos de caracterização	26
3.3.6 - Cultura de células	28

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Microscopia Ótica (MO)	30
4.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	35
4.3 - Análise de Energia Dispersiva (MEV-AED)	40
4.4 - Cultura Celular	46
4.4.1 - Adesão celular	46
4.4.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura das células osteoblásticas sobre os diferentes substratos de aço inoxidável 316L com 24 h de cultura	47

CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES

SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

BIBLIOGRAFIA

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estágios para a formação do osso	7
Figura 2.2 - Descrição das principais partes de um quadril	9
Figura 2.3 - Componentes de uma prótese de quadril	10
Figura 2.4 - Haste femural com revestimento de HA	11
Figura 2.5 - Sistema ROKIDE	11
Figura 3.1 - Forno de sinterização e acessórios	24
Figura 3.2 - Vista do interior do tubo	24
Figura 3.3 - Cadinho para sinterização	24
Figura 3.4 - Curva de sinterização para temperatura de 1250°C	25
Figura 3.5 - Curva de sinterização para temperatura de 1350°C	25
Figura 3.6 - Corpos de prova após sinterização	29
Figura 3.7 - Substrato jateado e corpos de prova após recobrimento por Rokide	29
Figura 4.1 - Pó de HA (a) Ampliação de 160x, granulometria variando de 10 a 20 μm e (b) Ampliação de 160x e entre 20 a 32 μm , conforme barras de divisão micrométricas. (c) e (d) Ampliação de 320x, porosidade da HA	30
Figura 4.2 - Pó de aço inoxidável 316L	31
Figura 4.3 - Superfície do corpo de prova após a compactação	31
Figura 4.4 - Morfologia do revestimento, em (a) e (b) compactado de HA com granulometria de 10 a 20 μm e temperaturas de sinterização de 1250°C e 1350°C respectivamente. Para (c) e (d) temos uma mistura de HA com granulometria entre 10 e 20 μm e aço inoxidável 316L entre 20 e 32 μm . A porcentagem em peso é 20% de aço inoxidável e o restante de HA	32
Figura 4.5 - Micrografias de corpos de prova em corte transversal: cp 02 (Figuras a; b) e cp 09 (Figuras c; d) foram sinterizados com HA, cp 16 (Figuras e; f) e cp 18 (Figuras g; h) foram sinterizados com a mistura dos pós de aço inoxidável 316L e HA	34
Figura 4.6 - Micrografias do corpo de prova 02 que foi sinterizado a 1250°C com HA na granulometria de 10 a 20 μm	36
Figura 4.7 - Micrografias do corpo de prova 06 que foi sinterizado a 1350°C com HA na granulometria de 10 a 20 μm	36

Figura 4.8 - Micrografias do corpo de prova 09 que foi sinterizado a 1350°C com HA na granulometria de 20 a 32 µm	37
Figura 4.9 - Micrografias do corpo de prova 12 que foi sinterizado a 1350°C com HA na granulometria de 20 a 32 µm	37
Figura 4.10 - Micrografias do corpo de prova 13 que foi sinterizado a 1350°C com pó de HA e 20% em peso de pó de aço inoxidável AISI 316L na mistura. As granulometrias são de 20 a 32 µm	37
Figura 4.11 - Micrografias do corpo de prova 16 que foi sinterizado a 1350°C com pó de HA e 33% em peso de pó de aço inoxidável AISI 316L na mistura. As granulometrias são de 20 a 32 µm	38
Figura 4.12 - Micrografia do substrato de aço inoxidável AISI 316L para recobrimento	38
Figura 4.13 - Micrografia da superfície do corpo de prova recoberto com alumina pela técnica de Rokide	38
Figura 4.14 - Micrografia da superfície do corpo de prova recoberto com zirconia pela técnica de Rokide	39
Figura 4.15 - Micrografia da superfície do corpo de prova recoberto com óxido de cromo pela técnica de Rokide	39
Figura 4.16 - Percentual em peso dos elementos químicos da superfície do corpo de prova 02 (barras em azul)	41
Figura 4.17 - Percentual em peso dos elementos químicos da superfície do corpo de prova 06 (barras em azul)	42
Figura 4.18 - Percentual em peso dos elementos químicos da superfície do corpo de prova 09 (barras em azul)	43
Figura 4.19 - Percentual em peso dos elementos químicos da superfície do corpo de prova 12 (barras em azul)	44
Figura 4.20 - Adesão de células osteoblásticas ao substratos de aço inoxidável 316L sem e com diferentes recobrimentos	47
Figura 4.21 - Células osteoblásticas cultivadas sobre: (A) vidro; (B) aço inoxidável 316L; (C) e (D) aço inoxidável 316L recoberto com hidroxiapatita; (E) aço inoxidável 316L recoberto com alumina; (F) aço inoxidável 316L recoberto com óxido de cromo; (G) aço inoxidável 316L recoberto com zircônia; (H) o substrato jateado	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição percentual em peso para cada tipo de bastão cerâmico	12
Tabela 2.2 - Aplicações típicas do processo de ROKIDE	13
Tabela 3.1 - Composição química do aço inoxidável AISI 316L	18
Tabela 3.2.a - Corpo de prova com a especificação do peso dos pós de HA e aço inoxidável AISI 316L e temperatura para sinterização	21
Tabela 3.2.b - Corpo de prova com a especificação do peso dos pós de HA e aço inoxidável AISI 316L e temperatura para sinterização	21
Tabela 3.2.c - Corpo de prova com a especificação do peso dos pós de HA e aço inoxidável AISI 316L e temperatura para sinterização	22
Tabela 4.1 - Valores obtidos para as micro-regiões selecionadas do corpo de prova 02	41
Tabela 4.2 - Valores obtidos para as micro-regiões selecionadas do corpo de prova 06	42
Tabela 4.3 - Valores obtidos para as micro-regiões selecionadas do corpo de prova 09	43
Tabela 4.4 - Valores obtidos para as micro-regiões selecionadas do corpo de prova 12	44
Tabela 4.5 - Difusão da HA no substrato de aço inoxidável 316L do corpo de prova 10 sinterizado somente com pó de HA	45
Tabela 4.6 - Difusão da HA no substrato do corpo de prova 16 com 33% em peso de pó de aço inoxidável 316L	45
Tabela 4.7 - Absorbância das diferentes amostras estudadas no ensaio de adesão celular	46

ABREVIACOES

EFEI - Escola Federal de Engenharia de Itajubá

UNICAMP - Universidade Estadual de Campinas

MEV - Microscópio Eletrônico de Varredura

MO - Microscópio ptico

AED - Análise de Energia Dispersiva

EA - Elétrons absorvidos

ER - Elétrons retroespalhados

ES - Elétrons secundários

AISI - American Iron and Steel Institute

ASTM - American Standard Testing Materials

UHMW - Ultra High Molecular Weight

B - Boro

C - Carbono

Co - Cobalto

Cr - Cromo

Fe - Ferro

Mn - Manganês

Mo - Molibdênio

Nb - Nióbio

Ni - Níquel

Si - Silício

Ti - Titânio

W - Tungstnio

Zr - Zircônio

Al₂O₃ - alumina

CaO - xido de cálcio

Cr₂O₃ - xido de cromo

Fe₂O₃ - xido de ferro

HA - hidroxiapatita

MgO - xido de magnésio

SiO₂ - xido de silício

CAPÍTULO 1

1 - INTRODUÇÃO

Os biomateriais, de um modo geral, podem ser classificados como bioestáveis ou permanentes e bioabsorvíveis ou temporários (TÖRMÄLÄ *et al.*, 1998). Os dispositivos bioestáveis ou permanentes têm como objetivo a substituição de um tecido lesado por tempo indeterminado. Dessa forma, esses materiais são produzidos de modo a reter as suas características mecânicas e propriedades químicas por longos períodos (TÖRMÄLÄ *et al.*, 1998). Esses dispositivos são comumente empregados como próteses em articulações danificadas ou em ossos, seja para a fixação ou substituição de grandes porções ósseas. Por outro lado, existem os dispositivos bioabsorvíveis ou temporários, que são compostos que naturalmente se degradam tanto *in vitro* quanto *in vivo* (TÖRMÄLÄ *et al.*, 1998). Para ambos os tipos de materiais citados, uma vez que o objetivo geral é a restauração da funcionabilidade ou substituição do tecidos danificados, é de extrema importância a compreensão das interações das células com os biomateriais no padrão de adesão e crescimento celular (LANGER e VACANTI, 1993; HENCH, 1998).

A biocompatibilidade de um material está associada à reação que o organismo apresenta quando em presença do implante, como também à reação do implante em relação ao contato com o organismo. Um material pode ser descrito como biocompatível quando ele não afetar, de maneira prejudicial, o organismo e nem sofre alterações em suas características por estar em contato com o mesmo organismo.

Devido ao desenvolvimento tecnológico da metalurgia, com o preparo de ligas metálicas especiais que reduziram as reações orgânicas ao metal, tornou-se possível a idéia da síntese óssea proposta no século passado, em 1850. Os materiais metálicos de síntese óssea oxidavam em contato com os eletrólitos do corpo humano, levando à reação do corpo estranho e a infecções. A primeira necessidade era a de reduzir a infecção, que freqüentemente acompanhava essas tentativas. Posteriormente, buscou-se um melhor desempenho a longo prazo. Pode-se considerar a década de 60 como o início da era moderna em *Biomateriais*, devido a várias descobertas e ao aprimoramento da metalurgia (REIS, 1998).

O revestimento de ligas metálicas por plasma spray com hidroxiapatita tem sido feito para aplicações em componentes femurais de próteses de quadril e implantes

dentários. Entretanto, os implantes fabricados por essa técnica, não apresentam ainda grande confiabilidade nos resultados, pois a aderência da camada depositada apresenta-se inferior à necessária. Além disso, a exposição da HA a altas temperaturas envolvidas no processo de recobrimento, causa alterações na estrutura da cerâmica pura, e normalmente α -fosfato tricálcio, β -fosfato tricálcio, óxido de cálcio e, também, fosfato tetracálcio estão presentes na fase amorfa e na camada final em adição a HA. A inadequada estabilidade biomecânica, causada pela adição dessas fases, resulta em um aumento na taxa de degradação da camada cerâmica, fazendo com que a mesma perca suas características em torno de um ano (GOTTLANDER *et al.*, 1997).

A cultura de células constitui uma ferramenta extremamente útil para a avaliação biológica de biomateriais, seja para determinar sua possível toxicidade ou a influência destes no processo de adesão, crescimento e diferenciação celular, objetivando uma melhor performance destes compostos em animais. Tendo em vista que os testes *in vivo*, embora indispensáveis, apresentam custo elevado, o teste *in vitro* é recomendado principalmente quando se tem um grande número de amostras que necessitam ser analisadas, permitindo que se faça uma pré-seleção rápida de materiais os quais serão posteriormente avaliados em animais de experimentação.

Este trabalho tem por objetivo um estudo comparativo entre os recobrimentos de hidroxiapatita, alumina, zirconia e óxido de cromo depositados por sinterização (a hidroxiapatita) e aspensão térmica (as outras cerâmicas) em um substrato de aço inoxidável AISI 316L com relação à citotoxicidade, adesão celular e morfologia do recobrimento e de células osteoblastas.

CAPÍTULO 2

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A ciência dos biomateriais é uma área multidisciplinar. Seu objetivo geral é, não apenas o desenvolvimento de compostos a serem utilizados como substitutos de tecidos danificados, mas também o entendimento das interações desses materiais com o organismo receptor. Isso tem levado diferentes pesquisadores, entre eles médicos, engenheiros, químicos e biólogos, à criação e ao aperfeiçoamento de dispositivos que sejam biocompatíveis, funcionais e duráveis que, quando implantados cirurgicamente, possibilitem uma melhoria na qualidade de vida dos pacientes que os utilizem.

Durante séculos, lesões teciduais, originadas de traumas mecânicos ou de doenças degenerativas entre outras, sempre trouxeram problemas aos médicos em função dos poucos recursos terapêuticos disponíveis. A remoção da porção injuriada era a prática mais comumente utilizada, o que por sua vez trazia uma série de limitações aos portadores daquela dada enfermidade. A extração de grandes porções de tecidos levava a um significativo decréscimo da qualidade de vida do paciente e, assim, a substituição de porções corpóreas danificadas tornou-se um objetivo desde tempos remotos. Com o aumento da expectativa de vida do ser humano obtida com o descobrimento dos antibióticos e dos quimioterápicos, além da melhoria das condições sanitárias e de higiene nas populações humanas, a busca por metodologias para a substituição de tecidos lesados tornou-se uma necessidade.

2.1 - CULTURA DE CÉLULAS

Inicialmente, os biomateriais eram desenvolvidos para que permanecessem inertes no organismo. Sendo assim, os estudos visavam em como prevenir ou minimizar as reações teciduais indesejáveis, tais como a inflamação. Embora tais abordagens continuem sendo de grande importância, atualmente os novos dispositivos são concebidos para que haja uma efetiva interação com as células, provocando respostas fisiológicas como crescimento e/ou diferenciação no sítio de implantação (HUBBELL, 1995). Nas últimas décadas, avanços significativos foram obtidos no entendimento dos mecanismos de interação das células animais com o seu ambiente natural, a matriz extracelular

(HUBBELL, 1997). Esse conhecimento vem sendo utilizado para o desenvolvimento de materiais que possam mimetizar as características da matriz extracelular, exercendo assim um papel ativo na restauração tecidual.

Por volta da década de sessenta, existiam dois procedimentos que visavam suprir a falta de alternativas clínicas à substituição de tecidos e órgãos danificados: os *transplantes* e os *implantes*. Em relação aos transplantes, os tecidos ou órgãos podiam ser obtidos de doadores vivos, caso do coração ou rins, ou de cadáveres, como no caso de ossos liofilizados e congelados. Em ambos os casos, para utilização dos mesmos, torna-se necessário a utilização de drogas imunossupressoras, para evitar a rejeição dos órgãos, e de outros medicamentos que neutralizem a possível contaminação microbiana e viral (HENCH, 1998). Além disso, os transplantes têm a desvantagem de trazer uma série de questões éticas e até mesmo religiosas. Por outro lado, dispositivos desenvolvidos para servirem como implantes, além de não apresentarem vários dos problemas referidos acima, são desenvolvidos para atuarem na interface com os tecidos receptores no organismo interagindo com eles. Estes dispositivos concebidos para serem implantados são atualmente conhecidos hoje como *biomateriais* (HUBBELL, 1995; HENCH, 1998).

O primeiro passo para uma boa integração entre células e tecidos, e um dado material produzido para servir como implante, é a capacidade que este apresenta em interagir com as células. A adesão celular é a forma pela qual a célula interage com os diferentes componentes que a rodeiam. Em superfícies sintéticas, a adesão celular é conseqüência direta da adsorção de proteínas ao substrato.

Devido a normatização internacional dos ensaios para a avaliação biológica dos biomateriais (ISO 10993-5, 1992; KIRKPATRICK, 1992), torna-se necessário comparar a receptividade de uma dada superfície com substratos que sejam reconhecidamente estimuladores da adesão celular (controle +) e que sejam inibidores da mesma (controle -) em um dado tempo. Após a adesão ter se completado, muitas células entram em divisão de modo a alterar o seu número sobre a superfície a qual se encontram. Para excluir essa variável, limita-se o tempo de incubação dos ensaios em 2h, tempo esse onde não se observa qualquer sinal de proliferação celular.

Em relação a morfologia celular, observamos que em cada amostra estudada as células apresentam um padrão estrutural diferente. *In vivo*, as células presentes nos diferentes tecidos estão em contato íntimo com seu ambiente natural, a matriz extracelular, com a qual interagem. As interações entre as células e a matriz extracelular são bidirecionais. Se por um lado as células são capazes de responder aos sinais presentes na

matriz e responder a eles através da alteração na sua morfologia e até de sua funcionabilidade; por outro lado, a célula é também capaz de modificar a matriz, seja promovendo sua renovação ou mesmo pela remodelação através da degradação e síntese de novos componentes. Esse tipo de complexo de interações é conhecido como reciprocidade dinâmica (LIN e BISSEL, 1993; HUBBELL, 1997). Desta forma, alterações na morfologia celular em razão de variações no substrato são esperadas.

O meio-ambiente biológico reage de várias maneiras em relação à corrosão dos produtos e aos íons resultantes da ação eletrolítica.

O tecido responde aos produtos da corrosão metálica com um processo inflamatório. A mínima reação consiste da formação de poucas camadas de tecido fibroso relativamente avascular, entre o implante e o osso normal ou partes moles. Uma reação mais intensa, em que a corrosão no implante é mais pronunciada, consiste de um aumento no espessamento da barreira do tecido fibroso (fibras alongadas). Os fagócitos (células que ingerem material estranho) englobam as partículas metálicas. O tecido fibroso é vascularizado aumentado e se estende para restabelecer o tecido normal circunvizinho. (TUREK, 1991).

O osso reage de duas maneiras. Uma corrosão intensa causa "lise" óssea, de modo que o implante fica frouxo. Um processo inflamatório se forma sobre o implante e ocorre uma osteomielite química. Esta reação pode ser pouco intensa causando pouca esclerose (endurecimento de tecido) óssea para envolver o implante.

A remodelação do osso também ocorre em resposta a estresses físicos ou à ausência deles, assim o osso é depositado nos sítios sujeitos a estresse e reabsorvido onde este ocorre menos. Tal fenômeno é geralmente chamado de lei de Wolff e é exemplificado pelo notável engrossamento da cortical óssea no lado côncavo de um osso curvo, assim como pelo alinhamento dos sistemas trabeculares ao longo das linhas de suporte de peso na arquitetura interna da extremidade superior do fêmur (SALTER, 1985).

Vários fatores são capazes de modular a morfologia celular *in vitro*. FOLKMAN e MOSCONA (1978), mostraram em relatos clássicos que células cultivadas em superfícies de poli (hidroxi-etil-meta-acrilato) ou PHEMA apresentavam variações na sua morfologia conforme a concentração do polímero utilizado. Nestas condições, a forma da célula variou do arredondado ao bem espalhado, sugerindo que a adesividade da superfície, bem como suas características químicas foram capazes de influenciar a morfologia e crescimento das células. Resultados semelhantes podem ser obtidos com outros tipos de variações nos materiais empregados. Células fibroblásticas, por exemplo, podem ter a sua morfologia

alterada do achatado ao bem espalhado em superfícies de pHEMA que variaram não a concentração do monômero mas sim, as cargas elétricas superficiais e a hidrofiliabilidade do polímero (LOMBELLO *et al.*, 2000a, 2000b). A própria textura e topografia da superfície a qual as células são cultivadas também podem promover alteração na morfologia celular. Células fibroblásticas cultivadas em membranas de PLLA podem também crescer de forma arredondada (ZOPPI *et al.*, 1999), achatada ou ainda alongada (SANTOS *et al.*, 2001) dependendo se elas crescem em superfícies lisas ou porosas. O próprio diâmetro dos poros onde as células crescem parece também influenciar de forma marcante a morfologia celular (SANTOS *et al.*, 2001).

Nas últimas décadas, avanços significativos foram obtidos no entendimento dos mecanismos de interação das células animais com o seu ambiente natural, a matriz extracelular (HUBBELL, 1997). Por outro lado, tendo-se em vista a avaliação biomédica destes materiais, tem sido propostas simulações biomecânicas, testes *in vitro* para a avaliação de citotoxicidade e da biofuncionabilidade destes compostos (KIRKPATRICK, 1992; KIRKPATRICK *et al.*, 1998). Concomitantemente, implantes destes biomateriais em animais de experimentação têm sido feitos com o objetivo de se avaliar a biocompatibilidade e a bioperformance destes materiais.

Com o desenvolvimento metodológico aplicado a engenharia de tecidos, novos procedimentos passaram a ser utilizados na restauração óssea. O transplante de células isoladas e cultivadas em polímeros biodegradáveis de poli(L-ácido láctico) [PLLA] e poli(L-ácido glicólico) [PGA] vem sendo investigado experimentalmente (LANGER e VACANTI, 1993). Células osteoblásticas cultivadas em filmes de PLLA e PGA mostraram um padrão de crescimento e proliferação bastante satisfatórios sobre os substratos. Além disso, as células sobre estes polímeros demonstraram a manutenção de características biológicas compatíveis com as dos osteoblastos *in vivo* (ISHAUG *et al.*, 1994). Resultados similares foram obtidos cultivando-se osteoblastos em suportes tridimensionais de PLGA. Neste caso, foi observado ainda a mineralização da matriz óssea produzida (ISHAUG *et al.*, 1997; ISHAUG-RILEY *et al.*, 1998). Interessante ressaltar que mesmo células obtidas de medula óssea quando cultivadas em membranas porosas de PLGA e implantadas no interior de ratos foram capazes de iniciar a formação ectópica (fora do sítio original) de tecido ósseo (ISHAUG-RILEY *et al.*, 1997). No entanto, no caso de pessoas que perderam grandes extensões de massa óssea, sobretudo próximas às articulações, o uso de materiais bioabsorvíveis é bastante limitado e a utilização de compostos bioestáveis passa a ser uma necessidade.

2.2 - BIOMATERIAIS

As células são a matéria-prima do osso, pois são elas que se agrupam de maneira a formar essa estrutura complexa. A Figura 2.1 mostra os estágios para a formação do osso:

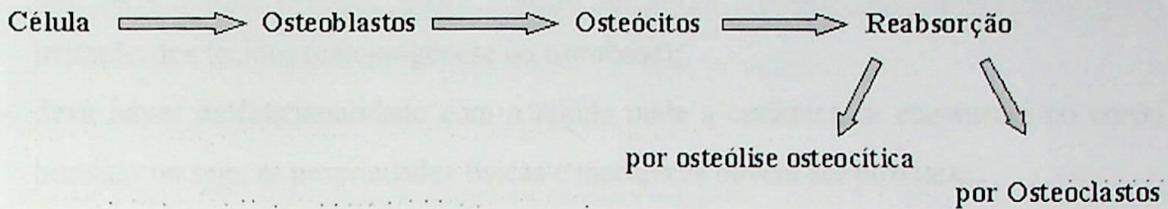


Figura 2.1 - Estágios para a formação do osso.

Os estágios para a formação do osso são caracterizados em:

- 1) **OSTEOBLASTOS**: produtores da parte orgânica da matriz, produzem colágeno que são capazes de concentrar fosfato e cálcio, sendo que o osso não calcificado é o Osteóide;
- 2) **OSTEÓCITOS**: situam-se na cavidade ou lacunas no interior da matriz óssea (um em cada lacuna) são células achatadas, essenciais para a manutenção da matriz óssea (matriz óssea é formada por células de material intercelular calcificado);
- 3) **OSTEOCLASTOS**: células gigantes, móveis e multinucleadas, que reabsorvem o tecido ósseo, participa do processo de remodelação dos ossos.

A parte inorgânica representa cerca de 50% do peso da matriz óssea. Os íons mais encontrados são o fosfato e o cálcio, e pouco de bicarbonato, magnésio, potássio, sódio e citrato em pequena quantidade.

O cálcio e o fósforo formam cristais onde estudos de Difração de Raios X mostram ter uma estrutura denominada de HIDROXIAPATITA (HA), com composição química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Nas Micrografias Eletrônicas, os cristais de hidroxiapatita aparecem sob a forma de tabletes alongados medindo 40x25x3 nm. Esses cristais se arranjam ao longo das fibrilas colágenas e são envolvidas por substância fundamental amorfa.

A associação de hidroxiapatita com fibras colágenas é responsável pela dureza e resistência característica do tecido ósseo.

As biocerâmicas, em especial a hidroxiapatita, apresentam excelente biocompatibilidade quando utilizadas como material protético. Estas podem ser classificadas como bionertes ou bioativas¹. A HA é uma cerâmica de grande interesse, pois esta é bioativa. Para que as cerâmicas possam ser utilizadas no corpo humano, as seguintes condições precisam ser satisfeitas (GROOT, 1991):

- a- não deve surgir nenhum efeito danoso ao corpo humano, exemplos: toxicidade, irritação dos tecidos (carcinogênese ou trombose);
- b- deve haver biofuncionalidade com a região onde a cerâmica se encontrará no corpo humano ou seja, as propriedades físicas e mecânicas devem ser próximas;
- c- deve haver forte aderência com os ossos ou outros tecidos, a fim de evitar formação de debris resultantes de uma má aderência da camada de HA depositada por plasma spray, que passa a fazer parte da circulação sanguínea;
- d- não deve ocorrer fadiga estática (corrosão sob tensão) quando imersas em fluidos humanos;
- e- a resistência ao desgaste deve ser elevada e deve haver facilidade de fabricação.

Para a correta aplicação das ligas ferrosas exige-se um conhecimento adequado das suas características estruturais e mecânicas e dos fatores que podem afetá-las, desde os efeitos das condições de fabricação, dos elementos de ligas básica e da introdução de elementos de liga especiais, até os efeitos dos tratamentos térmicos a que são geralmente submetidas.

Por esses motivos, tanto o produtor como o consumidor devem estar a par dessas peculiaridades, com maior ou menor profundidade, dependendo do seu campo de atuação.

Principais matérias-primas para implantes ortopédicos e odontológicos:

- Aço inoxidável AISI 316 L;
- Aço Cr-Co-Mo;
- Polietileno UHMW - 1900;
- Titânio puro e ligas de titânio;
- Cerâmicas como óxidos de zircônia e alumina, HA.

1. materiais bionertes são aqueles que possuem pouco ou nenhuma reação com o corpo humano/materiais bioativos são aqueles que estimulam uma reação do tecido hospedeiro.

2.3 - CARACTERÍSTICAS DOS IMPLANTES DE PRÓTESE DE QUADRIL

Entende-se por implantes ortopédicos e odontológicos, qualquer dispositivo, sujeito a solicitações mecânicas, que seja colocado no interior do corpo humano e ali deixado por prazos variáveis ou permanentes.

Para um melhor entendimento dos aspectos que envolvem uma prótese de quadril, a Figura 2.2 apresenta uma região do quadril com as suas principais partes.

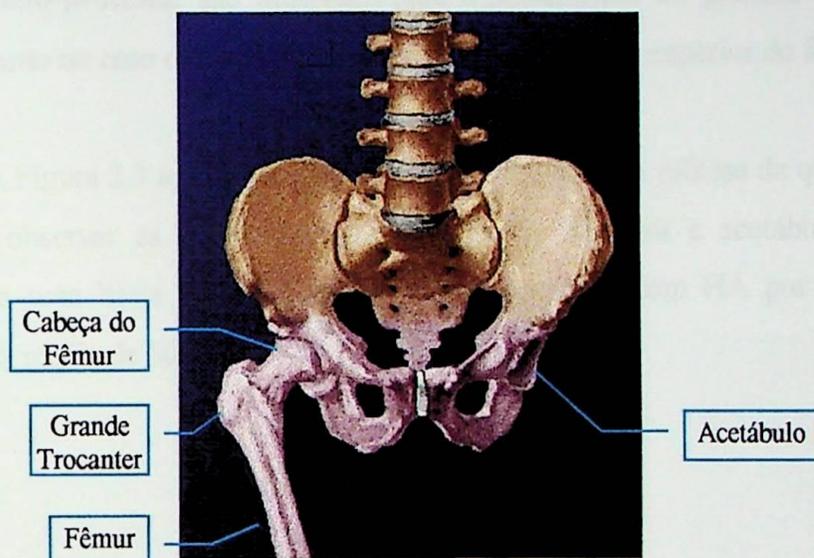


Figura 2.2 - Descrição das principais partes de um quadril.

A substituição da articulação do quadril é uma cirurgia denominada Artroplastia ou Prótese Total do Quadril. Esta cirurgia foi idealizada por ortopedistas para restabelecer a função da articulação coxo-femural (TUREK,1991). Muitas doenças degeneram esta articulação, sendo que as mais importantes são:

- Artrose de Quadril: doença degenerativa que destrói a articulação causando muita dor e limitação dos movimentos. A causa é desconhecida na maioria das vezes. Esta doença tem evolução lenta e progressiva.
- Fraturas do Colo do Fêmur: são fraturas que ocorrem geralmente em pessoas de idade avançada, com osteoporose, após uma queda. Normalmente, estas fraturas localizam-se abaixo da cabeça femoral, que é a parte superior do fêmur que se encaixa na bacia, num local denominado acetábulo.

Os principais tipos de prótese total de quadril são:

- **Prótese cimentada:** é a que usa cimento ortopédico para fixar o componente acetabular na bacia e a parte femural no fêmur. O acetábulo é manufaturado com polietileno de alta densidade e a parte femural é fabricada a partir de ligas metálicas.
- **Prótese não-cimentada:** é a que fixa suas partes (acetábulo e componente femural) diretamente na superfície óssea, sem a utilização de cimento.
- **Prótese híbrida:** o componente acetabular é fixado à bacia através de parafusos e o componente femural fixado com cimento ao fêmur.
- **Endo-próteses:** são utilizadas para a substituição de grandes segmentos ósseos, como no caso de um tumor que comprometa a parte superior do fêmur.

A Figura 2.3 apresenta alguns componentes de uma prótese de quadril. Nesta figura pode-se observar as formas variadas das hastes femurais e acetábulos. A Figura 2.4 apresenta uma haste femural, onde a região revestida com HA por plasma spray tem espessura média de 60 μm .

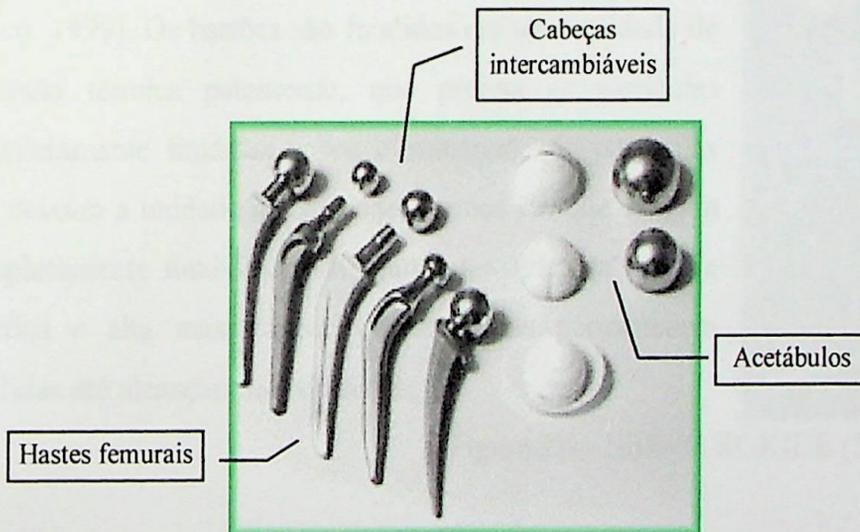


Figura 2.3 - Componentes de uma prótese de quadril.

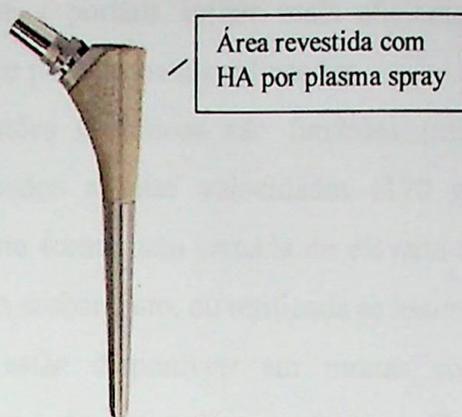


Figura 2.4 - Haste femural com revestimento de HA.

2.4 - MÉTODOS DE RECOBRIMENTO

2.4.1 - ROKIDE

O sistema ROKIDE de aspersão térmica utiliza bastões de óxidos cerâmicos para os revestimentos (Norton Pakco, 1999). Os bastões são fundidos em uma unidade de aspersão térmica patenteada, que projeta as partículas completamente fundidas sobre o substrato. As partículas não deixam a unidade de aspersão térmica até que estejam completamente fundidas. Estas partículas têm alta energia cinética e alta massa térmica, assim elas permanecem fundidas até alcançarem o substrato.



Figura 2.5 - Sistema ROKIDE (Norton Pakco, 1999)

Sistemas de aspersão térmica de pós, por outro lado, projetam pequenas partículas em um fluxo de gás quente, não havendo o tempo necessário que permita a todas as partículas de pó que se derretam completamente. Os revestimentos obtidos pelo sistema ROKIDE apresentam então, uma maior coesão entre as partículas. Tipicamente, utiliza-se revestimentos de ROKIDE, com espessuras de 0,03 mm até 1,6 mm.

O sistema de ROKIDE também custa menos na sua aquisição, instalação, operação e manutenção comparado ao plasma spray. O processo não requer água ou gases inertes. A manutenção pode ser feita na própria oficina, e normalmente não requer ajuda técnica

externa. O sistema de ROKIDE é portátil, utiliza mais eficientemente os materiais. O sistema também é fácil de montar para pequenas aplicações.

Neste processo, os bastões cerâmicos são fundidos (utilizando-se acetileno e oxigênio), atomizados e aplicados a altas velocidades (170 m.s^{-1}) sobre metal ou superfícies de não metálicas. Isto forma uma camada de elevada dureza e quimicamente inerte, que pode permanecer sem acabamento, ou retificada se assim o desejar.

Bastões de ROKIDE estão disponíveis em muitas composições de óxidos cerâmicos, para uma ampla gama de aplicações, conforme a Tabela 2.1. Além destes bastões, está disponível um kit de conversão, onde a pistola de ROKIDE pode ser adaptada para também aplicar cordões flexíveis.

Os bastões cerâmicos usados no processo de Rokide podem ser encontrados em diversos tipos de composições cerâmicas como apresentado na Tabela 2.1. A Tabela 2.2 apresenta as aplicações mais comuns para este processo.

Tabela 2.1 - Composição percentual em peso para cada tipo de bastão cerâmico (Norton Pakco, 1999).

	Al ₂ O ₃	SiO ₂	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	NaO ₂	CaO	Cr ₂ O ₃	ZrO ₂	MgO
Rokide A	98,38	0,78	0,05	0,01	0,30	0,14	-----	-----	0,34
Rokide MBA	99,74	0,04	0,09	0,03	0,06	0,03	-----	-----	0,01
Rokide AS	98,92	0,90	0,03	0,03	-----	0,10	-----	0,10	0,01
Rokide AZ/4	95,5	0,03	-----	-----	-----	0,11	-----	4,3	-----
Rokide UHPA	99,68	0,10	0,02	0,03	0,03	0,13	-----	-----	0,01
Rokide C	3,67	5,62	0,27	-----	-----	-----	90,33	-----	0,11
Rokide TC	3,2	8,4	0,78	0,16	0,28	1,3	82,9	-----	2,9
Rokide MBC	2,18	11,64	0,50	-----	-----	0,66	81,4	-----	3,62
Rokide Z	0,72	0,29	0,04	0,47	0,02	0,49	-----	97,91	0,06
Rokide EZ	2,3	2,9	0,08	0,41	0,02	4,1	-----	90,0	0,07
Rokide ZS	0,94	39,61	0,09	0,17	0,07	0,94	-----	57,78	0,40
Rokide MZ	0,45	0,36	0,08	0,26	-----	0,25	-----	77,50	21,10
Rokide MBAT	94,93	0,66	0,46	3,13	0,04	0,20	-----	0,13	0,45
Rokide MBAT	85-87	0,50	0,30	13-15	0,20	0,20	-----	-----	0,30
Rokide MBAT	58-60	0,50	0,30	40-42	0,20	0,20	-----	-----	0,30
Rokide MA	65,32	1,69	0,18	0,04	0,10	0,36	-----	0,01	32,31

Tabela 2.2 - Aplicações típicas do processo de ROKIDE (Norton Pakco, 1999).

Tipo de bastão	Material	Exemplos de Aplicação
ROKIDE A	Alumina	Isolamento elétrico
ROKIDE MBA	Alumina	Barreiras de reação em placas de grafite
ROKIDE AZ/4	Alumina/Zircônia	Medidor de deformação que operam sob temperaturas elevadas
ROKIDE HPA	Alumina	Aquecedores / Tubos de vácuo
ROKIDE C	Óxido de Cromo	Bombas de polpa / selos / polias / guias fio / pistões / camisas
ROKIDE TC	Óxido de Cromo	Selos Mecânicos
ROKIDE MBC	Óxido de Cromo	Camisas de bombas
ROKIDE Z	Zircônia	Cones de exaustão de foguetes
ROKIDE EZ	Zircônia	Matrizes de extrusão
ROKIDE ZS	Silicato de Zircônio	Selos Mecânicos
ROKIDE MZ	Zirconato de Magnésio	Barreiras de reação em caixas cerâmicas
ROKIDE MBAT 97/3	Alumina / Titânia	Peças de bombas
ROKIDE MBAT 87/13	Alumina / Titânia	Guias fio
ROKIDE MBAT 60/40	Alumina / Titânia	Placas de aquecedores- tratamento de fibras sintéticas
ROKIDE MA	Aluminato de Magnésio	Barreira de reação em Carbetos de Tungstênio

2.4.2 - MÉTODO POR METALURGIA DO PÓ

A importância adquirida pela metalurgia do pó na indústria moderna, fez-se mediante as vantagens que o processo apresenta em relação às técnicas metalúrgicas convencionais: produção de peças de metais refratários, obtenção de efeitos estruturais especiais (porosidade controlada), combinação de substâncias metálicas com materiais não-metálicos, obtenção de materiais onde os constituintes metálicos e não-metálicos continuam a conservar suas características físicas individuais, produção mais econômica de peças de grande precisão de forma e de dimensões. Outras vantagens do processo residem nos seguintes pontos: controle rigoroso da composição do material e eliminação, ou redução, ao mínimo das impurezas introduzidas pelos processos metalúrgicos convencionais, operação em atmosferas rigorosamente controladas ou em vácuo, redução ou eliminação das perdas de material ou produção de sucata, maior economia e rapidez de fabricação (CHIAVERINI, 1982).

As matérias-primas na metalurgia do pó são pós metálicos e não-metálicos, cujas características tecnológicas influem não só no comportamento do pó durante o seu processamento, como também nas qualidades finais do produto sinterizado.

As principais características dos pós são:

- Tamanho e distribuição das partículas (variam de 0,1 a 400 μm);
- Forma da partícula - depende do processo de obtenção do pó:
 - esférica – carbonila
 - gotas – atomização ou decomposição térmica
 - esponjoso – redução
 - dentrítica – eletrolítico
 - angular – moagem
- Porosidade das partículas;
- Composição química;
- Superfície específica; densidade aparente.

As técnicas de produção de pós são muito extensas e complexas e relacionadas com as propriedades físico-químicas do material a ser processado, além das propriedades a serem adquiridas pelas partículas do pó como por exemplo: o tamanho, a forma, a densidade, etc (CHIAVERINI, 1982; GOMES, 1995).

Na metalurgia do pó, a matéria prima é o fator mais importante e portanto a sua produção deve ser controlada sistematicamente, pois dela depende as propriedades do pó que devem ser conhecidas e determinadas com rigor.

Resumidamente, os métodos de fabricação dos pós podem ser agrupados nas seguintes classes:

- Processo de condensação e redução;
- Processo eletrolítico;
- Processo mecânico;
- Atomização de metais líquidos.

Geralmente, existem vários processos para a produção de um mesmo material e a técnica de fabricação mais adequada será determinada em relação ao tipo de aplicação, às propriedades e estruturas desejadas no produto final e aos custos envolvidos.

A compactação consiste na moldagem dos pós pela aplicação de pressão, no interior de matrizes, cujas cavidades correspondem a forma da peça a ser fabricada.

Esta operação visa também conferir ao compactado a verde, as dimensões finais especificadas, a resistência mecânica suficiente para ser manuseado e o contato necessário entre as partículas para facilitar a operação de sinterização.

A compactação está dividida em três estágios (GOMES, 1995):

1º estágio - Há um adensamento do pó, reduzindo o vazio entre as partículas, sem deformação das partículas e sem produzir adesão entre elas.

2º estágio - Com aumento da pressão haverá a deformação plástica das partículas. As partes mais finas de cada partícula sofrerão deformação ou quebra, que favorece o entrelaçamento dos grãos, produzindo uma espécie de "solda fria".

3º estágio - Com o aumento da compressão, o atrito do material contra as paredes da matriz e a fricção interna das partículas elevam a densidade do material aos valores desejados.

O uso e o controle da atmosfera de sinterização são obrigatórios devido a sua interação com o material em processo. O controle das reações químicas torna-se evidente, pois a maioria dos compactados a verde são porosos. Os gases da atmosfera de sinterização podem reagir com a superfície das peças, penetrando pela estrutura porosa, e reagir com o interior do compactado.

De modo geral a atmosfera de sinterização exerce as seguintes funções:

- Evitar ou minimizar as reações químicas (oxidação, carbonetação, descarbonetação, etc.) do pó, as quais podem inibir ou interferir no processo;
- Limpar e purificar o pó de impurezas, não só aquelas absorvidas na superfície como também filmes e elementos inclusos no volume, que podem difundir-se para a superfície e, conseqüentemente, evaporar;
- Fornecer um ou mais elementos químicos para se ligarem com o compactado.

No processo de sinterização sólida são empregados basicamente o hidrogênio, nitrogênio, argônio, hélio, ar ou vácuo. O hidrogênio é altamente redutor de óxido metálicos, muito inflamável, ótimo condutor e de fácil remoção das impurezas de oxigênio e vapor d'água. O nitrogênio não é redutor e se empregam misturas de hidrogênio-nitrogênio compostas de 75% de H₂ e 25% de N₂. O argônio e o hélio são atmosferas inertes (GOMES, 1995).

A sinterização é uma etapa da metalurgia do pó onde ocorre a interdifusão (transporte de matéria por ativação térmica) entre as partículas pelo aquecimento das peças

comprimidas. Para isso, temos condições controladas de tempo, temperatura e atmosfera do forno (CHIAVERINI, 1982; GOMES, 1995).

Existem muitas teorias a respeito do fenômeno de sinterização. Pode-se explicar tal fenômeno como sendo a adesão inicial das partículas, cujos pontos de contato aumentam com a temperatura sem que, nessa fase inicial, ocorra qualquer contração de volume e apenas com pequena influência na difusão superficial. À medida que a temperatura aumenta, ocorre um aumento de densidade, acompanhado de esferoidização e progressivo fechamento dos vazios. Por fim, mediante uma difusão nos contornos dos grãos, desaparecem os últimos vazios arredondados e isolados. Resumidamente, o processo de sinterização se baseia na ligação atômica entre superfícies de partículas vizinhas. Em função da temperatura e do tempo de sinterização, ocorrem também os fenômenos de recristalização e crescimento de grãos (CHIAVERINI, 1982; GOMES, 1995).

Os fornos de sinterização são a gás ou elétricos, por resistência ou por indução. As temperaturas de sinterização podem alcançar faixas de 1200°C a 3000°C. As atmosferas protetoras empregadas na sinterização podem ser: sob vácuo, hidrogênio, amônia dissociada, gás endotérmico, gás exotérmico e gás de gasogênio (CHIAVERINI, 1982; GOMES, 1995).

A sinterização tem por objetivo conferir ao compactado verde as ligações definitivas entre as partículas, de modo a produzir as propriedades finais.

A literatura tem apresentado as mais diversas formas de estruturas de materiais obtidos por metalurgia do pó. Esta mesma literatura vem confirmar a possibilidade do uso desta técnica para a sinterização de biomateriais (GOMES, 1995).

CAPÍTULO 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MATERIAIS

3.1.1 - HIDROXIAPATITA (HA)

A HA faz parte de um grupo de minerais chamados apatitas, possui a fórmula química $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, sendo um hidróxido fosfato de cálcio com concentração de Ca/P igual a 1,67. Esta cerâmica pode ser obtida mediante vários processos de síntese, porém para este trabalho usou-se a HA sintetizada no laboratório de química da EFEI através do Método de Via Úmida (SILVA, 2000). Esse método consiste em preparar duas soluções, uma contendo nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) dissolvido em água destilada e a outra solução contendo fosfato amônio bibásico ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), também dissolvido em água destilada. Após a preparação foi aquecida as soluções a uma temperatura de 70°C e manteve-se sob agitação. Em seguida acrescenta-se amônia (NH_4OH), até que o pH resultante das soluções seja próximo de 12. Mistura-se as soluções e utilizando um funil de Büchner com auxílio de uma trompa de vácuo, filtrou-se o precipitado formado. O material filtrado foi lavado com acetona e éter de petróleo. Após, foi levado a uma estufa para secagem a temperatura aproximada de 150°C por 30 min. Em seguida, o material obtido foi levado a uma mufla com a temperatura de 900°C por 50 min, sendo este procedimento correspondente ao processo de calcinação. Por fim, a HA sintetizada foi moída com um bastão cerâmico numa cuba.

Através de um peneiramento manual do pó de HA, foi obtido duas granulometrias principais, 10 a $20\ \mu\text{m}$ e 20 a $32\ \mu\text{m}$, que foram utilizadas nos experimentos.

3.1.2 - SUBSTRATO METÁLICO

Foram usinados cilindros de aço inoxidável AISI 316L com um diâmetro de 12 mm, que é o diâmetro da matriz de compactação, e depois cortados com 30 mm de comprimento.

São recomendados os seguintes requisitos metalúrgicos para o aço inoxidável AISI 316L:

- a estrutura do material deverá ser totalmente austenítica, não contendo regiões de ferrita;
- a composição química deverá ser conforme a Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Composição química do aço inoxidável AISI 316L fornecido pelo fabricante.

Obs: Todos os valores isolados referem-se a porcentagens máximas, quando não especificado o intervalo.

ELEMENTO	Percentual
Carbono	0,03
Manganês	2,00
Fósforo	0,025
Enxofre	0,005
Silício	1,00
Cromo	17,00-19,00
Níquel	12,00-14,00
Molibdênio	2,00-3,00
Nitrogênio	0,10
Cobre	0,50
Ferro	restante

O aço inoxidável AISI 316L é pouco sensível à corrosão intercrystalina. Por isso, é recomendado para aplicações sujeitas a permanências prolongadas na faixa de temperaturas entre 400°C e 900°C e que não possam ser submetidos a recozimento posterior.

3.1.3 - PÓ DE AÇO INOXIDÁVEL AISI 316L

Foi utilizado pó de aço inoxidável AISI 316L atomizado pela Metal Pó cuja composição química média fornecida pelo fabricante está apresentada na Tabela 3.1.

Através de uma seqüência de peneiras próprias para a classificação granulométrica, de 10 µm a 1000 µm, foi realizada a separação granulométrica do pó de aço inoxidável AISI 316L. Para a mistura com o pó de HA com granulometria de 20 µm a 32 µm, utilizou-se o pó de aço inoxidável AISI 316L na mesma granulometria.

3.1.4 - ÁLCOOL ETÍLICO

O álcool etílico foi usado para a limpeza da superfície onde o pó é compactado. A presença de gordura na superfície dificulta a sinterização, criando canais de passagem para a gordura evaporar e reduzindo o contato entre os pós e a base metálica.

3.1.5 - PARAFINA

A parafina foi usada para criar uma ligação inicial entre o pó e a base metálica. Esta parafina foi eliminada a aproximadamente 700°C, durante a fase de pré-sinterização.

3.1.6 - ALUMINA

A alumina, fornecida pela ALCOA, foi usada como interface entre a bandeja de sinterização e as bases metálicas, evitando assim que durante o manuseio, os substratos metálicos se deslizassem sobre a bandeja.

3.2 - MATERIAIS PERMANENTES

- Forno de sinterização: forno de resistências elétricas, marca: NABERTHERM
temperatura máxima de trabalho: 1750°C e programador para ciclos de sinterização
- Prensa para compactação: prensa hidráulica Hidro Phoenix uniaxial de controle manual de 10 toneladas
- Matrizes para compactação
- Jogo de peneiras e agitador
- Rugosímetro: marca Taylor-Hobson, modelo: Surtronic 3+, resolução: 0,1 µm
- Microscópio Eletrônico de Varredura com AED:
marca: JEOL, modelo: JXA-840 A
X-Ray Microanalysis System, marca: Tracon Northern - TN - 5500
- Microscópio ótico: Microscópio metalúrgico (luz refletida)
marca: ZEISS, modelo: MHP160
- Embutidora: marca Termopress da Panambra/Struers
- Balança eletrônica: marca Metler, resolução: 0,1 g
- Bomba de vácuo.



3.3 - METODOLOGIA

3.3.1 - AVALIAÇÃO DA RUGOSIDADE DOS SUBSTRATOS METÁLICOS

A medição qualitativa da rugosidade dos substratos foi realizada usando o rugosímetro. Inicialmente, posicionou-se a base no suporte do equipamento e varreu-se a superfície da amostra com o palpador; a leitura foi obtido diretamente no relógio digital. A rugosidade média (Ra) dos substratos foi de $0,39 \pm 0,03 \mu\text{m}$.

3.3.2 - CÁLCULO DA PRESSÃO DE COMPACTAÇÃO

A pressão de compactação foi calculada através da equação 3.1 que relaciona a pressão com a força da prensa e a área da peça compactada:

$$P = F / A \quad (3.1)$$

Para a compactação das amostras utilizou-se uma prensa hidráulica. A força de compactação foi de 2 toneladas e a área das amostras de $1,13 \text{ cm}^2$, resultando numa pressão de compactação de aproximadamente 176,0 MPa.

3.3.3 - COMPACTAÇÃO DAS AMOSTRAS

Após a pesagem do pó de HA e pó de aço inoxidável AISI 316L, colocou-se o substrato de aço inoxidável AISI 316L com uma fina camada de parafina na superfície, para auxiliar na adesão do pó, dentro da matriz de compactação. Em seguida foi depositado o pó de HA ou a mistura dos pós, conforme as Tabelas 3.2.a, 3.2.b e 3.2.c, dentro da cavidade da matriz e sobre a superfície do substrato com parafina. Colocou-se o punção na cavidade da matriz e realizou-se a compactação com 2 toneladas de força na prensa. A extração do substrato com o pó compactado é feito manualmente com a ajuda de um pino extrator.

Tabela 3.2.a - Corpo de prova com a especificação do peso dos pós de HA e aço inoxidável AISI 316L e temperatura para sinterização.

Corpo de prova	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10
Temperatura de sinterização (°C)	1250	1250	1250	1250	1350	1350	1250	1250	1350	1350
Peso de HA (g)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Granulometria de HA (µm)	10 a 20	20 a 32	20 a 32	20 a 32	20 a 32					
Peso de pó de aço inoxidável 316L (g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Granulometria do pó de aço inoxidável 316L (µm)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Peso total (g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Porcentagem em peso do pó de aço inoxidável na mistura	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabela 3.2.b - Corpo de prova com a especificação do peso dos pós de HA e aço inoxidável AISI 316L e temperatura para sinterização.

Corpo de prova	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Temperatura de sinterização (°C)	1350	1350	1350	1350	1350	1350	1350	1350	1350	1350
Peso de HA (g)	0,3	0,3	0,4	0,4	0,2	0,2	0,1	0,1	0,5	0,5
Granulometria de HA (µm)	20 a 32	10 a 20	10 a 20							
Peso de pó de aço inoxidável 316L (g)	-	-	0,1	0,1	0,1	0,1	0,4	0,4	-	-
Granulometria do pó de aço inoxidável 316L (µm)	-	-	20 a 32	-	-					
Peso total (g)	-	-	0,5	0,5	0,65	0,65	0,5	0,5	-	-
Porcentagem em peso do pó de aço inoxidável na mistura	-	-	20%	20%	33%	33%	80%	80%	-	-

Tabela 3.2.c - Corpo de prova com a especificação do peso dos pós de HA e aço inoxidável AISI 316L e temperatura para sinterização.

Corpo de prova	21	22	23	24	25	26	27
Temperatura de sinterização (°C)	1350	1350	1350	1350	1350	1350	1350
Peso de HA (g)	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Granulometria de HA (μm)	10 a 20						
Peso de pó de aço inoxidável 316L (g)	-	-	-	-	-	-	-
Granulometria do pó de aço inoxidável 316L (μm)	-	-	-	-	-	-	-
Peso total (g)	-	-	-	-	-	-	-
Porcentagem em peso do pó de aço inoxidável na mistura	-	-	-	-	-	-	-

3.3.4 - SINTERIZAÇÃO DOS CORPOS DE PROVA

Para a sinterização dos corpos de prova, foi utilizado um forno elétrico. Para os experimentos de sinterização, foi acoplado dentro deste forno um tubo de alumina, onde no interior do tubo fez-se vácuo e introduziu-se gás hidrogênio para o controle da atmosfera de sinterização. A temperatura máxima atingida pelo forno é de 1750°C. Durante a sinterização, manteve-se um fluxo de hidrogênio constante dentro do tubo, com a finalidade de manter uma atmosfera redutora dentro do tubo de alumina. A Figura 3.1 apresenta uma foto do forno e os equipamentos auxiliares.

O reator tubular comporta até seis corpos de prova, contudo em experimentos preliminares foi constatado que não há uma uniformidade de temperatura em todas as regiões. A uniformidade de temperatura ocorre somente na região dianteira do tubo onde pode-se sinterizar até dois corpos de prova por vez. As sinterizações foram realizadas em várias etapas.

Para a curva com temperatura de sinterização de 1250°C, Figura 3.2, os corpos de prova foram aquecidos até a temperatura de 300°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min, temperatura em que os corpos de prova foram mantidos durante 10 minutos, permitindo que fosse efetuado uma "lavagem" (troca dos gases contidos no tubo pelo hidrogênio) da atmosfera de sinterização com hidrogênio. Nesta temperatura realizou-se

uma purga do ambiente e o hidrogênio foi trocado 03 vezes, buscando-se manter a atmosfera de sinterização somente com o gás de hidrogênio.

Na segunda rampa, o aquecimento continuou a uma taxa de 10 °C/min até a temperatura de 1200°C. Na terceira rampa, a taxa de aquecimento foi de 5 °C/min até a temperatura de 1250°C, temperatura na qual os corpos de prova são mantidos durante 60 min.

Em seguida iniciou-se o resfriamento, quarta rampa, com uma taxa de resfriamento de 5 °C/min até a temperatura de 700°C. O resfriamento prosseguiu a uma taxa de resfriamento de 10 °C até a temperatura de 200°C onde o forno foi desligado e as corpos de prova resfriadas até a temperatura ambiente dentro do forno ainda com a mesma atmosfera de hidrogênio.

Para a curva com temperatura de sinterização de 1350°C, Figura 3.3, os corpos de prova foram aquecidos até a temperatura de 300°C a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, temperatura em que os corpos de prova foram mantidas durante 10 minutos, permitindo que fosse efetuado uma lavagem da atmosfera de sinterização com hidrogênio. Nesta temperatura realizou-se a purga do ambiente com hidrogênio.

Na segunda rampa, o aquecimento continuou a uma taxa de 10 °C/min até a temperatura de 1200°C. Na terceira rampa, a taxa de aquecimento foi de 5 °C/min até a temperatura de 1350°C, temperatura na qual os corpos de prova são mantidos durante 30 min.

Em seguida iniciou-se o resfriamento, quarta rampa, com uma taxa de resfriamento de 5 °C/min até a temperatura de 700°C. O resfriamento prosseguiu a uma taxa de resfriamento de 10°C até a temperatura de 200°C onde o forno foi desligado e as corpos de prova resfriadas até a temperatura ambiente dentro do forno ainda com a mesma atmosfera de hidrogênio.

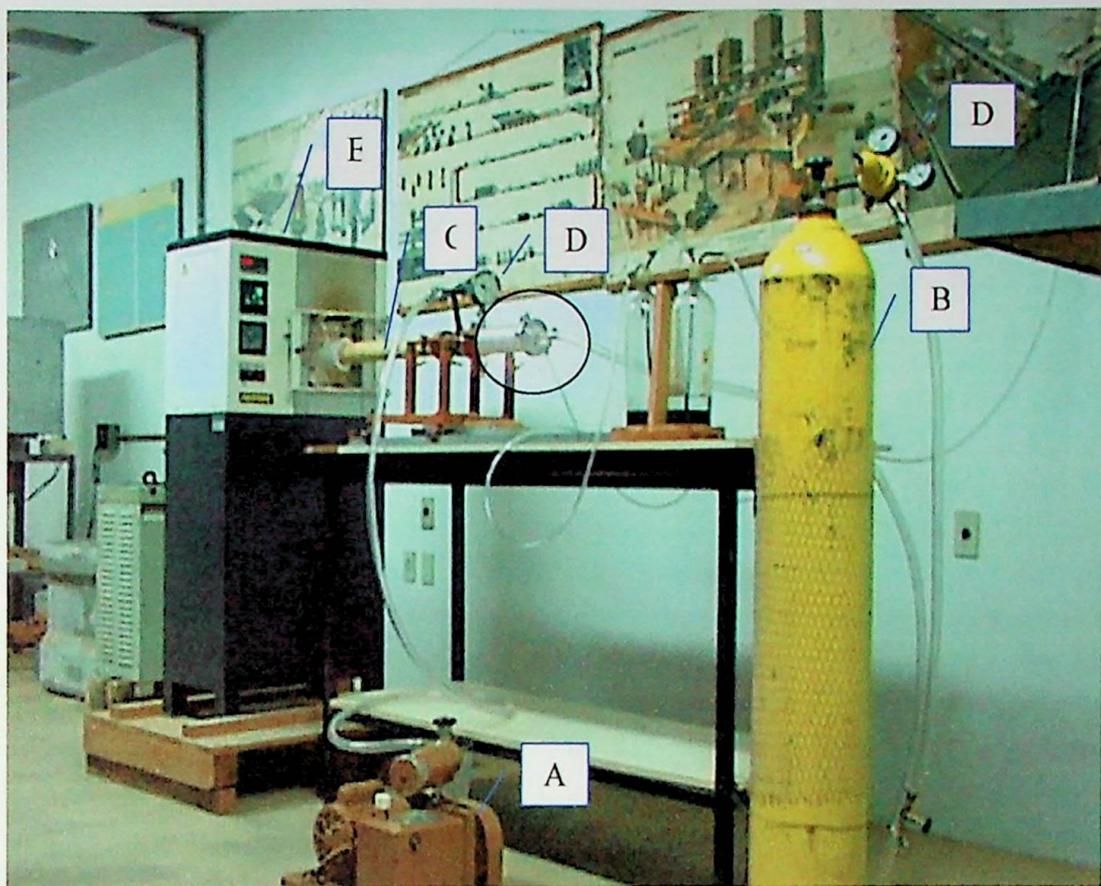


Figura 3.1 - Forno de sinterização e acessórios:

- A : Bomba de vácuo
- B : Cilindro de hidrogênio
- C : Tubo de sinterização
- D : Manômetros
- E : Forno.

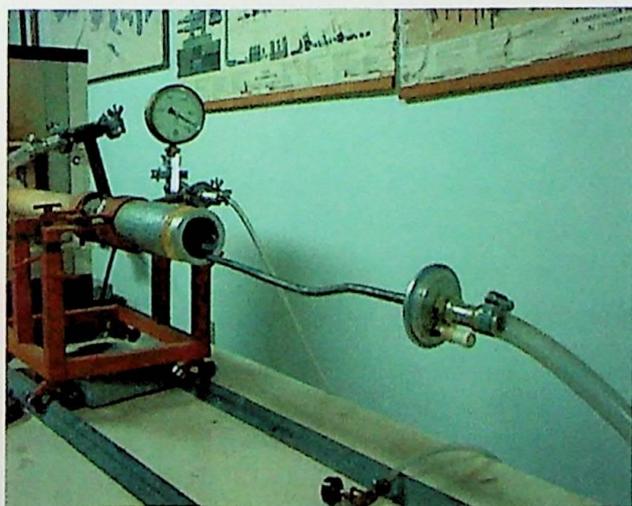


Figura 3.2 - Vista do interior do tubo.



Figura 3.3 - Cadinho para sinterização.

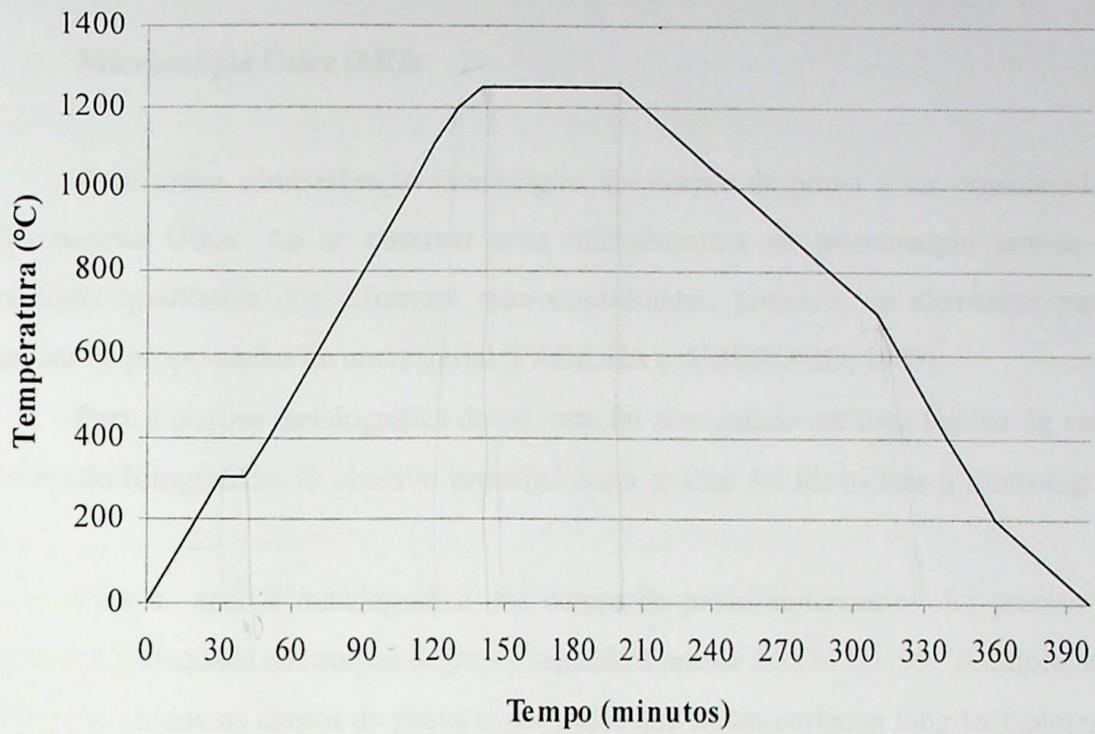


Figura 3.4 - Curva de sinterização para temperatura de 1250°C.

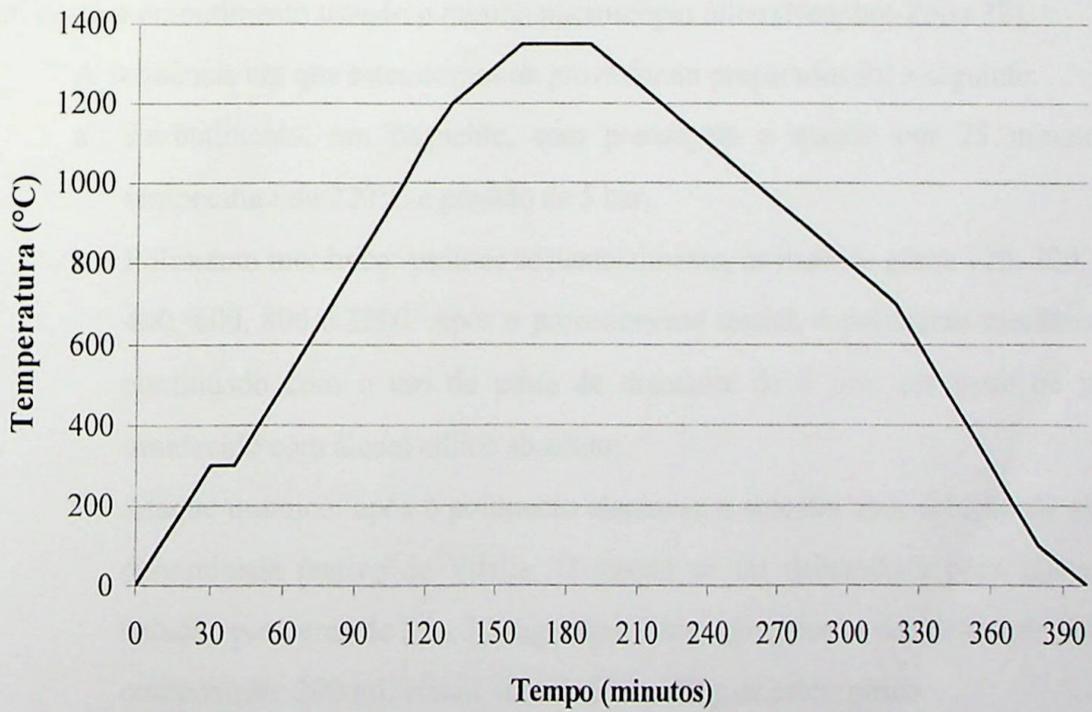


Figura 3.5 - Curva de sinterização para temperatura de 1350°C.

3.3.5 - MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

Microscopia Ótica (MO)

A primeira caracterização morfológica dos corpos de prova a ser considerada é a Microscopia Ótica. Ao se observar uma microestrutura no microscópio tem-se uma descrição qualitativa dos diferentes microconstituintes, portanto, os elementos para se analisar as propriedades de um material (PADILHA e AMBROSIO, 1985).

Para a análise metalográfica do pó, este foi acomodado em uma lâmina de vidro e observado/fotografado. O objetivo principal desta análise foi identificar a morfologia do pó.

Para a análise metalográfica dos corpos de prova sinterizados, foi preciso uma preparação adequada dos corpos de prova segundo a norma ASTM E3-95. Aleatoriamente foram escolhidos os corpos de prova sinterizados que foram cortados longitudinalmente e embutidos em baquelite com prensagem a quente numa embutidora. A difusão da HA nos corpos de prova pode ser observada a partir da superfície, que variou a espessura conforme as características dos testes adotados. Os corpos de prova restantes foram caracterizados sem corte e embutimento usando o mesmo microscópio ótico (Neophot-Zeiss 32).

A seqüência em que estes corpos de prova foram preparados foi a seguinte:

- a. Embutimento: em baquelite, com prensagem a quente por 25 minutos, à temperatura de 220°C e pressão de 5 bar;
- b. Polimento mecânico: usou-se seqüencialmente, as lixas de grana 120, 220, 320, 400, 600, 800 e 1200. Após o procedimento inicial, o polimento mecânico foi continuado com o uso de pasta de diamante de 6 μm , em pano de nylon umidecido com álcool etílico absoluto;
- c. Ataque químico: após o polimento atacou-se a amostra com solução de ataque denominada reativo de Vilella. O ataque se faz deixando a peça imersa na solução por cerca de 25 a 30 segundos. Para a preparação do reativo de Vilella, composição: 200 mL etanol, 05 mL HCl e 02 g de ácido pírico.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-EDS)

Os corpos de prova sinterizados foram caracterizados através do MEV acoplado a um EDS (Energy Dispersive Spectroscopy - X-Ray Micro Analysis System) da

UNICAMP. O EDS permitiu analisar quimicamente os corpos de prova obtidos, visto que a composição química de tais constituintes pode alterar as propriedades finais da amostra. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), destaca-se entre alguns dos métodos de microscopia, pois alcança limites de resolução melhores e qualquer superfície boa condutora elétrica e estável em vácuo pode ser analisada com boa profundidade de foco. Materiais isolantes devem ser recobertos com uma fina camada de material condutor (PADILHA e AMBROSIO, 1985).

Neste tipo de microscópio, os elétrons são acelerados em uma coluna através de duas ou três lentes eletromagnéticas por tensões de 1 a 30 KV. Estas lentes obrigam um feixe de elétrons bastante colimado (50 a 200 Å de diâmetro) a atingir a superfície da amostra. Bobinas de varredura obrigam o feixe a varrer a superfície da amostra na forma de uma varredura quadrada similar a uma lente de televisão. A corrente que passa pela bobina de varredura, sincronizada com as correspondentes bobinas de deflexão de um tubo de raios catódicos, produz uma imagem similar, mas aumentada.

Os elétrons emitidos atingem um coletor e a corrente resultante é amplificada e utilizada para modular o brilho do tubo de raios catódicos. Os tempos associados com a emissão e coleta dos elétrons, comparados com o tempo de varredura, são desprezíveis, havendo assim uma correspondência entre o elétron coletado de um ponto particular da amostra e o brilho do mesmo ponto na tela do tubo.

Dentre as interações que podem ocorrer durante a incidência de um feixe de elétrons em um material, pode-se destacar algumas que são importantes em MEV, pois são as fontes dos sinais utilizados. Os sinais utilizados são os seguintes:

- Elétrons secundários (ES): baixa energia, 50 eV, emergem de uma profundidade de 100 a 200 Å. Sua emissão depende sensivelmente da topografia da superfície da amostra e apresenta imagem com boa profundidade de foco para aumentos entre 10 e 100.000 X ;
- Elétrons retroespalhados (ER): apresentam imagem com menor resolução que os elétrons secundários; são refletidos principalmente por colisões elásticas, de uma profundidade entre 300 e 400 Å. Tem alta energia, podendo ser aproximadamente igual à do feixe incidente. Indicado para aumentos até 2.000 X;
- Elétrons absorvidos (EA): correspondem à fração dos elétrons primários que perdem toda sua energia na amostra, constituindo a chamada corrente da amostra.

3.3.6 - CULTURA DE CÉLULAS

Cultura celular

Foram usadas nesse trabalho linhagem celular OFCOLII, que correspondem a osteoblastos obtidos de camundongo. Estas células foram adquiridas no Banco de Células do Rio de Janeiro vinculado a UFRJ. As mesmas foram mantidas em meio Ham F-10 (Sigma) com 10% de Soro fetal Bovino (Nutricell). As trocas de meio foram efetuadas sempre que a acidificação do mesmo fosse verificada, pH 3,0, e os repiques celulares foram realizados sempre que o tapete celular atingisse 70% de confluência. Todos os ensaios com cultura celular foram feitos de acordo com normatizações internacionais para estudos com biomateriais (ISO 10993-5, 1992; KIRKPATRICK, 1992).

Adesão celular

Para avaliar as possíveis alterações no padrão de adesão celular em relação aos substratos de aço inoxidável AISI 316L com diferentes recobrimentos, foi realizado um ensaio de adesão por meio de uma variação do método descrito por MURAKAMI *et al.* (1998). Inicialmente os diferentes substratos foram esterelizados e mantidos em meio Ham F-10 por 24 h a 37°C. Estes foram então colocados em placas de cultura para receberem as células. As células osteoblásticas foram inoculadas em placas de cultura de 96 poços (Corning) em meio Ham F-10 com 10% de SFB a 37°C com os diferentes substratos e mantidas por 2 h. Após este tempo de incubação, as amostras foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) 0,1 mol/L em pH 7,4 a 37°C, fixadas em formalina 10% por 15 minutos, lavadas em PBS e coradas com cresil violeta 0,05% (em metanol 20%) por 15 minutos. As amostras foram então lavadas com PBS 0,1 mol/L e incubadas com citrato de sódio 0,1 mol/L (em etanol 50% a pH 4,2) por 30 minutos, e analisadas em leitor de microplacas Multiskan Bichromatic versão 1.06 no comprimento de onda de 540 nm. A absorbância dos poços livre de células foram utilizadas com controle de coloração no experimento.

Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia das células foi avaliada em microscópio eletrônico de varredura. As células foram inoculadas em meio Ham F-10 com 10% SFB em lamínulas de vidro ou nos substratos de aço inoxidável AISI 316L com os diferentes recobrimentos. Após 24 h de incubação, as amostras foram fixadas com glutaraldeído 3% (Sigma) em tampão fosfato

0,1 mol/L em pH 7,2 por 45 minutos a 4°C e pós-fixadas com OsO₄ 1% (Sigma) por 2 h a 4°C. As amostras foram desidratadas em séries crescentes de etanol, secas em ponto crítico (Balzers CDT 030) e recobertas com ouro em *Sputter* (Balzers CDT 050). Os espécimes foram observados e fotografados em microscópio eletrônico de varredura JEOL 300.

Os corpos de prova para o estudo 'in vitro' podem ser vistos nas Figuras 3.6 e 3.7 que seguem:



Figura 3.6 – Corpos de prova após sinterização.

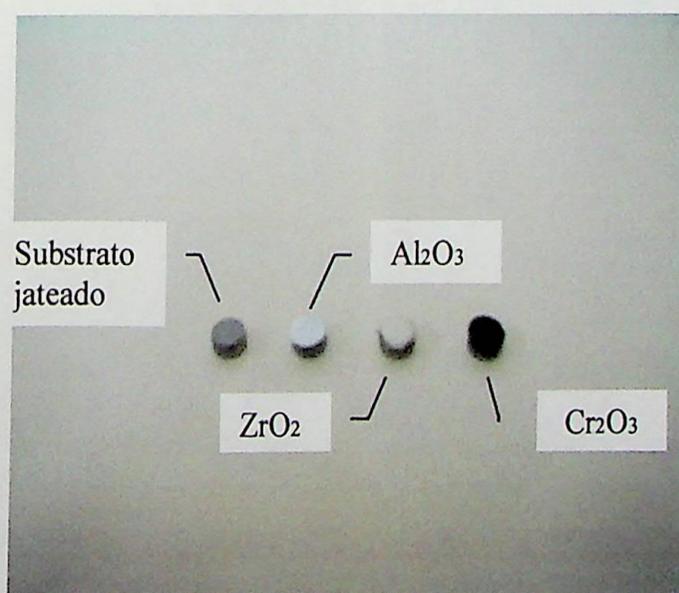


Figura 3.7 – Substrato jateado e corpos de prova após recobrimento por Rokide.

CAPÍTULO 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - MICROSCOPIA ÓTICA (MO)

Caracterização do pó de hidroxiapatita

Na Figura 4.1 são mostrados fotomicrografias do pó de HA antes da compactação nas duas faixas de granulometrias usadas neste trabalho, em (a) e (c) a granulometria está entre 10 e 20 μm , (b) e (d) entre 20 e 32 μm . Pode-se observar uma morfologia irregular do pó em (a) e (b) e as Figuras (c) e (d) permitem verificar a existência de poros nas partículas de HA.

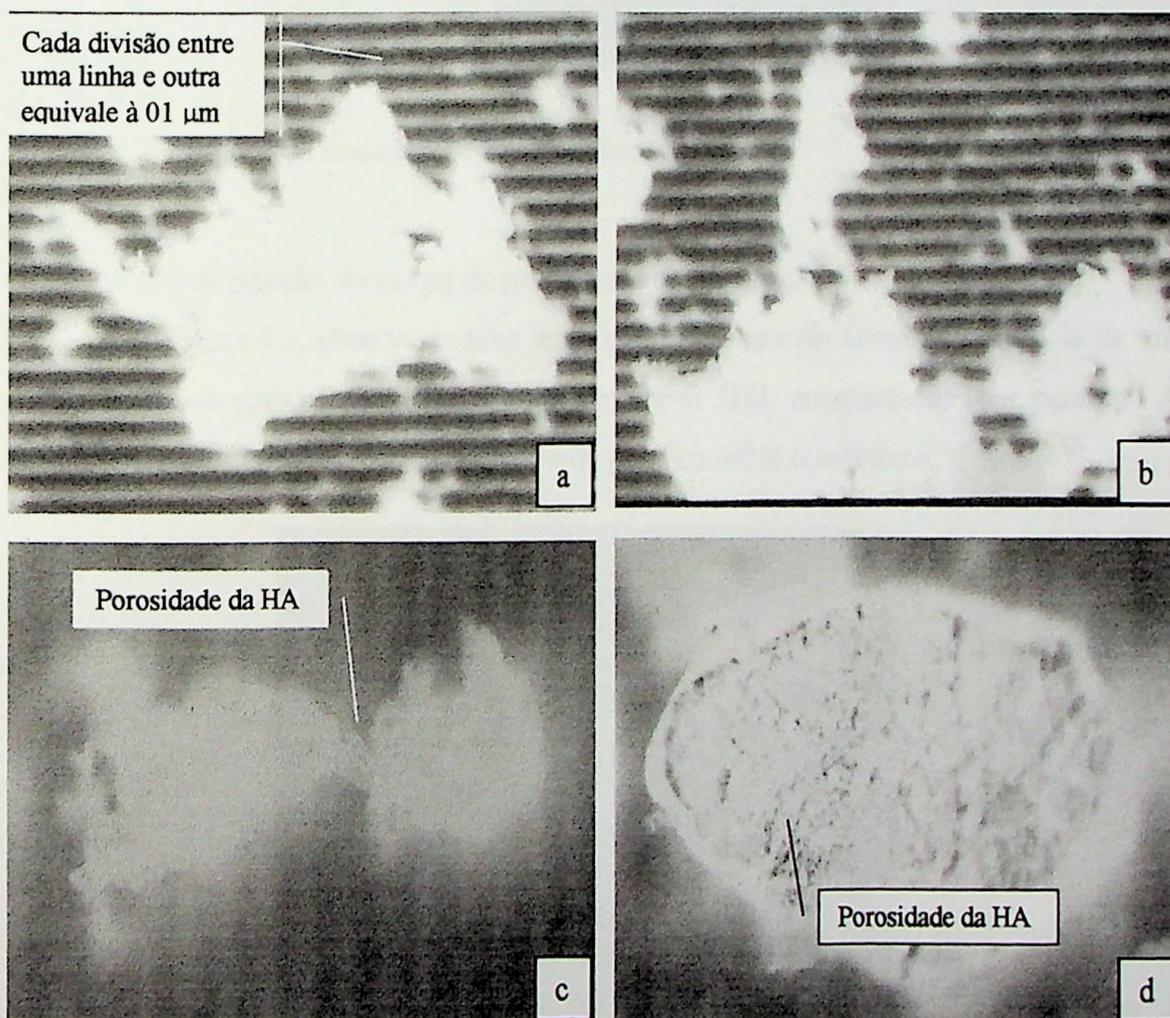


Figura 4.1 - Pó de HA: (a) Ampliação de 160x, granulometria variando de 10 a 20 μm e (b) Ampliação de 160x e entre 20 a 32 μm , conforme barras de divisão micrométricas. (c) e (d) Ampliação de 320x, porosidade da HA.

Caracterização do pó de aço inoxidável AISI 316L

A Figura 4.2 mostra a fotomicrografia do pó do aço inoxidável 316L com a granulometria variando de 20 a 32 μm . A morfologia do pó é irregular e possui uma geometria dendrítica.

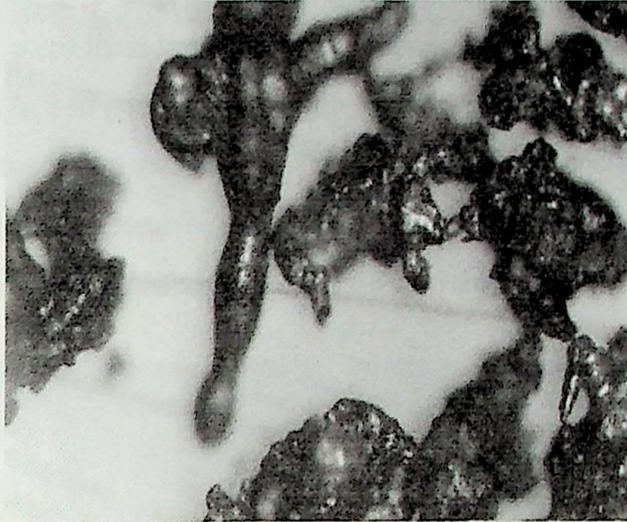


Figura 4.2 – Pó de aço inoxidável 316L (ampliação de 100x)

Caracterização do corpo de prova após compactação

Na Figura 4.3, observa-se uma imagem de Microscopia Ótica da superfície de um corpo de prova com os pós de HA e aço inoxidável 316L compactados com parafina. A figura mostra a homogeneização dos pós e da parafina sobre o substrato.

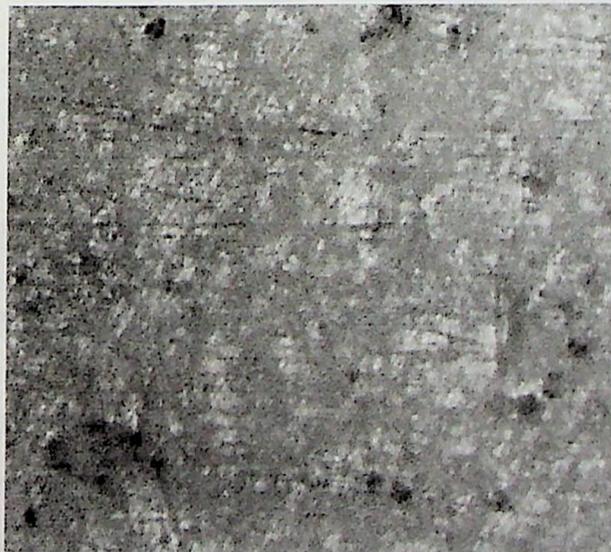


Figura 4.3 – Superfície do corpo de prova após a compactação (Ampliação 160x)

Caracterização do corpo de prova após sinterização

A Figura 4.4 mostra as superfícies de quatro corpos de prova. As Figuras 4.4 (a) e (b) são de amostras que foram compactadas apenas com HA variando-se os ciclos de sinterização (Tabela 3.2.a) e (c) e (d) são da mistura dos pós de aço inoxidável e HA (20% em peso do pó de aço inoxidável) com a variação dos ciclos (Tabela 3.2.b). Para as amostras com HA e aço inoxidável, a superfície apresenta uma topografia mais irregular do que a de apenas HA, isso pode ser observado, considerando que as regiões fora de foco em (c) são mais acentuadas do que em (a). Para as amostras compactadas com o mesmo pó, vemos que quando a temperatura do ciclo de sinterização foi mais elevada, houve uma maior homogeneização do recobrimento, que é o caso (b) e (d).

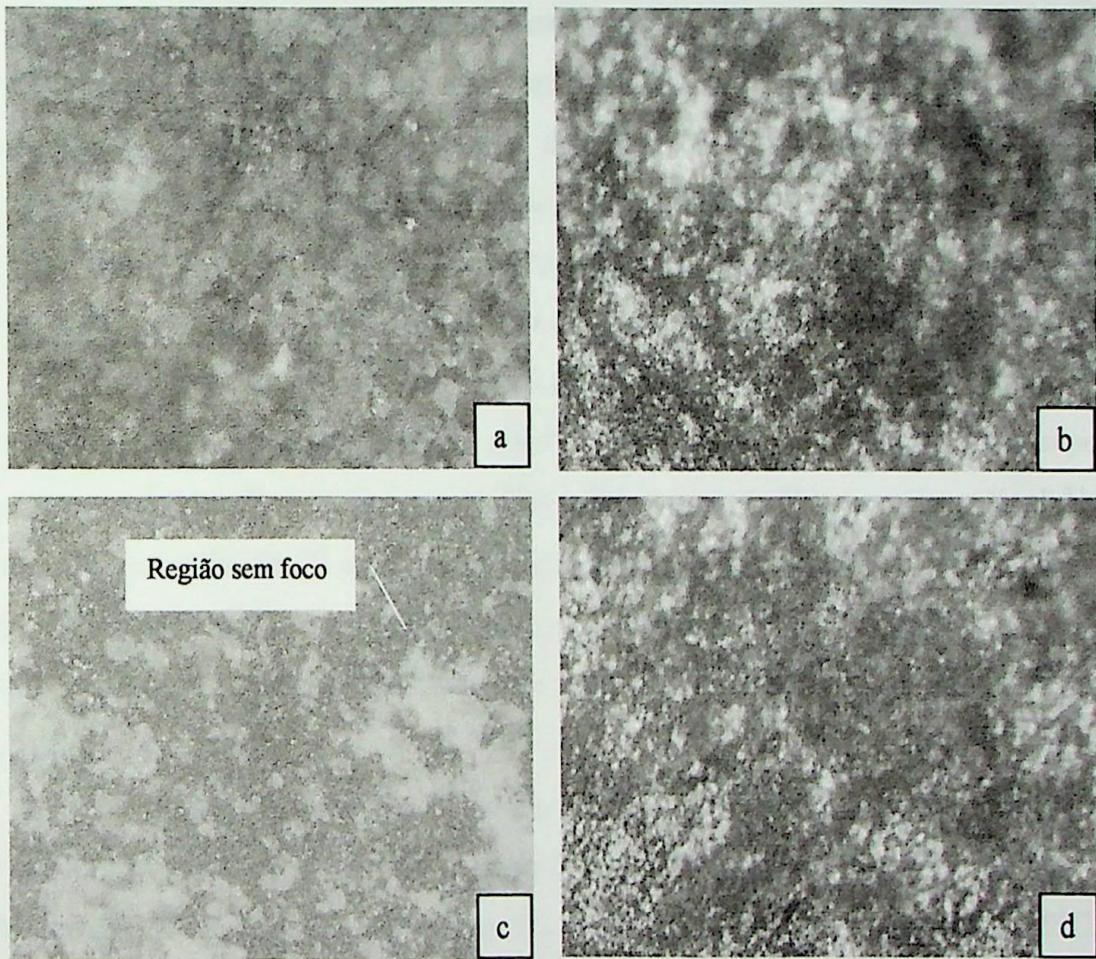


Figura 4.4 – Morfologia do revestimento, em (a) e (b) compactado de HA com granulometria de 10 a 20 μm e temperaturas de sinterização de 1250°C e 1350°C, respectivamente. Para (c) e (d) temos uma mistura de HA com granulometria entre 10 e 20 μm e aço inoxidável 316L entre 20 e 32 μm . A porcentagem em peso é 20% de aço inoxidável e o restante de HA. As temperaturas de sinterização são de 1250°C e 1350°C, respectivamente. (Ampliação de 160x)

A Figura 4.5 mostra as micrografias de amostras em um corte transversal. A observação destas figuras permite-se afirmar que em todas as amostras há uma camada difundida de HA no substrato. Nas Figuras 4.5 (a), (b), (c) e (d) tem-se as amostras compactadas somente com HA e nas Figuras 4.5 (e), (f), (g) e (h) adicionou-se o pó de aço inoxidável 316L para a compactação. No caso das amostras com apenas HA obteve-se uma camada difundida mais espessa do que as amostras com a adição do pó de aço inoxidável.

Para a sinterização da amostra 02, Figuras 4.5 (a) e (b), utilizou-se pó de HA com granulometria entre 10 e 20 μm e temperatura de sinterização de 1250°C e para a amostra 09, Figuras 4.5 (c) e (d), tem-se o pó com granulometria entre 20 e 32 μm e temperatura de sinterização de 1350°C. Para a amostra 02, Figuras 4.5 (a) e (b), que possui a menor granulometria do pó, obteve-se a maior camada de difusão e a mais homogênea. Quando aumenta-se a granulometria do pó e a temperatura de sinterização, não se consegue uma camada tão espessa comparada com a amostra com menor granulometria (mesmo aumentando a temperatura de sinterização). A difusão da HA no substrato de aço inoxidável 316L é uma variável da temperatura e do tamanho da partícula, sendo que o tamanho da partícula foi o que determinou a espessura da camada difundida no substrato.

No caso da amostra 16, Figuras 4.5 (e) e (f), tem-se um compactado com 33,33% em peso do pó de aço inoxidável e na amostra 18, Figuras 4.5 (g) e (h), com 80% em peso do aço inoxidável. Para ambas as amostras utilizou-se pó de HA e aço inoxidável 316L com granulometria de 20 a 32 μm e a temperatura de sinterização de 1350°C. Para a amostra com menor porcentagem de pó de aço inoxidável 316L, amostra 16, obteve-se uma maior camada difundida no substrato e mais homogênea do que a amostra 18, Figuras 4.5 (g) e (h).

Na amostra 02, Figuras 4.5 (a) e (b), formou-se um contorno de grão bem definido e homogêneo nas proximidades da superfície com o compactado do pó de HA. As condições experimentais da amostra 02, temperatura de sinterização de 1250°C e granulometria do pó de HA de 10 a 20 μm , foram as que mostraram os melhores resultados na difusão da HA.

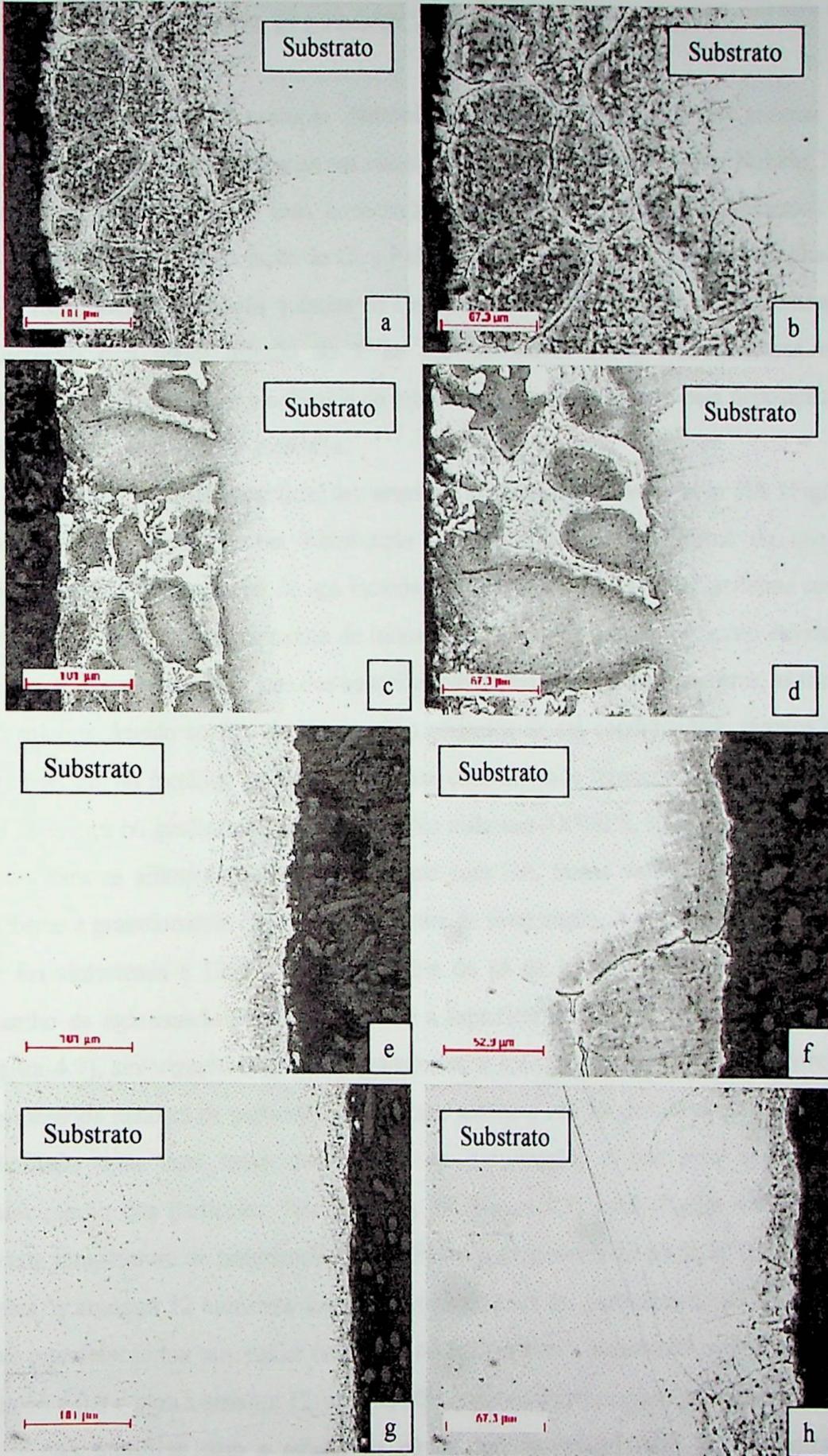


Figura 4.5 - Micrografias de corpos de prova em corte transversal: cp 02 (Figuras a; b) e cp 09 (Figuras c; d) foram sinterizados com HA, cp 16 (Figuras e; f) e cp 18 (Figuras g; h) foram sinterizados com a mistura dos pós de aço inoxidável 316L e HA.

4.2 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura acoplado ao sistema de Energia Dispersiva foram realizadas nas amostras sinterizadas e revestidas por Rokide. Nas amostras sinterizadas, houve uma concentração muito intensa de certos elementos na camada difundida e a dissociação do Ca e P da molécula de HA. Uma possível explicação para o rompimento da ligação química do Ca e P na molécula da HA é a temperatura de sinterização e a maior difusão do P no aço inoxidável 316L. Nas amostras com revestimento por Rokide, a morfologia do recobrimento se caracterizou pela deposição de várias camadas da cerâmica estudada.

A morfologia da superfície das amostras sinterizadas somente com HA (Figuras 4.6,4.7,4.8,4.9) apresenta uma distribuição das partículas mais uniforme do que as amostras com a adição do pó de aço inoxidável (Figuras 4.10,4.11). Nas amostras com a mistura dos pós, há o aparecimento de trincas e aglomerados que se formaram devido as diferentes propriedades térmicas dos materiais. No resfriamento dessas amostras, as trincas se formaram devido ao fato da HA ser uma cerâmica de má condutividade térmica e as partículas do pó metálico possuem uma boa condutividade térmica, o que resultou em uma diferença no gradiente de resfriamento dos materiais (GOMES, 1995).

Para as amostras sinterizadas somente com HA, temos variações da morfologia conforme a granulometria do pó e a temperatura de sinterização. A amostra 02 (Figura 4.6) que foi sinterizada a 1250°C e granulometria do pó de 10 µm a 20 µm tem o menor tamanho de aglomerado de partículas sobre a superfície do substrato. Para a amostra 06 (Figura 4.7), sinterização a 1350°C e granulometria entre 10 µm e 20 µm, foi encontrado aglomerados maiores de partículas que no caso anterior, isto foi devido ao fato de termos trabalhado com uma maior temperatura de sinterização, o que leva a um maior coalescimento das partículas. Nas amostras 09 (Figura 4.8) e 12 (Figura 4.9), temos a mesma temperatura de sinterização de 1350°C, e granulometria do pó de 20 µm a 32 µm, porém, a amostra 12 apresenta um maior coalescimento das partículas do pó de HA. Um fator que determinou esse maior coalescimento foi que para a amostra 09 compactou-se 0,5 g de pó e 0,3 g para a amostra 12, ou seja, 40% a menos de pó em peso para a sinterização.

As amostras com a adição do pó de aço inoxidável AISI 316L mostram o aparecimento de trincas e grandes aglomerados de partículas. Na amostra com 33% em peso de pó metálico (Figura 4.11), observa-se que houve uma concentração maior de aglomerados do que na amostra com 20% em peso do pó metálico (Figura 4.10).

Para o recobrimento da superfície com a técnica do Rokide, primeiramente fez-se o jateamento da superfície com alumina e obteve-se uma superfície com maior rugosidade como é mostrado na Figura 4.12 do substrato jateado. As amostras com recobrimento de ZrO_2 e Cr_2O_3 (Figuras 4.14; 4.15, respectivamente) apresentaram uma morfologia bastante lamelar com porosidades e a amostra recoberta com Al_2O_3 (Figura 4.13) apresentou formas de escamas em sua superfície o que não é favorável a adesão celular como será apresentado nos resultados de cultura de células.

É importante ressaltar que todas as amostras apresentam uma topografia irregular entre os aglomerados de partículas, o que resulta em uma porosidade que é benéfica ao ancoramento das células osteoblastas nessas superfícies.

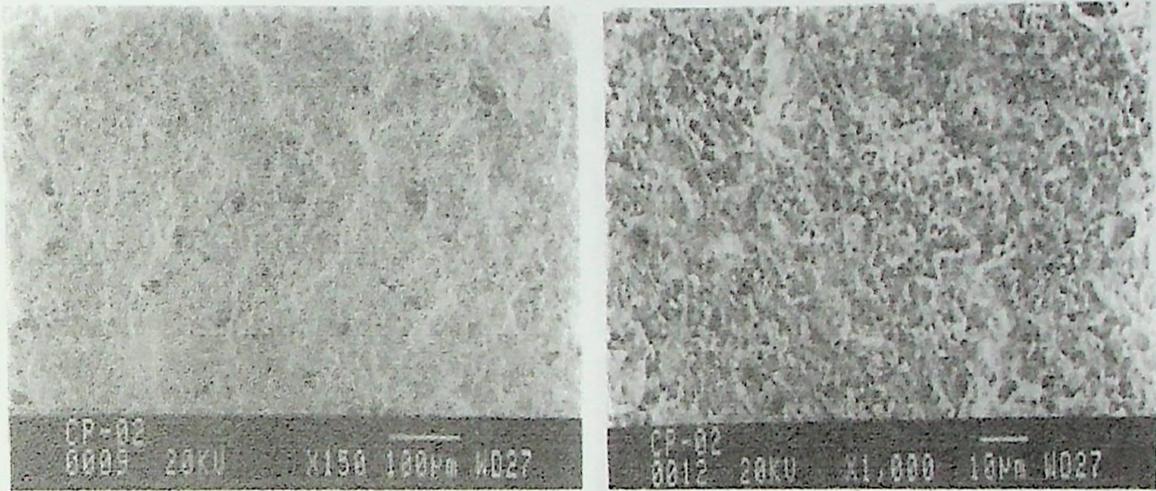


Figura 4.6 - Micrografias do corpo de prova 02 que foi sinterizado a 1250°C com HA na granulometria de 10 a 20 μm .

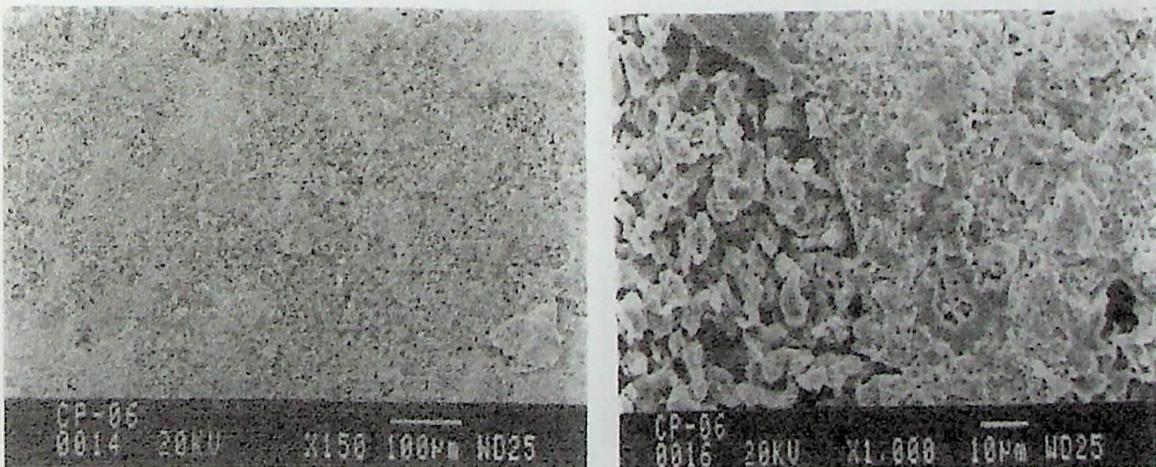


Figura 4.7 - Micrografias do corpo de prova 06 que foi sinterizado a 1350°C com HA na granulometria de 10 a 20 μm .

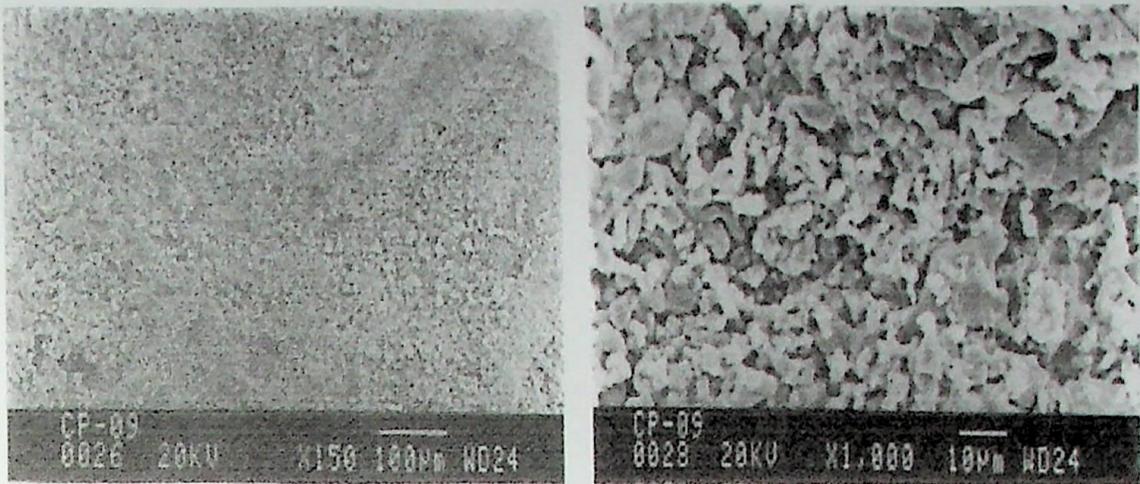


Figura 4.8 - Micrografias do corpo de prova 09 que foi sinterizado a 1350°C com HA na granulometria de 20 a 32 µm.

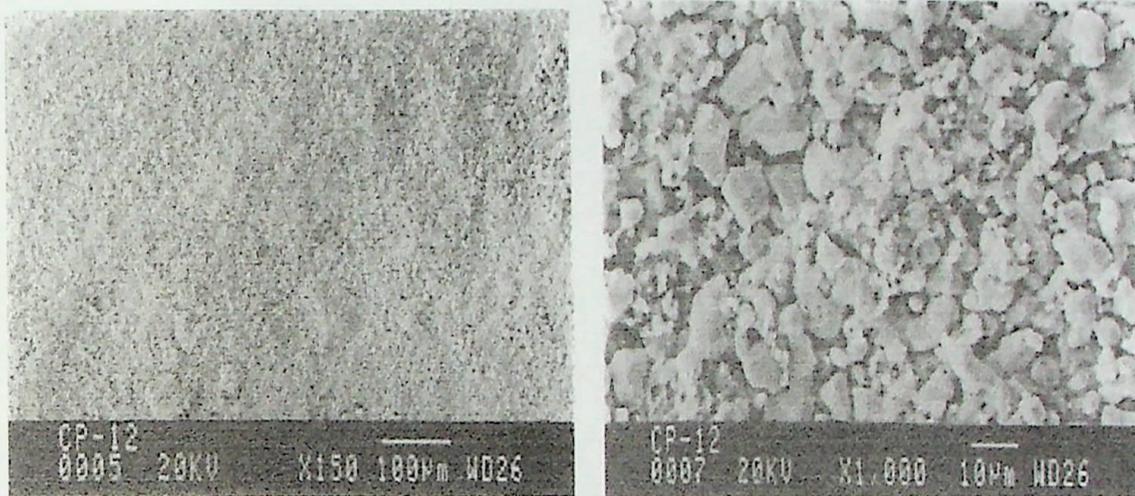


Figura 4.9 - Micrografias do corpo de prova 12 que foi sinterizado a 1350°C com HA na granulometria de 20 a 32 µm.

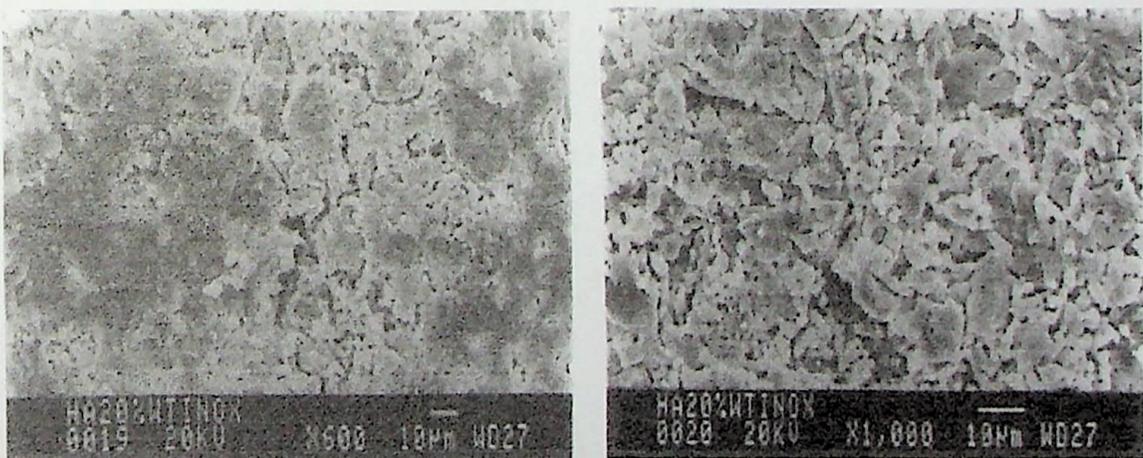


Figura 4.10 - Micrografias do corpo de prova 13 que foi sinterizado a 1350°C com pó de HA e 20% em peso de pó de aço inoxidável AISI 316L na mistura. As granulometrias são de 20 a 32 µm.

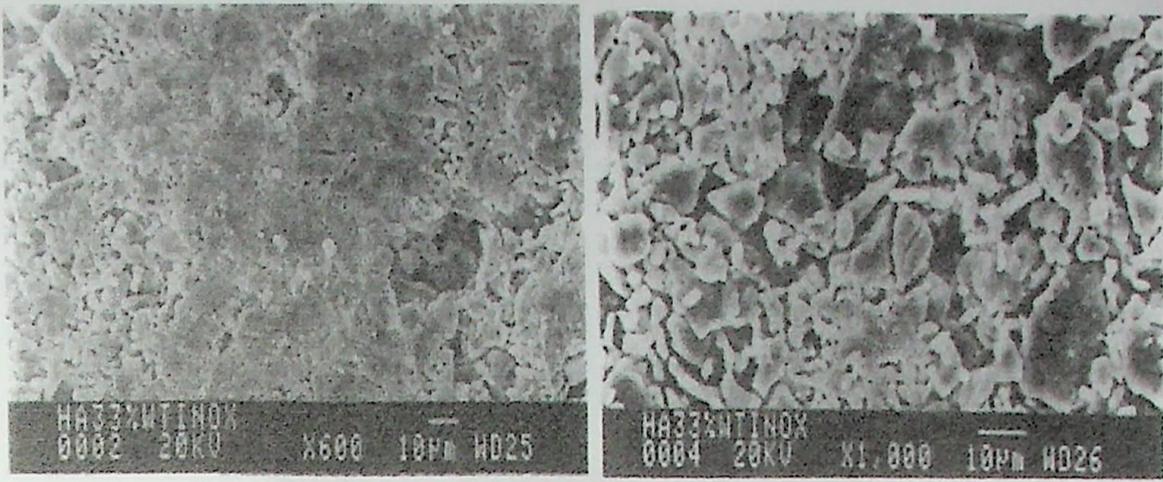


Figura 4.11 - Micrografias do corpo de prova 16 que foi sinterizado a 1350°C com pó de HA e 33% em peso de pó de aço inoxidável AISI 316L na mistura. As granulometrias são de 20 a 32 μm .



Figura 4.12 - Micrografia do substrato de aço inoxidável AISI 316L para recobrimento.

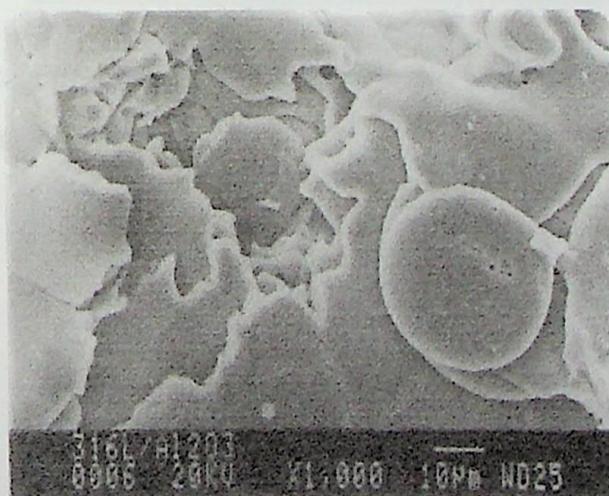


Figura 4.13 - Micrografia da superfície do corpo de prova recoberto com alumina pela técnica de Rokide.

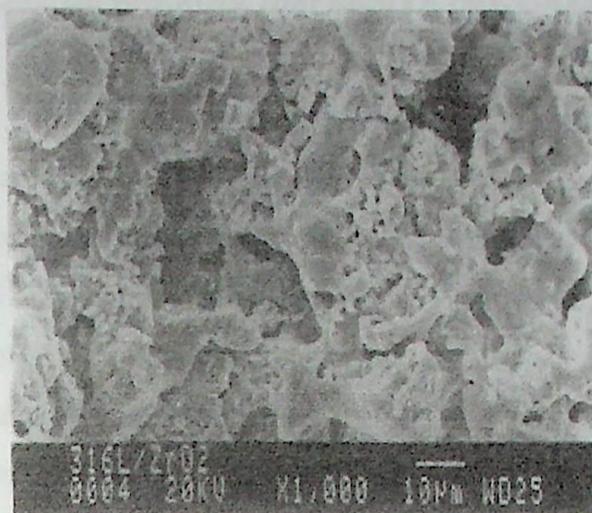


Figura 4.14 - Micrografia da superfície do corpo de prova recoberto com zirconia pela técnica de Rokide.

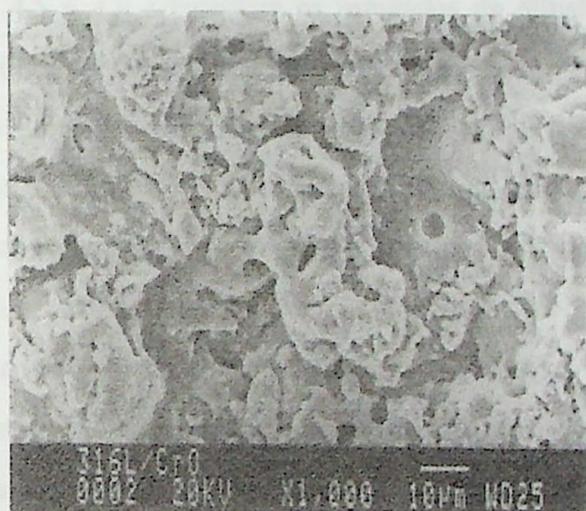


Figura 4.15 - Micrografia da superfície do corpo de prova recoberto com óxido de cromo pela técnica de Rokide.



4.3 - ANÁLISE DE ENERGIA DISPERSIVA (MEV-AED)

Para avaliar as porcentagens em peso dos elementos constituintes do recobrimento, utilizou-se a técnica de análise de Energia Dispersiva acoplado ao MEV em 3 diferentes regiões do recobrimento das amostras com micro-regiões de 450x450 μm .

A Tabela 3.1 apresenta a composição química do aço inoxidável 316-L. Nesta tabela pode-se observar os percentuais máximos em peso de cada elemento constituinte do substrato, quando não especificado o intervalo.

Muito embora tenha coletado dados em regiões significativas, pode-se observar das Tabelas 4.1 a 4.4 e Figuras 4.16 a 4.19 que não houve uma correspondência com os dados esperados da Tabela 3.1 e da relação Ca/P de 1,67 conhecida para a formação da fase hidroxiapatita (HING *et al.*, 1999). Isto indica que houve uma difusão que é mostrada nas Tabelas 4.5 e 4.6.

As Tabelas 4.5 e 4.6 apresentam os resultados da difusão no substrato de aço inoxidável AISI 316L. Pode-se observar que na superfície das amostras os percentuais em peso dos elementos químicos variaram e não estão conforme os dados esperados da Tabela 3.1 e da relação Ca/P de 1,67. Porém, quando se analisa os dados a 200 μm da superfície, observa-se que as concentrações dos elementos químicos estão próximos aos fornecidos pelo fabricante. Outro fato importante foi que para o corpo de prova 10 sinterizado somente com HA houve uma maior difusão do cromo e do fósforo para a superfície do que para o corpo de prova 16, com 33% em peso de aço inoxidável na mistura dos pós. Lembrando que para ambos os corpos de prova, a temperatura de sinterização foi de 1350°C e a granulometria do pó de HA entre 0,20 e 0,32 μm .

Tabela 4.1 - Valores obtidos para as micro-regiões selecionadas do corpo de prova 02.

Elemento / Micro-Região		Porcentagem em peso				
		Área 01	Área 02	Área 03	Média	Desvio Padrão
P	1	9,00	7,18	8,58	8,25	0,95
Ca	2	0,00	0,14	0,09	0,08	0,07
Si	3	0,13	0,15	0,15	0,14	0,01
Mo	4	3,65	3,57	3,61	3,61	0,04
Cr	5	24,65	22,38	23,92	23,65	1,16
Ni	6	11,22	12,22	11,24	11,56	0,57
Cu	7	0,31	0,22	0,46	0,33	0,12
Fe	8	48,06	51,11	49,22	49,46	1,54
Mn	9	2,98	3,03	2,72	2,91	0,17

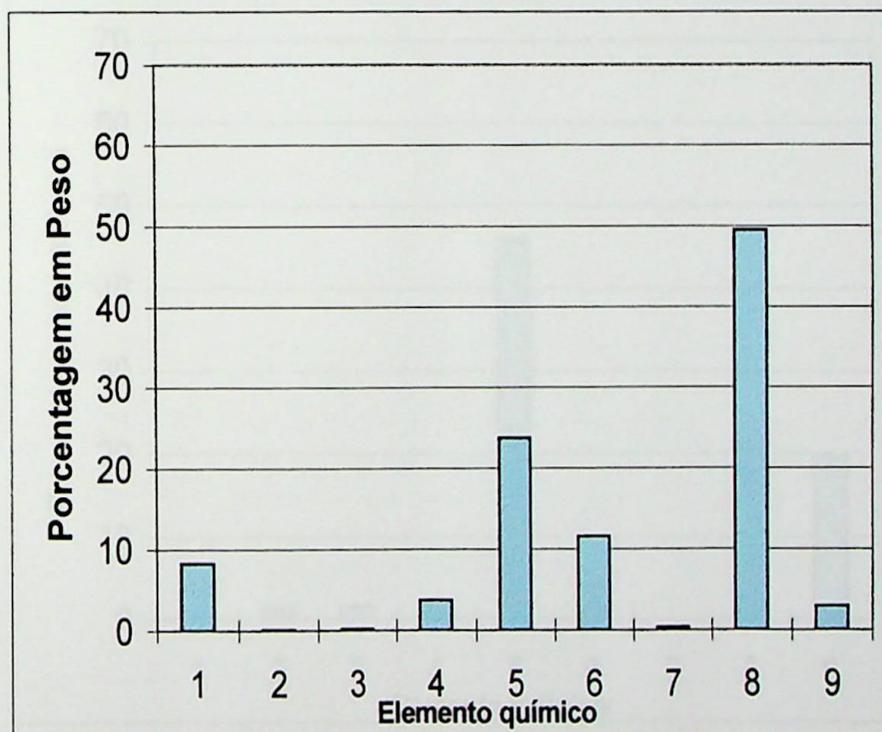


Figura 4.16 - Percentual em peso dos elementos químicos da superfície do corpo de prova 02 (barras em azul).

Tabela 4.2 - Valores obtidos para as micro-regiões selecionadas do corpo de prova 06.

Elemento / Micro-Região		Porcentagem em peso				
		Área 01	Área 02	Área 03	Média	Desvio Padrão
P	1	5,18	4,77	4,15	4,70	0,52
Ca	2	3,40	0,44	0,61	1,48	1,66
Si	3	3,48	0,58	1,03	1,70	1,56
Mo	4	1,84	1,45	1,98	1,76	0,27
Cr	5	42,13	50,50	44,92	45,85	4,26
Ni	6	4,49	3,17	4,95	4,20	0,92
Cu	7	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Fe	8	20,72	17,86	23,28	20,62	2,71
Mn	9	18,76	21,23	19,08	19,69	1,34

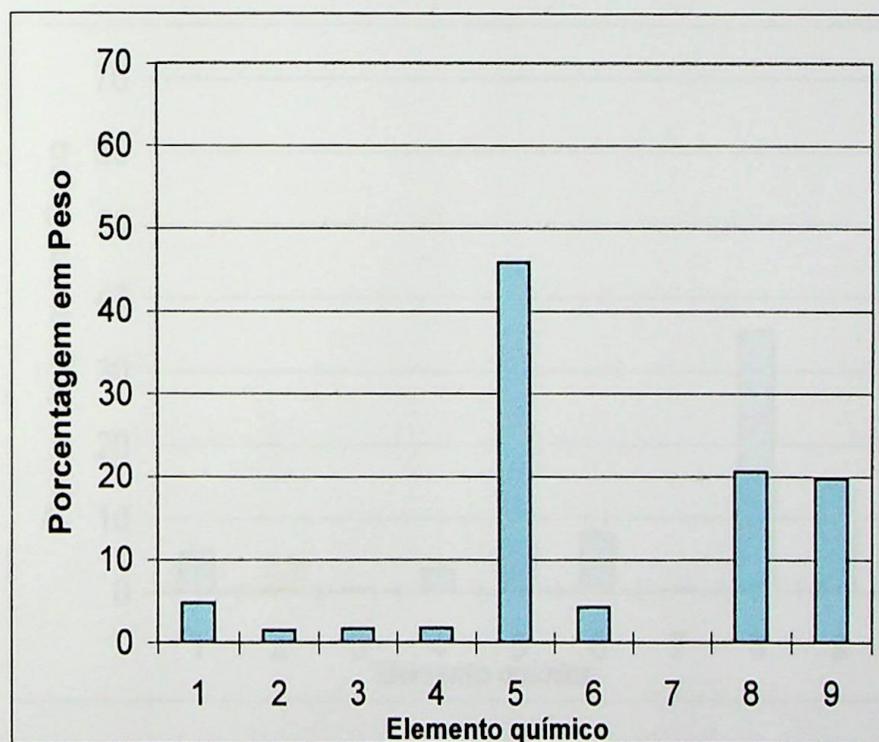


Figura 4.17 - Percentual em peso dos elementos químicos da superfície do corpo de prova 06 (barras em azul).

Tabela 4.3 - Valores obtidos para as micro-regiões selecionadas do corpo de prova 09.

Elemento / Micro-Região		Porcentagem em peso				
		Área 01	Área 02	Área 03	Média	Desvio Padrão
P	1	2,07	5,89	8,66	5,54	3,31
Ca	2	0,39	0,27	0,07	0,24	0,16
Si	3	0,38	0,40	0,30	0,36	0,05
Mo	4	1,60	3,46	4,22	3,09	1,35
Cr	5	46,90	35,69	24,06	35,55	11,42
Ni	6	5,23	7,45	11,40	8,03	3,13
Cu	7	0,00	0,92	0,00	0,31	0,53
Fe	8	21,98	35,15	49,42	35,52	13,72
Mn	9	21,46	10,77	10,87	14,37	6,14

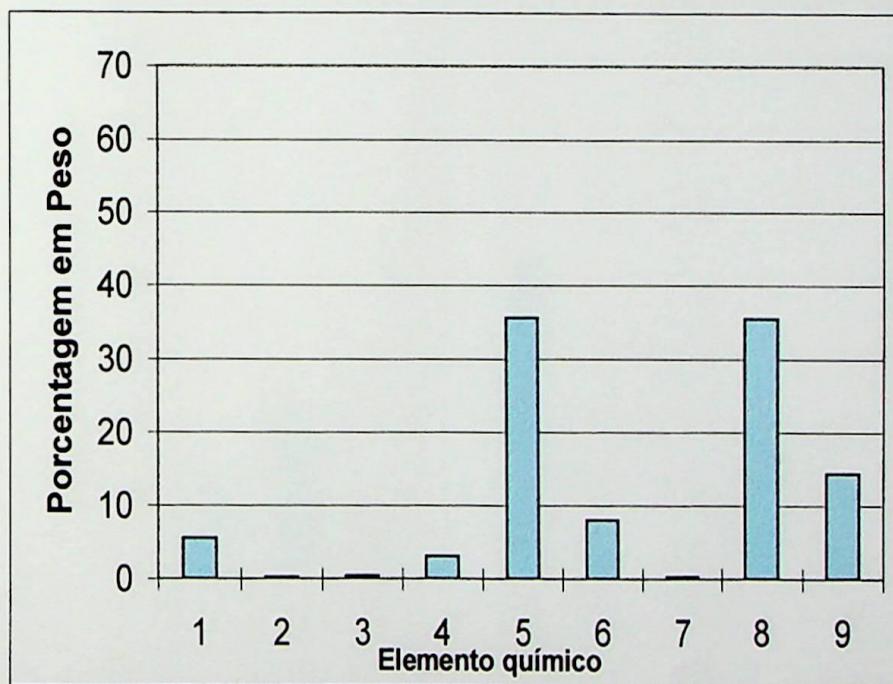


Figura 4.18 - Percentual em peso dos elementos químicos da superfície do corpo de prova 09 (barras em azul).

Tabela 4.4 - Valores obtidos para as micro-regiões selecionadas do corpo de prova 12.

Elemento / Micro-Região		Porcentagem em peso				
		Área 01	Área 02	Área 03	Média	Desvio Padrão
P	1	11,85	14,35	10,66	12,29	1,88
Ca	2	30,50	18,41	16,95	21,95	7,44
Si	3	3,54	1,67	0,48	1,90	1,54
Mo	4	0,40	0,00	0,00	0,13	0,23
Cr	5	32,39	41,78	52,61	42,26	10,12
Ni	6	2,66	2,21	1,73	2,20	0,47
Cu	7	0,00	0,56	0,00	0,19	0,32
Fe	8	16,38	18,42	15,03	16,61	1,71
Mn	9	2,29	2,60	2,55	2,48	0,17

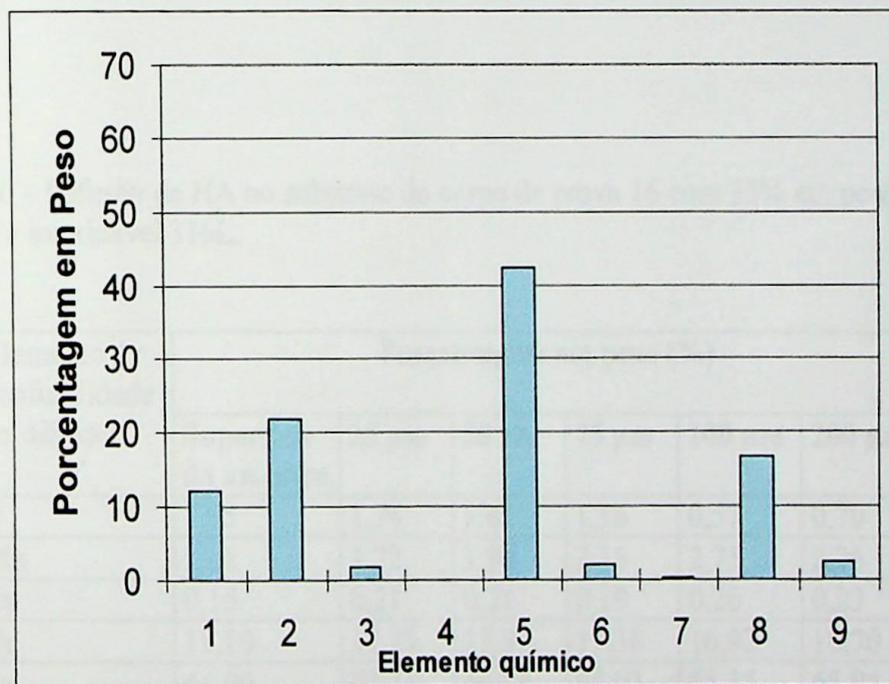


Figura 4.19 - Percentual em peso dos elementos químicos da superfície do corpo de prova 12 (barras em azul).

Tabela 4.5 - Difusão da HA no substrato de aço inoxidável 316L do corpo de prova 10 sinterizado somente com pó de HA.

Elemento / Profundidade de difusão	Porcentagem em peso (%)					
	Superfície da amostra	25 μm	50 μm	75 μm	100 μm	200 μm
P	3,53	3,45	0,25	0,54	0,30	0,00
Mn	1,77	1,89	0,75	1,43	0,93	2,55
Ca	0,11	0,10	0,10	0,23	0,00	0,00
Cr	30,02	29,80	16,68	16,24	16,50	18,69
Fe	52,53	53,02	68,27	66,40	67,42	62,82
Ni	9,44	9,29	12,67	3,29	13,49	13,18
Mo	2,12	2,00	1,12	1,76	1,17	1,93
Si	0,06	0,07	0,16	0,13	0,19	0,26
Cu	0,42	0,37	0,00	0,00	0,00	0,57

Tabela 4.6 - Difusão da HA no substrato do corpo de prova 16 com 33% em peso de pó de aço inoxidável 316L.

Elemento / Profundidade de difusão	Porcentagem em peso (%)					
	Superfície da amostra	25 μm	50 μm	75 μm	100 μm	200 μm
P	1,95	1,74	1,42	1,16	0,57	0,70
Mn	1,41	1,72	1,90	2,15	2,75	2,26
Ca	0,15	0,21	0,21	0,19	0,26	0,23
Cr	18,10	17,73	17,97	17,38	16,92	16,70
Fe	64,90	63,24	64,24	64,03	65,15	65,94
Ni	12,58	13,32	13,06	13,21	12,80	13,39
Mo	1,78	1,87	1,49	1,68	1,17	1,08
Si	0,12	0,17	0,15	0,19	0,27	0,39
Cu	0,00	0,00	0,00	0,00	0,11	0,31

4.4 - CULTURA CELULAR

4.4.1 - ADESÃO CELULAR

Pelo ensaio de adesão celular com 2 h de incubação, pode-se observar que as células em todas as amostras apresentaram uma capacidade de adesão menor que o controle positivo utilizado (polipropileno). Na verdade, os resultados obtidos foram muito próximos aos encontrados com o controle negativo (Teflon). As únicas amostras que apresentaram uma capacidade de estimular a adesão maior que o controle negativo foram os substratos de aço inoxidável 316L sem recobrimento e os substratos jateados. Todos estes dados estão apresentados na Tabela 4.7 e Figura 4.20.

Tabela 4.7 - Absorbância das diferentes amostras estudadas no ensaio de adesão celular.

Amostras	Absorbância média			
	Substrato	Substrato + Células	Células	Desvio Padrão
Controle +	0,000	0,321000	0,321000	0,096890
Controle -	2,004	2,034286	0,030286	0,046013
Aço inoxidável	0,458	0,566429	0,108429	0,092881
Aço inoxidável+HA	0,852	0,865333	0,013333	0,009074
Aço inoxidável+Al ₂ O ₃	0,801	0,824333	0,023333	0,003055
Aço inoxidável+Cr ₂ O ₃	0,808	0,826333	0,018333	0,017039
Aço inoxidável+ZrO ₂	0,822	0,853667	0,031667	0,025007
Substrato Jateado	0,680	0,799667	0,119667	0,047596

Pode-se observar que todas as amostras estudadas mostraram uma menor adesividade em relação aos controles positivos utilizados (polipropileno) e muitos próximos ao do controle negativo (Teflon). As únicas amostras que apresentaram a capacidade de estimular a adesão maior que o controle negativo foram os substratos de aço inoxidável 316L sem qualquer recobrimento e os substratos jateados.

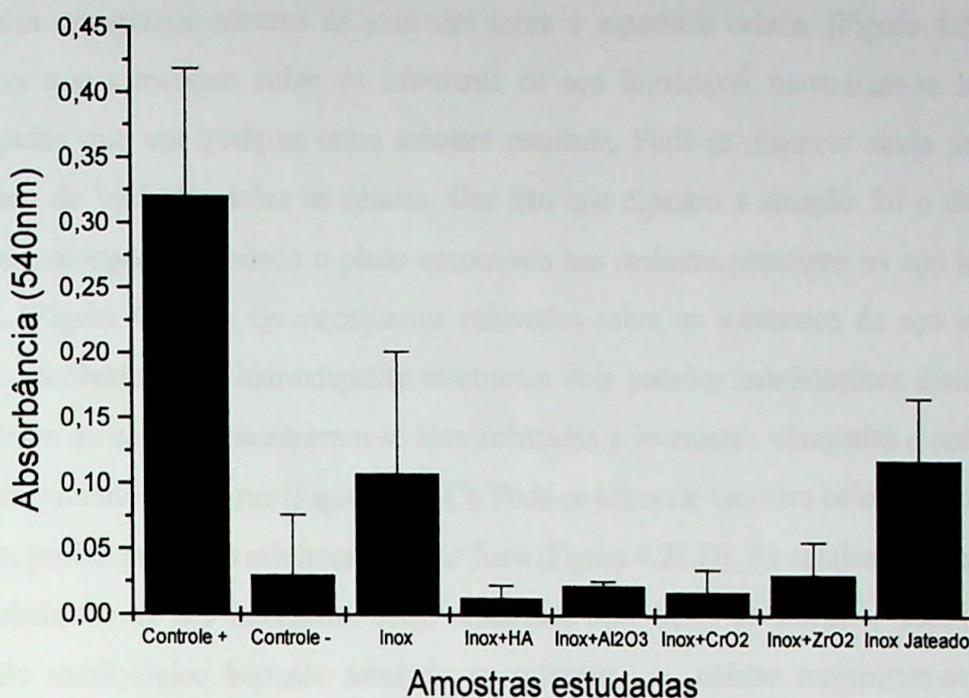


Figura 4.20 - Adesão de células osteoblásticas ao substratos de aço inoxidável 316L sem e com diferentes recobrimentos.

Por outro lado, o fato de um dado material não estimular de forma intensa a adesão celular não indica necessariamente uma característica indesejável. Há relatos que mostram que a baixa adesividade a superfícies é capaz de estimular a produção de moléculas de matriz extracelular pelas células, ao passo que essa capacidade é diminuída em substratos bastante adesivos (MANN *et al.*, 1999). A produção de matriz extracelular é importante não apenas para a diferenciação das células e manutenção de suas características funcionais, como também é para a boa integração do implante com o organismo hospedeiro (HUBBELL, 1997). Assim, torna-se necessário um profundo conhecimento das características superficiais dos materiais para uma boa interação célula-biomaterial.

4.4.2 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS CÉLULAS OSTEOLÁSTICAS SOBRE OS DIFERENTES SUBSTRATOS DE AÇO INOXIDÁVEL 316L COM 24H DE CULTURA (CRESCIMENTO CELULAR).

A análise da morfologia das células osteoblásticas cultivadas sobre as lamínulas de vidro mostrou células com formato irregular, levemente alongadas e com grande número

de prolongamentos celulares, muitos deles ligando uma célula a outra. Observamos também um grande número de vesículas sobre a superfície celular (Figura 4.21.A). As células que cresceram sobre os substratos de aço inoxidável mostraram-se bem mais alongadas que em qualquer outra amostra estudada. Pode-se observar ainda um grande número de vesículas sobre as células. Um fato que chamou a atenção foi o das células estarem alongadas seguindo o plano encontrado nas ranhuras presentes no aço inoxidável 316L (Figura 4.21.B). Os osteoblastos cultivados sobre os substratos de aço inoxidável 316L recobertos com hidroxiapatita mostraram dois padrões morfológicos distintos. Em um deles as células encontravam-se bem achatadas e levemente alongadas e com poucos prolongamentos celulares (Figura 4.21.C). Pode-se observar também células arredondadas e com prolongamentos celulares bastante finos (Figura 4.21.D). As células cultivadas sobre os substratos de aço inoxidável 316L revestidos com óxido de alumínio mostraram um padrão morfológico bastante achatado ao substrato. As células mostraram-se bastante espalhadas, havendo pouco espaço existente entre elas. Observamos ainda poucas vesículas na superfície celular e não encontramos prolongamentos partindo das células (Figura 4.21.E). Os osteoblastos que foram cultivados sobre os substratos de aço inoxidável 316L recobertos com óxido de cromo mostraram-se bem espalhados sobre o substrato. Nesta situação, escassas vesículas na superfície celular foram encontradas (Figura 4.21.F). As células osteoblásticas que cresceram sobre os substratos de aço inoxidável 316L revestidos com óxido de zircônio mostraram-se bastante achatadas e espalhadas sobre os substratos, formando uma camada celular contínua apesar da irregularidade do substrato. Sobre estas células algumas vesículas celulares puderam ser encontradas (Figura 4.21.G). Sobre os substratos de aço inoxidável 316L que foram jateados encontramos células com morfologia irregular com grande número de vesículas na superfície celular (Figura 4.21.H).

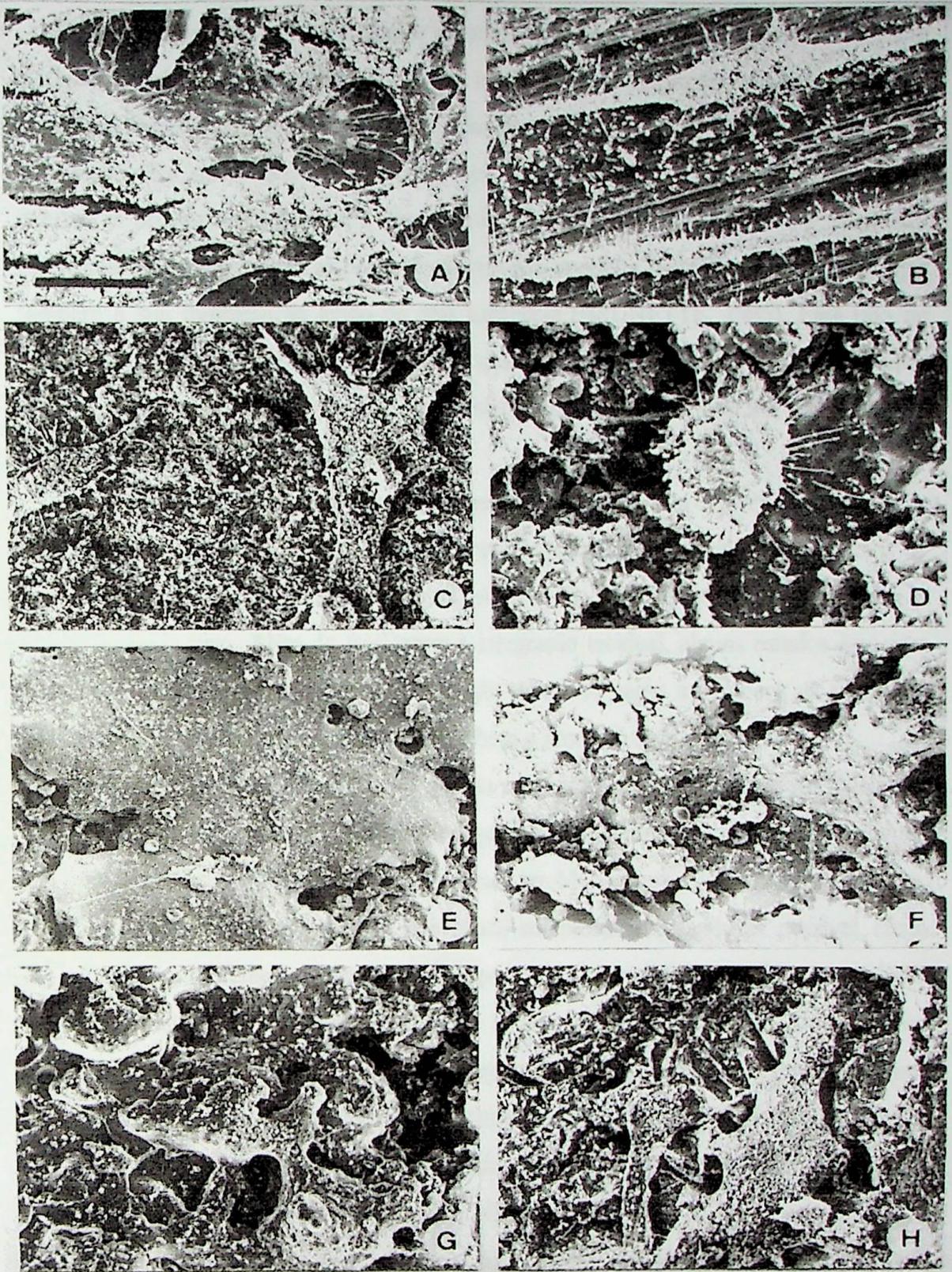


Figura 4.21 - Células osteoblásticas cultivadas sobre: (A) vidro; (B) aço inoxidável 316L; (C) e (D) aço inoxidável 316L recoberto com hidroxiapatita; (E) aço inoxidável 316L recoberto com alumina; (F) aço inoxidável 316L recoberto com óxido de cromo; (G) aço inoxidável 316L recoberto com zircônia; (H) o substrato jateado. Barra de aumento: 10 μ m para todas as figuras.

As células que foram cultivadas sobre os substratos de aço inoxidável 316L sem qualquer recobrimento apresentaram-se bem alongadas em relação aos controles (lâminas de vidro). Importante ressaltar que as células cresceram de forma alinhada, seguindo a orientação das micro-ranhuradas presentes nos substratos. Este tipo de comportamento celular, já previamente descrito, é denominado direcionamento de contato e é de grande relevância pois permite que se possa direcionar não apenas a morfologia das células mas também a sua migração ao longo de uma superfície (BRUNETTE, 1986). Esse tipo de padrão de crescimento pode ser utilizado quando se visa a fixação de determinados dispositivos em implantes ósseos, pois as micro-ranhuradas podem orientar a migração e crescimento tecidual ao longo do implante.

Todas as demais amostras estudadas apresentaram uma superfície irregular e porosa, embora esses poros se estendam apenas na camada superficial dos substratos de aço inoxidável 316L. Estruturas porosas também são interessantes quando se visa a implantação *in vivo*. Além de facilitarem a integração tecidual, alguns estudos associam estruturas porosas com o estímulo a produção de novos vasos sanguíneos na região do implante (BRAUKER *et al.*, 1992) o que melhora o processo de cicatrização.

Apesar da baixa capacidade de adesão mostrada pelos osteoblastos aos diferentes recobrimentos nos substratos estudados (em geral muito próximo aos controles negativos), um grande número de células pôde ser observada em Microscopia Eletrônica de Varredura, o que sugere proliferação celular. Isso afasta completamente qualquer possível efeito tóxico que as diferentes amostras possam apresentar. A análise dos dados em conjunto permite concluir que a adesão celular sobre as amostras é bastante lenta. Uma possível explicação do motivo dessa lentidão talvez seja o fato da célula não apresentar receptores de membrana para os componentes presentes na interface com os diferentes substratos. Outros resultados mostram que superfícies hidrofílicas favorecem a adesão ao passo que as hidrofóbicas não (BERTRAND *et al.*, 1998; NEFF *et al.*, 1998).

Nos substratos de aço inoxidável que foram recobertos com hidroxiapatita, encontramos células bastante achatadas com morfologia irregular, condizente com a forma osteoblástica natural. Por outro lado, observamos também células arredondadas e com grande quantidade de prolongamentos bastante finos. *In vivo*, esse padrão morfológico das células ósseas é encontrado apenas quando ocorre diferenciação terminal dos osteoblastos de modo a originar os osteócitos, que corresponde à célula madura do osso e que se encontra imersa na matriz óssea (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999, MELLO, 2001).

Esse resultado pode sugerir que a hidroxiapatita esteja estimulando a diferenciação dos osteoblastos.

Quando o aço inoxidável 316L foi revestido com óxido de alumínio, o padrão morfológico das células foi completamente diferente das amostras anteriormente relatadas. Neste caso, foram encontradas regiões com grande densidade de células sendo que as mesmas mostravam-se extremamente achatadas e muito próximas umas das outras, cobrindo a irregularidade presente nos substratos. Na superfície destas células, foi observado pouca quantidade de vesículas e microvilosidades, ao contrário das amostras anteriores.

No caso dos substratos de aço inoxidável 316L com revestimento com óxido de cromo e óxido de zircônio, um padrão morfológico muito semelhante ao descrito para revestimento com alumina foi encontrado. Neste caso as células também mostravam-se achatadas e muito próximas umas das outras. Nestas amostras também foram observada poucas vesículas e/ou microvilosidades na superfície das células. Entretanto, as células pareceram estar mais bem espalhadas sobre a superfície dos substratos, uma vez que a irregularidade do mesmo pôde ser visualizada com maior nitidez.

Finalmente, nas amostras onde o revestimento foi constituído com aço inoxidável 316L jateado foi observado um padrão morfológico bastante distinto dos demais tipos de recobrimento utilizados. Nesse caso, encontramos células com morfologia bastante irregular e bastante variável, além de estarem bem espaçadas umas das outras. Estas células apresentavam uma abundância muito grande de microvilosidades e/ou vesículas em suas superfícies.

A análise conjunta dos resultados apresentados mostra que quando ocorrem variações químicas ou estruturais na superfície do substrato, as células adquirem um padrão morfológico diferenciado. É sabido que fatores como a matriz extracelular, o substrato natural das células *in vivo*, está intimamente relacionado com a indução da diferenciação celular, que é o processo onde células imaturas se especializam em funções específicas nos diferentes tecidos animais (SANTOS & WADA, 2001). Também se sabe que a forma de uma célula está relacionada com a sua função no organismo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; MELLO, 2001). Desta forma, as variações morfológicas celulares observadas neste trabalho podem ser interpretadas como uma adaptação da célula às características dos diferentes substratos, ou seja, elas estariam diferenciando-se em respostas as características físico-químicas das diferentes superfícies estudadas. Visando a utilização ortopédica das amostras e pensando no implante dos mesmos nos ossos, o

padrão morfológico obtido com as células cultivadas sobre o substrato de aço inoxidável AISI 316L recoberto com hidroxiapatita demonstra ser mais adequado que as demais amostras, uma vez que as células apresentaram nestas amostras uma forma mais próxima à encontrada *in vivo*. Além disso, a presença de células com características distintas sobre as diferentes superfícies, reforça a inexistência de efeito citotóxico direto dos substratos, uma vez que não foram observados sinais morfológicos de degeneração celular em nenhuma das amostras estudadas.

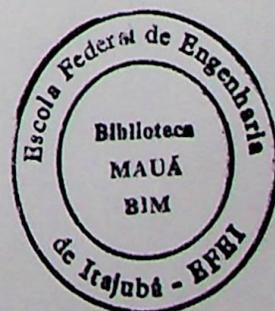
CAPÍTULO 5

CONCLUSÕES

O mecanismo biológico que explica a melhor resposta da integração de implantes revestidos com HA não está completamente elucidado. As principais indicações apontam para a natureza química deste revestimento, constituída de cálcio e fósforo sob uma formulação muito semelhante àquela encontrada no próprio osso, ensejando uma excelente identidade química e táctil na reparação do osso.

Com base nos resultados deste trabalho, foram obtidas as seguintes conclusões:

- A presença de células com características distintas sobre as diferentes superfícies, reforça a inexistência de efeito citotóxico direto dos substratos.
- O padrão morfológico obtido com as células cultivadas sobre o substrato recoberto com hidroxiapatita demonstra ser mais adequado que as demais amostras, uma vez que as células apresentaram nestas amostras uma forma mais próxima à encontrada *in vivo*.
- Os resultados mostram que quando ocorrem variações químicas ou estruturais na superfície do substrato, as células adquirem um padrão morfológico diferenciado.
- Os revestimentos de alumina, zirconia, óxido de cromo e mistura dos pós não apresentaram diferença quanto ao crescimento celular.
- Os revestimentos com mistura de pós apresentaram trincas na superfície, devido a má condutividade térmica da HA.
- A camada de hidroxiapatita encontrada difundida no substrato de aço inoxidável 316L foi de 200 μm .



SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente trabalho envolve aspectos gerais de recobrimentos cerâmicos em um substrato de aço inoxidável AISI 316L para ser aplicado como implante. Este estudo envolve diferentes áreas do conhecimento, tanto das ligadas à engenharia mecânica e materiais, como as relacionadas com as ciências médicas. Como forma de aprofundar este trabalho, as seguintes sugestões para trabalhos futuros são listadas:

- A caracterização das amostras sinterizadas e recobertas pelo processo de Rokide através de ensaios de aderência, porosidade e Difração de Raios X;
- Teste de biocompatibilidade "in vivo" e histológico, em cobaias, através de implante sobre o tecido ósseo das mesmas;
- Recobrimento de outros substratos metálicos normalmente utilizados na fabricação de implantes ortopédicos e odontológicos, tais como: ligas de titânio, titânio puro, aço Cr-Co-Mo;
- Utilização de outros pós metálicos para a sinterização com o pó de hidroxiapatita, tais como: pó de titânio e ligas de titânio.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- BERTRAND, P.; DEWEZ, J.L.; LHOEST, J.B.; DETRAIT, E.; BERGER, V.; DUPONT-GILLAIN, C.C.; VINCENT, L.M.; SCHNEIDER, Y.J.; ROUXHET, PG., **Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces: from physical chemistry of surfaces to selective adhesion of defined patterns**, *Biomaterials* 19: 1441-1445, 1998.
- BRAUKER, J.; MARTINSON, L.A.; HILL, R.S.; YOUNG, S.K.; CARR-BRENDEL, V.E.; JOHNSON, R.C., **Neovascularization of immuoisolation membranes: the effects of membrane architecture and encapsulated tissue**, *Transplant. Proc.* 24: 2924-2924, 1992.
- BRUNETTE, D., **Fibroblasts on micromachined substrata orient hierarchically to grooves of different dimensions**, *Exp. Cell Res.* 164: 11-26, 1986.
- CHIAVERINI, V., **Metalurgia do pó - Técnicas e produtos**, ABM, São Paulo, 1982.
- FOLKAMAN, J.; MOSCONA, A., **Role of cell shape in growth control**, *Nature* 273: 345-349, 1978.
- GOMES, U.U., **Tecnologia dos Pós - Fundamentos e Aplicação**, Ed. UFRN, Natal/RN, 1995.
- GOTTLANDER, M.; JOHANSSON, C.B.; ALBREKTSSON, T., **Short- and long-term animal studies with a plasma-sprayed calcium phosphate-coated implant**, *Clin. Oral Implan Res* 8: (5) 345-351, Oct, 1997.
- GROOT, K., **Medical Applications of calciumphosphate Bioceramics**, The centennial Issue of the Ceramic Society of Japan, 99, (10), pp. 943-953, 1991.
- HENCH, L.L., **Biomaterials: a forecast for the future**, *Biomaterials* 19: 1419-1423, 1998.

HING, K. A.; BEST, S. M.; BONFIELD, W, **Characterization of Porous Hydroxypatite**,
Journal of Materials Science: materials in Medicine, 10, 135-145, 1999.

HUBBELL, L.; LANGER, R.; CHICK, W., **In: Principles of Tissue Engineering**,
Journal Matrix effects, Landes Company, pp.247-262, 1997.

HUBBELL, J.A., **Biomaterials in tissue engineering**, Biotechnology 13: 565-576, 1995.

ISHAUG, S.L.; YASZEMSKI, M.J.; BRIZIOS, R.; MIKOS, A.G., **Osteoblast function on synthetic biodegradable polymers.**, Journal Biomed, Mater, Research. 28: 1445-1453, 1994.

ISHAUG-RILEY, S.L.; CRANE, G.M.; GURLEK, A.; MILLER, M.J.; YASKO, A.W.;
YASZEMSKI, M.J; MIKOS, A.G., **Ectopic bone formation by marrow stromal osteoblast transplantation using poly (L-lactic-co-glycolic acid) foams implanted into the rat mesentery**, Journal Biomed. Mater, Research. 36: 1-8, 17-28, 1997.

ISHAUG-RILEY, S.L.; CRANE-KRUGER, G.M.; YASZEMSKI, M.J.; MIKOS, A.G.,
Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers, Biomaterials 19: 1405-1412, 1998.

ISO 10993-5, **Biological evaluation of medical devices - Part 5 - Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods**, 1992.

SILVA, JORDIR A.G., **Síntese e caracterização de hidroxiapatita utilizada como recobrimento via processamento de pó**, EFEI, 2000.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J., **Histologia Básica**, 9^a ed., Editora Guanabara Koogan, RJ, 1999.

KIRKPATRICK, C.J.; BITTINGER, F.; WAGNER, H.; KOHLER, H.; van KOOTEN, T.C.; KLEIN, C.L.; OTTO, M., **Current trends in biocompatibility testing**, Proc. Instn. Mech Engrs. 212: 75-84, 1998.

- KIRKPATRICK, C.J., **Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity in vitro**, Regulatory Affairs 4: 13-32, 1992.
- LANGER, R.; VACANTI, J.P., **Tissue engineering**, Science 260: 920-925, 1993.
- LIN, C.Q.; BISSEL, M.J., **Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix**, FASEB J. 7: 737-743, 1993.
- LOMBELLO, C.B.; MALMONGE, S.M.; WADA, M.L.F., **Morphology of fibroblastic cells cultured on poly (HEMA-co-AA) substrates**, Cytobios 101 115-122, 2000.
- LOMBELLO, C.B.; MALMONGE, S.M.; WADA, M.L.F., **PolyHEMA and polyHEMA-Poly (MMA-co-AA) as substrates for culturing Vero cells**, Jornal Mater. Sci. Mater. Med. 11: 541-546, 2000.
- MANN, B.K.; TSAI, A.T.; SCOTT-BURDEN, T.; WEST, J.L., **Modification of surfaces with cell adhesion peptides alters extracellular matrix deposition**, Biomaterials 20: 2281-2286, 1999.
- MELLO, M.L.S., **Aspectos gerais da estrutura celular**, CARVALHO, H.F. & RECCO-PIMENTEL, S.M. (Organizadores), A Célula 2001, Editora Manole, SP, p. 01-05, 2001.
- MURAKAMI, N.; FUKUCHI, S.; TAKEUCHI, K.; HORI, T.; SHIBAMOTO, S.; ITO, F., **Antagonistic regulation of cell migration by epidermal growth factor and glucocorticoid in human gastric carcinoma cells**, Journal Cell. Physiol. 176: 127-137, 1998.
- NEFF, J.A.; CALDWELL, K.D.; TESCO, P.A., **A novel method for surface modification to promote cell attachment to hydrophobic substrates**, Journal Biomed. Mater. Res. 40: 511-519, 1998.

- NORTON PAKCO INDUSTRIAL CERAMICS, **ROKIDE Ceramic Rod Spray System**, Latrobe, PA, USA, 1999.
- REIS, FERNANDO B., **Traumatologia**, Universidade Federal de São Paulo, Escola Paulista de Medicina, Editor, São Paulo, 1998.
- SANTOS, A.R Jr; BARBANTI, S.H.; DUEK, E.A.R.; DOLDER, H.; WADA, R.S, WADA, M.L.F., **Growth and differentiation of Vero cells on poly (L-lactic acid) membranes of different pore diameters**, *Artif. Organs* 25: 7-13, 2001.
- SANTOS, A. R. Jr.; WADA, M.L.F., **Diferenciação celular**, CARVALHO, H.F. & ECCO-PIMENTEL, S.M. (Organizadores), *A Célula* 2001, Editora Manole, SP, p. 260-274, 2001.
- TÖRMÄLÄ, P.; POHJONEN, T.; ROKKANEN, P., **Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications**, *Proc. Inst. Mech. Engrs (Part H)* 212: 101-111, 1998.
- TUREK, S. L., **Ortopedia Princípios e sua Aplicação**, Quarta Edição, Editora Manole Ltda, São Paulo, 1991.
- ZOPPI, R.A.; CONTANT, S.; DUEK, E.A.R.; MARQUES, F.R.; WADA, M.L.F.; NUNES, S.P., **Porous poly (L-lactide) films obtained by immersion precipitation process: morphology, phase separation and culture of VERO cells**, *Polymer* 40 3275-3289, 1999.

BIBLIOGRAFIA

- Aços Inoxidáveis, Aços Martensíticos, Aços Endurecíveis por Precipitação,**
Catálogo Villares, 1996.
- AOKI, H., **Science and Medical Applications of Hydroxypatite**, Japanese Association of Apatite Science, (JAAS), Tokio, 1991.
- CHIAVERINI, V., **Aços e Ferros Fundidos**, Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais, São Paulo, 6^o Edição, 1990.
- CHIAVERINI, V., **Tecnologia mecânica: Estrutura e Propriedades das Ligas Metálicas**, Vol I 2^o ed. McGraw-Hill, São Paulo, 1986.
- HENCH, L.L.; ETHRIDGE, E.C., **Biomaterials: An Interfacial Approach**, Academic Press, New York, 1982.
- METALS HANDBOOK, **Atlas of Microestrutres of industrial alloys**, vol. 7, 8th edition, Printed in USA , 1972.
- PADILHA, A. F.; FILHO, F. A., **Técnicas de Análise Microestrutural**, ed. Hemus, São Paulo, 1985.
- RATNER, ALLAN S.; HOFFMAN, FREDERICK J.; SCHOEN AND JACK LEMONS, **An Introduction to Materials in Medicine**, Endorsed by the Society for Biomaterials, Biomaterials Science, Edited by Buddy D, California, USA, 1996.
- SALTER, ROBERT B., **Distúrbios e Lesões do Musculo-Esquelético**, ed. Médica e científica Ltda, 1985.
- SOUZA, SÉRGIO A, **Ensaio Mecânicos de Materiais Metálicos - Fundamentos Teóricos e Práticos**, Ed. Edgar Blücher Ltda, 1989.