



**AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO**

**SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA E SUA APLICAÇÃO
COMO BIOMATERIAL**

MAGALI DE CAMPOS VALENTE

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear -Aplicações.**

**Orientadora:
Dra. Ana Helena de Almeida Bressiani**

**São Paulo
1999**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia Associada à Universidade de São Paulo

**SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA E SUA APLICAÇÃO
COMO BIOMATERIAL**

MAGALI DE CAMPOS VALENTE

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau
de “Doutor em Ciências” na Área
de Tecnologia Nuclear - Aplicações**

Orientadora:

Dra. Ana Helena de Almeida Bressiani

SÃO PAULO

1999



AGRADECIMENTOS

À Dra. Ana Helena de Almeida Bressiani, minha orientadora, pela confiança desde o início, pelos conhecimentos transmitidos, permanente colaboração e amizade.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, IPEN-CNEN/SP, fomentador de pesquisas, infra estrutura e cursos oferecidos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pelo apoio financeiro, através da bolsa de doutoramento.

À Universidade de Mogi das Cruzes pelo apoio recebido.

À Prof.a Dra. Cecília Amélia de Carvalho Zavaglia, por ter organizado cursos e palestras de grande valia para a comunidade científica, além de ter doado o pó de HAp importado, utilizado neste trabalho.

Ao Departamento de Materiais da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela presteza nos trabalhos de recobrimentos, em especial ao Prof. Dr. Carlos Pérez Bergmann.

À Dra. Pilar Sepúlveda, pela contribuição na execução experimental de obtenção da HAp porosa.

Aos Laboratórios de Microscopia Eletrônica de varredura, do Instituto de Geociências/USP e do IPEN-SP, em particular ao Eng. Metalurgista Isaac Jamil Sayeg e Celso Vieira de Moraes, pelos bons resultados obtidos.

Ao Laboratório de Caracterização Tecnológica, Escola Politécnica, pelas análises de difratometria de raios X, coordenado pelo Prof. Dr. Henrique Khan.

Ao Departamento de Radiobiologia, pelos ensaios de citotoxicidade realizados, aos préstimos da Msc. Sizue Ota Rogero e Dr.a Olga Zazuco Higa.

Ao Instituto Adolfo Lutz, Seção de Culturas Celulares, pelos ensaios de citotoxicidade realizados, realizados por Áurea S. Cruz e Tamiko I. Ikeda.

Ao Laboratório de Análise Térmica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo pelas análises de espectroscopia de infravermelho, em particular ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos.

Aos amigos e colaboradores: Valquiria de Campos, Rogério Soares Lima, Antônio Takimi, Gehard e Volkmar Ett, Alessandro Sapienza, Wilson Carlos da Silva, Carlos Eduardo Pinedo, Zélia Maria da Costa, Eliana C. S. Rigo, Daniel Moraes, pelas valiosas sugestões.

Aos colegas da Divisão de Materiais Cerâmicos, pela amizade e incentivo.

À Divisão de Oficinas do IPEN, em especial, ao Sr. José Carlos Sabino pela produção dos aparatos científicos.

Ao pessoal da Biblioteca do IPEN, pela cooperação que me permitiu navegar em busca de informações científicas.

Agradeço a minha super família: Nestor, Valquiria e Isaac, Luisa, Walter e Aracy, Silvia, Walter Jorge e Sheila, pelo apoio e carinho recebido. Aos pequeninos sobrinhos, Catarine e Felipe, Paulina, Rafael, Bruno e Felipe, pelos momentos de alegria.

*Aos meus pais, Luiz e Lourdes,
Ao meu esposo, Wagner
Companheiros em todos os momentos*

SÍNTESE DE HIDROXIAPATITA E SUA APLICAÇÃO COMO BIOMATERIAL

Magali de Campos Valente

RESUMO

A HAp é um biomaterial, aplicado como biocerâmica densa, porosa ou de revestimento, nas áreas médica e odontológica. Este trabalho teve como objetivo contribuir na obtenção da HAp na forma de um produto que possibilitasse as três aplicações. Foram estudados em escala de laboratório quatro métodos de síntese: cristalização, sol-gel em meio aquoso, sol-gel em meio alcoólico e neutralização. Os métodos, cristalização e neutralização, que apresentaram os melhores resultados em termos de estabilidade térmica, foram reproduzidos em escala piloto. Em escala piloto, foram produzidos pós de HAp em sistema aberto e fechado, com atmosfera de nitrogênio, para evitar a carbonatohidroxiapatita. Os pós foram utilizados como recobrimentos de ligas de titânio. A técnica de deposição utilizada foi a aspersão térmica com chama plásmica e HVOF. Os resultados foram comparados com HAp disponível comercialmente. Os recobrimentos obtidos apresentaram como fase principal a HAp com boa adesão qualitativa. Corpos cerâmicos porosos foram obtidos pelo método *gelcasting* de espumas com a HAp obtida pelo método de neutralização em atmosfera inerte. As principais técnicas utilizadas na caracterização dos pós, substratos metálicos, recobrimentos, corpos cerâmicos densos e porosos foram: espectroscopia de infravermelho, espectrometria com fonte de plasma induzido, área superficial específica, distribuição do tamanho de partículas, microscopia eletrônica de varredura, difratometria de raios X, medidas de rugosidade e ensaios de citotoxicidade. A fase HAp foi detectada como majoritária em todas condições e os produtos obtidos não são citotóxicos.

SYNTHESIS OF HYDROXYAPATITE FOR BIOMATERIAL APPLICATION

Magali de Campos Valente

ABSTRACT

The HAp is a biomaterial, applied as a dense bioceramics, porous or coating, in the medical and odontological areas. This work had as main objective to be a contributions in the search for a product to four methods of syntheses were analyzed: crystallization, sol-gel in aqueous means, sol-gel in alcoholic means and neutralization. Crystallization and neutralization showed the best results for thermal spraying stability, being thereafter reproduced in a pilot scale, in an open and closed system, with nitrogen atmosphere to avoid the formation of carbonatehydroxyapatite. The powders were used to obtain coating of titanium alloy. The technique of deposition engaged on this was one for thermal spraying with plasma and HVOF. The coatings were compared to the ones obtained with HAp available in the market. They showed as main phase the HAp also had a good qualitative adherence. Porous ceramic bodies were obtained by gelcasting the foam with the HAp from the neutralization method in a inert atmosphere. The main techniques used in the powder characterization metallic substrates, coatings, porous and dense ceramic bodies were: infrared absorption spectroscopy, induction coupled plasma, particle size distribution, surface roughness, scanning electron microscopy, X-ray diffractometry, infra-red spectroscopy. The HAp phase was detected as the majority in all conditions and results are no cytotoxic.

SUMÁRIO

	página
Agradecimentos	i
Resumo	iii
Abstract	iv
I. Introdução	1
II. Revisão bibliográfica	6
II.1 Biomateriais	6
II.2 Tecido ósseo	7
II.3 Implantes	10
II.3.1 Implantes ortopédicos	13
II.4 Ligas de titânio	17
II.5 Cerâmicas	18
II.6 Hidroxiapatita-HAp	19
II.6.1 Métodos de obtenção de hidroxiapatita	23
II.6.2 Recobrimentos de implantes com HAp por aspersão térmica	25
II.6.3 HVOF	28
II.6.4 Hidroxiapatita densa e porosa	29
III. Procedimento experimental	30
III.1 Síntese de hidroxiapatita em escala de laboratório	31
III.1.1 Método de cristalização	31
III.1.2 Método sol-gel	32
III.1.3 Método da neutralização	34
III.2 Teste de estabilidade da HAp	35
III.3 Obtenção da hidroxiapatita em escala piloto	35
III.4 Obtenção da hidroxiapatita porosa pelo método <i>gelcasting</i> de espumas	37
III.5 Equipamentos de aspersão térmica	38

III.5.1	Preparação dos substratos	39
III.5.2	Deposição por aspersão térmica	40
III.6	Teste de avaliação citotóxica	43
III.6.1	Avaliação citotóxica da HAp na forma de pó pelo método de supressão de colônias	43
III.6.1.1	Preparação dos extratos	44
III.6.1.2	Preparação das placas de cultura	44
III.6.2	Avaliação citotóxica da HAp porosa	46
III.6.3	Avaliação citotóxica dos substratos metálicos	46
III.6.4	Avaliação citotóxica dos substratos pelo método de difusão em ágar	46
IV.	Resultados e discussão	48
IV.1	Caracterização dos pós de HAp sintetizados em escala de laboratório	48
IV.2	Obtenção de corpos monolíticos de HAp	54
IV.3	Obtenção da hidroxiapatita em escala piloto	58
IV.4	Aspersão térmica	67
IV.4.1	Caracterização dos pós destinados à aspersão térmica	67
IV.4.2	Avaliação citotóxica dos pós utilizados na aspersão térmica	71
IV.4.3	Caracterização dos substratos metálicos	74
IV.4.3.1	Avaliação citotóxica dos substratos metálicos	77
IV.4.4	Caracterização dos recobrimentos	80
IV.4.4.1	Avaliação citotóxica dos recobrimentos	99
IV.5	Obtenção de corpos porosos de HAp	101
V.	Conclusões	105
	Referências bibliográficas	107

O que é vida? Como responder com palavras a tal pergunta, se várias idéias surgem na mente? Mas, a essa pergunta, o homem responde todos os dias, quando tenta melhorar as condições do meio em que vive. Essas condições vão desde atos mais simples como tomar banho ou organizar a mesa do escritório, até os mais complexos, como transformar os materiais disponíveis na natureza extraindo suas melhores propriedades e aplicá-los em diversas finalidades, sempre com o objetivo de gerar bem estar aos seres vivos. Um nível ainda maior de complexidade é atingido, quando certos materiais precisam ser utilizados dentro do que tem vida, para restaurar uma função original ou suprir uma necessidade do organismo, esses dispositivos que entram em contato com o que tem vida recebem o nome de implantes e o tecido que recebe o implante é chamado de tecido hospedeiro.

Os materiais empregados nessa área recebem o nome de biomateriais [1]. Na utilização dos biomateriais os principais problemas enfrentados são decorrentes às reações de defesa do organismo após a interação com o implante. Esses problemas estão sendo superados a partir do desenvolvimento de materiais especiais, que ao entrarem em contato com os tecidos vivos possuam características favoráveis a sua aceitação pelo tecido hospedeiro [2, 3].

A diversidade de materiais e dispositivos implantáveis, com aplicações em praticamente todo corpo humano são apresentados na figura 1 [2].

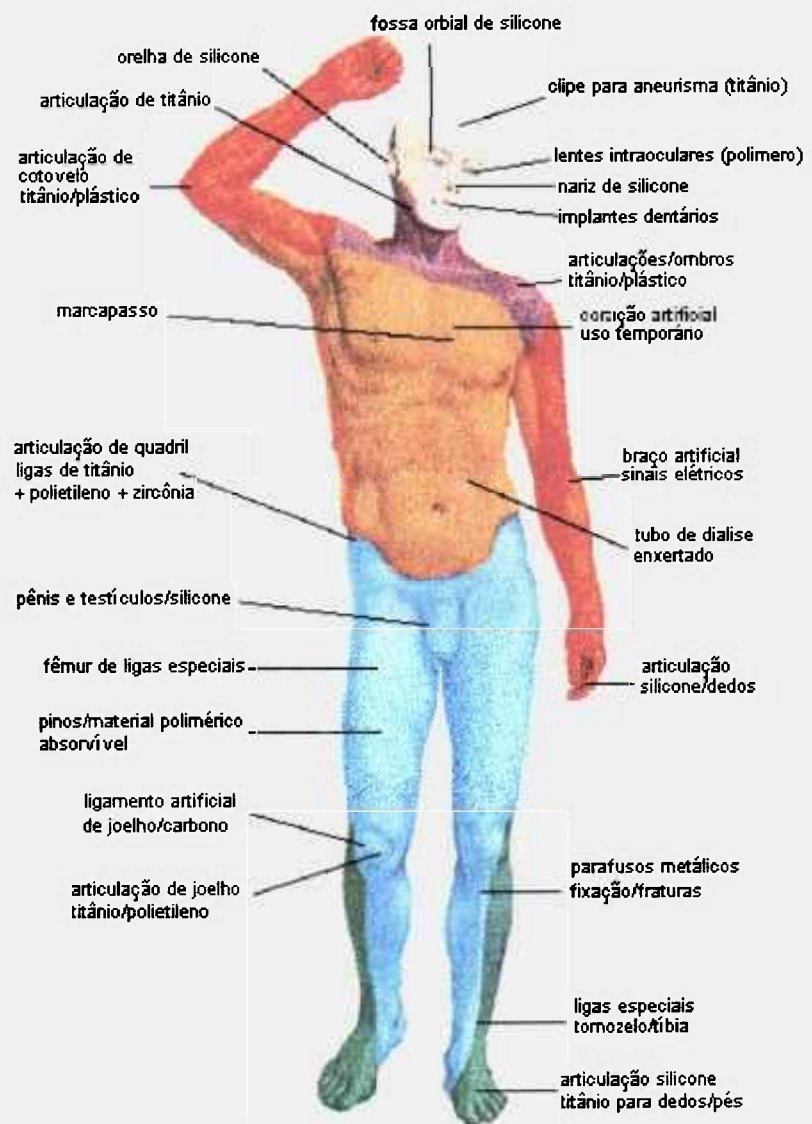


Figura 1. Dispositivos implantáveis utilizados no corpo humano.

Os biomateriais podem ser compostos metálicos, poliméricos e cerâmicos, desde que na condição de implante apresentem algumas das características: alta inércia química; expectativa de vida longa; sistema de produção simples; resistência a tensões mecânicas, e outras. Ao mesmo tempo os biomateriais não devem ter características como: sofrer modificações físico-químicas durante esterilização, produzir radicais livres, ser cancerígenos, incitar reações inflamatórias, sofrer desgaste superficial, formar trombos, sofrer modificações físicas na geometria da prótese depois de implantadas, apresentar falha por fadiga, e outras [2, 4].

Na ausência de um único material que supra algumas das exigências citadas acima, torna-se necessário combinar os materiais, explorando ao máximo o potencial físico, químico e biológico de cada um.

Em função do tipo de resposta provocada a partir da interação do implante com o meio biológico vivo (tecido hospedeiro) os biomateriais podem ser classificados em bioinertes, biotolerantes e bioativos [2, 3].

Os *bioinertes* mantêm suas propriedades físicas e mecânicas durante a vida útil do implante clínico. Esses materiais, possuem reatividade bioquímica mínima com o tecido hospedeiro sendo considerados estáveis. Nessa categoria, encontram-se os óxidos cerâmicos como alumina (Al_2O_3), titânia (TiO_2), zircônia tetragonal policristalina (ZrO_2 -TZP) e os materiais carbonosos. Os materiais bioinertes são usados tanto nas funções de revestimento, como de sustentação mecânica, principalmente em ortopedia, como cabeça de fêmur em implantes de quadris. Estas aplicações são possíveis, uma vez que os materiais apresentam alta densidade e facilidade de polimento termoquímico, o que diminui o coeficiente de atrito entre a cabeça de fêmur cerâmica e o componente acetabular, normalmente de polietileno, quando comparados aos materiais metálicos [1, 3].

Os *biotolerantes* representados por metais e polímeros apresentam reações bioquímicas na interação com o tecido vivo. Embora algumas dessas reações sejam

nocivas, são toleradas pelo meio biológico. Esses materiais são utilizados em função das propriedades mecânicas de sustentação. Os metais mais usados são o aço inoxidável, ligas de Vitalium (Cr-Co) e ligas de titânio. Usualmente, emprega-se o polimetilmetacrilato (PMMA) como polímero biotolerante [1,3].

Os *bioativos* são aceitos pelo tecido hospedeiro e não produzem reações tóxicas ou nocivas. Esses materiais são divididos em dois grupos, os reabsorvíveis e os de superfície ativa. As características dos materiais reabsorvíveis possibilitam aplicações de preenchimento de cavidades ósseas, servindo como suporte e condutor ósseo. Esses materiais quando implantados são absorvidos e transformados naturalmente em novo tecido ósseo. Diante destas condições, os materiais reabsorvíveis possuem tempo limitado de atuação. O sulfato de cálcio $(\text{CaSO}_4)_n \cdot \text{H}_2\text{O}$ e o tricalciofosfato (TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ são exemplos de materiais reabsorvíveis. Os materiais de superfície ativa não são absorvidos, mas desenvolvem ligações químicas com o tecido vivo. Estas ligações auxiliam no processo de união e fixação da prótese. Fazem parte do grupo de materiais bioativos: o biovidro, a hidroxiapatita (HAp), $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ e a fluorapatita (FHAp), $\text{F}_{10}(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$. Embora as reações do material com o meio vivo sejam bastante conhecidas, apresentam elevada complexidade [1, 2, 4, 6].

As propriedades da HAp, entre as cerâmicas bioativas, conferem grandes atrativos para aplicações cirúrgicas. Entretanto, sua utilização para fins ortopédicos é limitada devido a sua baixa resistência mecânica, especialmente sob tensão. Uma das formas encontradas para superar esta deficiência mecânica consiste no recobrimento de finas camadas de HAp sobre próteses metálicas [2, 7, 8].

O titânio, embora não sofra ataques corrosivos acentuados, possui baixa resistência mecânica que, quando comparada as das ligas de titânio, inviabiliza sua utilização ortopédica. Uma das propriedades interessantes desse material é sua afinidade com o tecido ósseo, possibilitando a fixação mecânica através do crescimento ósseo adjacente, sem a necessidade do cimento ortopédico [9, 10].

A liga Ti-6Al-4V destaca-se em aplicações cirúrgicas buco-maxilo-faciais, ortopédicas e cardiovasculares. Em implantes de natureza ortopédica o osso poderá ser substituído ou escorado com este material metálico. A superioridade desta liga decorre das combinações das propriedades químicas e físicas como: maior resistência a corrosão quando comparados a outras ligas e densidade próximos aos do tecido ósseo [11, 12].

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de metodologia de síntese de HAp e sua aplicação como cerâmica densa, porosa e em revestimentos de substratos metálicos. Optou-se pela hidroxiapatita por ter composição química similar aos ossos bem como apresentar propriedades bioativas. Como substratos metálicos foram escolhidos titânio puro e liga Ti-6Al-4V. A técnica de recobrimentos por aspersão térmica é uma das mais favoráveis em termos de propriedades mecânicas, resistência a corrosão em meio biológico e maior retenção entre recobrimento/substrato. A combinação de Ti e Ti-6Al-4V com HAp, é muito empregada em aplicações ortopédicas e odontológicas.

O programa de Tese foi definido para se obter a biocerâmica, HAp com alto teor de pureza, primeiramente em escala de laboratório e depois, piloto. O material sintetizado foi processado na forma de cerâmica densa, porosa e de recobrimento. Optou-se pelo tipo de recobrimento utilizado comercialmente, aspersão térmica. Os recobrimentos foram comparados aos obtidos com a HAp comercial utilizada em implantes de natureza ortopédica.

II.1 Biomateriais

Os materiais sempre fizeram parte do nosso cotidiano, inclusive em situações médicas, tem-se evidências arqueológicas de que há milênios o homem já os utilizava tentando substituir partes do corpo humano. O avanço nessa área foi prejudicado até 1860 principalmente por falta de técnicas de assepsia que deveriam ser praticadas nos procedimentos cirúrgicos [13].

Os dois grandes marcos recentes no desenvolvimento dos biomateriais foram as duas Grandes Guerras. A necessidade de se evitar principalmente a amputação de membros que haviam perdido as funções fez com que o homem utilizasse praticamente todos os elementos químicos disponíveis. Os danos provocados a saúde dos pacientes, por muitos dos materiais utilizados nos atos cirúrgicos, foram considerados catastróficos. Esses resultados fizeram com que o Comitê Americano para o Tratamento de Fraturas do Colégio Americano de Cirurgiões recomendasse formalmente em 1947 a utilização de aços inoxidáveis. Após esse período, além dos metais, outros materiais considerados adequados foram desenvolvidos como os polímeros, cerâmicos e compósitos [13, 14].

O material a ser utilizado na área médica e odontológica deve desempenhar a função a que se destina e ser aceito pelo corpo do hospedeiro. Um biomaterial pode ser definido como um material não natural utilizado em dispositivo médico, com intenção de interagir com sistemas biológicos” [15]. Segundo Park [16], “biomateriais são tudo que, de modo contínuo ou intermitente, entra em contato com fluidos corpóreos, mesmo que esteja localizado fora do corpo”. Estas definições elucidam que os biomateriais interagem diretamente com o meio biológico vivo, evidenciando que esta interação entre o material e o tecido vivo é um importante fator no tratamento.

A capacidade de um material funcionar com uma resposta apropriada do hospedeiro em uma aplicação específica é chamada de biocompatibilidade. Quando

os materiais utilizados como implantes não são biocompatíveis, o organismo vivo isola o dispositivo com a formação de uma camada aderente de tecido fibroso pouco vascularizado de espessura variável; quanto maior a espessura menor a aceitação, [17, 18, 19].

As situações mais comuns que requerem a utilização de biomateriais vão desde problemas psicológicos e estéticos até extração de tumores, administração de drogas de maneira controlada, enfermidades que ocasionam danos irreversíveis, defeitos congênitos com deficiências funcionais e atrofia com perda gradual de tecidos. Casos clínicos como esses são satisfeitos com biomateriais que desempenhem a função desejada e, para isto é necessário que o mesmo possua um conjunto de propriedades específicas, isto é, seja biofuncional. Algumas das propriedades que asseguram a biofuncionalidade são: transmissão de cargas e distribuição de tensões, articulação com baixo atrito, preenchimento de cavidades, geração e aplicação de estímulos elétricos, transmissão de sons, transporte e emissão de drogas, guia para regeneração de tecidos etc. [20, 21].

II.2 Tecido ósseo

Na maioria dos vertebrados, o esqueleto não é apenas um conjunto de peças bem articuladas entre si, mas também um banco dinâmico de reservas minerais no qual o organismo armazena 90% de cálcio na forma de hidroxapatita e o libera quando necessário. O íon cálcio é importante para o funcionamento de diversos sistemas enzimáticos, inclusive os responsáveis pela contração muscular e pela transmissão de impulso nervoso, coagulação do sangue e adesão celular [22, 23].

O tecido ósseo é uma variedade do tecido conjuntivo e constitui o esqueleto sendo um dos mais resistentes e rígidos do corpo humano. Serve de suporte para as partes moles e protege órgãos vitais, como os contidos nas caixas cranianas e torácica e no canal raquidiano. Aloja e protege a medula óssea, formadora das

células do sangue. Além dessas funções, proporciona o apoio aos músculos esqueléticos, transformando suas trações em movimentos úteis. Os ossos longos constituem sistemas de alavancas que ampliam as forças geradas na contração muscular [24, 25].

O tecido ósseo é formado por células e um material intercelular calcificado, chamado de matriz. As células são os osteócitos, osteoblastos e osteoclastos. Os osteócitos situam-se em cavidades ou lacunas no interior da matriz e são essenciais para a manutenção da matriz mineralizada do osso. Sua morte é seguida por reabsorção da matriz. Os osteoblastos são os produtores da parte orgânica da matriz, colágeno e glicoproteínas. Os osteoclastos, são células gigantes multinucleadas, relacionadas com a reabsorção do tecido ósseo e que participam dos processos de remodelação dos ossos [23, 24, 26, 27].

A parte inorgânica representa cerca de 50% em peso da matriz óssea que varia dependendo da função e do tipo de osso. O osso cortical é composto aproximadamente por 70% em peso de constituintes minerais e 30% em peso de orgânicos. Os íons mais encontrados são os fosfatos e cálcio. Há também íons bicarbonatos, magnésio, potássio, sódio e citratos, em pequenas quantidades. O citrato é responsável pela captura de íons cálcio formando um complexo que serve de base à formação da HAp do osso [28, 29].

Cálcio e fosfato formam cristais que apresentam a estrutura da hidroxiapatita pouco cristalina. Por microscopia eletrônica, os cristais de HAp aparecem sob a forma de agulhas ou tabletes alongados, medindo $40 \times 25 \times 3 \text{ nm}^3$, que se alinham ao longo das fibras colágenas ocupando espaços pré-determinados. A rede cristalina da HAp pode sofrer adsorção ou ter seus constituintes substituídos por íons como estrôncio, zinco, magnésio, fluoretos, hidroxilas e, outros íons comuns. Os íons que formam a superfície dos cristais de HAp são hidratados formando uma esfera de hidratação que facilita a troca de íons entre o cristal e o fluido intersticial [26, 30].

A parte orgânica da matriz é formada por fibras colágenas, com aproximadamente 95%, e por substância fundamental amorfa 5%, que contém mucopolissacarídes ácidos e neutros associados a proteínas. As composições e propriedades das partes orgânicas e inorgânicas sofrem diferenciação com a idade, sexo, tipo de tecido, dieta alimentar e hábitos saudáveis [30, 31].

Quanto as propriedades mecânica, apesar da resistência às tensões e da dureza do osso, o tecido ósseo é muito plástico, sendo capaz de remodelar sua estrutura interna em resposta a modificações nas forças a que estão submetidos normalmente. Essas propriedades são possíveis porque o osso é um material compósito. A HAp óssea é resistente à compressão, com baixa resistência sob tração e o módulo de elasticidade elevado. O colágeno, por outro lado tem limite de resistência a tração elevado, mas baixo módulo de elasticidade. A combinação resulta em um material compósito com alta resistência a tração e alto módulo de elasticidade, leve e bastante flexível. As trincas nos cristais de HAp não se propagam nas fibras adjacentes de colágeno, estas podem ser deformadas, mas não necessariamente rompidas. Os valores das propriedades mecânicas do osso são apresentados na tabela 1 [31, 32, 33].

O tecido ósseo apresenta duas variedades, o osso esponjoso e o cortical (denso). Ambos existem em todos os ossos, mas a quantidade de cada um depende da solicitação a uma determinada função, isto é, as frações volumétricas de cada constituinte geram propriedades mecânicas distintas [32, 33].

Tabela 1 - Propriedades mecânicas do osso cortical humano.

propriedade	valor
resistência à tração	133 MPa
resistência à compressão	193 MPa
resistência ao cisalhamento	68 MPa
módulo de elasticidade	17 GPa

As propriedades desejadas do osso são muito dependentes de sua vitalidade. O osso quando vivo sofre constante remodelamento estrutural para se adaptar às mudanças nas tensões a que é submetido. O remodelamento é uma importante característica do tecido ósseo que continuamente repara pequenas danificações. O osso induz o remodelamento dependendo do tipo e do grau de tensão aplicado. Embora haja a presença de uma resposta adaptada, os meios mecânicos que a induzem não são totalmente claros. Uma hipótese atrativa é que as mesmas cargas que deformam os ossos também servem de estímulo, de forma que a quantidade de osso presente, juntamente com sua arquitetura, são influenciados por muitas forças, que são necessárias a sua resistência [31, 34].

II.3 Implantes

A implantação de dispositivos no corpo humano é uma prática de longa data, marcada principalmente até 1875 pela utilização de metais puros como ouro, prata e cobre. As ligas metálicas tornaram-se mais utilizadas entre 1875 e 1925 coincidindo com avanços nas técnicas cirúrgicas. O período posterior a 1925 pode ser considerado como a era moderna dos biomateriais metálicos. Hoje o número de biomateriais utilizados cresceu muito, e como consequência, as áreas médicas e odontológicas têm à sua disposição inúmeros dispositivos implantáveis, que variam na forma, tamanho, tipo de material e preço. A grande diversidade obtida em termos de materiais implantáveis só foi possível a partir da interação e cooperação de profissionais especializados de diferentes áreas. Muitos problemas já foram superados ou estão sendo resolvidos e outros ainda não podem ser solucionados com a tecnologia disponível [35, 36].

Os fatores que determinam o sucesso do implante e influenciam na resposta do hospedeiro, após o ato cirúrgico, estão relacionados diretamente ao material, cirurgião e paciente[2].

Em relação ao material, deve-se ter um controle rigoroso durante o processamento para que a composição química seja de alto teor de pureza, minimizando danos teciduais. Na utilização de material particulado, na faixa de 1 a 4 μm , estimula-se a fagocitose e a formação de macrófagos, isto é, as células identificam as partículas como material estranho e tentam eliminá-las, incitando reações inflamatórias independente do biomaterial [19].

A atividade celular também é afetada pelo formato das partículas, o esférico é preferido ao pontiagudo por evitar lesões no citoplasma das células [19, 26].

Um outro tipo de atividade celular é o aparecimento de uma camada de tecido fibroso que encapsula e isola o implante do tecido adjacente. Este comportamento é prejudicial ao sucesso do trabalho, pois perde-se a possibilidade de fixação do implante no tecido hospedeiro, e ocorre principalmente nas interfaces com materiais bioinertes ou biotolerantes [19, 26].

À contribuição do cirurgião está relacionada, principalmente a observação e escolha de técnicas cirúrgicas de sucesso estatístico, além da conservação do acabamento superficial do implante durante a manipulação e colocação do mesmo.

Em relação ao paciente, os fatores mais importantes e inerentes são idade, sexo e raça, outros como hábitos alimentares também influenciam. Caso o paciente seja portador de doenças crônicas ou degenerativas será mais difícil de se obter o sucesso, também é imprescindível que se dê o acompanhamento pós-operatório e o seguimento na reabilitação.

Determinados tipos de implantes proporcionam boas respostas no tecido hospedeiro porque têm a capacidade de interagir diretamente com o osso sem promover a formação do tecido fibroso interposto, constituído de fibroblastos. Esse comportamento foi postulado em 1969 por Branemark e colaboradores. O termo osseointegração foi usado pela primeira vez em 1977 em seu livro "Implantes

osseointegrados” [17]. Em 1985, o mesmo autor sugeriu a seguinte definição: “A osseointegração é definida como uma conexão funcional e estrutural direta entre o osso vivo e organizado e a superfície de um implante submetido a forças”. Esta definição é criticada por Albrektsson e Sennerby, por não definir o nível de resolução do contato direto e não incluir uma estimativa quantificada da proporção mínima de contato osso-implante. O termo osseointegração pode ser definido como o “contato estabelecido entre o osso normal e remodelado e a superfície do implante sem a interposição de tecido conectivo não ósseo, a nível de microscopia óptica” [35]. Os implantes à base de titânio e suas ligas são os que têm apresentado maior porcentagem de sucesso de casos de osseointegração [37, 38].

A utilização de implantes metálicos difunde-se dia a dia, por estarem cumprindo o requisito de sobrevida, proporcionando ao paciente maiores intervalos sem intervenção cirúrgica. Esse comportamento deve-se às propriedades físico-químicas, propriedades mecânicas, e compatibilidade com o ambiente biológico. O período de sobrevida do implante deve ser monitorado constantemente de forma que se avaliem possíveis alterações químicas nos tecidos e a formação de neoplasias. Novas ligas e acabamentos superficiais têm melhorado a resistência à corrosão, geralmente associada às condições de solitação mecânica, que é um dos fatores responsáveis pelo grande número de falhas mecânicas [37, 38].

Em função das aplicações e dos comportamentos celulares citados, os biomateriais para implantes devem ser selecionados de acordo com a biocompatibilidade e biofuncionalidade. Os implantes selecionados devem manter as propriedades físicas e químicas durante e após a esterilização.

A esterilização pode ser feita principalmente pelo aumento da temperatura (estufa seca ou a vapor), por produtos químicos (óxido de etileno) e por radiação gama. Os materiais metálicos e cerâmicos de interesse como biomaterial não sofrem alterações em temperaturas na faixa de 160 a 190°C para a esterilização a seco, que é o método mais simples e econômico. Os polímeros, mesmo na utilização de vapor

em temperaturas mais baixas, na faixa de 120 a 135°C, sofrem mudanças nas suas propriedades, restando a utilização de produtos químicos ou radiação gama, que podem gerar ação tóxica ou degradante [2, 39, 40, 41, 42].

II.3.1 Implantes ortopédicos

Os implantes de natureza ortopédica utilizados em artroplastia (substituição de articulações) tem maior complexidade geométrica do que os implantes odontológicos, devido a dinâmica dos movimentos. A preparação do leito ósseo que recebe o implante também é mais bem instrumentado (preparado). Os objetivos da substituição articular total são de eliminar ou reduzir a dor, corrigir deformidades, restabelecer a função e prevenir ou melhorar os efeitos dolorosos secundários em articulações adjacentes [2, 4].

As cargas que atuam sobre implantes ortopédicos, de um modo geral, são bastante altas e variam em função do tipo de implante e da atividade física do paciente. Estudos demonstram que a cabeça do fêmur suporta em média 2,5 vezes o peso do corpo, podendo chegar a valores próximos de 4,9. Uma pessoa com atividade física normal (um não atleta) dá cerca de 2,5 milhões de passos por ano. Essas solicitações no implante de quadril caracterizam uma situação típica de solicitação à fadiga. As propriedades mecânicas mais importantes para aplicações ortopédicas são resistência mecânicas à tração, compressão e flexo-compressão.

Outra propriedade mecânica importante é o módulo de elasticidade. O interessante é ter materiais que tenham módulo de elasticidade próximos ao tecido ósseo. Na tabela 2, são apresentados valores do módulo de elasticidade para alguns materiais [2, 42].

Tabela 2 - Módulo de elasticidade de diversos materiais utilizados em implantes e tecidos naturais.

Material	Módulo de Elasticidade GPa
aço inox 316 L	200
liga Co-Cr fundida	248
titânio	110
Ti6Al4V	124
Al ₂ O ₃	365
ZrO ₂	200
ZrO ₂ -Y ₂ O ₃	205
osso cortical	3,8-25
osso esponjoso	0,7 - 4
dentina	18,2
esmalte dentário	82,4
Hidroxiapatita sintética	110 - 279

O implante de quadril consiste dos componentes: acetabular, implantado dentro do quadril, e femoral, implantado dentro do fêmur. Há vários modelos projetados, que variam em geometria para maximizar a transferência de tensão para a haste femoral rodeada com osso. O implante de quadril sofre solicitação mecânica imediatamente após a cirurgia. O osso da interface traumatizado sofre um remodelamento e passa a responder às forças durante o andar; não há um estágio de repouso para o osso se regenerar, como acontece nos implantes dentários. Os requisitos necessários para que ocorra a osseointegração são rigorosos e durante os primeiros meses o paciente deve minimizar a subida de escadas e levantar-se de cadeira, especialmente na utilização de implantes com haste curvada [34]. O fêmur e a prótese total de quadril utilizada em artroplastia são apresentados na figura 2.

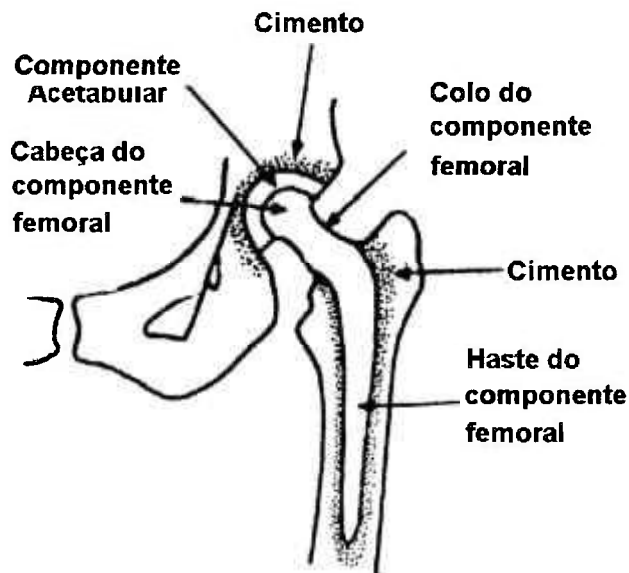


Figura 2 - Esquema de prótese total de quadril cimentada.

Charley iniciou a nova era das artroplastias de substituição com a introdução de componente femoral metálico e o acetábulo de polietileno de alta densidade, fixados com cimento acrílico. A reação de polimerização do cimento acrílico é exotérmica, necrosando as células adjacentes e provocando inflamações, como acontece com o polimetilmetacrilato (PMMA). A principal vantagem na utilização desse material é a fixação imediata do implante dentro do osso. Embora os resultados iniciais fossem animadores, com o passar dos anos, surgiram complicações, como a soltura do implante, criando novos desafios a serem enfrentados. A perda da fixação dos implantes é preocupante, principalmente em pacientes jovens, submetidos à artroplastia total, uma vez que são candidatos em potencial a mais de uma artroplastia de revisão durante sua existência. No final da década de 70, iniciou-se a utilização de artroplastia não cimentada, visando a fixação biológica dos implantes, que requeriam basicamente parâmetros biocerâmicos, alta precisão cirúrgica e acurada preparação do leito ósseo [36].

Em artroplastia de quadril, o nível de sollicitação mecânica que as ligas metálicas empregadas suportam não foram ainda superadas por nenhum outro material. Em contrapartida, a osseointegração é mais bem conseguida com materiais bioativos. A natureza desse tipo de implante necessita da bioatividade da cerâmica e

das propriedades mecânicas do metal. A combinação dessas propriedades é melhor explorada em implantes de materiais compósitos ou de metais recobertos por materiais bioativos [6, 43].

Os compósitos utilizados nessa área são constituídos de matriz bioinerte ou biotolerante e material bioativo disperso, e os materiais recobertos são bioinertes ou biotolerantes com recobrimento de material bioativo. Para os materiais compósitos, embora sejam de fácil obtenção, a falta de união interfacial entre cada constituinte gera falhas diante das solicitações mecânicas, e a superfície de interface com o tecido hospedeiro apresenta resposta tecidual diferenciada para cada constituinte [8, 43, 44].

O recobrimento de materiais bioinertes ou biotolerantes com materiais bioativos permite a combinação de propriedades mecânicas e bioativas. Os principais métodos de deposição utilizados são: *ion sputtering*, sol-gel, recobrimento eletrolítico, recobrimento biomimético e aspersão térmica. As principais dificuldades enfrentadas referem-se à adesão da camada bioativa ao substrato. O método de deposição por aspersão térmica é o único utilizado comercialmente. A combinação desses materiais oferece resultados interessantes por possibilitar, ao mesmo tempo, a retomada parcial ou total da marcha e a recuperação mais rápida do tecido ósseo localizado por meio da osseointegração após cirurgia [10, 45, 46, 47].

II.4 Ligas de titânio

O titânio e suas ligas são considerados materiais biocompatíveis e tem sido utilizados com sucesso em implantes odontológicos e ortopédicos. Vários estudos tem demonstrado que o titânio forma um contato íntimo com o tecido ósseo. O titânio e suas ligas apresentam este tipo de comportamento em função da camada passivante que se forma em solução aquosa. O filme óxido formado é estável em ambiente fisiológico. Este material possibilita a fixação mecânica através do

crescimento ósseo adjacente, sem a necessidade do cimento ortopédico. Esta é principal vantagem comparada à utilização de outras ligas como o aço inoxidável 316-L e as ligas de Cr-Co [37, 42, 48, 49,].

O titânio puro tem boa resistência à corrosão, porém devido à baixa resistência mecânica, sua utilização é restrita a locais onde as solicitações mecânicas são baixas [10, 37, 42].

Na área médica, o titânio puro foi utilizado pela primeira vez na década de 50; a liga Ti-6Al-4V no final da década de 70; a liga Ti-6Al-2,5Fe em 1980 e a liga Ti-6Al-7Nb foi utilizada em 1986 em implantes totais de quadril [37, 50].

As ligas de titânio combinam as propriedades mecânicas com resistência à corrosão, além de apresentarem peso específico próximos ao do osso. A liga mais conhecida é a liga Ti-6Al-4V, desenvolvida inicialmente para aplicações em aeronáutica. Uma das vantagens das ligas de titânio é apresentar módulo de elasticidade inferior ao das outras ligas utilizadas em implantes (tabela 2). A temperatura ambiente, a liga Ti-6Al-4V consiste de uma mistura de duas fases alotrópicas: a fase α , hexagonal compacta, estabilizada pelo alumínio e a fase β , cúbica de corpo centrado, estabilizada pelo vanádio. Na necessidade de implantes de natureza ortopédica, o osso poderá ser substituído ou escorado com este material metálico. Os poucos casos reportados na literatura de falhas por fadiga em hastes femorais de Ti-6Al-4V forjado são atribuídos à forma do implante e defeitos na fabricação. Destaca-se em aplicações cirúrgicas buco-maxilo-faciais, ortopédicas e cardiovasculares [42, 49, 50, 51, 52, 53].

II.5 Cerâmicas

Materiais cerâmicos são largamente utilizados em implantes por apresentarem aspectos como, alta resistência à compressão, propriedades anti-

corrosivas e por serem bioinertes. As principais cerâmicas utilizadas em implantes ortopédicos são alumina, zircônia, biovidros e hidroxiapatita [54].

A alumina (Al_2O_3) oferece uma vantagem principal sobre os metais e polímeros: baixa taxa de desgaste. E com isso, há uma baixa concentração de partículas desgastadas (fragmentos) ao redor do tecido. A alumina para ser utilizada em implantes cirúrgicos deve apresentar pequeno tamanho de grão, alta densidade relativa e alto teor de pureza. Essas exigências precisam ser observadas criteriosamente durante o processo de fabricação [2, 54].

A zircônia (ZrO_2) estabilizada nas fases tetragonal e cúbica é um material qualificado para implantes de sustentação. Apresenta vantagens, em relação à alumina, por possuir maiores resistência à fratura e tenacidade. A zircônia gera um certo nível de radiação gama proveniente de pequenos traços de tório, que não são completamente eliminados pelas técnicas químicas de purificação da matéria-prima. Essa radiação embora seja pequena e inofensiva proporciona desconfiança da classe médica e dos pacientes [2, 3, 54].

Os vidros de composição próxima a 45% de SiO_2 , 24,5% de Na_2O , 24,5% de CaO e 6% de P_2O_5 são chamados de biovidros e têm a capacidade de formar ligações químicas estáveis com o osso adjacente. Estes materiais são mais utilizados em próteses de ouvido médio e implantes ortodônticos, por apresentarem resistência mecânica insuficiente para próteses de natureza ortopédica [2, 4, 5].

II.6 Hidroxiapatita - HAp

A hidroxiapatita é utilizada na área médica e odontológica como material de revestimento de implantes metálicos ou no preenchimento de cavidades ósseas. As aplicações incluem bolsas periodônticas ou fraturas onde o preenchimento é necessário, permitindo a partir da osseointegração a reestruturação

óssea local. Parafusos, aplicados em implantes dentários e ortopédicos, revestidos com HAp, apresentam torque de remoção significativamente maior do que os de titânio sem revestimento. A HAp também pode ser utilizada em implantes de ouvido médio, formando um selo contra bactérias [2, 6, 55, 56, 57].

Apatita é um termo utilizado para designar uma família de compostos com estrutura similar [58]. O grupo das apatitas compreende espécies de fórmula geral $R_5Y(XO_4)_3 = (RY)(XO_4)_3$, onde $R = Ca, Mg, Pb$ e Mn ; $Y = F, Cl, Br$ e OH e $X = P, As$ e V . Apatitas: $(CaF)Ca_4(PO_4)_3$ – fluorapatita; $(CaCl)Ca_4(PO_4)_3$ – cloroapatita; $(CaOH)Ca_4(PO_4)_3$ -hidroxiapatita [56, 59].

Na hidroxiapatita, o fósforo é cercado por quatro átomos de oxigênio situados nos vértices de um tetraedro (figura 3). A unidade monomérica ou tetraedro simples $(PO_4)^{3-}$ é chamada de ortofosfato, as cadeias simples P-O-P são polifosfatos e os anéis são metafosfatos [2, 59].

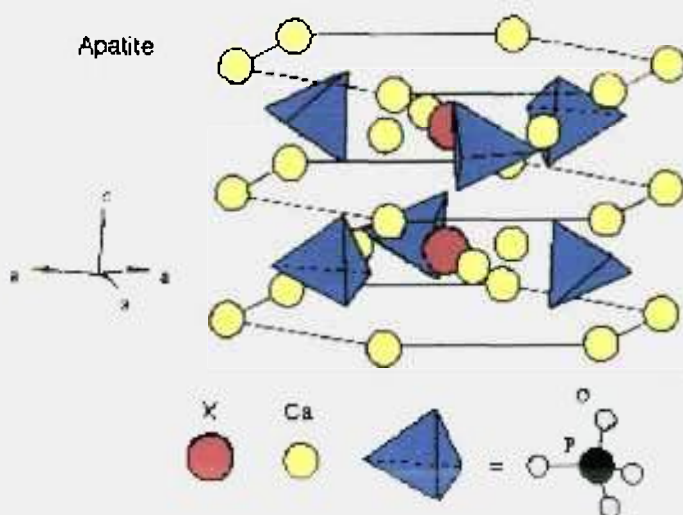


Figura 3 - Estrutura cristalina da apatita $[Ca_{10}(PO_4)_6(X)_2]$; $X = OH, F, Cl$ e Br .

O diagrama de fase binário apresenta as fases possíveis da HAp em condição de equilíbrio. A HAp é representada como um composto estequiométrico: tetracalciofosfato, com fórmula química de $C_4P_2O_9$ e designada como “ C_4P ”, e tricalciofosfato, com a fórmula química de $Ca_3(PO_4)_2$ e designada como “ C_3P ”. A região de interesse está entre os dois compostos estequiométricos. Em pressão parcial de água zero, a hidroxiapatita não é estável. A combinação de tetracalciofosfato e tricalciofosfato existe em alta temperatura e permanece em uma constante composição de fase em baixa temperatura. Somente a estrutura do tricalciofosfato pode mudar durante o resfriamento (figura 4) [2, 6, 56].

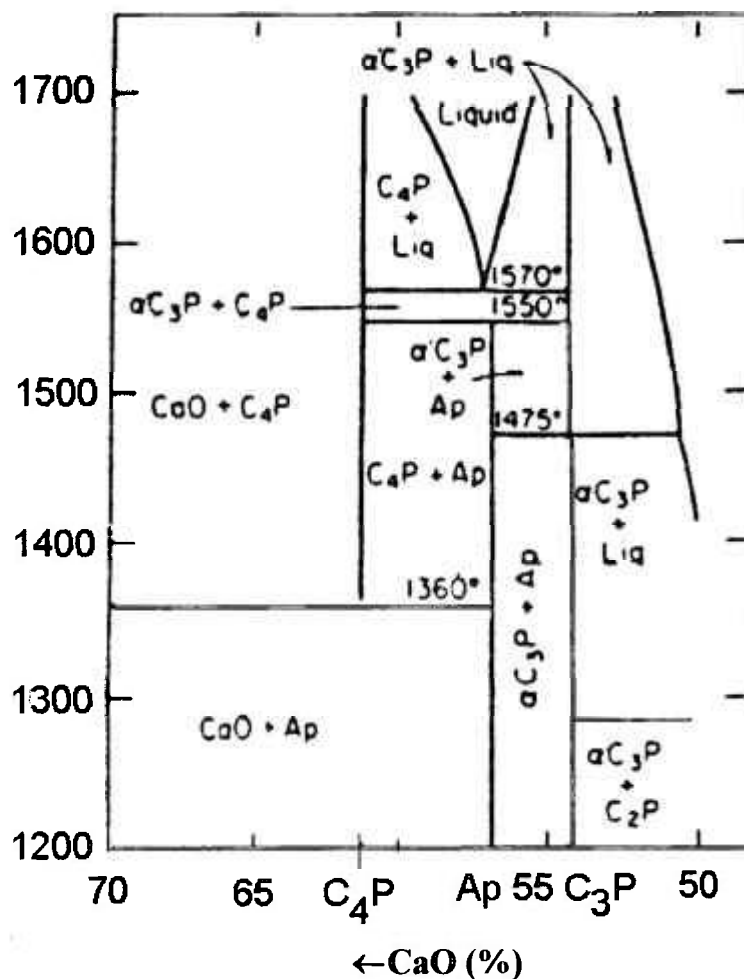


Figura 4 – Diagrama de fase parcial do sistema CaO/P_2O_5 em alta temperatura ($^{\circ}C$ no eixo vertical). Pressão de vapor de água = 500mmHg.

A razão entre o óxido catiônico (CaO) e o óxido aniônico (P₂O₅) determina o tipo de fosfato de acordo com a tabela 3.

Tabela 3 - Razão estabelecida entre CaO e P₂O₅.

Razão entre óxidos	Nomes
$R = 0$	Pentóxido de fósforo
$0 < R < 1$	ultrafosfatos
$R = 1$	metafosfatos
$1 < R < 2$	polifosfatos
$R = 2$	Pirofosfatos
$2 < R < 3$	Mistura de piro e ortofosfatos
$R = 3$	ortofosfatos
$R > 3$	Ortofosfato e óxido do metal

Quando hidróxido de cálcio e ácido ortofosfórico são misturados, é muito difícil evitar que no fosfato de cálcio resultante sejam obtidos também o hidróxido e ácidos livres. Como o fosfato de cálcio é bastante insolúvel, esta reação em geral se completa. É possível cristalizar os ortofosfatos de monocálcio e de dicálcio, a partir de solução aquosa, porém isso não ocorre para o ortofosfato de tricálcio, já que nas condições em que seria esperado obtê-lo, apenas a hidroxiapatita é produzida [2].

A forma alfa do ortofosfato de cálcio é obtida termicamente acima de 1100°C e a forma beta, abaixo desta temperatura. Como a transição entre as duas formas é lenta, ambas podem ser observadas à temperatura ambiente.

A hidroxiapatita é representada pelas fórmulas: Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ e Ca₅(PO₄)₃OH, forma simplificada. A HAp de estrutura hexagonal apresenta célula unitária com dimensões de a₀ = 0,9432 nm e c₀ = 0,6881 nm, pertencente ao grupo espacial P6_{3/m}. O íon hidroxila pode ser substituído pelo fluoreto aumentando a estabilidade da estrutura [2].

A razão Ca/P da hidroxiapatita estequiométrica estabelecida por difração de raios X e de nêutrons é de 1,67, no entanto as hidroxiapatitas deficientes em cálcio são as de maior interesse biológico, porque a razão Ca/P no osso é mais próxima de 1,5 [2].

A HAp óssea não é estequiométrica, sendo deficiente em cálcio em até 10%. O balanço eletrônico das cargas pode ser obtido pela ausência de grupos hidroxilas (OH⁻) ou alternativamente pela presença do ânion hidrogenofosfato (HPO₄²⁻) no lugar do PO₄³⁻. O cálcio pode também ser substituído, principalmente por cátions de magnésio, sódio e estrôncio. A hidroxila pode ser substituída por ânions como carbonato, ortofosfato, fluoreto ou cloreto. A análise química do osso apresenta composição de 4 a 6% de carbonato, 0,9% de citrato, 0,5% de magnésio, 0,7% de sódio e traços de flúor, cloro, potássio, estrôncio e outros íons metálicos [2].

A HAp sintética com carbonato substituído sofre tensão na rede, o que explica o aumento da taxa de dissolução no sistema “*in vitro*” quando o CO₃²⁻ está presente. Esta rede é mais representativa para ossos, que também têm muitos outros elementos substituídos na estrutura [54, 60, 61].

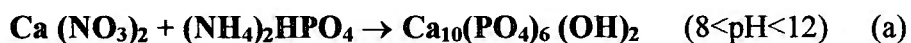
A HAp sintética é um dos materiais mais utilizados com sucesso em implantes por formar ligações químicas com a HAp óssea, promovendo a osseointegração. Essas ligações químicas de natureza covalente possibilitam à interface tecido vivo/implante suportar esforços mecânicos significativos, além de estimular o crescimento ósseo [56, 62, 63].

II.6.1 Métodos de obtenção de hidroxiapatita

A hidroxiapatita pode ser sintetizada por diferentes métodos: aquoso, seco e hidrotermal, de acordo com as seguintes reações [6, 64].

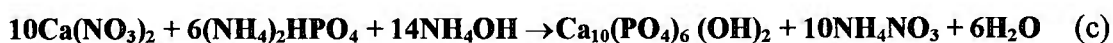
II.6.1.1 Método aquoso

O método aquoso produz HAp por duas reações principais. Estas reações de obtenção (a e b) são conhecidas como método por precipitação e neutralização:



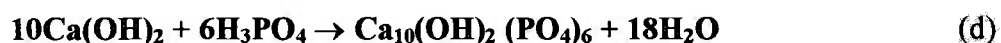
O método de síntese por sol-gel produz partículas pequenas de HAp. A reação pode ser uma variação das reações (a) e (b) em meio alcoólico ou reações com alcóxidos do metal [6, 45, 46, 65].

A HAp obtida por precipitação utiliza sais de cálcio, nitrato ou cloreto de cálcio com o hidrogenofosfato de amônio em pH elevado, ajustado com hidróxido de amônio concentrado. A reação ocorre a temperatura de 90°C. Este método produz HAp com bom rendimento de acordo com a reação (c). O produto obtido é homogêneo [33, 34]:



A desvantagem do método está na necessidade de um grande número de lavagens do precipitado com água para se eliminar o nitrato de amônio [64].

A HAp é obtida por neutralização a partir da reação do ácido ortofosfórico, em solução com uma suspensão de hidróxido de cálcio. Por este método, produz-se HAp com bom rendimento de acordo com a reação [64]:

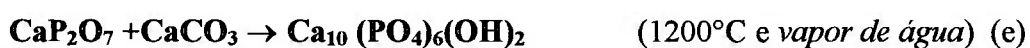


A principal vantagem do método é a formação de um produto com alto teor de pureza, já que são obtidos apenas HAp e água. Como a reação ocorre em

temperatura ambiente, a utilização de reatores de aço inoxidável pode ser eliminada, utilizando-se outros materiais menos tóxicos como polímeros e vidros [66, 67, 68].

II.6.1.2 Método seco

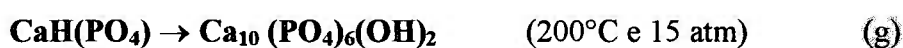
A reação por método seco, ocorre no estado sólido e produz HAp por duas reações principais:



Por este método, obtém-se HAp fina e com boa cristalinidade [2].

II.6.1.3 Método hidrotermal

O método hidrotermal apresenta basicamente duas variações:



O método hidrotermal produz cristais grandes e perfeitos de acordo com variações na pressão, tempo e temperatura [2, 6].

II.6.2 Recobrimentos de implantes com HAp por aspersão térmica

Aspersão térmica é uma técnica de deposição de revestimentos que no Brasil é pouco difundida comparativamente aos países mais avançados tecnologicamente. A técnica é conhecida como aspersão térmica, metalização, pulverização ou *spray* térmico [19, 69].

O processo consiste basicamente em se depositar um material na forma de *spray* (pulverização de pequenas gotas) sobre uma superfície previamente preparada. A versatilidade do processo está na utilização de materiais como metais, cerâmicas, polímeros, na forma de pó e fio [19, 70, 71].

O material é conduzido em uma pistola de aspersão (figura 5), que possui uma fonte de calor, cuja origem pode ser plasma, combustão de gases ou arco elétrico, dependendo do tipo de equipamento. O aquecimento por chama plásmica consiste basicamente em se passar uma corrente de gases através de um arco elétrico de corrente contínua, aplicado entre dois eletrodos. Este arco promove a ionização dos gases, em um estado de alta energia, o plasma. A temperatura é elevada e são alcançados valores da ordem de até 30.000°C, entre os eletrodos, dependendo da potência ou equipamento [72, 73]. Regiões mais afastadas dos eletrodos apresentam temperaturas menores, a distâncias de aproximadamente 6 cm são encontrados valores na faixa de 1000 a 1500°C. A fonte de calor tem a função de fundir parcial ou totalmente o material a ser depositado. A figura esquematiza o equipamento por chama plásmica. Os gases do plasma, devido às altas temperaturas atingidas, se expandem violentamente, acelerando as partículas do material contra a superfície do substrato. As partículas, em estado altamente energético, sofrem achatamento ao se chocarem com a superfície, ao mesmo tempo em que sofrem resfriamento rápido, resultando em revestimentos com morfologia lamelar. Entre as camadas lamelares são também observados poros ilustrados na figura 6 [74]. A espessura do recobrimento pode variar de acordo com a necessidade, de poucos micrômetros até centímetros [74, 75, 76, 77].

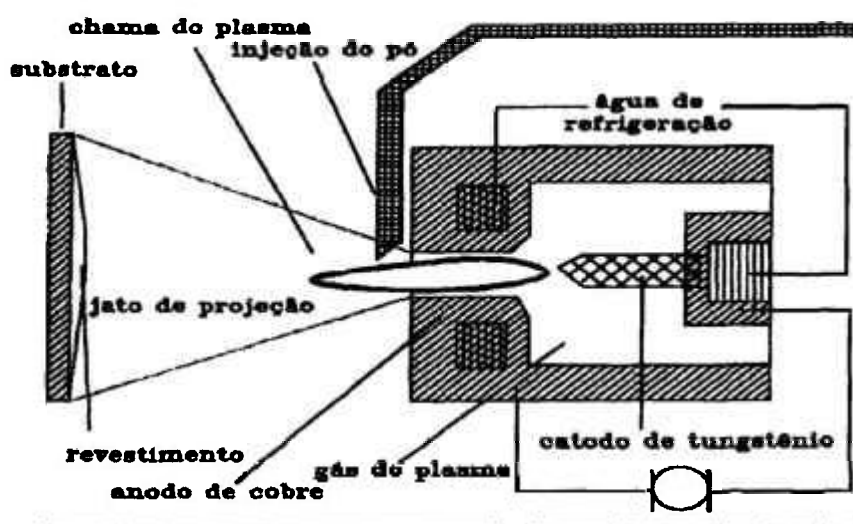


Figura 5 - Esquema de uma pistola de aspersão térmica por chama a plasma

Com o objetivo de melhorar a fixação entre implantes metálicos e tecido ósseo, na década de oitenta, foram realizados os primeiros revestimentos de HAp por aspersão térmica. A partir daí, vários artigos discutiram a aplicação de HAp como recobrimentos de implantes metálicos. As principais aplicações de revestimentos de HAp em ligas metálicas são: em implantes dentários e componentes femurais para implante de quadril. Este tipo de recobrimento reduz a eliminação de íons do substrato metálico para o meio biológico [10, 78, 79].

A bioatividade da HAp no revestimento diminui os efeitos inflamatórios, melhoram a fixação com o osso adjacente, proporcionando ao paciente a estabilização do implante em curto prazo. Recobrimentos de HAp por esta técnica são os únicos utilizados para fins comerciais [10, 19, 78, 79].

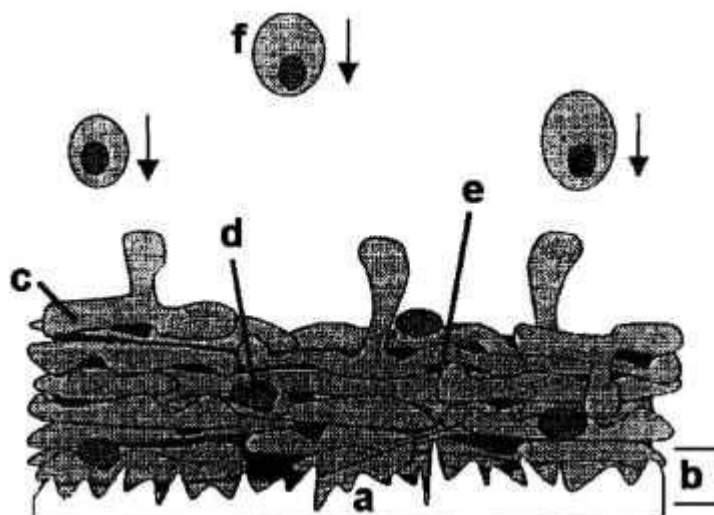


Figura 6 - Esquema típico de camadas depositadas por aspersão térmica: (a) substrato, (b) rugosidade do substrato, (c) lamelas aspergidas, (d) oclusão de impurezas, (e) poros e (f) partícula aspergida parcialmente fundida.

A HAp, submetida à técnica de aspersão térmica, sofre decomposição parcial em : óxido de cálcio (CaO), tetracalciofosfato ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$), α e β -fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), oxiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$) e fase amorfa. Estes produtos, em meio fisiológico, são mais solúveis do que a HAp. Se a solubilidade ocorrer de forma lenta, os íons cálcio e fosfato podem ser reprecipitados promovendo uma neoformação óssea; já a rápida dissolução pode prejudicar a integridade do recobrimento.

A HAp utilizada em recobrimentos de implantes tem proporcionado a curto prazo a osseointegração, induzindo a formação óssea durante o período inicial de cicatrização [80, 81, 82, 83, 84].

II.6.3 Aspersão Hipersônica - HVOF

Por aspersão hipersônica, (*high velocity oxygen fuel* – HVOF), obtém-se revestimentos com boa coesão e baixa porosidade de pós. A técnica utiliza a energia proveniente da combustão oxigênio/combustível. A energia liberada impele o material na forma de pó contra a superfície do substrato. A ignição é promovida por uma vela apropriada. A pistola de HVOF consta basicamente de um corpo de forma alongada, sendo que em seu interior são introduzidos combustível, oxigênio e material na forma de pó. Quando a ignição é produzida, uma onda explosões em alta frequência, controlada pelo operador, aquece e acelera as partículas do pó, expulsando-as da pistola. A temperatura atingida pela chama no HVOF é da ordem de 3000°C. A velocidade de saída das partículas é superior a 2000 m.s⁻¹. A energia cinética atingida pela partícula é liberada no instante do choque com o substrato. A figura 7 apresenta um esquema da pistola utilizada na aspersão hipersônica [69, 85, 86, 87].

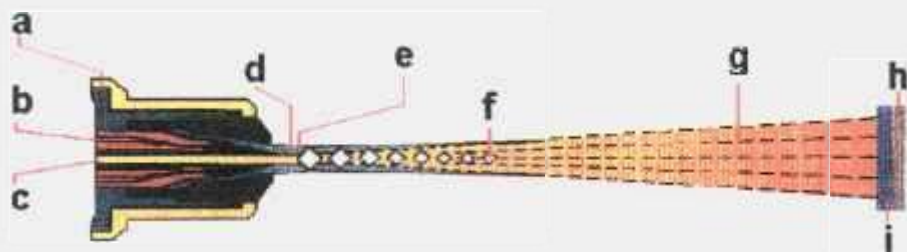


Figura 7 - Corte esquemático de uma pistola hipersônica - HVOF. (a) e (c) = ar comprimido; (b) = combustível; (d) = exaustão dos gases; (e) = velocidade de 1000m.s⁻¹; (f) = banda virtual de energia na forma de diamante; (g) = jato de projeção; (h) = substrato; (i) = revestimento.

II.6.4 HAp densa e porosa

A HAp densa é obtida pela compactação e sinterização de pós obtidos por métodos como neutralização e cristalização. É aplicada como material de preenchimento ósseo em odontologia e ortopedia. Em odontologia, uma das aplicações é a inserção do material no formato de dente imediatamente após a extração, impedindo a reabsorção óssea. A HAp na forma de dispositivo ou material particulado também é utilizada para corrigir o tamanho do osso alveolar para a fixação de dentaduras, reconstrução maxilo-facial. Blocos monolíticos de HAp são esculpidos para obtenção de implantes do ouvido médio [2, 88].

A HAp porosa pode ser obtida por síntese hidrotermal de corais formados de carbonatos de cálcio. A estrutura é mantida intacta após a reação. Outras reações de obtenção ocorrem via produção de espumas pela agitação de suspensões cerâmicas aquosas com tensoativos. Agentes iniciadores da polimerização promovem a solidificação de monômeros orgânicos incluídos nas composições. Este método permite a produção de corpos com formatos de alta complexidade. A HAp porosa possibilita o crescimento ósseo dentro dos poros, promovendo melhor fixação e vascularização [89,90, 91, 92, 93, 94].

O procedimento experimental foi dividido basicamente em três etapas, a primeira etapa refere-se à síntese da HAp, em escala de laboratório, por quatro métodos diferentes: cristalização, neutralização, sol-gel em meio aquoso e sol-gel em meio alcoólico. Na segunda etapa do trabalho é descrita a obtenção da HAp em escala piloto utilizando-se os métodos por cristalização e neutralização, já que estes apresentaram os melhores resultados, na caracterização físico-química por comparação entre os produtos obtidos. A terceira etapa do trabalho refere-se à aplicação da HAp obtida em escala piloto na forma de corpos densos, porosos e em recobrimento de substratos metálicos. As técnicas utilizadas para os recobrimentos foram aspersão térmica por chama plásmica e hipersônica (HVOF). Os recobrimentos obtidos com HAp sintetizada são comparados com os obtidos com hidroxiapatita comercial (HAp-i). A figura 8 apresenta um fluxograma simplificado do trabalho experimental desenvolvido.

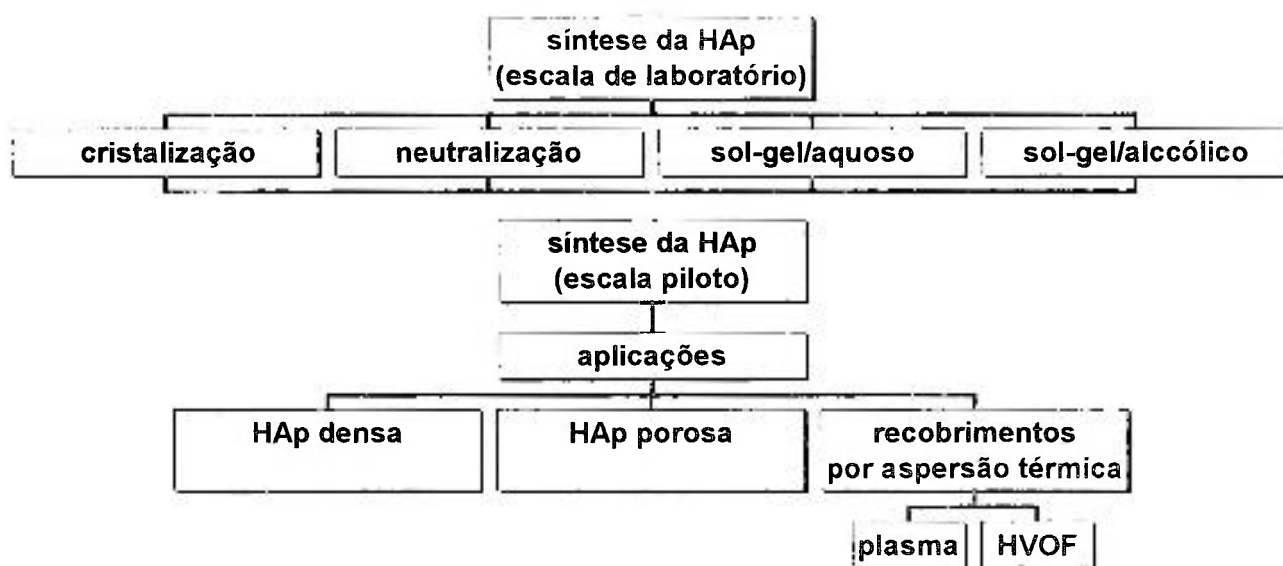


Figura 8 - Sequência experimental desenvolvida.

III.1 Síntese de hidroxiapatita em escala de laboratório

A denominação “escala de laboratório” foi dada às sínteses programadas para produzir de 5 a 10g de HAp na forma de pó seco e calcinado, quantidade suficiente para a caracterização.

A partir dos métodos de síntese de HAp encontrados em literatura, optou-se por aqueles de baixo custo operacional, e com reagentes que não formassem subprodutos de difícil eliminação do precipitado. As soluções utilizadas no trabalho experimental foram preparadas a partir de reagentes de grau p.a.

Nesta primeira etapa do trabalho, os métodos de síntese foram avaliados e algumas modificações foram introduzidas nos mesmos, gerando condições de produzir HAp com a mesma qualidade em escala piloto.

Os métodos de síntese escolhidos foram por cristalização, neutralização, sol-gel em meio aquoso e sol-gel em meio alcoólico e são descritos a seguir.

III.1.1 Método de cristalização

A síntese por cristalização ou precipitação foi realizada com adição controlada e simultânea de duas soluções, acetato de cálcio $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0,20 M) e hidrogenofosfato de amônio $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (0,11 M), sobre uma solução de acetato de amônio $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$ (0,40 M), sob agitação constante. O pH foi mantido em $8,5 \pm 0,3$ pela adição controlada de hidróxido de amônio (NH_4OH) . O experimento foi realizado em béquer e o sistema mantido à temperatura de $90^\circ\text{C} \pm 0,5$ por meio de um banho-maria com termostato. O precipitado de coloração branca obtido foi filtrado, e submetido a lavagem com água destilada. Posteriormente, o material foi seco em estufa a 80°C por 24 horas e calcinado em forno tipo mufla a

1000°C por 3 horas. A figura 9 apresenta o fluxograma referente às condições experimentais utilizadas.

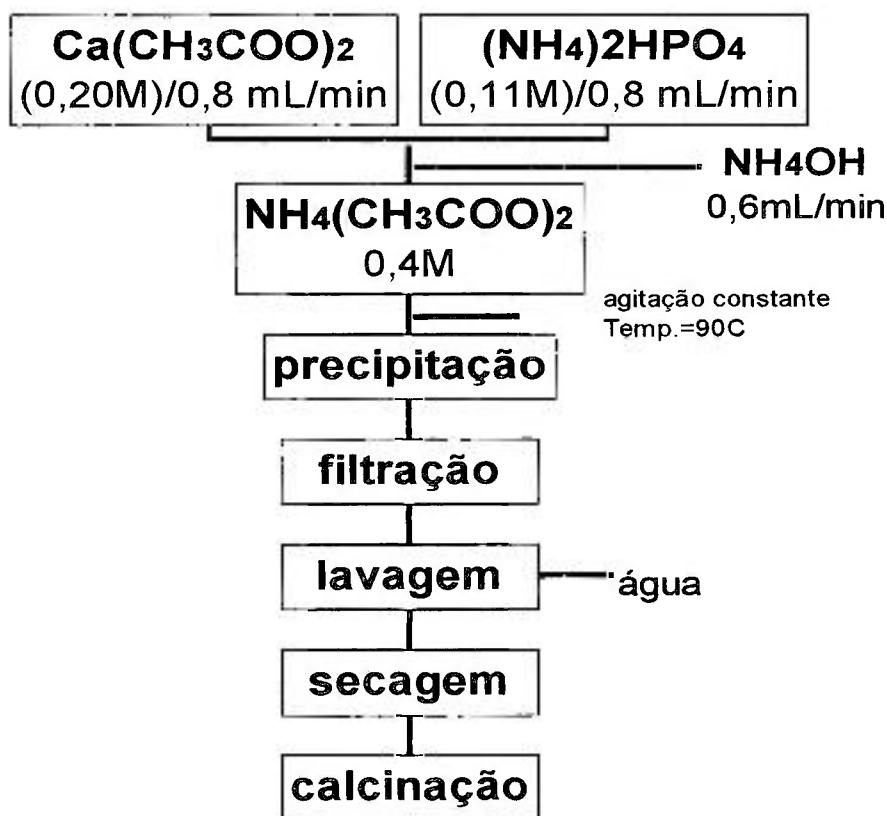


Figura 9 - Seqüência experimental desenvolvida na síntese de HAp por cristalização

III.1.2 Método sol-gel

A síntese de HAp pelo método sol-gel foi realizada pela adição simultânea de duas soluções, de NH_4OH e de H_3PO_4 , em solução de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ em meio alcoólico. Foram realizadas duas séries de sínteses, uma utilizando água destilada ao preparar as soluções, chamada de sol-gel/aq, e outra utilizando álcool no preparo das soluções, denominada de sol-gel/Al.

A solução de hidróxido de amônio foi preparada a partir do reagente concentrado, diluindo-se a 6,20 M.

A velocidade de adição dos reagentes foi de aproximadamente 0,8 mL/min. Após a precipitação, a solução permaneceu em repouso por 10 horas. Em intervalos de 30 minutos, foi efetuada a monitorização dos valores da medida de pH até o término da reação.

Após a etapa de filtração, o material foi seco em estufa à temperatura de 80°C por 24 horas e calcinado em forno tipo mufla a 1000°C por 3 horas. O fluxograma do processo desenvolvido é apresentado na figura 10.

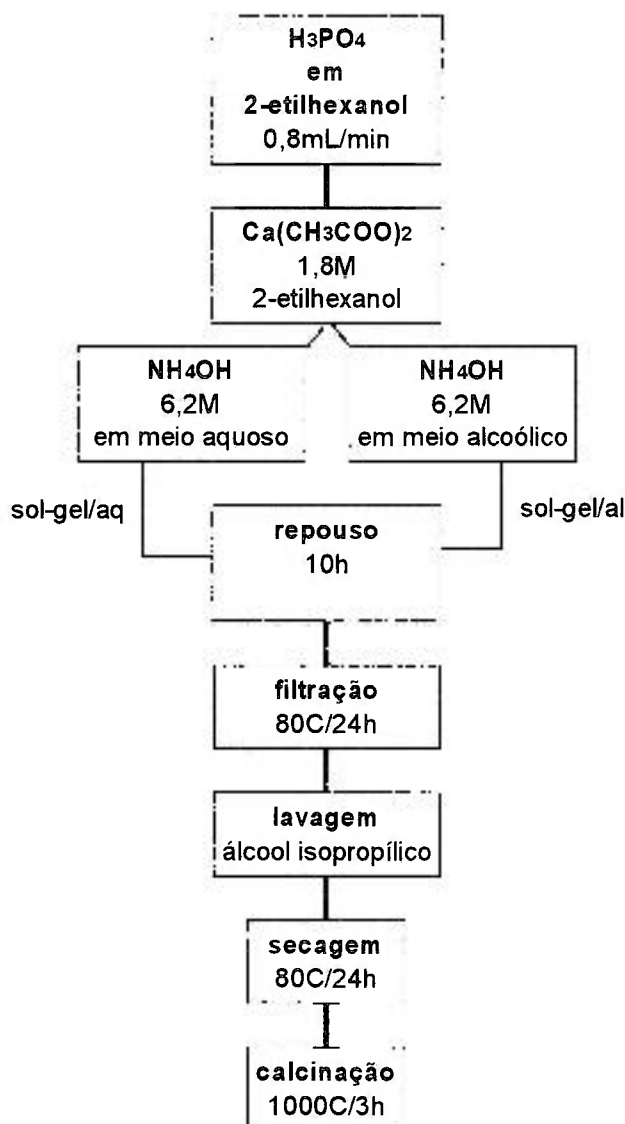


Figura 10 - Seqüência experimental desenvolvida na obtenção da HAp pelo método por sol-gel.

III.1.3 Método da neutralização

A síntese por neutralização consiste na adição de uma solução de ácido ortofosfórico (H_3PO_4) sobre uma suspensão de hidróxido de cálcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) em agitação.

O precipitado foi obtido a partir da adição de solução de ácido ortofosfórico 0,30 M numa vazão de aproximadamente 0,8 mL/min sobre a suspensão de hidróxido de cálcio 0,10 M sob agitação e temperatura de 25°C, constantes. A monitoração dos valores de pH foi realizada durante toda etapa de precipitação. Após a precipitação, a solução foi submetida a sistema de refluxo a 40°C por 24 horas.

O precipitado obtido foi filtrado e lavado com água destilada seguido de secagem em estufa à temperatura de 80°C, por 24 horas, e calcinação em forno tipo mufla a 1000°C por 3 horas. O fluxograma do processo desenvolvido é apresentado na figura 11.

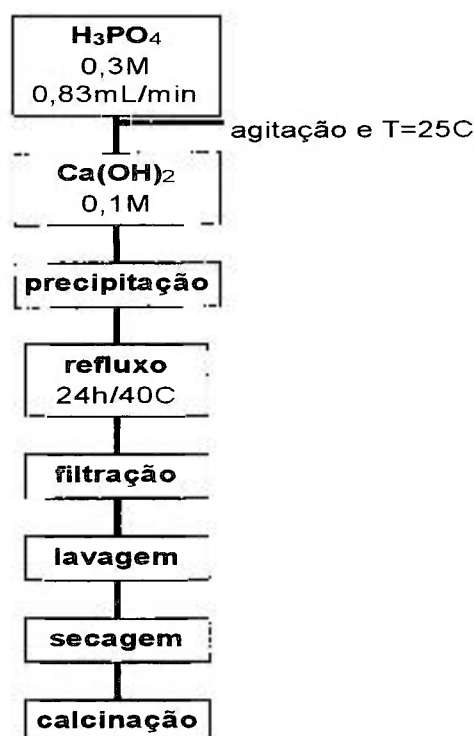


Figura 11 - Seqüência experimental referente à síntese por neutralização.

III.2 Teste de estabilidade da HAp

Para verificar a densificação e estabilidade térmica da HAp obtida a partir dos experimentos por cristalização, sol-gel/aq, sol-gel/al e neutralização, foram feitas sinterizações à temperatura de 1250 °C por 3 horas. As amostras foram compactadas uniaxialmente com pressão de 20 MPa por 30 segundos, em matriz de aço com diâmetro de 12 mm. Foram utilizados em média 0,5g do pó calcinado e desaglomerado em almofariz de ágata. Não foram utilizados lubrificantes para evitar possíveis contaminações. As pastilhas foram posteriormente submetidas à prensagem isostática com pressão de 200 MPa por 20 minutos. A sinterização foi realizada em forno tipo mufla marca Lindberg com taxa de aquecimento da ordem de 5°C/min até atingir a temperatura desejada. O resfriamento ocorreu dentro do próprio forno.

Para a determinação da densidade geométrica, as amostras compactadas foram pesadas em balança analítica e as dimensões das pastilhas determinadas com o auxílio de micrômetro. O volume foi calculado utilizando-se a média destas medidas. A densidade hidrostática aparente das pastilhas sinterizadas foi medida pelo método de Arquimedes, utilizando-se água destilada à temperatura de 21°C. Para a determinação da densidade relativa considerou-se o material obtido como sendo apenas HAp e densidade teórica como sendo $\rho = 3,156 \text{ g/cm}^3$ [2].

III.3 Obtenção da hidroxiapatita em escala piloto

A avaliação dos dados obtidos após etapa de sinterização direcionaram os trabalhos para obtenção de HAp em escala piloto pelos métodos de cristalização e neutralização.

A síntese por cristalização foi realizada em reator de aço inoxidável com sistema de aquecimento e capacidade para 60 L. Foram realizadas três sínteses com o objetivo de se produzirem 300 g por vez. A única condição alterada, em relação

ao procedimento adotado em escala de laboratório, foi em relação a vazão dos reagentes, de 0,8 para 120 mL/min. Esta alteração teve como objetivo a adaptação para as condições pré-existentes de um sistema de reatores já utilizados para sínteses de outros materiais. O valor de pH próximo a 8,5 foi obtido com a adição gota a gota de NH_4OH com determinações a cada 15 minutos até o término da reação, aproximadamente 3 horas.

O sólido de coloração branca obtido foi filtrado, e submetido a lavagem com água destilada. Posteriormente, o material foi seco em estufa a 80°C por 24 horas e calcinado em forno tipo mufla a 1000°C por 3 horas.

A síntese de HAp por neutralização em escala piloto teve algumas modificações em relação ao procedimento experimental para escala de laboratório. A primeira modificação veio em função da necessidade de se ter um sistema único de refluxo com capacidade para pelo menos 60 L. Optou-se por estudar a substituição do sistema de refluxo por períodos de digestão de 0, 1, 5, 10, e 20 dias. Esses experimentos foram primeiramente realizados em escala de laboratório e posteriormente em escala piloto. Optou-se pela utilização de reator constituído de material polimérico nelprene, não reciclado, com capacidade de 90 L. A melhor condição estudada em escala de laboratório foi reproduzida em escala piloto com sistema aberto. Nesta primeira produção, foram sintetizados 500 g de HAp. O produto foi caracterizado e a partir da avaliação dos resultados optou-se por se trabalhar em sistema fechado. A utilização do reator com tampa de nelprene, possibilitou realizar experimentos em atmosfera inerte. Primeiramente, o sistema foi submetido a vácuo e, depois a fluxo de nitrogênio gasoso durante toda etapa de síntese. Todas as soluções foram preparadas com água fervida e resfriada. Este sistema foi mantido hermeticamente fechado por 20 dias e teve como objetivo a obtenção de 1000 g de HAp.

III.4 Obtenção de hidroxiapatita porosa pelo método *gelcasting* de espumas

Com o objetivo de se obter um material poroso de HAp, foi preparada uma suspensão contendo aproximadamente 58 % em peso de HAp, proveniente da síntese de neutralização em sistema fechado. A suspensão foi preparada utilizando-se ácido poliacrílico como dispersante e agentes reticulantes, monômeros acrílicos, foram incorporados à suspensão para promover a posterior formação do gel [89]. A figura 12 apresenta um fluxograma do processo.

O processo é realizado em câmara selada com luvas, em atmosfera de nitrogênio. A espuma é produzida pela agitação da suspensão e pela adição de agente espumante (à base de polietileno glicol éter). A formação do gel é efetuada pela adição do agente iniciador persulfato de amônio e catalisador, uma diamina terciária. A figura 7 apresenta o desenvolvimento experimental adotado.

O material poroso foi seco a temperatura ambiente por 72 horas seguido de secagem a 100 °C/24h, 300°C/3h e 500 °C/2h. Sinterizações foram realizadas nas temperaturas de 1200, 1250, 1300, 1350 e 1400 °C por 3 horas. A taxa de aquecimento em todas condições foi de 10°C por minuto, o resfriamento ocorreu no forno. Foram determinados os valores de densidade geométrica a verde e após sinterização.



Figura 12 - Desenvolvimento experimental adotado na obtenção da HAp porosa.

III.5 Equipamentos de aspersão térmica

Os revestimentos cerâmicos foram depositados em substratos metálicos por aspersão térmica a plasma e HVOF.

Para a deposição por aspersão térmica a plasma, utilizou-se o equipamento da marca Miller, modelo 3702 com pistola de plasma Miller SG-100 com gás primário de argônio. Foram estudados os efeitos produzidos pelos gases secundários, hidrogênio e hélio.

Para a deposição por HVOF utilizou-se o equipamento da marca Tafa modelo JP 5000 com uma mistura de ar/oxigênio/querosene.

A deposição dos revestimentos foi realizada em sala com cabine munida de sistema de exaustão forçada e filme d'água, o que minimiza a dispersão de pós e gases resultantes do processo de aspersão.

III.5.1 Preparação dos substratos

Como substratos foram empregadas placas metálicas, de titânio puro e da liga Ti-6Al-4V, disponível comercialmente, especificados como grau-2 e grau-5, respectivamente.

Os substratos foram submetidos a jateamento abrasivo com granalha de alumina, na faixa de 2 mm a 38 μ m, com pressão de 3,6 KPa. Os valores de rugosidade na superfície dos substratos foram obtidos em rugosímetro.

Após o jateamento abrasivo, os substratos foram limpos em ultra-som com acetona por 5 minutos.

Primeiramente, os substratos metálicos foram pré aquecidos até 100°C com os gases formadores de plasma. A temperatura foi controlada por um pirômetro óptico. Temperaturas superiores produziam a oxidação no metal, evidenciada pela coloração em tons amarelos e azuis. Para assegurar o mesmo nível de oxidação em todos os substratos, foram rejeitados os que apresentavam variações na coloração original do metal (figura 13).

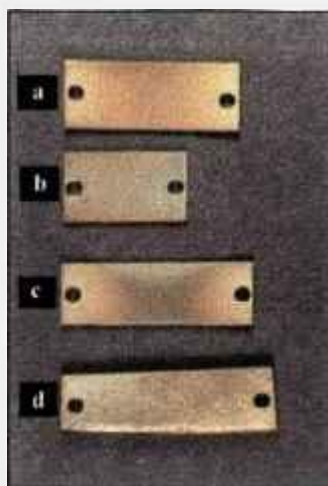


Figura 13 - Substratos rejeitados em função da camada de óxido formada pelo aquecimento em temperatura superior a 100°C. (a) T₁; (b) T₂; (c) TV₃; (d) T₄.

III.5.2 Deposição por aspersão térmica a plasma e HVOF

As técnicas de aspersão térmica a plasma e HVOF foram utilizadas para recobrir os substratos de titânio puro e na forma de liga Ti-6Al-4V. Foram utilizados pós de HAp obtidos em escala piloto por cristalização (HAp-cr), por neutralização em atmosfera ambiente (HAp-ar) e neutralização em atmosfera de nitrogênio, (HAp-N₂). Os resultados foram comparados com os recobrimentos de HAp-i e Al₂O₃ da Brodmann, pós utilizados comercialmente em recobrimentos por aspersão.

Os pós HAp-cr, HAp-ar e HAp-N₂ foram calcinados a 1000°C por 3 horas antes da aspersão. Os pós HAp-i e Al₂O₃ foram utilizados como recebidos. Utilizou-se substratos de titânio grau-2 e grau-5, na forma de chapas retangulares. Também foram revestidas duas próteses totais de quadril de Ti-6Al-4V.

A Al_2O_3 foi utilizada nos recobrimentos como camada intermediária entre o substrato metálico e a HAp. Este procedimento foi adotado visando aumentar o valor da rugosidade superficial nos recobrimentos e isolar o metal do meio externo.

Todos os pós antes de serem aspergidos, foram mantidos em estufa a temperatura de 40°C por 24 horas. Antecedendo a deposição, os substratos foram pré aquecido com a pistola de aspersão com os gases iniciantes por 30 segundos até atingir valores próximos e abaixo de 100°C .

A pistola foi operada manualmente com movimentos verticais. O tempo médio de deposição foi de 2 minutos e a temperatura máxima atingida no substrato foi de aproximadamente 500°C . A temperatura dos substratos foi controlada no pré-aquecimento e durante o processo de aspersão por um pirômetro óptico digital.

Durante a deposição, não foi utilizado nenhum dispositivo especial de refrigeração no sistema revestimento/substrato/suporte metálico, ou seja, o resfriamento do sistema ocorria por perda natural de calor para o meio ambiente.

As variáveis escolhidas para controle e reprodutibilidade do processo basearam-se nos seguintes parâmetros: distância entre o bico da pistola de aspersão e o substrato metálico, vazão dos gases e da fluidez dos pós através de suas respectivas válvulas.

Nas tabelas 4 e 5 são apresentados os valores utilizados nos processos de aspersão térmica por chama a plasma e HVOF.

Tabela 4 - Parâmetros utilizados no processo de aspersão térmica por plasma de H₂ e He.

Parâmetros	Plasma de H ₂		Plasma de He
	I	II	
Potência utilizada	29,6 kW	29,6 kW	32 kW
Tensão	37 V	37 V	40 V
Corrente	800 A	800 A	800 A
Gás primário	Ar	Ar	Ar
Pressão do gás primário	2,4 kPa	2,4 KPa	2,4 KPa
Fluxo do gás primário ($\cdot 10^2$ L/h)	23,21–23,50	23,21–23,50	23,21–23,50
Gás secundário	H₂	H₂	He
Pressão do gás secundário	0,5 KPa	0,7 KPa	5,3 KPa
Fluxo de gás secundário ($\cdot 10^2$ L/h)	1,56	2,41	12,46
Gás carregador	N₂	N₂	Ar
Pressão do gás carregador	1,9 KPa	1,9 KPa	1,7 KPa
Fluxo do gás carregador ($\cdot 10^2$ L/h)	3,40	3,40	3,40
Distância de projeção	70-75 mm	70-75 mm	70-75 mm
Temperatura de pré-aquecimento	< 100°C	< 100°C	< 100°C
Temperatura durante a deposição	< 500°C	< 500°C	< 500°C
Taxa de alimentação de pó	2,0 rpm	2,0 rpm	2,0 rpm

Os substratos recobertos sofreram tratamento térmico, realizado em forno vertical à temperatura de 500°C por 3 horas sob fluxo de oxigênio para retirar os resíduos orgânicos presentes no pó de HAp-i.

Tabela 5 - Parâmetros utilizados no equipamento de HVOF

Parâmetros	HVOF
Fluxo de oxigênio	49,5.10 ³ L/h
Fluxo de querosene	25,0 L/h
Fluxo de gás carregador (N ₂)	73,6.10 ¹ L/h
Pressão de oxigênio (linha)	7,2-8,6 KPa
Pressão de querosene (linha)	10,1 kPa
Pressão da água	8,1 KPa
Temperatura de pré-aquecimento	< 100°C
Temperatura durante a deposição	< 400°C
Distância de projeção	350 mm
Taxa de alimentação de pó	2,0 rpm

III.6 Testes de Avaliação citotóxica

No desenvolvimento deste trabalho, foram testados quanto à toxicidade todos os produtos obtidos. O método da supressão de colônias [96, 97] foi utilizado para avaliar os pós de HAp obtidos por neutralização e cristalização, os pós importados, (HAp-i e Al₂O₃), e HAp porosa. Os recobrimentos foram testados quanto a sua citotoxicidade pelo método da difusão em ágar, que permite avaliar a superfície ou uma camada. Os substratos metálicos foram testados pelos dois métodos a título de comparação dos resultados.

III.6.1 Avaliação citotóxica da HAp na forma de pó pelo método de supressão de colônias

A hidroxiapatita importada HAp-i e os produtos obtidos pelas sínteses de cristalização e neutralização foram submetidos a testes de citotoxicidade. Os testes foram realizados em placa de Petri (15 x 60mm²) colocando-se soluções, obtidas a

partir de diluições dos extratos dos diversos materiais em contato com uma cultura de célula de ovário de hamster chinês (CHO k1), da American Type Culture Collection (ATCC). Utilizou-se como controle positivo uma solução de fenol 0,02% e como controle negativo o extrato da alumina (A-16 Alcoa).

III.6.1.1 Preparação dos extratos

Os extratos são obtidos a partir da interação de 6g do material, na forma de pó, com 60 mL do meio de cultura RPMI-FCS (meio formado por RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de penicilina e estreptomicina), em frasco de vidro com tampa rosqueada, com capacidade para 100mL, esterilizados em autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 20 minutos. A partir de cada extrato são feitas três diluições. O mesmo procedimento é adotado para o controle negativo. Como controle positivo é utilizado uma solução de fenol 0,02% (50; 25; 12,5%). Após incubação de cada frasco em estufa a 37°C por 48 horas, o extrato é filtrado em membrana millipore (poro de $0,22 \mu\text{m}$). O resíduo é eliminado e, a partir do filtrado são feitas diluições seriadas (100, 50, 25 e 12,5%). As soluções obtidas a partir das diluições seriadas são posteriormente colocadas em contato com as células.

III.6.1.2 Preparação das placas de cultura

As células CHO fornecidas pelo Instituto de Química da USP foram cultivadas em garrafas plásticas em meio de cultura RPMI-FCS, em estufa com atmosfera úmida com 5% de CO_2 a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, até obtenção de uma camada de células com crescimento confluyente.

O meio de cultura foi retirado e as células foram lavadas com tampão fosfato em solução salina sem cálcio e magnésio (PBS-CMF). Para o desprendimento de

células da superfície interna dos frascos, foi adicionado uma solução de tripsina 0,2%.

Após a tripsinização as células são transferidas para um tubo de centrifuga com tampa e lavadas duas vezes com PBS-CMF. As células são ressuspensas em RPMI-FCS ajustando-se para uma suspensão contendo 100 células/mL. A partir dessa suspensão, são distribuídos 2 mL em cada placa de cultura e incubadas por 5 horas para a adesão das células à placa.

Após esse período, o meio de cultura é removido por sucção a vácuo, restando apenas as células aderidas no fundo de cada placa. Nesta etapa, são adicionados 5 mL do extrato puro e 5 mL de cada diluição seriada. Na placa de controle de CHO, é adicionado 5 mL do meio fresco de RPMI.

Foram feitas triplicatas de cada concentração dos extratos testados. As placas são incubadas em estufa úmida com 5% de gás carbônico (CO₂) a 37 ± 1°C por 7 dias.

Decorrido esse período, o meio foi removido por sucção a vácuo e as colônias formadas foram fixadas em formol 10% em solução salina 0,9% e coradas com corante de *Giemsa*.

As colônias visíveis em cada placa são contadas e comparadas com o número de colônias formadas na placa controle de CHO. O potencial citotóxico do material avaliado é expresso em índice de citotoxicidade (IC₅₀), que corresponde à concentração do extrato que suprime em 50% a capacidade de formação de colônias em relação ao controle.

III.6.2 Avaliação citotóxica da hidroxiapatita porosa

Foi realizada a avaliação citotóxica da hidroxiapatita porosa obtida por sinterização à temperatura de 1200 °C por 3 horas. O corpo sólido poroso foi triturado em almofariz de ágata e submetido a esterilização em autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 20 minutos e seco em estufa a 40°C. O procedimento adotado seguiu como descrito anteriormente.

III.6.3 Avaliação citotóxica dos substratos metálicos

Os substratos metálicos, limpos em ultra-som com água destilada e álcool isopropílico, foram esterilizados em autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ por 20 minutos e secos em estufa a 40°C.

Os substratos metálicos foram avaliados “*in vitro*” quanto à citotoxicidade por dois métodos distintos. O primeiro referente ao método da supressão de colônias descrito no item III.6.1 e o segundo, pelo método da difusão em ágar, descrito a seguir. As superfícies dos substratos recobertos por aspensão térmica também foram avaliadas pelo método da difusão em ágar.

III.6.4 Teste de avaliação citotóxica pelo método da difusão em ágar

O método da difusão em ágar é realizado com dois tipos de cultura de células a linhagem NTC-C clone L-929-(CCLI-ATCC) de tecido conectivo de camundongo e RC-IAL células fibroblásticas de rim de coelho, isoladas no Instituto Adolfo Lutz.

As células foram semeadas em placa de Petri (15x 60mm²), na concentração de $1,5 \cdot 10^5$ células/mL em Meio Mínimo de Eagle (MEM) com 10 % de soro fetal

bovino (FCS) no volume de 5 mL. A incubação ocorreu em estufa por 24 horas à temperatura de 37°C com 5% de CO₂ e atmosfera úmida.

Após esse período, com a monocamada de células já formada, o meio de cultura foi desprezado, sendo então adicionado 5 mL do meio de cultivo “*overlay*”. Este meio é composto de partes iguais meio de MEM, duas vezes concentrado, e ágar a 1,8% em peso contendo 0,01% em peso de vermelho neutro como corante vital preparado no momento do uso, o ágar é fundido e misturado na mesma proporção com o MEM duas vezes concentrado, ambos a uma temperatura de 44 °C e adicionado sobre a monocamada de células. Os substratos a serem testados são cortados em placas com 10 mm de lado e colocadas sobre a camada de ágar antes da solidificação completa. As placas de Petri foram incubadas novamente em estufa a 37°C com 5% de de CO₂ e atmosfera úmida por 24 horas.

Foram utilizadas como controle positivo, cilindros de látex e como controle negativo papel de filtro atóxico, ambos com 5 mm de diâmetro. As amostras são avaliadas em cada linhagem celular.

As leituras nas placas são feitas macroscopicamente onde a presença de citotoxicidade é constatada por halo claro ao redor do material em teste, o que corresponde à região de células mortas.

IV.1 Caracterização dos pós de HAp sintetizados – escala de laboratório

A primeira etapa do trabalho foi obter HAp em escala de laboratório pelas sínteses: cristalização, neutralização, sol-gel em meio aquoso e sol-gel em meio alcoólico. Os pós obtidos foram caracterizados por difratometria de raios X (DRX), espectroscopia por infravermelho (IV), microscopia eletrônica de varredura (MEV), área superficial específica (B.E.T.), determinação da distribuição de tamanho médio de partículas e densidade geométrica das pastilhas sinterizadas. Os métodos de síntese que apresentaram os melhores resultados foram escolhidos para serem reproduzidos em escala piloto.

As sínteses realizadas em escala de laboratório foram calculadas para fornecerem de 5 a 10 g de HAp. O rendimento foi de 98,2 % por cristalização, 96,7 % por neutralização, 95,2 % por sol-gel/aq e 94,3 % por sol-gel/al.

O precipitado de aspecto cristalino, obtido na síntese por cristalização, favoreceu as etapas de transferência, lavagem e filtração, proporcionando melhor rendimento. Os menores rendimentos foram obtidos nas sínteses por sol-gel, que formaram precipitados de aspecto gelatinoso, e que por serem mais volumosos, arrastam quantidades consideráveis de água oferecendo dificuldades à filtração e lavagem. Na neutralização, o precipitado formado apresentou aspecto gelatinoso, mas com flocos mais dispersos, quando comparados às síntese por sol-gel.

A técnica de espectroscopia de infravermelho foi utilizada para identificar bandas de absorção correspondentes aos grupos funcionais como P-O, H-O, C-O e outros. As amostras calcinadas foram desaglomeradas em almofariz de ágata e dispersas em Nujol (óleo mineral). Uma gota da suspensão foi colocada em porta amostra de KBr. A leitura foi realizada na faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm^{-1} . Não foram observadas diferenças significativas entre as amostras preparadas por cristalização, neutralização e sol-gel, em meio aquoso. As figuras 14

e 15 apresentam as bandas características do fosfato (P-O) e hidroxila (O-H) indicando a presença da fase hidroxiapatita.

O espectro de transmitância da amostra sol-gel em meio alcoólico (figura 15) apresenta diferença considerável em relação a amostra em meio aquoso, principalmente na região de 500 a 1300 cm^{-1} , que são as bandas de absorção características do tetracalciofosfato [2, 6]. Esse perfil decorre provavelmente da ausência de água no método de síntese, que forneceria os grupos O-H, necessários para a formação da HAp.

Em todas as condições foram identificadas, além das bandas de fosfatos e hidroxilas, bandas de C-O presentes na forma de carbonatos. O carbonato é incorporado na apatita formando a carbonatohidroxiapatita e está relacionado à concentração de CO_3^{2-} na solução. Esses íons têm sua origem a partir do gás carbônico, presente no ar, e na utilização de soluções que contenham íons carbonatos. Para minimizar a presença dos íons CO_3^{2-} , toda água utilizada foi fervida. A presença do carbonato na apatita promove maior solubilidade em meio aquoso. Sabe-se, a partir da literatura, que a máxima absorção de carbonato pela HAp está limitada em 22% em peso [6].

As bandas de absorção do Nujol podem ser observadas em todas as condições de análise por IR na região de 2700 a 3000, 1450 a 1500 e 700 a 730 cm^{-1} [6].

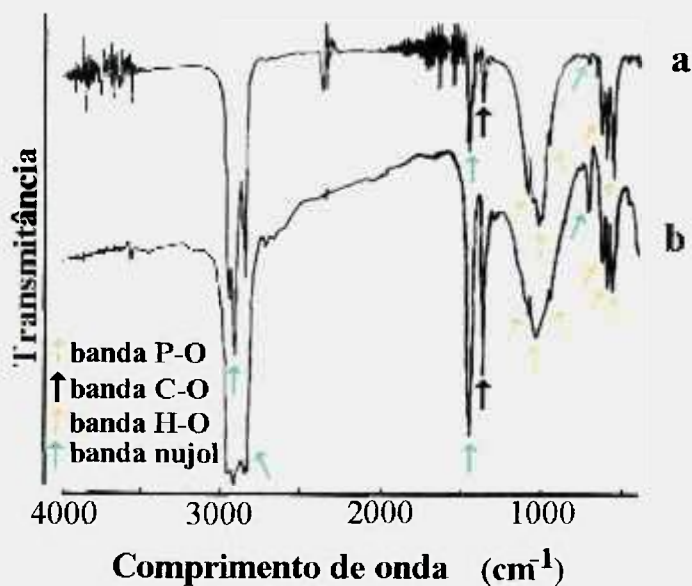


Figura 14 - Espectro de infravermelho das amostras de HAp na forma de pó calcinado a 1000°C/3h. (a) síntese por cristalização (b) síntese por neutralização.

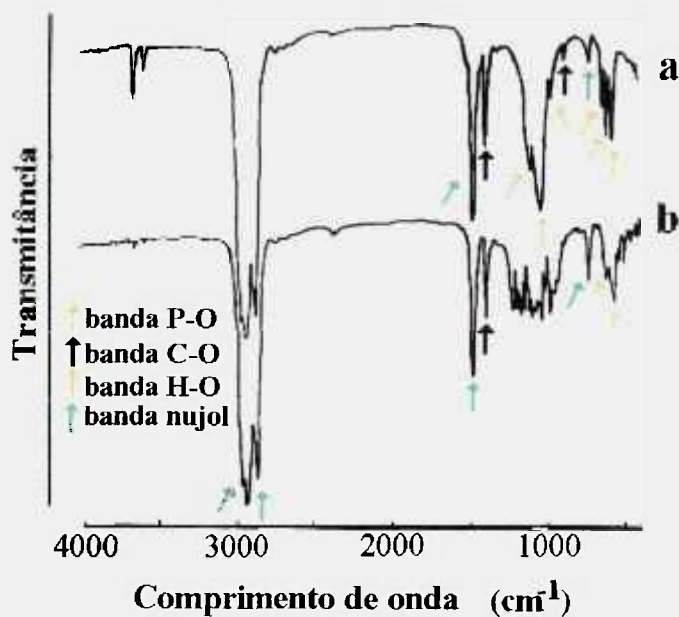


Figura 15 - Espectro de infravermelho das amostras de HAp na forma de pó calcinado a 1000°C/3h. (a) síntese por sol-gel em meio aquoso (b) síntese por sol-gel em meio alcoólico.

Determinou-se a área de superfície específica dos pós das amostras calcinadas a 1000°C por 3 horas referentes aos experimentos de síntese. Os resultados encontram-se na tabela 6. Os maiores valores de área superficial específica foram encontrados para os pós provenientes de síntese por sol-gel. A síntese por cristalização apresentou o menor valor de área superficial indicando a presença de partículas grandes.

Tabela 6 - Área superficial específica (S) por B.E.T. e tamanho médio dos aglomerados (D) por espalhamento a laser das amostras calcinadas a 1000 °C/3h

Síntese	S (m ² /g)	D (μm)
Cristalização	2,4	15
Neutralização	3,0	15
Sol-gel/aq	6,0	3
Sol-gel/al	7,0	6

Determinou-se pelo método de espalhamento a laser a distribuição do tamanho de partícula e ou aglomerados dos pós de HAp, após calcinação a 1000°C por 3 horas. As curvas de distribuição de tamanho de partícula são apresentadas na figura 16 e também diferem entre si. Os maiores valores são encontrados para os pós provenientes da síntese por cristalização e neutralização com 15μm, respectivamente (tabela 6).

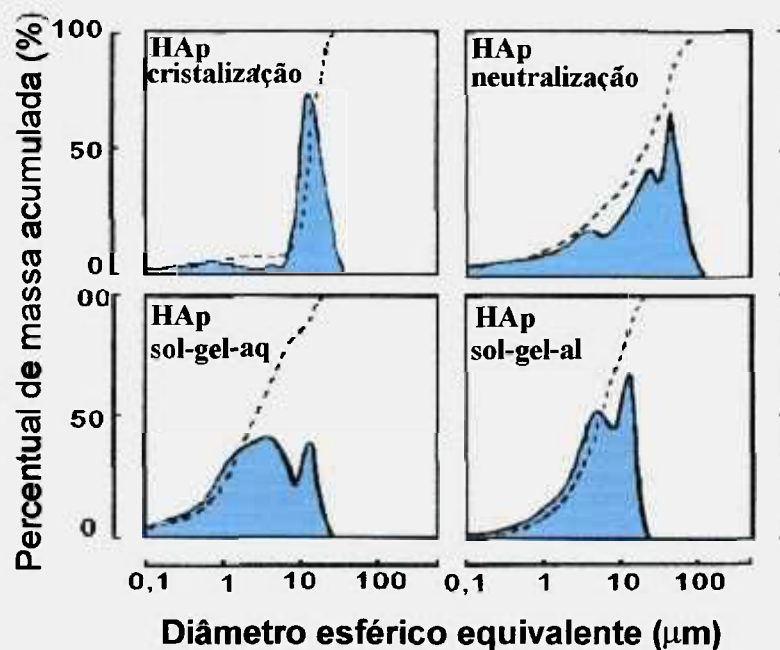


Figura 16 - Curvas de distribuição do tamanho de partícula dos pós calcinados a 1000°C/3h.

Micrografias representativas das amostras na forma de pós calcinados são apresentadas na figura 17. Pela análise do pó obtido por cristalização observa-se aglomerados da ordem de 10 μm com geometria arredondada formados pela junção de pequenos cristais de forma acicular. A micrografia do pó obtido por neutralização revela a presença de fragmentos angulares e heterogêneos, com forma e tamanho, bastante variados. As micrografias dos pós obtidos por sol-gel são semelhantes, apresentando aglomerados de formas irregulares com tamanhos inferiores às amostras citadas anteriormente.

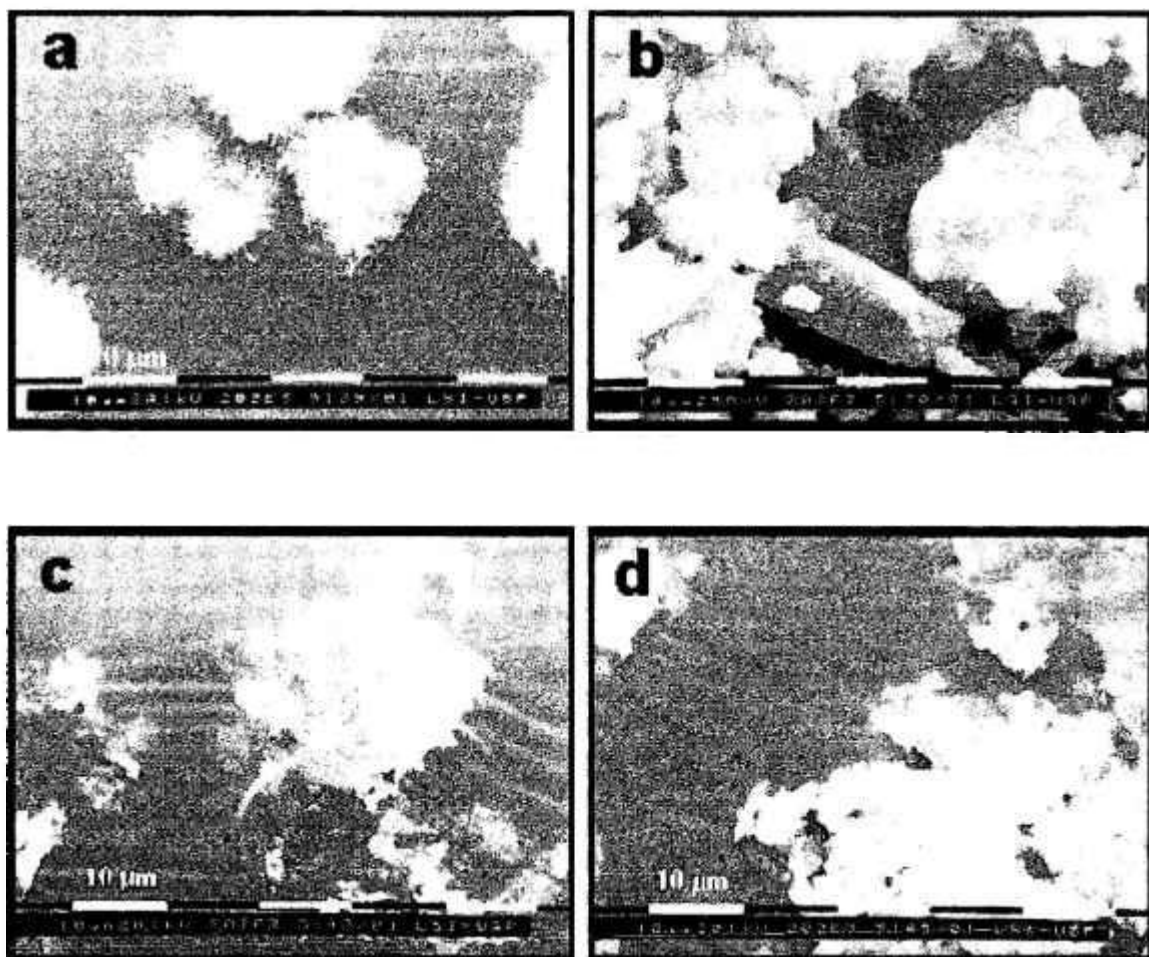


Figura 17 - Micrografias das amostras de pós calcinados a 1000°C por 3 horas. Síntese por cristalização (a); neutralização (b); sol-gel/aq (c); sol-gel/al (d).

As amostras de HAp, na forma de pó, a partir dos experimentos de síntese foram analisadas por DRX após serem submetidas as temperaturas de secagem a 80°C por 24 horas e calcinação a 1000°C por 3 horas. Nessas condições, todas as amostras apresentaram como fase principal a HAp.

IV.2 Obtenção de corpos monolíticos

Após a caracterização dos pós calcinados, estes foram sinterizados à temperatura de 1250°C por 3 horas com objetivo de se verificar o comportamento das fases cristalinas em tratamentos térmicos e densificação. Os valores de densidade a verde e após sinterização das pastilhas obtidas referentes aos métodos de síntese são apresentados na tabela 7.

As pastilhas que apresentaram maiores valores de densidade, 90% da densidade teórica da hidroxiapatita ($3,156 \text{ g.cm}^{-3}$), são as obtidas a partir dos experimentos de cristalização e neutralização, sendo estes os melhores métodos para obtenção de HAp para a produção de corpos sinterizados de alta densidade. No pó HAp obtido por cristalização, este fato se deve à morfologia das partículas arredondadas apresentadas na figura 17 associado à distribuição praticamente monomodal do tamanho de aglomerados como observado na figura 16. O pó de HAp obtido por neutralização embora apresente partículas de formas angulares a curva de distribuição de tamanho é multimodal auxiliando na formação de compactos mais densos. As pastilhas obtidas por sol gel são friáveis e quebradiças impossibilitando a determinação da densidade

Tabela 7 - Densidade dos pós calcinados a 1000°C por 3 horas e pastilhas sinterizadas a 1250°C por 3 horas.

síntese	T (°C/3h)	ρ_1 (g/cm³)	ρ_2 (g/cm³)	ρ_3 (g/cm³)	ρ_t (%DT)
crystalização	1250	1,8	2,9	2,8	89,3
neutralização	1250	2,2	3,0	3,0	93,7
Sol-gel (aq.)	1250	2,0	2,1	-	-
Sol-gel (al.)	1250	2,0	2,3	-	-

T = temperatura de sinterização

ρ_1 = densidade a verde das pastilhas

ρ_2 = densidade geométrica das pastilhas sinterizadas

ρ_3 = densidade hidrostática das pastilhas sinterizadas

ρ_t = densidade relativa após sinterização

DT = densidade teórica

As pastilhas após sinterização (1250°C/3h), foram analisadas por difratometria de raios X.

Por neutralização, as pastilhas apresentam apenas a fase HAp como pode ser observado no difratograma da figura 18-b. As pastilhas obtidas por cristalização (figura 18-a) e sol-gel/aq (figura 18-c) apresentam como fase principal HAp, e em pequena quantidade o β -TCP. Por sol-gel/al, a fase HAp não aparece como principal e sim como uma mistura entre o β -TCP e o TTCP, sendo que a identificação das fases cristalinas torna-se difícil visto que há sobreposição dos principais picos (figura 18-d).

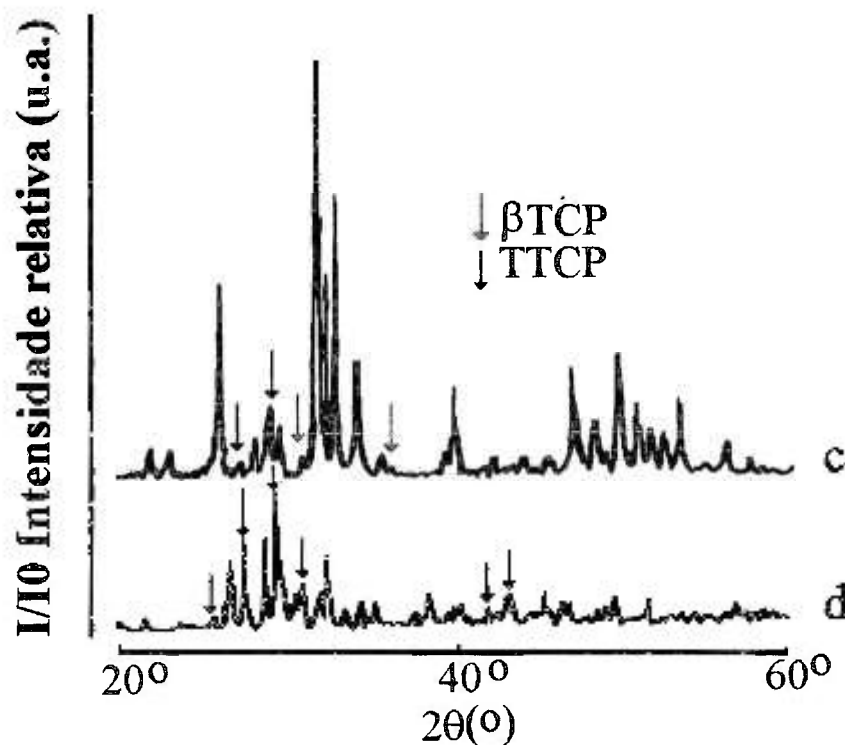
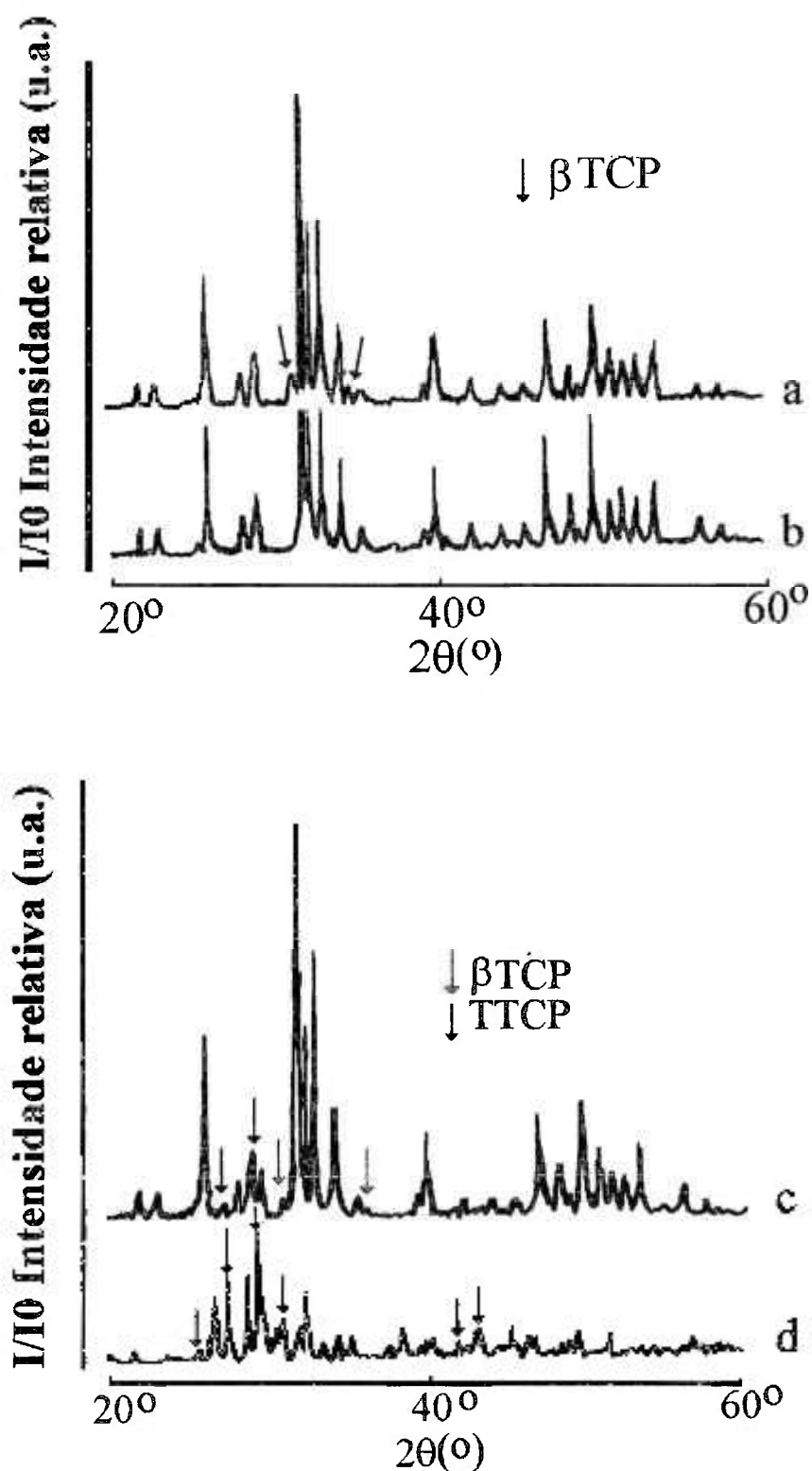


Figura 18 - Difratomogramas de raios X de pastilhas sinterizadas a 1250°C por 3 horas. (a) síntese por cristalização; (b) síntese por neutralização; (c) síntese por sol-gel/aq e (d) síntese por sol-gel/al. Os picos não assinalados são da fase HAp.

As pastilhas sinterizadas foram fraturadas e observadas por MEV, algumas micrografias representativas são apresentadas nas figura 19 e 20.

A partir das micrografias pode-se constatar a maior porosidade nas pastilhas obtidas pelo processo sol-gel/al (figura 20-b).



Figura 19 - Superfícies de fraturas de amostras sinterizadas a 1250°C por 3 horas. (a) síntese por cristalização e (b) síntese por neutralização, (SE).

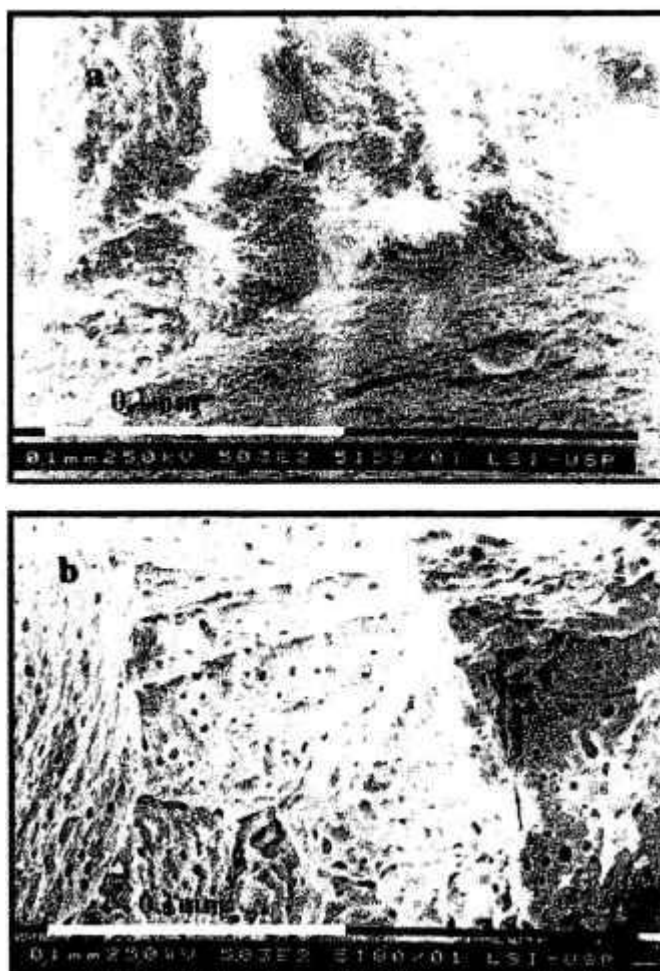


Figura 20 - Superfícies de fraturas de amostras sinterizadas a 1250°C por 3 horas. (a) síntese por sol-gel/aq e (b) síntese por sol-gel/al, (SE).

IV.3 Obtenção de HAp em escala piloto

A partir dos dados de estabilidade das fases cristalinas na temperatura de 1250°C e maiores valores de densidade relativa optou-se por produzir HAp por cristalização e neutralização em escala piloto.

Na síntese de HAp por cristalização em escala piloto, foi alterado apenas a vazão dos reagentes de 0,8mL/min, em escala de laboratório, para 120 mL/min em escala piloto. Foram realizados três experimentos, e por batelada produzidos 300 g

de HAp, com rendimento de $97,9 \pm 0,4$. Não foram observadas mudanças no valor do pH, mantido praticamente em 8,5 durante todo o experimento. Os produtos obtidos foram secos em estufa a 80°C por 24 horas, e calcinado a 1000°C por 3 horas. Os pós obtidos em escala piloto por cristalização foram analisados por IR e DRX, figuras 21 e 22. Não foram observadas diferenças significativas entre o material produzido em escala piloto e em laboratório.

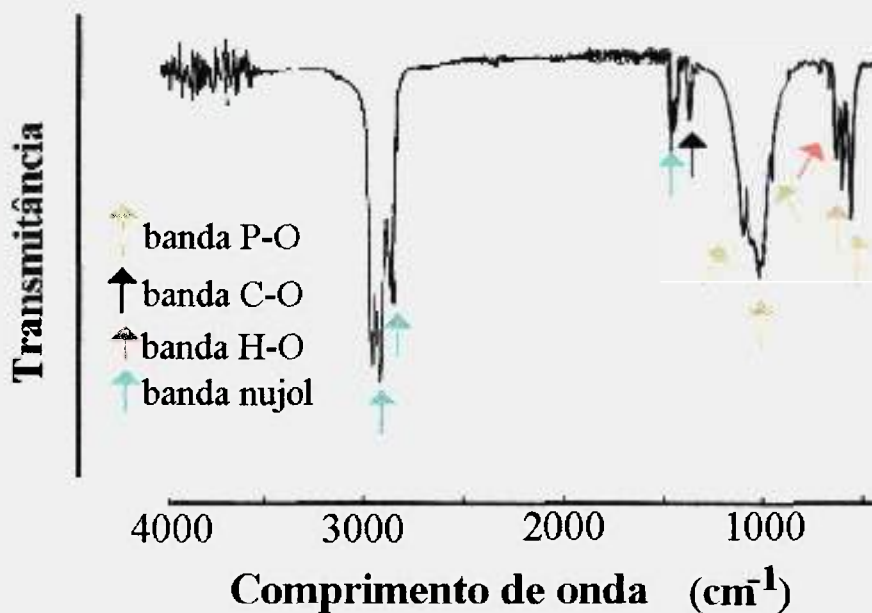


Figura 21 - Espectro de infravermelho da amostra HAp obtida por cristalização em escala piloto calcinada a 1000°C por 3 horas.

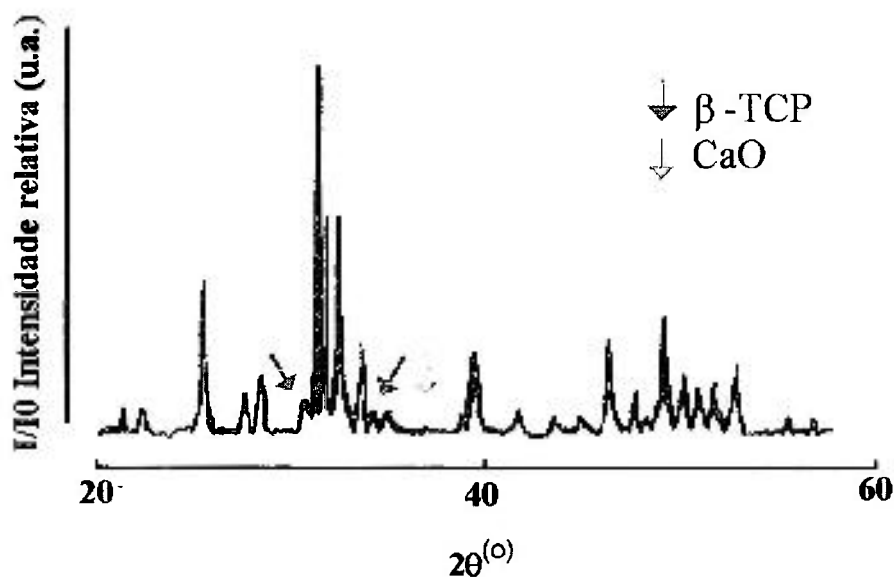


Figura 22 - Difratograma do pó obtido por cristalização em escala piloto, calcinado a 1000°C por 3 horas, os picos não identificados correspondem a HAp.

O procedimento de síntese de HAp por neutralização em escala piloto foi modificado com a substituição do sistema de refluxo por período de envelhecimento de 20 dias, em contato com a solução mãe. Foram estudados, em escala de laboratório, os períodos de envelhecimento de 0, 5, 10, 15 e 20 dias.

As análises por DRX dos produtos obtidos indicam a presença da fase HAp como majoritária em todas as condições, isto é, praticamente não há decomposição de fase durante a calcinação a 1000°C por 3 horas, exceto para o período de envelhecimento de 0 dia, foi identificada a fase β -TCP, como assinalado na figura 21. Um pequeno pico da fase CaO foi identificado em 37,3°.

Os valores de área superficial específica obtidos foram de 4 m²/g para período de digestão de 10 dias e 2,5 m²/g para 20 dias.

Optou-se por se trabalhar com período de envelhecimento por 20 dias, por favorecer a formação de partículas e/ou aglomerados maiores, visando utilização desse material por aspersão térmica. Partículas pequenas quando atravessam a região do plasma são completamente fundidas sofrendo mudança na estrutura cristalina. Tamanhos maiores de partículas mantêm o interior intacto e proporcionam que apenas a camada externa da partícula sofra fusão melhorando a adesão ao substrato.

Foram realizados dois experimentos em escala piloto com período de envelhecimento de 20 dias. Um dos experimentos foi executado em ar, denominando-se o produto obtido de HAp-ar, e outro em atmosfera de nitrogênio, denominando de HAp-N₂. Nos dois experimentos toda água utilizada foi fervida e resfriada para eliminação do gás carbônico, minimizando a formação da carbonato-hidroxiapatita que é mais solúvel do que a hidroxiapatita em meio fisiológico.

Por batelada foram produzidos 500g de HAp-ar com rendimento de 95,7 % e 1000 g de HAp-N₂ com rendimento de 94,6 %.

Os pós provenientes das sínteses, HAp-ar e HAp-N₂ obtidos em escala piloto foram caracterizados por espectroscopia por infravermelho e comparados ao pó HAp-i.

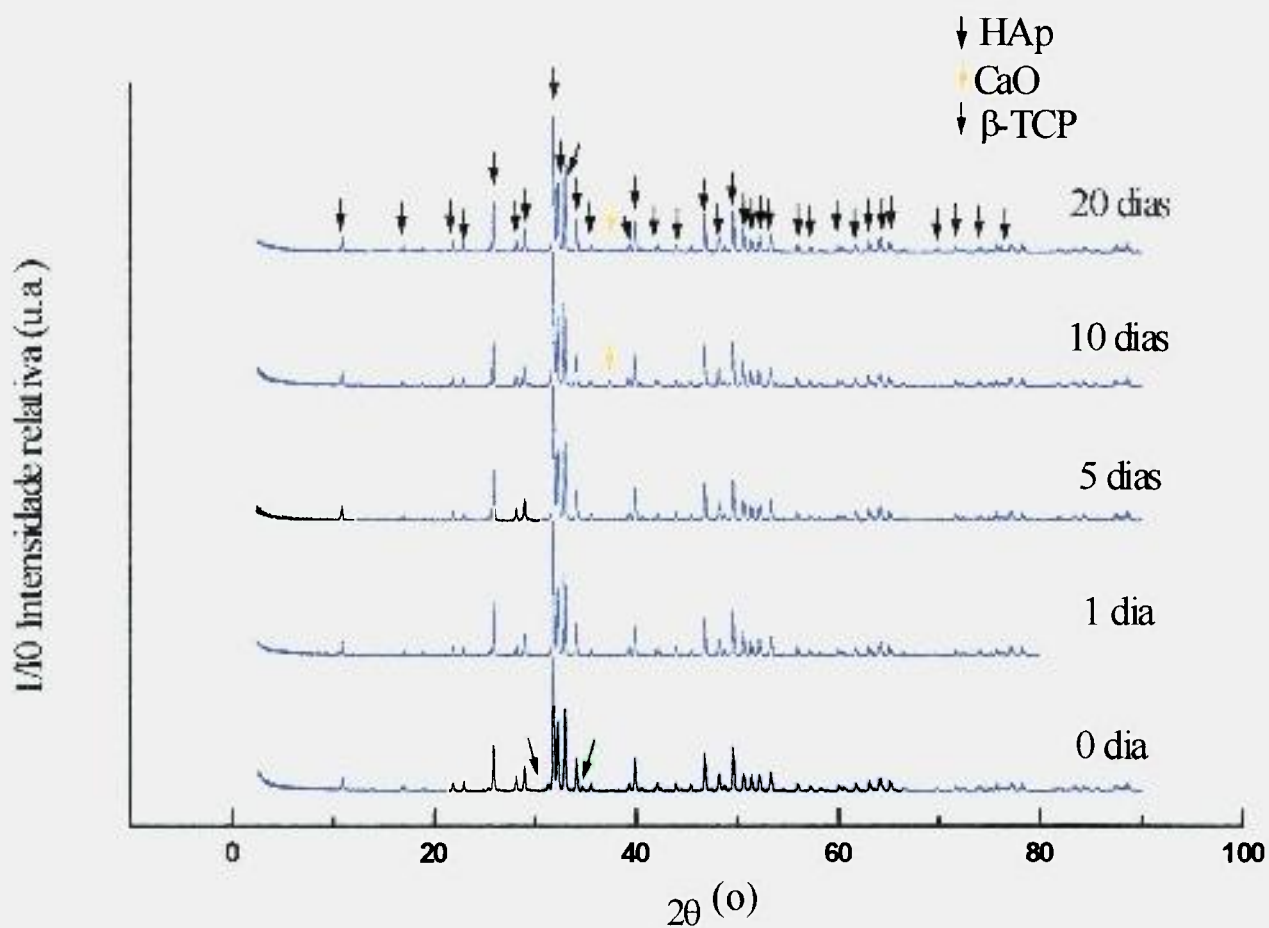


Figura 23 - Difratogramas dos pós obtidos por neutralização com período de envelhecimento em dias, calcinados a 1000°C por 3 horas. Os picos não identificados nas condições de 0, 1, 5 e 10 dias correspondem a HAp.

As amostras obtidas em escala piloto foram caracterizadas por IR no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} . Para a leitura, foram utilizadas pastilhas de KBr com os pós calcinados, misturados em uma concentração de 0,03% em peso. Na figura 24 são apresentados os resultados obtidos, para os três pós. Verifica-se a que o método utilizado na síntese HAp-N₂ foi eficiente para se obter pós livres de carbonato, já que a banda de absorção desse composto foi eliminada comparando-se com a HAp-ar. As demais bandas P-O são pertencentes à hidroxiapatita; não foram observadas bandas indicando a decomposição desse material em β -TCP.

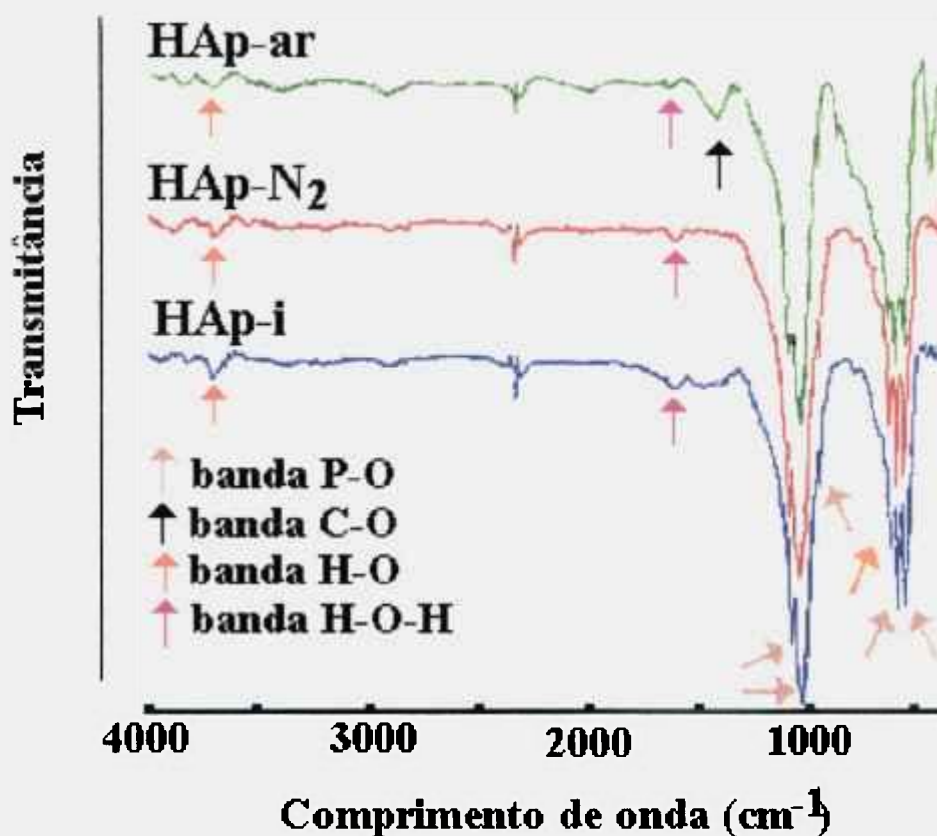


Figura 24 - Espectros de infravermelho das amostras HAp-ar, HAp-N₂ e HAp-i calcinadas a 1000°C por 3 horas.

Os pós de HAp-N₂, HAp-ar e HAp-i e Al₂O₃ foram caracterizados por difratometria de raios X. As amostras obtidas nas condições HAp-N₂ e HAp-ar apresentaram picos bem definidos correspondentes a hidroxiapatita (figura 25). HAp-ar apresenta além da fase principal hidroxiapatita, traços da fase do óxido de cálcio. A HAp-i também apresenta como fase principal a hidroxiapatita, no entanto os picos são mais largos, o que dificulta a identificação de outras possíveis fases cristalinas. A alumina apresenta como fase principal alumina alfa e traços de impurezas, identificada como NaA₁₁O₁₇ (figura 26).

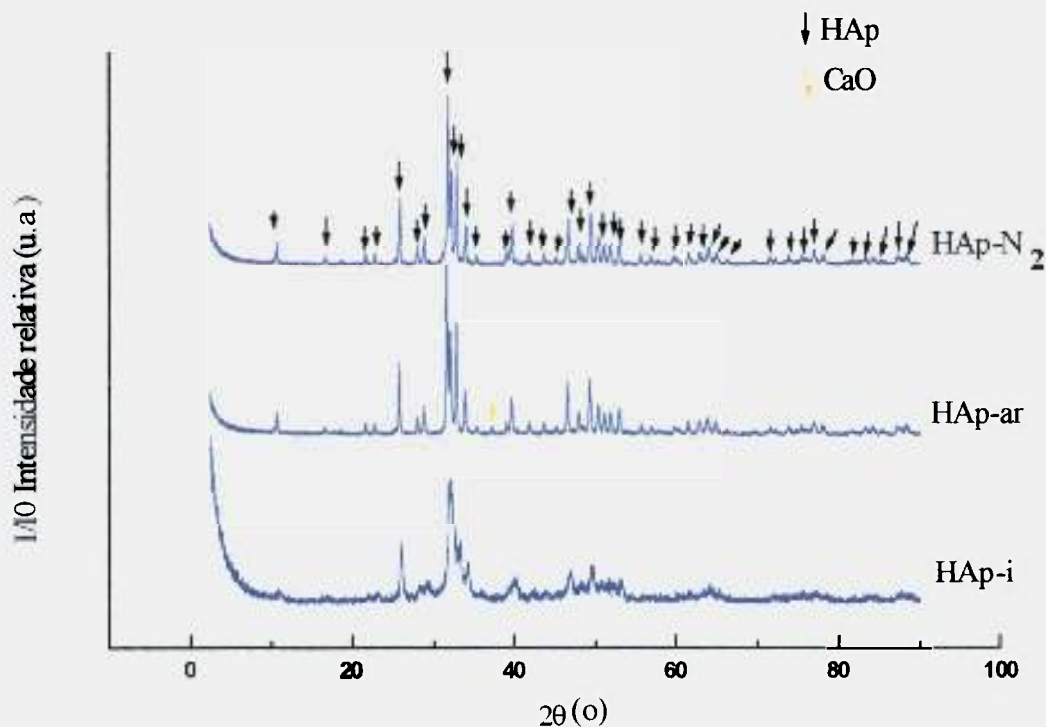


Figura 25 - Difrátogramas de raios X das amostras de HAp na forma de pó calcinado a 1000°C por 3 horas, HAp-ar e HAp-N₂. A amostra HAp-i foi analisada como recebida.

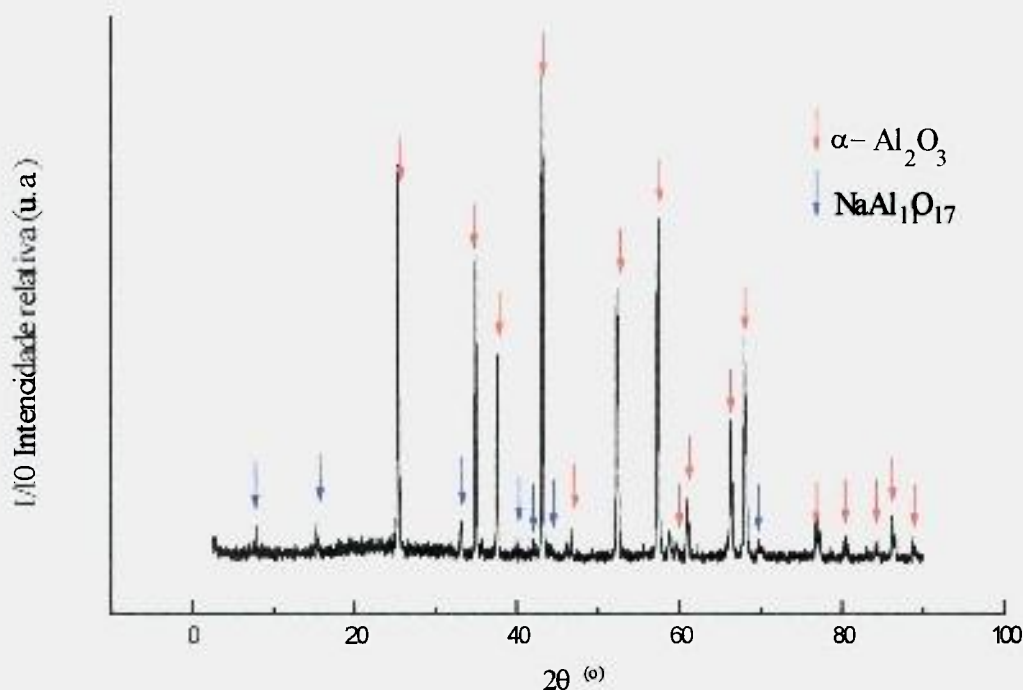


Figura 26 - Difratoograma de raios X da Al_2O_3 como recebida.

A análise química dos pós, HAp-cr, HAp-ar, HAp- N_2 , obtidos em escala piloto e HAp-i como recebida, foi realizada por espectrometria de emissão com fonte de plasma induzido (ICP). Os resultados são apresentados na tabela 8. Nota-se que todos os pós apresentam composição química semelhante. As amostras HAp-cr e HAp- N_2 apresentaram menores teores de impurezas. A razão molar Ca/P foi de 1,82 para HAp-i e HAp-cr, 1,81 para HAp- N_2 . A razão molar superior a 1,67 indica que o material é rico em cálcio, com tendência a formar CaO. A HAp-ar apresentou a razão molar de 2,05 para Ca/P. Este resultado não pôde ser explicado.

Tabela 8 - Análise química obtida por espectrometria com fonte de plasma induzido dos pós HAp-cr, HAp-ar e HAp-N₂ calcinados a 1000°C por 3 horas e HAp-i como recebido.

Óxidos (%)	HAp-cr	HAp-ar	HAp-N ₂	HAp-i
SiO ₂	0,25	0,15	0,11	0,20
Al ₂ O ₃	0,04	0,13	0,19	0,22
Fe ₂ O ₃	0,04	0,02	0,02	0,04
MnO	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,01
MgO	0,29	0,24	0,18	0,43
CaO	58,36	59,68	57,47	57,28
Na ₂ O	0,02	< 0,01	< 0,01	0,21
K ₂ O	0,02	< 0,01	0,03	< 0,01
TiO ₂	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,63
P ₂ O ₅	40,62	36,78	40,15	39,88
Perda ao fogo	0,06	0,97	0,42	0,29
Total	99,69	97,99	98,58	99,20

Elementos (ppm)	Ba	Sr	Y	Sc	Zr	Be	V
HAp-cr	14	1826	3	< 1	16	< 1	< 5
HAp-ar	35	1784	4	< 1	166	< 1	< 5
HAp-N ₂	35	1723	1	< 1	27	< 1	< 5
HAp-i	9	173	17	< 1	65	< 1	< 5

IV.4 Aspersão térmica

Nesta etapa do trabalho são caracterizados os pós utilizados na aspersão térmica a plasma e HVOF, substratos metálicos e recobrimentos.

IV.4.1 Caracterização dos pós destinados à aspersão térmica

Os pós destinados aos recobrimentos foram caracterizados quanto a distribuição dos tamanhos de partículas/aglomerados e morfologia por microscopia eletrônica de varredura. Os valores médios dos tamanhos de partículas são apresentados na tabela 9 e as curvas de distribuição são apresentadas na figura 27. As curvas de distribuição diferem entre si. Os valores médios maiores foram encontrados para a HAp-ar e HAp-cr com tamanhos médios de 41,3 μm e 37 μm , respectivamente. O método da cristalização produziu pós com distribuição monomodal, o mesmo comportamento foi observado em escala de laboratório (figura 15). A HAp-i apresenta tamanho médio de 25 μm e 31,8 μm para a HAp-N₂. A Al₂O₃ com 46,5 μm apresenta o maior valor médio e distribuição monomodal.

Tabela 9 - Tamanho médio dos aglomerados (D) das amostras obtidas em escala piloto, HAp-cr, HAp-ar e HAp-N₂ calcinadas a 1000 °C/3h e pós comerciais como recebidos, HAp-i e Al₂O₃.

Síntese	D (μm)
HAp-cr	37,0
HAp-ar	41,3
HAp-N ₂	31,8
HAp-i	2,5
Al ₂ O ₃	46,5

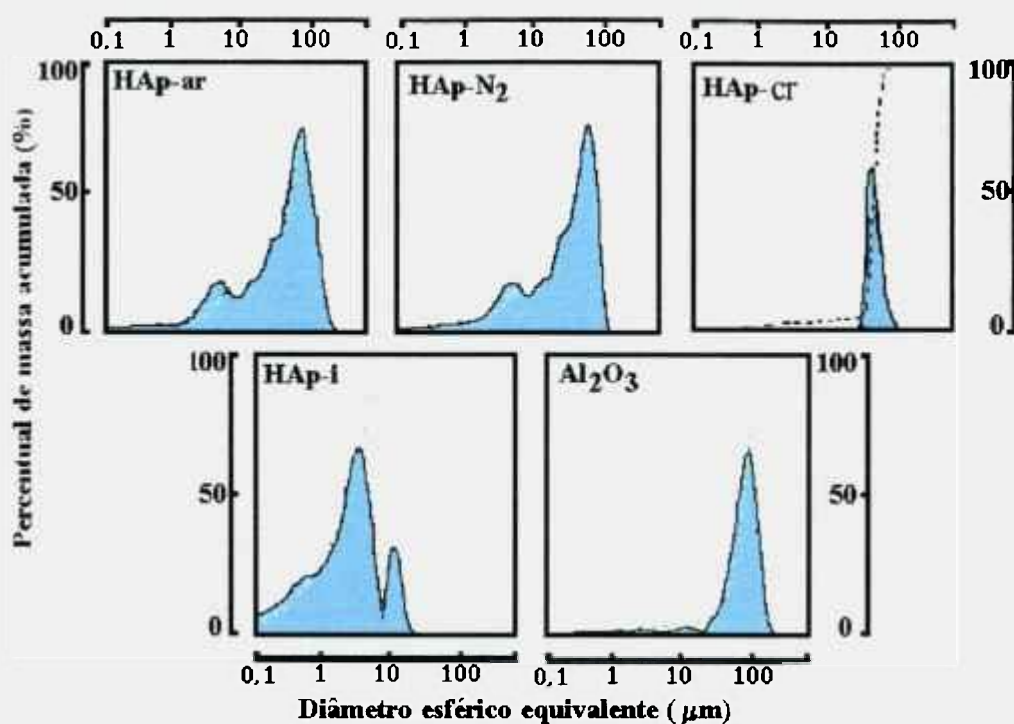


Figura 27 - Curvas de distribuição dos tamanhos de partículas/aglomerados dos pós obtidos em escala piloto, HAp-cr, HAp-ar e HAp-N₂ calcinadas a 1000 °C/3h e pós comerciais como recebidos, HAp-i e Al₂O₃.

A avaliação por MEV mostra a presença de morfologia irregular para o pó HAp-ar e com tamanho médio superior a HAp-i de partículas arredondadas. A alumina utilizada apresenta partículas angulares de tamanho e morfologia homogênea (figura 28).

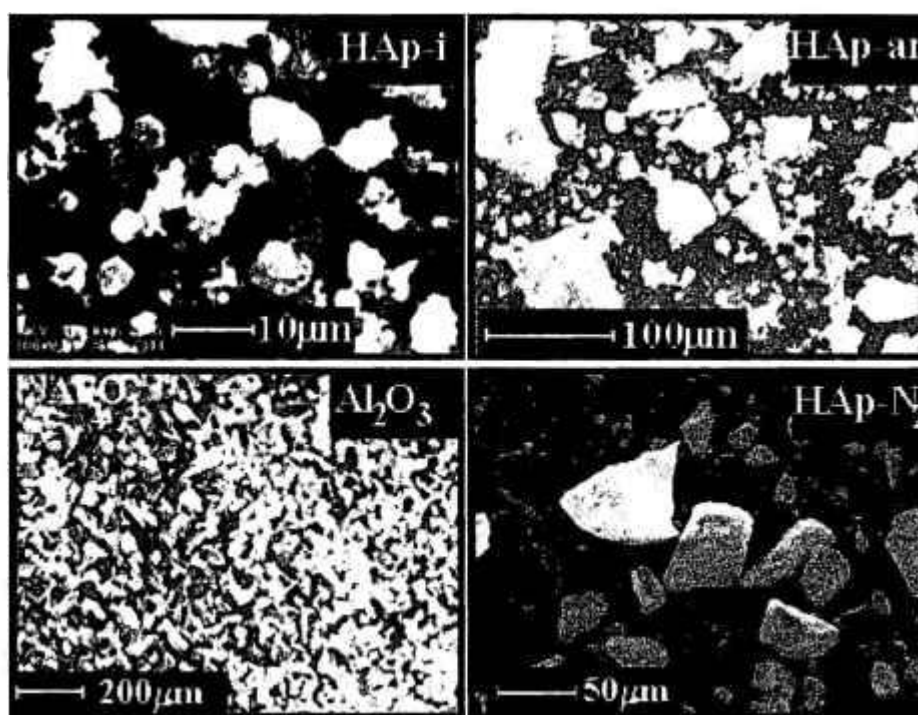


Figura 28 - Micrografias dos pós utilizados nos recobrimentos por aspersão térmica. HAp-ar e HAp-N₂ calcinados a 1000°C/3h. HAp-i e Al₂O₃ como recebido, (SE).

Micrografia do pó de HAp-N₂ observado em MEV com maior aumento é apresentada na figura 29. Os aglomerados são constituídos de pequenas partículas com tamanho médio inferior a 0,2 μm. Os pós sintetizados provenientes por esse processo são finos e a aglomeração provavelmente ocorre no momento da secagem. A morfologia dos aglomerados do pó de HAp-cr são constituídos de estruturas com vários cristais de formato aciculares e concêntricos, observados em MEV, figura 30.

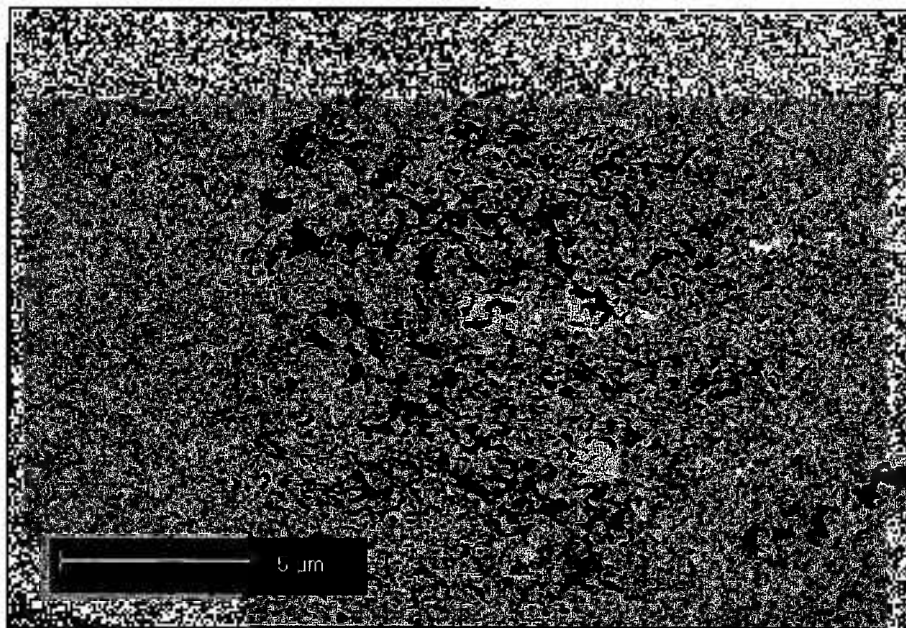


Figura 29 - Micrografia de aglomerado HAp-N₂ calcinado a 1000°C por 3 horas, (SE).

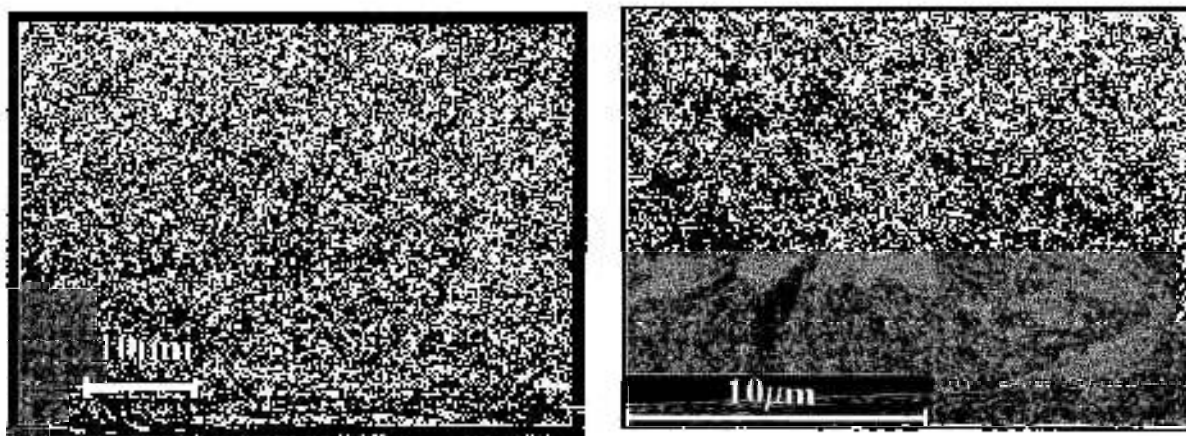


Figura 30 - Micrografia de aglomerados de HAp-cr calcinado a 1000°C por 3 horas, (SE).

IV.4.2 Avaliação citotóxica dos pós utilizados na aspersão

A avaliação citotóxica dos pós de HAp-ar, HAp-N₂ e HAp-i, utilizados nas deposições, foi realizada pelo método de supressão de colônias. As porcentagens do número de colônias formadas nas placas de Petri, CHO nas diferentes concentrações dos extratos dos materiais analisados são apresentadas na tabela 10.

Os valores obtidos nos ensaios são projetados em gráfico (figura 31). A partir dos gráficos pode-se calcular quantitativamente o potencial citotóxico, IC₅₀, que é uma unidade de bioatividade. IC₅₀ expressa a concentração de extrato do material analisado que provoca a morte ou inibe metade da população celular. O controle negativo, não deve produzir resposta citotóxica, como é observado com a alumina de alto teor de pureza utilizada. O controle positivo deve levar a uma resposta citotóxica positiva, como é o caso da solução de fenol 0,02 %, que apresenta IC₅₀ igual a 30% (figura 31). A HAp-ar e HAp-N₂ apresentam IC₅₀ maiores que 100 indicando ausência de citotoxicidade.

A HAp-i apresentou IC₅₀ menor que 100, inferindo comportamento citotóxico bastante acentuado. A figura 32 apresenta uma comparação entre as diversas placas de cultura das amostras tóxicas e não tóxicas. O comportamento citotóxico da HAp se deve provavelmente a aditivos orgânicos utilizados no pó comercial.

A HAp-cr apresentou IC₅₀ > 100 indicando ausência de citotoxicidade e portanto características biocompatíveis (tabela 11).

Tabela 10 - Teste de citotoxicidade pela supressão de colônias dos pós de HAp utilizados nas deposições por aspensão térmica, em relação à placa controle.

Amostras	Colônias visíveis nas placas de CHO				
	Concentração do Extrato (%)				
	6,25	12,5	25	50	100
Controle Negativo	93	93	88	97	97
Controle Positivo	77	70	55	26	0
HAp-ar (1000°C/3h)	73	92	84	77	65
HAp-N ₂ (1000°C/3h)	78	85	78	83	72
HAp-i (sem calcinação)	57	32	17	0	0
HAp-i (500°C/3h)	91	83	70	17	1
HAp-i (1000°C/3h)	0	1	0	0	0

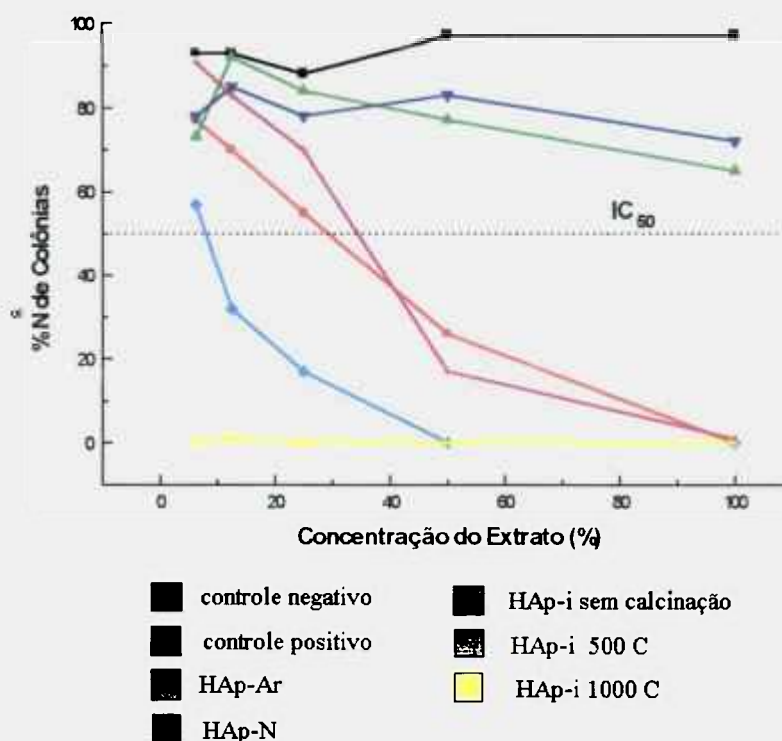


Figura 31 - Curva de supressão de colônias para os pós de HAp utilizados nas deposições por aspensão térmica.

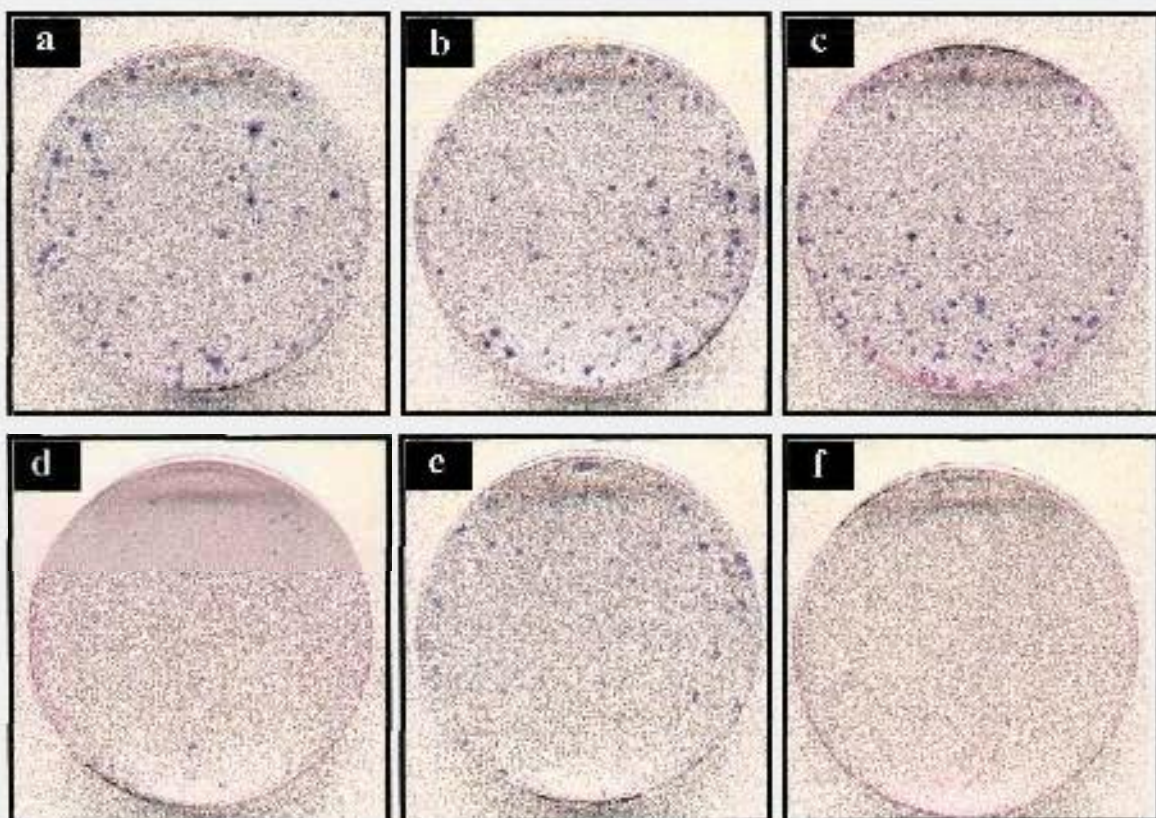


Figura 32 - Placas de cultura utilizadas nos ensaios de supressão de colônias. (a) placa controle CHO; (b) placa com extrato de HAp-ar; (c) placa com extrato de HAp-N₂; (d) placa com extrato de HAp-i como recebida; (e) placa com extrato de HAp-i calcinada a 500°C/3h; (f) placa com extrato de HAp-i calcinada a 1000°C/3h.

Tabela 11 – Teste de citotoxicidade da HAp-cr: percentual do número de colônias visíveis nas placas de CHO, em relação a placa controle.

Amostras	Colônias visíveis nas placas de CHO			
	Concentração do Extrato (%)			
	12,5	25	50	100
Controle Negativo	103	86	95	100
Controle Positivo	85	93	65	24
HAp-cr (1000°C/3h)	99	92	85	86

IV.4.3 Caracterização dos substratos metálicos

Utilizou-se a técnica de espectrometria de fluorescência de raios X para a caracterização química dos substratos metálicos a partir dos resultados apresentados na tabela 12. Foi detectada a presença de ferro em todos os substratos analisados. Verifica-se que os teores de ferro encontrados nos substratos 1 e 4 estão de acordo com as especificações da norma ASTM B265-GR2. O substrato 2 está fora da especificação em função do alto teor de Fe, que diminui a resistência a corrosão. No substrato 3, o valor de 3,55% para V difere do valor nominal de 4%, mas está dentro das especificações, já o teor de Al deveria ser de no máximo 6,75%.

Tabela 12 - Resultados das análises químicas por FRX das ligas metálicas.

Determinação dos elementos (%)				
substratos	Ti	Al	V	Fe
T ₁	99,80	-	-	0,20
T ₂	99,57	-	-	0,43
TV ₃	88,68	7,41	3,55	0,36
T ₄	99,79	-	-	0,21

Utilizou-se difratometria de raios X para identificação das fases cristalinas presentes nos substratos metálicos. Os resultados são apresentados na figura 33. Os difratogramas referentes aos substratos 1, 2 e 4 foram identificados como sendo de titânio metálico pertencente ao sistema hexagonal de acordo com a identificação pela microficha 44-1294 (JCPDS).

As amostras metálicas foram submetidas a técnica de *spining* (rotação) para diminuir o efeito da textura o que poderia inviabilizar os resultados. Apesar disso, houve inversão na intensidade do pico de 100% indicado pela seta de cor lilás,

enquanto a seta vermelha indica a presença de um pequeno pico de difração não identificado.

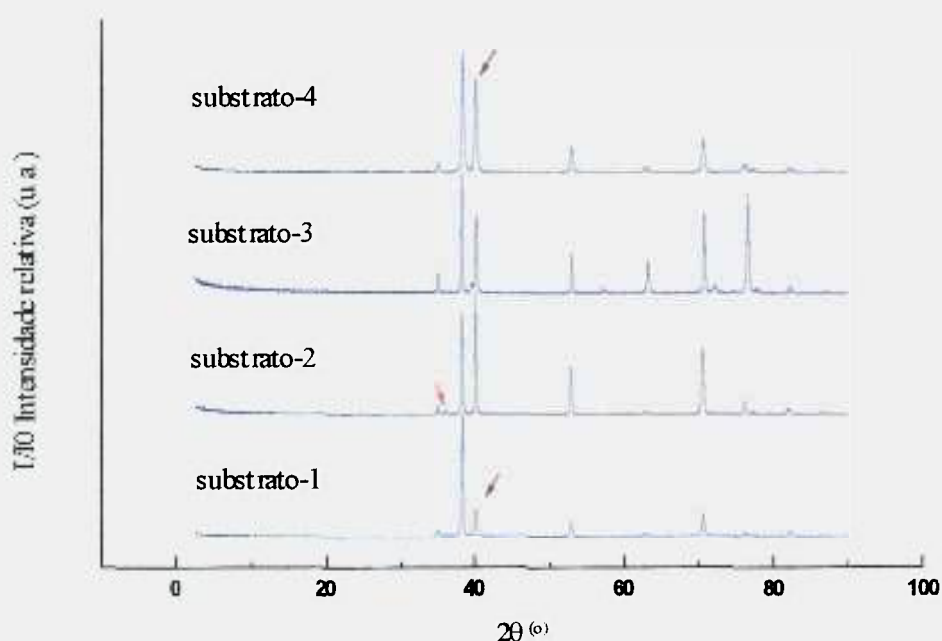


Figura 33 - Difratogramas dos substratos metálicos 1, 2, 3 e 4.

Após jateamento abrasivo com granalha de alumina, foram medidas as rugosidades dos substratos. Os valores são apresentados na tabela 13 juntamente com as suas dimensões.

As micrografias da figura 34 referem-se aos substratos metálicos com morfologia similar após jateamento abrasivo. Por microanálise qualitativa, realizada com EDS em MEV, não foram encontradas impurezas nos substratos jateados.

Tabela 13 - Dimensões dos substratos metálicos na forma de chapas retangulares e rugosidade média obtida após jateamento abrasivo com granalha de alumina.

substrato	T ₁	T ₂	TV ₃	T ₄
Dimensões (mm)	37x10x0,91	33x10x0,9	20x10x0,5	27x10x2,0
rugosidade (μm)	4,3	5,0	4,1	4,3

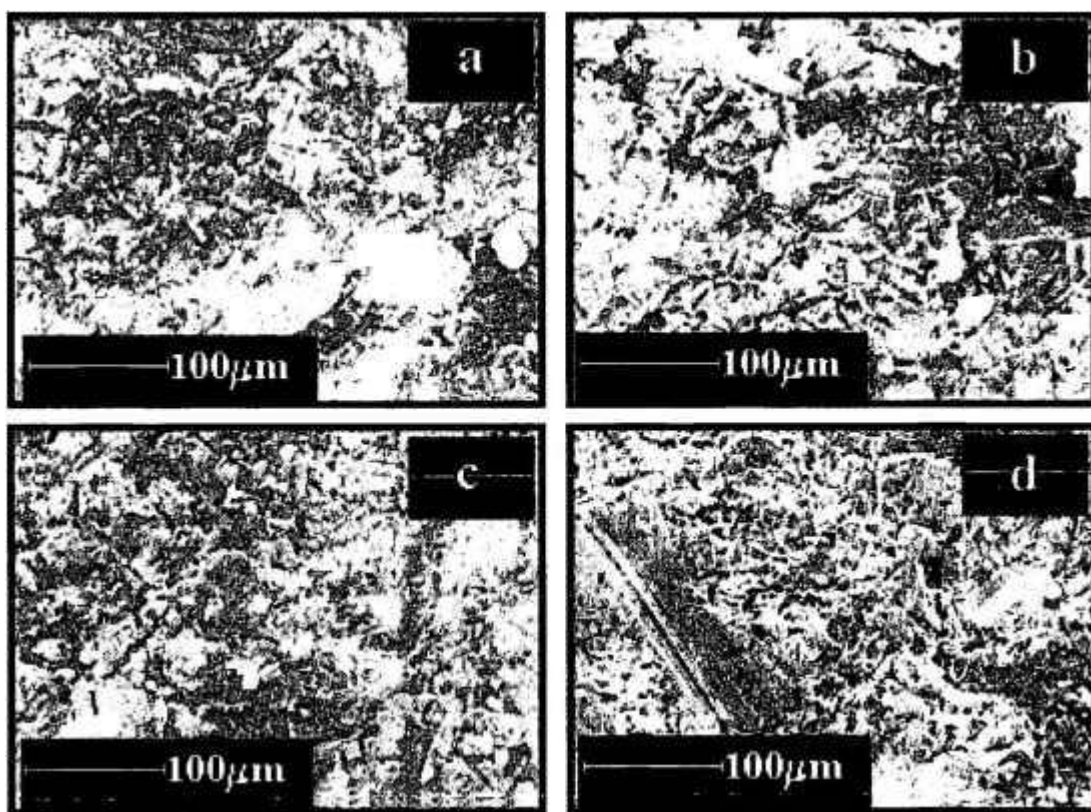


Figura 34 - Micrografias dos substratos metálicos: (a) T1, (b) T2, (c) TV3 e (d) T4 após receberem jato abrasivo com granalha de alumina.

IV.4.3.1 Avaliação citotóxica dos substratos metálicos

A avaliação citotóxica dos substratos metálicos foi efetuada pelo método de supressão de colônias e difusão em ágar. Os metais testados apresentaram $IC_{50} > 100$ indicando ausência de citotoxicidade.

A avaliação citotóxica pelo método da difusão em ágar foi realizada em duplicata. Neste método, a monocamada de células vivas apresenta coloração vermelha enquanto que a coloração amarelada indica que as células morreram. Este método possibilitou avaliar a toxicidade pela formação de halo amarelo indicando a morte celular. O ágar atua como uma camada amortecedora impedindo que ocorra agressão mecânica na monocamada celular e possibilitando a difusão de compostos citotóxicos quando existentes.

A figura 35 apresenta fotografias de placas de cultura representativas dos ensaios. Em (a), tem-se a formação do halo mais amarelado referente à resposta positiva, isto é, a partir da interação com o material citotóxico no centro da placa (controle positivo). Em (b), a fotografia refere-se ao substrato T_1 que como pode ser observado não apresenta halo. Todos os substratos foram testados, observando-se a não formação de halos, resposta não citotóxica. A título de comparação, em (c) tem-se um pedaço de papel de filtro que não é citotóxico (controle negativo).

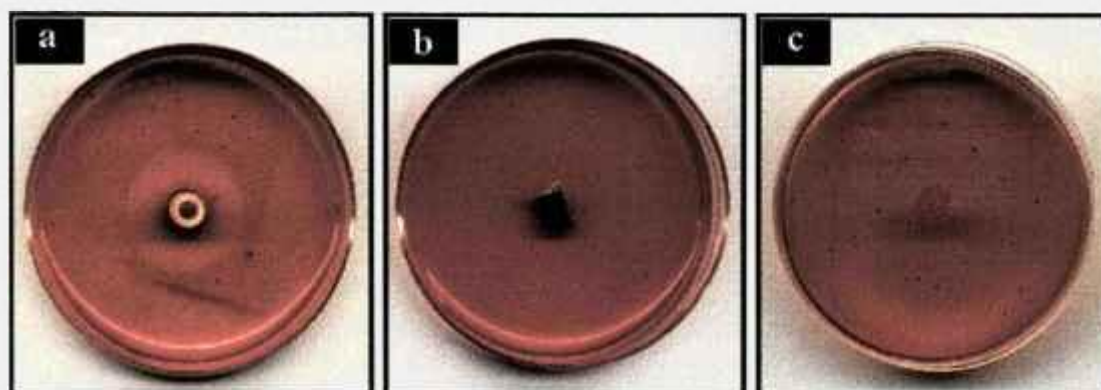


Figura 35 - Fotografia do ensaio de toxicidade realizado com o substrato metálico T₁ pelo método da difusão em ágar. (a) controle positivo com látex; (b) substrato metálico (T₁); (c) controle negativo com papel de filtro.

A interface entre as duas regiões, células mortas e saudáveis, é ilustrada na figura 36 com fotografias obtidas em ensaios com um cilindro de látex, controle positivo.

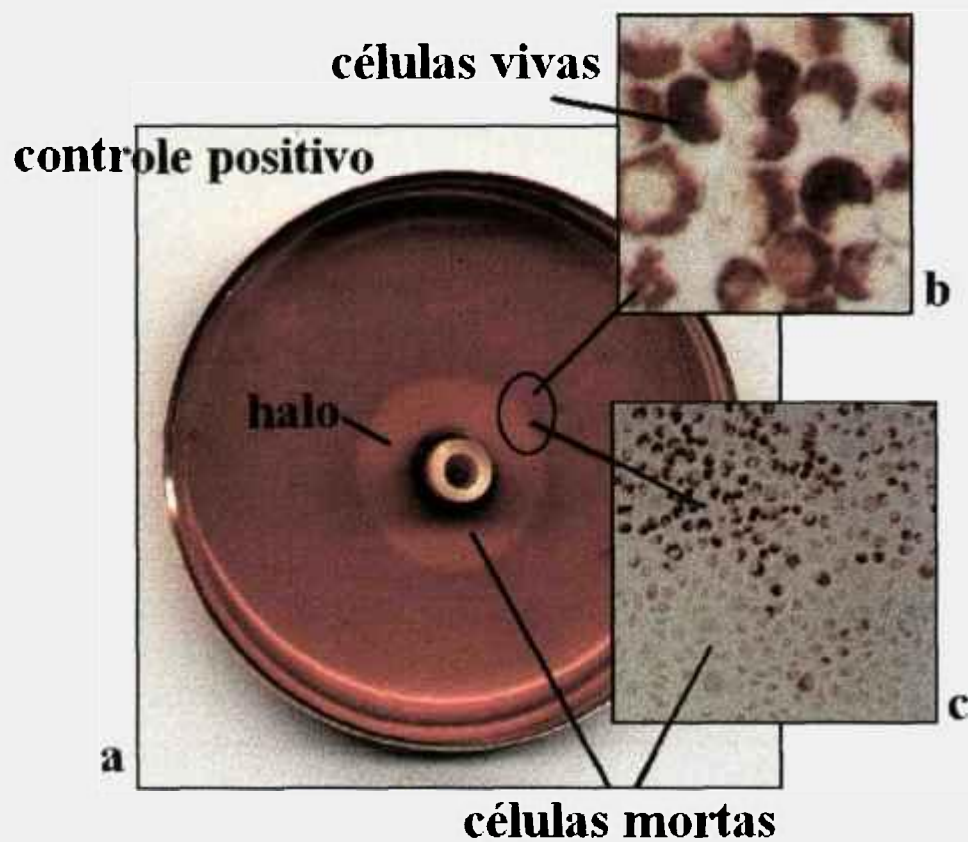


Figura 36 - Fotografias obtidas por microscopia óptica da placa de controle positivo (a); região com células vivas (b); região de interface entre o halo com células mortas e as células vivas (c).

IV.4.4 Caracterização dos recobrimentos

Para a aspersão térmica foram utilizados pós de HAp obtidos em escala piloto, HAp-cr, HAp-ar e HAp-N₂ e os resultados foram comparados com os pós obtidos nos recobrimentos com HAp-i e Al₂O₃ da Brodmann, pós utilizados comercialmente. As diferentes condições experimentais realizada por aspersão térmica a plasma e HVOF são apresentadas na tabela 14.

Tabela 14 - Códigos utilizados para descrever as diferentes condições experimentais para recobrimento por plasma e HVOF.

Material aspergido	Técnica de aspersão			
	Plasma-H ₂		Plasma-He	HVOF
I	II			
Al ₂ O ₃	-	A-T ₁ -P-H ₂ -II A-T ₂ -P-H ₂ -II A-TV ₃ -P-H ₂ -II A-T ₄ -P-H ₂ -II	A-T ₁ -P-He A-TV ₃ -P-He	-
HAp-i	HAp-i-T ₁ -P-H ₂ -I HAp-i-T ₂ -P-H ₂ -I HAp-i-TV ₃ -P-H ₂ -I HAp-i-T ₄ -P-H ₂ -I	HAp-i-T ₁ -P-H ₂ -II HAp-i-T ₂ -P-H ₂ -II HAp-i-TV ₃ -P-H ₂ -II HAp-i-T ₄ -P-H ₂ -II	HAp-i-T ₁ -P-He HAp-i-TV ₃ -P-He	HAp-i-T ₁ -HV HAp-i-T ₂ -HV HAp-i-TV ₃ -HV HAp-i-T ₄ -HV
Al ₂ O ₃ + HAp-i	-	A-HAp-i-T ₁ -P-H ₂ -II A-HAp-i-T ₂ -P-H ₂ -II A-HAp-i-TV ₃ -P-H ₂ -II A-HAp-i-T ₄ -P-H ₂ -II	A-HAp-i-T ₁ -P-He A-HAp-i-TV ₃ -P-He	-
HAp-ar	-	-	HAp-ar-T ₁ -P-He HAp-ar-TV ₃ -P-He	-
Al ₂ O ₃ + HAp-ar	-	-	A-HAp-ar-T ₁ -P-He A-HAp-ar-TV ₃ -P-He	-
HAp-N ₂	-	-	HAp-N ₂ -T ₁ -P-He HAp-N ₂ -TV ₃ -P-He	HAp-N ₂ -T ₁ -HV
Al ₂ O ₃ + HAp-N ₂	-	-	A-HAp-N ₂ -T ₁ -P-He A-HAp-N ₂ -TV ₃ -P-He	-

Onde: [A= Al₂O₃], [P= plasma], [I= plasma com fluxo de H₂=5,5],[II= plasma com fluxo de H₂=8,5], [ar = ar], [N₂= nitrogênio], [HAp-i = HAp importada], [T= Ti (1,2 ou 4)], [TV₃ =Ti-6Al-4V]

Os pós obtidos por HAp-cr não puderam ser aspergidos sobre os substratos por provocarem entupimento do sistema de alimentação dos pós. Este fato pode estar relacionado a morfologia acicular (figura 30) dificultando a escoabilidade.

Por difratometria de raios X dos substratos recobertos com HAp-i por plasma de hidrogênio na condição I (figura 37), observa-se a presença das fases hidroxiapatita, como majoritária e, óxido de cálcio e β -TCP, em menores proporções, em todos os tipos de substratos. Essa condição de recobrimento não apresentou, visualmente e por tato, bons resultados. Por isso foram utilizadas condições mais energéticas e com maior fluxo de hidrogênio. Os difratogramas dos recobrimentos referentes a essa nova condição são apresentados na figura 38.

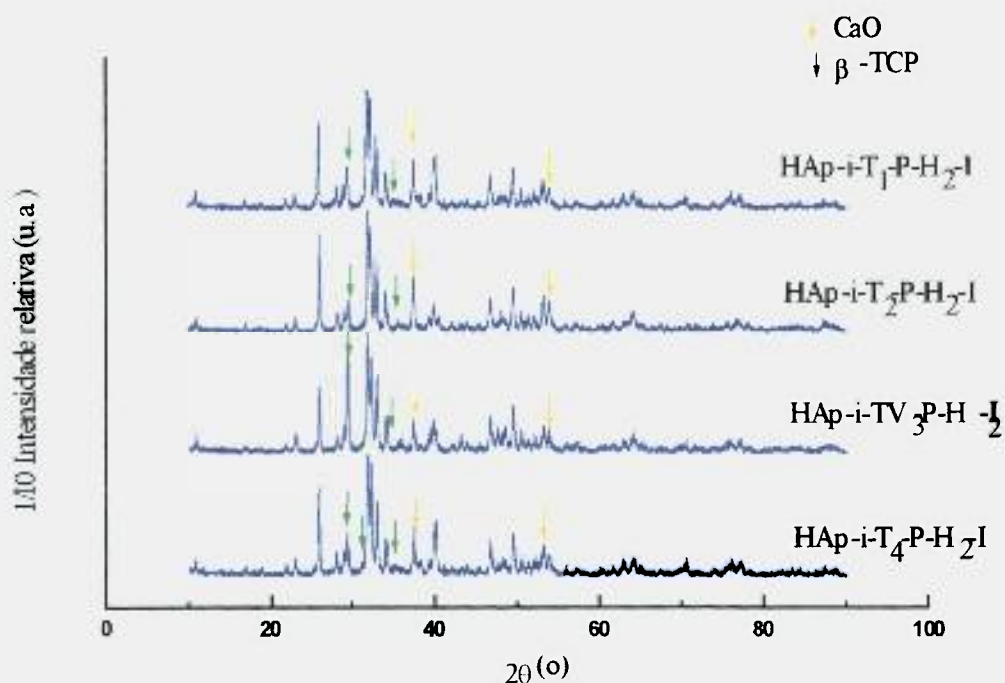


Figura 37 - Difratogramas de raios X de substratos recobertos com HAp-i na condição de plasma de hidrogênio (I) e calcinados a 500°C/3h. Os picos não assinalados pertencem a HAp.

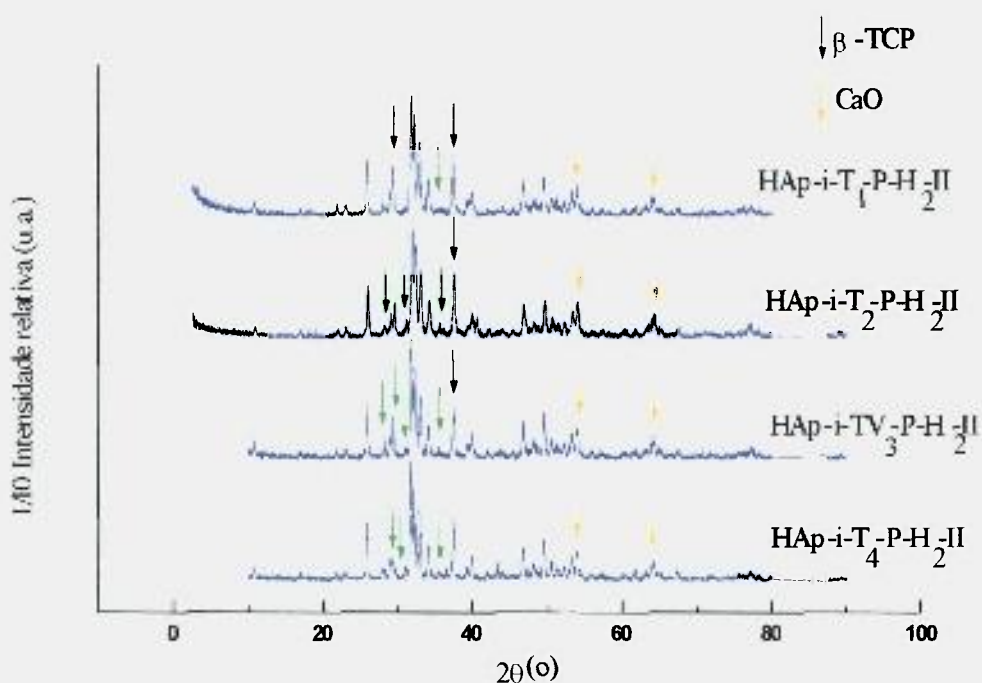


Figura 38 - Difratomogramas de raios X de substratos recobertos com HAp-i na condição de plasma de hidrogênio (II) e calcinados a 500°C/3h. Os picos não assinalados são da fase HAp.

Nos recobrimentos com alumina, houve transformação parcial da fase α -alumina para γ -alumina, independentemente do tipo de substrato ou plasma utilizado, H₂ ou He (figuras 39 e 40). Essa transformação decorre do resfriamento rápido que sofre o material no estado fundido ao atingir o substrato frio. A detecção da alumina- α nos recobrimentos pode ser atribuída a partículas isoladas que permaneceram sólidas ou sofreram fusão parcial durante a deposição.

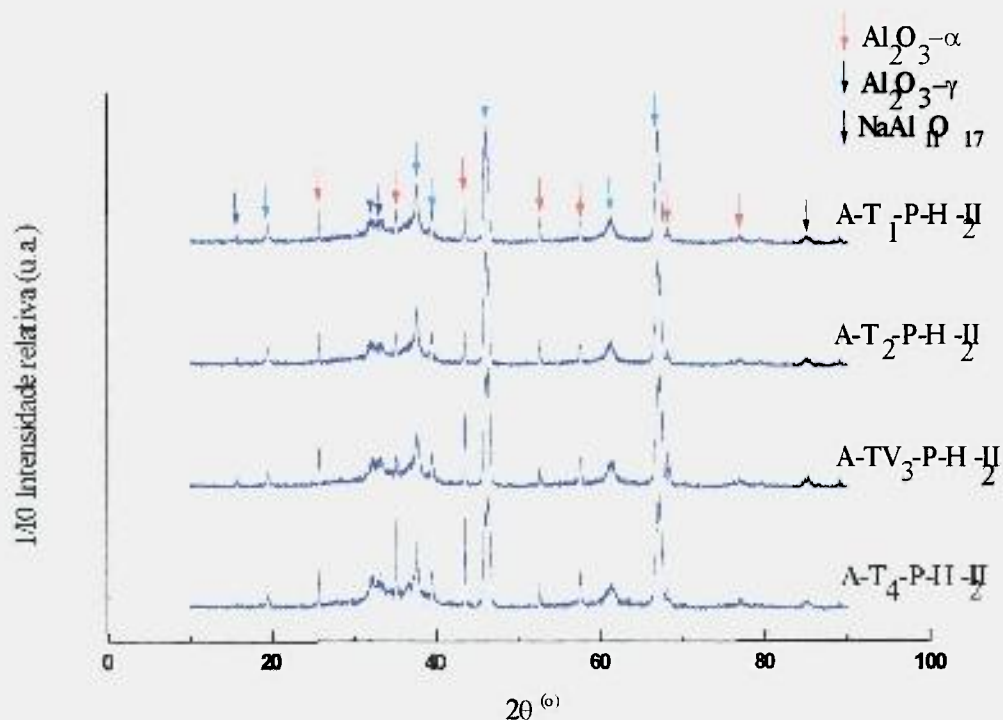


Figura 39 - Difratogramas de raios X de substratos recobertos com Al₂O₃ na condição de plasma de hidrogênio (II) calcinados a 500°C/3h.

A Figura 40 apresenta difratogramas de substratos recobertos primeiramente com alumina e depois por HAp-i, na condição de plasma de hidrogênio II. São observados além da fase majoritária de HAp, picos de alumina gama, de óxido de cálcio e β-TCP. Um pico não pode ser identificado para a condição A-HAp-i-T₂-PH₂-II. Em função da fina camada de recobrimento na condição A-HAp-i-TV₃-PH₂-II foram observados picos pertencentes a liga do substrato, Ti-6Al-4V.

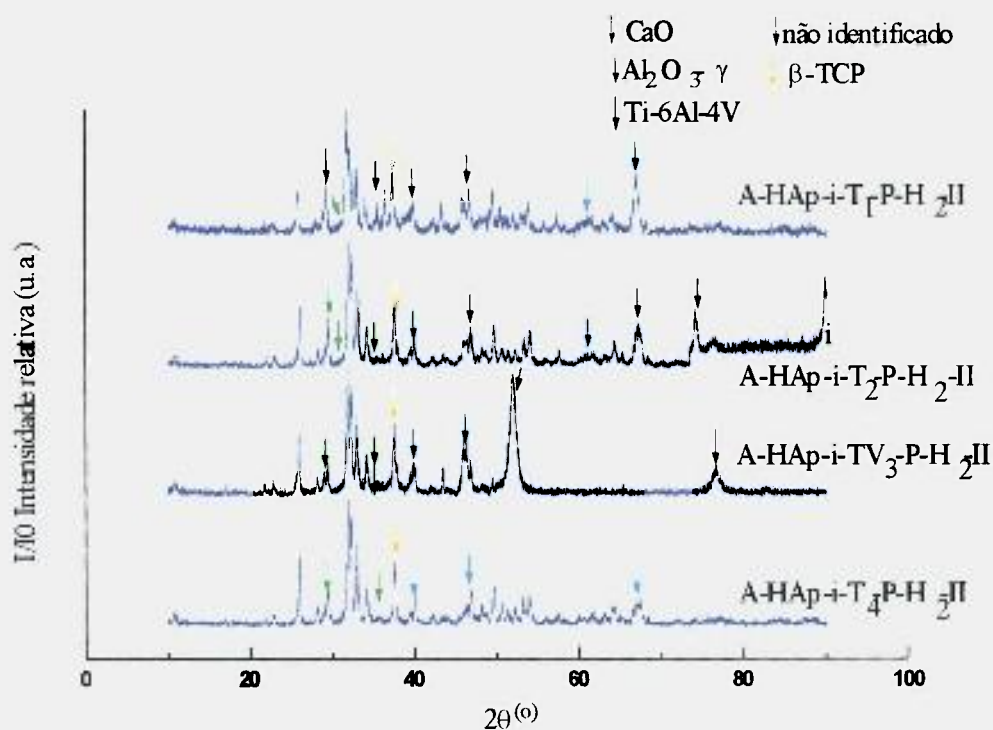


Figura 40 - Difratoogramas de raios X de substratos recobertos com Al_2O_3 e HAp-i na condição de plasma de hidrogênio (II), calcinados a $500^\circ\text{C}/3\text{h}$.

A figura 41 apresenta os difratogramas referentes as deposições de aspersão térmica com He para Al_2O_3 e HAp-i sobre substrato T₁. Nos substratos revestidos com alumina, foram identificadas as fases de alumina alfa e gama, além de picos de um óxido misto de sódio e alumínio. Este óxido é formado no processo de obtenção da alumina.

A HAp-i aspergida por plasma de He apresentou como fase principal a HAp com decomposição parcial para CaO e β -TCP.

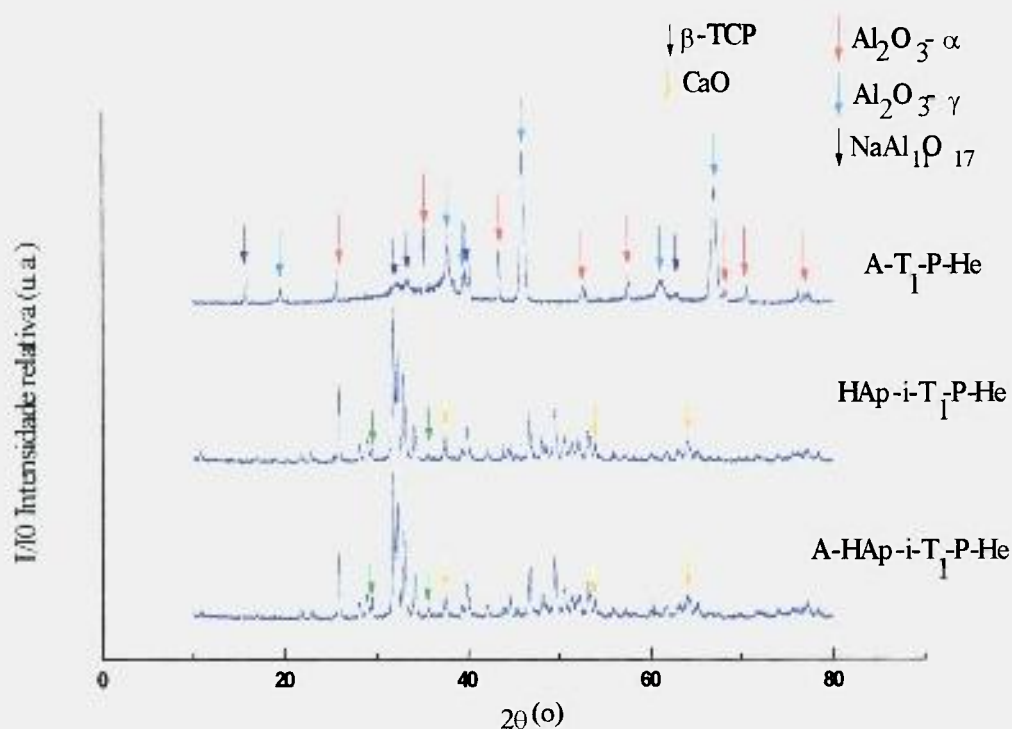


Figura 41 - Difrátogramas de raios X de substratos recobertos com Al₂O₃ e HAp-i na condição de plasma de He calcinados a 500°C/3h. Os picos não assinalados pertencem à fase HAp.

Os difratogramas referentes às deposições de HAp-ar e HAp-N₂ por plasma de He são apresentados na figura 42. Os substratos recobertos com HAp-N₂ ou HAp-ar apresentaram comportamento semelhante, com presença da fase principal de HAp, picos de mistura das fases provenientes da decomposição da HAp, β-TCP e CaO.

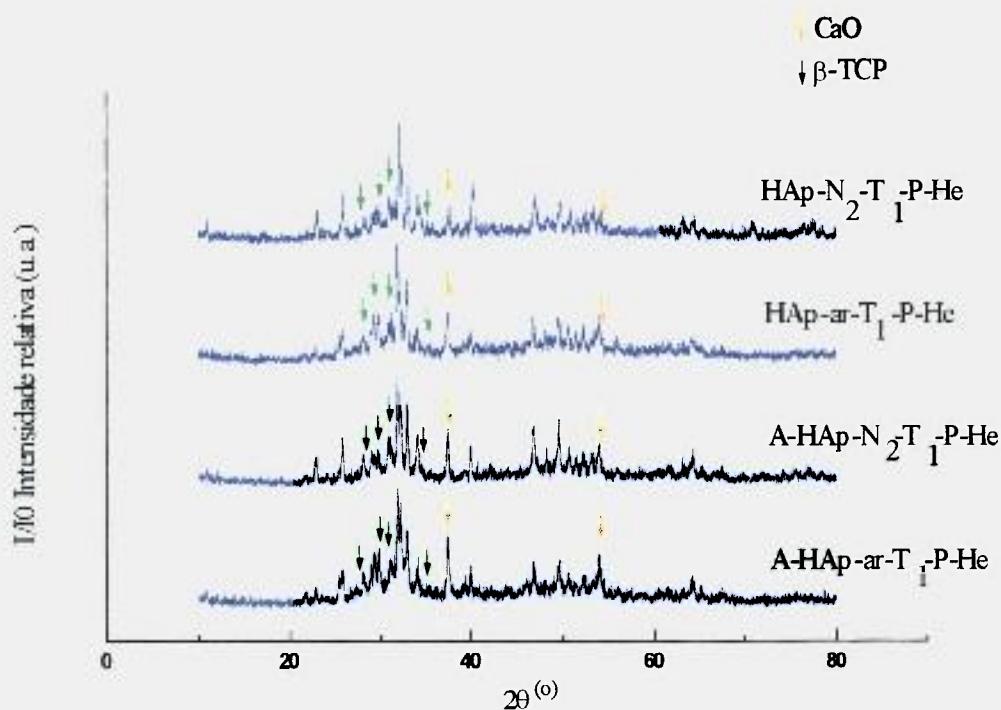


Figura 42 - Difratoogramas de raios X de substratos recobertos com HAp-ar e HAp-N₂ na condição de plasma de He calcinados a 500°C/3h.

Por DRX foi observado que os revestimentos mais cristalinos foram obtidos com plasma de He. O plasma de H₂ diminui a cristalinidade dos recobrimentos. Este resultado pode ser explicado devido a maior reatividade do gás hidrogênio, que ao interagir com o pó, além de fundir o material, reage quimicamente. Como consequência da reatividade química e térmicas a fase β-TCP aparece mais intensamente na condição de plasma de H₂.

Os revestimentos de HAp-i nas diferentes condições de aspersão sofreram decomposição de fase em CaO. A fase CaO surge da decomposição de hidroxiapatitas ricas em cálcio [2, 6]. Este fato foi observado em todos revestimentos com os pós de HAp, independente da condição de aspersão. Estes resultados estão de acordo com os valores superiores a 1,67 para a relação Ca/P, tabela 8.

Por DRX, foi possível constatar que os revestimentos com pós de HAp-i são aparentemente mais cristalinos apresentando picos de difração mais bem definidos e estreitos, quando comparados aos revestimentos com HAp-ar e HAp-N₂, independente do tipo de plasma utilizado.

As figuras 43 e 44 apresentam os difratogramas referentes as deposições por HVOF. Estas camadas são mais finas comparativamente aos recobrimentos por plasma, sendo observado nos difratogramas, os principais picos do metal (Ti).

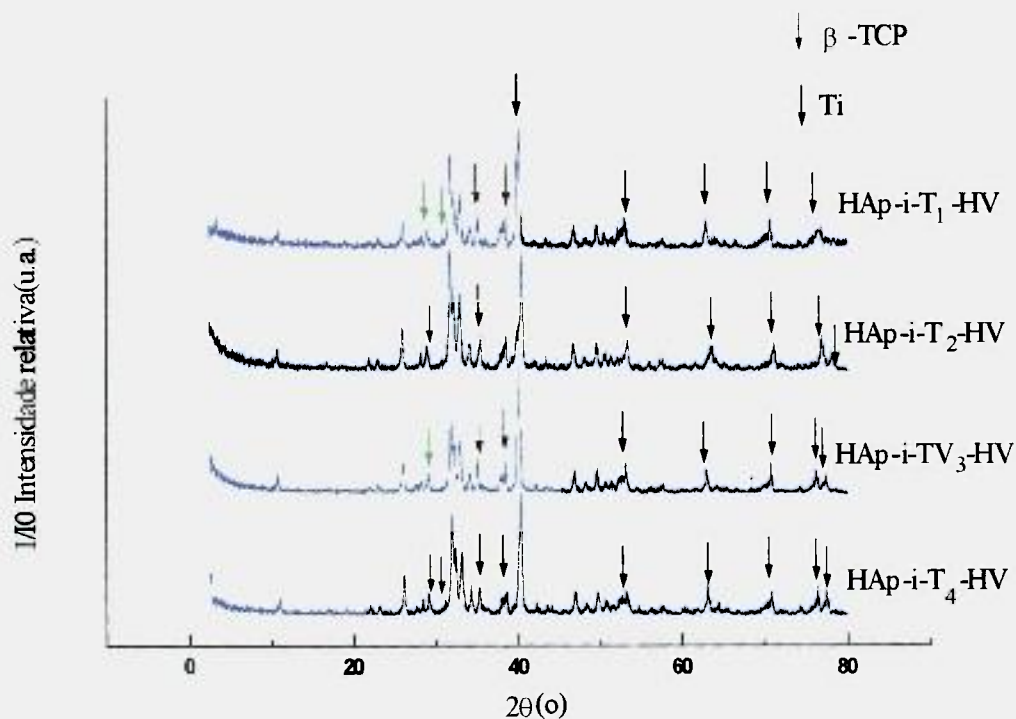


Figura 43 - Difratogramas de raios X de substratos recobertos com HAp-i na condição de HVOF e calcinados a 500°C/3h. Os picos não assinalados pertencem a fase HAp.

A deposição por HVOF apresenta condições altamente oxidantes que acabam por decompor a hidroxiapatita nas fases alfa e beta tricalciofosfato. Essa condição, visando sua aplicação em implantes metálicos, favoreceria a dissolução do revestimento. Um estudo “*in vivo*” poderia comprovar se este revestimento possui propriedades osseointodutoras.

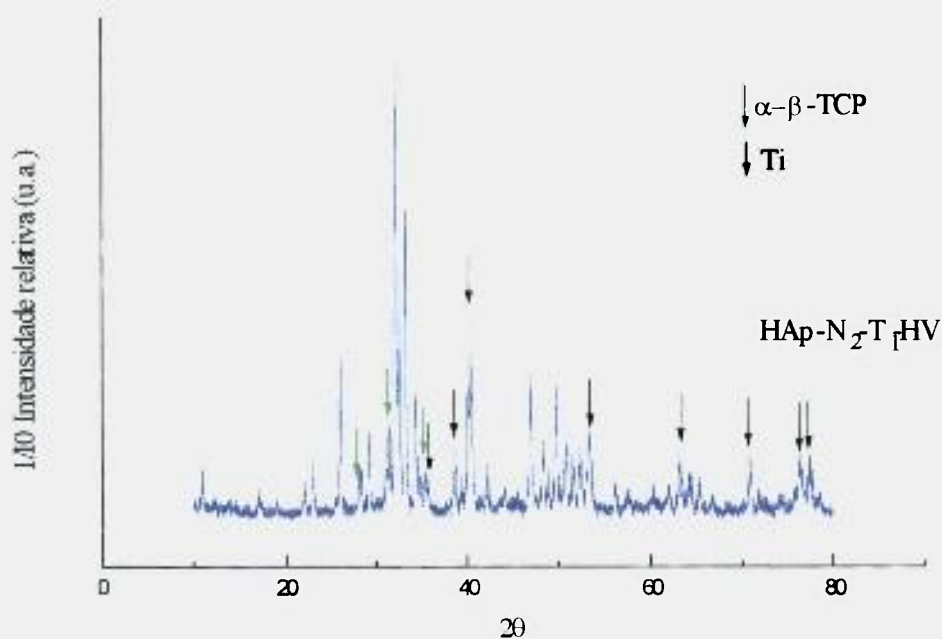


Figura 44 - Difratoograma de raios X de substrato de Ti recoberto por HAp-N₂ por HVOF e calcinados a 500°C/3h. Os picos não assinalados pertencem a fase HAp.

Os valores médios de rugosidade das superfícies dos recobrimentos são apresentados na figura 45 em Ra (μm). As colunas vermelhas referem-se às deposições por plasma de hidrogênio e HVOF e as azuis, por plasma de hélio. Os maiores valores de rugosidade são observados para os pós HAp-ar e HAp-N₂, aspergidos com plasma de He com camada intermediária de alumina. Não foram observadas diferenças em relação ao tipo de substrato metálico. HAp-i, com ou sem a camada de alumina, apresentou os menores valores em termos de rugosidade média. Maiores valores de rugosidade proporcionam o crescimento celular dentro das cavidades auxiliando na fixação do implante.

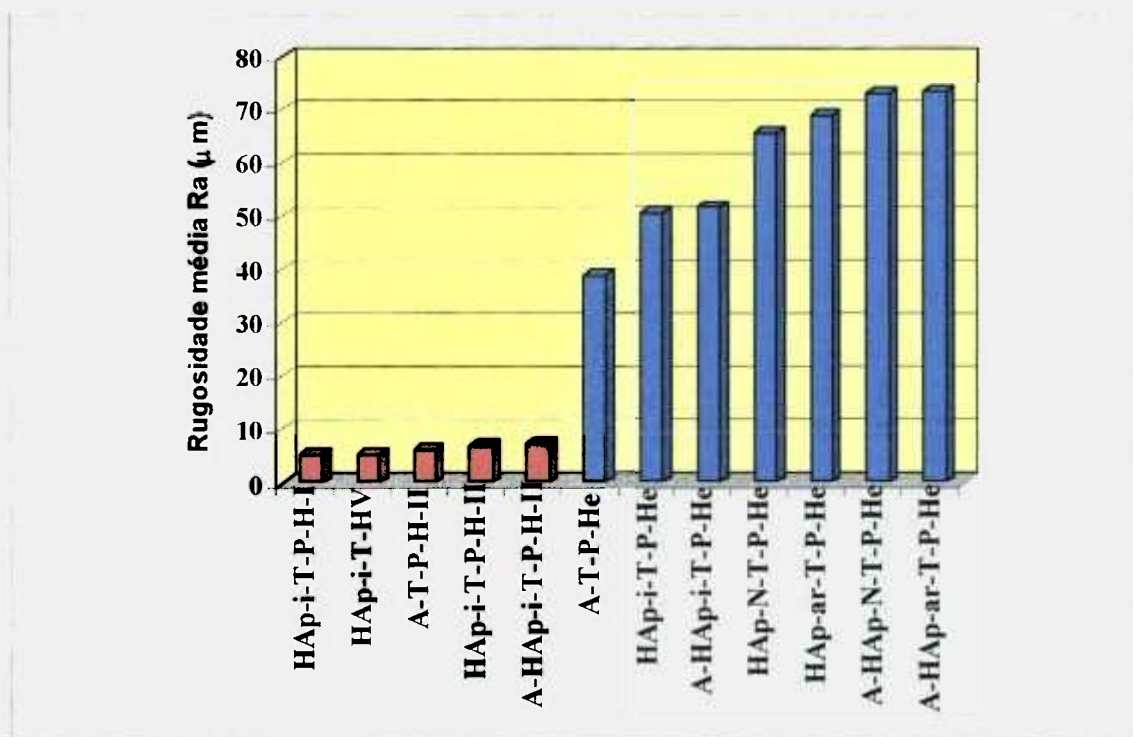


Figura 45 - Rugosidade média, Ra (μm), dos substratos recobertos por plasma de H₂, He e HVOF.

Menores valores de rugosidade são observados nas amostras com recobrimento de HAp-i (50 μm), quando comparados aos valores das HAp-ar (69 μm) e HAp-N₂ (66 μm).

Isto está de acordo com o tamanho médio de partículas/aglomerados dos pós HAp-i, HAp-N₂ e HAp-ar medidos 2,5; 31,8 e 41,3 μm , respectivamente. Assim, quanto maior o tamanho médio de partículas/aglomerados dos pós, maiores os valores de rugosidade na superfície do recobrimento.

Os menores valores de rugosidade foram encontrados nas condições de plasma de hidrogênio para a HAp-i (6,8 μm) e alumina (6,2 μm).

A análise microestrutural em MEV, das amostras preparadas de acordo com as condições apresentadas na tabela 5, foi realizada com o objetivo de se verificar a distribuição de porosidade, o grau de uniformidade microestrutural trincas e a adesão da camada revestida (figuras 46, 47(a e b) e 48(a e b)). Foram escolhidas micrografias representativas para cada série, não tendo sido observadas mudanças significativas em função do tipo de liga utilizada como substrato. Mudanças morfológicas ocorrem de uma série para outra.

Não são observadas diferenças significativas em função da alteração nas condições de plasma de hidrogênio I e II, como pode ser observado nas micrografias. As diferenças surgem quando são comparados os pós de alumina e de hidroxiapatita. Os recobrimentos com alumina apresentam um relevo mais suave, enquanto com a hidroxiapatita é bastante irregular (figura 46).

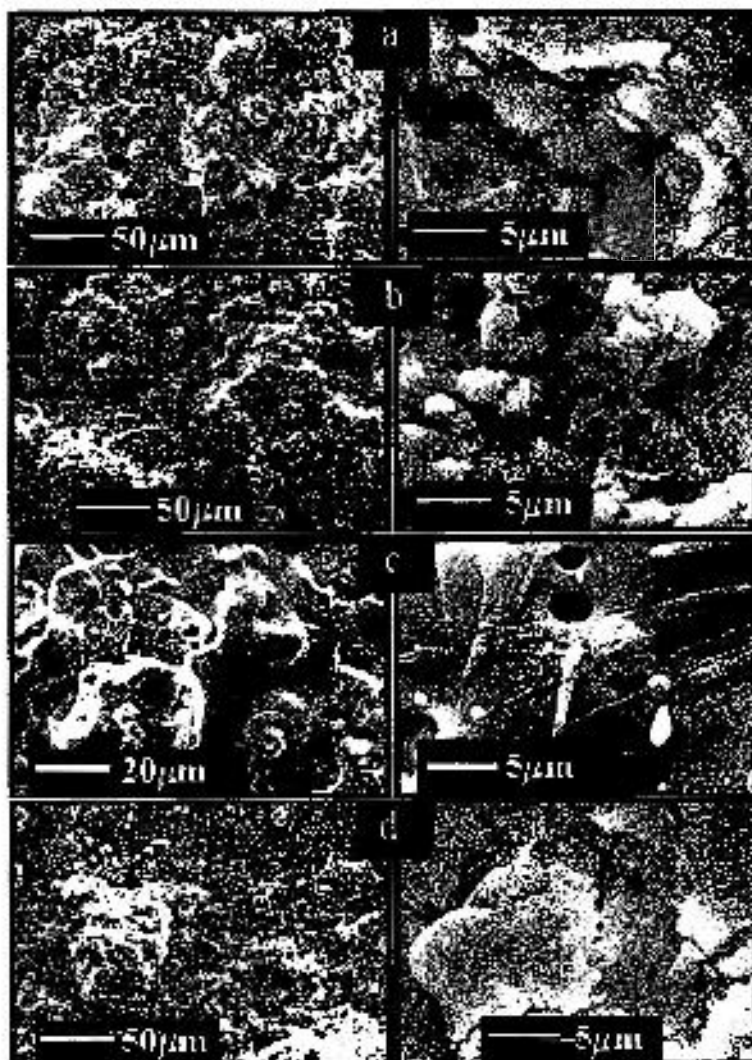


Figura 46 - Micrografias dos recobrimentos referentes à tabela 5. (a) HAp-i por plasma de H₂-I; (b) HAp-i por plasma de H₂-II; (c) deposição de Al₂O₃ por H₂-II, (d) HAp-i por H₂-II, após deposição de Al₂O₃, SE.

A série obtida por plasma de H_2 , apresentou trincas na região da interface cerâmica/metal trincas dificultando o preparo do material para observação em MEV. As deposições com Al_2O_3 e HAp-i/ Al_2O_3 são apresentadas na figura 47. Em (b) observa-se trincas na região de interface HAp-i/ Al_2O_3 .

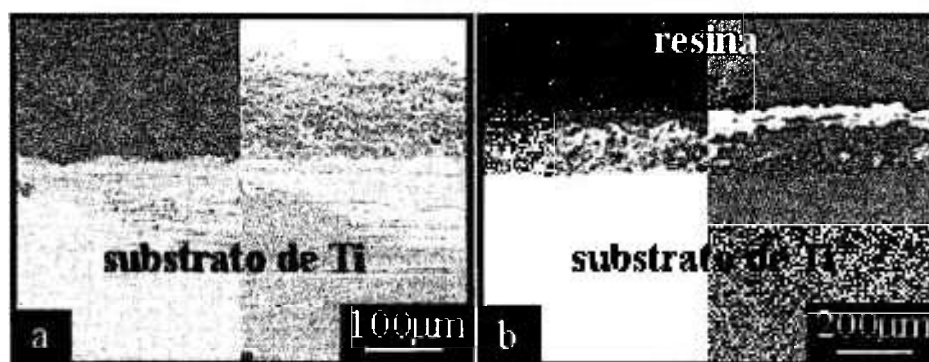


Figura 47 - Micrografias dos recobrimentos por plasma de H_2 -II referentes a tabela 5. (a) região da interface Al_2O_3 /substrato; (b) região da interface da HAp-i e Al_2O_3 /substrato de Ti, (BSE, SE).

Na condição de plasma de He, utilizando-se HAp-ar e HAp- N_2 observa-se qualitativamente a boa adesão da camada cerâmica ao substrato, isto é, porque não são observadas trincas na proximidade da região interface metal/cerâmica figuras 48 e 49. As micrografias também apresentam o preenchimento das cavidades metálicas pela cerâmica demonstrando que a cerâmica, realmente passou por um estado de fusão moldando-se à superfície do substrato.

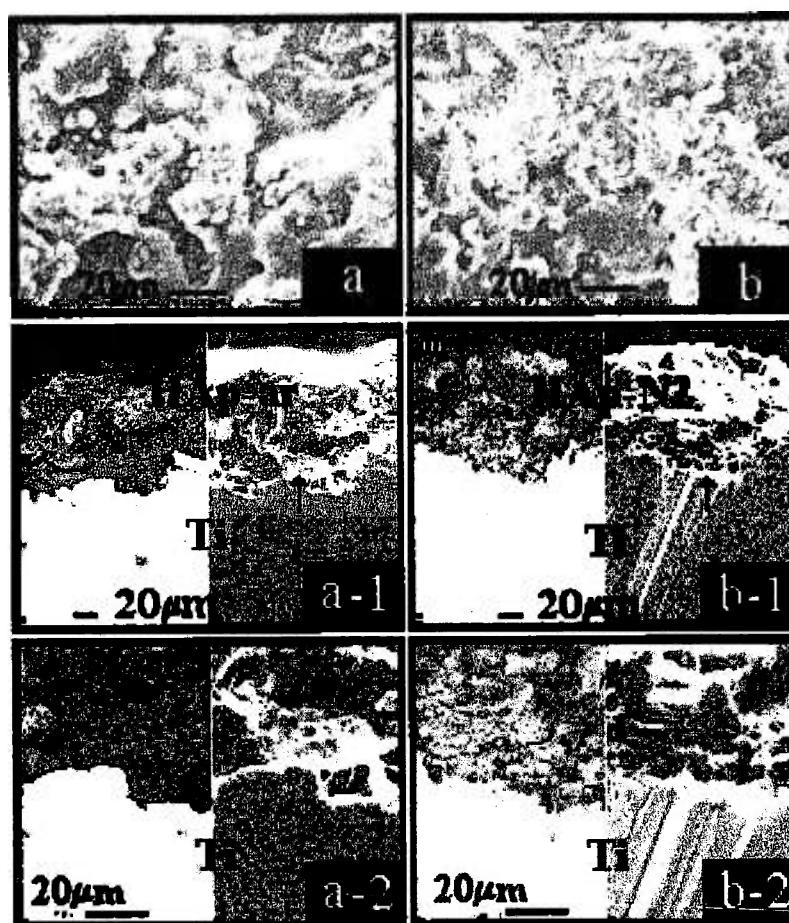


Figura 48 - Micrografias dos recobrimentos referentes à tabela 5. (a) HAp-ar por plasma de He; (b) HAp-N₂ por plasma de He; (a-1 e a-2) região da interface da HAp-ar/substrato de Ti; (b-1 e b-2) região da interface da HAp-N₂/substrato de Ti (SE, BSE).

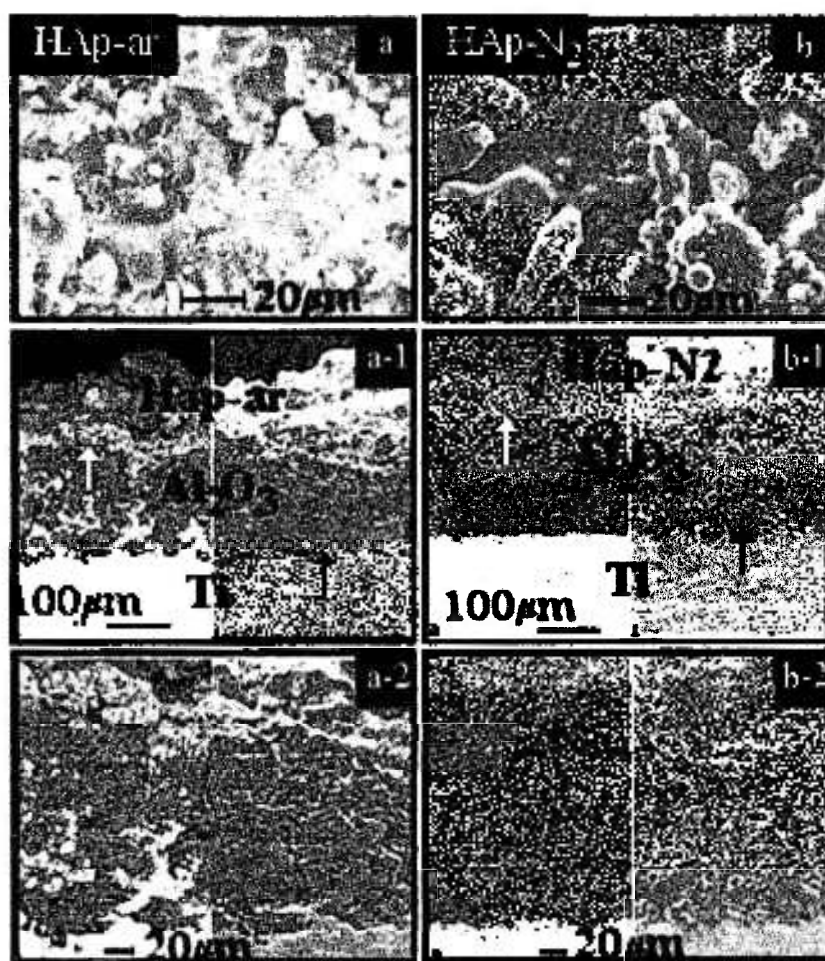


Figura 49 - Micrografias dos recobrimentos referentes à tabela 5. (a) HAp-ar por plasma de He, após recobrimento de Al₂O₃; (b) HAp-N₂ por plasma de He, após recobrimento de Al₂O₃; (a-1 e a-2) região da interface da HAp-ar e Al₂O₃/substrato de T₁; (b-1 e b-2) região da interface da HAp-N₂ e Al₂O₃/substrato de T₁. BSE, SE.

As micrografias por plasma de He com HAp-i são apresentadas na figura 50. A região da interface entre a HAp-i e alumina apresenta trincas, independente do substrato (figura 50 c-1).

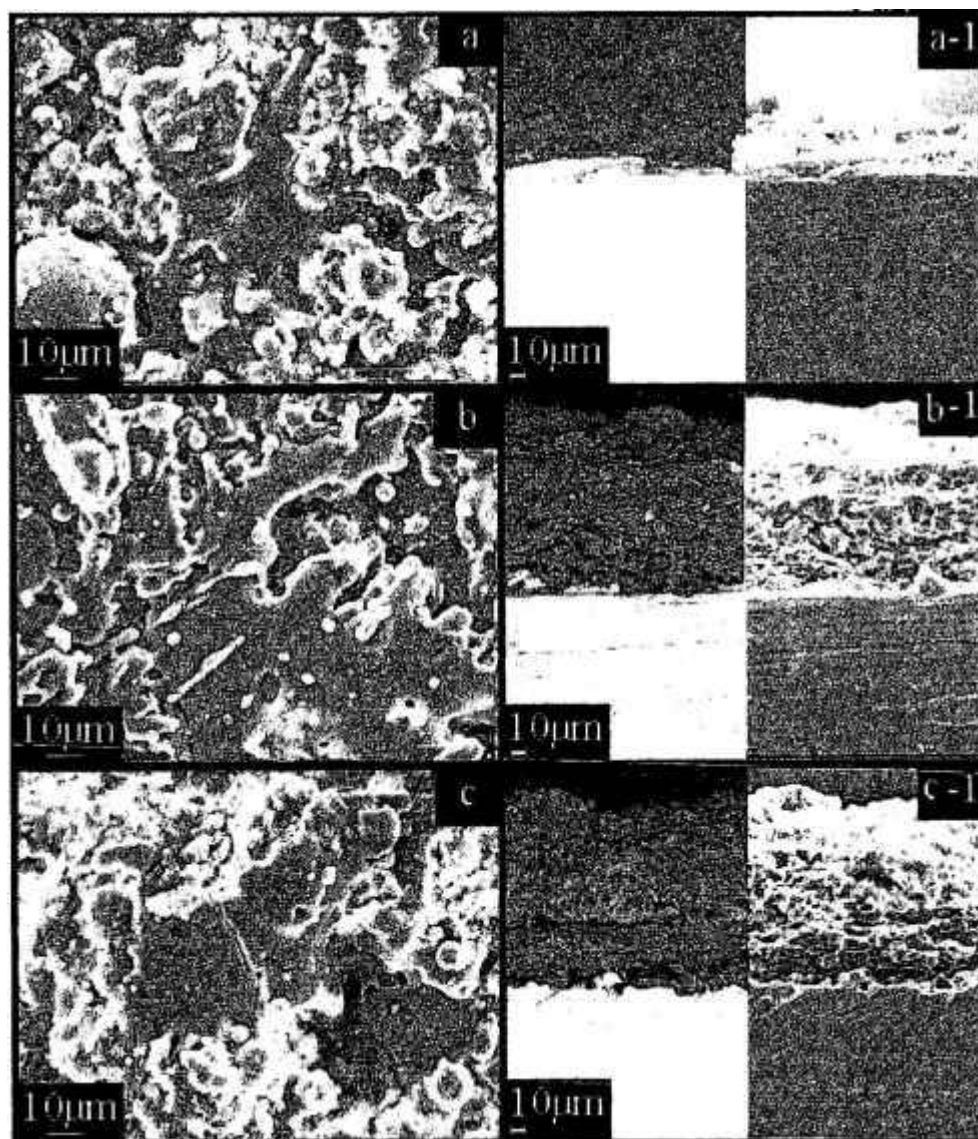


Figura 50 - Micrografias dos recobrimentos referentes as deposições por plasma de He, tabela 5. (a) HAp-i ; (b) Al_2O_3 (c) HAp-i, após recobrimento de Al_2O_3 ; (a-1, b-1 e c-1) região das interfaces. BSE, SE.

As micrografias dos recobrimentos obtidos por HVOF apresentam superfície irregular (figura 51).

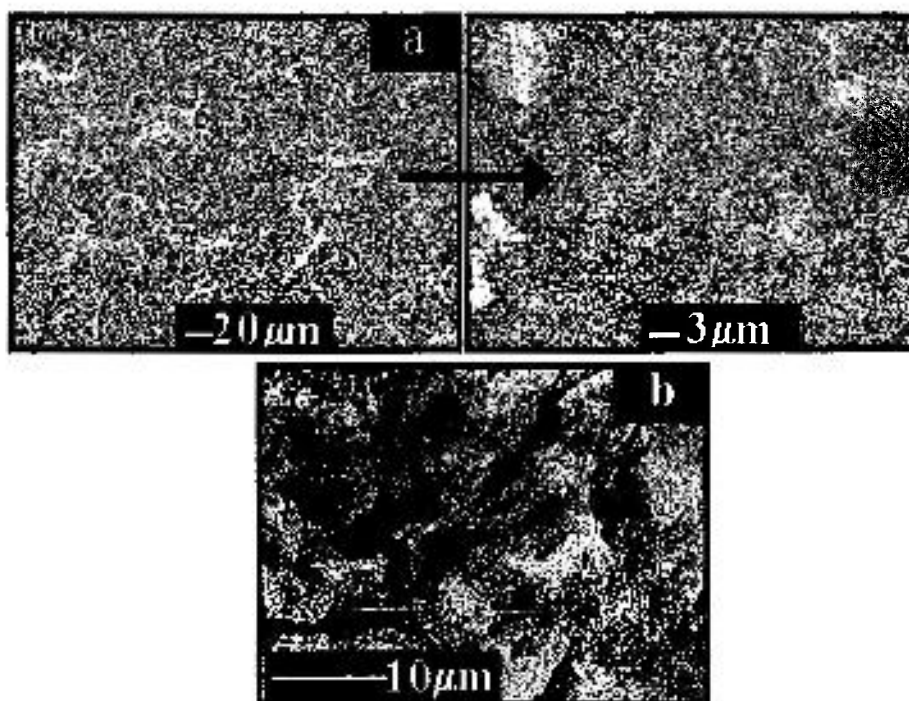


Figura 51 - Micrografias dos recobrimentos obtidos por HVOF de acordo com a tabela 5.

(a) HAp-N₂; (b) HAp-i.

Em (a), com maior aumento observa-se pequenos grãos, semelhantes a morfologia apresentada na figura 29 indicando que a HAp neste caso não sofreu fusão.

Com o objetivo de se avaliar o sistema de deposição, foram aspergidos dois tipos de próteses de implante de quadril com a HAp-i na condição de plasma de H₂-II. As próteses foram colocadas em tornos com rotação constante e submetidas ao jato de aspersão térmica. Essas próteses por serem de geometria mais complexas foram indicativas valiosos quanto ao sistema de deposição adotado. Pela análise visual das próteses, não foram encontradas trincas ou escamações na superfície, (figura 52), indicando que o sistema adotado quanto a distância de projeção, e demais parâmetros são adequados.

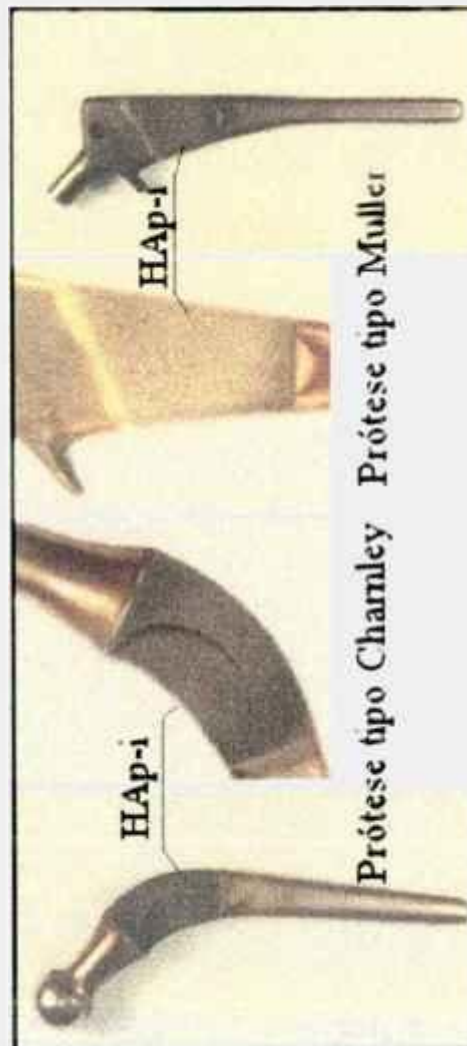


Figura 52 - Fotografia de próteses de quadril submetidas ao jato de aspersão térmica com HAp-i na condição de plasma de H₂-II.

IV.4.4.1 Avaliação citotóxica dos recobrimentos

Todas as superfícies recobertas, segundo as condições da tabela 5, foram testadas em relação à citotoxicidade pelo método da difusão em ágar. A superfície dos recobrimentos foi colocada em contato direto com o ágar.

Este ensaio possibilitou avaliar a superfície do recobrimento cerâmico de forma seletiva, pois o substrato metálico não entra em contato com o ágar, não interferindo nos resultados.

Nenhuma das superfícies testadas apresentou citotoxicidade (figura 53 (c) e (d)). Os resultados dos testes foram negativos, isto é, não há formação de halo amarelo. Em todas as condições testadas, os substratos revestidos foram retirados do ágar. Por microscopia óptica, não foi observado nenhum tipo de anomalia nas células ou na coloração das placas (figura 53, (c-1) e (d-1)). A figura é representativa das demais condições avaliadas. Este resultado indica que o processo de aspersão térmica utilizado não introduziu no material estudado, modificações que fossem nocivas às células, assim como a limpeza da sala de deposição e equipamentos utilizados.

O pó de HAp-i, citotóxico no método de supressão de colônias após ser submetido as técnicas de plasma ou HVOF, não apresentou nenhum grau de citotoxicidade. As altas temperaturas envolvidas nestas técnicas eliminou por combustão os compostos orgânicos citotóxicos.

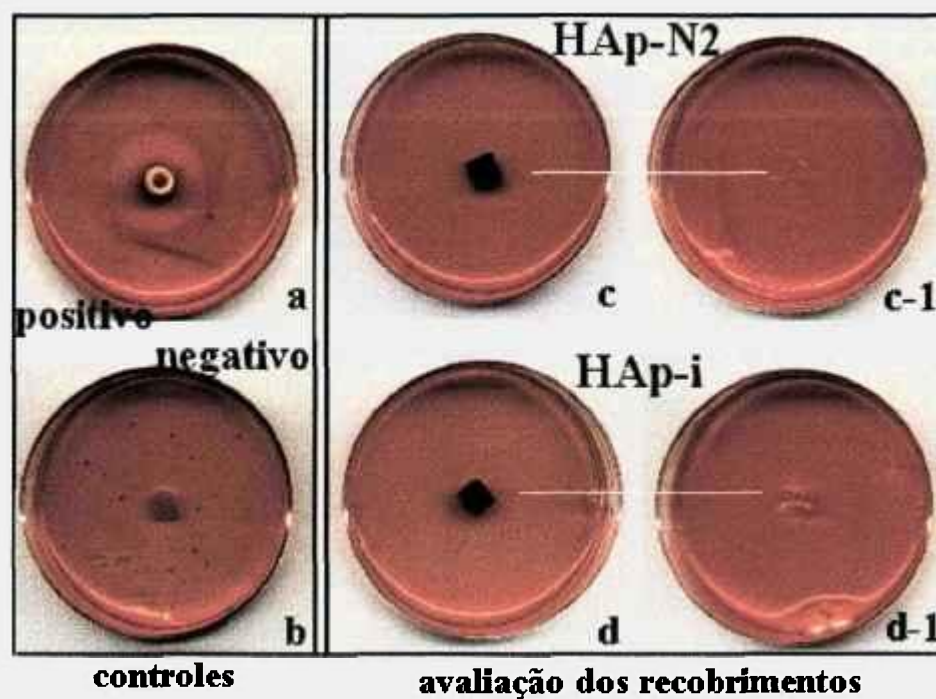


Figura 53 - Fotografias dos ensaios de citotoxicidade realizados com os substratos recobertos referentes a tabela 5. (a) controle positivo (cilindro de látex); (b) controle negativo (papel de filtro); (c) N2-HAp-T₁-PHe; (c-1) sob a chapa aspergida N2-HAp-T₁-PHe; (d) ar-HAp-T₁-PHe ; (d-1) sob a chapa aspergida ar-HAp-T₁-Phe.

IV.5 Obtenção de corpos porosos de HAp

O pó HAp-N₂ foi utilizado para testar o processamento de biocerâmica porosa pelo método *gelcasting* de espumas. Amostras de densidade a verde de 0,44g/cm³ foram sinterizadas em diferentes temperaturas, apresentando densidades de 0,72 a 0,77g/cm³ (tabela 15).

Tabela 15 - Densidade das cerâmicas porosas após sinterização por 3 horas.

amostra	Temperatura de Sinterização (°C)	Densidade geométrica a verde (g/cm³)	Densidade geométrica (g/cm³)
1	1200	0,42	0,73
2	1250	0,44	0,72
3	1300	0,43	0,73
4	1350	0,44	0,74
5	1400	0,44	0,77

Após sinterização, as amostras foram analisadas por DRX (figura 54). Nas amostras sinterizadas nas temperaturas de 1250, 1350 e 1400°C, observa-se a presença da fase hidroxiapatita e, em menores quantidades, a fase β -TCP, na condição de 1250°C e α - β TCP, para a condição acima de 1300°C.

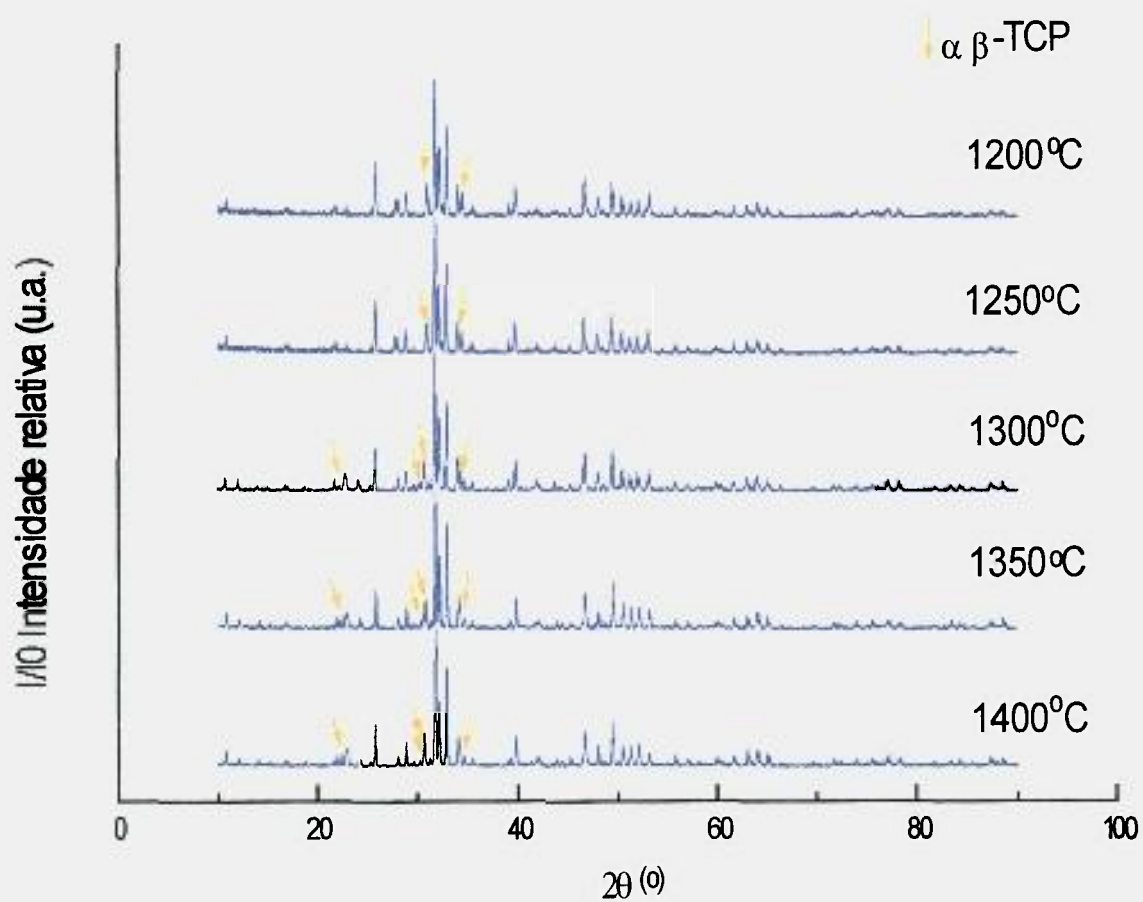


Figura 54 - Difratogramas de raios X das amostras de HAp-N₂ porosa sinterizadas por 3 horas, nas temperaturas indicadas. Os picos não assinalados são da fase HAp.

Micrografias das amostras de HAp-N₂ porosa obtidas nas diferentes temperaturas de sinterização são apresentadas na figura 55. A porosidade se encontra distribuída na forma de poros esféricos interconectados.

A figura 56 apresenta micrografias dos corpos cerâmicos, sem trincas e empenamento após a etapa de sinterização, indicando que a eliminação da matéria orgânica utilizada no processamento não acarretou problemas à macroestrutura. O aumento na temperatura de 1200 a 1400°C proporcionou um aumento no tamanho médio dos grãos (figura 56 (e)).

Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade pelo método de supressão de colônias para a HAp-N₂ porosa sinterizada a 1200°C por 3 horas revelam que a HAp-N₂ porosa apresenta IC_{50(%)} maior que 100%, indicando portanto ausência de citotoxicidade. Esses resultados indicam que todas as substâncias orgânicas utilizadas, como dispersantes, monômeros e agentes espumantes são eliminadas durante a etapa de sinterização.

Este tipo de estrutura quando implantado permite o crescimento de tecido ósseo a partir desses canais para seu interior com a posterior passagem de nutrientes para a manutenção e renovação dos tecidos.

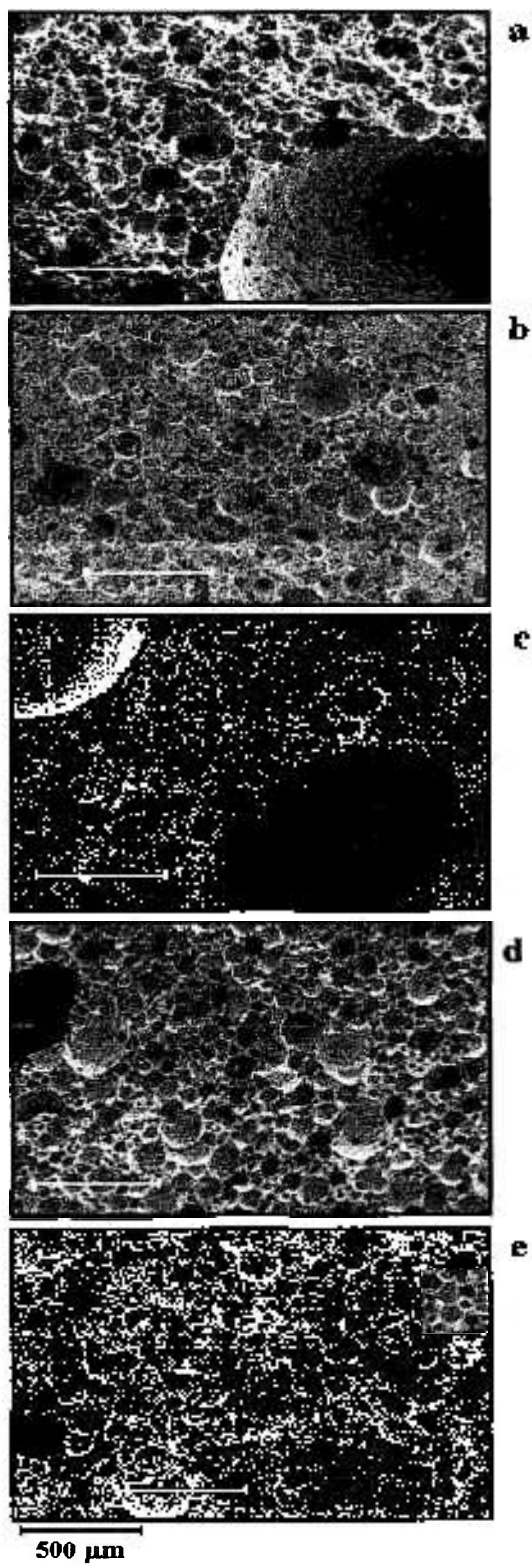


Figura-55 Micrografias de fraturas de amostras de HAp-N₂ porosa sinterizada em diferentes temperaturas. (a) 1200°C, (b) 1250°C, (c) 1300°C, (d) 1350°C e (e) 1400°C, por 3 horas.

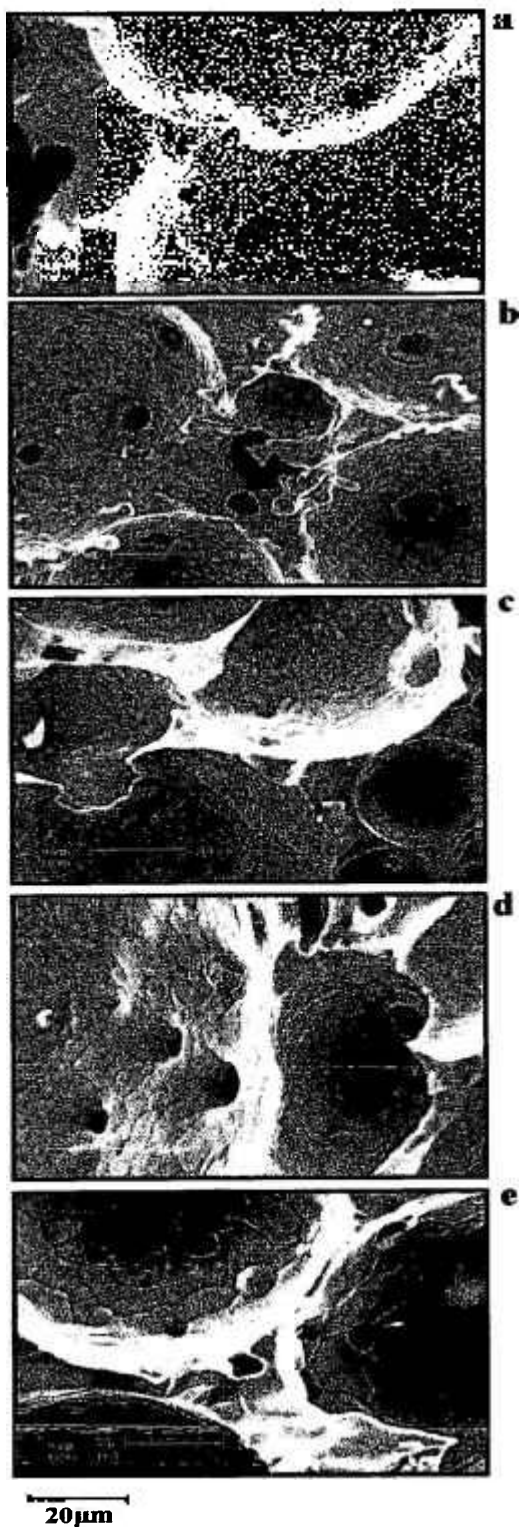


Figura 56 - Fraturas de amostras de HAp-N₂ porosa sinterizadas por 3 horas a (a) 1200°C, (b) 1250°C, (c) 1300°C, (d) 1350°C e (e) 1400°C.

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

HAp obtida por neutralização, com sistema de refluxo ou período de envelhecimento de 20 dias é estável a 1250°C. O sistema utilizado permite a produção de HAp em escala de laboratório ou piloto com rendimento superior a 95% e alto teor de pureza.

A HAp obtida por neutralização em sistema fechado com fluxo de nitrogênio e utilização de água fervida no preparo das soluções, permite a eliminação de carbonatos no produto final. Os carbonatos (CO_3^{2-}) são absorvidos do ar.

A síntese de HAp por neutralização com envelhecimento de 20 dias produziu partículas/aglomerados maiores e mais cristalinos.

A partir dos métodos cristalização e neutralização foi possível obter corpos monolíticos com densidade superiores a 90% da densidade teórica da HAp, ressaltando que tais pós foram utilizados sem qualquer trabalho de beneficiamento.

As sínteses de HAp por cristalização e sol-gel/aquoso produziu como fase principal a HAp e como secundária, o β -TCP, a 1250°C. Por sol-gel/alcoólico a fase majoritária foi o TTCP. O meio alcoólico não disponibilizou os grupos OH necessários a formação da HAp durante a precipitação.

Nas sínteses da HAp foram utilizados reagentes em quantidade estequiométrica e as razões Ca/P em todas as condições foram superiores a 1,67.

A integridade da interface dos recobrimentos obtidos por plasma apresentaram melhores resultados em termos de adesão/coesão e estabilidade das fases cristalinas, quando comparados ao HVOF, observado qualitativamente em MEV. O HVOF provocou a decomposição da fase HAp nos recobrimentos devido ao poder oxidante da chama

A utilização de gás secundário He, produziu recobrimentos mais cristalinos e com menor decomposição da fase HAp, em relação aos recobrimentos obtidos com gás secundário H₂, evidenciado nos difratogramas. Este resultado se deve a maior reatividade química do H₂ associada aos efeitos térmicos gerados no plasma, que também diminuíram os valores da rugosidade média, comparados aos maiores valores de rugosidade obtidos por He.

O pó de HAp obtido por neutralização ao importado produziu recobrimentos com maiores valores de rugosidade em todas condições testadas. Os recobrimentos com as camadas intermediárias de alumina forneceram os maiores valores de rugosidade média em todas condições testadas.

A morfologia acicular das partículas dos pós de HAp obtidos por cristalização devido a baixa escoabilidade inviabilizaram a aspensão por obstruir o sistema de trajeto do pó.

O método “gelcasting” de espuma foi utilizado com eficiência na obtenção da HAp porosa. Os corpos porosos não sofreram trincas ou empenamento durante a sinterização e mantiveram como fase principal a HAp e secundária o β -TCP até 1400°C.

Através dos ensaios “in vitro” constatou-se a não citotoxicidade dos substratos metálicos, das HAp sintética, recobrimentos aspergidos, amostras de HAp sinterizadas porosas e densas.

A partir da síntese da HAp por neutralização foi possível aplicar o material na forma de corpo cerâmico denso, poroso e na forma de recobrimentos.

- [01] HUKINS, W. L. ; LEAHY, J.C. ; MATHIAS, K. J. Biomaterials: defining the mechanical properties of natural tissues and selection of replacement materials. *Journal Materials Chemistry*. v. 9, p. 629-636, 1999.
- [02] HENCH, L. L. ; WILSON, J. *Introduction An Introduction to Bioceramics*. (Advanced series in bioceramics, 1). Florida: Hench and Wilson, World Scientific Publishing Co., v.1, 1993.
- [03] WILLMANN, G. Medical-Grade Ceramics - What every engineer Show know, Supplement to Inter, *Ceram*. v. 47, n 2.9.1.2.4, 1998.
- [04] WRITER, S. Biointegrated material project. *Techno. Japan*, n. 30, v. 9, p.10-20, 1997.
- [05] HENCH, L. L. Bioactive glasses and glass ceramics. *Materials Science Forum*, v. 293, p. 37-64, 1999.
- [06] LEGEROS, R. Z. *Calcium phosphates in oral biology and medicine*. Monographs in Oral Science, New York: Karger, v. 15, 1991.
- [07] HAYASHI, K. ; MASHIM, T.; VENOYAMA, K. The effect of hydroxyapatite coating on bony ingrowth in to grooved titanium implants. *Biomaterials*, v. 20, p. 111-119, 1999.
- [08] LARSON, F. G. Hydroxyapatite coatings. *Medical Device & Diagnostic Industry*, p. 34-40, 1994.

- [09] BLUNN, G. W. ; HUA, J.; HUNTER, A. ; WAIT, M. E.; WALKER, The effect of implants stiffness on the osseointegration of titanium alloy, ADVANCES IN BIOMATERIALS. In: BIOMATERIALS - TISSUE INTERFACES, *Proceedings of 9th European Conference on Biomaterials*, Chester, Sept., p. 293-298, 1991.
- [10] PALKA, V. ; IVAN, J. ; POSTRKOVA, E. ; KOLENCIAK, V. The effect of biological environment on the surface of titanium and plasma – sprayed layer of hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 9, p. 369–373, 1998.
- [11] UNGERSBÖCK, A., PERREN, S. M.; POHLER, O. Comparison of the tissue reaction to implants made of beta titanium alloy and pure titanium. Experimental study on rabbits. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 5, p. 788-792, 1994.
- [12] AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. Standard Specification for titanium Ti-6Al-4V. Eli alloy for surgical implant applications. (ANSI/ASTM F 136–79). In: Annual book of ASTM standards. Section: v.
- [13] MEARS, D.C. *Materials and Orthopaedic Surgery*. Baltimore.: Williams and Wilkins Co., 1979.
- [14] BOSCHI, A. O. O que é necessário para que um material possa ser considerado um biomaterial ? *ANAIS DO III ENCONTRO NACIONAL DE BIOMATERIAIS*,. Out. 15., São Paulo, p. 63-75, de 1993.

- [15] WILLIAMS, D. F. Definitions in Biomaterials. CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR BIOMATERIALS, Mar. 3–5, Chester, England, Elsevier, Amsterdam, n 6: p. 49–59, 1987.
- [16] PARK, D. F. *Biomaterials: an Introduction*. New York, N.Y.: Plenum Press, 1979.
- [17] ALBREKTSSON, T. ; ALBREKTSSON, B. Osseointegration of bone implants. *Acta Orthopedic Scand.*, v. 58, p. 567-577, 1987.
- ∅
- [18] TWEDEN, K. S. ; MAZE, G. I. ; MCGEE, T. D. ; RUNYON, C. L. ; NIYO, Y. Evaluation of the tissue response of organic, metallic, ceramic and osteoceramic tooth roots. *Materials Science Forum*, v. 293, p. 17–36, 1999.
- ∅
- [19] SAVARINO, L. ; STEA, S. ; GRANCHI, D. ; DONATI, M. E. ; CERVELLATI, M. ; MORRONI, A. ; PAGANETTO, G. ; PIZZOFERRATO, A. X-ray diffraction of bone at the interface with hydroxyapatite – coated versus uncoated metal implants. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 9, p. 109-115, 1998.
- [20] WILLIAMS, D. F. *Biofunctionality and Biocompatibility*. Medical and Dental Materials., New York, N.Y.: VCH Publishers, p. 1-27, 1992.
- [21] FERNANDEZ, E. ; GIL, F. G. ; GINEBRA, M. P. ; DRIESSENS, F. C. M. ; PLANELL, J. A ; BEST, S. M. Calcium phosphate bone cements for clinical applications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 10, p. 169 – 176, 1999.

- [22] BODEN, S. D. ; KAPLAN, F. S., Calcium homeostasis; pathologic fractures in metabolic bone disease. *The Orthopedic Clinics of North America*, Jan., v. 21, p. 31-42, 1990.
- [23] MARTIN, R. B. Bone as a ceramic composite material. *Materials Science Forum*, v. 293, p. 5-16, 1999.
- [24] CHAMBERS, T. J.; PATH, M. R. C. The cellular basis of bone resorption. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, Sept, v.151, p. 283-293,1980.
- [25] ALMEIDA JUNIOR, A. ; FERREIRA, A. *Elementos de Anatomia e Fisiologia humanas*. São Paulo, S.P.: Edição Nacional, p. 41-66, 1983.
- [26] JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. *Histologia Básica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. 3 ed., p. 132-155, 1973.
- [27] BULLOUGH, P. G.; BANSAL, M. ; DICARLO, E. F, The tissue diagnosis of metabolic bone disease, role of histomorphometry. *The Orthopedic Clinics of North America*, v. 21, p. 65-79, 1990.
- [28] PARK, E. ; CONDRATE, S. R. ; R. A ; HOELZER, D. T. ; FISCHIMAN, G. H.; Interfacial characterization of plasma-spray coated calcium phosphate on Ti-6-Al-4V. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 9, p. 643-649,. 1998.
- [29] HOOT, M.; NOEL, B.; BERANACHE-ASSOLANT, D.; MARIE, P.J. ; REY, C. Proliferation and differentiation of human trabecular osteoblastic cells on hydroxyapatite. *Journal Biomedical Material Research*, v. 37, p. 508-516, 1997.

- [30] BOSKEY, A. L. Bone mineral and matrix, are they altered in osteoporosis. pathologic fractures in metabolic bone disease. *The Orthopedic Clinics of North America*, v. 21, p. 19-29, 1990.
- [31] GÜNTER, H. ; KLEIN, C. P. A. T. ; GROOT, K. *Osseo-integrated implants*. In: Implants in oral and ENT surgery, Bioactive Ceramics. CRC Press – Implant systems Based on, n. 2, v. 7: p. 193-208, 1990.
- [32] WALSH, W. R. ; OHNO, M. ; GUZELSU, N. Bone composite behaviour: effects of mineral-organic bonding. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 5, p. 72-79, 1994.
- [33] EL-KHOLY, M. B. ; KHALIL, A. A. ; HASHEM, A. M. Thermochemistry of bovine teeth and synthesis of hydroxyapatite. *Interceramics*, n. 1, v. 47, p. 29-32, 1998.
- [34] TONI, A.; MACNAMARA, B.; VICECONTI, M.; SUDANESE, A; BARUFFALDI, F. Bone remodeling after total hip arthroplasty. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 7, p. 149-152, 1996.
- [35] CABRINI, R. L; GUGLIELMONTTI, M. B. Aspectos biológicos da osseointegração – sua importância na Implantologia. *Atualização em Clínica Odontológica*, p. 163-173, 1994.
- [36] SHACKELFORD, J. F. Bioceramics: an historical perspective. *Materials Science Forum*, v. 293, p. 1-4, 1999

- [37] LEE, T. M.; CHANG, E.; YANG, C.Y. Surface characteristics of Ti-6Al-4V alloy: effect of materials, passivation and autoclaving. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 9, p. 439-448, 1998
- [38] BÜNGER, C. Cells, vascularization and structure of bone with an implant. *Acta Orthopaedica Scandinavica*, v. 59, n. 2, p. 197-225, 1988.
- [39] SIQUEIRA, J.T.T.; STIVAL, N.; DIAS, P.V. Considerações sobre limpeza de superfícies de implantes dentários jateados. *IBI*, jan.-fev., n. 6, 1996.
- [40] KASEMO, B.; LAUSMAA, J. Biomaterial and implant surfaces: On the role of cleanliness, contamination and preparation procedures. *Journal Biomedical Material Research*, v. 22, p. 145-158, 1988.
- [41] ISO/TR 9325 (1989) Implants for surgery – Partial and total hip joint prostheses – Recommendations for simulators for evaluation of hip joint prostheses.
- [42] ZAVAGLIA, C. A. C. *Aplicações de biocerâmicas em próteses ortopédicas*. Campinas: 1993. Tese (Livre Docência) – Universidade Estadual de Campinas.
- [43] RIGO, E., C.; OLIVEIRA, L. C.; SANTOS, L. A.; BOSCHI, A. O.; CARRODEGUAS, R. G. Biomimetic method for obtaining hydroxyapatite. *Materials Science Forum*, v. 2., p. 99-103, 1999.
- [44] OSAKA, A ; TSURU, K. ; IIDA, H. ; OHTSUKI, C. ; HAYAKAWA, S. Spray pyrolysis preparation of apatite – composite particles for biological application. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, v. 8, p. 655–661, 1997.

- [45] CHAI, C. S.; GROSS, K. A; NISSAN, B. B. Critical ageing of hydroxyapatite sol-gel solutions. *Biomaterials*, v. 19, p. 2291-2296, 1998.
- [46] HWANG, K.; LIM, Y. Chemical and structural changes of hydroxyapatite films by using a sol-gel method. *Surface and Coatings Technology*, v. 115, p. 172-175, 1999.
- [47] CHEN, J. S.; JUANG, H. V.; HON, M.H. Calcium phosphate coating on titanium substrate by a modified electrocrystallization process. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 9, p. 297-300, 1998.
- [48] SITTING, C.; TEXTOR, M.; SPENCER, N. D.; WILAND, M.; VALLTTON, P. H. Surface characterization of implant materials c.p. Ti, Ti-6Al-7Nb and Ti-6Al-4V with different pretreatment. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 10, p. 35-46, 1999.
- [49] HANAHA, T. Titanium and its oxide film, a substrate for formation of apatite, the bone - biomaterial interface. *J.E. Davies*, n. 4, p. 49-61, 1991.
- [50] KAWAKAMI, K. *Avaliação dos filmes óxidos crescidos anodicamente na liga Ti-6Al-7Nb, pela técnica de impedância eletroquímica, para aplicação como biomaterial*. Campinas: 1996. Tese (Doutoramento) - Universidade Estadual de Campinas.
- [51] CHERN, C. P.; LIN, J. H.; LIU, M. L. Structure and properties of hydroxyapatite bioactive glass composites plasma sprayed on Ti6Al4V. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 5, p. 279-283, 1994.

- [52] LARSON, F. G. For medical implants. *Medical Device and diagnostic Industry*, p. 34-39, 1994.
- [53] SENNERBY, L.; THOMSEN, P.; ERICSON, L. E. Early tissue response to titanium implants inserted in rabbit cortical bone. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 4, p. 494-502, 1993.
- [54] HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. *Journal of the American Ceramic Society*, v. 74, n. 7, p. 1487-1510, 1991.
- [55] CHAMBERS, T.J, PATH, M.R.C. The cellular basis of bone resorption. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, n. 151, p. 283-293, 1980.
- [56] LEGEROS, R.; DACULSI, G.; ORLY, I.; WALTERS, M.; LEGEROS, J. P; Bioceramics-tissue interfaces: characterization of ultrastructural properties *Proceedings of the 6th International Symposium on Ceramics in Medicine* Philadelphia: Nov., p. 79-84, 1993.
- [57] DONATH, K. A comparison of tissue-implant interface of osseous integrated titanium and hydroxyapatite coated titanium dental implants. *Oral Implantology and Biomaterials*. Progress in Biomedical Engineering, Haruyuki Kawahara, Amsterdam. v. 7, p. 193-196, 1989.
- [58] GUEYE, P. A. *Estudos Alternativos de transporte para exploração de jazida de fosfato no Senegal*. Campinas: 1998. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas..

- [59] COSTA, Z. M. *Desenvolvimento de um sistema dosimétrico para situações de emergência envolvendo pessoas do público em geral*. São Paulo: 1999. Tese (Doutoramento) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- [60] DOI, Y.; SHIBUTANI, T. MORIWAKI, Y.; KAJIMOTO, T.; IWAYAMA, Y. Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *Journal Biomedical Materials Research*, v. 39, p. 603-610, 1998.
- [61] MERRY, J. C.; GIBSON, I. R.; BEST, S. M.; BONFIELD, W. Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 9, p. 779–783, 1998.
- [62] BERNDT, C. C.; GROSS, K. A. Characteristics of hydroxyapatite. Bio-coatings. *Proceedings of the Internacional Thermal Spray Conference Exposition*, , 28 May – 5 June, , Orlando, Florida, 1992
- [63] PLAFF, H. G.; WILLMANN, G.; PÖTHING, R. Properties of HA-coatings. *Bioceramics*, v. 6, p. 420-424, 1993.
- [64] OSAKA, A ; MIURA, Y. ; TAKEUCHI, K. ; ASADA, M. ; TAKAHASHI, K. Calcium apatite prepared form calcium hydroxide and orthophosphoric acid. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.2, p. 51-55, 1991
- [65] DEPTULA, A.; LADA, W.; OLCZAK, T.; BORELLO, A.; ALVANI, C.; BARTOMOMEIO, A. Preparation of spherical powders of hydroxyapatite by sol-gel process. *Journal of Non-Crystalline Solids*, v.2 , p. 537-541, 1992.

- [66] SUWA, S.; BANNO, H.; MIZUNO, M.; SAITO, H. Synthesis of compositionally regulated hydroxyapatite from Ca(OH)_2 and H_3PO_4 . *Journal of the Ceramic Society of Japan*. V. 101, p. 659-664, 1993.
- [67] WENG, W.; BAPTISTA, J. L. A new synthesis of hydroxyapatite. *Journal of the European Ceramic Society*, v.17, p. 1151-1156, 1997.
- [68] FANOVICH, M. A.; LÓPEZ, J. M. P. Influence of temperature and additives on the microstructure and sintering behaviour of hydroxyapatites with different Ca/P ratios. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 9, p. 53-60, 1998.
- [69] LUTZ, E. K., Plasma Ceramics. *Powder Metallurgy International*, v. 25, n. 3, p. 131-137, 1993.
- [70] GERDEMAN, D. A.; HECHT, N. L. *Arc plasma technology in materials science*. New York, Springer.: Verlag Wien, 1972.
- [71] HOWLETT, S. Application for ceramic coatings. *Ceramic Technology International*. In: The International Review of Ceramic Reduction and Manufacturing Technology. Lan Birkby, p. 79 – 81, 1992.
- [72] BERTAGNOLLI, M.; MARCHESE, M.; JACUCCI, G. Modeling of particles impacting on rigid substrate under plasma spraying conditions. *Journal of Thermal Spray Technology*, v.4, n. 1, p. 41-49, 1994.
- [73] BERGMANN, C. P. Deposição por plasma de camadas cerâmicas. Parte I: medida de temperatura interfacial durante o processo. *Cerâmica*, v. 39, p. 260, 1993.

- [74] GLEDHILL, H. C.; TURNER, I. G.; DOYLE, C. Direct morphological comparison of vacuum plasma sprayed and detonation gun sprayed hydroxyapatite coatings for orthopaedic applications. *Biomaterials*, v. 20, p. 315-322, 1999.
- [75] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SOLDAGEM. *A Aspersão térmica – metalização*. PAPST, N. 1978. In: Programa de cursos modulares em tecnologia de soldagens.
- [76] BIANCHI, L.; LUCHESE, P.; DENOIRJEAN, A; FAUCHAIS, P. Microstructural investigation of plasma – sprayed alumina splats. Sept. 11–15, Texas. In: *Proceedings of the 8th National Thermal Spray Conference*,. Houston, Texas, 1995, p. 255 –260.
- [77] GROSS, K. A.; PHILLIPS, M. R. Identification and mapping of the amorphous phase in plasma – sprayed hydroxyapatite coatings using scanning cathodoluminescence microscopy. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.9, p. 797–802, 1998.
- [78] KURZWEG, H.; HEIMANN, R. B. ; TROCZYNSKI, T. Adhesion of thermally sprayed hydroxyapatite-bond-coat systems measured by a novel peel test. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 9, p. 9-16, 1998.
- [79] LAMY, D.; PIERRE, A. C. ; HEIMANN, R. B. hydroxyapatite coatings with a bond coat of biomedical implants by plasma projection. *Journal Materials Research*, v. 11, n. 3, p. 680–686, 1996.

- [80] YAN, W. Q.; NAKAMURA, T.; KAWANABE, K.; NISHIGOCHI, S.; OKA, M.; KOKUBO, T. Apatite layer-coated titanium for use as bone bonding implants. *Biomaterials*, n. 18, p. 1185-1190, 1997.
- [81] RIE, K. T.; STUCKY, T.; SILVA, R. A.; LEITÃO, E.; BORDJI, K.; JOUZEAU, J. Y.; MAINARD, D. Plasma Surface treatment and PACVD on Ti alloys for surgical implants. *Surface and Coatings Technology*, v. 2, p. 973-980, 1995.
- [82] YANG, C. Y.; WANG, B. C.; CHANG, E.; WU, J. D. The influences of plasma spraying parameters on the characteristics of hydroxyapatite study. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 6, p. 249-257, 1995.
- [83] ARADA, C. R.; MONTANARO, L.; MORONI, A.; GIORDANO, M.; PIZZOFERRATO, A.; DONATI, M. E. Hydroxyapatite-coated orthopedic screws as infection resistant materials: in vitro study. *Biomaterials*, v. 20, p. 323-327, 1999.
- [84] GROSS, K. A.; BERNDT, C. C. In vitro testing of plasma-sprayed hydroxyapatite coatings. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 5, p. 219-224, 1994.
- [85] HACKETT, C. M.; SETTLES, G. S. The influence of nozzle design on HVOF spray particle velocity and temperature. Sept, 1995, Texas. *In: Proceedings of the 8th National Thermal Spray Conference*, Houston, Texas. p.11-15, 1995.
- [86] HACKETT, C. M.; SETTLES, G. S.; MILLER, J. D. On the gas dynamics of HVOF thermal sprays. June 7-11, Anaheim. *In: Proceedings of the National Thermal Spray Conference*, Anaheim, p. 167-172, 1993.

- [87] SARTWELL, B. D.; BRETZ, P. E. HVOF thermal spray coatings replace hard chrome. *Advanced Materials and Processes*, v. 156, n. 2, p.25-28, Aug., 1999.
- [88] LU, H.; QU, Z.; ZHOU, Y.; Preparation and mechanical properties of dense polycrystalline hydroxyapatite through freeze – drying. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 9, p. 583-587, 1998.
- [89] SEPULVEDA, P. A. I.; BINNER, J. G. P. Processing of cellular ceramics by forming and in situ polymerization of organic monomer. *Journal European Ceramic Society* (no prelo), 1999.
- [90] HING, K. A.; BEST, S. M.; TANNER, K. E.; REVELL, P.A.; BONFIELD, W. Differences in the relative volume of bone ingrowth within porous hydroxyapatite implants with time. *Bioceramics*, v. 9, 157-160, 1999.
- [91] RIPAMONTI, U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models. *Biomaterials*, v. 17, p. 31-35, 1996.
- [92] HING, K. A.; BEST, S. M.; TANNER, K. E.; REVELL, P. A.; BONFIELD, W. Characterization of porous hydroxyapatite. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 10, p. 135-145, 1999.
- [93] JIANGUO, X.; DONG, Z. X.; MÜLLER-MAI, C.; GROSS, V. The early host and material response of hydroxyapatite β -tricalciumphosphate porous ceramics after implantation into the femur of rats. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 5, p. 243-251, 1994.

- [94] SHORS, E. C. ; HOLMES, R. E. Bone formation in porous hydroxyapatite obtained from human biopsies. Philadelphia. *Proceedings of the 6th International Symposium on Ceramics in Medicine*, Philadelphia., Nov., 1993, p. 375-379
- [95] ZHANG, X. S.; CLYNE, T. W.; HUTCHINGS, I. M. Relationship between microstructure and erosive wear resistance of plasma sprayed alumina coatings. *Surface Engineering*, v. 13, n. 5, p. 393–401, 1997.
- [96] INTERNATIONAL STANDARD. Biological Evaluation of Medical Devices. 1993. (ISO 10 993-5). In 1993. Part 5: Tests for Cytotoxicity: in vitro methods.
- [97] VALENTE, M.C., ROGERO, S.O., BRESSIANI, A. H. A., HIGA, O. Z. Avaliação citotóxica de hidroxiapatita obtida por precipitação aquosa, 12^o CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA E CIÊNCIA DOS MATERIAIS, Dez. 8-11, 1996, Aguas de Lindóia, São Paulo, 1996, p. 125-128.