CLAUDIA CRISTIANE CAMILO

**Escafolds para implantes ósseos em alumina/hidroxiapatita/biovidro: análises
mecânica e in vitro**

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia Mecânica - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Engenharia Mecânica.

Área de concentração: Projeto Mecânico

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Fortulan

São Carlos

2006

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Tratamento
da Informação do Serviço de Biblioteca – EESC/USP

C183e Camilo, Claudia Cristiane
Escafolds para implantes ósseos em
alumina/hidroxiapatita/biovidro : análises mecânica e *in vitro* /
Claudia Cristiane Camilo; Carlos Alberto Fortulan. — São Carlos, 2006.

Dissertação (Mestrado-Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica.
Área de Concentração: Projeto Mecânico) — Escola de Engenharia de São Carlos da
Universidade de São Paulo, 2006.

1. Escafolds de cerâmica. 2. Estrutura porosa.
3. Interação celular *in vitro*. 4. Engenharia de tecidos. 5. Biovidro. 6. Hidroxiapatita.
7. Alumina. 8. Resistência mecânica. 9. Scaffolds. I. Título.

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidata: Fisioterapeuta **CLAUDIA CRISTIANE CAMILO**

Dissertação defendida e julgada em 16/08/2006 perante a Comissão Julgadora:

Prof. Dr. **CARLOS ALBERTO FORTULAN (Orientador)**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Titular **BENEDITO DE MOARES PURQUÉRIO**
(Escola de Engenharia de São Carlos/USP)

Aprovada

Prof. Dr. **NIVALDO ANTÔNIO PARIZOTTO**
(Universidade Federal de São Carlos/UFSCar)

APROVADA

Prof. Associado **JONAS DE CARVALHO**
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Mecânica

Profa. Titular **MARIA DO CARMO CALJURI**
Presidente da Comissão de Pós-Graduação

À Maria Clara Camilo Fernandes, minha filha,
um amor de criança.

AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos

Ao Professor Titular Benedito de Moraes Purquerio pela orientação nas etapas deste trabalho, pelo apoio e auxílio oferecidos para a pesquisa científica e por proporcionar liberdade no ambiente de trabalho.

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Fortulan pela orientação, condução e participação durante todas as fases desta pesquisa, pela paciência em ensinar e pela amizade.

Ao amigo e colega de laboratório Rogério A. Ikegami pelo apoio imprescindível e necessário na parte técnico-científica desta pesquisa. Fico muito grata pela presença deste grande amigo no cotidiano, sua ajuda é incomparável.

Aos amigos de laboratório Romeu Rony Cavalcante da Costa, Rodrigo B. Canto, Volnei Tita, Amauri Bravo Ferneda, Geraldo Dantas Silvestre Filho e Neilor César dos Santos pela amizade e pelo auxílio indispensável nos momentos de dúvidas dos conceitos de Engenharia Mecânica.

Aos amigos Francisco Henrique Monaretti, Thaís H. Samed e Sousa, Zilda de Castro Silveira e Maria Alejandra Guzman Prado, pelo companheirismo e auxílio no convívio no Laboratório de Tribologia e Compósitos – LTC – EESC – USP.

À Professora Dr. Cecília Amélia C. Zavaglia pelo auxílio e receptibilidade na UNICAMP.

Ao Professor Dr. João Manuel Domingos de Almeida Rollo pelos esclarecimentos dispensados durante as aulas.

Ao Professor Dr. Arnaldo Rodrigues dos Santos Jr. pelo auxílio técnico - científico no processamento das análises *in vitro* deste trabalho.

Ao Professor Dr. Oscar Peitl Filho, Professor da UFSCar – LaMaV, pela entrevista sobre biovidros.

Ao José Carlos Risardi, técnico do LAMAFE – EESC – USP, pela prestatividade em manufaturar os dispositivos para ensaio mecânico.

Ao Walter Aparecido Mariano, técnico do DEMA – UFSCar, pelo auxílio nas análises mecânicas.

Aos amigos do LADinC – EESC – USP, pelos momentos de interação.

Ao José Cláudio P. de Azevedo, amigo e técnico do laboratório LADinC – EESC – USP, pela sua disposição em ajudar e proporcionar um ambiente divertido no cotidiano.

Às amigas Lie e Carolina pela amizade e pelo convívio agradável.

À minha querida mãe, Dulcenea Souza Camilo, e ao meu querido pai, Antônio José Camilo Jr, não somente pelas suas presenças em todos os momentos, mas pelas suas ajudas nos momentos mais difíceis de minha vida.

À minha irmã Elizangela Camilo pelos momentos de incentivo, colaboração e amizade.

À minha irmã Jacqueline Souza Camilo, por ser atenciosa e amiga.

Ao meu marido, João Paulo Fernandes Filho, pela paciência e pelo apoio em todos os momentos.

À Deus por tudo.

À Capes – Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior – e ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – pelo apoio financeiro.

RESUMO

CAMILO, C.C. Escafolds para implantes ósseos em alumina/hidroxiapatita/biovidro: análises mecânica e *in vitro*. 2006. 134p – Dissertação (Mestrado) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Escafolds em alumina foram fabricados e em suas superfícies impregnou-se biovidro e hidroxiapatita; realizou-se análise das propriedades mecânica e de interação célula-escafolds *in vitro*. Estruturas porosas denominadas escafolds são utilizadas como suportes para crescimento de tecidos, devem apresentar poros abertos interconectados, com morfologia, distribuição e quantidade de poros que confirmem resistência mecânica e induzam o crescimento ósseo. Os escafolds simulam a matriz extracelular e são a chave para a Engenharia de Tecidos que está conceituada na cultura prévia de células com proteínas morfogenéticas, oferecendo suporte para o crescimento celular na formação do tecido maduro. Neste trabalho desenvolveu-se técnica de manufatura onde foram conformados escafolds como corpos-de-prova em alumina, em hidroxiapatita e em alumina infiltrada com biovidro e hidroxiapatita. Os escafolds foram submetidos a ensaios mecânicos de compressão e sofreram análise de interação com células *in vitro*. A morfologia e a concentração da porosidade dos escafolds foram analisadas por Microscopia de Varredura Eletrônica e apresentaram porosidade volumétrica de aproximadamente 70% e diâmetro médio de poros em torno de 190µm. Observou-se interação das células mais vigorosas e com pronunciada mitose nos escafolds infiltrados relativamente aos escafolds de alumina e hidroxiapatita. Os resultados indicaram resistência mecânica para os corpos infiltrados de 43,27 MPa, valor inferior ao observado nos escafolds de alumina 52,27 MPa e muito superior aos de hidroxiapatita 0,28 MPa. Conclui-se que os escafolds de alumina infiltrados com biovidro e hidroxiapatita apresentaram uma combinação promissora nas características mecânicas e biológicas *in vitro* com viabilidade econômica.

Palavras-chave: escafolds de cerâmica, scaffolds, estrutura porosa, interação celular *in vitro*, engenharia de tecidos, biovidro, hidroxiapatita, alumina, resistência mecânica.

ABSTRACT

CAMILO, C.C. Scaffolds in alumina, hydroxyapatite and bio-glass for bone implants: mechanical tests and *in vitro* analysis. 2006. 134p – Master Degree Dissertation – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos.

Alumina scaffolds were manufactured and surface impregnated with bio-glass and hydroxyapatite; the mechanical properties and the *in vitro* bone-cell and scaffold interaction were analyzed. Porous matrices are usually denominated as scaffolds in tissue engineering and they are used as supports for the tissue growing; they may have open and interconnected pores, with known porous geometry and distribution and with good mechanical strength and be able to induce the tissue cells growing. Scaffolds can work as extra cell matrices, mimic the desired tissue and are considered as the key for the tissue engineering, offering support for the cellular growing in the formation of mature tissue. In this work, manufacture techniques were developed where scaffolds were conformed in alumina, in hydroxyapatite and in alumina infiltrated with bio-glass and hydroxyapatite, as test bodies. The scaffolds were submitted to mechanical compression tests and to the interaction with bone cells *in vitro*. The morphology and the concentration of the scaffold porosity were analyzed by Scanning Electronic Microscopy (SEM) and they presented porosity concentration near 70,0 vol% and medium diameter of pores around 190,0 μm . The cells interaction strongest and more vigorous bone cell interaction with pronounced mitosis was observed in the alumina scaffolds infiltrated with bio-glass and hydroxyapatite when compared with the alumina scaffolds and hydroxyapatite scaffolds. The results obtained shown lower values of the mechanical strength for the infiltrated scaffolds (43,27 MPa), higher values for non infiltrated alumina scaffold (52,27 MPa) and very low values for the hydroxyapatite scaffolds (0,28 MPa). As observed, Final results shown that alumina scaffolds infiltrated with bio-glass and hydroxyapatite presented a promising combination in the mechanical and biological *in vitro* characteristics with economic viability.

Key-words: ceramic scaffold, scaffolds, porous structure, *in vitro* cells interaction, tissue engineering, bio-glass, hydroxyapatite, alumina, mechanical strength.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 – Estrutura microscópica do osso cortical. (a) osso compacto, (b) corte do sistema Haversiano, (c) fotomicrografia do sistema Haversiano. Fonte: Fridez (1996) apud Doblaré, García e Gómez (2004).	30
Figura 2.2 – Esquema simplificado da organização celular no periósteo. Fonte: (RAVAGLIOLI e KRAJEWSKI, 1992).	32
Figura 2.3 – Secção óssea ilustrando trabeculado ósseo. Internamente osso esponjoso e externamente osso compacto. Observam-se as formas oblonga e arredondada dos poros. Fonte: Williams, 1995	33
Figura 2.4- Seqüência de ativação – reabsorção - formação óssea. (a) Osso compacto. (b) Osso esponjoso. Fonte: Fridez (1996) apud Doblaré, García e Gómez (2004).	37
Figura 2.5 – Classificação dos materiais para implante relativamente à interação com o meio fisiológico.	39
Figura 2.6 – Modelo de microestrutura porosa, homogênea; interconectada e com poros de 100 à 300 μ m. Fonte: Ramay e Zhang (2004).	50
Figura 2.8- Estrutura da hidroxiapatita célula unitária.	53
Figura 2.9 – Faixas de composição do Biovidro	56
Figura 2.10 - Composições de Biovidro x nomes comerciais. Fonte: Ravaglioli et. Krajewski (1992).	60
Figura 3.1 – Diagrama de Fluxo da metodologia.	64
Figura 3.2 – Curva Termogravimétrica ATG das Partículas de Sacarose.	69
Figura 3.3 – Escafolds conformados em formato de pastilha para teste in vitro.	72
Figura 3.4 – Curva de aquecimento do forno para sinterização dos escafolds.	73
Figura 3.5 – Corpo-de-Prova (escafolds) de hidroxiapatita para compressão.	79
Figura 4.1 – Imagem (MEV) de um escafolds de alumina não impregnado com diâmetro médio de poros de 192,3 μ m (+ 159,4).	81
Figura 4.2 – Citotoxicidade indireta. Em todas as amostras (exceto a HAP) nota-se a presença de células o que evidencia a ausência de sinais de toxicidade indireta. Barra de aumento: 250 μ m para todas as figuras.	83
Figura 4.3 – Citotoxicidade direta. Citotoxicidade indireta. Em todas as amostras (exceto a HAP) nota-se a presença de células o que evidencia a ausência de sinais de toxicidade indireta. Barra de aumento: 250 μ m para todas as figuras.	85
Figura 4.4 – Imagem das células controles. Aumento 1000X.	86
Figura 4.5 – Imagem das células controles. Aumento de 1000X.	87
Figura 4.6 – Imagem de superfície de escafolds de alumina não infiltrado. Aumento de 400X.	88
Figura 4.7 – Imagem de superfície de escafolds de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.	88
Figura 4.8 – Imagem de superfície de escafolds de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.	89
Figura 4.9 – Imagem de superfície de escafolds de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.	90
Figura 4.10 – Imagem de superfície de escafolds de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.	90
Figura 4.11 – Imagem de superfície de escafolds de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.	91
Figura 4.12 – Imagem de superfície de escafolds de alumina não infiltrado. Aumento de 400X.	92
Figura 4.13 – Imagem de superfície de escafolds de alumina não infiltrado. Aumento de 400X.	93
Figura 4.14 – Imagem de superfície de escafolds de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.	93
Figura 4.15 – Imagem de superfície de escafolds de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.	94

Figura 4.16 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 400X.	94
Figura 4.17 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.	95
Figura 4.18 – Imagem de superfície de escafolde de hidroxiapatita. Aumento de 400X.	96
Figura 4.19 – Imagem de superfície de escafolde de hidroxiapatita. Aumento de 1000X.	96
Figura 4.20 – Imagem de superfície de escafolde de hidroxiapatita. Aumento de 2000X.	97
Figura 4.21 – Imagem de superfície de escafolde de hidroxiapatita. Aumento de 1000X.	97
Figura 4.22 – Imagem de superfície de escafolde de hidroxiapatita. Aumento de 2000X.	98
Figura 4.23 – Imagem de superfície de escafolde de hidroxiapatita. Aumento de 1000X.	99
Figura 4.24 – Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 400X.	100
Figura 4.25 – Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 1000X.	101
Figura 4.26 - Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 400X.	101
Figura 4.27 - Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 400X.	102
Figura 4.28 – Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 100X.	103
Figura 4.29 – Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 400X.	103
Figura 4.30 – Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 400X.	104
Figura 4.31 – Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 1000X.	105
Figura 4.32 – Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 1000X.	106
Figura 4.33 – Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 1000X.	106
Figura 4.34 – Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 1000X.	107
Figura 4.35 – Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 1000X.	108
Figura 4.36 – Microscopia de varredura eletrônica (MEV) de superfície de fratura de uma peça de hidroxiapatita porosa (82% de porosidade induzida). Magnitudes de 5000 vezes. Observam-se poros induzidos e formatos arredondados e poros de formato oblongo.	109
Figura 4.37 – Superfície de fratura do escafolde de alumina infiltrado. Imagem com magnitude de 65 vezes.	110
Figura 4.38 – EDX da alumina (Al_2O_3) infiltrada com hidroxiapatita-biovidro.	111
Figura 4.39 – O mapeamento de EDX nas amostras de alumina infiltrada por biovidro/hidroxiapatita.	111
Figura 4.40 – EDX do vidro bioativo, podemos observar a presença dos seguintes elementos em percentual de elemento: Oxigênio (42,58%), Sódio (12,02%), Silício (21,02%), Fósforo (2,77%) e Cálcio (20,84).	112
Figura 4.41 – C orpo-de-prova (escafolde) de hidroxiapatita após ruptura.	114
Figura 4.42 – Gráfico referente ao ensaio mecânico dos escafolde de alumina não impregnados.	115
Figura 4.43 – Gráfico referente ao ensaio mecânico dos escafolde hidroxiapatita.	115
Figura 4.44 – Gráfico referente ao ensaio mecânico dos escafolde de alumina impregnados.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Mecanismos de cicatrização/regeneração de enxerto ósseo.....	36
Tabela 2.2 – Classificação de biocerâmicas.....	45
Tabela 2.3 – Evolução dos implantes de vidro bioativo e de vitro-cerâmica.....	47
Tabela 2.4 – Propriedades ABNT NBR ISO – 6474 da alumina policristalina.....	51
Tabela 2.5 – Comparação das composições químicas e propriedades mecânicas do osso e da hidroxiapatita.....	54
Tabela 2.6 – Métodos de caracterização da Hidroxiapatita.....	55
Tabela 3.1 – Custo dos materiais utilizados para manufatura dos escafolds.....	65
Tabela 3.2 – Máximo de impurezas da sacarose.....	67
Tabela 3.3 – Barbotinas – composição e dados.....	70
Tabela 3.4 – Etapas para manufatura das amostras.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

ASTM	-	American Society For Testing And Materials
ATG	-	Análise termogravimétrica
BA	-	Barbotina com Alumina
BH	-	Barbotina com hidroxiapatita
BBvH	-	Barbotina composta por biovidro e hidroxiapatita
EDX ou EDS	-	Energy Dispersive x-ray detector
FDM	-	Fused Deposition Modeling
FDC	-	Fused deposition of ceramics
GPa	-	Giga-Pascal
HAp	-	Hidroxiapatita
HV	-	Dureza Vickers
ISO	-	International Organization for Standardization (Organização Internacional de Normalização)
Kg	-	Kilograma
LTC	-	Laboratório de Tribologia e Compósitos
MEV	-	Microscopia eletrônica de varredura
MET	-	Microscopia eletrônica de transmissão
mm ²	-	Milímetro quadrado
mm ³	-	Milímetro cúbico
MPa	-	Mega-Pascal
PGA	-	Ácido Poli-glicólico
PLA	-	Ácido Poli-lálico
PTFE	-	Tetrafluoretileno
RNM	-	Ressonância nuclear magnética

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	-	mícron
σ_f	-	tensão de fratura (N)
$\propto$	-	Coefficiente que indica proporcionalidade
ρ	-	Densidade dos grãos de um material
$\varnothing$	-	Diâmetro (mm)
H	-	Altura (mm)
°C	-	Graus Celsius
Pap	-	Porosidade aparente
Dap	-	Densidade aparente
P _{total}	-	Porosidade total
Pi	-	Peso imerso
Pu	-	Peso úmido
Ps	-	Peso seco
μL	-	Densidade da água
DAI ₂ O ₃	-	Densidade da alumina
Al ₂ O ₃	-	Alumina
CO ₃	-	Trióxido de carbono
K	-	Potássio
Mg	-	Magnésio
MgO	-	Óxido de magnésio
Na	-	Sódio
Na ₂ O	-	Óxido de Sódio
SiO ₂	-	Óxido de Silício

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$		Hidroxiapatita
OH	-	Hidroxila
H	-	Hidrogênio
P	-	Fósforo
Ca	-	Cálcio
CaO	-	Óxido de Cálcio
$\text{ZrO}_2\text{-}t$	-	Zircônia Tetragonal
45S5	-	Bioglass ®

SUMÁRIO

RESUMO	7
ABSTRACT	8
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	9
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS	12
LISTA DE SÍMBOLOS	13
1 – INTRODUÇÃO	21
2 – REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 – Engenharia de Tecidos	25
2.1.1 – Técnicas de preparo de scaffolds cerâmicos	26
2.2 – Tecido Ósseo	29
2.3 – Considerações Sobre Cicatrização/Regeneração e Osteointegração	35
2.4 – Considerações sobre enxertos ósseos	37
2.5 – Biomateriais	38
2.5.1 – Biocerâmicas	43
2.5.1.1 – Alumina	50
2.5.1.2 – Hidroxiapatita (HAp)	53
2.5.1.3 – Biovidro	55
2.6 – Estudos In Vitro e Osteointegração de Scaffolds	60
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1 – Matérias primas	65
3.2 – Manufatura	67
3.2.1 – Classificação do tamanho das partículas e análise termogravimétrica da sacarose	68
3.2.2 – Preparação das composições cerâmicas	70
3.2.3 – Conformação dos scaffolds	71
3.2.4 – Programação da curva de sinterização	72
3.2.5 – Infiltração da barbotina biovidro/hidroxiapatita	73
3.3 – Análise in vitro	73
3.3.1 – Cultura celular	74
3.3.1.1 – Ensaio de citotoxicidade indireta	74
3.3.1.2 – Ensaio de citotoxicidade direta	75
3.3.2 – Teste de avaliação morfológica da interação célula-material	75
3.3.3 – Morfologia	76
3.4 – Análise macro e microestrutural dos scaffolds	76
3.5 – Análise Química por EDX	77
3.6 – Análise da Densidade e Porosidade Aparente dos Scaffolds	77
3.7 – Ensaio de Resistência Mecânica de Compressão	79
4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO	80
4.1 – Análise Macro e Microestrutural dos Scaffolds	80
4.1.1 – MEV	80
4.1.2 Densidade e porosidade aparente	81
4.2 – Testes de toxicidade	82
4.2.1 – Citotoxicidade indireta	82
4.2.2 – Citotoxicidade direta	84
4.3 – Ensaio de interação scaffold/célula	86
4.3.1 – Scaffold de alumina	87

4.3.2 – Escafolde de hidroxiapatita.....	95
4.3.3 – Escafolde de alumina infiltrada com biovidro/hidroxiapatita	100
4.4 – Análise micro e macro estrutural por MEV	109
4.5 – Análise química por EDX.....	110
4.6 – Ensaio mecânico.....	113
4.7 – Viabilidade Econômica	117
5 – CONCLUSÕES.....	119
6 – PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS	123
7 – REFERÊNCIAS	125

1 – INTRODUÇÃO

Em pesquisas que visam a substituição de tecido ósseo, o conhecimento das propriedades deste tecido e do material empregado é de fundamental importância em projetos de implantes.

O osso pode ser definido como a parte rígida de tecido conjuntivo. O tecido ósseo cuja matriz extracelular é calcificada é uma das estruturas mais rígidas do corpo, porém apresenta características dinâmicas e muda de forma constantemente, dependendo da força a ele aplicada. A resistência e rigidez do osso estão intrinsecamente relacionadas com a associação dos cristais de hidroxiapatita e o colágeno.

As substituições do tecido ósseo e dos dentes têm incentivado pesquisas em busca de novos materiais, chamados biomateriais. As pesquisas com biomateriais cerâmicos são de grande importância, pois podem ser materiais reabsorvíveis, bioinertes ou bioativos.

A engenharia de tecidos pode utilizar o escafolde como suporte e a fabricação desses suportes é um processo-chave em todos os procedimentos de engenharia de tecido ósseo.

Alguns fatores são fundamentais nas características dos escafoldes como a morfologia (se esférica ou oblonga), o tamanho, a distribuição e a interconectividade dos poros, bem como as propriedades mecânicas. A porosidade ótima das biocerâmicas está

relacionada à necessidade de fornecer um suprimento sanguíneo ao tecido conectivo em crescimento e o tamanho de poros tem importância na osteocondutividade do escafolds.

São diversas as técnicas para fabricação de escafolds, procura-se um processo de fabricação ideal com baixo custo e resposta biológica compatível. A busca por processos de manufatura sem utilizar moldes ou ferramental fez surgir a prototipagem rápida. Esta técnica emergiu como processo revolucionário de manufatura com capacidade inerente para fabricação de objetos formados virtualmente. Nesse processo o formato e a quantidade de poros podem ser controlados precisamente.

Através da prototipagem pode-se decisivamente planejar a morfologia e distribuição dos poros em um escafolds. Porém, é ainda um processo recente e pouco difundido, mas se apresenta como forte candidato a principal forma de fabricação, uma vez que as reposições ósseas são normalmente casos personalizados e a produção seriada não apresenta vantagem competitiva.

No entanto, a manufatura de escafolds ainda depende da seleção dos materiais, das propriedades mecânicas e da interação desse material com o meio fisiológico (inércia química, bioatividade, biocompatibilidade ou biofuncionalidade).

Esta proposta de trabalho não ignora as necessidades do Sistema Único de Saúde (SUS), o qual apresenta uma urgência para as soluções dos problemas cirúrgicos relacionados aos implantes ósseos, os esforços são freqüentes para alcançar baixo custo e respostas adequadas às necessidades do paciente.

A presente pesquisa tem por base o estudo da bioativação de um escafolds de alumina. Para isso, fabricou-se escafolds de alumina seguidos de infiltração com biovidro e hidroxiapatita com posterior sinterização para a fixação do infiltrado com o objetivo de obter uma matriz porosa, econômica, resistente mecanicamente e bioativa.

Assim sendo, este trabalho tem por objetivo analisar, comparar e validar a confecção de matrizes porosas de alumina infiltradas com biovidro/hidroxiapatita, aqui denominadas

escafoldes. O processo de fabricação visou produzir poros no material, buscar resistência mecânica à compressão e avaliar a interação células - biomaterial.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 – Engenharia de Tecidos

Segundo Langer e Vacanti (1993) e Griffith e Naughton (2002), a engenharia de tecidos é uma técnica que consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos através do recrutamento de tecidos do próprio paciente, que são dissociados em células e cultivados sobre suportes biológicos ou sintéticos para então serem inseridos no paciente.

Neste trabalho será utilizada a palavra *escafolde* para designar um suporte sintético. Tecnicamente, a palavra *escafolde*, do original inglês *scaffold*, tem diversos significados tais como suportes, andaime, matrizes tridimensionais, arcabouços e estruturas. Aqui *escafolde* terá o significado de suporte poroso estrutural ou matriz porosa.

A regulamentação de produtos para engenharia de tecidos como, por exemplo, os suportes porosos para implantes (*escafoldes*) está normalizada por normas ASTM e por órgãos governamentais de países como Canadá, Japão e Estados Unidos (LLOYD-EVANS, 2004). A norma ASTM F1185 – 03, por sua vez, padroniza a composição da hidroxiapatita para implantes cirúrgicos.

Os materiais para uso em engenharia de tecido ósseo podem ser cerâmicos tais como os Fosfatos de cálcio, vidro bioativo e vitro-cerâmicas, alumina e zircônia. Podem também ser poliméricos (Natural ou sintético) como o Quitosan e alginato, ácido (poli) láctico

(PLA) e ácido (poli) glicólico (PGA). Podem ainda ser Metálicos, como o Titânio, aço inox. E ainda os Compósitos.

A estrutura porosa (escafolds) segundo Lee (2003) deve possuir cinco fatores, dentre outros, considerados como características desejáveis. São elas: a superfície do escafolds precisa permitir a adesão e o crescimento celular; nenhum componente ou subproduto de sua degradação deve provocar reações inflamatórias ou de toxicidade; o material tem de ser manufaturado em estrutura tridimensional; a porosidade deve proporcionar elevada área superficial para interação célula-escafolds, espaço para regeneração superficial da matriz extracelular e mínima constrição de difusão durante cultura *in vivo* e taxa de regeneração ajustável para combinar com a taxa de regeneração do tecido de interesse.

2.1.1 – Técnicas de preparo de escafolds cerâmicos

Várias técnicas têm sido desenvolvidas para fabricar cerâmicas porosas, à saber: incorporação de substância volátil durante sinterização; *gel casting*; síntese sol gel; processamento GASAR; sinterização no estado sólido (*Solid state sintering*); réplica de estrutura porosa polimérica; técnica de barbotinas cerâmicas (*Foaming of ceramic slurries*); fabricação de sólido de formato arbitrário (*Solid freeform fabrication*) (VEISEH M; EDMONDSON, 2003).

O método *gelcasting* foi estudado por Sepulveda et al (2002) (a). Nesse estudo, a fabricação de esponja de hidroxiapatita (HAp) porosa e a análise *in vivo* mostraram resultados de biocompatibilidade e boa osteointegração. Ortega et al (2003) também pesquisaram tal método. Realizaram o processo de fabricação de cerâmicas porosas baseado na aeração de uma suspensão cerâmica que resultou em peças com valores de porosidade que podem ultrapassar 90%-vol., bem como uma macroestrutura de poros com geometria aproximadamente esférica e paredes densas, e microestrutura homogênea. Estas características, segundo esses autores, tendem a melhorar as propriedades mecânicas

destes materiais, já que os poros, com formato esférico, são defeitos críticos presentes, e apresentam uma geometria que minimiza a concentração de tensões mecânicas.

A HAp porosa pode ser fabricada empregando o método esponja, segundo Deisinger et al (2004). Nesta técnica, uma esponja de poliuretano é embebida parcialmente com barbotina e após a sinterização obtém-se o corpo-de-prova poroso. No mesmo estudo foi utilizado também um molde polimérico fabricado via prototipagem rápida, obtendo-se estruturas porosas com macroporos interconectados com distribuição uniforme e com porosidade de 50 – 96 vol%, bem como tamanhos de poros variando entre 400 e 900 μm .

Certos corais marinhos apresentam-se como excelente matriz para obtenção de estruturas com tamanhos de poros altamente controlados. No caso de cerâmicas de fosfato de cálcio, podem-se formar réplicas de corais marinhos por íons fosfato, resultando em excelentes “réplicas de corais” (JARCHO, 1981), os quais apresentam a porosidade adequada naturalmente. Fosfatos de cálcio têm sido também usados para o preparo de suportes esponjosos (BAKSH et al, 1998) para a fixação de células ósseas capazes de induzir a restauração tecidual através de técnicas de engenharia de tecidos (SHEA et al, 1999). Neste sentido coral natural com tamanhos de poros de 150 a 220 μm e porosidade próxima de 36% foi moldado na forma de côndilo mandibular humano. A peça foi utilizada como enxerto e apresentou processo osteogênico normal, o que sugere a utilização desse material como reconstrução de defeito ósseo (CHEN et al, 2002).

Durante a década passada, a técnica de prototipagem rápida emergiu como processo revolucionário de manufatura com capacidade inerente para fabricação de objetos formados virtualmente sem precisar de moldes ou ferramental (BOSE, 2002). Esta técnica vem chamando a atenção para a fabricação de escafoldes.

A produção de um molde de cerâmica perdida empregando a prototipagem rápida foi realizada por Wilson et al (2004). Esses autores infiltraram barbotina de HAp aquosa neste molde, que depois de sinterizada à 1250⁰C, caracterizou a formação da estrutura porosa.

Pfister et al (2002) compararam as diferentes técnicas de prototipagem rápida, informando que as utilizadas para conformar cerâmicas, dentre outros materiais, são as de CNC *milling*, sinterização a laser, impressão tridimensional (3D), FDM/FDC e 3D *plotting*.

Através da prototipagem pode-se decisivamente planejar a morfologia e distribuição dos poros em um escafolde. Porém, é ainda um processo recente e pouco difundido, mas se apresenta como forte candidato a principal forma de fabricação, uma vez que as reposições ósseas são casos personalizados e a produção seriada não apresenta vantagem competitiva.

No entanto, alguns fatores para a manufatura de escafoldes devem ser relevados, tais como a seleção dos materiais, as propriedades mecânicas e a interação desses materiais com o meio fisiológico (inércia química, bioatividade, bioabsorção, biocompatibilidade ou biofuncionalidade).

A alumina densa, hoje utilizada como material para implantes apresenta uma resistência de 4000 MPa em ensaios de compressão (HEIMKE, 1987). Segundo alguns autores, os escafoldes de alumina podem apresentar resistências de 5,5 – 7,5 MPa (LIU e MIAO, 2005) e os de HA (0,55 – 5 MPa, 1,6 – 5,8 MPa, 4,4 – 7,4 MPa) segundo Ramay e Zhang (2003), Sepulveda et al (2002 (b)) e Sepulveda et al (2000), respectivamente. Já os de biovidro podem variar de 10 a 30 MPa, segundo Tamai et al (2002). Os de biovidro, com porosidade próxima de 90%, apresentam uma resistência à compressão de 0,3 – 0,4 MPa valores próximos de material frágil e altamente poroso, segundo trabalho realizado por Chen, Thompson e Boccaccini (2006). Todos esses valores estão relacionados com a resistência à compressão e dependem do processo de manufatura, da porosidade existente no material e do tempo de sinterização entre outros fatores. Contudo, um material para implante deve ser resistente mecanicamente e apresentar valores próximos aos do tecido em que se deseja substituir e ainda prover interação biológica para a sua fixação. Segundo a literatura, a alumina é um material inerte biologicamente e não proporciona atividade biológica, quando comparada com a HAp e o biovidro.

2.2 – Tecido Ósseo

O osso pode ser definido conforme Herzog e Nigg (1994) como a parte rígida do esqueleto da maioria dos vertebrados e consiste de componentes orgânicos e inorgânicos ou minerais. O osso realiza várias funções mecânicas e fisiológicas. A estrutura esquelética determina a forma e o tamanho corporal e desempenha funções importantes como as de alavanca e de suporte (HAMILL e KNUTZEN, 1999).

O tecido ósseo é um tecido conjuntivo, cuja matriz extracelular é calcificada e constitui uma das estruturas mais rígidas do corpo, porém apresenta características dinâmicas e muda de forma constantemente, dependendo da força a ele aplicada. A resistência e rigidez do osso estão intimamente relacionadas com a associação dos cristais de hidroxiapatita com o colágeno. Se o osso for descalcificado, ele ainda mantém sua forma original, mas se torna extremamente flexível. Se o componente orgânico for retirado do osso, o esqueleto mineralizado ainda mantém sua forma original, mas se torna extremamente frágil. O componente orgânico da matriz óssea, que constitui aproximadamente 35 % do peso seco do osso, inclui fibras que são quase exclusivamente de colágeno tipo I. O colágeno, que constitui cerca de 90 % do componente orgânico do osso, é formado de feixes grandes (50 a 70 nm de diâmetro) que apresentam a dimensão típica de 67 μm (GARTNER e HIATT, 2003). A Figura 2.1 ilustra estruturas ósseas.

Figura 2.1 – Estrutura microscópica do osso cortical. (a) osso compacto, (b) corte do sistema Haversiano, (c) fotomicrografia do sistema Haversiano. Fonte: Fridez* (1996) apud Doblaré, García e Gómez (2004).

As células ósseas, segundo a literatura, são classificadas em osteoprogenitoras, osteoblastos, osteócitos e osteoclastos.

As **células osteoprogenitoras** estão localizadas na camada celular interna do periósteo, revestindo canais de Havers, e no endósteo. Os fibroblastos fazem parte desse grupo de células. Podem sofrer divisão mitótica ou mitose que é a divisão celular que resulta na formação de duas células geneticamente idênticas à célula original e possuem a potencialidade de se diferenciar em osteoblastos. Em condições de pouca oxigenação se diferenciam em células condrogênicas que são as células formadoras de cartilagem. Apresentam aspecto fusiforme e possuem um núcleo oval, pouco corado. Essas células são mais ativas durante o período de intenso crescimento ósseo (GARTNER e HIATT, 2003).

* Fridez P. Modélisation de l'adaptation osseuse externe. PhD thesis, In Physics Department, EPFL, Lausanne, 1996.

Os **osteoblastos**, derivados de células osteoprogenitoras, são responsáveis pela formação de osso e síntese dos componentes orgânicos da matriz óssea, incluindo o colágeno, proteoglicanas e glicoproteínas. Os osteoblastos estão localizados na superfície do osso, no periósteo, em um arranjo semelhante a uma membrana de células, de cúbica à cilíndrica (GARTNER e HIATT, 2003). Os osteoblastos pertencem a categoria geral dos fibroblastos e são células típicas de tecido conectivo inorgânico (RAVAGLIOLI e KRAJEWSKI, 1992).

Os **osteócitos** são células maduras do osso, derivadas dos osteoblastos e ficam situadas em lacunas no interior da matriz óssea calcificada. Essas células secretam substâncias necessárias para a manutenção do osso.

Os **osteoclastos** são os responsáveis pela reabsorção óssea. O precursor dos osteoclastos se origina na medula óssea.

Os ossos podem ser classificados de acordo com a forma que apresentam: ossos longos, curtos, chatos, irregulares e sesamóides. Os **ossos longos** apresentam um cilindro (diáfise óssea) entre duas extremidades (epífises) alargadas e modeladas para se articular com o outro osso da mesma articulação, como por exemplo, o fêmur com a tíbia e o úmero com a unha. Os **ossos curtos** possuem mais ou menos o mesmo comprimento e largura como, por exemplo, os ossos do carpo. Os ossos chatos são achatados, finos e em forma de disco como, por exemplo, os ossos que formam a caixa craniana, os **ossos irregulares** possuem uma forma irregular que não se insere nas outras classes como, por exemplo, os ossos esfenóide e etmóide. Os **ossos sesamóides** que se desenvolvem no interior dos tendões como, por exemplo, a patela (GARTNER e HIATT, 2003).

Os ossos longos de uma pessoa em fase de crescimento apresentam a diáfise separada de cada epífise pelo disco epifisário da cartilagem. A superfície da extremidade articular é revestida por somente uma camada fina de osso compacto, que recobre o osso esponjoso. Logo acima está a cartilagem hialina articular, altamente lisa, que reduz o atrito contra a cartilagem articular do osso oposto daquela articulação. A área de transmissão

entre o disco epifisário e a diáfise é chamada de metáfise e nela estão localizadas as colunas de osso esponjoso. É a partir do disco epifisário e da diáfise que o osso cresce em comprimento. A diáfise é coberta por um periósteo, exceto onde os tendões e músculos se inserem no osso. Além disso, não há periósteo nas superfícies cobertas pela cartilagem articular. O periósteo é um tecido conjuntivo colágeno não-calcificado, denso não-modelado, que cobre o osso na sua superfície externa e se insere nele através das fibras de Sharpey. O periósteo é constituído de duas camadas: a camada externa fibrosa, cuja função principal é distribuir o suprimento sanguíneo e nervoso para o osso, e a camada interna celular, que possui células osteoprogenitoras (GARTNER e HIATT, 2003). A Figura 2.2 ilustra uma membrana periosteal.

Figura 2.2 – Esquema simplificado da organização celular no periósteo. Fonte: (RAVAGLIOLI e KRAJEWSKI, 1992).

Os ossos são também classificados macroscopicamente e microscopicamente de acordo com critérios histológicos.

As características macroestruturais do tecido ósseo permitem uma classificação que se baseia na porosidade óssea, ou seja, como osso compacto e osso esponjoso, ambos apresentam trabéculas, porém as trabéculas do osso compacto são mais organizadas. Formados pelos mesmos tipos de células e de substâncias intercelulares, esses dois tipos de ossos diferem entre si quanto a disposição espacial do trabeculado e a proporção entre espaços medulares e substância óssea (CARTER e SPENGLER, 1978).

No **tecido ósseo compacto** a porosidade do volume do osso ocupado por tecido não mineralizado é baixa (5 a 30%) e apresenta-se na diáfise dos ossos (HALL, 1991). O

tecido ósseo compacto praticamente não apresenta espaços medulares, mas existem canalículos e um conjunto de canais que são percorridos por nervos e vasos sanguíneos chamados de canais de Volkmann e canais de Havers. Os ossos apresentam grande sensibilidade e capacidade de regeneração por ser uma estrutura innervada e irrigada. Ao redor de cada canal de Havers, podem-se observar lamelas concêntricas de substância intercelular e de células ósseas.

No **tecido ósseo esponjoso**, encontrado na epífise óssea, a porosidade é relativamente alta (30 a 90%) (HALL, 1991). Nele, os espaços são relativamente mais amplos e dispostos irregularmente e a substância óssea é modelada como delgadas espículas e trabéculas, dispostas de acordo com as solicitações mecânicas. As trabéculas apresentam espessura variando entre 50 a 400 μm (ERIKSEN et al, 1993) e possuem espaços irregulares ligados entre si. As trabéculas se interconectam formando uma rede adequada para resistir as cargas mecânicas. Ossos esponjosos são encontrados nos corpos vertebrais, nas epífises de ossos longos, em ossos curtos e entre as duas camadas de osso compacto que formam os ossos planos (NIGG e GRIMSTON, 1994). A Figura 2.3 ilustra o trabeculado ósseo, segundo Williams (1995).

Figura 2.3 – Secção óssea ilustrando trabeculado ósseo. Internamente osso esponjoso e externamente osso compacto. Observam-se as formas oblonga e arredondada dos poros. Fonte: Williams, 1995.

As características microestruturais dos ossos permitem a classificação em primário (ou imaturo) ou esponjoso. Eles possuem fibras colágenas sem arranjo definido com abundantes osteócitos e feixes irregulares de colágeno, que durante o desenvolvimento do tecido ósseo são substituídos e organizados por osso secundário, exceto em certas áreas (suturas da abóbada, local da inserção de tendões, e alvéolos dos dentes). O conteúdo mineral do osso primário é muito menor do que o do secundário. Este último é um osso maduro, constituído de lamelas concêntricas ou paralelas, de 3 a 7 μm de espessura. Por ser mais calcificada, a matriz do osso secundário é mais resistente do que a do primário (GARTNER e HIATT, 2003).

O osso maduro é uma estrutura altamente organizada, não homogênea, porosa e anisotrópica, e como consequência da anisotropia, todas as propriedades físicas dependem das direções em que são consideradas. Por exemplo, a resistência média encontrada no osso humano compacto por Reilly e Burstein (1975) foi 105 de MPa em teste de compressão longitudinal, e 131 MPa em compressão transversal e na tração longitudinal foi de 53 MPa. Segundo Cowin (1996), o osso compacto tem baixa porosidade e sua anisotropia é controlada principalmente pelas orientações lamelar e osteonal. Ao contrário, o osso esponjoso tem alta porosidade e sua anisotropia é determinada pela orientação trabecular.

Segundo Capozzo et al (1992), para atender os vários tipos de força a que está sujeito, o material de que é feito o osso deve ser suficientemente rígido, para resistir a forças de compressão, e elástico, para suportar as forças de tração. Dessa forma os componentes inorgânicos do osso conferem resistência a compressão, já o colágeno confere elasticidade e resistência à tração.

As propriedades mecânicas dos ossos dependem da composição e estruturas do tecido. Contudo, a composição do tecido ósseo não é constante durante toda a vida do indivíduo, pois alterações ocorrem dependendo de estímulos mecânicos, envelhecimento,

patologias e nutrição entre outros fatores. Alguns trabalhos buscam esclarecer quanto os ossos resistem mecanicamente.

Backaitis (1996) citou algumas propriedades mecânicas do osso compacto úmido, onde verificou que o módulo de elasticidade (E) em tração está em torno de 17,6 GPa para o fêmur e 18,4GPa para a tíbia. Verificou também que a resistência a compressão é da ordem de 170 MPa $\pm$ 4,3. Já para Ravaglioli e Krajewski (1992) o fêmur humano resiste a 125 -166 MPa em teste de compressão.

Boruszewski et al (2004) compararam o módulo de elasticidade e a densidade do osso compacto (13,70 GPa e 0,3, respectivamente) com o osso esponjoso (1,370 GPa e 0,3, respectivamente). Conforme Yang et al (2001), para o osso compacto, as resistências à tração, à compressão e o módulo de elasticidade são de 60 a 160 MPa, 130 a 180 MPa e 3 a 30 GPa , respectivamente e, para o osso esponjoso, a resistência à compressão e o módulo de elasticidade são de 4 a 12 MPa e 0,02 a 0,5 GPa, respectivamente.

A resistência mecânica dos materiais para implantes deve ser analisada no sentido de que a peça não apresente um modulo de elasticidade excessivamente superior nem inferior ao módulo de elasticidade do tecido ósseo. No primeiro caso, uma peça implantada pode inibir que a ação das forças carregue a parte óssea inserida ao implante, o que leva à reabsorção do osso e sua conseqüente soltura, e o segundo caso pode resultar em fratura do implante.

2.3 – Considerações Sobre Cicatrização/Regeneração e Osteointegração

O processo de cicatrização de enxertos ósseos é complexo e envolve diversos fatores do metabolismo ósseo bem como alterações no balanço hormonal (HABAL e REDDI, 1987). A revascularização, por sua vez, é o fator que proporciona a cicatrização e integração do enxerto. Nesse contexto, o osso esponjoso apresenta penetração vascular mais fácil que o osso compacto, conforme Burchardt e Enneking (1978), Eitel et al (1980), Kusiak et al

(1985), Arden e Burgio (1992), Habal (1992). Resultados melhores geralmente são encontrados em implantes cortico-trabeculares, por unir as características de ambos, resistência mecânica e adequada revascularização. O processo de cicatrização/regeneração de enxertos ósseos ocorre por conta de osteocondução ou osteoindução conforme a Tabela 2.1. Esses mecanismos não são separados e distintos, mas integrados. Entender esses processos proporciona a seleção apropriada para uma aplicação particular de um implante. Materiais osteoindutores estimulam a diferenciação de células e materiais osteocondutivos proporcionam um escafolde permanente ou reabsorvível com crescimento ósseo nas margens do implante.

Contudo, a maneira como o implante é integrado ao tecido pode ser intensificada através da superfície de contato osso-implante, de cultura de células utilizando proteínas morfogenéticas, como fatores de crescimento ósseo e utilização de materiais específicos.

Tabela 2.1 – Mecanismos de cicatrização/regeneração de enxerto ósseo

Tipo	Princípio fisiológico	Exemplos de materiais
Osteogênese	Transplante de osteoblasto e pré-osteoblasto	Osso esponjoso, medula, periósteo, e enxerto vascularizado
Osteocondução	Crescimento de osso com gradual absorção do implante	Segmento compacto, osso alogênico ou xenogênico, material reabsorvível
Osteoindução	Conversão de célula mesenquimal em célula óssea	Osso desmineralizado e dentina

Fonte: Glowacki, 1992.

O remodelamento ósseo ocorre com a seqüência de ativação-reabsorção-formação óssea. É um processo cíclico para manutenção do tecido e estima-se, segundo a literatura, que a cada 10 anos o osso humano é totalmente remodelado. A Figura 2.4 ilustra este processo.

Figura 2.4- Seqüência de ativação – reabsorção - formação óssea. (a) Osso compacto. (b) Osso esponjoso. Fonte: Fridez (1996)[†] apud Doblaré, Garcia e Gómez (2004).

2.4 – Considerações sobre enxertos ósseos

Os materiais para enxertos podem ser osteogênicos, osteoindutores e ou osteocondutores (SICCA et al, 2000).

Os materiais osteogênicos referem-se a materiais capazes de estimular a formação do osso diretamente a partir de osteoblastos (MARX e SAUNDERS, 1986). Os materiais osteoindutores, segundo Urist (1965, 1980), são capazes de induzir a diferenciação de

[†] Fridez P. Modélisation de l'adaptation osseuse externe. PhD thesis, In Physics Department, EPFL, Lausanne, 1996.

células mesenquimais em osteoblastos ou condroblastos, aumentando a formação óssea no local ou mesmo estimular a formação de osso em um sítio heterotópico. Os materiais osteocondutores são geralmente inorgânicos e permitem a aposição de um novo tecido ósseo na sua superfície, requerendo para isso a presença de tecido ósseo pré-existente como fonte de células osteoprogenitoras (MASTERS, 1998).

Diversos materiais têm sido empregados em defeitos intra-ósseos, como, por exemplo, o enxerto alógeno mineralizado ou desmineralizado liofilizado, as cerâmicas biocompatíveis como a de coral natural, fosfato de cálcio e hidroxiapatita sintética, vidros bioativos e polímeros (HERCULIANI et al, 2000; TAGA et al, 2000; ZITZMANN et al, 1997). Os derivados inorgânicos sintéticos como a hidroxiapatita e fosfato tricálcico têm recebido grande atenção como materiais de preenchimento, espaçadores e substitutos para os enxertos ósseos, principalmente devido a sua biocompatibilidade, bioatividade e características de osteocondução em relação ao tecido hospedeiro conforme Burstein, F.D. et al (1997), Damien, C.J., De Groot, K. (1980) e Jarcho, M (1981).

2.5 – Biomateriais

Todos os materiais existentes são classificados, de um modo geral, em cerâmicos, metálicos, poliméricos e compósitos. No entanto, para aplicação em implantes, os materiais podem ser divididos de outra forma dependendo da interação com o meio fisiológico, quando aplicados na engenharia de tecidos. Nesta, os biomateriais podem ser classificados pela origem e pelas aplicações a que se destinam, sendo esta última geralmente divididas em três grupos: substituição de tecidos moles, substituição de tecidos duros e materiais para o sistema cardiovascular.

Uma possível definição de biomaterial, segundo Williams (1987), pode ser uma substância ou combinação de duas ou mais substâncias farmacologicamente inertes, de

natureza sintética ou natural, que são utilizadas para melhorar, aumentar ou substituir, parcial ou integralmente os tecidos e órgãos.

Quanto à classificação de acordo com sua origem, os biomateriais apresentam como classificação geral, os materiais biológicos ou naturais e materiais artificiais. A Figura 2.5 apresenta uma classificação para os materiais utilizados na engenharia de tecidos.

Figura 2.5 – Classificação dos materiais para implante relativamente à interação com o meio fisiológico.

Os biomateriais naturais ou biológicos podem ser classificados como autógenos ou autólogos, homógenos ou homólogos ou alógenos e heterógenos ou heterólogos ou xenógenos.

Os autógenos ou autólogos são materiais orgânicos provenientes do próprio indivíduo ao qual será destinado e apresentam resultados mais previsíveis ao indivíduo, durante uma substituição ou reconstrução de falhas teciduais. No entanto, este tipo de biomaterial tem a inconveniência da morbidade cirúrgica da fonte doadora, além da sua disponibilidade limitada. Como exemplo desses materiais pode ser citado o osso esponjoso, que além de fornecer fatores de indução óssea, possui estrutura porosa que favorece o crescimento vascular e osteogênico em seu interior.

Os homogêneos ou homólogos ou alógenos são materiais orgânicos provenientes de um outro indivíduo da mesma espécie, e se apresentam como uma opção viável, porém oferecem riscos de contaminação e/ou rejeição. Como exemplo desses materiais encontra-se o osso esponjoso humano na forma não-descalcificada ou descalcificada e liofilizada, proveniente de bancos de ossos.

Os heterogêneos ou heterólogos ou xenógenos são materiais orgânicos provenientes de um indivíduo de espécie diferente e se apresentam também como uma opção viável, porém oferecem riscos de contaminação e/ou rejeição. Como exemplos desses materiais encontram-se os ossos de origem bovina na forma não-descalcificada ou descalcificada e liofilizada.

Na Engenharia de Tecidos é utilizado o termo “materiais biomiméticos”. São aqueles que mimetizam ou que imitam biologicamente a estrutura porosa da matriz extracelular nativa, ou seja, considerados biomiméticos por imitarem a natureza da matriz extracelular óssea, sendo eles colágenos, proteoglicanas, componentes de glicosaminoglicanas e ácido hialurônico e a hidroxiapatita como fase mineral do osso (FISHER e REDDI, 2003). Quanto à origem destes materiais, pode ser autógena, homogênea ou heterogênea.

O uso de material sintético para implante ósseo pode ser justificado em consideração aos resultados de implantes autógenos, pois esses exigem duas cirurgias, uma para remover o enxerto e outra para implantá-lo. Podem ser classificados em metálicos, poliméricos e compósitos,

Os materiais metálicos são usados em forma de ligas e geralmente apresentam alta resistência mecânica à tração, ao impacto, à fadiga e ao desgaste, mas possuem algumas desvantagens dependendo do tipo de material metálico, como a baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico, alta densidade e diferença de propriedades mecânicas em relação aos tecidos. Como exemplo têm-se os aços AISI F138, ligas de Co-Cr, titânio e ligas Ti6Al4V e Ti6Al7Nb.

Os materiais poliméricos são largamente empregados em implantes devido à facilidade de fabricação, baixa densidade e boa biocompatibilidade, porém, com baixa resistência mecânica. Como o polietileno, poliuretano, polimetilmetacrilato, silicone e poli (ácido láctico).

Os materiais cerâmicos ou cerâmicas podem apresentar características interessantes para utilização como implantes ósseos, pois oferecem características desejáveis como biocompatibilidade, inércia química em meio fisiológico, dureza e boa resistência mecânica à compressão, porém, baixa resistência à tração. Algumas das cerâmicas mais empregadas em implantes são a alumina, zircônia, hidroxiapatita, biovidros, vitro-cerâmicas e os compostos de fosfatos de cálcio.

Os materiais compósitos são formados através da associação de dois ou mais materiais, dos quais um será a matriz e os outros serão componentes de reforço, o que objetiva obter propriedades específicas para aplicações em implantes, dependendo dos biomateriais empregados.

Outra classificação dos biomateriais, mostrada na literatura, é de acordo com suas características de interação com o tecido e o meio fisiológico conforme Hench e Wilson (1993).

Materiais biotoleráveis são aqueles apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através de formação de camada envoltória de tecido fibroso. Esta camada é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e

outros por parte do material implantado. Quanto maior a espessura da camada de tecido fibroso formada, menor a tolerabilidade dos tecidos ao material. Os materiais biotoleráveis são praticamente todos os polímeros sintéticos, assim como a grande maioria dos metais.

Materiais bioinertes são aqueles também tolerados pelo organismo, mas a formação de envoltório fibroso é mínima, praticamente inexistente. O material não libera nenhum tipo de componente ou o faz em quantidades mínimas. A quantidade de células fagocitárias na interface é mínima, a resposta fagocítica é passageira e uma fina cápsula toma lugar após a colocação do implante. Em alguns casos esta camada é praticamente imperceptível. Os materiais bioinertes mais utilizados são a alumina, zircônia, titânio, ligas de titânio e carbono. De acordo com a Conferência da Sociedade Européia para Biomateriais realizada na Inglaterra em 1986 (WILLIAMS, 1987), o termo bioinerte, não é adequado, já que todo material induz algum tipo de resposta do tecido hospedeiro, mesmo que seja mínima e, segundo Hench (1993), não existe material implantado em tecido vivo que seja completamente inerte, por este motivo, o termo bioinerte deve ser evitado. No entanto, o termo ainda é comumente utilizado, e é definido como um material que apresenta uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou na rejeição do tecido hospedeiro, formando uma cápsula fibrosa não aderente ao redor do material (WILLIAMS, 1987). Como exemplos de cerâmicas bioinertes podem ser citadas a alumina ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$), zircônia (ZrO_2) e dióxido de titânio (TiO_2) (AOKI, 1988).

Materiais bioativos são aqueles que proporcionam ligações de natureza química entre o material e o tecido ósseo, induzindo a osteointegração. Esses materiais promovem uma resposta biológica específica na interface do material que resulta na união entre os tecidos e o material (HENCH et al, 1972). Em função da similaridade química entre estes materiais e a parte mineral óssea, os tecidos ósseos se ligam a estes materiais, permitindo a osteocondução através do recobrimento por células ósseas. Os principais materiais desta classe são os vidros bioativos e as vitro-cerâmicas à base de fosfatos de cálcio, a hidroxiapatita e os compostos de fosfato de cálcio.

Materiais reabsorvíveis são aqueles que após certo período de tempo em contato com os tecidos, são degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Tais materiais são extremamente interessantes em aplicações clínicas, em função de ser desnecessária nova intervenção cirúrgica para a retirada do material de implante. Os principais exemplos destes materiais são as cerâmicas α -tricálcio fosfato (α -TCP), β -tricálcio fosfato (β -TCP), hidroxiapatita sinterizada (u-HAp), tetracálcio-fosfato (TTCP), octacálcio fosfato (OCP) e os polímeros ácido polilático (Polilactide-PLA), ácido poliglicólico (Poliglicolide-PGA).

Entretanto, alguns materiais poliméricos como o poli ácido - láctico e poli ácido – glicólico, ou co-polímeros formados por esses materiais podem ser utilizados como escafoldes para regeneração óssea, porém a maior limitação desses materiais porosos a base de polímeros está no seu relativo baixo módulo de elasticidade e resistência mecânica não compatíveis para aplicações em regiões articulares de substituições ósseas. Situação similar pode ser observada com os fosfatos de cálcio porosos por suportar condições de baixo carregamento (PILLIAR et al, 2001). Hidroxiapatita e trifosfato de cálcio quando formados por estruturas porosas exibem baixa resistência da ordem de 57 MPa em compressão para estrutura com 50% vol de porosidade e praticamente não resiste na tração (CAPK G. et al. 1990).

2.5.1 – Biocerâmicas

As biocerâmicas podem ser empregadas na forma densa e porosa. Para a cerâmica praticamente inerte e densa, o tecido não é aderido física, química ou biologicamente e com isso o material pode se mover facilmente, levando o implante ao desprendimento e eventual fracasso (CAO e HENCH, 1996). Porém, se o material for inerte e poroso, uma adesão interfacial se forma devido ao crescimento do tecido para dentro dos poros superficiais ou

através do implante, com aumento da área superficial de interface e conseqüente aumento da resistência ao movimento do implante no tecido.

O aumento da porosidade isoladamente diminui a resistência mecânica do material. No entanto, a existência de poros com dimensões adequadas favorece o crescimento de tecido através deles e ocorre um forte entrelaçamento do tecido com o implante, aumentando, a resistência do material *in vivo*. Os implantes macroporosos aceleram o processo de regeneração, já que permitem o crescimento progressivo de colágeno e posterior mineralização de tecido ósseo através dos poros abertos e interconectados (ZAVAGLIA, 2003). A osteocondução quase sempre é observada nas cerâmicas, sobretudo quando estas possuem composição e/ ou porosidade similares à estrutura óssea (CORNELL e LANE, 1998).

As biocerâmicas empregadas em implantes devem ser selecionadas em função da aplicação, biocompatibilidade, solicitação de cargas, vida útil, custo e formato do implante, o que sugere que os materiais cerâmicos porosos são fortes candidatos para engenharia de tecido duro.

Existem quatro tipos de respostas e diferentes meios que possibilitam a adesão do sistema musculoesquelético aos implantes que dependem do tipo de material do implante e são classificadas de acordo com a Tabela 2.2.

Tabela 2.2 – Classificação de biocerâmicas.

Tipo de biocerâmica	Tipo de fixação	Descrição da adesão	Materiais
Praticamente inerte	Morfológica	Crescimento ósseo nas irregularidades da superfície com ação de adesivo ou por pressão conveniente no defeito ou vazio.	Monocristais e alumina policristalina, zircônia.
Porosa para intracrescimento	Biológica	Ocorre o intracrescimento ósseo, com fixação mecânica do osso no material.	Alumina policristalina porosa e metais revestidos com hidroxiapatita.
Superfície reativa	Bioativa	Adesão química diretamente com o osso.	Vidros bioativos ou hidroxiapatita.
Reabsorvível	Reabsorvível	Cerâmicas são lentamente substituídas por osso.	Sulfato de cálcio, fosfato tricálcio, sais. de fosfato de cálcio.

Fonte: Hench, 1993.

O emprego das biocerâmicas em humanos apresenta-se desde a época dos egípcios. Niederauer e McGee (1991) relatam que encontraram nas bocas de múmias egípcias algumas obturações e dentes artificiais. Em 1892, Dreesman publicou o uso de gesso para preenchimento de defeitos ósseos e 30 anos após, Albee e Morrison fizeram a primeira publicação sobre o uso de fosfato tricálcio para o preenchimento dos vazios ósseos, ambos aplicados a usos dentários (NIEDERAUER e MCGEE, 1991). Porém, somente após 1960 iniciaram-se pesquisas e desenvolvimentos relevantes de biocerâmicas na área de implantes. De acordo com Bose et al (2002), Hench (1993) e Zavaglia (1993), aplicações de biocerâmicas para implantes encontram-se nas mais diversas áreas como a ortopedia, buco-maxilo-facial e odontológica. Na odontológica e buco-maxilo-facial as cerâmicas são aplicadas para substituição de articulações, de dentes, reparação de patologias periodontais, reconstrução maxilofacial, substituição e estabilização da mandíbula, enxerto ósseo e suporte para enzimas.

Segundo Matsuno et al (1996), as propriedades cristalográficas e semelhança das biocerâmicas com a parte mineral do osso e dos dentes após a sinterização, tem superior

compatibilidade com estes tecidos, o que permite o uso destes materiais como substituto potencial de tecido ósseo e de dentes. A principal limitação, todavia, advém da fragilidade e da baixa resistência mecânica das cerâmicas que restringem essas aplicações.

A primeira biocerâmica com uso difundido na década de 70 foi a alumina densa α - Al_2O_3 (HULBERT e COOKE, 1970), que se apresentava como bioinerte. Devido a sua biocompatibilidade e elevada resistência mecânica, ela é utilizada em próteses ortopédicas.

Segundo Hench (1993), uma das primeiras restrições do uso clínico das biocerâmicas está certamente relacionada com a vida útil sob estado de tensão atuante complexo, que geralmente manifesta através de lenta propagação de trincas e fadiga. Essas manifestações acarretam em fracasso de muitas das aplicações clínicas.

Por outro lado a tenacidade à fratura de um corpo sinterizado constituído de 100% de hidroxiapatita apresenta-se em torno de $1,1\text{MPa.m}^{1/2}$, já em compósitos com até 50% de ZrO_2 -t são relatados em contribuições científicas valores de até $2,8\text{MPa.m}^{1/2}$, valor este que amplia em muito as possibilidades de aplicação em implantes estruturais (MATSUNO et al, 1996).

Compósitos biocerâmicos têm surgido na forma de compostos com plásticos, carbono, vidros ou matrizes cerâmicas reforçadas com vários tipos de fibras; incluindo carbono, aço inoxidável, vidros de fosfatos e Zircônia (ZrO_2). Em muitos casos, esses compósitos são investigados, com o objetivo de aumentar a resistência à flexão e a torção e a diminuição do módulo de elasticidade. Nos compósitos Alumina-Zircônia, uma biocerâmica inerte, busca-se com a variação da concentração dos componentes, a possibilidade de estabelecer um acordo entre as suas propriedades com a obtenção de alta resistência mecânica, alta tenacidade e elevada dureza conforme relata Burelli et al (1998).

Em pesquisa realizada por Gomide e Zavaglia em 2004, a análise da porosidade do compósito Hidroxiapatita-Zircônia foi realizada através da variação da temperatura, tamanho médio de partícula e métodos de processamento cerâmico. Nessa pesquisa, a hidroxiapatita

foi sintetizada através do método via úmida. Com a utilização das condições de processamento pelo método de prensagem uniaxial e isostática e posterior sinterização sobre a porosidade do compósito, as conclusões relatam que a redução do tamanho das partículas proporciona uma maior densificação e melhor tenacidade à fratura e que para obtenção de densidade mais alta é necessário que haja uma maior pressão de conformação e uma distribuição diferente de tamanhos de partículas de hidroxiapatita, alterando-se o processo de moagem.

Cerâmicas bioativas abrangem os vidros bioativos, vitro-cerâmicas bioativas, e HAp. A característica comum desses materiais é que se ligam ao osso com tecido não fibroso na interface. A evolução dos implantes de vidros bioativos e de vitro-cerâmicas estão na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Evolução dos implantes de vidro bioativo e de vitro-cerâmica.

Evolução dos implantes de vidro bioativo e de vitro-cerâmica	
Ano	Acontecimento
1969	Evidência de ligação entre o osso aos vidros bioativos e vitro-cerâmicas (45S5 Bioglass®).
1973	Mecanismos de identificação das ligações osso-vidro bioativo
1975	Sucesso de próteses ortopédicas em locais de descarga de peso (load-bearing) em macacos usando Biovidro 45S5.
1980	Histologia comparativa de implantes de bioatividade variável.
1981	Análise ultraestrutural da vitro-cerâmica bioativa e osso.
1981	Testes de toxicologia e biocompatibilidade de vidros bioativos (Biovidro 45S5) bem sucedidos e primeira evidência de união em tecido mole.
1982	Material resistente para implante bioativo (A/W vitro-cerâmica) e prótese vertebral
1984	FDA (U.S. Food and Drug Administration) aprova o vidro bioativo (45S5 Bioglass®) em prótese auditiva.

Fonte: Yamamuro T. Y.; Hench L.L.; Wilson J. (1990).

A porosidade, conforme Leon Y Leon (1998), é definida como a porcentagem de espaços vazios em um sólido e é uma propriedade morfológica independente do material. No caso de matrizes para implantes ou escafoides, os poros são necessários para a formação do tecido ósseo porque eles permitem a migração e proliferação de osteoblastos e células mesenquimais, bem como a vascularização. Em adição, a superfície porosa promove fixação mecânica entre o implante e o osso (KUBOKI Y et al, 1998).

Conforme o Sub-comitê para a caracterização de sólidos porosos da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) KAWACHI et al (2000), materiais macroporosos apresentam poros com dimensões maiores que 50 nm. No entanto, para que um biomaterial seja considerado macroporoso é necessário que ele apresente poros da ordem de diâmetro Haversiano (Canais Haversianos dos ossos) (50 a 250 μm) (HENCH e ETHRIDGE, 1982)

Contudo, a literatura traz informações sobre o tamanho de poros para que haja osteocondutividade. Segundo Hench e Ethridge (1982) a porosidade ótima das biocerâmicas para implantes está relacionada à necessidade de fornecer um suprimento sanguíneo ao tecido conectivo em crescimento, fator que ocorre em poros maiores que 100 μm , os quais permitem o desenvolvimento de um sistema de vasos capilares entremeado com a cerâmica porosa. Outros autores afirmam que poros maiores que 100 μm e menores que 200 μm são necessários para obtenção de uma estrutura porosa para implante (HULBERT, 1970; LIU, 1997). Conforme Klawiter (1976), para que ocorra osteointegração os poros devem ser maiores que 50 a 100 μm ou próximo de 250 a 300 μm . Para Humbert et al (1971), o tamanho mínimo dos poros é de 100 μm , mas para que ocorra osteocondução são necessários tamanhos maiores que 200 μm . Liu (1997) traz a informação de que o macroporo pode ter o limite de 400 μm . Lê Huec et al (1995) colocaram que o volume total de poros da cerâmica tem variado de 20% a 60% e o tamanho pode ser de 5 μm – 400 μm . Nessa estrutura ocorreram variações nas respostas mecânicas as estruturas com poros maiores apresentaram menor resistência à compressão. Binner e Sambrook (2004) divulgaram que tamanho de poros de 100 a 200 μm permitem um crescimento de osteoblastos nos poros e para estes autores, a presença de diâmetro de microporosidade de aproximadamente 1 μm na parede do poro é importante para efetivar o crescimento de células. Conforme Hulbert et al (1987) e Simske et al (1997), para que ocorra osteocondutividade é necessário tamanho de poro de 100 a 600 μm .

Das pesquisas avaliadas, observou-se uma importância fundamental na geometria dos poros (esférica ou oblonga), no tamanho e na distribuição dos poros, interconectividade e relação com as propriedades mecânicas. Verifica-se que o objetivo é obter porosidades em torno de 60 a 90% e manter uma resistência mecânica compatível com a região tecidual à ser implantada, pois a fabricação dos escafolds é o processo-chave em todos os procedimentos de engenharia de tecido ósseo.

Quando o material empregado na fabricação de um escafolds for uma cerâmica podem ocorrer dois tipos de poros e de porosidades, ou seja, os poros intrínsecos ao processo de fabricação cerâmico que formam a porosidade intrínseca e os poros induzidos que formam a porosidade induzida.

A porosidade intrínseca de um escafolds, mesmo que seja considerado denso, possui microporos, que são inerentes ao processamento cerâmico adotado. Esses microporos geralmente possuem dimensões muito pequenas formando uma porosidade intrínseca, a qual, isoladamente, não desempenha papel fundamental para o desenvolvimento tecidual, mas podem contribuir para a diminuição da resistência mecânica do suporte.

A porosidade induzida de um escafolds desempenha papel fundamental para o desenvolvimento tecidual, sendo que a formação destes poros pode ser induzida através de vários métodos. O tamanho desejável dos poros de uma porosidade induzida varia numa faixa de 50 a 400 μm , de acordo com a literatura, no entanto, dependendo do processo utilizado, poros menores que 50 μm , também, podem ocorrer. Na prática, obtêm-se poros advindos de ambas as naturezas.

A Figura 2.6 apresenta uma microestrutura porosa desejável para engenharia de tecido ósseo.

Figura 2.6 – Modelo de microestrutura porosa, homogênea; interconectada e com poros de 100 à 300 μ m. Fonte: Ramay e Zhang (2004)

2.5.1.1 – Alumina

A alumina é um material cerâmico com fórmula molecular Al_2O_3 , estrutura cristalina hexagonal compacta, comportamento elástico anisotrópico, com alta dureza, a Figura 2.7 ilustra a fórmula estrutural plana da alumina.

Figura 2.7 – Fórmula estrutural plana da alumina.

A alumina está presente na natureza em abundância nas argilas, caulim e feldspatos. A principal fonte de alumina isolada na natureza, ou seja, sem a presença de outros óxidos, são os minérios de bauxita, nos quais ela aparece na forma hidratada, isto é, como um hidróxido de alumínio (HÜBNER e DÖRRE, 1984).

O uso comercial em larga escala de cerâmicas com alto teor de alumina teve início na década de 30, consolidando-se por volta de Segunda Guerra Mundial com sua utilização em isoladores de velas de ignição, substituindo a porcelana e em produtos para uso laboratorial. As cerâmicas de alta alumina têm encontrado aplicações nas mais diversas

áreas, destacando-se as aplicações para fins estruturais, como guias-fio têxteis, eixos, selos mecânicos, ferramentas de corte, tubos para proteção de termopares, cadinhos, elementos de moagem, bicos pulverizadores, cabeças de pistão, entre outros (FORTULAN, 1999). Além disso, a alumina é o material de maior aceitação para aplicação em casos que necessitam de inércia como em aplicações biomédicas, devido à combinação de excelente resistência à corrosão, boa biocompatibilidade, alta resistência ao desgaste, alta resistência mecânica à compressão e alta rigidez, sendo a maioria das aplicações obtidas com o emprego de Alumina- α policristalina com pequenas quantidades de MgO (<0,5%) como aditivo de sinterização, que inibe o crescimento de grão durante a sinterização (HEIMKE, 1987; HENCH, 1993) e assim, contribui no aumento das propriedades mecânicas relativas a sua microestrutura.

As propriedades da alumina policristalina são normalizadas pela ABNT NBR ISO – 6474, conforme mostra a Tabela 2.4.

Tabela 2.4 – Propriedades ABNT NBR ISO – 6474 da alumina policristalina.

Propriedades	Unidades	NBR ISO – 6474
Al_2O_3	%	$\geq 99,5$
$\text{SiO}_2 + \text{Na}_2\text{O}$	%	$< 0,1$
Densidade	g/cm^3	$\geq 3,90$
Tamanho médio de grão	μm	< 7
Dureza Vickers	HV	> 2000
Módulo de ruptura à flexão	MPa	> 400

Apenas as características físico-químicas são normalizadas, e são as que visam garantir o desempenho do material quando submetido às condições de uso. Quando utiliza-se uma alumina como material para implante, a composição química da alumina não deverá envolver utilização excessiva de auxiliares de sinterização que possam comprometer as propriedades mecânicas do material, principalmente as características de resistência à fadiga em um meio agressivo como é o meio fisiológico. A utilização de auxiliares de sinterização pode também gerar um aumento do tamanho dos grãos do material,

comprometendo a resistência mecânica, uma vez que está diretamente relacionada com o tamanho de grão, ou seja,

$$\sigma_f \propto d^{-1/2},$$

onde σ_f é a tensão de fratura e d o diâmetro dos grãos. Esta relação está ligada ao fato de que a propagação de trincas em materiais cerâmicos é feita principalmente pelo contorno do grão, em função da alta energia de ligação entre os átomos no interior dos grãos e da concentração de defeitos junto ao contorno do grão. Quanto maior a quantidade de contornos, maior o caminho a ser percorrido pelas trincas, maior a quantidade de energia pode ser dispersa, aumentando assim a resistência mecânica do material.

A Alumina densa ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$) policristalina é utilizada principalmente para ponto de apoio de carga em próteses de quadril e implantes dentários, em função da boa combinação de suas propriedades físicas, visando prevenir falhas ao longo do tempo, sendo importante em implantes ortopédicos e buco-maxilo-facial.

Existem aplicações também para a alumina monocristalina (safira) como biomaterial, uma vez que esta apresenta resistência mecânica cerca de três vezes superior à alumina policristalina além das suas características de biocompatibilidade. Entretanto, os custos de produção e os tamanhos relativamente reduzidos das peças produzidas inviabilizam a sua utilização mais ampla.

A alumina pode ser empregada na forma de suporte poroso. O aumento da porosidade, todavia, diminui a resistência mecânica do material isoladamente, pois os poros são intensificadores de tensões, porém a existência de poros com dimensões adequadas favorece o crescimento de tecido através deles, e um forte entrelaçamento do tecido com o implante ocorre com conseqüente aumento da resistência do material *in vivo*.

2.5.1.2 – Hidroxiapatita (HAp)

O tecido ósseo é constituído basicamente por colágeno, água e componentes inorgânicos. Esse componente inorgânico é composto fundamentalmente por cálcio e fosfato. Inicialmente, o cálcio e o fosfato são depositados como sais amorfos para serem rearranjados numa estrutura cristalina semelhante a hidroxiapatita $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$. Devido à grande superfície de troca iônica da microestrutura cristalina da matriz mineral, outros íons, como Na, K, Mg e CO_3 , também podem ser encontrados, a célula unitária da Hap está ilustrada a Figura 2.8. Dependendo da ingestão de flúor, quantidades variáveis de fluorapatita, também podem estar presentes, sendo esta a diferença da hidroxiapatita sintética para a natural. A hidroxiapatita estequiométrica tem 39,9% em peso de cálcio, 18,5% de fosfato e 3,38% de hidroxila (OH), ou seja, ela é ausente de íons (GOMIDE, 2005).

Figura 2.8– Estrutura da hidroxiapatita – célula unitária
Fonte: DAVISON et al (2001)

Apatita é uma definição de estrutura e não de composição. Cristalograficamente a estrutura da apatita apresenta um sistema hexagonal. A célula unitária se repete em três

dimensões para formar o cristal de apatita. A estabilidade da estrutura da apatita é fornecida pela rede de grupos PO_4 em arranjos com empacotamentos fechados.

O termo apatita descreve uma família de compostos que apresentem estruturas similares e não necessariamente composições idênticas. Hidroxiapatita, especificamente HAp-cálcio, é um composto com uma composição $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

A estrutura da apatita possibilita a substituição dos íons Ca^{2+} , OH^- e PO_4^{3-} por outros como CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} , F^- e outros, resultando em mudanças nas suas propriedades.

As apatitas biológicas compreendem a fase mineral dos tecidos calcificados como os dentes, esmalte, ossos e são denominadas de HAp-cálcio. As HAp biológicas diferem da HAp pura na estequiometria, na composição, cristalinidade e outras propriedades físicas e mecânicas como ilustra a Tabela 2.5.

Tabela 2.5 – Comparação das composições químicas e propriedades mecânicas do osso e da hidroxiapatita.

Constituintes (% peso)	Osso	HAp
Cálcio, Ca^{2+}	24,5	39,6
Fósforo, P	11,5	18,5
Razão Ca/P	1,65	1,67
Sódio, Na^+	0,7	-
Potássio, K^+	0,03	-
Magnésio, Mg^{2+}	0,55	-
Carbonato, CO_3^{2+}	5,8	-
Flúor, F^-	0,02	-
Cloro, Cl^-	0,10	-
Total inorgânico	65,0	100
Total orgânico	25,5	-
H_2O absorvida*	9,7	-
Propriedades Mecânicas		
Módulo elástico (10^6 MPa)	0,020*	0,01
Resistência à tensão (MPa)	150*	100
*Valores para osso compacto		

Fonte: Le Geros, R.Z; Le Geros J.P. (1995).

Métodos de caracterização da hidroxiapatita

A hidroxiapatita (HAp) sintética, mineral ou biológica pode ser estudada através dos seguintes métodos físicos: difração de raio-x, nêutrons e elétrons, microscopia eletrônica de varredura e transmissão, ressonância magnética, espectroscopia no infravermelho e termogravimetria, conforme ilustra a Tabela 2.6.

Tabela 2.6 – Métodos de caracterização da Hidroxiapatita

Método Analítico	Informação
Difração de raio-x, DRX	Identificação, pureza, presença de fases misturadas, cristalinidade (tamanho e ou força do cristalino), parâmetro de redes.
Espectroscopia de infravermelho, IV	Presença de grupos funcionais, determinação, maneira de substituição (p.ex. CO_3 para PO_4) pureza, cristalinidade.
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	Morfologia do cristal (tamanho e forma)
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	Defeito de rede, tamanho e forma do cristalino, orientação.
Sonda eletrônica	Distribuição qualitativa de elementos, razão Ca/P.
Ressonância nuclear magnética (RNM)	Ligação de H, efeito do F
Análise termogravimétrica, ATG	Estabilidade térmica de componentes de fosfato de cálcio.
Microscópio polarizado	Grau de mineralização, porosidade.
Clorimetria	Determinação de conteúdo de fosfato
Absorção atômica	Análise elementar de cátions (p.ex. Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Sr^{2+})

2.5.1.3 – Biovidro

Os primeiros biovidros foram desenvolvidos por Hench em 1969, e recebem o nome de Bioglass®. Desde então, diversas pesquisas têm sido realizadas no intuito de melhorar as propriedades destes materiais. Os vidros bioativos têm a capacidade de formar uma camada rica em cálcio (Ca) e fósforo (P) na superfície de um implante quando mergulhados em uma solução celular que simula o plasma sanguíneo. Esta propriedade leva à adesão do implante ao osso e posteriormente auxilia a reparação de tecidos lesados. Por estas razões, muitas vezes, também são denominados estes vidros bioativos de biovidros. O gráfico

ternário da Figura 2.9 ilustra algumas composições com relações aos elementos químicos mais expressivos em quantidades da composição de um biovidro.

Figura 2.9 – Faixas de composição do Biovidro

A Figura 2.9 ilustra três regiões onde se observa as propriedades relativas a elas. A região A, ilustra a bioatividade com o osso; a região B, típica de vidros silicatos e praticamente inerte ilustra a ocorrência da formação de cápsula fibrosa na interface tecido implante e a região C, reabsorvível, desaparece após 10 – 15 dias de implante.

Conforme Greenlee et al (1971) em 1971 surgiram as primeiras evidências de que implantes vitro-cerâmicos se fixaram firmemente ao osso.

O biovidro foi estudado *in vitro* e *in vivo* em 1972, quando o uso como cobertura de próteses metálicas e como ligante pode ser confirmado em testes realizados em animais (HENCH et al, 1972). Foram realizadas análises do comportamento histoquímico do biovidro e das interfaces, quando em solução ou ligado ao osso. Os resultados obtidos indicaram que os implantes vitro-cerâmicos são ligados ao osso quando eles apresentam uma camada rica em sílica, cálcio e fosfato, a qual se assemelha a um cimento que serve como um local ativo para ligação colágena seguida de calcificação. Mostrou-se também que as regiões adjacentes à superfície do implante de biovidro apresentaram evidências de crescimento de osso novo (HENCH L. L. et al, 1973).

Segundo Hench et al (1970)[‡] apud Yamamuro; Hench e Wilson (1990) a hipótese de que um vidro ou vitro-cerâmica poderia ser desenvolvido sem ser rejeitado pelo organismo através da formação de tecido fibroso e ao contrário formaria uma ligação química com o tecido hospedeiro surgiu em 1967.

O biovidro é normalmente fixado ao osso por interação ou reação devido ao fato de ser um material que pode reagir com o osso criando uma fase de transição entre o tecido e o material e essa fixação apresenta razoável resistência (SMITH, 1982). Os biovidros formam uma fixação não porosa, densa e com superfícies ativas; eles proporcionam uma fixação bioativa, ou seja, fixação por ligação química com o osso.

O biovidro 45S5 (45% SiO₂ e Ca/P com uma razão de 5) foi testado *in vitro* e *in vivo* em três condições microestruturais: amorfa (vidro), parcialmente cristalina e totalmente cristalina. Em todas as condições, os implantes se ligaram ao osso compacto de fêmures de ratos após seis semanas de implante. A amorfa e a cristalizada se ligaram ao tecido e não poderiam ser removidos forçosamente do sítio de implante. Em contraste, os implantes de cerâmicas controles de SiO₂ puro, 99,5% Al₂O₃, ou 99,9 % de MgO soltaram-se do defeito ósseo durante a preparação histológica (HENCH et al, 1970; HENCH et al, 1971; GREENLEE et al, 1972 apud YAMAMURO; HENCH; WILSON, 1990).

Estudos que compararam implantes de biovidro com implantes metálicos comprovaram a presença de ossificação na interface osso-vidro e presença de tecido fibroso nas superfícies dos implantes metálicos e que a presença de tecido fibroso é um fator indesejado para implantes, conforme Hench et al (1974). Hench et al em 1975 prosseguiram com estudos *in vitro* e *in vivo* em animais de pequeno porte.

Dee et al (1996) verificaram, em um estudo *in vitro* utilizando osteoblasto de ratos, três períodos distintos da expressão gênica que se segue à adesão celular: proliferação celular, síntese da matriz extracelular, maturação e organização da matriz. Neste estudo,

[‡] HENCH et al. U.S. Army Research and development command, Contract No. DADA17-70-C-0001, University of Florida, Gainesville, 1970.

verificou-se um significativo aumento no tamanho e no número dos depósitos minerais numa cultura de osteoblastos que tinha crescido num vidro modificado.

A parcial cristalização da fase vítrea do material durante seu aquecimento na cobertura do implante, explica a ocorrência da camada superficial de vidro bioativo ser reabsorvida nas áreas sem contato ósseo direto e nas áreas com íntimo contato ósseo. Nesse caso o vidro foi ligado ao osso por meio de uma camada de fosfato de cálcio na superfície do revestimento e a camada de fosfato de cálcio é formada mesmo quando o fósforo não faz parte da composição do vidro, como ocorreu no estudo destes autores. Isto significa que o fosfato da camada cálcio-fosfato provém do fluido corporal (PAJAMAKI et al, 1995).

Estudo realizado por Heikkila et al (1996) mostrou que uma quantidade de osso formado na interface com a hidroxiapatita foi menor que na interface com biovidro.

Oonishi et al (1997) observaram que o biovidro pode permitir a completa restauração óssea em duas semanas ao contrário das doze semanas necessárias para o uso da hidroxiapatita.

Turunem et al (1995) mostraram que o vidro bioativo aumenta o reparo de defeitos no osso compacto enquanto que o tetrafluoretileno (PTFE) parece diminuir o reparo ósseo. Em outro estudo foi comparado o efeito dos mesmos materiais, agora adjacentes a implantes de titânio e de vidros bioativos. Os resultados desse estudo indicam que os implantes cobertos com vidro parecem aumentar a osteointegração nas áreas com defeito ósseo, Turunem et al (1998).

Segundo Hench (1998) a biocompatibilidade do biovidro foi um fato verificado por vários estudiosos que utilizaram o material.

Reyes em 2000 realizou um estudo com uma composição de biovidro modificado baseado no vidro bioativo 45S5 e as análises dos achados radiológicos e histológicos indicaram um material biocompatível, pois não houve rejeição do tecido hospedeiro; o vidro apresentou característica de enchimento, pois foi constatada sua presença no tecido hospedeiro e o material utilizado caracterizava-se também, como osteocondutor.

Portanto, um biovidro deve apresentar em sua composição menos de 60mol % SiO₂, alto Na₂O e CaO e alta razão CaO/P₂O₅ para formar uma camada reativa com estrutura parecida com um gel quando em contato com os tecidos e fluidos do corpo. Isto desenvolve uma interface adjacente entre o tecido e o corpo vítreo. Com isso, a superfície forma uma camada de hidroxiapatita biologicamente ativa que promove a adesão entre a interface com o tecido. A vantagem está em o biovidro desenvolver uma interface que resista a subseqüentes esforços mecânicos. A presença de Al₂O₃ na composição aumenta a durabilidade química do biovidro, o que inibe a adesão óssea. O comportamento biológico do vidro bioativo depende da composição, especialmente relativa a proporção de ligações ponte de oxigênio e ligações não ponte de oxigênio. Contudo, os materiais bioativos devem apresentar estrutura porosa para que ocorra osteointegração, a qual pode ser definida como a conexão estrutural e funcional existente entre osso vivo organizado e a superfície de um implante.

O conceito de material bioativo tem se expandido e está abrangendo um número grande de materiais bioativos com ênfase nas ligações e espessura na camada de ligação interfacial.

Segundo Hench (1988) e Gross et al (1988), os materiais bioativos incluem vidros bioativos como Bioglass®, vitro-cerâmica bioativa como Ceravital®, A/W vitro-cerâmica, ou vitro-cerâmica *machinable*; hidroxiapatita densa como a Durapatite® ou Calcitite®, ou compósitos bioativos como o polietileno – Bioglass®, polissulfone Bioglass®, e misturas polietileno – hidroxiapatita (Hapex®). Todos os materiais bioativos citados acima se integram na interface com o osso. Contudo, o tempo dependente da ligação, a resistência da ligação, o mecanismo de ligação e a espessura da zona de ligação diferem para cada material. A Figura 2.10 ilustra um diagrama ternário com os tipos de biovidros comerciais mais conhecidos.

Figura 2.10 - Composições de Biovidro x nomes comerciais. Fonte: Ravaglioli e Krajewski (1992)

2.6 – Estudos In Vitro e Osteointegração de Escafolds

Bose et al (2002) realizaram um estudo in vitro de estrutura porosa de alumina com revestimento de hidroxiapatita para promover bioatividade. A porosidade da matriz foi controlada pelo processo de prototipagem rápida *Fused Deposition Modeling* (FDM). Os resultados do estudo mostraram que a estrutura avaliada promove um sítio favorável para fixação de células *in vitro*.

Trabalho realizado por Pilliar et al (2001) sugeriu que estruturas porosas de fosfato de cálcio (como polifosfato de cálcio) podem apresentar potencial utilidade como material para substituição óssea. A porosidade das amostras fabricadas por Pilliar et al foram em torno de 30 a 45 vol%. Foi analisada a resistência mecânica das amostras através de teste de compressão diametral, apresentando resistência máxima de 24,1 MPa, difração de raio-X e ensaios in vitro. Nos ensaios in vitro, foi analisada a degradação do material polifosfato de cálcio em condições semelhantes ao meio fisiológico. Os resultados demonstraram significativa perda de resistência mecânica em um período de 30 dias o que permite concluir

que houve degradação hidrolítica do polifosfato de cálcio, demonstrando a possível utilidade desse material como estrutura porosa absorvível para implante ósseo.

Chen, Thompson e Boccaccini (2006) analisaram *in vitro* a resposta de escafolds manufacturados através da técnica barbotina-cerâmica (ou biovidro). Esponjas poliméricas de poliuretano foram embebidas em barbotina e em seguida as esponjas foram secas em estufa e levadas para sinterização a 900°C por 5 horas a 950 °C por 2 horas e a 1000 °C por 1 hora; obtendo ao final do processo corpos porosos de vidro bioativo (45S5 *Bioglass*®). Foi realizada análise *in vitro* com fluido corporal simulado e os resultados indicaram formação de hidroxiapatita na superfície do material, que pode ser caracterizado como um material bioativo. Os escafolds de biovidro, com porosidade próxima de 90%, apresentam uma resistência à compressão de 0,3 a 0,4 MPa, valores estes próximos de material frágil e altamente poroso segundo trabalho realizado por Chen, Thompson e Boccaccini (2006) e segundo Tamai et al (2002) podem variar de 10 a 30 MPa.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

Para avaliar o desempenho de escafolds de alumina bioativos, corpos porosos foram manufaturados em alumina e em hidroxiapatita. Os escafolds de alumina foram infiltrados com biovidro e HAp. Os corpos porosos foram avaliados quanto à resistência mecânica à compressão, citotoxicidade e morfologia da interação célula-material.

Este trabalho tem como idéia principal reunir as propriedades mecânicas da alumina e associá-las com as propriedades de bioatividade de um vidro bioativo e da hidroxiapatita. Foram selecionados: um material bioinerte (alumina) como componente da matriz dos corpos-de-prova, material orgânico (sacarose) como formador de poros e materiais bioativos (hidroxiapatita e biovidro) para incorporar aos poros da matriz de alumina. Foram fabricadas peças de hidroxiapatita porosa e peças porosas de alumina. Estas ultimas foram infiltradas com biovidro e hidroxiapatita. A manufatura foi realizada através do método barbotina-cerâmica com incorporação de agente orgânico (sacarose) como formador de poros. A conformação das peças foi através de prensa uniaxial e prensa isostática, seguido de lixiviação da sacarose e sinterização. Foram manufaturados nove corpos-de-prova de alumina, infiltrados por hidroxiapatita-biovidro, sete corpos-de-prova de alumina não infiltrados e sete corpos-de-prova com matriz de hidroxiapatita para ensaio de compressão; doze amostras de hidroxiapatita porosa, doze amostras de alumina infiltrada por hidroxiapatita-biovidro e doze amostras de alumina porosa para análise *in vitro* de

citotoxicidade e de interação célula-material; cinco amostras de hidroxiapatita porosa e cinco amostras de alumina infiltrada por hidroxiapatita-biovidro, para análise em Microscópio de Varredura Eletrônica e análise química por EDX ou EDS (*Energy Dispersive x-ray detector*).

O diagrama de fluxo da metodologia empregada neste trabalho é ilustrado na Figura 3.1.

Figura 3.1 – Diagrama de Fluxo da metodologia.

3.1 - Matérias primas

O custo de aquisição dos materiais utilizados neste trabalho para a fabricação dos scaffolds está na Tabela 3.1, para a fabricação comercial, estes custos devem ser revistos, pois a aquisição é feita em lotes maiores e os custos diminuem.

Tabela 3.1 – Custo dos materiais utilizados para manufatura dos scaffolds.

	Data	Preço R\$ /g	Preço US\$ /g	Local
Alumina Calcinada CT-3000	29/11/2005		0,00484	Brasil
Hidroxiapatita (Fluka-Sigma-Aldrich - 21223)	30/08/2005	0,336		Brasil
Hidroxiapatita (Sigma-Aldrich – 289396)	30/08/2005	18,4		Brasil
Biovidro (Biogran – 45S5 <i>Bioglass</i> ®)	26/01/2006	148		Brasil
Polivinil-butiral (PVB) (Butvar B98)	29/11/2005		0,01844	Brasil/Porto de Santos*
Álcool Isopropílico (PA) - ACS (Labsynth Ltda.)	08/09/2005	0,011		Brasil
Sacarose (PA) Marca Synth	08/09/2005	0,00496		Brasil

* incidir taxas de importação (na compra mínima ~ 100%)

Como **componente estrutural bioinerte** dos scaffolds foi utilizada a Alumina Calcinada CT-3000, (Alcoa & Chemicals Ltda) com diâmetro médio equivalente de partícula de 0,6 μm , área superficial de 6 a 8 m^2/g . A seleção da alumina se deve ao seu comportamento tido como universal, de propriedades mecânicas e biológicas conhecidas e de manufatura estável e passíveis de serem reproduzidas por outros materiais.

Como **componente estrutural dos scaffolds bioativos** foi utilizada a Hidroxiapatita (Fluka-Sigma-Aldrich-21223) com a seguinte composição $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \geq 90\%$, Cloro (Cl) $\leq 0,05\%$, Sulfato (SO_4) $\leq 0,1\%$, Cd $\leq 0,005\%$, Co $\leq 0,005\%$, Cu $\leq 0,005\%$, Fe $\leq 0,04\%$, K $\leq 0,01\%$, Na $\leq 0,05$, Ni $\leq 0,005\%$, Pb $\leq 0,005\%$ e Zn $\leq 0,005\%$. Os scaffolds

produzidos com ela foram utilizados para o controle e a comparação nas análises de resistência a compressão e análise *in vitro* visando a citotoxicidade e interação celular. Ressalta-se que a composição química desta hidroxiapatita não atende a norma ASTM 1185-03 (Standard Specification for Composition of Hydroxylapatite for Surgical Implants), relativamente a concentração máxima de Cd (3 ppm) e Pb (30 ppm) porém, devido ao seu relativo baixo custo (Tabela 3.1) optou-se pelo seu uso no desenvolvimento do processo de manufatura dos corpos-de-prova para ensaio de compressão e amostras para análise *in vitro*.

Como **componente para infiltração (1)**, foi utilizada a Hidroxiapatita (Sigma-Aldrich – 289396). Este material apresenta pureza que atende a norma ASTM 1185-03 (*Standard Specification for Composition of Hydroxylapatite for Surgical Implants*) e é comercializado para implantes. No processo de infiltração a quantidade empregada é muito reduzida o que permitiu o emprego deste material de maior valor agregado (Tabela 3.1) e resultados mais próximos do ideal.

O **componente para infiltração (2)** empregado foi o Biovidro (Biogran – 45S5 Bioglass®), 300 a 355 µm (50 – 45 mesh), fabricado pela *3i Implant Innovations Inc* – Enxerto ósseo sintético reabsorvível, lote 440663 2100-0003. Este material é comercializado para aplicações em implante.

Como **ligante cerâmico** foi empregado o Polivinil-butiral (PVB) (Butvar B98). Este ligante, totalmente orgânico, é altamente solúvel em álcool isopropílico e praticamente insolúvel em água. A seleção do PVB foi feita por viabilizar a lixiviação em água da sacarose mantendo a integridade dos escafoldes conformados.

O **solvente do ligante e meio líquido da barbotina** utilizado foi o Álcool Isopropílico (PA) - ACS da (Labsynth Ltda.), com densidade igual a 0,782 g/ml, com um máximo de 0,2% de água. A característica determinante na seleção deste solvente para a confecção dos escafoldes está na baixa solubilidade que a sacarose apresenta neste líquido, o que permite

a preparação da barbotina mantendo a integridade dimensional dos cristais de sacarose, ou seja, dos vazios ou poros desejados.

Como **solvente para lixiviação do açúcar** foi usado água destilada.

E, finalmente, como **agente formador de poros** foi utilizada a Sacarose (PA) da Synth (LABYNTH Produtos para laboratórios Ltda), com a seguinte formulação $C_{12}H_{22}O_{11}$ - HXOO18-00256, Código Compl: 35801, Família: 0018, Rotação específica +66,3° a +66,8. O máximo de impurezas da sacarose pode ser observado na Tabela 3.2. As impurezas apresentadas pela sacarose foram quase que integralmente removidas do escafolde durante a lixiviação, traços remanescentes após lixiviação e decomposição não influenciam na pureza dos escafoldes, pois todos foram sinterizados, no segmento da fabricação.

Tabela 3.2 – Máximo de impurezas da sacarose

Máximo de impurezas	
Acidez	0,0008
Açúcar invertido	0,05%
Cloretos (Cl)	0,005%
Ferro (Fe)	0,0005%
Insolúveis	0,005%
Metais Pesados (c/ Pb)	0,0005%
Perda por secagem	0,03%
Resíduos de ignição	0,01%
Sulfatos e sulfitos	0,005%

3.2 – Manufatura

Nos procedimentos para confecção dos escafoldes, foram conformados corpos-de-prova porosos (escafoldes) para o ensaio de compressão e cultura *in vitro*. Para a obtenção de porosidade em cerâmicas são empregadas diversas técnicas, das quais a mais difundida consiste em adicionar um componente disperso que seja degradável e volátil com a temperatura. Este método permite que o constituinte degradável se decomponha e deixe vazios (poros) no material durante a queima. Se, eventualmente, a concentração for maior que o limite de percolação, uma estrutura aberta e porosa pode ser assim obtida. Atualmente para componentes formadores de poros utiliza-se uma gama enorme de

materiais incluindo amido, grafite, sacarose, naftaleno, farinha de trigo entre outros. Todavia, cuidados devem focalizar sempre o controle da pureza dos materiais, particularmente os materiais inorgânicos livres na degradação. Em algumas aplicações, contudo, resíduos inorgânicos podem ser planejados e eles podem favorecer a sinterização se for finamente disperso e reativo. Neste trabalho, optou-se por agente formador de poros por decomposição térmica, a sacarose, nominalmente 100% orgânica, com impurezas minimizadas e controladas. Os corpos-de-prova foram conformados por prensagem isostática e a sacarose lixiviada antes da queima.

3.2.1 – Classificação do tamanho das partículas e análise termogravimétrica da sacarose

O processo de seleção do diâmetro médio da porosidade desejada e da quantidade de sacarose a ser utilizada implica em controlar a porosidade e o tamanho de poros das peças (escafoides) a serem manufaturadas. Para tanto foram selecionados dois intervalos dos tamanhos de partículas de sacarose, a saber: $177 < \text{tamanho 1} < 300 \mu\text{m}$ e $300 < \text{tamanho 2} < 600 \mu\text{m}$. Esse critério de classificação foi baseado na porosidade requerida para os escafoides com tamanho de poros entre $100 \mu\text{m}$ e $400 \mu\text{m}$. A porosidade planejada de 70%, todavia, requer uma entrada de 82% de sacarose, conforme Monaretti (2005).

- **Moagem da sacarose**

A moagem da sacarose, agente formador de poros, foi realizada com almofariz e pistilo. Posteriormente, as partículas de sacarose foram submetidas à classificação de tamanho, através de peneiras Tyler, para então selecionar partículas de tamanhos nos intervalos de 177 a $600 \mu\text{m}$. A partir da moagem e seleção, elas foram armazenadas em três recipientes distintos: um recipiente contendo partículas na faixa de 177 a $300 \mu\text{m}$, outro com partículas no intervalo de 301 a $600 \mu\text{m}$ e um terceiro recipiente armazenou uma combinação de 50% de partículas na faixa de 177 a $300 \mu\text{m}$ e 50% de partículas na faixa de

301 a 600 μm , sendo esta combinação utilizada na manufatura dos escafoldes para ensaio *in vitro* e ensaio mecânico.

- **Análise termogravimétrica (ATG) da sacarose**

A sacarose utilizada na confecção dos corpos-de-prova foi submetida a teste de termogravimetria. A curva termogravimétrica obtida da sacarose é apresentada na Figura 3.2. Nesta Figura, destaca-se o intervalo de temperatura de maior perda de massa que representa a faixa de temperatura em que a sacarose sofre decomposição e o pico da derivada termogravimétrica (DTG) do maior evento de decomposição que se dá entre 243°C até uma temperatura superior a 600°C com pico de derivada em 256°C.

Figura 3.2 – Curva Termogravimétrica ATG das Partículas de Sacarose. Fonte: Monaretti (2005).

3.2.2 – Preparação das composições cerâmicas

Para a preparação de composições cerâmicas, três barbotinas foram preparadas: a) barbotina com alumina (BA), b) barbotina com Hidroxiapatita (BH) e c) Barbotina para infiltração composta por biovidro e hidroxiapatita (BBvH).

Para as barbotinas BA e BH estabeleceu-se uma suspensão com 30 vol% de sólidos, 3 vol% de ligante PVB e álcool isopropílico. A porcentagem referente parte sólida da barbotina (30 vol%) foi constituída por 18 vol% de alumina e 82 vol% de sacarose. Para a barbotina BBvH estabeleceu-se uma suspensão a 12 vol% de sólidos, 0,3 vol% de PVB e álcool isopropílico. Nos procedimentos o PVB foi considerado como líquido uma vez que estaria dissolvido no álcool.

A Tabela 3.3 apresenta os dados volumétricos genéricos das barbotina e dados específicos em massa do processo desenvolvido neste trabalho para obtenção de 100ml de barbotina BA e BH e 12 ml para BBvH.

Tabela 3.3 – Barbotinas – composição e dados

Barbotinas		BA Vol. 100ml	BH Vol. 100ml	BBvH Vol. 12ml
Alumina	Vol (%)	5,4	-	-
	massa (g)	21,546	-	-
	ρ (g/cm³)	3,99	-	-
Hidroxiapatita	Vol (%)	-	5,4	6,6
	massa (g)	-	17,04	2,5
	ρ (g/cm³)	-	3,156	3,156
Biovidro	Vol (%)	-	-	3,4
	massa (g)	-	-	0,98
	ρ (g/cm³)	-	-	2,4
Sacarose	Vol (%)	24,6	24,6	-
	massa (g)	33,184	33,184	-
	ρ (g/cm³)	1,3327	1,3327	-
PVB	Vol (%)	3	3	0,3
	massa (g)	3,3	3,3	0,04
	ρ (g/cm³)	1,1	1,1	1,1
Álcool Isopropílico	Vol (%)	67	65	89,7
	massa (g)	52,26	52,26	8,4
	ρ (g/cm³)	0,78	0,78	0,78

- **Procedimento experimental**

A mistura, desaglomeração e homogeneização das matérias primas utilizadas para o preparo das barbotinas BA e BH foram realizadas em moinho de bolas, com um jarro de polietileno de alto peso molecular (HDPE) de 150,0 ml de capacidade volumétrica total e 100,0 ml de capacidade volumétrica útil, utilizando como elementos de moagem 400,0 g de cilindros de alumina ($\varnothing = 12,0$ mm, $h = 12,0$ mm). Para a barbotina BBvH foi empregado um jarro de nylon com volume total de 60 ml carregado com 75g de elementos de moagem esféricos de zircônia com 6mm de diâmetros. A seqüência experimental é a descrita na Tabela 3.4.

Tabela 3.4 – Etapas para manufatura das amostras

Etapas	Procedimento (82% de Sacarose em matrizes de alumina e de hidroxiapatita)
01	Carregar o jarro com a formulação da barbotina apresentada na tabela 3.3, valores em peso, sem a sacarose e girar em moinho por 6 horas. Objetivo: misturar, desaglomerar, dissolver PVB e homogeneizar mistura.
02	Adicionar 29,98 g de sacarose, constituída por 50% tamanho 600 μm - 300 μm e 50% tamanho de 300 μm a 177 μm girar o jarro durante 5 minutos.
03	Verter a barbotina em uma bandeja e desaglomerar manualmente, passar em peneira com malha #25 <i>mesh</i> (710 μm), usando soprador de ar.
04	Secar a temperatura de 80°C durante 2 horas, armazenar em jarro fechado e em temperatura ambiente.

3.2.3 – Conformação dos escafoldes

Foram necessários 46 corpos-de-prova no formato de pastilhas de diâmetro 6mm e espessura 2 mm. Para cultura *in vitro*, análises macro e microestrutural e análise química por EDX ou EDS (Energy Dispersive x-ray detector). Para isto foram conformadas pastilhas em prensagem uniaxial a 10MPa seguidas de prensagem isostática a 100MPa onde as pastilhas foram embaladas a vácuo em filme elastomérico, com patamar na máxima pressão por tempo de 1 min. Prensagem uniaxial foi necessária para obtenção da forma e a prensagem isostática para a compactação máxima, o diâmetro a verde foi de 7mm por 2,2

mm de espessura. Os cristais de sacarose utilizados como elementos geradores de poros são rígidos, porém frágeis e tem baixa resistência mecânica. Quando a prensagem uniaxial excede a tensão de 10MPa ocorre um achatamento da forma dos cristais, a prensagem isostática minimiza a deformação direcionada dos cristais e a rigidez destes auxilia na manutenção da forma do compactado após remoção da pressão de compactação.

Para os ensaios de compressão os escafoldes, foram prensados uniaxialmente na forma de pastilhas no mesmo molde ($\varnothing$ 7mm) com pressão de 10MPa e posterior consolidação por prensagem isostática a 100MPa. Porém, com altura de 15mm. Os escafoldes conformados em formato de pastilha estão ilustrados na Figura 3.3.

Figura 3.3 – Escafoldes conformados em formato de pastilha.

3.2.4 – Programação da curva de sinterização

A programação do forno, baseada na análise termogravimétrica da sacarose, está apresentada na Figura 3.4. Nesta figura é apresentada uma condição favorável para a degradação e remoção da sacarose nas temperaturas em que este fenômeno ocorre com mais intensidade. Os escafoldes de alumina foram sinterizados a 1550°C com patamar de 1 hora nesta temperatura. Já os escafoldes de hidroxiapatita foram sinterizados a 1100 °C com patamar de 1 hora nessa temperatura.

Figura 3.4 – Curva de aquecimento do forno para sinterização dos escafoldes. Fonte: Monaretti (2005)

3.2.5 – Infiltração da barbotina biovidro/hidroxiapatita

Dos escafoldes de alumina 35 (28 pastilhas e sete cilindros) foram infiltrados a vácuo com a barbotina Biovidro/Hidroxiapatita e em seguida foram secos em estufa a 80°C durante 2 horas. Os escafoldes foram queimados a 900°C durante 1 hora no patamar de temperatura de 900°C.

3.3 – Análise *in vitro*

Os primeiros testes realizados *in vitro* foram para analisar a toxicidade dos escafoldes relativamente aos materiais constituintes. Foram analisados escafoldes de alumina, de hidroxiapatita, e de alumina infiltrada. Os escafoldes tiveram as seguintes denominações neste ensaio: alumina Al_2O_3 , A e Al_2O_3 , B, hidroxiapatita (HAP) e alumina infiltrada A e B. Os testes que seguiram foram de avaliação morfológica da interação célula-material. Todos os testes de cultura celular (*in vitro*) foram realizados no Laboratório de

Biotecnologia animal do Centro Regional Universitário de Espírito Santo do Pinhal (UNIPINHAL) em Espírito Santo do Pinhal – SP. O processamento foi feito no Laboratório de Biomecânica Ortopédica na Faculdade de Medicina da UNICAMP – Campinas - SP e as análises morfológicas foram feitas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Faculdade de Engenharia Mecânica da UNICAMP – Campinas - SP. Os testes *in vitro* realizados consistiram em inocular o mesmo número de células nas diferentes amostras e posterior análise morfológica da interação célula-material.

3.3.1 – Cultura celular

Foram utilizadas as células VERO, uma linhagem celular tipo fibroblastos originários do rim do Macaco Verde Africano (*Cercopithecus aethiops*). É uma linhagem celular estabelecida isto é, comercializada normalmente em escala mundial, obtidas originalmente junto ao Instituto Adolfo Lutz, em São Paulo-SP. Essas células foram mantidas em meio Ham F-10 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO - USA) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB - Nutricell, Campinas-SP-Brasil) a 37°C. As células VERO são de uma linhagem recomendada para testes de citotoxicidade e interações com biomateriais (ISO, 1992, KIRKIPATRIC, 1992) e foram utilizadas para o desenvolvimento do ensaio de citotoxicidade indireta e direta deste trabalho.

3.3.1.1 – Ensaio de citotoxicidade indireta

A avaliação da Citotoxicidade Indireta das amostras estudadas foram incubadas em meio Ham F-10 com 10% de Soro fetal bovino à 37°C na proporção de 0,2 g/ml de meio por 48 horas, segundo normas internacionais ASTM F813-83 e ISO 10993-5 (1992) com o objetivo de extração de possíveis substâncias tóxicas solúveis eliminadas pelas amostras. Após a obtenção dos extratos para testes, uma suspensão celular na concentração de 3×10^5 células/ml foi inoculada em placas de 96 poços (*Corning/Costar Corporation, Cambridge,*

MA, USA) e as células foram cultivadas por 24 horas a 37°C. Foi utilizado como controle positivo (+) de toxicidade uma solução de meio Ham F-10 com 10% SFB e 10% de fenol e como controle negativo (-) de toxicidade do extrato de poliestireno. Decorrido o período de cultivo de 24 horas, foram feitas imagens das células vivas em contraste de fase utilizando microscópio invertido Olympus IX-50.

3.3.1.2 – Ensaio de citotoxicidade direta

Este ensaio visou a observação dos possíveis efeitos deletérios sobre as células a partir do contato direto das mesmas com o material estudado. Para avaliação da citotoxicidade direta, células VERO foram cultivadas diretamente sobre as amostras em meio Ham F-10 com 10% de SFB a 37° durante 24h. Após este tempo de incubação, foram feitas imagens das células vivas em microscópio invertido Olympus IX-50. Em seguida, as amostras foram fixadas em metanol e ácido acético (3:1) ou formol 10% e coradas com azul de toluidina com pH 4,0 e xylidine ponceau em pH 2,0. O azul de toluidina é um corante basófilo que em pH 4,0 se liga em radicais aniônicos PO_4^{-3} , SO_4^{-2} e COO^- presentes em DNA, RNA e açúcares ácidos (glicosaminoglicanos). O xylidine ponceau é um corante acidófilo que em pH 2,5 interage com radicais catiônicos NH_3^+ presentes em proteínas (Lison , 1960; Módis , 1991; Mello, 1997; Mello e Vidal, 1980).

3.3.2 – Teste de avaliação morfológica da interação célula-material

Este ensaio consistiu em realizar culturas de fibroblastos sobre os scaffolds em estudo. A metodologia segue com os ensaios de toxicidade, porém quando o material é não tóxico, todos os dados do teste direto passam a ser de testes de interação célula-material. Ao observar as imagens de microscopia de varredura eletrônica (MEV) deve-se analisar, entre outros fatores, a presença de células arredondadas, pois, ao se dividir as células se "soltam" do substrato e passam a ter uma geometria arredondada. Na mitose celular a célula

está em divisão quando duas células arredondadas se posicionam muito próximas ou aderidas. Tecnicamente observa-se que se houver muitas células existe um indicativo de divisão celular; se houver poucas células, indica que não houve divisão celular. Ressalta-se que um mesmo número de células foi inoculado nas diferentes amostras.

3.3.3 – Morfologia

As linhagens celulares na concentração de 2×10^5 células/ml foram inoculadas sobre lamínulas de vidro, os quais formam o controle para morfologia, e para os diferentes substratos estudados. Em todas as amostras, as células Vero foram cultivadas em meio Ham F-10 com 10% de SFB por 24h a 37°C. As amostras foram fixadas em glutaraldeído 2,5% (em tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2), pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% (Sigma), desidratadas em etanol em concentrações crescentes, secos em ponto crítico (Balzers CTD 030), e submetidos à evaporação com ouro em Sputter (Balzers CTD 050). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (JEOL JSM-5800 LV).

3.4 – Análise macro e microestrutural dos escafoides

Para a análise macroestrutural, os escafoides de alumina foram fraturados e embutidos à vácuo em resina epóxi. Suas superfícies foram aplainadas e polidas com lixas de carbetto de silício na sequência de #250, #320, #400, #600 *mesh* em meio aquoso por 5 minutos em cada uma, seguido de polimento sobre tecidos impregnado com pasta de diamante de 6µm, 1µm e ¼ µm.

A macroestrutura, a forma e a distribuição dos poros dos escafoides foram caracterizadas por microscopia de varredura eletrônica (MEV). O microscópio utilizado foi da marca LEO modelo 440 disponibilizado pelo CAQI – IQSC – USP. Nesta análise, as superfícies de fratura dos escafoides examinadas foram previamente metalizadas com uma

fina camada de ouro e então rastreadas com um feixe de elétrons, que é refletido e coletado. A imagem obtida representa as características da superfície de fratura.

As imagens dos escafolds obtidas por MEV foram então analisadas através do software *Image-Pro Plus 4.5* para o estudo macroestrutural, da forma, da dimensão e da distribuição dos poros. Nesta análise consideraram-se somente os poros induzidos, de diâmetros que variaram num intervalo de 10 μ m ou mais.

3.5 – Análise Química por EDX

A análise química da superfície de fratura dos escafolds infiltrados foi realizada utilizando os recursos de EDX/EDS no Microscópio Eletrônico de Varredura. O microscópio utilizado foi LEO modelo 440 disponibilizado pelo CAQI – IQSC – USP. Nele, através do recurso de mapa de EDX, pôde-se verificar a profundidade e distribuição do infiltrado nos escafolds.

3.6 – Análise da Densidade e Porosidade Aparente dos Escafolds

A densidade e porosidade aparente foram determinadas através do teste de densidade por imersão, conhecido como princípio de Arquimedes (ASTM C373-88, 1999), utilizando uma balança da marca Mettler Toledo, modelo AB 204 (e=1mg; d=0,1mg) e aparato de suporte de Becker e bandeja disponibilizado pelo LASP/DEMA – UFSCar.

Vinte amostras de cada escafolds foram pesadas, obtendo-se o peso seco (P_s) de cada uma. Posteriormente, estas foram mantidas imersas em água destilada/deionizada por 24 horas e em seguida mediu-se o peso imerso (P_i) e o peso úmido (P_u). Com estes dados obteve-se a porosidade aparente (P_{ap}), a densidade aparente (D_{ap}), o percentual de massa de alumina ($Massa\%Al_2O_3$) e a porosidade total (P_{total}), através das equações 3.1 a 3.4.

$$Pap = [(Pu - Ps)/(Pu - Pi)] \times 100 \quad (3.1)$$

$$Dap = [Ps/ (Pu - Pi)] \times \mu L \quad (3.2)$$

onde, μL é a densidade da água.

$$\text{Massa\%Al}_2\text{O}_3 = Dap/DAI_2O_3 \quad (3.3)$$

onde, DAI_2O_3 é a densidade da Al_2O_3 .

$$P_{\text{total}} = 100 - \text{Massa\%Al}_2\text{O}_3 \quad (3.4)$$

3.7 – Ensaio de Resistência Mecânica de Compressão

Para os ensaios mecânicos foram confeccionados corpos-de-prova cilíndricos com a mesma estrutura utilizada nos escafoldes com formato de pastilhas. Os corpos-de-prova cilíndricos de cada espécime foram os seguintes: alumina (8 cps), hidroxiapatita (7 cps) e alumina infiltrada (7 cps). Para os ensaios utilizou-se uma Máquina de ensaio Honsfield tensometer – Serial 88746 – disponibilizada pelo DEMa-UFSCar, no laboratório de cerâmica. Durante os ensaios foi aplicada uma taxa de compressão de 2,5 mm/min. As amostras tiveram suas faces de apoio planificadas, com pastilhas paralelas de alumínio fixadas com adesivo epóxi, conforme a. Figura 3.5.

Figura 3.5 – Corpo-de-Prova (escafolds) de hidroxiapatita para compressão.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente estudo, escafoides de alumina infiltrados foram desenvolvidos, fabricados, comparados, analisados e validados. O desenvolvimento e o processo de fabricação dos escafoides visaram produzir poros definidos no material, proporcionar interação celular no escafolde e buscar resistência mecânica à compressão. A análise, comparação e validação buscaram avaliar a interação células - escafoides.

4.1 – Análise Macro e Microestrutural dos Escafoides

Os escafoides deste trabalho foram analisados macro e microestruturalmente utilizando microscopia eletrônica da varredura e medição de densidade e porosidade.

4.1.1 MEV

A imagem apresentada na figura 4.1 ilustra a superfície de um escafolde de alumina infiltrado com resina epoxi e polido, obtida através de microscopia eletrônica da varredura (MEV). A análise com o auxílio do programa *Image-Pro Plus 4.5* objetivou a verificação do tamanho médio e a distribuição dos poros induzidos, maiores que 10 μm , no escafolde.

Figura 4.1 – Imagem (MEV) de um escafolde de alumina não impregnado com diâmetro médio de poros de $192,3 \mu\text{m}$ ($\pm 159,4$).

O escafolde apresentou poros com diâmetro médio de $192,3 \mu\text{m}$ ($\pm 159,4$) e pode-se observar a interconecção dos poros com a parte densa (alumina) bem definida e coerente, conforme ilustra a Figura 4.1.

Verificou-se neste escafolde, tamanho de poros entre 190 e $230 \mu\text{m}$. Para implantes ósseos segundo a literatura, desejam-se tamanhos de poros entre 100 e $400 \mu\text{m}$. Portanto o método utilizado no trabalho proporcionou tamanhos de poros dentro do desejado para aplicações em engenharia de tecidos.

4.1.2 Densidade e porosidade aparente

Utilizando o princípio de Arquimedes, mediu-se porosidade aparente média dos poros abertos dos escafoldes e obteve-se $44,5\%$. Mediu-se também a porosidade total média, ou seja, a porosidade aberta e a porosidade fechada, obtendo-se o valor de $68,8\%$.

A porosidade fechada em torno de 24,3% não é interessante sob o ponto de vista mecânico, e por ser provavelmente constituída de poros pequenos torna-se responsável pela perda de propriedades mecânicas. O método de manufatura adotado apresenta esta desvantagem.

Nos escafoides impregnados mediu-se um acréscimo de 10% do peso, acréscimo este relativo ao biovidro e a hidroxiapatita incorporada aos escafoides.

4.2 – Testes de toxicidade

Neste trabalho foram realizados testes de toxicidade direta e indireta com os escafoides fabricados.

4.2.1 Citotoxicidade indireta

O teste da toxicidade indireta avalia se o material elimina algum produto solúvel no meio de cultura. Esses possíveis produtos entrariam em contato com as células e, desta maneira, se avalia a toxicidade dos compostos *in vitro*. Essa situação seria equivalente a eliminação de substâncias tóxicas nos fluidos biológicos.

Foi observado que as células Vero utilizadas nos testes mostraram um padrão morfológico muito semelhante ao controle negativo de toxicidade, ou seja, não tóxico, nas amostras do impregnado A, impregnado B, Al_2O_3 A e Al_2O_3 B. Por outro lado, as amostras HAP apresentaram um padrão morfológico muito semelhante ao controle positivo, ou seja, tóxico, sendo considerado, portanto, tóxico ao contato indireto. Os resultados destes testes são apresentados na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Citotoxicidade indireta. Em todas as amostras (exceto a HAP) nota-se a presença de células o que evidencia a ausência de sinais de toxicidade indireta. Barra de aumento: 250µm para todas as figuras.

Observa-se que a amostra HAP apresenta um padrão morfológico muito semelhante ao controle positivo de toxicidade (fenol). As demais amostras não mostraram sinais de toxicidade indireta.

4.2.2 – Citotoxicidade direta

Os testes de toxicidade direta avaliam o possível efeito tóxico de um composto mediado pelo contato direto da amostra com as células em cultura.

Os resultados obtidos nesses testes foram muito semelhantes aos descritos anteriormente para a toxicidade indireta. Observa-se que as células Vero utilizadas mostraram um padrão morfológico semelhante ao controle negativo de toxicidade (não tóxico) nas amostras Al_2O_3 A e Al_2O_3 B, impregnado A, impregnado B. Entretanto, a amostra HAP apresentou um padrão morfológico semelhante ao controle positivo (tóxico), sendo considerado, portanto tóxico ao contato direto. Esses resultados são apresentados na Figura 4.5. A hidroxiapatita utilizada para manufaturar estas matrizes foi a Fluka-Sigma-Aldrich-21223, que não atende a norma ASTM 1185-03, e então, foi esperada uma resposta positiva de toxicidade. Este material foi adotado e mantido para os ensaios devido ao elevado consumo deste material nesta etapa do processo de fabricação.

As Figuras 4.2 e 4.3 ilustram, os resultados dos testes e, nessa Figura pode-se observar a presença de células em todas as imagens exceto nas imagens de HAP.

Figura 4.3 – Citotoxicidade direta. Citotoxicidade indireta. Em todas as amostras (exceto a HAP) nota-se a presença de células o que evidencia a ausência de sinais de toxicidade indireta. Barra de aumento: 250µm para todas as figuras.

Observa-se que a amostra HAP apresenta um padrão morfológico muito semelhante ao controle positivo de toxicidade (fenol). As demais amostras não mostraram sinais de toxicidade indireta. Em todas as imagens a sombra negra corresponde às bordas do escafolde de cerâmica sob avaliação.

A alumina CT-3000, o biovidro Biogran, e a hidroxiapatita Sigma-Aldrich – 289396 utilizados nesta pesquisa não apresentaram toxicidade nos testes realizados. A hidroxiapatita Fluka-Sigma-Aldrich-21223 apresentou padrão de toxicidade.

4.3 – Ensaio de interação escafolde/célula

Foram efetuados, neste trabalho, ensaios de interação escafolde/célula. As Figuras 4.4 e 4.5 apresentam as imagens de células controles da interação biomaterial/célula que foram inoculadas sobre uma lâmina de vidro.

Figura 4.4 – Imagem das células controles. Aumento 1000X.

Observa-se na Figura 4.4 células espalhadas sob as lâminas de vidro. No centro células em processo de retração citoplasmática, provavelmente iniciando seu processo de divisão celular, se destacam.

Figura 4.5 – Imagem das células controles. Aumento de 1000X.

Na Figura 4.5, em outro campo são observadas também células bem espalhadas sobre a superfície.

4.3.1 – Escafolde de alumina

Foram também efetuados ensaios de interação escafolde de alumina/célula. Os testes foram realizados em escafolde de alumina amostra A (Al_2O_3 A) e B (Al_2O_3 B).

a) escafolde de alumina amostra A (Al_2O_3 A)

As figuras 4.6 a 4.11, apresentam a interação célula-material sobre superfície de escafolde de alumina não infiltrado.

Na figura 4.6, observa-se na visão panorâmica as células cultivadas sobre o material estudado.

■ Células espalhadas

Figura 4.6 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 400X.

A Figura 4.7 ilustra com maior aumento, campo onde se observam células bem espalhadas sobre a superfície irregular do escafolde.

■ Células espalhadas ■ Células Arredondadas

Figura 4.7 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.

A Figura 4.8 mostra células bem espalhadas crescendo na borda externa e interna dos poros do escafolde de alumina não infiltrado. Em algumas regiões se observam agregados celulares bem espalhados sobre a superfície.

■ Células em espalhamento ■ Células espalhadas

Figura 4.8 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.

A Figura 4.9 ilustra a imagem de superfície da matriz porosa de alumina não infiltrada. Onde se observam células crescendo nas bordas interna e externa dos poros. As células estão bem espalhadas, sendo conectadas por prolongamentos celulares.

Figura 4.9 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.

A Figura 4.10 ilustra células bem espalhadas na superfície do escafolde de alumina não infiltrado. As células estão conectadas por finos prolongamentos, o que indica a possível produção de material fibroso por parte das células.

Figura 4.10 Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.

A figura 4.11 ilustra células crescendo sobre as margens dos poros do escafolde de alumina não infiltrado. Nesta figura as células estão também conectadas por finos prolongamentos.

■ Células espalhadas ■ Finos prolongamentos

Figura 4.11 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.

Relativamente aos resultados dos testes de interação escafolde/células, pode ser observado que nos escafoldes das Figura 4.6 à 4.11 não apenas as células ficaram bem espalhadas como também parecem produzir elementos fibrosos. Estes resultados certamente indicariam uma boa integração com as fibras do tecido conjuntivo na região de contato superficial um possível implante.

Os escafoldes de alumina não impregnados apresentaram nestes testes células arredondadas e com finos prolongamentos como ilustra a Figura 4.11, onde observou-se um aspecto fibroso formado pelas células sobre o material. Esses resultados indicam uma boa interação escafolde/célula.

b) Escafolde de alumina amostra A (Al_2O_3 B)

As figuras 4.12 a 4.17 ilustram a interação célula-material sobre superfície de um outro escafolde de alumina não infiltrado, também ensaiado para verificar a interação escafolde/células.

Um dos resultados é ilustrado na Figura 4.12 onde observam-se as células espalhadas e com formato irregular sobre o material.

Figura 4.12 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 400X.

Também na Figura 4.13, observam-se células bem espalhadas recobrindo a superfície do material.

■ Células espalhadas

Figura 4.13 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 400X.

A Figura 4.14 ilustra com um maior aumento de campo anterior, as células que parecem recobrir esta região do escafolde.

■ Células espalhadas

Figura 4.14 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.

A Figura 4.15 ilustra com uma visão maior, detalhes do espalhamento celular na figura anterior.

Figura 4.15 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.

A Figura 4.16 mostra outro aspecto das células espalhadas sobre a superfície do material.

■ Células espalhadas

Figura 4.16 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 400X.

Na figura 4.17 pode-se observar no centro da imagem uma células espalhadas sobre a borda dos poros do escafolde.

Figura 4.17 – Imagem de superfície de escafolde de alumina não infiltrado. Aumento de 1000X.

Relativamente aos resultados dos testes de interação escafolde/célula ilustrados nas Figura 4.12 à 4.17 observa-se que houve dificuldade em definir as células sobre a superfície do escafolde. Em função da quantidade em que elas se apresentaram e o padrão de crescimento desenvolvido, observou-se que as células que foram encontradas não apresentavam prolongamentos citoplasmáticos.

4.3.2 – Escafolde de hidroxiapatita

Foram efetuados ensaios de interação escafolde de hidroxiapatita/célula. Os resultados desses ensaios estão ilustrados nas Figuras 4.18 a 4.23, que apresentam a interação célula/material sobre superfície do escafolde de hidroxiapatita não infiltrado. A Figura 4.18 mostra os primeiros resultados desses ensaios, onde se observa algumas células espalhadas sobre a superfície.

Figura 4.18 – Imagem de superfície de escafolde de hidroxiapatita. Aumento de 400X.

Já, a Figura 4.19, mostra esses mesmos resultados em uma vista ampliada onde se observa uma célula alongada crescendo sobre o material.

Figura 4.19 – Imagem de superfície de escafolde de hidroxiapatita. Aumento de 1000X.

A Figura 4.20 ilustra esses resultados com um maior aumento, onde pode-se observar a célula alongada crescendo sobre o material.

Figura 4.20 – Imagem de superfície de escafolde de hidroxiapatita. Aumento de 2000X.

A Figura 4.21 ilustra células bem espalhadas sobre o material. Onde se destaca um agregado de células recobrindo a superfície.

■ Células espalhadas ■ Células Arredondadas

Figura 4.21 – Imagem de superfície de escafolde de hidroxiapatita. Aumento de 1000X.

Nos resultados mostrados na Figura 4.22 observa-se o crescimento de células bem espalhadas sobre o material. Tendo ao centro uma célula arredondada. Observe ainda na figura, células interligadas por prolongamentos citoplasmáticos

■ Células espalhadas ■ Células Arredondadas ■ Finos prolongamnetos

Figura 4.22 – Imagem de superfície de escafolde de hidroxiapatita. Aumento de 2000X.

A Figura 4.23 ilustra outra imagem mostrando as células crescendo sobre o material e interligadas por prolongamentos finos, sugerindo a produção de material fibroso.

Figura 4.23 – Imagem de superfície de escafolds de hidroxiapatita. Aumento de 1000X.

Os resultados ilustrados pelas Figuras 4.18 à 4.23 mostraram como as células interagem com as superfícies dos escafolds estudados. Mostra que como a alumina (Al_2O_3) das Figuras 4.6 a 4.11, a hidroxiapatita parece ser muito promissora embora a quantidade de células observadas tenha sido bem inferior ao encontrado nos escafolds de alumina, deve-se ressaltar que uma das amostras havia apresentado toxicidade indireta. Todavia isso não foi observado nestas imagens. Provavelmente o teste de toxicidade conduza a interpretação de que o material tinha inicialmente algum contaminante ou resquício de solvente ou outra droga que pode ter interferido no resultado do teste de toxicidade.

Os ensaios de toxicidade, todavia, indicaram que os escafolds de hidroxiapatita apresentam um padrão de toxicidade, porém, nos testes de interação tecidual observaram-se células arredondadas e com prolongamentos citoplasmático recobrimdo o material. Observa-se também que a hidroxiapatita utilizada neste trabalho, para manufaturar a matriz dos escafolds com esse material não consta na norma ASTM F1185 – 03 e contém certo grau de impureza, mas mesmo assim elas apresentaram uma boa interação celular, conforme ilustrado nas Figuras 4.18 a 4.23.

4.3.3 – Escafolde de alumina infiltrada com biovidro/hidroxiapatita

Foram feitos testes de interação entre escafoldes de alumina infiltrados com biovidro/hidroxiapatita e o crescimento celular. Os resultados foram conduzidos com 2 amostras de impregnados, A e B.

a) escafolde de alumina infiltrado - amostra A (Impregnado A)

Os resultados dos ensaios com a amostra A são mostrados nas Figuras 4.24 a 4.29, que apresentam a interação célula-material sobre superfície de escafolde de alumina infiltrado.

A imagem da Figura 4.24 ilustra células bem espalhada que crescem bem próximas umas das outras sobre a superfície do material.

■ Células espalhadas

Figura 4.24 – Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 400X.

A Figura 4.25 mostra uma ampliação da imagem anterior, nota-se que as células recobrem a maior parte do material.

Figura 4.25 – Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 1000X.

A Figura 4.26 destaca um agregado de células sobre a borda de um poro do escafolde onde se pode observar material filamentososo na região direita da célula seguindo para o interior do poro.

Figura 4.26 - Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 400X.

A imagem da Figura 4.27 destaca um agregado celular sobre a superfície do escafolde. Nessa figura podem-se observar células já espalhadas ao lado de células arredondadas, sugerindo divisão mitótica sobre o material.

■ Células espalhadas ■ Células Arredondadas

Figura 4.27 - Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 400X.

A Figura 4.28 apresenta o mesmo padrão observado nas imagens anteriores, onde se verifica células bem espalhadas sobre o substrato e próximas de tipos celulares ainda arredondados.

Figura 4.28 – Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 100X.

A figura 4.29 apresenta células em espalhamento crescendo na borda do poro do material.

Figura 4.29 – Imagem de superficial de escafolde de alumina infiltrado. Aumento de 400X.

Os resultados dos ensaios de interação celular – escafolde, com o escafolde de alumina infiltrada com biovidro/hidroxiapatita são promissores. A análise desses resultados está ilustrada nas Figuras 4.24 à 4.29, mostra que novamente, observou-se um material onde as células tiveram um padrão de interação bem significativo com prolongamentos fibrosos para o interior do poro e divisão mitótica. Sugere uma boa interação *in vivo*.

a) Escafolde de alumina infiltrado - amostra B (Impregnado B)

Os resultados dos ensaios com a amostra B são mostrados nas Figuras 4.30 a 4.36 que apresentam a interação célula-material sobre superfície do escafolde de alumina infiltrado.

Na imagem da Figura 4.30 podem ser vista células arredondadas e agregados de células espalhadas sobre a superfície celular. Não se observa sinais de células em degeneração e/ou fragmentos celulares sobre o material.

■ Células Arredondadas

Figura 4.30. Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 400X.

Em uma vista com maior aumento conforme ilustra a Figura 4.31, notam-se agregados de células espalhadas sobre a superfície do material.

■ Células Arredondadas

Figura 4.31. Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 1000X.

A Figura 4.32 ilustra uma imagem de interação celular com o material do escafolde onde se podem observar células arredondadas e em início de processo de espalhamento sobre a superfície do material. Observa-se claramente a fixação inicial preferencialmente nas fissuras, o que ressalta a necessidade de porosidade intermediária da ordem de 1 a 5μm conforme Lê Huec et al (1995) e Binner e Sambrook (2004).

Figura 4.32 - Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 1000X.

A Figura 4.33 mostra uma imagem superficial do escafolde infiltrado. Células em espalhamento e também células já espalhadas sobre a superfície do material são claramente visíveis.

Figura 4.33 - Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 1000X.

Na imagem da Figura 4.34 observam-se células espalhadas sobre a superfície. Observa-se também algum material filamentosso aparentemente conectando algumas células sobre o material estudado.

Figura 4.34 - Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 1000X.

Na Figura 4.35 podem-se notar células bem espalhadas sobre o material ao lado de células em espalhamento. Observa-se ainda um material filamentosso que se assemelha a um aglomerado de células alongadas juntamente com células arredondadas. Ressalta-se nessa imagem, o vigor do aglomerado de células alongadas.

■ Células Arredondadas
 ■ Células espalhadas
 ■ Aglomerado de células alongadas
 Figura 4.35 - Imagem de superfície de escafolde de alumina infiltrado. Aumento final de 1000X.

Os resultados dos ensaios de interação célula/escafolde, realizados com escafolde de alumina infiltrados com biovidro/hidroxiapatita na amostra B identificaram nas imagens das Figuras 4.30 à 4.35 a presença de células que estão bem espalhadas, a imagem 4.35 evidencia a presença de células mais vigorosas, isto indica uma boa interação com a superfície do material. Este material além de não apresentar toxicidade direta, aparentemente demonstra um bom prognóstico para a interação com o tecido ósseo.

Nestes testes *in vitro* dos escafolde de alumina impregnados com biovidro/hidroxiapatita observaram-se células arredondadas, espalhadas e em espalhamento, aglomerado de células alongadas (Figura 4.35), filamentos conectando uma célula à outra e agregado celular sobre toda a superfície do material estudado. As células já espalhadas ao lado de células arredondadas sugerem divisão mitótica sobre o material. Esse material foi o único a evidenciar divisão mitótica e uma superfície quase toda recoberta por células em espalhamento além de apresentar aglomerados de células alongadas e arredondadas bem vigorosas.

4.4 Análise micro e macro estrutural por MEV

As Figuras 4.36 e 4.37 ilustram imagens obtidas por Microscopia de Varredura Eletrônica, a Figura 4.36 apresenta superfície de fratura de uma peça de hidroxiapatita porosa com 82% de porosidade induzida. A análise desta superfície permitiu identificar a presença da porosidade induzida e o formato dos poros do escafolde mostrando que os poros possuem formato oblongo e/ou arredondados.

Figura 4.36 – Microscopia de varredura eletrônica (MEV) de superfície de fratura de uma peça de hidroxiapatita porosa (82% de porosidade induzida). Magnitudes de 5000 vezes. Observam-se poros induzidos e formatos arredondados e poros de formato oblongo.

A Figura 4.37 ilustra a superfície de fraturado escafolde de alumina infiltrado, pode-se observar a distribuição dos poros.

Figura 4.37 – Superfície de fratura do escafolde de alumina infiltrado. Imagem com magnitude de 65 vezes.

4.5 – Análise química por EDX

A análise realizada por EDX foi necessária para mostrar a eficiência do processo de infiltração e também para confirmar os elementos químicos contidos no biovidro utilizado nesta pesquisa.

A Figura 4.38 mostra o espectro de EDX de uma superfície de fratura do corpo de prova de alumina infiltrada com biovidro/hidroxiapatita. Ressalta-se, ao observar a Figura 4.38, a presença de Oxigênio (O) (50,65%), Alumínio (Al) (34,20%), Fósforo (P) (5,18%) e Cálcio (Ca) (9,97 %), valores de percentual de elementos químicos presentes. Esta análise foi realizada próxima a superfície de impregnação e caracteriza-se qualitativamente apenas por mostrar que houve penetração do biovidro e hidroxiapatita, pois, os valores quantitativos não são conclusivos.

Figura 4.38 – EDX da alumina (Al_2O_3) infiltrada com hidroxiapatita-biovidro.

A Figura 4.39 mostra o mapeamento de EDX da amostra analisada. Nesta Figura verifica-se a presença de elementos exclusivos do biovidro e hidroxiapatita como o fósforo e o cálcio, numa profundidade de penetração de aproximadamente 100 μm .

Figura 4.39 – O mapeamento de EDX nas amostras de alumina infiltrada por biovidro/hidroxiapatita.

Na figura 4.39 a profundidade de 100 μm de infiltração revela uma limitação do processo empregado. Várias podem ser as origens dessa limitação, a mais provável talvez

seja pela retenção seletiva de partícula no percurso de infiltração. Partículas de dimensões nanométricas sugerem resolver esta possível retenção. As pastilhas (escafoides) de alumina após serem infiltradas por hidroxiapatita e biovidro foram levadas até à temperatura de 900 °C, embora a temperatura de fusão do biovidro seja aproximadamente de 1350 °C foi aplicada uma temperatura menor para minimizar a migração dos átomos de alumínio (Al) do suporte de alumina (Al_2O_3) para o biovidro, fato esse indesejado, pois a presença de alumínio no biovidro acarretaria no aumento da durabilidade química desse. O termo durabilidade química é empregado para especificar que o biovidro perde a sua capacidade de osteointegração.

O pó de biovidro (45S5 – *Bioglass* - Biogran ®) foi analisado por EDX para confirmar a presença dos elementos típico do biovidro 45S5, cujo espectro está apresentado na Figura 4.40. A fórmula do biovidro utilizado é $\text{SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5\text{-CaO-Na}_2\text{O}$. O vidro bioativo 45S5 – *Bioglass*® deve apresentar uma proporção de 45% de SiO_2 e uma razão Ca/P equivalente a 5.

Figura 4.40 – EDX do vidro bioativo, podemos observar a presença dos seguintes elementos em percentual de elemento: Oxigênio (42,58%), Sódio (12,02%), Silício (21,02%), Fósforo (2,77%) e Cálcio (20,84).

4.6 Ensaios mecânicos

Os corpos-de-prova (escafoides) foram ensaiados quanto à resistência a compressão e apresentaram as seguintes tensões de ruptura conforme segue.

Alumina: Média de 52,27 MPa ($\pm 19,70$).

Alumina impregnada: Média de 43,27 MPa ($\pm 16,94$).

Hidroxiapatita: Média de 0,28 MPa ($\pm 0,15$).

O processo de infiltração diminuiu drasticamente a resistência mecânica dos corpos - de - prova somente em alumina de 52,27MPa para 43,27MPa, entretanto apresentaram valores muito superiores aos de hidroxiapatita (0,28MPa). A queda de resistência dos escafoides de alumina deve-se provavelmente a concentração de tensão nas microtrincas devido a penetração do biovidro e da hidroxiapatita. Embora os valores apresentassem queda brusca na resistência mecânica conseguiu-se, neste trabalho, valores maiores que os da literatura, se comparados com a pesquisa realizada por Liu e Miao (2005) com peças porosas de alumina que resultou nos seguintes valores 5,5 – 7,5 MPa. O tecido ósseo, segundo a literatura apresenta valores de resistência à compressão como segue: Reilly e Burstein (1975) encontraram 105 MPa em teste de compressão longitudinal e 131 MPa em compressão transversal; Backaitis (1996) encontrou 170 MPa, Ravagliogli e Krajewski (1992) observaram que o fêmur humano resiste 125 a 166 MPa, Yang et al (2001) observaram para o osso compacto 130 a 180 MPa. Acredita-se que o método de manufatura pode ser ajustado para conseguir valores superiores de resistência à compressão, por exemplo, com a diminuição da porosidade total ou pelo uso da prensagem isostática a quente.

A figura 4.41 ilustra o ensaio de compressão de um escafolde.

Figura 4.41-Corpo-de-prova (escafolde) de hidroxiapatita após ruptura.

Estatística de Weibull

É a principal técnica para tratamento de valores obtidos em ensaios cerâmicos. Baseada na estatística de valores extremos e faz uma analogia com o elo mais fraco de uma corrente, supondo que o material seja apenas tão resistente quanto seu elemento mais fraco. Tipicamente materiais cerâmicos policristalinos ocupam valores de $3 < m < 15$, onde m é o módulo de Weibull. Quanto maior o valor de m , maior a confiabilidade. Quanto menor o valor de m , maior será o espalhamento de valores (NOGUEIRA, 1992; ZANOTTO e MIGLIORE, 1991).

As figuras 4.42, 4.43 e 4.44 ilustram os resultados estatísticos dos ensaios de compressão dos escafoldes de alumina não impregnados, escafoldes de hidroxiapatita e escafoldes de alumina impregnados, respectivamente.

Figura 4.42 – Gráfico Módulo de Weibull dos escafolds de alumina não impregnados

Figura 4.43 – Gráfico referente ao Módulo de Weibull dos escafolds de hidroxiapatita.

Corpos-de-prova de Alumina Infiltrada com Biovidro-HAp

Figura 4.44 – Gráfico referente ao Módulo de Weibull dos escafoldes de alumina impregnados

Analisando os gráficos observa-se que os corpos produzidos em alumina pura apresentaram maior valor para o módulo de Weibull, $m = 2,2$, o que demonstra que são corpos mais confiáveis quanto à solicitação mecânica que os demais, além de serem mais resistentes. Os corpos de hidroxiapatita apresentaram valor muito inferior para o módulo de Weibull $m = 1,11$ demonstrando que o espalhamento de valores de resistência mecânica é maior. Os corpos de alumina infiltrada com biovidro e hidroxiapatita apresentaram valor inferior aos da alumina pura $m = 2,10$, porém muito superiores aos de hidroxiapatita. Conclui-se que o processo de infiltração diminuiu a resistência mecânica dos corpos de alumina pura e também diminuiu sua confiabilidade, porém em ambas as considerações foram muito melhores que os fabricados em hidroxiapatita.

Segundo Pilliar et al (2001) e Capk et al (1990), materiais poliméricos e fosfatos de cálcio isoladamente podem não satisfazer as necessidades de implantes em regiões ósseas que exigem carregamento mecânico. Assim a opção por infiltração sinaliza favoravelmente

para a possibilidade de sucesso na tentativa de produzir um escafolde de alumina que atenda a algumas exigências de solicitações mecânicas.

4.7 – Viabilidade Econômica

Durante o desenvolvimento do trabalho foi consultado o preço para um bloco de escafolde em hidroxiapatita 40x30x15mm da empresa Berkeley Advanced Biomaterials, Inc. que foi orçado em aproximadamente R\$ 160,00 o cm^3 . Segundo o presente trabalho computou-se o custo em matéria prima para escafoldes de 1cm^3 e obteve-se: R\$ 0,053 para escafolde de alumina; R\$ 3,63 para escafolde de hidroxiapatita (homologada) e R\$1,39 para escafolde de alumina infiltrada com biovidro/hidroxiapatita. Estes números embora não considere o custo de manufatura indica o potencial para viabilidade econômica, não somente para produzir os escafoldes em hidroxiapatita como também para fazê-los principalmente em alumina infiltrada com biovidro/hidroxiapatita.

5 – CONCLUSÕES

Foram manufaturados escafoides de alumina infiltrados com biovidro e hidroxiapatita. Os escafoides foram ensaiados quanto a resistência à compressão e apresentaram valores de 42,27 MPa, surpreendentemente superiores aos de hidroxiapatita (0,28 MPa). Biologicamente se mostraram atóxicos e com forte interação com as células (vastas e vigorosas). O custo dos escafoides tornou-se muito inferior, pois reduziu os materiais bioativos (biovidro e hidroxiapatita) a no máximo 15% do volume da peça. Nos materiais adquiridos comercialmente neste trabalho a relação do custo entre biovidro/alumina é de aproximadamente 10000 vezes menor e a relação entre hidroxiapatita/alumina é de aproximadamente 1000 vezes menor por unidade de volume. Estes resultados validam a hipótese proposta para a obtenção de um escafolde para implante bioativo, resistente e economicamente viável.

Os resultados deste trabalho mostram que o processo de manufatura produziu peças com porosidade total em torno de 68,8%, tamanho de poros de até 192,5 (+/- 159,4) e formatos arredondados, que atenderam a expectativa dimensional e morfológica para os escafoides com poros de tamanho 50 a 100µm (arredondados e alongados). Entretanto, com porosidade fechada de 23,4% obteve-se um resultado com poros muito pequenos da ordem de 1 a 10µm. A técnica de prensagem isostática mostrou-se incapaz de compactar a fração alumina eficazmente, devido a alta concentração e tamanho relativo elevado da sacarose utilizada como agente formador de poros nos escafoides.

A resistência à compressão obtida nas peças de alumina infiltrada foi notadamente superior às de hidroxiapatita, o que sugere seu uso para implantes em locais de relativos esforços mecânicos.

O processo de infiltrar hidroxiapatita e biovidro nos suportes de alumina porosa através de vácuo promove a penetração de aproximadamente 100 µm na superfície do escafolde. O fato de não ter penetrado no interior do suporte pode ter várias causas dentre elas a retenção seletiva do material sólido durante o percurso exterior → interior.

Os testes *in vitro* de citotoxicidade indicaram que os biomateriais não apresentam toxicidade, exceto a hidroxiapatita Fluka-Sigma-Aldrich – 21223, que sabidamente não atendia as especificações de implantes. Houve interação célula – material em todos os biomateriais estudados, porém as células recobriram as superfícies dos escafoldes de alumina infiltrados quase que por completo e, ainda a presença de células arredondadas e muito próximas ou aderidas, foi observada nessas mesmas imagens, o que indica a presença de mitose. Nas outras imagens, as de alumina não infiltrada e de hidroxiapatita, observou-se menor quantidade de células sobre o substrato e elas apresentaram-se separadas entre si na maioria das imagens, indicando que não houve divisão celular. No início dos testes o mesmo número de células foi inoculado nas diferentes amostras e embora não tenha havido divisão nas demais amostras, deve-se considerar o tempo relativo, o que não quer dizer que não houve divisão nas demais, apenas não foi visto no momento em que as células foram fixadas.

Os resultados obtidos corroboram para que sejam efetuados estudos avançados de obtenção de escafoldes por prototipagem rápida ou outra técnica de manufatura direta para posterior infiltração.

Os resultados também são preliminares para a fabricação de estruturas de gradientes funcionais em andamento em trabalhos no laboratório. Nele, estão sendo viabilizadas peças de cerâmicas avançadas de núcleo denso, tenaz e com superfície externa porosa, delgada e bioativa. Essa linha de pesquisa segue com outros trabalhos

realizados (MONARETTI, 2005; MONARETTI et al, 2005 (a); MONARETTI et al, 2005 (b) e IKEGAMI, 2005).

6 – PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Considera-se que o presente trabalho foi o início de uma série de estudos sobre escafoldes de cerâmicas e que os resultados aqui obtidos são promissores. Assim sendo, vimos sugerir a continuidade deste trabalho da forma como segue.

Revisar a metodologia de infiltrar HAp e biovidro na alumina porosa, garantindo a penetração em todo o volume do corpo com o infiltrado; (moer em moinho vibratório menores tamanhos de partículas e alterar para meio líquido menos volátil sob vácuo).

Estudar a profundidade de crescimento ósseo efetivo em uma peça, fazendo assim porosidade na dimensão ideal, evitando vazios potenciais para desenvolvimento indesejável de bactérias e aumentando a resistência mecânica da peça.

Estudar a máxima temperatura de queima do infiltrado sem que aumente significativamente a durabilidade química do biovidro, aumentando assim a fixação do biovidro no escafolde de alumina.

Verificar qual a influência do material a ser infiltrado isoladamente na resistência mecânica dos escafoldes, seja o biovidro ou a hidroxiapatita.

Estudar a viabilidade da infiltração em peças de alumina prototipadas. Esta técnica permitiria a fabricação direta de peças para implante, sem modelagem e usinagens posteriores.

Verificar a reprodutibilidade da metodologia de infiltração para escafolds de zircônia e alumina-zircônia.

Outros estudos *in vitro* para obter dados compatíveis com a formação de uma matriz orgânica e deposição de minerais sobre ela (formação de tecido ósseo). Esse seria um teste compatível com o teste de osteoindução e deveria utilizar células como osteoblastos, por exemplo.

Análises *in vivo*. O teste de osteoindução é um tipo de ensaio de interação célula-material, porém, só pode ser feito *in vivo* (em animais). (a) Propõe-se verificar a viabilidade deste escafolds osteoindutor em animais. (b) Verificar a viabilidade deste escafolds osteoindutor em animais com osteoporose induzida. (c) Verificar a possibilidade de intensificar e/ou prover a integração do implante osseoindutor em animais com osteoporose induzida através de exercício físico resistido (osteoporose é uma patologia que se caracteriza pela diminuição da massa óssea e acelerada ação dos osteoclastos ou incapacidade de deposição de tecido por conta dos osteoblastos, um dos tratamentos, em ascensão, desta patologia é o exercício físico resistido). (d) Analisar a resistência mecânica *in vivo* destes escafolds.

7 – REFERÊNCIAS §

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). (1999). C373-88: Standard Test Method for Water Absorption, Bulk Density, Apparent Porosity, and Apparent Specific Gravity of Fired Whiteware Products.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). (1996). F813 – 83. Standard practice for direct contact cell culture evaluation of materials for medical devices.

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). (2003). F 1185 – 03. Standard Specification of Hydroxylapatite for Surgical Implants.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) (1998). NBR ISO – 6474: Implantes para cirurgia: materiais cerâmicos à base de alumina de alta pureza. Rio de Janeiro.

AOKI, H. Hydroxyapatite of Great Promise for Biomaterials. **Transactions of the JWRI**, vol.17, n.1, p.107-112. 1988.

ARDEN R.L, BURGIO D.L. Bone autografting of the craniofacial skeleton: clinical and biological considerations. **Am J Otolaryngol**, vol. 13, p. 328-41. 1992.

BACKAITIS S. H. (Editor). **Biomechanics of impact injury and injury tolerances of the extremities**. Ed. SAE International. Publicado pela Society of automotive engineering, 1996. p-254.

BAKSH et al. Three-dimensional matrices of calcium polyphosphates support bone growth in vitro and *in vivo*. **J. materials science: materials in medicine**, vol. 9, p. 743 – 748, 1998.

§ Associação Brasileira de Normas Técnica (ABNT) – NBR 6023

BINNER. J.; SAMBROOK R. Ceramic Foams – Processing and application as filters, interpenetrating composites and biomedical materials. Disponível em: <azom.com/details.asp?ArticleID=1869>. Acesso em: 18 maio 2004.

BORUSZEWSKI et al. *Stress distributions in mandibles around osseo-integrated implants, according to the occlusion pattern, using MSC/NASTRAN three-dimensional modeling*. Disponível em: <www.mscsoftware.com/support/library/conf/wuc96/04b_boru.pdf>. Acesso em: 06 ago. 2004.

BOSE, S. et al. Processing and characterization of porous alumina scaffolds. **Journal of materials science: materials in medicine**, vol. 13, p. 23-28. 2002.

BURELLI et al. Mechanical properties of flo-deflocculated and milled powders in the $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ZrO}_2$ (CeO_2) system. **J. of Materials Science**, vol.33, p.441-444. 1988.

BURSTEIN, F.D. et al. The use of porous granular hydroxyapatite in secondary orbitocranial reconstruction. **Plast. Reconstr. Surg.**, vol.100, n.4, p.869-74. 1997.

BURCHARDT H, ENNEKING WF. Transplantation of bone. **Surg Clin North Am.**, vol. 58, p. 403-27. 1978.

CAPK G. et al. Chemistry of calcium phosphate bioceramics. In: YAMAMURO T. HENCH L.L., WILSON J. editors. **Handbook on bioactive ceramics**, Boca raton, FL: CRC Press, vol. II, p. 31. 1990.

CARTER, D. R.; SPENGLER, D. M. Mechanical properties and composition of cortical bone. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 135, p. 192-217. sept, 1978.

CAPOZZO et al. **Biocomotion: a century of research using moving pictures**, *Promograph*, Roma, 1992.

CAO, W.; HENCH, L. L. Bioactive Materials. **Ceramics International**, vol. 22, n.6, p.493-507. 1996.

CHEN Q.Z., THOMPSON I.D e BOCCACCINI A.R. 45S5 Bioglass®-derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v.27, p. 2414-25, Jan. 2006.

CORNELL, C. N.; LANE, J. M. Current Understanding of Osteoconduction in Bone Regeneration. **Clinical Orthopaedics & Related Research: Fracture Healing Enhancement**, s.355, p.267-273. 1998.

CHEN et al. Bone Graft in the Shape of Human Mandibular Condyle Reconstruction via Seeding Marrow-Derived Osteoblasts Into Porous Coral in a Nude Mice Model. **J Oral Maxillofac Surg**, vol. 60, p. 1155-1159. 2002.

CHEN Q. Z., THOMPSON I. D., BOCCACCINI A.R. 45S5 Bioglass® -derived glass-ceramic scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, vol. 27, p. 2414-25. 2006.

COWIN S.C. Fabric dependence of an anisotropic strength criterion. *Mech. Mater.* vol. 5, p-251-60. 1996.

DAMIEN, C.J.; PARSONS, J.R. Bone graft and bone graft substitutes: a review of current technology and applications. **J. Appl. Biomater.**, vol.2, n.3, p.187-208, p.45-54. 1991.

DAVISON J. C. et al. "X-ray diffraction shows a 0.5nm spacing in hydrogels of poly(2-hydroxyethyl methacrylate) (pHEMA)", **J. Mat. Sci. Lett**, 2001, vol. 20, n. 23, p- 2135-2136.

DEE K. C. et al. Conditions with promote mineralization at the bone-implante interface: a model in vitro study. **Biomaterials.**, vol. 17, n.2, p. 209-15. Jan. 1996.

DEISINGER, et al. *Development of hydroxyapatite ceramics with tailored pore structure*. Disponível em: <www.fbi-biomaterialien.de/pdf/tagungsbeitrag_Deisiger_Bioceramics_16.pdf>. Acesso em: 07 julho 2004.

DE GROOT, K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts. **Biomaterials**, v.1, n.1, p.47-50, 1980.

DOBLARÉ M., GARCÍA J.M. E GÓMEZ M.J. Modelling bone tissue fracture and healing: a review. **Engineering Fracture Mechanics**. vol. 71, p – 1809 – 40. 2004.

ERIKSEN et al. Bone remodeling and bone structure. In: Mundy, G.R.; MARTIN, T.J. **Physiology and pharmacology of bone**. Berlim: Springer-Verlang. Cap. 2, p. 67- 109. 1993.

EITEL F, SCHENK RK, SCHWEIBERER L. Corticale Revitalisierung nach Marknagelung an der Hundetibia. **Unfallheilk**, vol. 83, p. 202-7. 1980

FISHER, J. P.; REDDI, A. H. Functional Tissue Engineering of Bone: Signals and Scaffolds. In: ASHAMMAKHI, N. FERRETTI, P. **Topics in Tissue Engineering**, v.1, Chapter 8. 2003.

FORTULAN, C. A. *Compósito alumina-zircônia – obtenção através de conformação coloidal e caracterização microestrutural*. Relatório de Pós-doutorado – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Mar.1999. 82p.

GARNET, L.P. and HIATT J. L. **Tratado de histologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. Cap. 7.

GLOWACKI J. Tissue response to bone derived implants. In: HABAL MB, REDDI AH. **Bone grafts and bone substitutes**. Saunders, Philadelphia, **1992**, p. 84-91.

GREENLEE T. K. et al. Glass-ceramic bone implants, a light microscopic study. In: **An investigation of bonding mechanisms at the interface of a prosthetic material**, University of Florida, 1971, p. 26-35.

GRIFFITH, L. G., NAUGHTON, G. Tissue Engineering-Current Challenges and Expanding Opportunities. **Science** , vol.295, n. 8, p. 1009-1014. 2002.

GROSS U. et al. The Response of Bone to Surface Active Glass/Glass-Ceramics, **CRC Critical Reviews in Biocompatibility**, vol. 4, n. 2. 1988.

GOMIDE, V. S.; ZAVAGLIA C. A. C. Estudo da porosidade do compósito zircônia – hidroxiapatita através da análise por MEV para aplicação em implante craniomaxilofacial. In: III Congresso Latino Americano de órgãos artificiais e biomateriais. 27 a 30 de julho de 2004. Campinas – Brasil.

GOMIDE, V. S. **Desenvolvimento e caracterização mecânica de compósitos hidroxiapatita-zircônia, hidroxiapatita-alumina e hidroxiapatita-titânia para fins biomédicos**. Campinas, Faculdade de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas: [s.n.], 2005. 121p. Dissertação (Mestrado).

HALL, S. **Biomecânica básica**, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991, 320p.

HAMIL J, KNUTZEN KM. **Bases biomecânicas do movimento humano**, Manole. 1999.

HABAL MB, REDDI AH. An update on bone grafting and bone substituting. **Adv Plast Reconstr Surg**; vol. 3, p. 147-210. 1987.

HABAL MB. Different forms of bone grafts. In: HABAL MB, REDDI HD. **Bone grafts and bone substitutes**. Saunders, Philadelphia **1992**, p. 6-8.

HEIMKE, G. Ceramic for osseo-integrated implants. **Advanced Ceramic Materials**, vol.2, n.4, p.764-770. 1987.

HEIKKILA et al Polymethylmethacrylate composites: disturbed bone formation at the surface of bioactive glass and hydroxyapatite. **Biomaterials.**, vol. 17, n. 18, p. 1775-60. Sep. 1996.

HENCH L. L. et al. *An investigation of bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials*, **J. Biomed. Mater. Res.**, vol. 2, n. 1, 117-141. 1972.

HENCH et al. **An investigation of bonding mechanisms at the interface of a prosthetic material**. University of Florida. p. 21-83. 1973.

HENCH et al. **An investigation of bonding mechanisms at the interface of a prosthetic material**. University of Florida., p. 24-117. 1974.

HENCH L. L. et al. **Interfacial behavior of ceramics implantes**, **National Bureal of standards Spec.** Publ. 415, Gaithersburg, v. 19. 1975.

HENCH, L. L.; ETHRIDGE, E. C. **Biomaterials: an interfacial approach**; New York: Academic Press, Noordergraaf, p. 3.1982.

HENCH, L.L. Bioactive Ceramics. In DUCHEYNE AND J. LEMONS. **Bioceramics: Materials Characteristics Versus *In Vivo* Behavior**, Vol. 523. Annals N.Y. Acad. Sci. **1988**, p, 54.

HENCH, L.L. Bioceramics: from concept to clinic. **Americam Ceramic Society - Bulletin**. 1993, vol. 72, n. 4, p 93-98.

HENCH, L. L.; WILSON, J. **Introduction to bioceramics**. Singapore. Word Scientific Publishing Co. Pte. Ltd. 1993. Cap. 4-6.

HENCH, L. L. Bioceramics. **Journal of the American Ceramic Society**, vol.81, n.7, p.1705-1733. 1998.

HERZOG W. e NIGG B. M. *Biomechanics of the musculo-skeletal system*, 2º Ed., Wiley. 1994.

HERCULIANI, P. P. et al. Tratamento de defeito ósseo perene em calvária de cobaia com membrana de cortical óssea bovina liofilizada associada ou não a enxerto ósseo bovino desmineralizado. **Rev. bras. Implant.** vol.7, n. 2, p.7-14. 2000.

HULBERT, S. F.; COOKE, F. W. J. *Biomedical Materials Research. Symp.* vol. 4, n. 1.1970.

HULBERT, S. F. et al. *In Ceramics in severe environments*. Ed. W. W. Kriegel & H. Palmour, Palmour, Plenum Press, New York. p. 417. 1971.

HULBERT, S. F et al. *Ceramics in clinical application: past, present and future*. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1987, p. 189-213.

HÜBNER, H.; DÖRRE, E. **Alumina**. Heidelberg: Springer-Verlag. Berlin.1984.

IKEGAMI, R. A. CAMILO, C. C.; MONARETTI, F. H.; FORTULAN, C A; PURQUERIO, B DE M. Reforço em corpo cerâmico poroso de alumina com adição de camada densa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CERÂMICA (49.: 2005: São Pedro). Anais São Pedro, 2005. p.1-10.

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

JARCHO, M. Calcium phosphates ceramics as hard tissues prosthetics. **Clin. Orthop. Rel. Res.**,v.157, p.259-78. 1981.

KAWACHI et al. Biocerâmica: tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar. **Química nova**. 2000, n. 23, v. 4, p. 518-522.

KIRKPATRICK CJ. Biological testing of materials and medical devices - A critical view of current and proposed methodologies for biocompatibility testing: cytotoxicity *in vitro*. **Regulatory Affairs**, 4: 13-32. 1992.

KLAWITER et al. An evaluation of bone growth into porous high density polyethylene. **Journal of biomedical Materials Research.**, v. 10, p. 311-321. 1976.

KUSIAK J. F.; ZINS J.E.; WHITAKER L.A. The early revascularisation of membranous bone. **Plast Reconstr Surg**. vol. 76, p. 510-6. 1985.

KUBOKI Y et al. BMP-induced osteogenesis on the surface of hidroxiapatite with geometrically feasible and non feasible structures: topology of osteogenesis. **J. Biomed. Mater. Res**. vol. 39, n. 2, p. 190-9.1998.

LANGER, R., VACANTI, J. P., Tissue engineering. **Science**, vol.260, p. 920-926. 1993.

LEE, et al. **Cell seeding of ceramic compositions**. Patente No.: US 6,544,290 B1. 8 Apr. 2003.

LÊ HUEC et al. Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress. **Biomaterials**. v. 16, p. 113-118. 1995,

LEON Y LEON CA, New perspectives in mercury porosimetry. **Adv. Colloid Interface Sci.**; 76-77, 341 – 72. Editorial. 1998.

LE GEROS, RZ; LE GEROS JP. In: RIGO, ECS. **Efeito das condições de precipitação sobre as características físico-químicas da hidroxiapatita**. São Carlos – Universidade Federal de São Carlos. Dissertação (mestrado). 1995.

LISON, L. **Histochemie et Cytochemie Animales – Principes et Methodes**. Gauthier Villars, Paris. 1960

LIU , D. M. Influence of porosity and pore size on the compressive strength of porous hydroxyapatite ceramic. **Ceramics internacional**, vol. 23, pp- 135-139. 1997.

LIU J.; MIAO X. Porous alumina ceramics prepared by slurry infiltration of expanded polystyrene beads. **Journal of materials science**, vol. 40, p-6145-50. 2005.

LLOYD-EVANS, M. Regulating Tissue Engineering. **Materials Today**, vol. 7, Issue 5, May, p.48-55. 2004.

MATSUNO et al. Sintering of zirconia coated hydroxyapatite particles. **Journal of the Ceramic Society of Japan**, vol. 104, p.942-945. 1996.

MASTERS, D.H. Implants. Bone and bone substitutes. **Calif. dent. Ass. J.** , vol.16, n.1, p. 56-65. 1988.

MARX, R.E.; SAUNDERS, T.R. Reconstruction and rehabilitation of cancer patients. In: FONSECA, R.J.; DAVIS, W.H. **Reconstructive preprosthetic oral and maxillofac. Surgery**. Philadelphia, saunders, 1986. p.347- 428.

MELLO M.L.S., 1997. Cytochemistry of DNA, RNA and nuclear proteins. **Braz. J. Genet.**, **20**, 257-264.

MELLO, M. L. S. e VIDAL, B. C. **Práticas de Biologia Celular**, Edgard Blücher/FUNCAMP, SP, 1980.

MÓDIS, L., 1991. **Organization of the Extracellular Matrix: A polarization Microscopic Approach**, CRC Press, Boca Raton.

MONARETTI F. H. **Estudo de viabilização de método e técnicas de manufatura de corpos porosos estruturais para engenharia de tecidos**. São Carlos, Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2005, 92p, Dissertação (Mestrado) 2005.

MONARETTI, F. H (a); CAMILO, C. C; IKEGAMI, R A; FORTULAN, C. A; PURQUERIO, B DE M. Fabricação de corpo poroso estrutural cerâmico aplicável à engenharia de tecidos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CERÂMICA (49.: 2005: São Pedro). Anais São Pedro, 2005. p. 1-12.

MONARETTI, F. H (b); CAMILO, C. C; IKEGAMI, R A; FORTULAN, C. A; PURQUERIO, B DE M. Manufacture of ceramic scaffolds for tissue engineering using cane sugar as pore-forming agent. In: FIFTH INTERNATIONAL LATIN-AMERICAN CONFERENCE ON POWDER TECHNOLOGY (50º: 2005: Costa do Sauípe). Anais, 2005, p. 6.

NOGUEIRA, R.E.F.Q. **Processing and properties of molded alumina bodies**. Brunel. (Doctor of Philosophy – Departament of Materials Technology, Brunel University), 166p, 1992.

NIGG, B. M.; GRIMSTRON, S. K. Bone. In: NIGG, B. M. HERZOG, W. **Biomechanics of the musculo-skeletal system**. 1. ed. Chichester: John Wiley & Sons. 1994, Cap. 2. vol.1, p. 48-78.

NIEDERAUER, G. G.; McGEE, T.D. **Evaluation of a bioactive ceramic composite as a dental implant**. *Ceramic Bulletin*, vol. 70, n 6, p. 1010-1015.1991.

OONISHI et al. Particulate bioglass compared with hydroxyapatite as a bone graft substitute. **Clinical orthopaedics.**, vol. 334, p. 316-325. Jan. 1997

ORTEGA, F. S. Propriedades mecânicas de espumas cerâmicas produzidas via “gelcasting”. **Cerâmica**, 2003, n. 49, p. 1-5.

PAJAMAKI et al. Bioactive glass and glass ceramic coated hip endoprosthesis: Experimental study in rabbit. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, vol. 6, n. 1, p. 14-18. Jan. 1995

PFISTER et al. *Fabrication of soft tissue engineering scaffolds by means of rapid prototyping techniques*. **Journal of materials science**. n. 37. p. 3107 – 3116. 2002.

PILLIAR R. M. et al. Porous calcium polyphosphate scaffolds for bone substitute application – in vitro characterization. **Biomaterials**. 2001, vol. 22, pp 963 – 972.

RAVAGLIOLI A. e KRAJEWSKI A. **Bioceramics: Materials, properties, applications**. London: Chapman & Hall, 1992, 416 p. ISBN 0-412-34960-4.

RAMAY H. e ZANG M. Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods, **Biomaterials**, 2003.vol. 24, n. 29, p – 3293-3302.

REILLY D.T., BURSTEIN A.H. The elastic and ultimate properties of compact bone tissue. **J. Biomech.** Vol. 8, p. 393-405. 1975.

REYES L. C. V. Aplicação de um vidro bioativo em tíbias de coelhos. São Carlos. Interunidades Bioengenharia. Universidade Estadual de São Paulo, 2000. p-91. Dissertação (Mestrado).

SEPULVEDA et al. Production of porous hydroxyapatite by the gel-casting of foams and cytotoxic evaluation. **Biomed. Mater. Res.** Vol. 50, p. 27-34. 2000.

SEPULVEDA et al (a). In Vivo Evaluation of Hydroxyapatite Foams. **Materials research.** vol. 5, n. 3, p. 253 – 256. 2002.

SEPULVEDA et al (b). In Vivo Evaluation of Hydroxyapatite Foams. **J. Biomed. Mater. Res.** Vol. 62, p. 587-92. 2002.

SICCA et al. Avaliação microscópica e bioquímica da resposta celular a enxertos de osso cortical bovino em subcutâneo de ratos: Efeito do tamanho da partícula. **Revista da Faculdade de Odontologia de Bauru.** vol.8, n. 1/2, p.1-10. Jan./Jun. 2000.

SIMSKE et al. **Material science forum.** 1997, vol. 250, p.151.

SMITH D. C. Composition and characteristics of dental cements. **Biocompatibility of dental materials.** Flórida: CRC Press, Inc.1982, vol. 2, p. 143-199.

SHEA et al. **Nature Biotech.** 1999, vol. 17, 551.

TAGA, R.; et al. Evolução de enxertos ósseos autógenos e alógenos colocados em defeitos ósseos de tamanho crítico em calvária de cobaias. **Rev. bras. Cirurg. Implant.**, vol.7, n.27, p.37-44. 2000.

TAMAI et al. Novel hydroxyapatite ceramics with an interconnective porous structure inhibit superior osteoconduction in vivo. **J. Biomed Mater Res.** N. 59, p. 110-7. 2002.

TURUNEM T. et al. A effect of bioactive glass granules and polytetrafluoroethylene membrane on repair of cortical bone defect. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine.** vol. 6, n. 11, p. 639-641. Nov. 1995.

TURUNEM T. et al . bioactive glass granules and polytetrafluoroethylene membrane in the repair of bone defects adjacent to titanium and bioactive glass implants. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, vol. 9, n. 7, p. 403-407. Jul. 1998.

URIST, M.R. Bone: formation by autoinduction. **Science**, 1965, v.150, n.698, p.893-9.

URIST, M.R. Bone transplants and implants. In: **Fundamental and clinical bone physiology**. Lippincott, Ed. Philadelphia J.B., p.331-68. **1980**.

VEISEH M; EDMONDSON D. Bone as an Open Cell Porous Material. Disponível em : < <http://courses.washington.edu/mengr599/vk/project.html>>. Acesso Mai. de 2003.

WILLIAMS PL. Gray's anatomy. 38 th ed. Churchill Livingstone. 1995.

WILLIAMS, D. F. **Progress in biomaterial engineering**: Definition in Biomaterials. v. 4. Amsterdam: Elsevier, 1987.

WILSON et al. Design and fabrication of standardized hydroxyapatite scaffolds with a defined macro-architecture by rapid prototyping for bone-tissue-engineering research. *J Biomed Mater Res*. n. 68A, p. 123-132. 2004.

YAMAMURO T. Y., HENCH L.L., WILSON J. *CRC Handbook of bioactive ceramics: Bioactive glasses and glass-ceramics*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc. 1990, vol. I, p-4. ISBN 0-8493-3241-9.

YANG S. et al. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue engineering*. 2001, v-7, n-6, p- 679-89.

ZANOTTO, E. D.; MIGLIORE JR. A. R. Propriedades mecânicas dos materiais cerâmicos: Uma introdução. **Cerâmica**, vol. 37, n247, p. 7-16, 1991.

ZAVAGLIA, C.A. de C. *Aplicações de biocerâmica em próteses ortopédicas*. Tese de Livre docência. UNICAMP. 1993.

ZAVAGLIA, C. A. **Curso de Introdução à Cerâmicas**. Apostila de biocerâmicas – Faculdade de Engenharia Mecânica, Unicamp, Campinas. 2003.

ZITZMANN, N.U. et al. Resorbable versus nonresorbable membranes in combination with Bio-Oss for guided bone regeneration. **Int. J. Oral Maxillofac. Implants**, v.12, n.6, p.844-52. 1997.