

**UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO**

SABRINA DE FÁTIMA FERREIRA MARIOTTO

**FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL DE SÓLIDOS
CELULARES DE AÇO INOXIDÁVEL 316L AUSTENÍTICO POR MEIO DO
PROCESSO DE METALURGIA DO PÓ PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS**

**São José dos Campos, SP
2009**

Sabrina de Fátima Ferreira Mariotto

Fabricação e caracterização microestrutural de sólidos celulares de aço inoxidável 316L austenítico por meio do processo de metalurgia do pó para aplicações biomédicas

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do título de Mestre Engenharia Biomédica.

Orientador(es): Profa. Dra. Kátia Regina Cardoso e Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares

São José dos Campos, SP

2009

M295f

Mariotto, Sabrina de Fátima Ferreira

Fabricação e caracterização microestrutural de sólidos celulares de aço inoxidável 316L austenítico por meio do processo de metalurgia do pó para aplicações biomédicas. / Sabrina de Fátima Ferreira Mariotto; Orientadoras: Profa. Dra. Kátia Regina Cardoso, Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares. -- São José dos Campos, 2009.

1 disco laser; 87f.: color.; 15cm

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Pesquisa e desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, 2009.

1. Materiais biomédicos 2. Aço inoxidável 3. Citotoxicidade 4. Microscopia eletrônica de varredura
I. Cardoso, Kátia Regina, orient. II. Soares, Cristina Pacheco, orient III. Título

CDU:62:61

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo foto-copiador ou transmissão eletrônica.

Assinatura do Aluno: *Sabrina Mariotto*

Data: 09/01/2009

SABRINA DE FÁTIMA FERREIRA MARIOTTO

**“FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL DE SÓLIDOS CELULARES
DE AÇO INOXIDÁVEL 316L AUSTENÍTICO POR MEIO DO PROCESSO DE METALURGIA
DO PÓ PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Biomédica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, SP, pela seguinte banca examinadora:

Prof^ª. Dra. **CRISTINA PACHECO SOARES** (UNIVAP)

Prof^ª. Dra. **KÁTIA REGINA CARDOSO** (UNIVAP)

Prof^ª. Dra. **ELIANA CRISTINA DA SILVA RIGO** (USP)

Cristina Pacheco Soares
Katia Regina Cardoso
El Rigo

Prof^ª. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa

Diretor do IP&D – UniVap

São José dos Campos, 09 de janeiro de 2009.

Dedico

A Deus por iluminar sempre meu caminho. Aos meus pais e irmã, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando e torcendo por meu sucesso. Obrigada pelo incentivo e carinho. A todos aqueles que me ajudaram e me apoiaram no decorrer desses dois anos de mestrado.

Agradecimentos

São muitas as pessoas que colaboraram diretamente com este trabalho. Agradeço a ajuda que prestaram e a constante disponibilidade ora por visualizarem a sua importância, ora pela simples generosidade de que lhes são própria. Não sem consciência disto, vão os meus sinceros agradecimentos*:

As minhas orientadoras, Profa. Dra. Kátia Regina Cardoso e a Profa. Dra. Cristina Pacheco Soares, a atenção que me dedicaram, pelo apoio, paciência, pelas valiosas discussões, dedicação, compreensão e por terem contribuído diretamente no desenvolvimento deste trabalho e em meu crescimento profissional, não tenho palavras para expressar minha gratidão;

Ao Prof. Dr. Rosinei B. Ribeiro - Coordenador do Instituto Superior de Pesquisa e Iniciação Científica das Faculdades Integradas Teresa D' Ávila (FATEA) e professor pesquisador da Escola de Engenharia de Lorena (EEL-USP), participante ativo da minha carreira profissional, pela grande amizade, incentivo, pelas valiosas discussões e apoio constante;

Ao Prof. Dr. José Augusto Jorge Rodrigues do Laboratório Associados de Combustão e Propulsão (LCP/INPE), Me. Sayuri Okamoto e Dra. Regina Célia de O. Guimarães pelos ensaios de porosimetria e picnometria, agradeço o profissionalismo, a seriedade e o compromisso pela busca de melhores resultados e que com grande sabedoria enriqueceram este trabalho e também meu crescimento profissional;

Aos amigos Prof. Dr. Gilbert Silva, Prof. Me. Jorge L. Rosa pela ajuda fundamental nas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura;

Ao Sr. Geraldo do Prado do laboratório de Tratamento Térmico – LTT/EEL - USP – Escola de Engenharia de Lorena/ Campus II – DEMAR/ Departamento de Materiais, pela sinterização das amostras;

À Juvalina Rosenberg Pereira técnica do Laboratório de Análises Químicas da FEAU (Faculdade de Engenharia, Arquitetura e Urbanismo – UNIVAP) pela Decapagem e Passivação – Banho ácido;

Ao Prof. Dr. Fernando dos Santos Ortega do Laboratório de Processamento de Materiais, obrigada por toda sua ajuda, principalmente com os equipamentos do laboratório;

* BAZAN, O. **Usinagem de próteses para cranioplastia a partir de imagens tomográficas**, 2004. 127 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) – Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, 2004.

À Profa. Dra. Vera Lúcia Arantes do Laboratório de Cerâmicas Avançadas, por disponibilizar a utilização dos equipamentos de seu laboratório;

À Metalpó Ind. E Com. Ltda. pela doação do material utilizado nesta pesquisa;

À Vanessa Guido aluna de iniciação científica (UNIVAP), por sua ajuda e apoio constante durante o processo de fabricação das amostras;

Aos funcionários do IP&D - UNIVAP do Campus Urbanova pela dedicação e respeito com que sempre nos trataram: Valéria, Vanessa, D. Ivone e D. Neuza;

À bibliotecária Rúbia pela atenção e disponibilidade, sempre disposta a nos ajudar;

Ao Prof. Dr. Antonio Augusto Couto da Universidade Presbiteriana Mackenzie, pela sua atenção e ajuda na obtenção do material referente a aplicação de aços inoxidáveis em implantes ortopédicos, projeto desenvolvido por sua aluna de graduação Tatiana L. de Araújo;

Ao meu querido tio Prof. Me. José Antonio O. da Cruz também pelas valiosas discussões e incentivo;

À minha querida prima Profa. Me. Neide Ap. Arruda de Oliveira pela colaboração na revisão de língua portuguesa;

Em especial, aos maravilhosos amigos que a vida me deu oportunidade de conhecer e que considero integrantes de minha família: Kátia Margareth B. de Moura (Katita), Isabelle C. Pereira e Giovani Arnaldo Pacetti... Obrigada pela ajuda, carinho e companheirismo;

Aos demais colegas que também fizeram parte deste momento, prestando auxílio de alguma forma para que tudo isso acontecesse: Walter Moreira, Mara Fachini Falavigna, Regina Célia e Adriano Sorbile;

Ao Instituto Santa Teresa (IST) e Faculdades Integradas Teresa D' Ávila (FATEA), pelo apoio fornecido durante a pesquisa;

E a todas as pessoas não citadas aqui que contribuíram na realização deste trabalho e no decorrer do curso fazendo parte da minha formação.

“Posso, tudo posso naquele que me fortalece nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir, quero, tudo quero, sem medo entregar meus projetos, deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim e ali estar, vou perseguir tudo aquilo que Deus já escolheu pra mim, vou persistir, e mesmo nas marcas daquela dor, do que ficou, vou me lembrar, e realizar o sonho mais lindo que Deus sonhou em meu lugar estar na espera de um novo que vai chegar, vou persistir, continuar a esperar e crer, e mesmo quando a visão se turva e o coração só chora, mas na alma, há certeza da vitória...”

(Celina Borges)

FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL DE SÓLIDOS CELULARES DE AÇO INOXIDÁVEL 316L AUSTENÍTICO POR MEIO DO PROCESSO DE METALURGIA DO PÓ PARA APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Resumo

Aços inoxidáveis austeníticos são materiais metálicos frequentemente usados em aplicações biomédicas, como implantes ortopédicos, por apresentarem propriedades como alta resistência à corrosão, resistência à fadiga e à fratura. Estas propriedades são parâmetros importantes na determinação da adequação de um material para aplicações biomédicas além da biocompatibilidade. No entanto, os implantes em aço inoxidáveis tradicionais são densos e não são capazes de induzir a regeneração do tecido ósseo, encurtando a vida do implante. As espumas metálicas constituem uma nova classe de materiais com densidade extremamente baixa e combinação sem igual de propriedades mecânicas, térmicas, elétricas e acústicas, com grande potencial para amplas aplicações incluindo implantes. Os materiais porosos não só encorajam o crescimento do osso de forma mais regular, mas também permite ao osso crescer no próprio implante, enquanto melhora a retenção reduzindo assim as chances de fadiga. A fabricação deste novo material pode ser feita por meio do processo de metalurgia do pó utilizando agentes espumantes. O objetivo deste trabalho foi a produção de amostras porosas de aço inoxidável 316L utilizando agentes espumantes e o processo de metalurgia do pó. Foram avaliados os efeitos de variáveis do processo, como fração volumétrica do agente espumante e pressão de compactação, no desenvolvimento das estruturas de poros. Para a adaptação do material obtido como biomaterial, foi avaliado por meio do teste de citotoxicidade, como determinado pela norma ISO 10993-5. Espumas de aço inoxidável 316L foram obtidas por metalurgia do pó com densidades relativas de 0,3 e 0,5 utilizando-se respectivamente 50% e 70% em peso dos agentes espumantes, carbonato e bicarbonato de amônio. Os pós foram misturados em um moinho de bolas do tipo planetário com velocidade de 60 rpm por 10 min. As misturas foram compactadas uniaxialmente com diferentes pressões de 93,6 a 318 MPa e sinterizadas a vácuo em um tratamento térmico em dois estágios, o primeiro a 200 °C por 5 horas para decomposição do carbonato e o segundo a 1.150 °C por 2 horas para sinterização do aço. As amostras sinterizadas compactadas com 286,5 MPa apresentaram melhor compactação a verde e melhores densidade e densidade relativa, estrutura de poros abertos e uma distribuição multimodal de tamanho de poros que variou com o agente espumante e sua concentração. As amostras produzidas com 70% em peso de agente espumante apresentaram estrutura de poros mais homogênea que as amostras obtidas com 50%. O teste de citotoxicidade MTT (3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difenil tetrazolio) foi utilizado para analisar a atividade mitocondrial de células L929 incubadas com as amostras por períodos de 24, 48 e 72 h, avaliando a adequação do material obtido para aplicações biomédicas. Os resultados após análise do teste de citotoxicidade demonstraram que as espumas produzidas não foram tóxicas para a cultura de fibroblastos. A amostra que apresentou melhor resultado com relação ao crescimento celular foi a produzida com 70% em peso de carbonato de amônio, na qual após 48 h de incubação observou-se desenvolvimento das células e após 72 h sua adesão e espalhamento sobre o material.

Palavras-chave: aço inoxidável, sólidos celulares, metalurgia do pó, citotoxicidade.

Microstructural production and characterization of 316L austenitic stainless steel cellular solid by powder metallurgy process for biomedical applications

Abstract

Austenitic stainless steels are frequently used in biomedical applications, like orthopedic implants, because of presenting properties as a high resistance to the corrosion, resistance to the fatigue and to the fracture. These properties are important in the determination of the adaptation of a material for biomedical applications besides the biocompatibility. However, the traditional implants in stainless steel are dense and are not able to induce the regeneration of the bone, shortening the implant life. Metal foams constitute a new class of materials with extremely low density and good combination of mechanical, thermal, electrical and acoustic properties, with great potential for a lot of applications including implants. An open celled porous material not only encourage the growth of the bone in a most regular form, but also allows bone to grow through the foam, improving the retention and reducing the chances of fatigue. The production of this new material can be by powder metallurgy using foaming agents. The aim of this work was the production of porous stainless steel 316L samples by using foaming agents and the powder metallurgy route. The effect of foaming agent and its concentration at the development of the pores structure was valued. The adaptation of the obtained material as biomaterial was valued by cytotoxicity test, according to ISO 10993-5. Porous 316L austenitic stainless steel was synthesized by powder metallurgy with relative density of 0,50 and 0,30 using respectively 15 wt. % and 30 wt. % of ammonium carbonate and ammonium bicarbonate as foaming agents. Powders were mixed in a planetary ball mill at 60 rpm for 10 minutes with a ball to powder weight ratio of 28:1. The powders were uniaxially pressed from 93,6 to 318 MPa and subsequently vacuum heat treated in two stages, the first one at 200°C for 5 hours for decomposition of the carbonate and the second one at 1150°C for 2 hours for sintering of steel. The samples presented an open porous structure and a multimodal porous size distribution which varied with the foaming agent and with its concentration. The samples obtained by addition of 70 wt. % of foaming agents presented a porous structure more homogeneous than that obtained with 50 wt. %. MTT cytotoxicity test [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] was used to evaluate the mitochondrial activity of L929 incubated cells with samples by periods of 24, 48 and 72h, valuing the material for biomedical applications. Results of cytotoxicity test show that the steel foams were not toxic to fibroblasts culture. The sample presented better result regarding the cellular growth was that produced with porosity 70 wt. % of ammonium carbonate, in which after 48h of incubation development of the cells was observed and after 72h his adhesion and spreading on the material.

Keywords: *stainless steel, cellular solids, powder metallurgy, cytotoxicity.*

Lista de figuras

Figura 1 - Fluxograma representativo do procedimento experimental.....	34
Figura 2 - (a) Jarro com bolas (b) moinho planetário.....	36
Figura 3 - Tratamento Térmico - (a) forno tubular, (b) bomba de vácuo.....	37
Figura 4 - Balança analítica.....	38
Figura 5 - Desenho esquemático mostrando as superfícies da pastilha que foram observadas por microscopia.....	39
Figura 6 – Emplacamento das amostras de aço inoxidável em meio à cultura de células (placa de 24 poços).....	42
Figura 7 – Grupo controle das amostras de aço inoxidável em meio à cultura de células (placa de 24 poços).....	44
Figura 8 – Placa de 24 poços após a incubação, foram retirados os grupos controles.....	44
Figura 9 – Placa de 24 poços após incubação com a solução tetrazólio MTT.....	45
Figura 10 – Placa de 24 poços com a adição de DMSO após completar solubilização do azul-escuro cristais de formazana MTT.....	45
Figura 11 - Variação da densidade da espuma (após compactação a verde) e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio.....	46
Figura 12 - Variação da densidade relativa (após compactação a verde) da espuma e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio.....	47
Figura 13 - Variação da densidade da espuma (após sinterização) e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio.....	47
Figura 14 - Variação da densidade relativa da espuma (após sinterização) e no eixo x a variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio.....	48
Figura 15 - Variação da densidade da espuma (após compactação a verde) e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio.....	49
Figura 16 - Variação da densidade relativa (após compactação a verde) da espuma e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio.....	49
Figura 17 - Variação da densidade da espuma (após sinterização) e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio.....	50
Figura 18 - Variação da densidade relativa da espuma (após sinterização) e no eixo x a variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio.....	50
Figura 19 - (Microscopia Óptica) – Micrografia das amostras sinterizadas utilizando o carbonato de amônio, em diferentes pressões de compactação de 93,6 MPa à 286,5 MPa....	53
Figura 20 - (Microscopia Óptica) – Micrografia da amostra sinterizadas utilizando o bicarbonato de amônio, em diferentes pressões de 191 MPa à 318 MPa.....	54

Figura 21 - (Microscopia Óptica) – Micrografia da amostra sinterizada, utilizando o carbonato de amônio, com pressão de 286,5 MPa	55	
Figura 22 - (Microscopia Óptica) – Micrografia da amostra utilizando o bicarbonato de amônio, processo de metalurgia do pó em pressão 191 MPa e 255 MPa.....	55	Excluído: 56
Figura 23 – Amostra da espuma de aço inoxidável 316L (a) face de topo e (b) seção transversal.....	56	
Figura 24 (Micrografia Eletrônica de Varredura - MEV) – amostra utilizando o carbonato de amônio, em diferentes pressões de 93,6 MPa (a) à 286,5 MPa (g).....	57	Excluído: 58
Figura 25 – (Micrografia Eletrônica de Varredura - MEV) – amostra utilizando o bicarbonato de amônio, em diferentes pressões de 191 MPa (a) a 318 MPa (b).....	58	Excluído: 59
Figura 26 – (Micrografia Eletrônica de Varredura - MEV) – amostra utilizando o carbonato de amônio, com pressão de 286,5 MPa (a) e (b).....	59	Excluído: 60
Figura 27 – (Micrografia Eletrônica de Varredura - MEV) – amostra utilizando o bicarbonato de amônio, em diferentes pressões 191 MPa (c) e 255 MPa (d).....	60	Excluído: 61
Figura 28 – Micrografia Eletrônica de Varredura – Amostras decapadas de aço inoxidável 316L + agente espumante (A) 50C, (B) 50B, (C) 50C e (D) 50B.....	61	Excluído: 62
Figura 29 – Micrografia Eletrônica de Varredura – Amostras decapadas de aço inoxidável 316L + agente espumante (E) 70C, (F) 70B, (G) 70C e (H) 70B	62	Excluído: 63
Figura 30 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra aço puro.....	64	Excluído: 66
Figura 31 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra aço puro.....	65	Excluído: 66
Figura 32 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% carbonato de amônio + aço	65	Excluído: 67
Figura 33 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% carbonato de amônio + aço	66	Excluído: 67
Figura 34 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% carbonato de amônio + aço	66	Excluído: 68
Figura 35 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% carbonato de amônio + aço	67	Excluído: 68
Figura 36 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% bicarbonato de amônio + aço	67	Excluído: 69
Figura 37 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% bicarbonato de amônio + aço	68	Excluído: 69
Figura 38 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% bicarbonato de amônio + aço	68	Excluído: 70
Figura 39 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% bicarbonato de amônio + aço	69	Excluído: 70
Figura 40 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 70% carbonato de amônio + aço	69	Excluído: 71
Figura 41 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 70% carbonato de amônio + aço	70	Excluído: 71

Figura 42 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 70% bicarbonato de amônio + aço	70	Excluído: 72
Figura 43 –Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 70% bicarbonato de amônio + aço	71	Excluído: 72
Figura 44 – Ensaio de citotoxicidade - células cultivadas sobre as amostras de aço puro e com agentes espumantes.....	73	Excluído: 74
Figura 45 - Microscopia de varredura. Proliferação de células L292, sobre após incubação por 48 horas (a-c) pastilhas recobertas com 50% (B) de porosidade; (b-d) 50% (C) de porosidade. Após incubação por 72 horas (e-g) pastilhas decapadas com 50% (B) de porosidade; (f-h) 50% (C) de porosidade. (i) pastilhas de aço após incubação com as células por 48 horas; (j) pastilhas de aço após incubação com as células por 72 horas	75	Excluído: 77
Figura 46 - Microscopia de varredura. Proliferação de células L292, sobre após incubação por 48 horas (k-m) pastilhas recobertas com 70% (B) de porosidade; (l-n) 70% (C) de porosidade. Após incubação por 72 horas (o-q) pastilhas decapadas com 70% (B) de porosidade; (p-r) 70% (C) de porosidade.	77	Excluído: 78
Figura 47 – Desenho esquemático- Amostra emplacada.....	78	Excluído: 80
Figura 48 – Desenho esquemático – Meio de cultura sobre amostra	79	Excluído: 80
Figura 49 - Meio de Cultura após a retirada do material.....	79	Excluído: 81

Lista de tabelas

Tabela 1- Características dos materiais metálicos para implantes ortopédicos.....	24	
Tabela 2 – Especificações - Propriedades Mecânicas do aço inoxidável 316L para	27	
Tabela 3 - Propriedades Mecânicas dos tecidos e materiais usados para sua substituição	28	
Tabela 4 - Composição química em porcentagem em peso do aço inoxidável 316L.	35	
Tabela 5 - Distribuição granulométrica (%) do aço inoxidável 316L.	35	
Tabela 6 - Pressões de compactação em MPa utilizadas na compactação das amostras e suas respectivas utilizações. 50% e 70% correspondem a porcentagens em volume dos respectivos agentes espumantes.....	37	
Tabela 7– Classificação por grupos das amostras para ensaio de citotoxicidade.....	41	
Tabela 8 – Densidade das amostras utilizadas para ensaio de citotoxicidade.....	51	
Tabela 9– Volume de Hg – representando o volume de poros.....	63	Excluído: 64
Tabela 10– Massa volumétrica obtida por picnometria a gás	72	Excluído: 73

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Al – Alumínio
ASTM – American Society for Testing and Materials
Au – Ouro
bar - Unidade de medida de pressão equivalente a 105 pascais
C- Carbono
c.c.c – Cúbica de corpo centrado
c.f.c – Cúbica de face centrada
CES – Centro espacial de Cachoeira Paulista
Co- Cobalto
CO₂- Dióxido de carbono
Cr – Cromo
DEMAR – Departamento de Materiais
DMSO – Dimetilsulfóxido
DO – Densidade Óptica
Dv/dlog (d) [cc/g] – distribuição de volume de poros
EDG – Equipamentos e Controles Ltda
EDS - Espectrometria de Energia Dispersiva
Fe - Ferro
FEAU – Faculdade de Engenharia, Arquitetura e Urbanismo
g – Grama
g/cm³ – Grama por centímetro cúbico
GPa – Giga Pascal
h - Hora
He - Hélio
HF – Ácido fluorídrico
Hg – Mercúrio
HNO₃ – Ácido nítrico
INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
ISO – International Organization for Standardization
“L” – Designação de *low carbon* (baixo carbono)
L929 – Linhagem de fibroblastos
LCP – Laboratório Associado de Combustão e Propulsão de Cachoeira Paulista
MEM – Meio mínimo essencial
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
mg – Miligramas
mL – Mililitros
Mn- Manganês
MO – Microscopia Óptica
Mo – Molibdênio
MPa – Mega Pascal
MTT - (3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difenil tetrazolio)
NiTi – Níquel titânio
nm – Nanômetro
P – Fósforo
Ag – Prata
PBS- Salina tampão fosfato
Pt – Platina

rpm – Rotação por minuto
S- Enxofre
SFB – Soro fetal bovino
Si- Silício
T – Tonelada
t.c.c – Tetragonal de corpo centrado
Ti – Titânio
t/min – Tempo por minuto
V – Vanádio
HRB – Dureza rockwell na escala B
 T_m – Temperatura fusão
°C – Grau Celsius
°C/min – Grau Celsius por minuto
 δ - Densidade
 δr – Densidade relativa
 δ teórica – Densidade teórica
 μ - Micron
 μm – Micromêtro
 μm^2 – Micron metro ao quadrado
 ϕ - Diâmetro
(P) – Potência do laser
(v) – Espaço de varredura
(d) – Densidade de camada
50%(C) – 50% de porosidade, utilizando agente espumante Carbonato de amônio
50%(B) – 50% de porosidade, utilizando agente espumante Bicarbonato de amônio
70%(C) – 70C – 70% de porosidade, utilizando agente espumante Carbonato de amônio
70%(B) - 70B – 70% de porosidade, utilizando agente espumante Bicarbonato de amônio

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 BIOMATERIAIS.....	20
2.2 BIOMATERIAIS METÁLICOS	21
2.3 AÇOS INOXIDÁVEIS	25
2.4. MATERIAIS CELULARES PARA IMPLANTES ÓSSEOS.....	27
2.5. ESPUMAS METÁLICAS.....	29
2.6 ESPUMAS DE AÇO INOXIDÁVEL.....	31
3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	34
3.1. MATERIAIS.....	34
3.3 PRODUÇÃO DAS ESPUMAS EM AÇO INOXIDÁVEL 316L	35
3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	38
3.4.1. Densidade	38
3.4.2. Caracterização Microestrutural.....	38
3.4.3 Porosimetria de Mercúrio (Hg).....	39
3.4.4 Picnômetro (He).....	40
3.5 ENSAIO IN VITRO (CITOTOXIDADE).....	40
3.5.1 Linhagem Celular.....	42
3.5.2 Manutenção da Cultura Celular.....	42
3.5.3 Ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difenil tetrazolio)	43
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 DENSIDADE	46
4.1.2 Amostras de 70% de porosidade.....	48
4.1.3 Densidade das Amostras – Ensaio Citotoxicidade.....	50
4.2 CARACTERIZAÇÃO MICROESTRUTURAL.....	51
4.2.1 Amostras com 50% de porosidade.....	51
4.2.2 Amostras com 70% de porosidade.....	54
4.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	56
4.3.1 Amostras com 50% de porosidade.....	56
4.3.2 Amostras com 70% de porosidade.....	59
4.3.3 Amostras Ensaio de Citotoxicidade	60
4.4 POROSIMETRIA DE MERCÚRIO (Hg).....	62
4.4.1 Macroporos.....	63
4.5 PICNOMETRIA (He)	71
4.6 ENSAIO DE CITOTOXIDADE.....	72
4.6.1 Ensaio MTT.....	72
4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	73
5 CONCLUSÃO.....	81
REFERÊNCIAS.....	82

Excluído: 39

Excluído: 40

Excluído: 41

Excluído: 43

Excluído: 52

Excluído: 52

Excluído: 55

Excluído: 57

Excluído: 57

Excluído: 60

Excluído: 62

Excluído: 64

Excluído: 65

Excluído: 73

Excluído: 73

Excluído: 73

Excluído: 75

Excluído: 82

Excluído: 83

1 Introdução

Os biomateriais correspondem a materiais usados em dispositivos médicos, implantados temporariamente ou permanentemente no corpo humano. O termo biomaterial foi definido na Conferência do Instituto Nacional de Desenvolvimento de Consenso em Saúde em 1982 como:

Qualquer substância (outra que não droga) ou combinação de substâncias, sintética ou natural em origem, que possa ser usada por um período de tempo, completa ou parcialmente como parte de um sistema que trate, aumente ou substitua qualquer tecido, órgão ou função do corpo. (HELMUS; TWEDEN, 1995)

Biomateriais são aplicados aos dispositivos médicos, tais como: válvulas de coração, arames guias, implantes ortopédicos e odontológicos, placas para fraturas, pregos e parafusos para reparo ósseo, suportes para corações artificiais, comandos para marca-passos, estimuladores elétricos implantáveis e prótese femoral.

A seleção de biomateriais é baseada principalmente na aplicação a que se destinam. Atualmente, há uma extensiva cadeia de materiais usados em aplicações biomédicas incluindo metais, polímeros, cerâmicas e macromoléculas naturais (ex.: biopolímeros). Os biopolímeros se adequam aos dispositivos médicos que entram em contato íntimo com as proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos, por essa razão são manufaturados ou processados. (PRADO DA SILVA, 1999).

Já os materiais metálicos são frequentemente usados em aplicações biomédicas porque possuem resistências à corrosão, fadiga e à fratura superiores as dos materiais poliméricos e cerâmicos. Estas propriedades seriam parâmetros importantes na determinação da adequação de um material para aplicações biomédicas além da biocompatibilidade.

Um dos materiais metálicos mais utilizados em dispositivos médicos são os aços inoxidáveis por terem custo mais acessível que os demais materiais. Além disso, um pré-requisito para materiais de implantes é a completa ausência de ferromagnetismo, propriedade encontrada em aços ferríticos que pode causar efeitos locais como irritação, inflamação em áreas adjacentes à interface implante-tecido, e sistêmicos (efeito tóxico sobre o organismo) (SUMITA; HANAWA; TEOH, 2004). Portanto, os aços inoxidáveis ferríticos são inadequados para materiais de implantes, devendo ser utilizado os aços inoxidáveis do tipo austenítico como o 316L.

Pesquisas no comportamento biológico de metais mostraram que a composição de biomateriais de implante, além dos outros parâmetros mencionados, deve ser cuidadosamente

selecionada para evitar ou minimizar as reações adversas que possam trazer malefícios à saúde. (WEN; YAMADA; HODGSON, 2005).

Recentemente houve um grande interesse na fabricação de novos materiais com propriedades mecânicas adequadas para serem aplicados a implantes, entre eles os *scaffolds*.

Os *scaffolds*, também conhecidos como sólidos celulares, exibem uma estrutura porosa que imita o osso e pode ter suas propriedades mecânicas ajustadas através do controle de sua porosidade. Este tipo de espuma ajuda na regeneração do tecido ósseo, além de exibir propriedades mecânicas e térmicas incomuns, inclusive absorção de energia (impacto), vibracional e amortecimento acústico, isolamento térmico, densidade muito reduzida, e boa dissipação de calor (PARK; NUTT, 2000a). A fabricação deste novo material pode ser feita por meio do processo de metalurgia do pó que transforma pós de metais, ligas metálicas e de substâncias não-metálicas, em peças resistentes, sem recorrer-se à fusão, apenas pelo emprego de pressão e calor, operação denominada de sinterização. Sua forma de espuma é obtida através de um agente granular espumante (CHIAVERINI, 2001).

Há vários tipos de espumas atualmente disponíveis no mercado. Espumas poliméricas têm sido usadas para absorção de vibração, ruído e energia a impacto. Porém, aplicações estruturais de espumas poliméricas geralmente têm sido limitadas para componentes de baixa pressão por causa da baixa resistência, assim como as espumas cerâmicas que poderiam fraturar se uma força súbita fosse aplicada a ela. Por esta razão, considerável atenção tem sido dedicada recentemente para a sinterização de espumas metálicas, que oferece maior resistência, rigidez e absorção de energia durante a deformação. (PARK; NUTT, 2000b).

Várias pesquisas realizadas demonstram que espumas metálicas em aço inoxidável 316L (austenítico), apresentam alta resistência mecânica e rigidez específica, alta temperatura de fusão, e redução no desgaste do material. Assim, a inerente resistência do aço combinada com a redução da densidade da espuma pode produzir um material altamente atrativo portador de resistência e eficiente na absorção de energia (PARK; NUTT, 2000b).

O objetivo deste trabalho consistiu no desenvolvimento de amostras porosas em aço inoxidável 316L (austenítico) por meio do processo de metalurgia do pó utilizando-se um agente espumante. Foram avaliados os efeitos de variáveis do processo, como fração volumétrica do agente espumante e pressão de compactação, no desenvolvimento das estruturas de poros. A adequação do material obtido como biomaterial foi avaliado por ensaios biológicos de citotoxicidade.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Biomateriais

Os biomateriais abrangem uma extensa classe de substâncias, naturais ou sintéticas, com propriedades mecânicas, físicas e químicas adequadas à recuperação das funções originais do tecido, órgão ou sistema perdido e que são substituídos na forma de implantes, próteses ou dispositivos extracorpóreo, sem lhes causar efeito nocivo (WILLIANS, 1993).

A aplicação dos biomateriais é bastante diversificada compreendendo dispositivos médicos desde coração artificial e válvulas cardíacas até implantes ortopédicos (quadril, joelho, perna, braço e mão), odontológicos (raízes de dentes) e, inúmeras outras aplicações (SCHNEIDER, 2001).

Os biomateriais não devem produzir qualquer resposta biológica adversa local ou sistêmica, ou seja: o material deve ser não-tóxico, não-carcinogênico, não-antigênico e não-mutagênico. Em aplicações sanguíneas, eles devem também ser não-trombogênicos. As complicações oriundas dos dispositivos implantados irão variar de acordo com a sua aplicação. Por exemplo, infecções e biodegradação irão afetar dispositivos que têm aplicações de longa duração como próteses permanentes e válvulas cardíacas (PRADO DA SILVA, 1999).

A substituição e recuperação de partes do corpo humano por materiais, sejam do tipo metálico, polimérico, cerâmico ou compósito, envolvem alguns aspectos como (WILLIANS, 1994).

- Reação do tecido ao implante;
- Corrosão do implante;
- Capacidade funcional e de projeto;
- Propriedades mecânicas e
- Implicações cirúrgicas.

Os estudos mostram que não existe um único material, ou um conjunto pequeno deles, que satisfaça a todas as condições. Portanto, para a seleção do material mais adequado para cada aplicação os requisitos necessários devem ser considerados e os elementos importantes identificados. (SCHNEIDER, 2001)

A seleção e avaliação de um material ou dispositivo para implante envolve um estudo detalhado das propriedades físicas e biológicas do mesmo. A avaliação biológica encontra-se

descrita na norma ISO 10993-1 (1993), onde os testes são classificados como iniciais e complementares. Dentre os testes de avaliação biológica inicial encontram-se:

- citotoxicidade: um dos testes “in vitro”, que utiliza técnicas de cultura de células, esse teste determina a morte, crescimento e outros efeitos, sobre as células, devido à presença do implante ou seu extrato;
- biocompatibilidade: teste “in vivo”, que avalia efeitos patológicos locais sobre o tecido vivo, tanto no nível macro como microscópico, causados pela amostra ou produto final que é implantado cirurgicamente ou introduzido no tecido ou região de interesse.

Os materiais são considerados biocompatíveis quando não causam a rejeição do meio biológico vivo e podem ser classificados, quanto à interface implante/tecido, como (SCHROEDER et al., 1994): bioinertes ou biotoleráveis e bioativos. Os materiais bioinertes ou biotoleráveis são aqueles que não interagem com o meio biológico, isto é, não sofrem rejeição e durante toda vida do implante mantêm suas propriedades físicas e mecânicas. (WILLIAMS, 1992). Já os materiais bioativos interagem com tecidos adjacentes de forma semelhante à da parte que eles substituem, ou seja, desenvolvem ligações químicas com tecido adjacente auxiliando no processo de união e fixação do implante (BOCHI, 1996).

Outro fator que devemos levar em conta seria a biofuncionalidade. A biofuncionalidade é um conjunto de propriedades que devem estar presentes em um dispositivo para que esse possa desenvolver a função desejada. Está relacionada com as propriedades mecânicas, físicas, químicas e biológicas que permitem ao implante o desempenho de sua função (BLACK, 1992; BOCHI, 1996).

2.2 Biomateriais Metálicos

Desde o século XVI têm sido investigados os materiais metálicos na utilização como implantes, visando reparar ou substituir partes do corpo humano. Estas substituições englobam aspectos como: reação do tecido ao implante, corrosão do implante, capacidade funcional e de projeto, propriedades mecânicas e implicações cirúrgicas. (SCHNEIDER, 2001; WILLIAMS, 1994).

Inicialmente foram testados metais nobres como ouro (Au), a prata (Ag) e a platina (Pt), mas logo foram descartados em função de suas propriedades mecânicas inadequadas (BANNON; MILD, 1983). Nos últimos anos a busca por materiais que se assemelham cada

vez mais às características do corpo humano e que supram as necessidades de seu comportamento, faz dos implantes e próteses produtos sofisticados, impondo a eles uma crescente demanda de materiais reunindo exigências de biocompatibilidade entre o material e o ambiente (circunvizinho) em que será introduzido.

Podemos observar que há uma grande dificuldade em reunir todas as características desejáveis em um só material (HOEPPNER; CHANDRASEKARAN, 1994). O titânio puro parece o biomaterial perfeito, mas infelizmente, muitas aplicações cirúrgicas e dentárias requerem materiais com propriedades mecânicas específicas, como, por exemplo, a ductilidade que o titânio puro não pode promover. Conseqüentemente materiais como a liga Ti6Al4V e o aço inoxidável 316L são usados apesar de sua resistência à corrosão ser mais baixa (BLACKWOOD, 2003), contudo, Ti6Al4V traz alguma restrição ao uso extensivo desta liga devido a dissolução de alumínio (Al) e vanádio (V) observada em ensaios de desgaste em meio fisiológico, os íons de Al e V apresentam certa toxicidade no material (KHAN et al, 1999) e (SCHNEIDER, 2001). Novas ligas de Ti sem adição destes elementos vêm sendo desenvolvidas para aplicação como implantes médicos. A liga Ti-6Al-7Nb apresenta características favoráveis à utilização para aplicações dentais, atendendo aos critérios de biocompatibilidade (SELIGSON et al, 1997). O Titânio e suas ligas apresentam excelente relação resistência/massa específica estão entre os materiais mais adequados ao emprego estrutural, especialmente se a redução de peso de um componente for um fator relevante. Além disso, suas notáveis características de biocompatibilidade e excelente resistência à corrosão favorecem seu emprego em diversos setores da indústria química e em implantes cirúrgicos. (HOEPPNER; CHANDRASEKARAN, 1994)

Em relação à corrosão, há uma grande preocupação com produtos corrosivos que podem resultar em complicações médicas trazendo conseqüências indesejáveis. Não há consenso atribuindo níveis de segurança, ou até mesmo classificações de metais tóxicos. A expectativa de vida do implante está aumentando e isto aumenta o risco de uma acumulação de íons tóxicos, como resultado haverá necessidade continuada para o desenvolvimento de novas ligas. (BLACKWOOD, 2003).

Por esses motivos cada vez mais tem aparecido novos materiais, e estes estudados para futuras aplicações. Como é o caso dos materiais porosos, ligas de NiTi, ímãs de terras raras, amálgamas de metais preciosos e a platina. (BLACKWOOD, 2003).

Os materiais porosos têm baixo módulo de elasticidade que é mais próximo do osso. Um material poroso não só estimula o crescimento do osso de forma regular, como também permite que o osso cresça no próprio implante, reduzindo as chances de fadiga

(BLACKWOOD, 2003). Segundo Prado da Silva (1999), os materiais metálicos não são osteogênicos, isto é, não são capazes de induzir a formação de um novo osso ou estimular as células precursoras dos osteoblastos.

A liga NiTi tem interessantes propriedades de memória de forma que resultam no uso potencial em aplicações cirúrgicas e dentárias (MANTOVANI, 2000). No entanto, a resistência à corrosão de NiTi em corpos-fluidos simulados deve ser completamente avaliada, pois há uma grande dificuldade em medir a toxicidade de níquel devido a variabilidade na resposta da dermatite de indivíduo para indivíduo.

Outros materiais como ímãs de terras raras têm propriedades magnéticas notavelmente fortes. Mas infelizmente estes ímãs têm baixa resistência à corrosão, sendo corroídos rapidamente em atmosfera úmida. Este material se faz desejável para várias aplicações médicas como retentor dental (sua forte magnetização é usada para manter fixações dentárias no lugar).

Devido ao alto custo de metais preciosos como Au, Ag e Pt há uma necessidade de reduzir a quantidade desses metais em amálgamas usados em aplicações odontológicas como coroas. Porém, estudos mostram que a resistência é diminuída e ocorre perda de brilho do material devido à oxidação superficial através do sulfeto. Assim a aparência estética de qualquer coroa diminuiria se a dieta do paciente / hábitos de higiene orais conduzissem a níveis altos de sulfeto em sua saliva. (BLACKWOOD, 2003).

E por fim, a Platina, seria dentre todos os materiais o menos associado a problemas de corrosão, porém foram achados problemas deste tipo em estimuladores biomédicos (BLACKWOOD, 2005). Ainda há muita pesquisa a ser feita em relação a estes novos materiais a fim de estabelecer melhores condições do material para sua aplicação.

Com relação à utilização de materiais metálicos atuais, os materiais de uso comum na atualidade abrangem três grupos (HOEPPNER; CHANDRASEKARAN, 1994):

- Aço inoxidável austenítico (especialmente 316 e 316L): onde o baixo teor de carbono confere maior resistência à corrosão no tipo L;
- Ligas a base de cobalto: com menor módulo de elasticidade, resistência à corrosão e ao desgaste maior que o aço inoxidável, Tabela 1;
- Ligas a base de titânio (particularmente Ti6Al4V): possuem uma boa combinação entre propriedades mecânicas e resistência à corrosão, além de menor densidade.

Segundo Silva (1999) a seleção do material deve levar em consideração as propriedades físicas, químicas e mecânicas como podemos observar na Tabela 1.

Tabela 1- Características dos materiais metálicos para implantes ortopédicos.

	Aço Inoxidável	Ligas de Co	Ti e Ligas de Ti
Denominação	ASTM F-138 (‘316 LDVM’)	ASTM F-75 ASTM F-799 ASTM F-1537 (Fundido e trabalhado)	ASTM F-67 (ISO 5832/II) ASTM F-136 (ISO 5832/II) ASTM F-1295 (Fundido e trabalhado)
Principais elementos de liga (% em peso)	Fe (bal.) Cr (17-20) Ni (12-14) Mo (2-4)	Co (bal.) Cr (19-30) Mo (0-10) Ni (0-37)	Ti (bal.) Al (6) V (4) ou Nb (7)
Vantagens	- Custo; - Disponibilidade; - Beneficiamento.	- Resistência ao desgaste; - Resistência à corrosão - Resistência à fadiga.	- Biocompatibilidade; - Resistência à corrosão; - Resistência à fadiga; - Menor módulo de elasticidade.
Desvantagens	- Comportamento durante longo tempo de aplicação; - Alto módulo de elasticidade.	- Alto módulo de elasticidade; - Problemas de biocompatibilidade.	- Baixa resistência ao desgaste; - Baixa resistência ao cisalhamento.
Utilizações	Dispositivos temporários (placas, parafusos e pinos)	Fundições dentais, e próteses externas	Dispositivos de longo tempo ou permanentes como haste femural, marca-passos e pinos

Fonte: Long (1998)

Dentre estas principais propriedades estão:

- Resistência: aplicações que requerem alta resistência tipo: enxertos de veia aorta, válvulas cardíacas, balões de angioplastia e implantes odontológicos e ortopédicos.
- Módulo de elasticidade, torção ou flexão: o módulo de torção e de flexão é aplicado a materiais como cateteres, que podem sofrer torque e fazer percursos tortuosos dentro dos vasos.
- Fadiga: os dispositivos que devem suportar esforços repetitivos sem permitir propagação de trinca. Esses dispositivos funcionam em sua maioria como implantes ortopédicos, odontológicos e cardiovasculares.
- Rugosidade: em aplicações onde é desejado baixo atrito e integração tecido-implante como em implantes de juntas ortopédicas. Quando se deseja uma integração tecido-implante, como em implantes endo-ósseos, é desejada uma alta rugosidade.
- Taxa de permeação: dispositivos requerem uma alta taxa de permeação de gases como lentes de contato.
- Absorção de água: alguns materiais sofrem mudanças em sua resistência a tração, à fadiga, à fluência, em seu módulo de elasticidade, torção ou flexão quando ligeiramente umedecidos.

- Bioestabilidade: dispositivos como fios de sutura e liberadores de drogas devem ter sua degradação controlada, enquanto implantes permanentes devem ser estáveis.
- Bioatividade: a bioatividade se refere à propriedade inerente a alguns materiais de participarem em reações biológicas específicas. Essa camada constitui uma superfície bioativa para o ancoramento de osso neoformado.
- Esterilização: pode alterar o estado energético da superfície de um implante, alterando a resposta celular.

Portanto, observando todos os aspectos mencionados quanto às propriedades que seriam importantes na determinação da adequação de um material para aplicações biomédicas podemos dizer que seria aquele que fosse ao mesmo tempo biocompatível, bioativo e que apresentasse a biofuncionalidade necessária. No entanto, ainda hoje essa combinação não é facilmente alcançada (HENCH, 1997).

2.3 Aços Inoxidáveis

Os aços inoxidáveis podem ser classificados de acordo com a sua estrutura em austeníticos (cúbica de face centrada - c.f.c.), ferríticos (cúbica de corpo centrado - c.c.c.) e martensíticos (tetragonal de corpo centrado - t.c.c.) (VAN VLACK, 2002).

O aço ganha a denominação de “inoxidável” quando apresenta em sua composição um teor mínimo de 10% a 12% do elemento cromo. A resistência dos aços inoxidáveis à corrosão é devida à formação de um filme fino superficial, chamado de camada passiva, que protege o metal do ataque químico em grande variedade de meios. Esse filme é composto de óxidos dos principais metais constituintes do aço, em especial o óxido de cromo, que se formam espontaneamente pela exposição da superfície metálica ao ar. (VILLAMIL et al., 2002).

Neste trabalho será dada ênfase à descrição dos aços inoxidáveis austeníticos, por serem aplicados em implantes ortopédicos. Eles retêm a baixas temperaturas, comparáveis às do corpo humano, a estrutura c.f.c. do ferro, que lhes garante propriedades mecânicas e de resistência à corrosão. O níquel é um elemento de liga que, adicionado ao aço inoxidável, estabiliza a estrutura austenítica. Por outro lado, esse metal é conhecido por causar, em muitos pacientes, reações alérgicas principalmente dermatites (VILLAMIL et al., 2002).

Em grandes quantidades, todos os elementos constituintes do aço são nocivos; no entanto, o conhecimento da resistência à corrosão desse material em fluidos biológicos pode levar ao controle da dissolução metálica em níveis permissíveis, isto é, não prejudiciais à saúde (VILLAMIL et al., 2002).

Atualmente, o aço inoxidável é o material mais freqüentemente utilizado para fixação interna. Ele demonstra uma boa combinação de resistência mecânica, ductilidade, custo efetivo e facilidade de fabricação. (ARAUJO; COUTO, 2004).

O aço mais comumente usado para implante é o 316L. Esse aço tem menos que 0,03% C no intuito de reduzir a possibilidade de corrosão in vivo. O “L” na designação 316L denota a baixa quantidade de carbono *low carbon*. A liga 316L é predominantemente ferro (60-65%) misturado com maiores quantidades de cromo (17-19%) e níquel (12-14%) e menores quantidades de nitrogênio, manganês, molibdênio, fósforo, silício e enxofre (CHAPIRO, 1995).

Os aços inoxidáveis austeníticos 316 e 316L, não podem ser endurecidos através de tratamento térmico, mas podem ser endurecidos por trabalho a frio como mostrado na tabela 2 que apresenta valores de propriedades mecânicas no estado recozido e trabalhado a frio do aço. Este grupo de aço é não magnético. A *American Society for Testing and Materials* (ASTM) recomenda a utilização de aços tipo 316L em lugar dos 316 para a fabricação de implante, devido suas especificações também apresentadas na tabela 2 (PARK; BRONZINO, 2000).

Tabela 2 – Especificações - Propriedades Mecânicas do aço inoxidável 316L para

Condição	Limite de Resistência à tração, min. (MPa)	Limite convencional de elasticidade (0.2% offset), min. (MPa)	Alongamento	Dureza Rockwell
Recozido	485	172	40	95 HRB
Trabalhado a frio	860	690	12	-----

Fonte: implantes (American Society for Testing and Materials, F139-86, p.61, 1992)

Implantes, em geral, necessitam tanto de segurança biomédica quanto de compatibilidade mecânica. Quanto à compatibilidade mecânica, é necessário que as propriedades mecânicas não mudem durante um período prolongado de uso. Propriedades mecânicas importantes incluem resistência mecânica, ductilidade, resistência à corrosão, desgaste e outros. (ARAUJO; COUTO, 2004).

O material recozido apresenta menor resistência mecânica. Essa condição geralmente é preferida para a manufatura de fio de cerclage e chapas de reconstrução onde uma baixa resistência é satisfatória, mas é preciso um máximo de ductilidade para adaptação da forma (BURNBY; DONKERWOLDKE; MUSTER, 1995). Certos aços inoxidáveis austeníticos, podem desenvolver maior resistência e dureza por meio de trabalho a frio. Por isso, esses aços apresentam uma maior resistência e são usados para fabricar parafusos e chapas para ossos, entre outros.

2.4 Materiais Celulares para Implantes Ósseos

Os módulos elásticos de ossos e implantes devem ser tão semelhantes quanto possível para evitar a tensão, protegendo contra fraturas e até mesmo necrose.

Tecidos macios têm resistência e módulo elástico que normalmente estão abaixo de 100 MPa, então polímeros com resistência semelhante e módulo ligeiramente mais alto eram os materiais que mais freqüentemente substituíam estes tecidos. Em contraste, o osso tem uma resistência à tração ligeiramente mais alta, enquanto seu módulo é dez vezes mais alto que o

valor achado para os tecidos macios. Considerando que o polímero não tem módulo superior a 10 GPa, ligas metálicas, cerâmicas e compósitos reforçados com fibras são usados para substituir o osso. (SIVER, 1994). Na tabela 3 mostram-se as propriedades mecânicas dos tecidos e materiais utilizados para sua substituição.

Tabela 3 - Propriedades Mecânicas dos tecidos e materiais usados para sua substituição

Material	Limite de Resistência à ruptura (MPa)	Módulo (MPa)	Ref.
Tecido Macio			
Parede Arterial	0.5– 0.72	1.0	Silver 1987
Cartilagem de hialino	1.3-18	0.4-19	Silver 1987
Pele	2.5-16	6-40	Silver 1987
Tendão / ligamento	30-300	65-2500	Silver 1987
Tecido Duro (osso)			
Cortical	30-211	16-20 (GPa)	Cowin 1989
Esponjoso	51-193	4.6-15 (GPa)	Cowin 1989
Polímeros			
Borracha sintética	10-12	4	Black 1988
Vítreo	25-100	1.6-2.6 (GPa)	Black 1988
Cristalino	22-40	0.015-1 (GPa)	Black 1988
Ligas Metálicas			
Aço	480-655	193 (GPa)	Black 1988
Cobalto	655-1400	195 (GPa)	Black 1988
Platina	152-485	147 (GPa)	Black 1988
Titânio	550-860	100-105 (GPa)	Black 1988
Cerâmicas			
Óxidos	90-380 (GPa)	160-4000 (GPa)	Heimke 1986
Hidroxiapatita	600	19 (GPa)	Heimke 1986
Compósitos			
Fibras	0.09-4.5 (GPa)	62-577 (GPa)	Black 1988
Matrizes	41-106	0.3-3.1	Black 1988

Fonte: Silver (1994)

Outro fator importante a ser considerado além da proximidade da tensão suportada pelo material com aquela suportada pelo osso seria a porosidade e o tamanho médio dos poros do material de implante.

Segundo Barbanti. et al. (2005) “A influência da porosidade e geometria do suporte é relatada como um dos fatores determinantes no crescimento celular”. Acrescentando, Kanetaki. et al. (2005) “ Um alcance ótimo de tamanho de poro para materiais porosos foi reportado como sendo de 200 a 500 μm ”.

O tamanho do poro metálico pode variar de 20 a 800 μm . Quando o tamanho do poro é menor do que 50 μm , o crescimento do tecido fibroso ocorre preferencialmente ao crescimento ósseo. Se os poros forem maiores que 400 μm , a resistência da fixação diminui acentuadamente. O poro ideal para rápida fixação e resistência deverá ser de 100 a 400 μm (DIAS et al., 1993).

Em polímeros absorvíveis, apresentando estruturas com 85% de porosidade média, e com tamanho de poros variando na faixa entre 50-150 μm , percebeu-se que quanto maior o tamanho do poro do material, maior a taxa do crescimento celular, devido à facilidade de difusão dos nutrientes dos fluidos orgânicos locais (BARBANTI et al., 2005).

Para biocerâmicas, poros maiores que 100 μm favorecem o crescimento do osso através do material. Este tamanho de poro, que define a porosidade ótima das biocerâmicas, está relacionada à necessidade de fornecer um suprimento sanguíneo ao tecido conectivo em crescimento, fator que só ocorre com materiais com poros maiores que 100 μm . (KAWACHI et al., 2000).

Todos estes parâmetros estudados, potencialmente devem ser usados para obtenção de espumas metálicas em aplicações biomédicas para alcançar características favoráveis a sua utilização como material de implante.

2.5 Espumas Metálicas

Espuma metálica é uma nova classe de materiais com densidade extremamente baixa e combinação sem igual de propriedades mecânicas, térmicas, elétricas e acústicas. Têm potencial para amplas aplicações, tais como: componentes estruturais ultraleves, materiais para centro de estruturas sanduíches, isolante térmico e dispositivo de absorção de energia, ruído, implantes e outros (PARK; NUTT, 2000c; WEN; MABUCHI et al., 2001).

Além disso, é conhecido que materiais porosos são apropriados para implantes cirúrgicos porque os poros permitem a interação óssea e dão uma firme união entre os implantes e o osso humano (KANETAKE; KOBASHI, 2005).

Materiais porosos não só encorajam o crescimento do osso de forma mais regular, mas também permite ao osso crescer no próprio implante, enquanto melhora a retenção reduzindo assim as chances de fadiga. (BLACKWOOD, 2003).

É especialmente atraente que a resistência e o Módulo de Young dos materiais celulares possam ser ajustados pelo controle da porosidade, para se assemelharem ao osso natural. Porém, os métodos para produção de espumas metálicas biocompatíveis estão longe de perfeitos porque os requisitos de projeto de implante poroso dependem da morfologia do poro, tamanho de poro, porosidade e alta pureza, para garantir as propriedades biomecânicas e a biocompatibilidade (WEN; MABUCHI et al., 2001).

Neste capítulo serão abordados alguns materiais, ligas e métodos utilizados para obtenção de espumas metálicas.

Kanetake e Kobashi (2006) fabricaram espumas intermetálicas (aluminídio de níquel) e compósitos porosos de matriz de titânio ($TiB_{(2)}$, TiC/Ti) por reações de combustão. A relação da mistura de Al/Ni foi um parâmetro importante no controle da porosidade, sendo que a maior porosidade foi obtida para o composto $NiAl_3$ (45%), enquanto a mínima foi obtida no composto Ni_3Al (<5%). No entanto, a adição de 5% em volume de um agente espumante (mistura de Ti + B_4C) ao composto Al_3Ni aumentou a porosidade da espuma para cerca de 80%. Compósitos de titânio (TiC/Ti e TiC , $TiB_{(2)}/Ti$) foram fabricados por reações entre titânio e pó não metálico (carbono ou B_4C). A relação de mistura de pós elementares (composição do material) foi um fator importante para a morfologia das células dos compósitos porosos de titânio. Uma composição rica em cerâmica foi apropriada para obter um material com células abertas, enquanto células esféricas fechadas formaram-se em uma composição rica em metal.

Wen, Yamada e Hodgson (2005) fabricaram com sucesso espuma de titânio puro com porosidade de aproximadamente 70% com bom módulo de Young. Entretanto essa espuma é demasiadamente fraca quando comparada ao osso cortical. Conseqüentemente é crucial no desenvolvimento de novas espumas de Ti a obtenção de porosidade elevada e ao mesmo tempo o aumento da resistência. Foi realizado um estudo com uma nova liga $TiZr$ biocompatível utilizando (MA) *Mechanical Alloying*, que é uma técnica versátil e vem sendo explorada extensivamente para elaboração mecânica de ligas que utilizam misturas ou pós elementares para formação de liga homogênea. Pós da liga $TiZr$ de composição estequiométrica, amorfos, foram sinterizados, onde a relação de bolas por peso de pó foi de 20:1. As espumas da liga $TiZr$ foram fabricadas com uma densidade relativa de aproximadamente 0.3. O tratamento térmico de sinterização foi executado a uma temperatura de 1300°C por 2h. O tamanho do macroporo das espumas foi de 220 a 500 μm , também havia microporos distribuídos nos contornos dos macroporos com variados tamanhos. A tensão de compressão e o módulo de Young da espuma foi de 78.4 MPa e 15.3 GPa, respectivamente.

Wen et al., 2001, fabricaram com sucesso, metais porosos biocompatíveis, inclusive Ti e Mg por meio da metalurgia do pó. Espumas de Ti e espumas de Mg foram produzidas com uma estrutura celular aberta; com distribuição de tamanho de poros de 200-500 μm , convenientemente ajustados para substituição do osso poroso. A porosidade obtida foi de 78% e 50% para espumas de Ti e espumas de Mg, respectivamente. A resistência a compressão obtida foi de 35 MPa e módulo de Young de 5.3 GPa para espumas de Ti; enquanto a resistência a compressão foi de 2.33 MPa e módulo de Young de 0.35 GPa para espumas de Mg. Ambas as espumas, de Ti e Mg, são presumivelmente resistentes o suficiente para resistir a manipulação durante a implantação *in vivo*. Estas espumas de Ti e espumas de Mg podem ser usadas como materiais de implantes biocompatíveis porque sua estrutura celular aberta permite o crescimento interno dos novos tecidos ósseos, endotelial e o transporte dos fluidos corpóreos.

2.6 Espumas de Aço Inoxidável

Um implante de material poroso com estrutura adequada de poros, com propriedades mecânicas apropriadas, e, além disso, confeccionado com material metálico biocompatível para proporcionar melhor interação com o osso, tem sido buscado como substituto ósseo ideal.

Pórem, o material implantado deve ser forte bastante e durável para resistir às cargas fisiológicas colocadas neste, durante anos.

Então, como mostrado anteriormente na tabela 3, o módulo elástico do osso natural é de 10 a 20 GPa, que é muito mais baixo que o osso artificial feito de aço inoxidável 316L, tendo em vista que o módulo elástico do aço é de 193 GPa. Um modo de aliviar este problema é reduzir o módulo de elasticidade dos materiais metálicos introduzindo poros, minimizando danos aos tecidos adjacentes e eventualmente prolongando a vida do dispositivo.

A inerente resistência do aço combinado com a redução da densidade da espuma pode produzir um material atrativo com resistência razoável, densidade reduzida e altamente eficiente na absorção de energia. Porém, o controle do processo para alcançar uniformidade e controlar a estrutura porosa é atualmente um grande desafio. (PARK; NUTT, 2000b).

Para a produção da espuma de aço, um dos métodos utilizado é a mistura do pó metálico com um agente espumante. Idealmente, o agente espumante deve ser distribuído

homogeneamente e bem disperso por toda amostra semi-acabada para alcançar uma distribuição uniforme na espuma. (PARK; NUTT, 2000c). Porém, a densidade do agente espumante é muito menor que a do pó de aço, e conseqüentemente os dois tendem a segregar para o topo e regiões inferiores da mistura. Especial atenção é dedicada desta maneira para os métodos de uniformização da distribuição dos pós, incluindo operação de mistura e moagem em moinho de bola. A espuma é formada pela expansão do compacto durante aquecimento até temperaturas próximas ao ponto de fusão da liga, através da liberação de gases devido à decomposição do agente espumante. A espuma resultante é formada por uma estrutura de células fechadas de densidade relativamente baixa. Este processo tem sido usado com êxito para a sinterização das espumas de alumínio, no entanto existem poucas tentativas para se aplicar o processo para o aço, (PARK, NUTT; 2000b) devido ao seu alto ponto de fusão e baixa viscosidade do fundido (PARK, NUTT; 2000c).

A espuma de aço inoxidável apresenta vantagens quando comparada a espumas de alumínio, como aumento da resistência, rigidez específica, baixo custo de matéria-prima e compatibilidades com estruturas de aço.

Segundo Dewidar et. al (2007),

Na sinterização de materiais porosos, as propriedades mecânicas são dependentes de dois parâmetros: 1) o tamanho dos empescoamentos entre as partículas que determina a intensidade na área de contato entre elas; 2) a distribuição da tensão ao redor dos poros (onde o nível de concentração de tensão é dependente da geometria, tamanho e forma dos poros). Seriam esperados fatores de concentração de tensão mais altos com poros pequenos de forma altamente irregular.

Vários experimentos têm sido realizados a fim de obter o melhor processo e propriedades mecânicas das espumas porosas de aço inoxidável 316L para aplicações biomédicas. Um deles estudados por Dewidar et al. (2007) visa à produção de espumas de aço inoxidável 316L por meio da metalurgia do pó, incluindo sinterização seletiva por laser (SLS) *selective laser sintering*, e sinterização tradicional com o uso do forno. Trata-se de uma técnica avançada na produção de componentes de vários materiais com formas complicadas. A sinterização a laser é um processo muito complicado e vários parâmetros influenciam no mecanismo de sinterização, entre eles: potência do laser (P), velocidade de varredura (v), espaço de varredura (h), densidade da camada (d), e temperatura de descanso. As propriedades mecânicas do aço inoxidável poroso 316L que podem potencialmente ser usados em aplicações biomédicas foram alcançadas usando o processo de sinterização seletiva a laser para a obtenção das amostras a verde que foram subseqüentemente sinterizadas em um processo tradicional utilizando um forno a vácuo. Para a mistura inicial foi utilizado o pó de

aço inoxidável 316L ($40 \mu\text{m}$) produzido por atomização a gás, coberto com uma mistura de resinas termoplástica (cera e fenólico). As amostras a verde foram sinterizadas a uma temperatura de 1150°C por 2h. Obtiveram-se, então, os seguintes resultados:

- aumento da porosidade;
- diminuição na densidade das amostras verdes;

- outro fator observado é o módulo de elasticidade, o módulo elástico aumenta com a diminuição da porosidade. As amostras com baixa porosidade de 40% mostra um alto módulo elástico de 43 GPa. Quando a porosidade aumenta de 40% para 50% o módulo elástico é somente 26 GPa.

Gradzka-Dahlke et al. (2007) realizaram outro estudo com aço inoxidável poroso 316, preocupados com o desenvolvimento de materiais porosos que facilitem o movimento do quadril autolubrificante. Neste estudo foram investigadas amostras obtidas com várias estruturas porosas, utilizando o método de metalurgia do pó. Foi observada diferente fricção em materiais não porosos. Os resultados deste teste afirmaram que sinterização porosa com porosidade similar e estrutura com grandes poros assegurou as melhores condições de lubrificação. Na caracterização microestrutural, o tamanho do poro foi estimado utilizando um sistema de análise de imagens. Nas amostras feitas com pó de granulometria mais fina, o tamanho das partículas foi de $125 - 150 \mu\text{m}$, predominantemente pequenos, principalmente com área abaixo de $5000 \mu\text{m}^2$. Por outro lado, na sinterização com pó de granulometria mais grossa, um grande número de ótimos poros com tamanho de partículas de $430-600 \mu\text{m}$ com área de extensão de $10,000 - 100,000 \mu\text{m}^2$. Estas amostras foram obtidas com diferentes pressões de compactação 500 MPa e 700 MPa. A forma do poro segundo os autores, influencia nas propriedades funcionais da sinterização metálica. Poros de forma mais regular e grande facilitam a circulação do líquido lubrificante.

3 Procedimento Experimental

No presente trabalho foram produzidas amostras porosas em aço inoxidável austenítico 316L pelo processo de metalurgia do pó, utilizando-se carbonato e bicarbonato de amônio como agente espumante. Os itens a seguir apresentam um detalhamento do procedimento experimental utilizado em cada etapa deste trabalho, as quais são esquematizadas no fluxograma da figura 1.

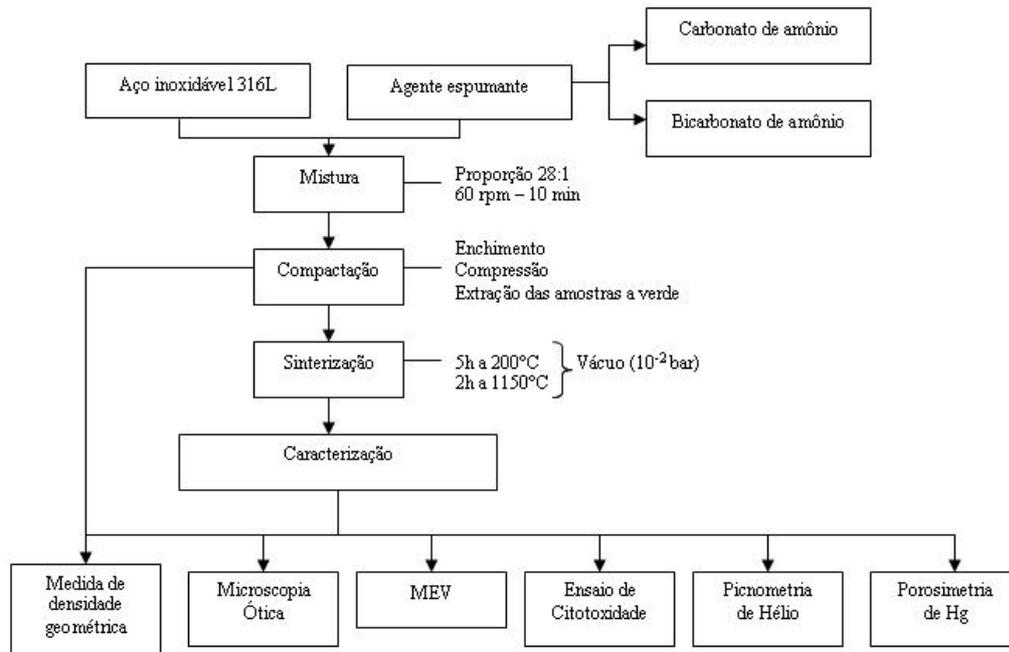


Figura 1 - Fluxograma representativo do procedimento experimental.

3.1 Materiais

Como material de partida foram utilizados pó de aço inoxidável 316L, doado pela Metalpó (Ind. E Com. Ltda, São Paulo), e como agentes espumantes o carbonato de amônio da marca Synth e o bicarbonato de amônio da marca VETEC. A composição química em porcentagem em peso do pó de aço inoxidável 316L segundo especificação da Metalpó é apresentada na Tabela 4, enquanto o resultado da análise granulométrica também fornecida pela Metalpó é mostrado na Tabela 5.

Tabela 4 - Composição química em porcentagem em peso do aço inoxidável 316L.

Cr	Ni	Mn	Si	S	C	P	Mo	Esterato de Lítio*	Kenolube*
18,0	14,0	0,5	1,0	0,03	0,03	0,045	3,0	1,05	0,21

* Aditivos para facilitar a compactação e desmoldagem.

Tabela 5 - Distribuição granulométrica (%) do aço inoxidável 316L.

Malha ASTM	Mínimo	Máximo	Abertura Nominal
+100		3	150 μm
+150	8	12	113 μm
+325	32	36	45 μm
-325	35	45	45 μm

3.3 Produção das Espumas em Aço Inoxidável 316L

Com o objetivo de produzir amostras com diferentes porosidades, cerca de 50% e 70%, foram realizadas misturas de pós do aço inoxidável 316L com pós de carbonato e bicarbonato de amônio na proporção de 15% e 30% em peso, respectivamente.

As misturas foram realizadas em um moinho de bolas do tipo planetário modelo Pulverisette 5 da marca Fritsch, em jarros e meio de moagem em aço AISI 52100 com velocidade de 60 rpm por 10 minutos e utilizando-se uma relação de peso de bolas por peso de pó de 28:1. A figura 2 apresenta fotos dos jarros e bolas de moagem e do moinho.



Figura 2 - (a) Jarro com bolas (b) moinho planetário

As misturas de aço e carbonato ou bicarbonato foram compactadas em uma prensa hidráulica manual da marca Nikkeypar com capacidade de 15T. Foram produzidas amostras em moldes de 20 mm e 10 mm de diâmetro com pressões de compactação que variaram de 94 a 318 MPa.

Para a caracterização por Picnometria e Porosimetria foram fabricadas 3 amostras para cada agente espumante, totalizando 12 amostras (50% em volume de carbonato e bicarbonato de amônio, 70% em volume de carbonato e bicarbonato amônio). Já para o ensaio de citotoxicidade foram fabricadas 30 amostras com 50% em volume de cada agente espumante totalizando 60 amostras e mais 10 amostras com 70% em volume de cada agente espumante totalizando 20 amostras. Foram também fabricadas para o ensaio de citotoxicidade 9 amostras de aço puro, tabela 6.

Tabela 6 - Pressões de compactação em MPa utilizadas na compactação das amostras e suas respectivas utilizações. 50% e 70% correspondem a porcentagens em volume dos respectivos agentes espumantes.

Utilização	Pressão de Compactação (MPa)			
	Aço inoxidável 316L + Carbonato de amônio		Aço inoxidável 316L + Bicarbonato de amônio	
	50%	70%	50%	70%
Caracterização MO e MEV	93,6			
	155,9	286,5	191	191
	218,3		255	318
	286,5		318	
Caracterização Picnometria de He e Porosimetria de Hg	286,5	286,5	286,5	286,5
Ensaio de Citotoxicidade + MEV	286,5	286,5	286,5	286,5

Observação: As medidas de densidade geométrica foram realizadas em todas as amostras produzidas.

A sinterização das amostras foi realizada a vácuo (10^{-2} bar) em um forno tubular da marca EDG que atinge a temperatura máxima de 1200°C , figura 3. O tubo onde as amostras foram tratadas é de aço inoxidável 304L, tendo suas extremidades refrigeradas a água. O tratamento térmico envolveu dois patamares de temperatura sendo o primeiro a 200°C por 5 horas para decomposição do carbonato e o segundo a 1150°C por 2 horas para sinterização do aço inoxidável. As taxas de aquecimento e resfriamento entre os patamares foram de $30^{\circ}\text{C}/\text{min}$. A temperatura foi sempre medida com auxílio de um termopar tipo K inserido no meio do tubo exatamente sobre a posição das amostras.

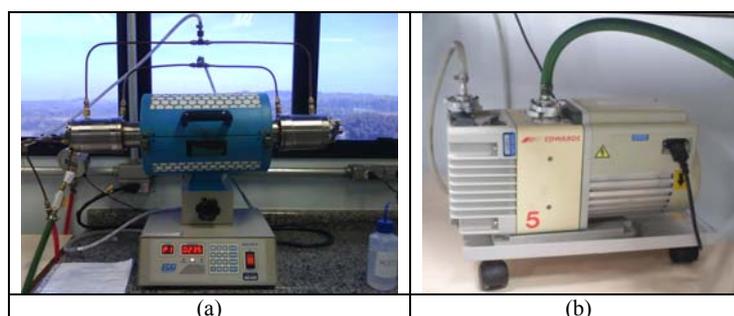


Figura 3 - Tratamento Térmico - (a) forno tubular, (b) bomba de vácuo

Um novo grupo de amostras de aço inoxidável 316L puro sem agente espumante (amostras não porosas) foram produzidas com pressão de compactação 286,5 MPa (2,3 T) e, em molde de 10mm de diâmetro e com cerca de 3mm de espessura. A sinterização das amostras foi realizada em atmosfera controlada a alto vácuo (turbo) na ordem de (10^{-6} bar) em um forno modelo Bipolar, com elemento resistivo de Tântalo (barquinha), a fim de minimizar totalmente a oxidação, a uma temperatura máxima de 1150°C por 2h. A rampa de aquecimento foi de 30°C/min seguido de resfriamento (lento), pelo mesmo tempo, com o objetivo de comparar os tratamentos térmicos e ter um parâmetro do efeito dos poros nos ensaios de Citotoxicidade.

O processo de sinterização foi realizado no laboratório de Tratamento Térmico – LTT/EEL - USP – Escola de Engenharia de Lorena/ Campus II – DEMAR/ Departamento de Materiais.

3.4 Caracterização das amostras

3.4.1 Densidade

Todas as amostras foram pesadas em uma balança analítica da marca Mettler Toledo max 210g d=0,1 mg, figura 4 e tiveram suas espessuras e diâmetros medidos com um paquímetro 0,05mm, após a compactação e após a sinterização, para determinação de suas densidades e das densidades relativas.



Figura 4 - Balança analítica

3.4.2 Caracterização Microestrutural

As amostras sinterizadas foram preparadas para caracterização microestrutural por processos convencionais de preparação metalográfica. As amostras foram cortadas em uma cortadeira da marca Struers, modelo Miniton, com velocidade de 250 a 300 rpm e embutidas a quente em baquelite, para análise das superfícies das pastilhas e das seções transversais, figura 5. As amostras embutidas foram lixadas em lixas de grão 240, 320, 400 e 600 e polidas com alumina em uma politriz mecânica.

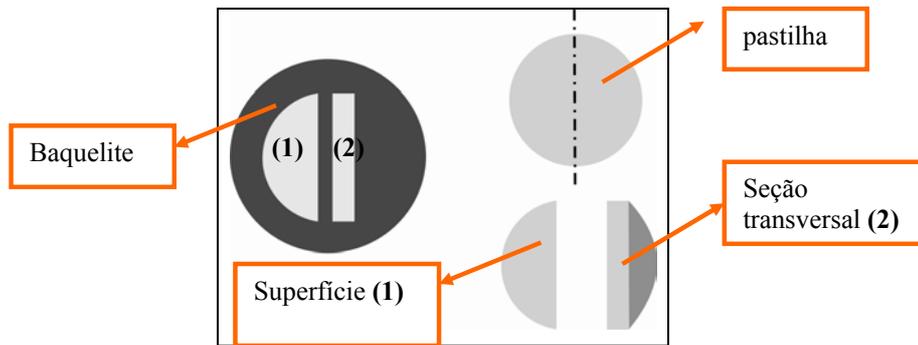


Figura 5 - Desenho esquemático mostrando as superfícies da pastilha que foram observadas por microscopia

A análise microestrutural das amostras polidas foi realizada por microscopia ótica em um microscópio metalográfico da marca Olympus, equipado com câmera digital para captura de imagens, as quais foram analisadas pelo software Image Pro Plus.

Para caracterização por microscopia eletrônica de varredura as amostras sofreram previamente um processo de desumidificação a vácuo por um período de 24h, devido a quantidade de poros presentes nas amostras. A caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica – LME/EEL – Escola de Engenharia de Lorena/ Campus II – DEMAR/ Departamento de Materiais, utilizando-se um microscópio tipo 1450 VP, fabricado pela LEO Instrumental, e no Laboratório de Caracterização Estrutural – LCE do Departamento de Engenharia de Materiais da Universidade Federal de São Carlos, DEMa/UFSCar, utilizando-se um microscópio TMP da marca Philips.

3.4.3 Porosimetria de Mercúrio (Hg)

As amostras com 50 e 70 % de porosidade, com pressão de compactação 286,5 MPa, foram analisadas por porosimetria de mercúrio que permite a determinação do volume de poros existentes em determinadas faixas de diâmetro de 1000 micrômetros a 6,53 nanômetros. O procedimento experimental foi realizado de acordo com a norma ASTM D 4284/83 – Method for Determination of Pore Volume Distribution of Catalysts by Mercury Intrusion, com pré-tratamento de 120°C/2h com objetivo de limpar as amostras, retirando umidade uma vez que estas foram expostas à atmosfera, utilizando porosímetro da marca Quantachrome modelo Poromaster 33, que permite faixa de pressão a partir de 0 até 31,6 ksi. Devido as amostras apresentarem variação do volume intrudado, os resultados foram avaliados na faixa de pressão de 0 a até 50 psi. O ensaio de porosimetria foi realizado no Laboratório Associado de Combustão e Propulsão (LCP/INPE) – Instituto Nacional de Pesquisa Espacial no CES/ Centro Espacial de Cachoeira Paulista.

3.4.4 Picnômetro (He)

Amostras com 50 e 70 % de porosidade, com pressão de compactação 286,5 MPa, também foram analisadas por picnometria de gás que determina o volume verdadeiro de um sólido, mesmo que poroso, por variação da pressão de gás numa câmara de volume conhecido. Normalmente utiliza-se hélio porque este gás, além de inerte, penetra facilmente nos poros (acessíveis) da amostra, devido ao pequeno tamanho dos seus átomos, permitindo, assim, determinar o volume do sólido com mais rigor. Foi realizado um pré-tratamento de 120°C/2h com objetivo de limpar as amostras, retirando umidade uma vez que estas foram expostas à atmosfera.

O ensaio de picnometria foi realizado no Laboratório Associado de Combustão e Propulsão (LCP/INPE) – Instituto Nacional de Pesquisa Espacial no CES/ Centro Espacial de Cachoeira Paulista, utilizando um Picnometro de Hélio (He) da marca Micromeritics modelo Multivolume 1305.

3.5 Ensaio *in vitro* (citotoxicidade)

O teste MTT (3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difenil tetrazolio), foi utilizado para analisar a atividade mitocondrial de células L929 incubadas com as amostras produzidas. O ensaio de MTT é um dos métodos mais utilizados para medidas de proliferação celular e citotoxicidade (LIU et al., 1997; ABE; MATSUKI, 2000) (apud MACHADO, 2006). Em células vivas, o sal tetrazolium MTT é reduzido a formazana (1-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-3,5-diphenylformazan), o qual pode ser analisado colorimetricamente. A redução do MTT é geralmente atribuída a atividade mitocondrial, mas isto tem sido também relatado para enzimas não-mitocondriais, bem como endossomos e lisossomos (VELLONEN; HONKAKOSKI; URTTI, 2004 apud MACHADO., 2006).

Para o ensaio, as amostras de aço inoxidável 316L com carbonato e bicarbonato foram divididas em 5 grupos como demonstrado na tabela 7. As amostras escolhidas para a realização do ensaio de citotoxicidade foram as amostras de aço inoxidável 316L com 50% e 70% de agente espumante carbonato e bicarbonato, prensadas com 286,5 MPa, por apresentarem melhor condição na caracterização microestrutural e as amostras de aço puro.

Tabela 7– Classificação por grupos das amostras para ensaio de citotoxicidade

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5
50% de porosidade (Aço 316L + Carbonato)	50% de porosidade (Aço 316L + Bicarbonato)	70% de porosidade (Aço 316L + Carbonato)	70% de porosidade (Aço 316L + Bicarbonato)	Aço puro

Como citado no item “3.3 Produção das Espumas em Aço Inoxidável 316L”, para o ensaio de citotoxicidade foram produzidas 60 amostras de aço inoxidável 316L com 50% de porosidade, sendo 30 delas produzidas usando o carbonato de amônio como agente espumante e as outras 30 utilizando o bicarbonato de amônio. Já as amostras com 70% de porosidade foram produzidas em um número total de 20, sendo 10 com carbonato e 10 com bicarbonato de amônio. Todas as amostras foram compactadas em um molde com 10mm de diâmetro e com cerca de 3mm de espessura.

Para manter a qualidade das amostras, visando a retirada das impurezas que ficaram no material após a sinterização, antes do ensaio de citotoxicidade as amostras passaram por um processo de Decapagem e Passivação por meio de um banho ácido: 15% HNO₃ + 2% HF, temperatura de 50 a 60 °C. Após o banho ácido as amostras foram lavadas em água corrente, secadas e colocadas na estufa a 100°C por 15 minutos para retirar toda a umidade e esterilizadas em Ultra-Violeta por 24h.

As amostras decapadas, foram divididas em triplicatas (50% de porosidade) e em duplicata (70% de porosidade) em meio às placas de 24 poços como mostrado na figura 6. Os grupos 1 e 2 foram levados ao ensaio de citotoxicidade separados dos grupos 3 e 4 para garantir qualidade tanto no ensaio como na contagem da atividade mitocondrial, devido a grande quantidade de amostras.

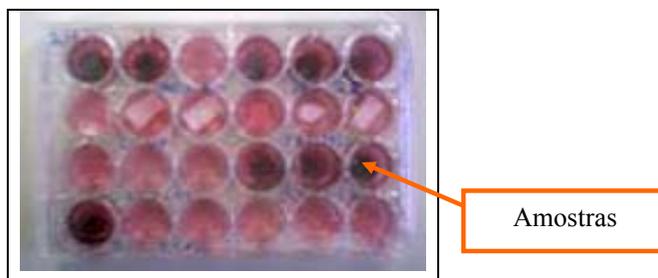


Figura 6 – Emplacamento das amostras de aço inoxidável em meio à cultura de células (placa de 24 poços).

As amostras de aço puro foram divididas em triplicatas em meio às placas de 24 poços, estas amostras foram apenas esterilizadas por 24h em Ultra-Violeta, não sendo realizado o processo de decapagem.

3.5.1 Linhagem Celular

Para a cultura de células foi utilizada a linhagem L929 (isolada de tecido conjuntivo de camundongo), cultivada em meio MEM (meio mínimo essencial), suplementado com 10 % de Soro fetal bovino (SFB). A cultura foi mantida em estufa a temperatura de 37° C em atmosfera de 5% de CO₂. As células foram adquiridas do Banco de células do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo - SP.

3.5.2 Manutenção da Cultura Celular

O estoque celular foi mantido em nitrogênio líquido. Partindo deste, foi preparado uma garrafa de cultura de 25cm², contendo 1 mL de cultura de células (~10⁶ células/ mL), adicionando-se 2 mL de meio de cultura MEM, enriquecendo com 10% SFB. As células foram mantidas na estufa com controle automático de temperatura 37°C e pressão de CO₂. O crescimento foi acompanhado por meio da observação em microscópio invertido.

Estas células foram subcultivadas após tripsinização, quando a densidade celular formou uma monocamada confluenta. Após o período de 3 minutos com 2 mL de tripsina retirou-se a mesma, adicionando 3 mL de meio de cultura MEM suplementado com 10% de SFB. Para a liberação das células da parede da garrafa, usaram-se jatos fortes com o auxílio de pipetador automático. Deste volume foram retirados alíquotas de 1 mL e passados para novas garrafas, adicionando-se mais 2 mL de meio MEM e incubadas em atmosferas de 5 % de CO₂ a 37°C.

Para manter o estoque foi realizado o congelamento das células durante a utilização das mesmas. As células foram removidas das garrafas com auxílio da tripsina e centrifugadas por 8 minutos a 12000 rotações por minuto. Desprezou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em meio de congelamento contendo 60% de meio MEM, 30% de SFB e 10% DMSO (Dimetilsulfóxido). Transferiu-se este material para criotubos e estocou-se em nitrogênio líquido.

3.5.3 Ensaio de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difenil tetrazolio)

O ensaio de citotoxicidade foi avaliado de acordo com a norma ISO 10993-5 "Avaliação biológica dos dispositivos médicos- Ensaio de citotoxicidade: métodos *in vitro*" (ou EN 30993-5), utilizando contato direto. A atividade proliferativa da cultura de células foi determinada com o ensaio colorimétrico MTT, como descrito (LOBO et al., 2007). Fragmentos de Látex foram utilizadas como controle positivo. Fragmentos de filtro de papel de comprovada natureza atóxico foram utilizadas como controle negativo, Figura7.

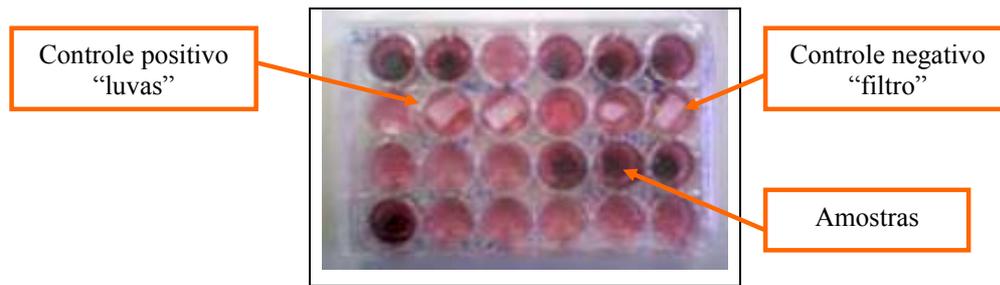


Figura 7 – Grupo controle das amostras de aço inoxidável em meio à cultura de células (placa de 24 poços).

Todas as amostras foram esterilizadas por 24 h sob radiação UV e colocadas em cada um dos 24 poços de cultura. As células foram semeadas em placas de 24 poços em uma concentração de 5×10^5 células/mL, em meio MEM suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco), incubadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂. A viabilidade foi determinada após 24 h, 48 h e 72 h. Após o tempo de incubação as amostras e os fragmentos dos controles, positivo e negativo, foram retirados dos respectivos poços, figura 8.

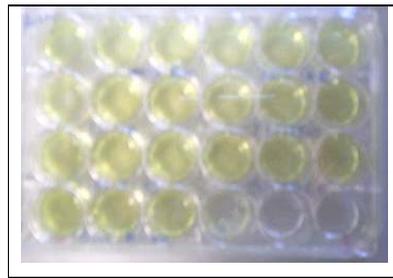


Figura 8 – Placa de 24 poços após a incubação, foram retirados os grupos controles

Só as células bem aderidas às paredes foram incubadas com uma solução de sal tetrazólio (MTT), [3-[4,5-dimetiltiazol]-2,5-difenil tetrazolio] (Sigma®) por 4 horas a 37 ° C, figura 9.



Figura 9 – Placa de 24 poços após incubação com a solução tetrazólio MTT

O MTT foi reduzido para uma formazana insolúvel, precipitado succionato desidrogenase de células viáveis. Após a remoção do meio, dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma®) solução (1:1) foram adicionados a cada poço. Após completa solubilização dos cristais de formazana, figura 10. A absorção do conteúdo de cada poço foi medido a 570 nm com um leitor de 24 microplacas em um espectrofotômetro (Spectra Count, Packard). A viabilidade celular foi calculada pela normalização da densidade óptica (DO) para o controle negativo. As amostras incubadas com as células para o MTT, foram utilizadas para Microscopia Eletrônica de Varredura.



Figura 10 – Placa de 24 poços com a adição de DMSO após completar solubilização do azul-escuro cristais de formazana MTT

O ensaio de MTT foi realizado no Laboratório de Cultura de Células/UNIVAP e a caracterização por microscopia eletrônica de varredura (MEV) das amostras emplacadas foi realizada no Laboratório de Microscopia Eletrônica – LME/EEL – Escola de Engenharia de Lorena/ Campus II – DEMAR/ Departamento de Materiais, utilizando-se um microscópio tipo 1450 VP, fabricado pela LEO Instrumental, após a preparação metalográfica.

4 Resultados e Discussão

4.1 Densidade

As figuras 11 e 12 apresentam os gráficos da variação da densidade a verde e δr (densidade relativa), com diferentes pressões de compactação para as amostras fabricadas com 50% de porosidade, utilizando como agente espumante o carbonato de amônio e o bicarbonato de amônio, respectivamente. Observa-se que ambas as amostras mostraram aumento na densidade com aumento da pressão de compactação. No entanto as amostras com bicarbonato de amônio apresentam uma menor densificação para as pressões mais altas. Verificou-se que com o uso do agente espumante carbonato de amônio as amostras estão mais próximas da δ teórica do composto que é de 5g/cm^3 .

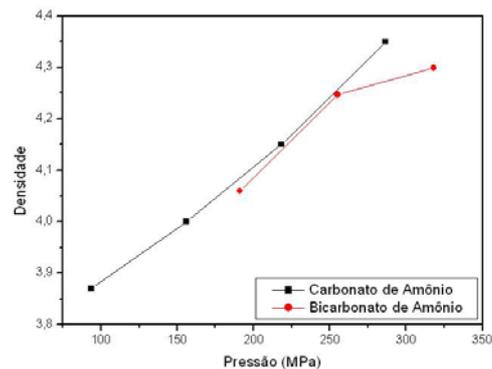


Figura 11 - Variação da densidade da espuma (após compactação a verde) e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio. Amostras com 50% de porosidade.

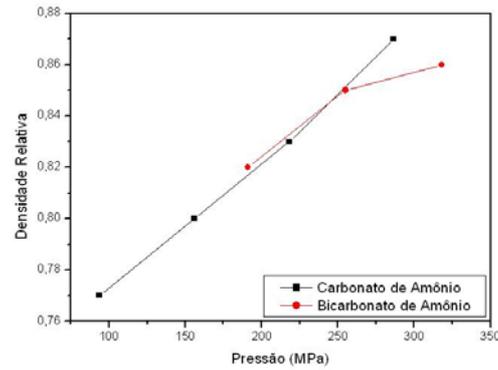


Figura 12 - Variação da densidade relativa (após compactação a verde) da espuma e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio. Amostras com 50% de porosidade.

As figuras 13 e 14 apresentam os gráficos da variação da densidade volumétrica e δr (densidade relativa), respectivamente com pressão de compactação para as mesmas amostras após sinterização. Observa-se que há uma redução na densidade relativa para pressão acima de 300 MPa para a amostra com bicarbonato.

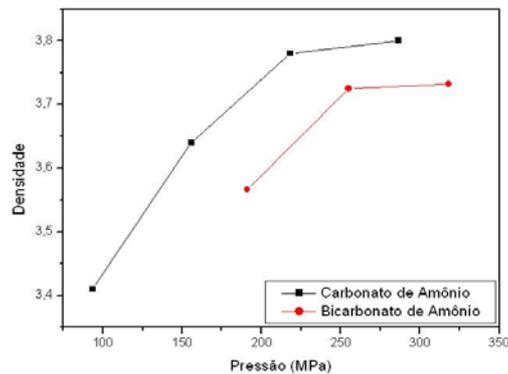


Figura 13 - Variação da densidade da espuma (após sinterização) e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio. Amostras com 50% de porosidade.

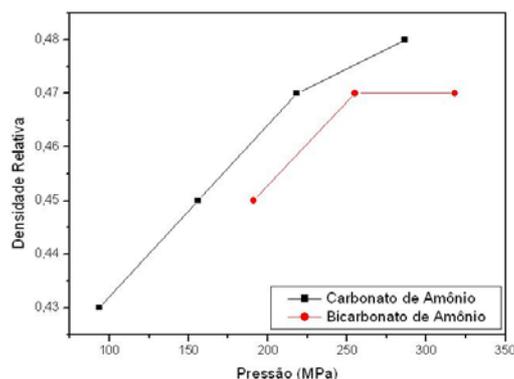


Figura 14 - Variação da densidade relativa da espuma (após sinterização) e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio. Amostras com 50% de porosidade.

A porosidade desejada de 50% foi obtida para as amostras utilizando maiores pressões de compactação, com agente espumante carbonato de amônio. No entanto, este valor não foi alcançado com as amostras, utilizando o agente espumante bicarbonato de amônio.

4.1.2 Amostras de 70% de porosidade

Devido a problemas experimentais, não foi possível obter a variação da densidade com a pressão de compactação para as amostras produzidas com 70% de porosidade na mesma faixa de pressão utilizada para as amostras com 50% de porosidade.

As figuras 15 e 16 apresentam os gráficos da variação da densidade a verde e da δr (densidade relativa) com a pressão de compactação para as amostras fabricadas com 70% de porosidade, utilizando como agente espumante o carbonato de amônio e o bicarbonato de amônio, respectivamente.

Observa-se que as amostras utilizando o agente espumante bicarbonato de amônio, teve um pequeno aumento na densidade quando compactadas com nível de maior pressão, porém este aumento não foi significativo. A amostra utilizando o agente espumante carbonato teve densidade próxima da obtida pelas amostras utilizando o bicarbonato de amônio, ambas as amostras estão próximas da densidade teórica do composto que é de 3,64 g/cm³.

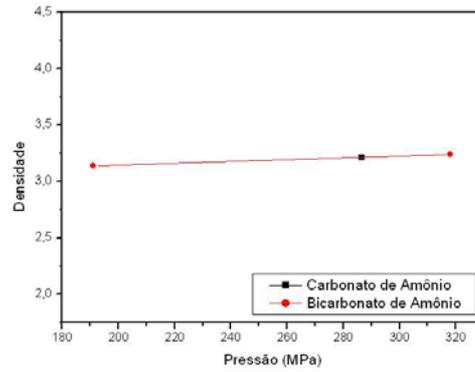


Figura 15 - Variação da densidade da espuma (após compactação a verde) e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio. Amostras com 70% de porosidade.

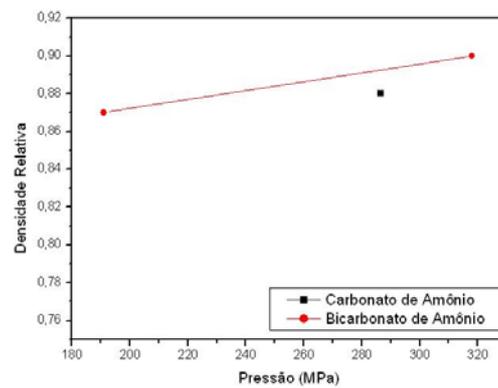


Figura 16 - Variação da densidade relativa (após compactação a verde) da espuma e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio. Amostras com 70% de porosidade.

As figuras 17 e 18 apresentam os gráficos da variação da densidade volumétrica e δr (densidade relativa), respectivamente com pressão de compactação para as mesmas amostras após sinterização. A porosidade de 70% foi obtida para as amostras utilizando maior pressão de compactação, porém o alcance da densidade de 0,30 foi levemente superior para o carbonato e levemente inferior para o bicarbonato de amônio.

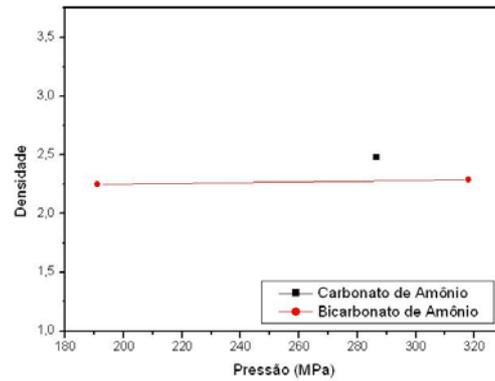


Figura 17 - Variação da densidade da espuma (após sinterização) e variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio. Amostras com 70% de porosidade.

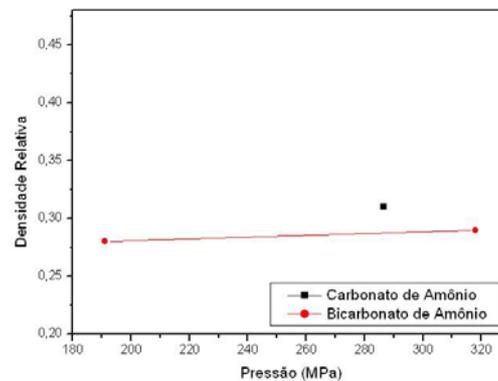


Figura 18 - Variação da densidade relativa da espuma (após sinterização) e no eixo x a variação da pressão de 94 a 318 MPa para os agentes espumantes: carbonato de amônio e bicarbonato de amônio. Amostras com 70% de porosidade.

Baseado nestes resultados iniciais escolhemos a pressão de 286,5 MPa para os ensaios de citotoxicidade, devido a apresentação de melhor compactação a verde e melhores densidade e δr (densidade relativa).

4.1.3 Densidade das Amostras – Ensaio Citotoxicidade

Na tabela 9 são apresentados os valores médios de densidade volumétrica e δr (densidade relativa) obtidos das amostras preparadas para o ensaio de citotoxicidade. As amostras a verde produzidas com o carbonato de amônio apresentam densidades mais

próximas das densidades teóricas dos compostos que são 5 g/cm^3 e $3,636 \text{ g/cm}^3$, para as amostras fabricadas com 50% e 70% de porosidade, respectivamente, que as amostras produzidas com o bicarbonato de amônio. As densidades relativas obtidas nas amostras sinterizadas foram as esperadas pela formulação utilizada, 0,5 e 0,3 para as amostras produzidas com 50% e 70% em volume dos agentes espumantes, respectivamente.

Tabela 8 – Densidade das amostras utilizadas para ensaio de citotoxicidade

Amostra	Porosidade	Verde	Verde	Sinterizada	Sinterizada
		Média/Desv. Pad $\delta \text{ (g/cm}^3\text{)}$	Média/Desv. Pad δr	Média/Desv. Pad $\delta \text{ (g/cm}^3\text{)}$	Média/Desv. Pad δr
Aço inox 316L + Carbonato	50%	$4,563 \pm 0,711$	$0,913 \pm 0,142$	$4,16 \pm 0,678$	$0,521 \pm 0,085$
Aço inox 316L + Bicarbonato	50%	$4,246 \pm 1,04$	$0,849 \pm 0,207$	$3,768 \pm 0,907$	$0,471 \pm 0,113$
Aço inox 316L + Carbonato	70%	$3,38 \pm 0,692$	$0,931 \pm 0,190$	$2,632 \pm 0,420$	$0,33 \pm 0,052$
Aço inox 316L + Bicarbonato	70%	$3,295 \pm 0,802$	$0,899 \pm 0,220$	$2,42 \pm 0,582$	$0,302 \pm 0,073$
Aço Puro	-	$6,775 \pm 1,692$	$0,847 \pm 0,212$	$6,975 \pm 1,746$	$0,869 \pm 0,217$

O resultado apresentado na tabela 8 foi obtido por meio de pesagem e medição de todas as amostras fabricadas antes e após o processo de sinterização. Vale ressaltar que ao todo foram fabricadas 30 amostras com 50% de porosidade, utilizando como agente espumante o carbonato de amônio e mais 30 amostras com 50% de porosidade, utilizando como agente espumante o bicarbonato de amônio. Para 70% de porosidade, foram fabricadas 10 amostras utilizando como agente espumante o carbonato de amônio e mais 10 amostras com 70% de porosidade, utilizando como agente espumante o bicarbonato de amônio.

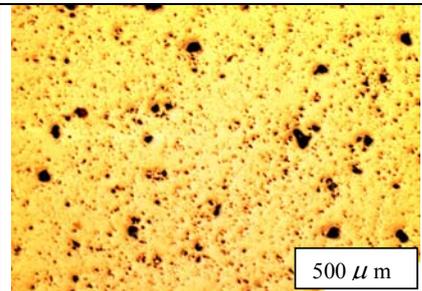
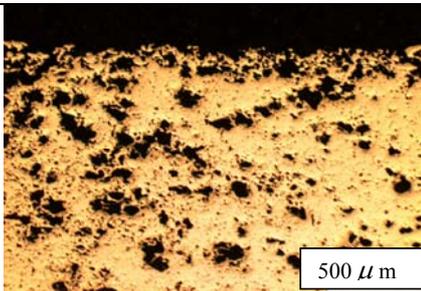
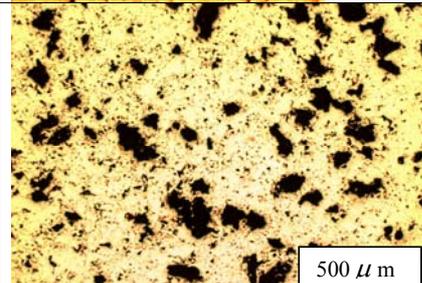
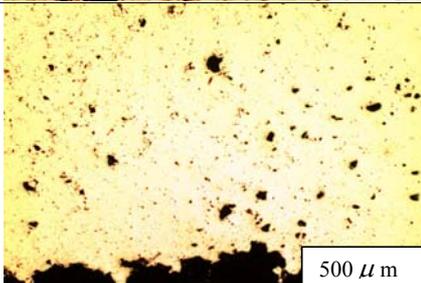
4.2 Caracterização Microestrutural

4.2.1 Amostras com 50% de porosidade

As figuras 19 e 20 apresentam micrografias obtidas por Microscopia Óptica das amostras fabricadas com 50% de porosidade, utilizando como agente espumante o carbonato de amônio e bicarbonato de amônio respectivamente. Foi analisada a distribuição e tamanho dos poros e sua variação com a pressão de compactação nas seções designadas como superfície e seção transversal como mostrado anteriormente na figura 5.

Para as amostras produzidas com carbonato de amônio compactadas com menor pressão de compactação, observa-se uma grande quantidade de poros menores distribuídos próximos dos poros maiores. Já para as amostras compactadas com maior pressão de compactação houve a diminuição dos poros menores, e o aumento na quantidade dos poros maiores.

Nas amostras produzidas com o bicarbonato de amônio, observa-se também a presença de poros menores quando as amostras foram compactadas com menor pressão de compactação, porém a níveis de maior pressão de compactação as figuras mostram que houve um aumento nos poros maiores no material, diminuindo a presença dos poros menores e pode-se observar que os poros começam a ficar mais homogêneos tanto em tamanho quanto em sua distribuição.

50% de porosidade / Carbonato de amônio		Pressão (MPa)
Superfície	Seção Transversal	
		93,6 MPa
		155,9 MPa

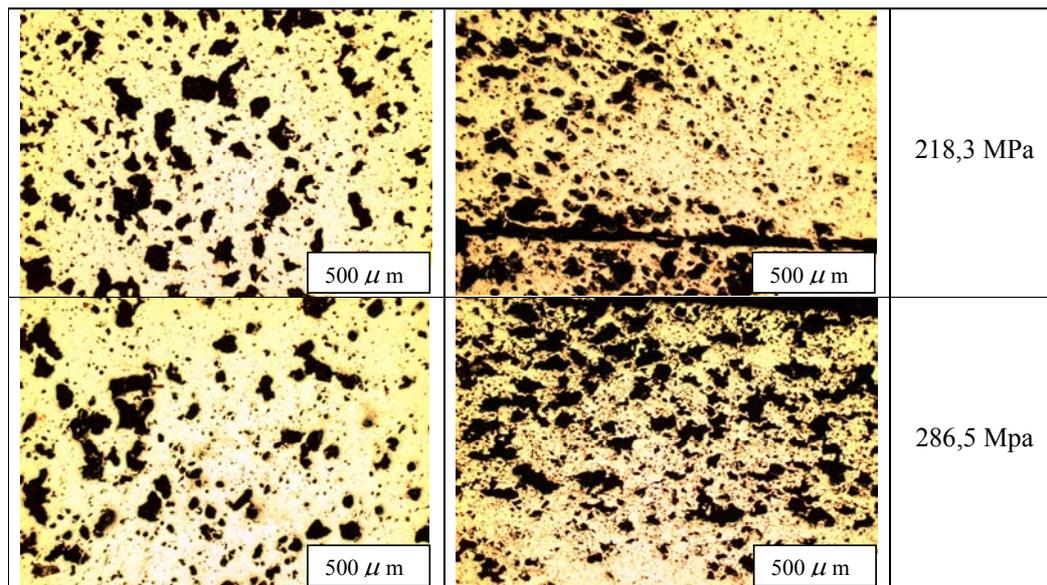
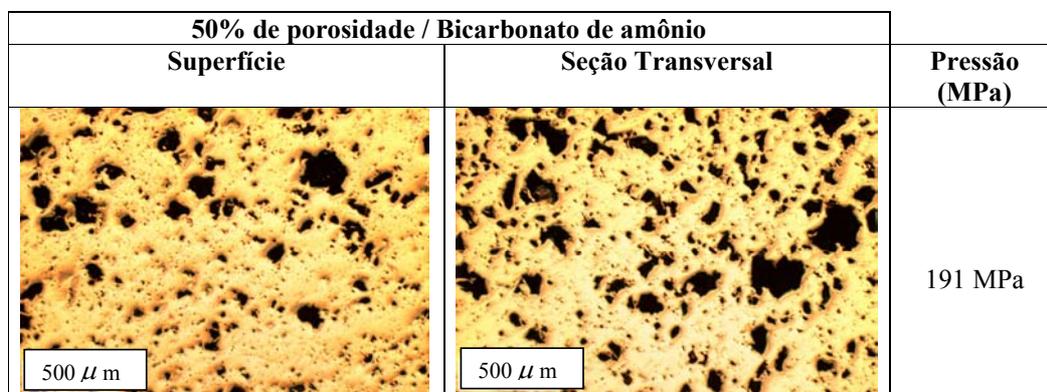


Figura 19 - (Microscopia Óptica) – Micrografia das amostras sinterizadas utilizando o carbonato de amônio, em diferentes pressões de compactação de 93,6 MPa à 286,5 MPa.



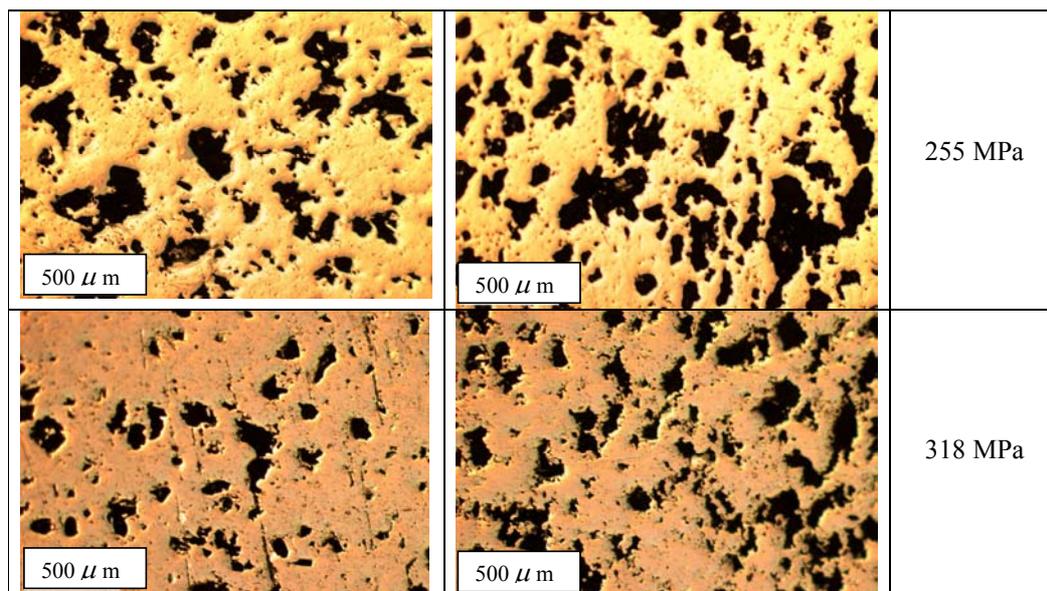


Figura 20 - (Microscopia Óptica) – Micrografia da amostra sinterizadas utilizando o bicarbonato de amônio, em diferentes pressões de 191 MPa à 318 MPa.

4.2.2 Amostras com 70% de porosidade

As figuras 21 e 22 apresentam micrografias obtidas por Microscopia Óptica das amostras fabricadas com 70% de porosidade, utilizando como agente espumante o carbonato de amônio e bicarbonato de amônio respectivamente. Devido a problemas experimentais, não foi possível com as amostras contendo carbonato de amônio e bicarbonato de amônio variação na pressão de compactação.

Foi analisada a distribuição dos poros na superfície e seção transversal para as amostras com carbonato de amônio, utilizando pressão de compactação 286,5 MPa, figura 21 e para o bicarbonato de amônio, utilizando pressão de compactação de 191 e 255 MPa, foi analisada a distribuição dos poros na superfície e seção transversal na figura 22, como mostrado anteriormente na figura 5.

Observa-se que para a amostra produzida com carbonato de amônio compactada com 286,5 MPa, maior pressão de compactação utilizada neste trabalho, não há presença de poros menores distribuídos próximos aos poros maiores, figura 21.

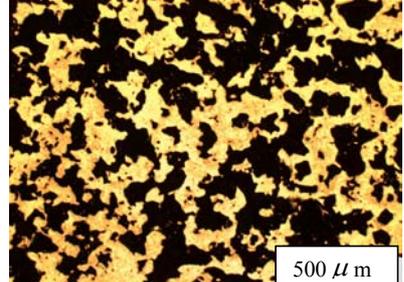
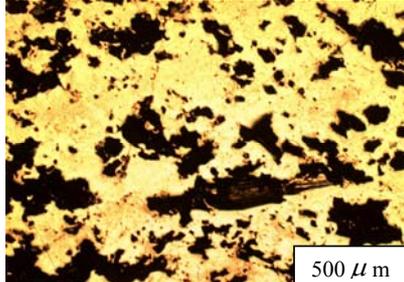
70% de porosidade / Carbonato de amônio		Pressão (MPa)
Superfície	Seção Transversal	
		286,5 MPa

Figura 21 - (Microscopia Óptica) – Micrografia da amostra sinterizada, utilizando o carbonato de amônio, com pressão de 286,5 MPa

As amostras produzidas com bicarbonato de amônio não apresentaram variação significativa na distribuição de tamanho de poros para as pressões de compactação utilizadas, quase não há presença de poros menores distribuídos próximos aos poros maiores. Pode-se verificar que também houve um aumento na quantidade dos poros maiores e estes mostram mais homogêneos, tanto em tamanho quanto em distribuição, figura 22.

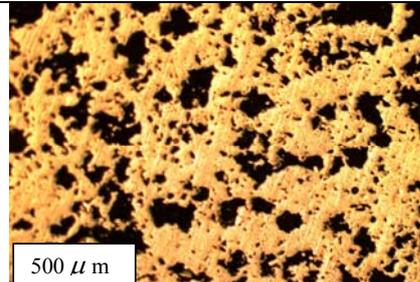
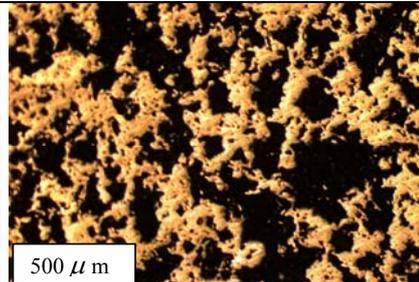
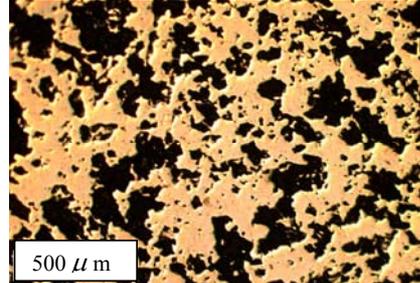
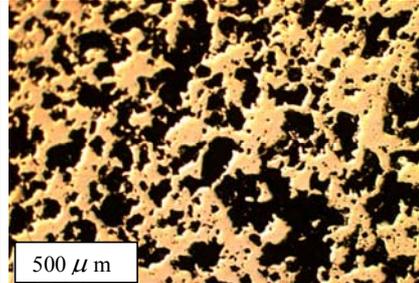
70% de porosidade / Bicarbonato de amônio		Pressão (MPa)
Superfície	Seção Transversal	
		191 MPa
		255 MPa

Figura 22 - (Microscopia Óptica) – Micrografia da amostra utilizando o bicarbonato de amônio, processo de metalurgia do pó em pressão 191 MPa e 255 MPa.

Em relação às figuras da seção transversal, tanto para as amostras de 50% e 70% de porosidade utilizando como agente espumante o carbonato e o bicarbonato de amônio, foi observado no processo de sinterização das espumas, a diferença na distribuição dos poros nas amostras. Muitos poros ficaram segregados na região superior e inferior das amostras conforme figura 23. Park et al, (2001) descreve que este fato pode ser ocasionado devido a densidade do agente espumante ser muito menor que a do pó de aço, e consequentemente os dois tendem a segregar para o topo e regiões inferiores da mistura.

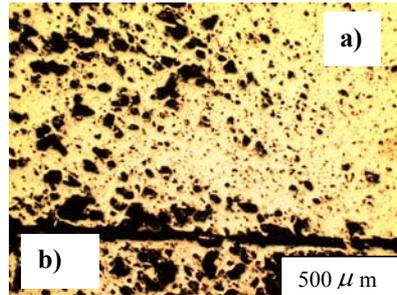


Figura 23 – Amostra da espuma de aço inoxidável 316L (a) face de topo e (b) seção transversal

When, Yamada e Hodgson (2005), com a fabricação de espuma de TiZr apresentando 70% de porosidade conseguiram obter poros maiores interconectados em toda a sua amostra e poros menores distribuídos às extremidades dos poros maiores.

A forma do poro influencia nas propriedades funcionais da sinterização metálica. Segundo Gradzka-Dahlke et. al. (2007) poros de forma mais regular e grande facilitam a circulação do líquido lubrificante.

4.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Excluído: ¶

4.3.1 Amostras com 50% de porosidade

As figuras 24 e 25 apresentam micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras fabricadas com 50% de porosidade, utilizando como agente espumante o carbonato de amônio e bicarbonato de amônio, respectivamente. Foi analisada a distribuição dos poros na superfície e seção transversal para as amostras com carbonato de

amônio, utilizando pressões de compactação de 93,6 a 286,5 MPa, figura 24 e para o bicarbonato de amônio, utilizando pressão de compactação, de 191 a 318 MPa, foi analisada a distribuição dos poros na superfície e seção transversal, figura 25, para as mesmas amostras observas por Microscopia Óptica.

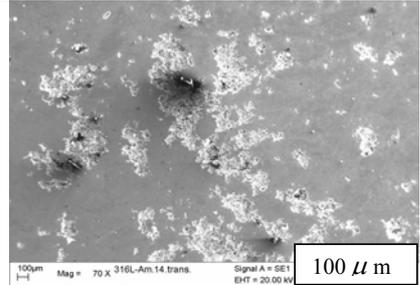
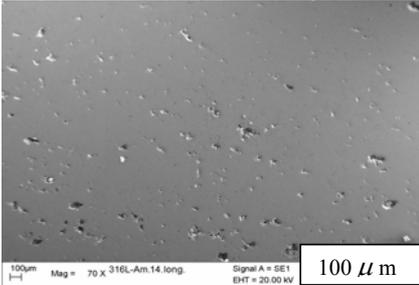
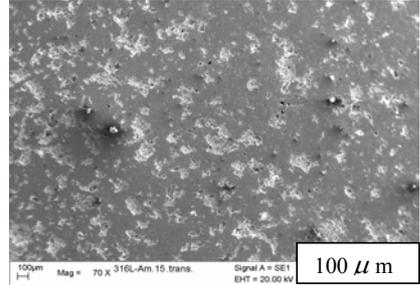
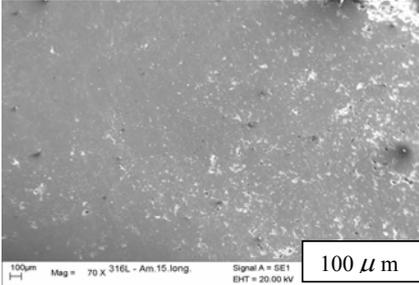
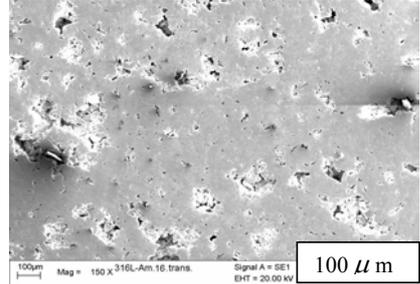
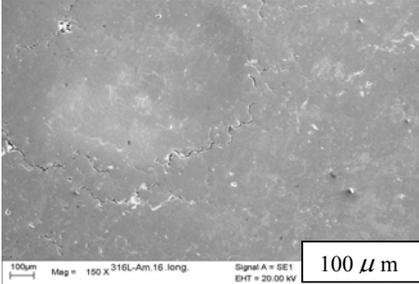
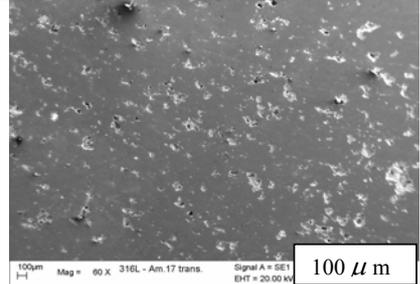
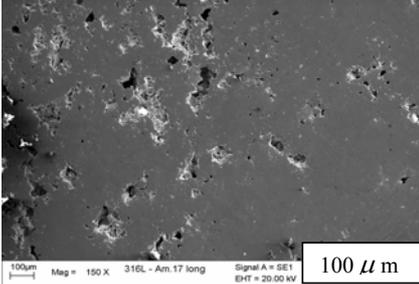
50% de porosidade / Carbonato de amônio		Pressão (MPa)
Superfície	Seção Transversal	
		93,6 MPa
		155,9 MPa
		218,3 MPa
		286,5 MPa

Figura 24 (Micrografia Eletrônica de Varredura - MEV) – amostra utilizando o carbonato de amônio, em diferentes pressões de 93,6 MPa (a) à 286,5 MPa (g).

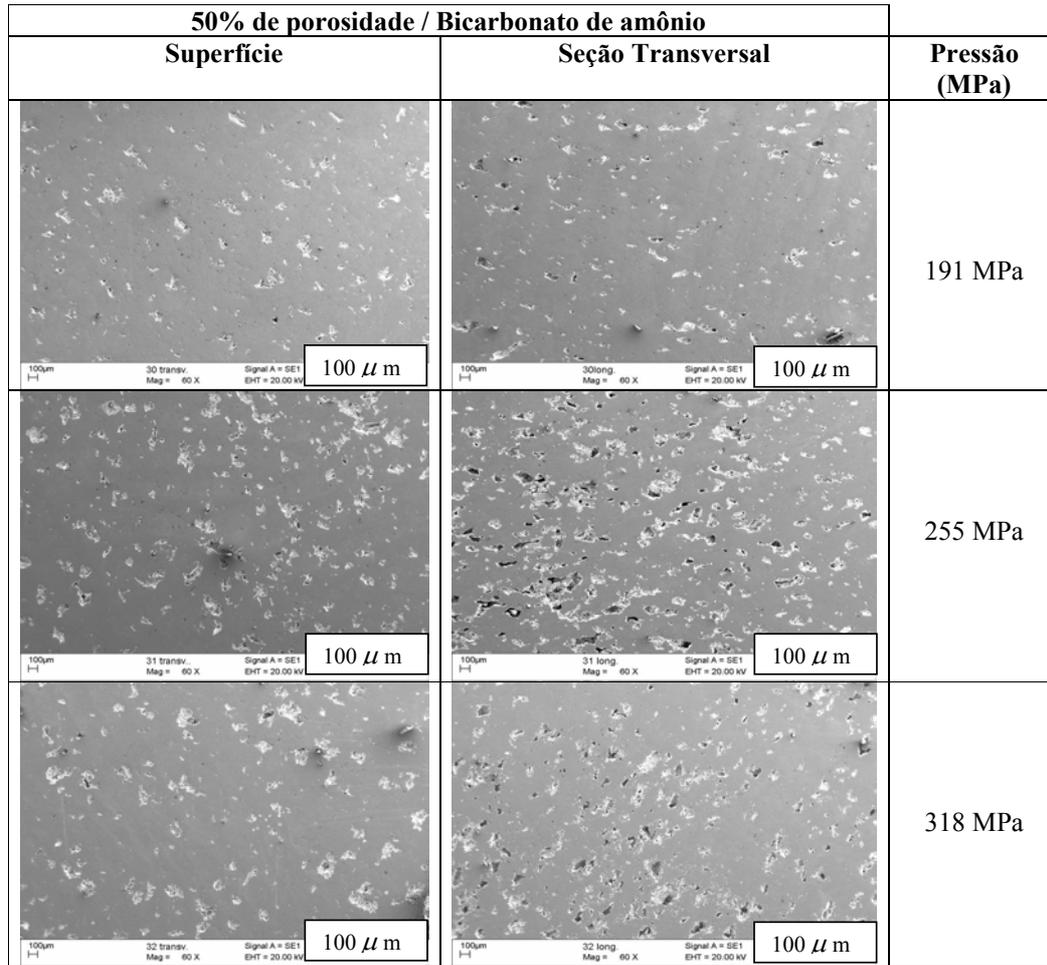


Figura 25 – (Micrografia Eletrônica de Varredura - MEV) – amostra utilizando o bicarbonato de amônio, em diferentes pressões de 191 MPa (a) a 318 MPa (b).

4.3.2 Amostras com 70% de porosidade

As figuras 26 e 27 apresentam micrografias obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura das amostras fabricadas com 70% de porosidade, utilizando como agente espumante o carbonato de amônio e bicarbonato de amônio respectivamente. Devido a problemas experimentais, não foi possível com as amostras contendo carbonato de amônio e bicarbonato de amônio variação na pressão de compactação.

Foi analisada a distribuição dos poros na superfície para as amostras com carbonato de amônio, utilizando pressão de compactação 286,5 MPa, figura 26 e para o bicarbonato de amônio, utilizando pressão de compactação de 191 Mpa e 255 MPa, foi analisada a distribuição dos poros na superfície e seção transversal, figura 27, para as mesmas amostras observas por Microscopia Óptica.

Nas amostras de 70% como podemos observar a figura 26, foi encontrado pequenos feixes de um determinado material na região interna dos poros. Após a realização do EDS no material foi relatado serem feixes de alumínio, podendo ter sido contaminado em algum momento no jarro, sendo um caso isolado de contaminação.

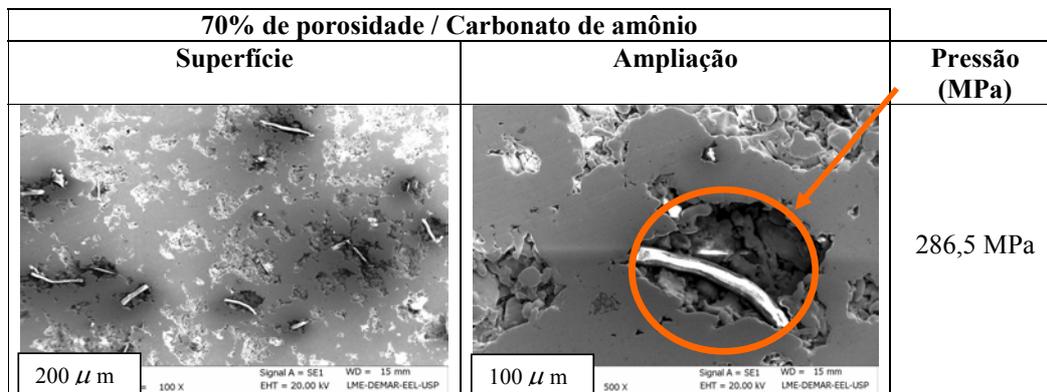


Figura 26 – (Micrografia Eletrônica de Varredura - MEV) – amostra utilizando o carbonato de amônio, com pressão de 286,5 MPa (a) e (b).

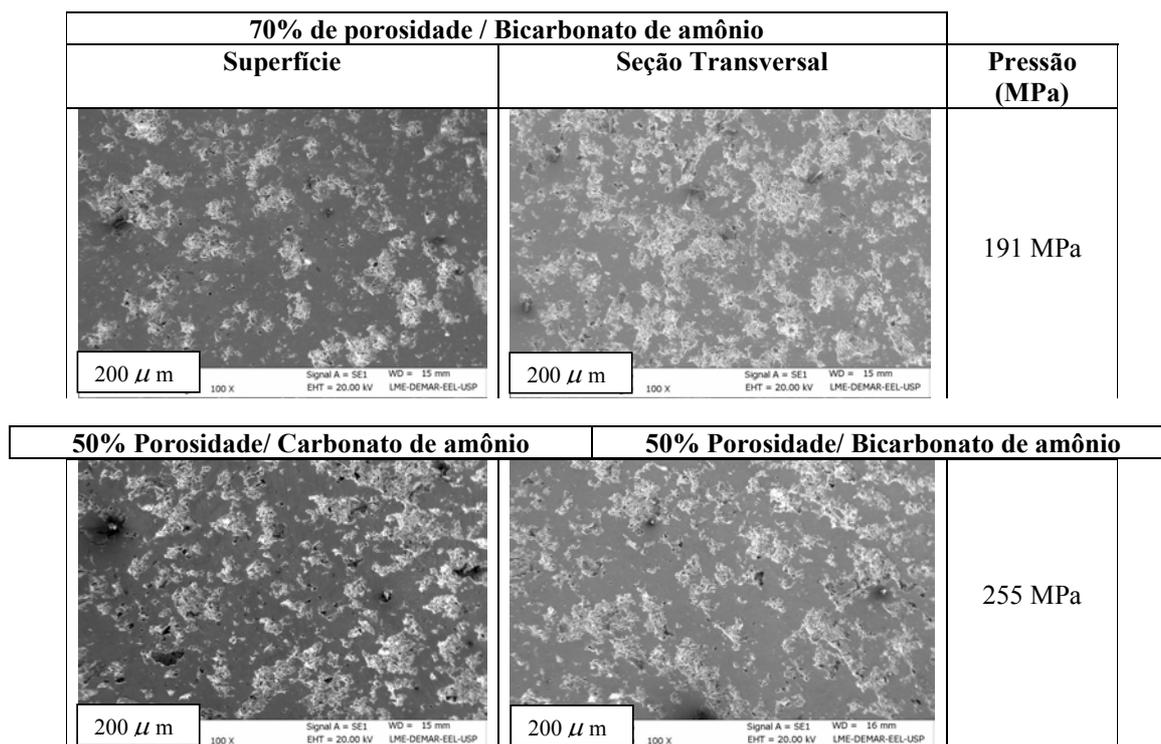


Figura 27 – (Micrografia Eletrônica de Varredura - MEV) – amostra utilizando o bicarbonato de amônio, em diferentes pressões 191 MPa (c) e 255 MPa (d).

4.3.3 Amostras Ensaio de Citotoxicidade

As figuras 28 e 29 apresentam micrografias obtidas pelo MEV das amostras com 50% de porosidade, utilizando como agente espumante o carbonato e bicarbonato de amônio e 70% de porosidade, utilizando como agente espumante o carbonato e bicarbonato de amônio, compactadas com pressão de 286,5 MPa. Referente as amostras que foram utilizadas no ensaio de citotoxicidade, observadas em diferentes regiões.

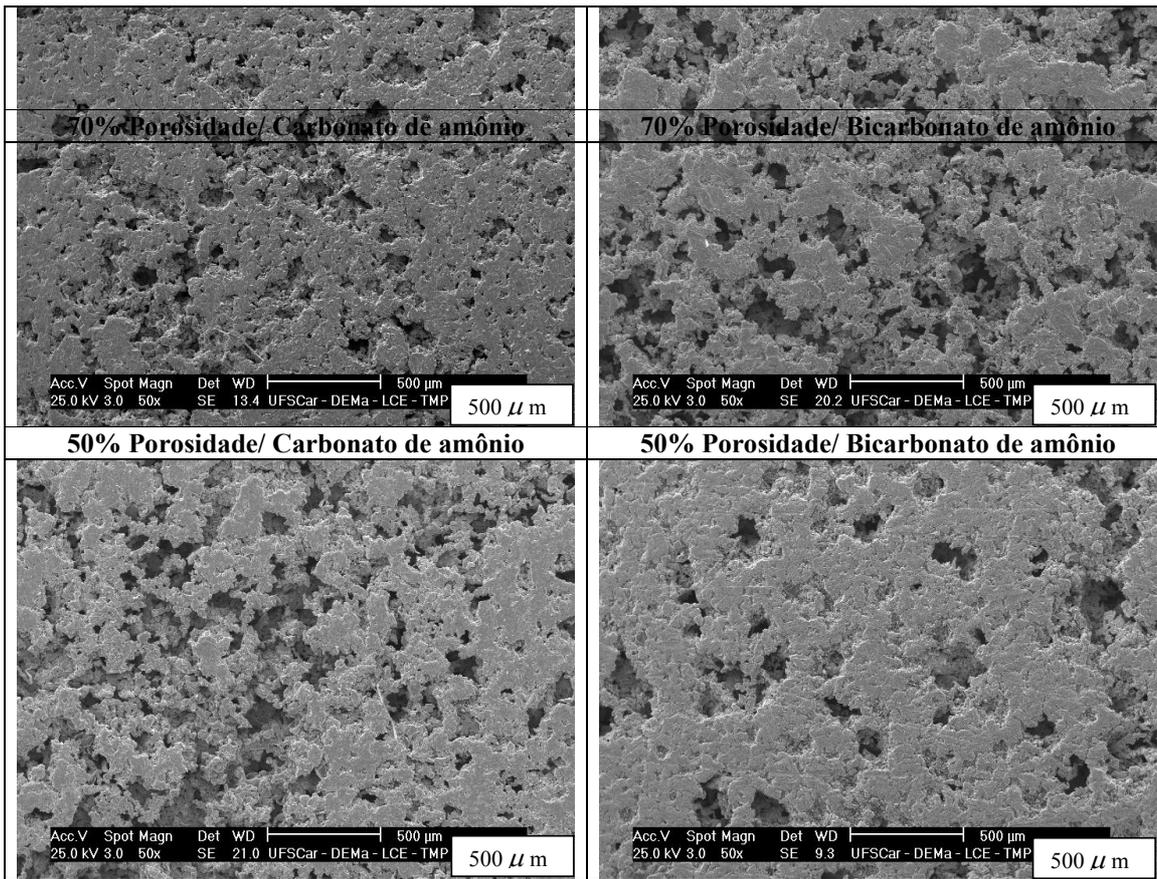


Figura 28 – Micrografia Eletrônica de Varredura – Amostras decapadas de aço inoxidável 316L + agente espumante.

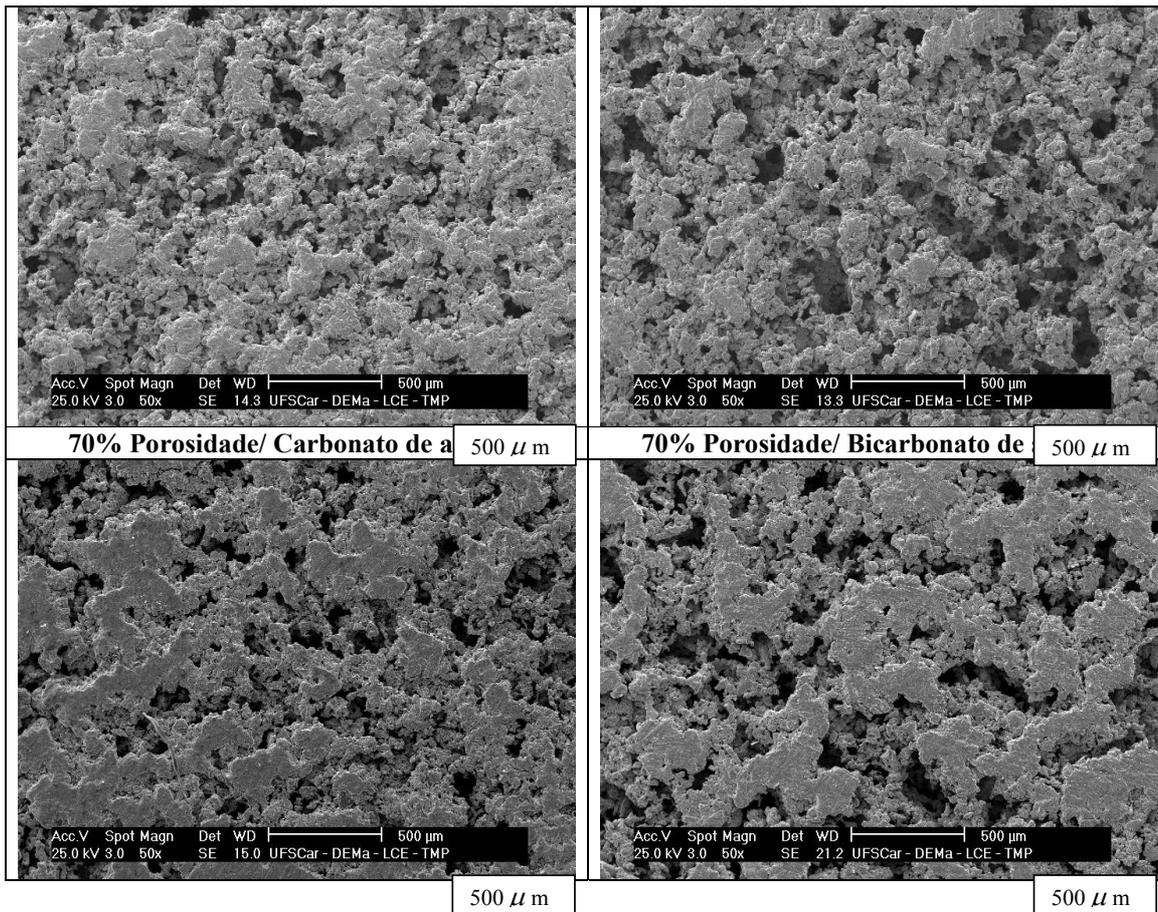


Figura 29 – Micrografia Eletrônica de Varredura – Amostras decapadas de aço inoxidável 316L + agente espumante.

4.4 Porosimetria de Mercúrio (Hg)

A tabela 9 apresenta o volume de mercúrio intrudado nas amostras compactadas com pressão de 286,5 MPa, no intervalo de pressão de 0 a 50 psi. Considerando esta faixa de pressão observam-se que as amostras de aço puro, amostras não porosas (grupo controle) tiveram um menor volume de Hg intrudado, o que está de acordo com a maior densidade relativa obtida nessas amostras apresentada na tabela 9. As amostras produzidas com a adição dos agentes espumantes apresentaram maiores volumes intrudados que as amostras de aço. No entanto, as amostras produzidas com 70% de porosidade apresentaram volumes intrudados menores que aqueles das amostras, produzidas com 50% de porosidade, indicando

aparentemente uma maior fração volumétrica de poros para amostras com maiores densidades relativas, 0,5, como visto na tabela 9. Este fato pode ser explicado pelo limite de tamanho de poro que pode ser analisado pelo equipamento utilizado para análise por porosimetria de Hg, que é de 1000 μm . Observações por MEV mostram que as amostras contendo 70% de porosidade, apresentam poros abertos, interconectados, maiores que 500 μm , como mostrado na figura 29 (g) e (h). Desta forma, os poros são preenchidos por Hg antes mesmo da aplicação de pressão, o que inviabiliza a caracterização destas amostras por esta técnica nesta faixa de tamanhos de poros.

Tabela 9– Volume de Hg – representando o volume de poros

	Volume intrudado de 0 até 50 (psi)	Média (cm³/g)	Densidade (g/cm³)
Aço Puro	0,0208 0,0186	0,020	6,5907
Carbonato 50%	0,5158 0,5365	0,526	5,9575
Bicarbonato 50%	0,4801 0,5412	0,511	6,3345
Carbonato 70%	0,2070 0,1629	0,1849	6,5859
Bicarbonato 70%	0,0826 0,1045	0,094	6,7663

Excluído: ¶

4.4.1 Macroporos

As figuras 30 e 31 mostram gráficos com distribuição bimodal, representando a distribuição de volume de poros $dV/d\log(d)$ versus o diâmetro de poro (μm) das amostras de aço puro. Observam-se que existem duas faixas apresentando níveis de porosidade diferentes com moda em 300 e 5 μm .

As figuras 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38 e 39, apresentam os gráficos de porosimetria obtidos das amostras com 50% em uma distribuição trimodal de poros abaixo de 1000 μm , apresentando uma distribuição estreita de microporos em torno de 10 μm e duas outras distribuições de poros, uma na faixa de 100-1000 μm (com moda em 500 μm) e outra na faixa de 10 a 100 μm (com moda em 20 μm). As amostras com 50% em porosidade, utilizando bicarbonato de amônio apresentam um comportamento bastante semelhante.

As figuras 40, 41, 42 e 43, apresentam os gráficos de porosimetria obtidos das amostras com 70% em porosidade, com duas distribuições de poros, uma na faixa de 200 a 1000 μm (com moda em 350 μm) e outra na faixa de 20 a 200 μm com moda em 50 μm . Já as amostras com 70% com bicarbonato de amônio, apresentaram apenas uma distribuição com poros variando de 20 a 1000 μm e moda em 50 μm .

When, Yamada, Hodgson (2005), obtiveram poros na faixa de 200 a 500 μm , com espumas de 70% de porosidade utilizando como agente espumante o carbonato de amônio.

Segundo os autores Kanetaki. et al. (2005), Dias, et al., (1993), Barbanti, et al. (2005) e Kawachi, et al. (2000) um alcance ótimo de tamanho de poro para materiais porosos foi reportado como sendo de 100 a 500 μm , percebeu-se que quanto maior o tamanho do poro do material, maior a taxa do crescimento celular, devido à facilidade de difusão dos nutrientes dos fluidos orgânicos locais, está relacionada à necessidade de fornecer um suprimento sanguíneo ao tecido conectivo em crescimento, fator que só ocorre com materiais com poros maiores que 100 μm .

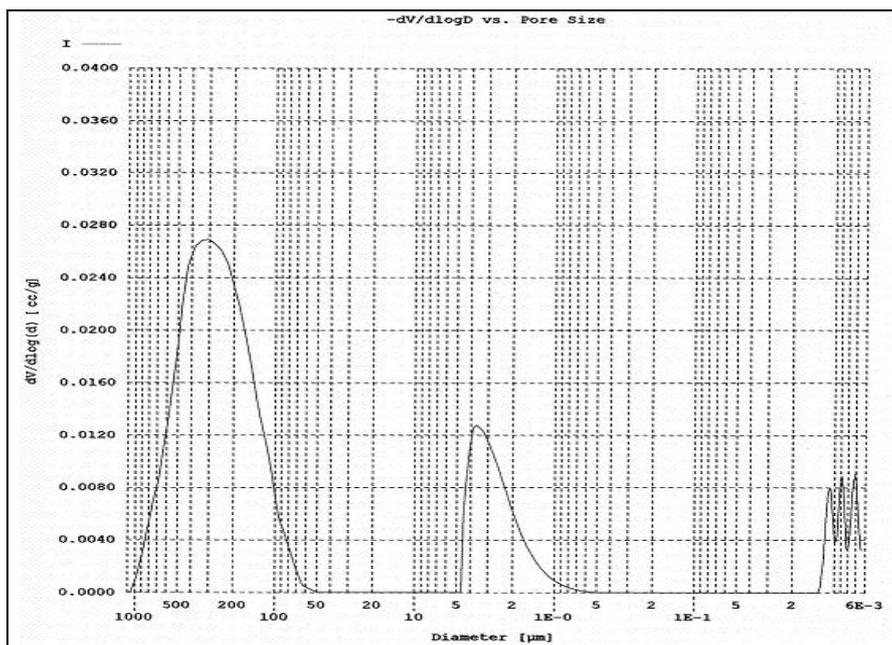


Figura 30 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra aço puro

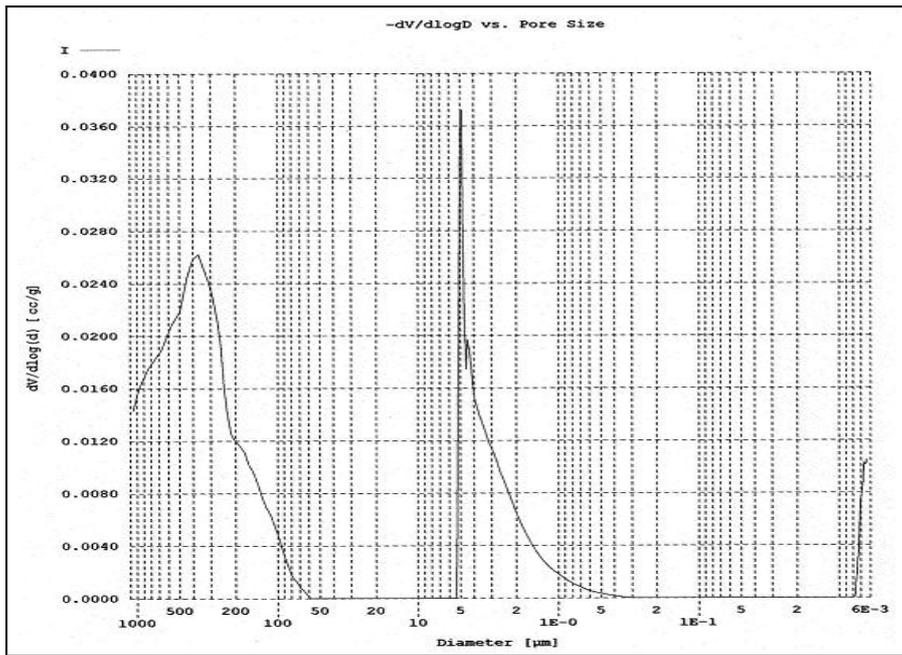


Figura 31 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra aço puro

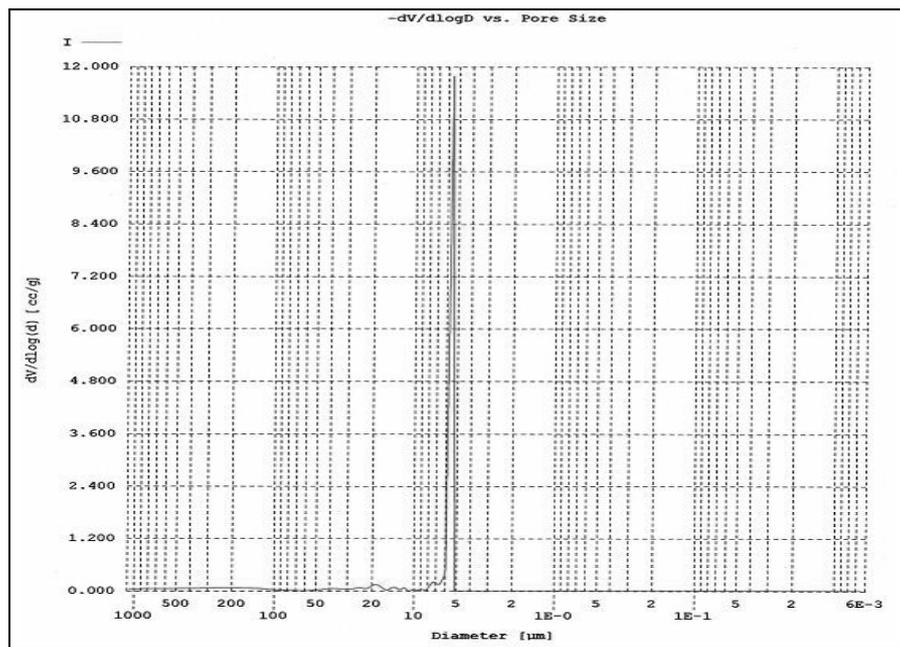


Figura 32 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% carbonato de amônio + aço

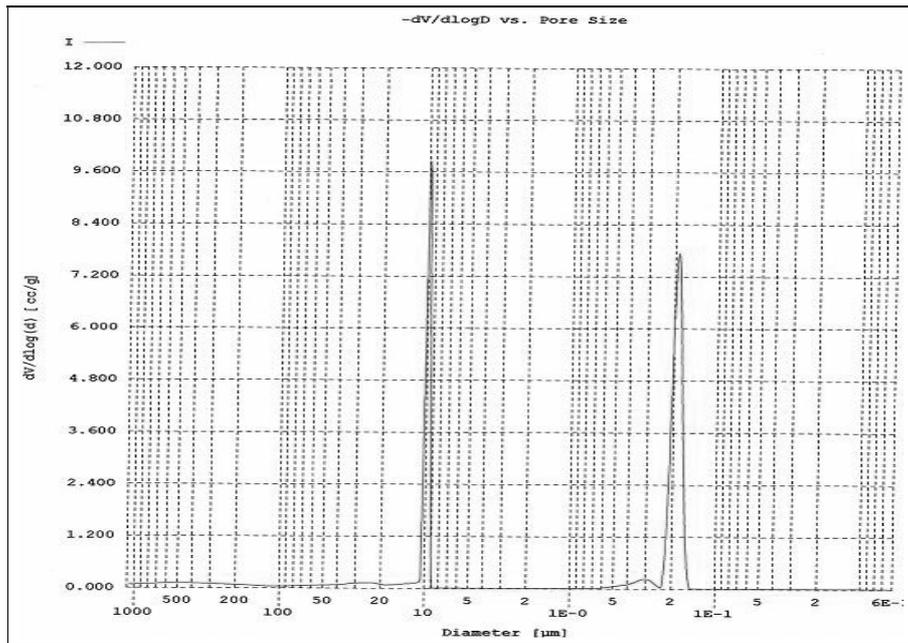


Figura 33 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% carbonato de amônio + aço

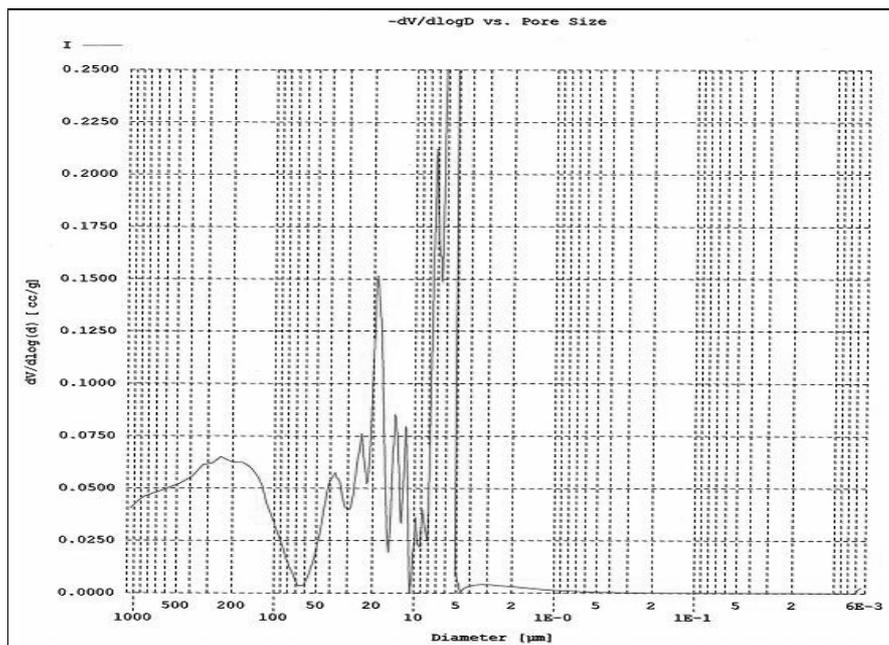


Figura 34 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% carbonato de amônio + aço

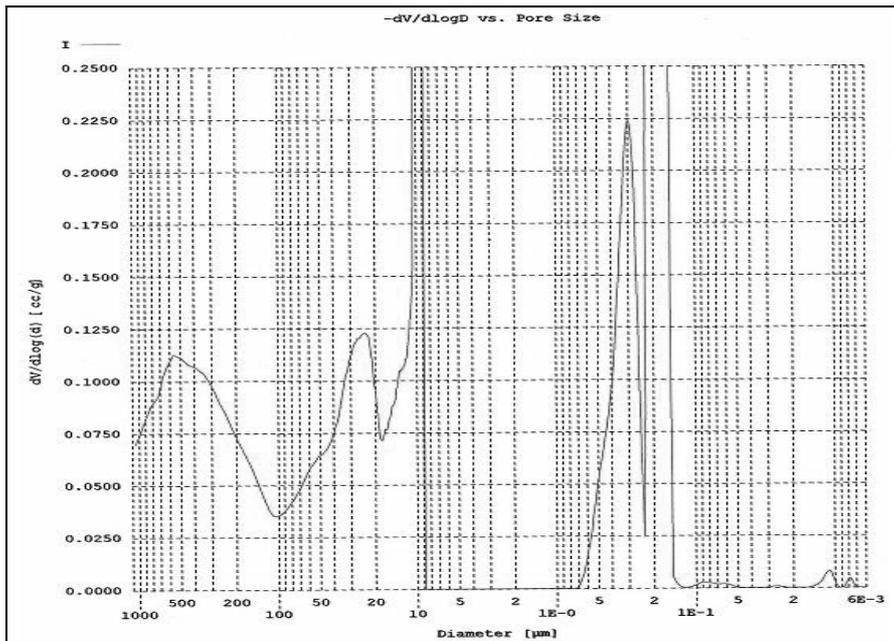


Figura 35 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% carbonato de amônio + aço

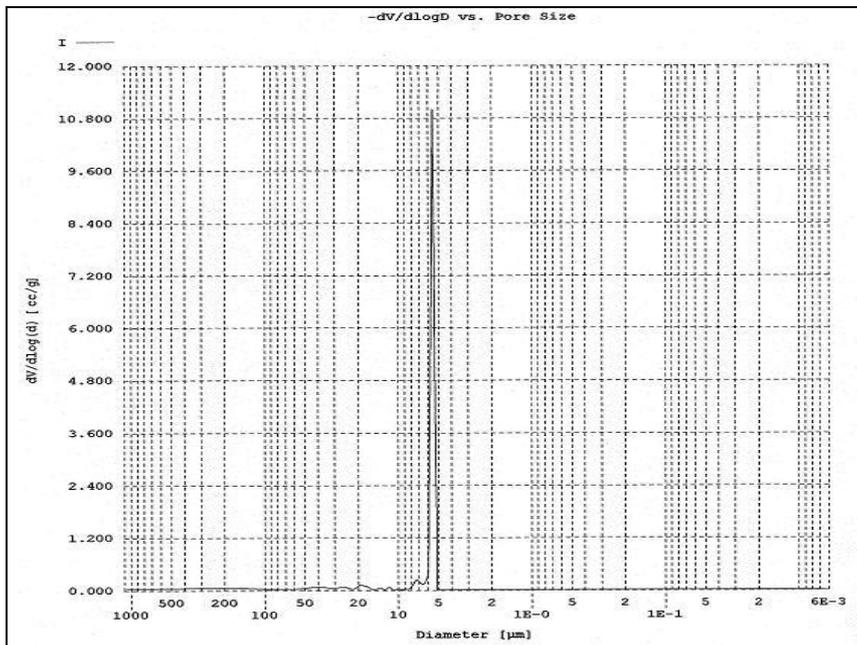


Figura 36 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% bicarbonato de amônio + aço

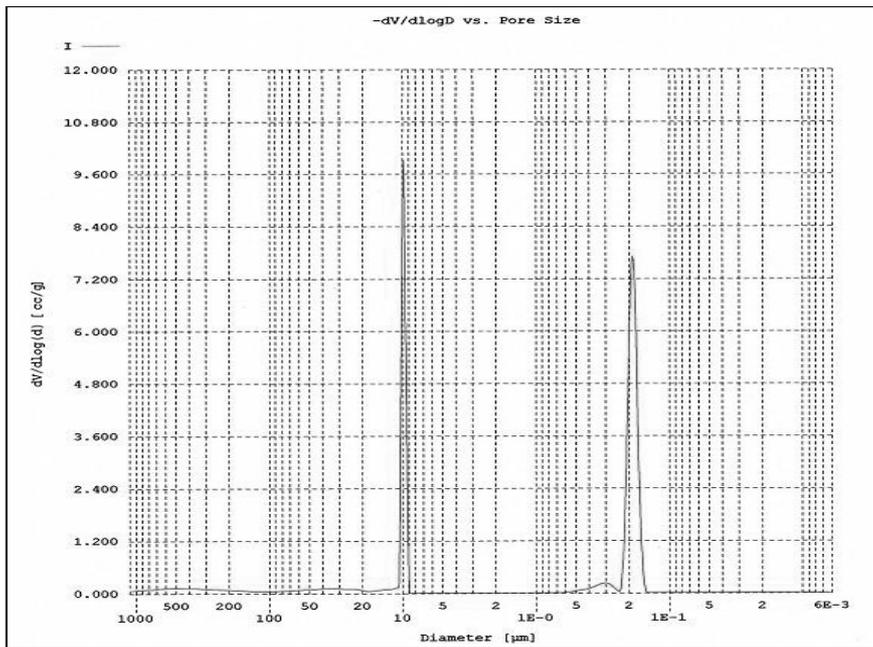


Figura 37 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% bicarbonato de amônio + aço

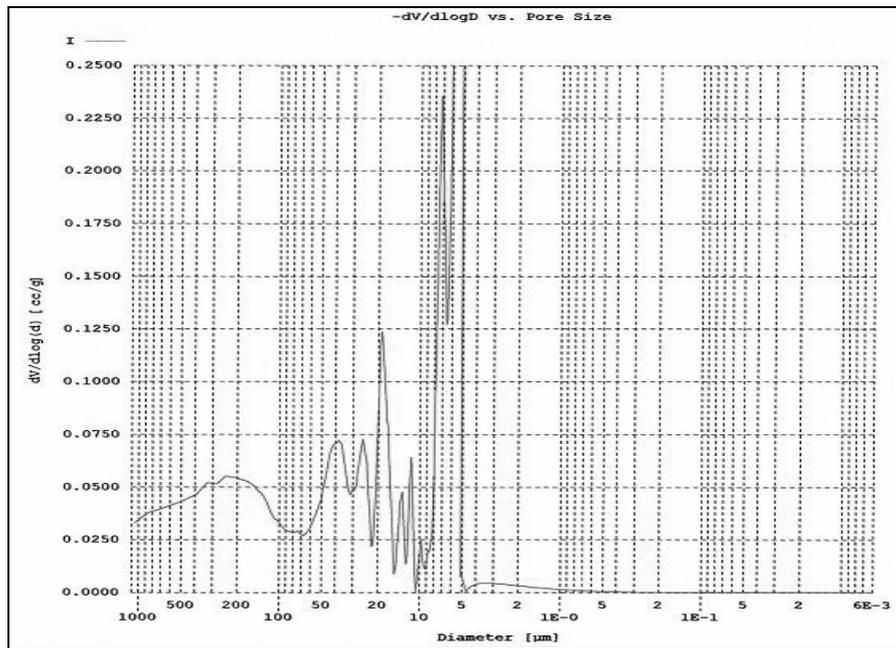


Figura 38 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% bicarbonato de amônio + aço

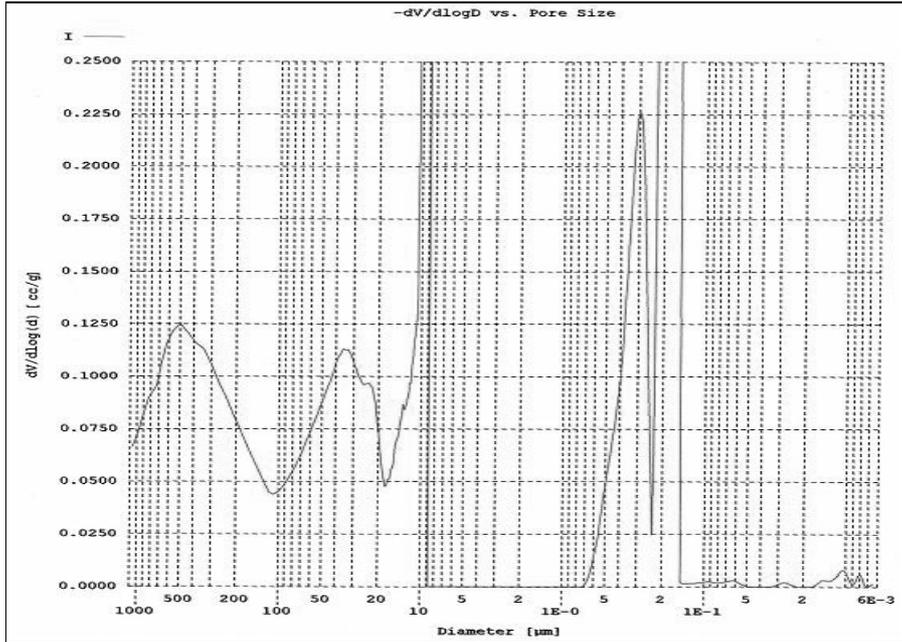


Figura 39 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 50% bicarbonato de amônio + aço

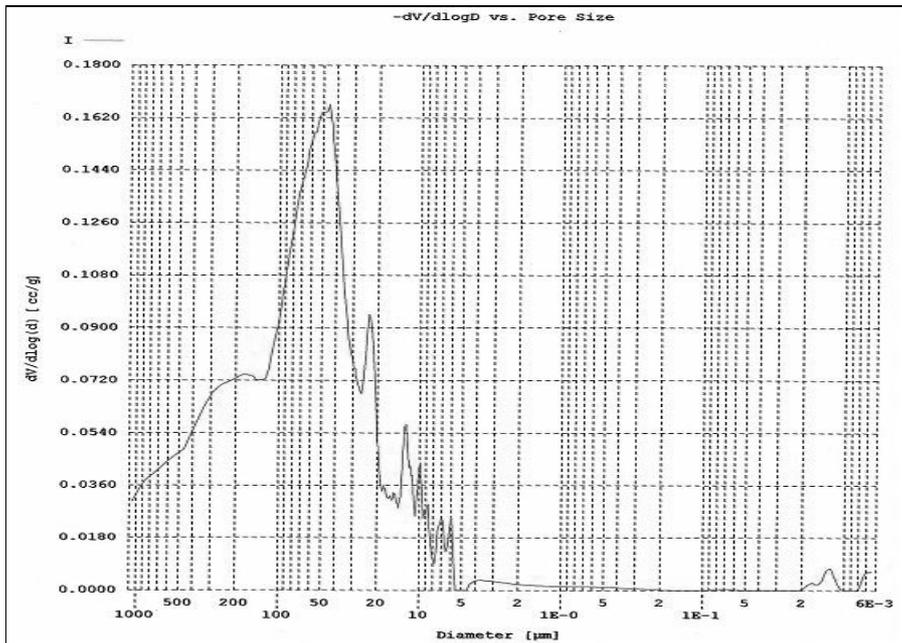


Figura 40 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 70% carbonato de amônio + aço

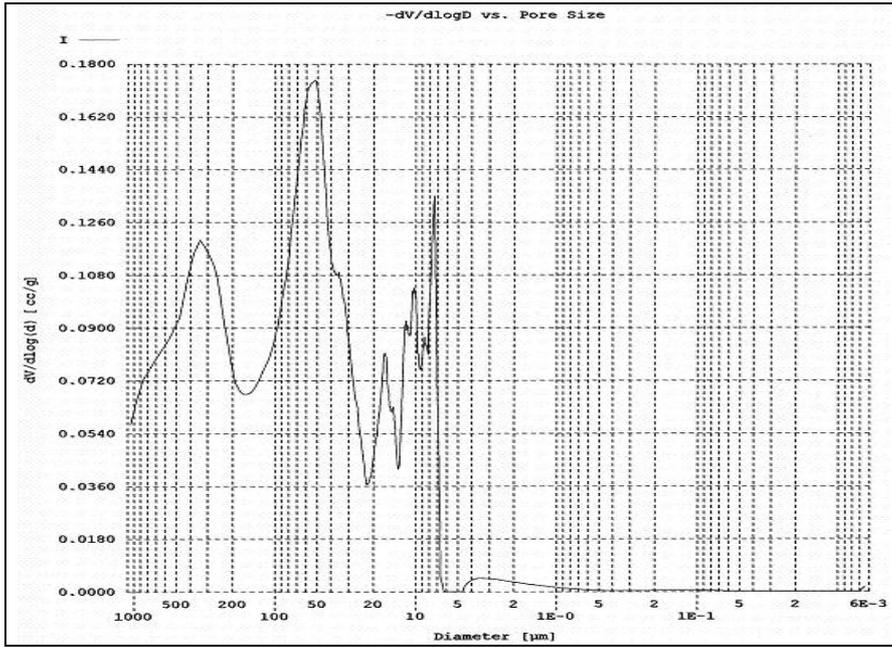


Figura 41 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 70% carbonato de amônio + aço

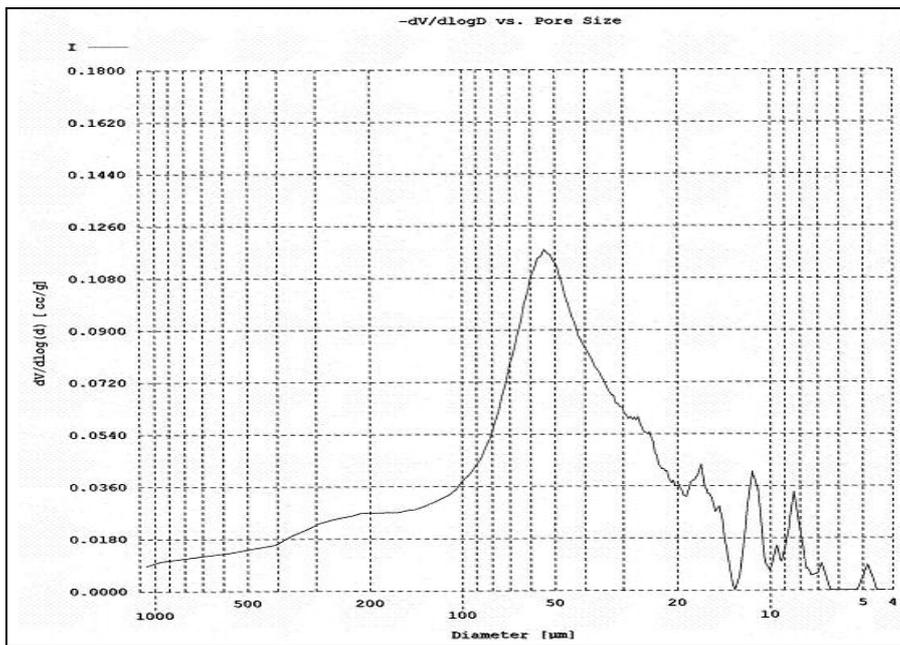


Figura 42 – Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 70% bicarbonato de amônio + aço

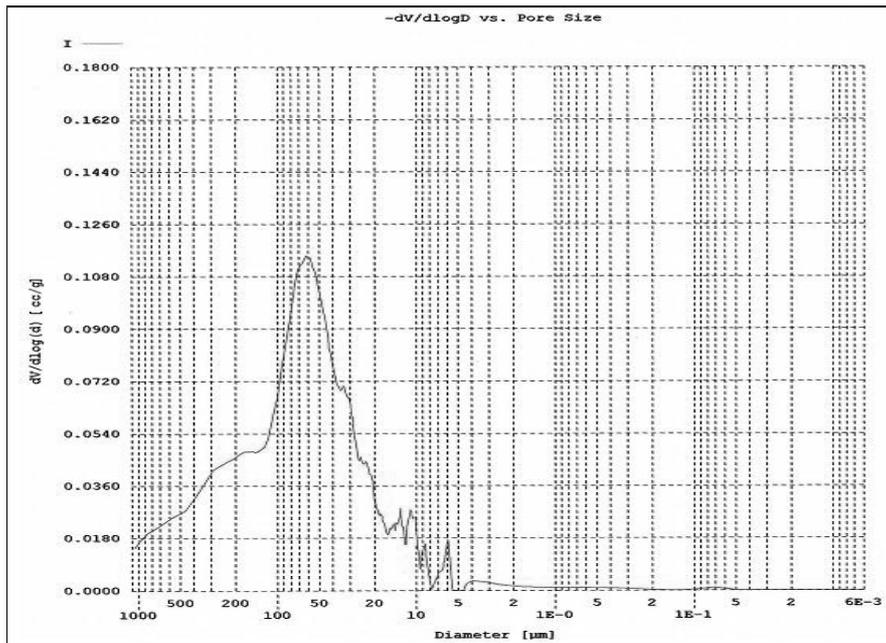


Figura 43 –Módulo representativo do tamanho dos poros – amostra 70% bicarbonato de amônio + aço

4.5 Picnometria (He)

A tabela 10 apresenta a massa volumétrica obtida por picnometria a gás. Como demonstrado na tabela 11 o valor da massa volumétrica do aço medido pelo picnômetro de gás indicia que o hélio não consegue penetrar completamente na estrutura porosa das amostras fabricadas utilizando como agente espumante o carbonato e o bicarbonato de amônio, mesmo tendo maior facilidade de penetração do hélio à medida que a área de exposição da amostra ao gás aumenta, com os dados obtidos observa-se a existência de poros fechados. A densidade do material obtida pelo ensaio de picnometria apresenta-se similar ao obtido com o ensaio de porosimetria para todas as amostras.

Tabela 10– Massa volumétrica obtida por picnometria a gás

Massa volumétrica – densidade – Aço (8 g/cm ³)				
Pressão (MPa)	Amostras	% Porosidade	Densidade real (g.cm ⁻³)	Desvio padrão
286,5	Aço inoxidável puro	-	6,907	± 0,087
286,5	Aço + carbonato de amônio	50	6,491	± 0,032
286,5	Aço + bicarbonato de amônio	50	7,089	± 0,003
286,5	Aço + carbonato de amônio	70	6,498	± 0,006
286,5	Aço + bicarbonato de amônio	70	6,735	± 0,014

4.6 Ensaio de Citotoxicidade

4.6.1 Ensaio MTT

Amostras de aço puro e amostras de aço, utilizando como agente espumante o carbonato de amônio e o bicarbonato de amônio foram levadas para o ensaio de citotoxicidade para avaliar a resposta celular das células L929 cultivada sobre ambas as amostras, por períodos de 24, 48 e 72h. Ao término de cada período, foi realizado o ensaio de MTT.

Os resultados obtidos após análise do teste de citotoxicidade demonstram que todas as amostras ensaiadas não foram tóxicas para a cultura de fibroblastos.

A Figura 44 apresenta os resultados dos ensaios de citotoxicidade, os resultados mostram uma redução significativa ($p < 0,01$) de cultura celular sobre as amostras com 50% de porosidade com carbonato de amônio, no tempo de 24 horas, para as demais amostras a diminuição não foi significativa ($p > 0,05$). No período de 48 horas, houve uma redução significativa ($p < 0,01$) de cultura celular sobre as amostras de aço puro (não porosa), 50% de porosidade com carbonato de amônio e 70% de porosidade com bicarbonato de amônio, não houve diminuição significativa para as amostras com 50% de porosidade com bicarbonato de amônio e 70% de porosidade com carbonato de amônio ($p > 0,05$). No período de 72 horas, houve uma redução significativa apenas para as amostras de aço puro (não porosa) ($p < 0,05$). O filtro foi comparado ao grupo controle (células) e a luva não obteve nenhum desenvolvimento celular.

Quando são comparados os grupos aço puro (amostra não porosa) e aço com agente espumante, verifica-se que o aço tem uma queda significativa no período de 48h chegando a 40% de viabilidade, ocorrendo uma recuperação no período de 72 h, para as amostras com 50% de porosidade com bicarbonato a viabilidade chega a 100% e para as demais amostras a viabilidade está acima de 100%, ocorrendo uma recuperação no período de 72 h apenas para as amostras com 50% de porosidade com bicarbonato de amônio.

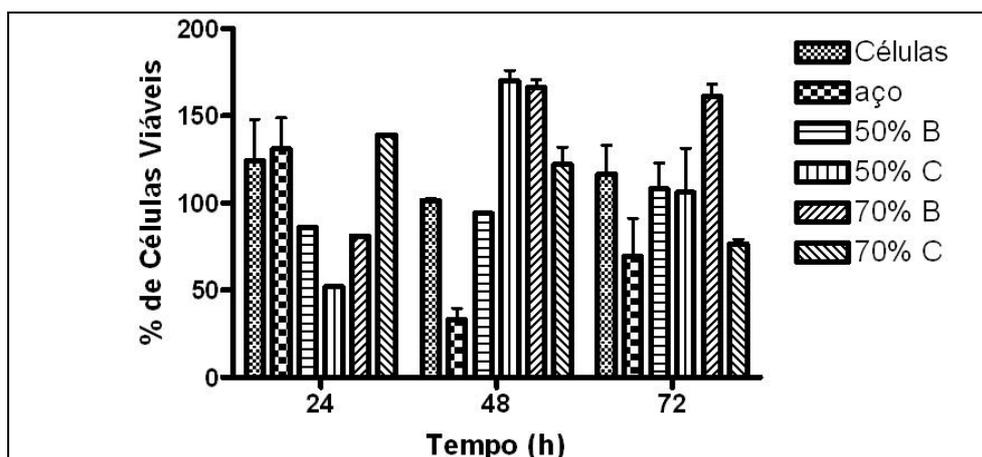


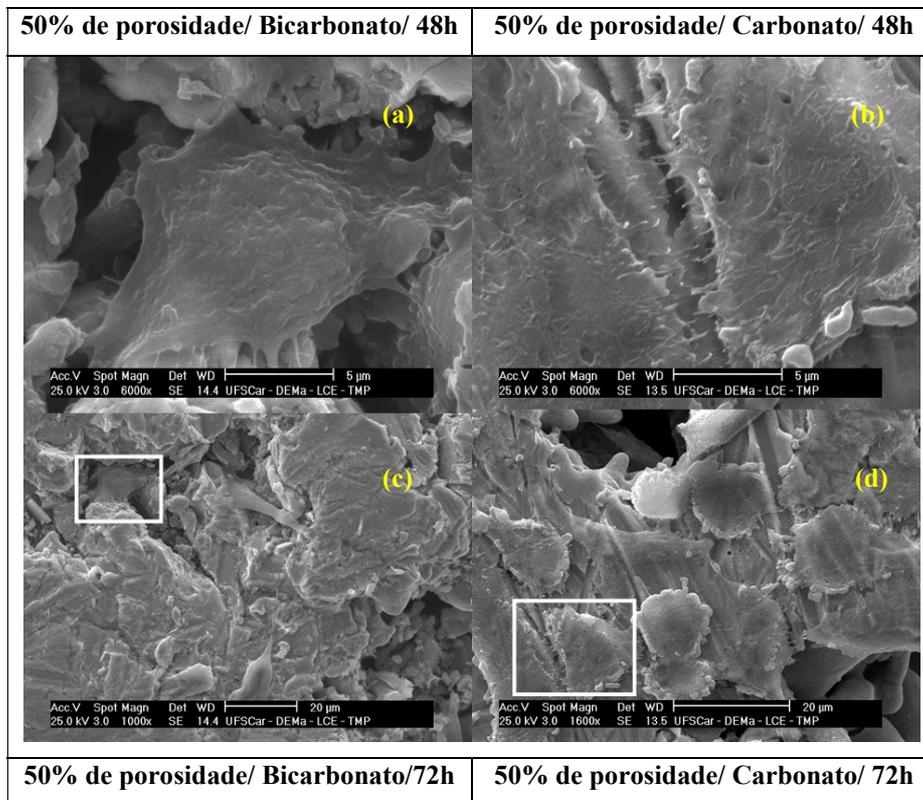
Figura 44 – Ensaio de citotoxicidade - células cultivadas sobre as amostras de aço puro e com agentes espumantes

4.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise das micrografias obtidas por MEV revela a presença de células sobre as amostras de aço, bem como nas amostras, utilizando como agente espumante o carbonato de amônio e bicarbonato de amônio. As micrografias apresentam áreas destacadas que estão em menor aumento, representando o mesmo material acima da figura que está em maior aumento.

Na figura 45 (A) é possível observar um espalhamento da célula, ocorrendo interação com o material. Na figura (C), observa-se menor aumento do mesmo material, verificando-se que as células estão no interior do poro. Na figura (B) observa-se também um espalhamento da célula, ocorrendo interação no material. Na figura (D) observa-se menor aumento do mesmo material, porém verificou-se que as células estão alojadas na superfície, assim como é observado também nas figuras (E) e (G). Na figura (F) observa-se um maior espalhamento e

uma maior aderência ao material. Na figura H observa-se menor aumento do mesmo material, verificando-se que as células estão no interior e ao redor dos poros.



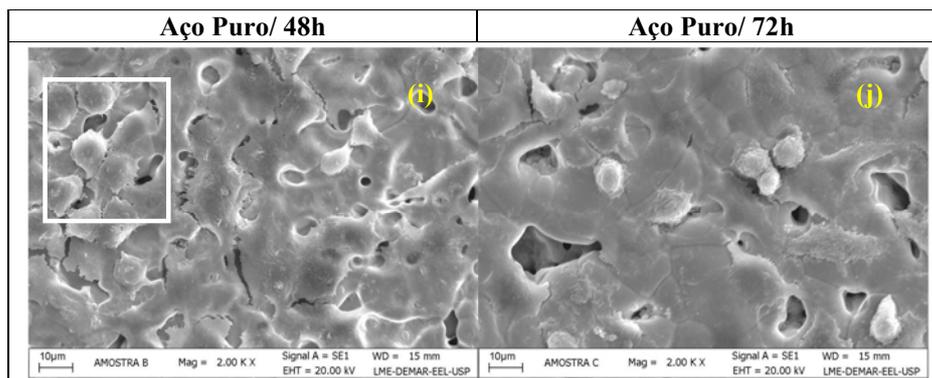
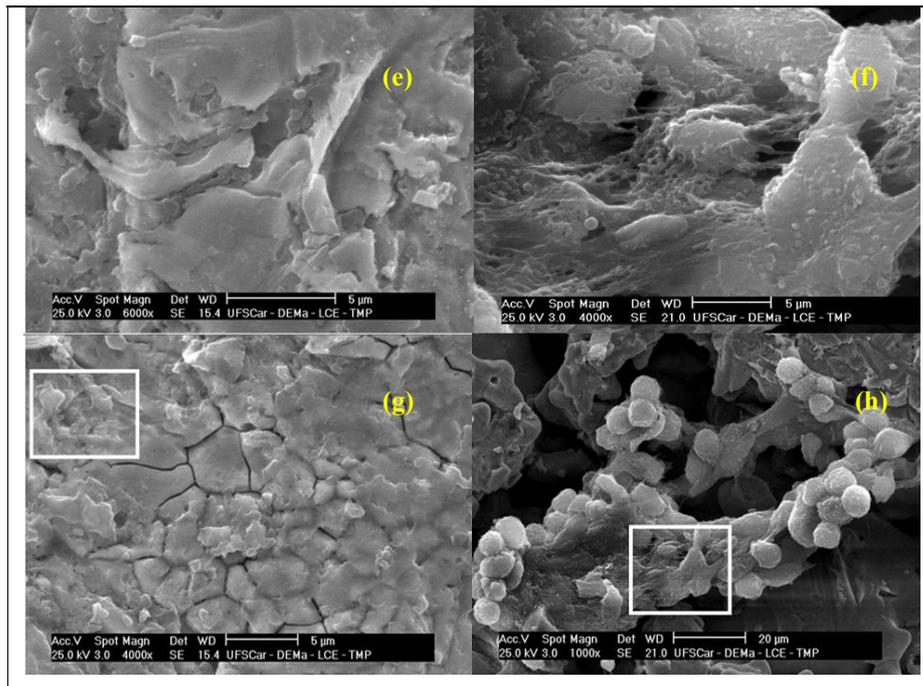
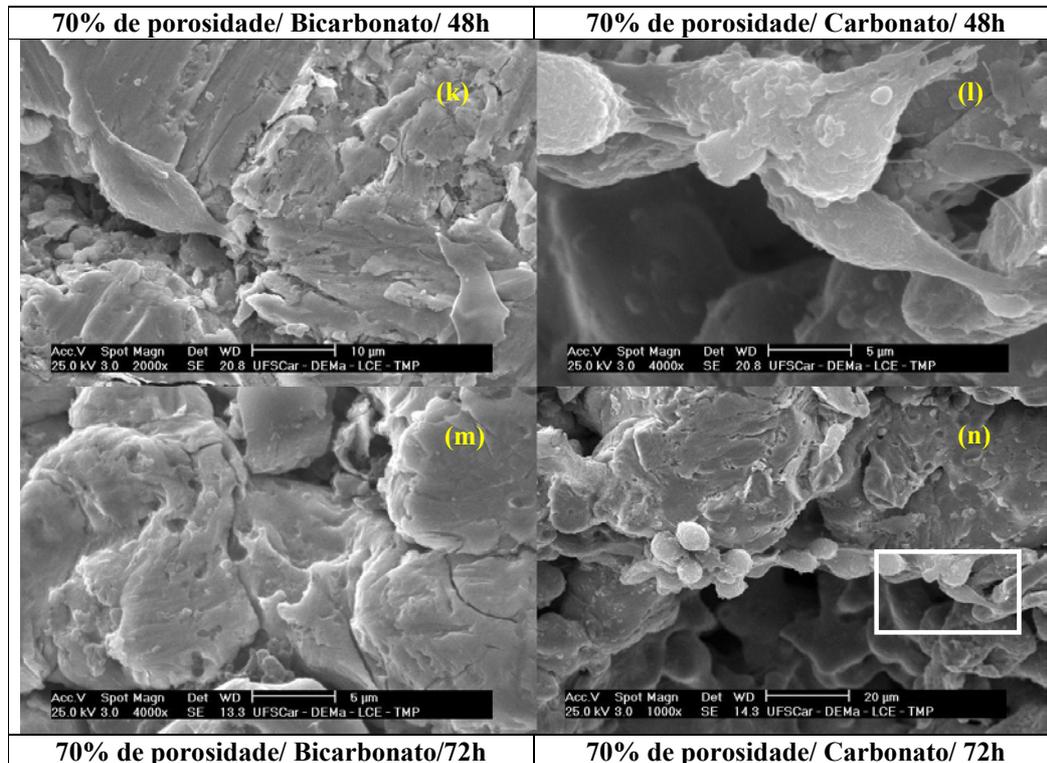


Figura 45 - Microscopia de varredura. Proliferação de células L292, após incubação por 48 horas (a-c) pastilhas recobertas com 50% (B) de porosidade; (b-d) 50% (C) de porosidade. Após incubação por 72 horas (e-g) pastilhas decapadas com 50% (B) de porosidade; (f-h) 50% (C) de porosidade. (i) pastilhas de aço após incubação com as células por 48 horas; (j) pastilhas de aço após incubação com as células por 72 horas.

Nas figuras (I) e (J), é possível observar o crescimento e um pequeno espalhamento das células sobre a superfície do material.

Na figura 46 (K) e (M) quase não é possível observar um espalhamento da célula, ocorrendo interação da célula com o material. Na figura (L) observa-se um espalhamento da

célula, ocorrendo interação no material. Na figura (N) observa-se menor aumento do mesmo material, verificou-se que as células estão alojadas na superfície. Nas figuras (O) e (Q), também observou-se ausência de células no material. Na figura (P) observa-se um pequeno espalhamento e aderência da célula no material. Na figura (H) observa-se menor aumento do mesmo material, verificando-se que as células estão no interior dos poros.



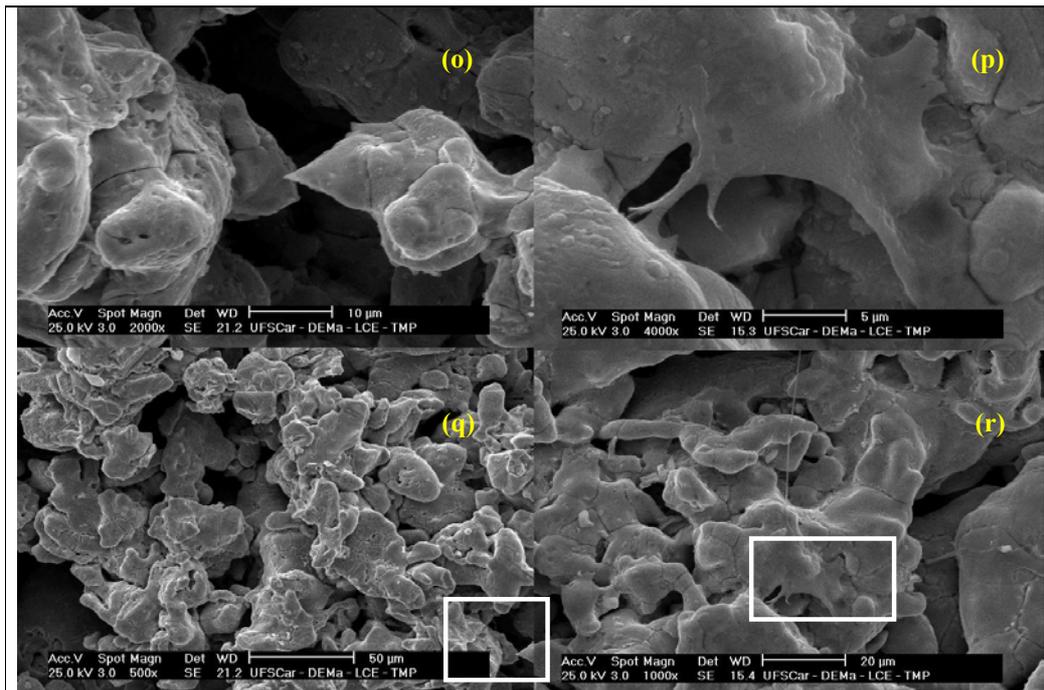


Figura 46 - Microscopia de varredura. Proliferação de células L292, sobre após incubação por 48 horas (k-m) pastilhas recobertas com 70% (B) de porosidade; (l-n) 70% (C) de porosidade. Após incubação por 72 horas (o-q) pastilhas decapadas com 70% (B) de porosidade; (p-r) 70% (C) de porosidade.

Pode-se observar que as amostras com 50 e 70% de porosidade, utilizando como agente espumante o carbonato de amônio, em 48h de incubação as células desenvolveram-se e após o período de 72h as células apresentaram filamentos para a ramificação, já havendo espalhamento. O que não ocorreu para as amostras utilizando 50% bicarbonato e 70% de bicarbonato, não havendo presença de células nas amostras.

Segundo os autores Kanetake et al. (2003), Dias et al. (1993), Barbanti et al. (2005) e Kawaki (2000) um alcance ótimo de tamanho de poro para materiais porosos foi reportado como sendo de 100 a 500 μm , percebeu-se que quanto maior o tamanho do poro do material, maior a taxa do crescimento celular, devido à facilidade de difusão dos nutrientes dos fluidos orgânicos locais, está relacionada à necessidade de fornecer um suprimento sanguíneo ao tecido conectivo em crescimento, fator que só ocorre com materiais com poros maiores que 100 μm .

Isto explica o fato do crescimento das células serem mais evidentes nas amostras com 70% de carbonato, estas amostras apresentam faixas de poros próximos destes tamanhos.

A interação das células com as superfícies dos materiais é de extrema importância na efetividade de implantes médicos, podendo definir o seu grau de rejeição. A superfície

química do material pode definir a resposta celular ao material e, de certa forma, afetar a adesão celular, proliferação, migração e função das células (CRAIGHEAD et al., 2001; BOYAN et al., 1996; DEE et al., 1998; LAUFFENBURGER et al., 1996).

O conhecimento dos mecanismos básicos de interação célula-material e um melhor entendimento dos processos a nível celular durante a adesão podem colaborar para o desenvolvimento de novos biomateriais e para o desenvolvimento de novos produtos biomédicos (KUMARI *et al.*, 2002).

Pelo gráfico obtido, figura 44, as amostras que mostraram-se mais viáveis foram aquelas que não apresentaram células na superfície das amostras nas análises de MEV. Essa situação explica o fato das células terem tido um crescimento significativo, como observado no gráfico das amostras de aço puro no período de 72h e uma diminuição das células incubadas após o período de 24h para as amostras utilizando como agente espumante o carbonato e o bicarbonato de amônio.

A figura 47 representa o funcionamento deste processo de interação do meio de cultura com o material estudado, através de um desenho esquemático. O processo inicia-se com a figura de uma amostra ocupando um poço de uma placa de 24 poços, utilizada para cultura celular.

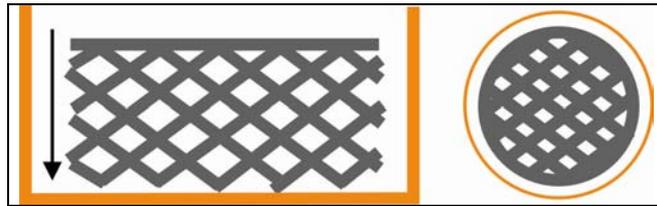


Figura 47 – Desenho esquemático- Amostra emplacada

Fonte: Releitura do desenho do meio de cultura com o material estudado (Making tissue engineering scaffolds work, v. 5, p. 29-40, 2003)

A figura 48 representa o meio de cultura com células L929, colocado sobre a amostra, e após período de incubação por diferentes tempos as células começam a desenvolverem-se e a migrar para o interior dos poros do material.

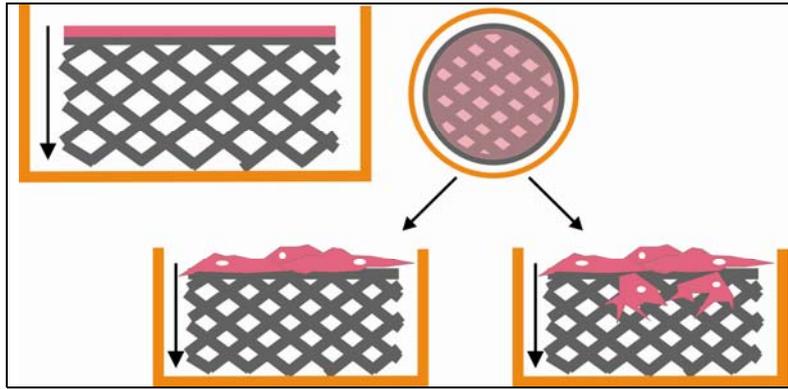


Figura 48 – Desenho esquemático – Meio de cultura sobre amostra

Fonte: Releitura do desenho do meio de cultura com o material estudado (Making tissue engineering scaffolds work, v. 5, p. 29-40, 2003)

A figura 49 representa a leitura da cultura após o período de incubação de diferentes tempos. As células que sobraram para a contagem foram as que ficaram no interior da placa após a retirada do material. Observa-se que algumas células ficaram aderidas a pastilha que foi para o MEV. Em alguns casos, como podemos observar o aumento no gráfico para as amostras com aço puro em 72h no gráfico e a falta de células nas amostras conforme observado pelo MEV, foi devido as células não aderirem totalmente as amostras e escoarem para o fundo do poço. Quando foi realizada a leitura, as amostras encontravam-se todas no fundo do poço, por isso o aumento foi significativo. Ao contrário quando é observada uma diminuição nas no gráfico, pode-se considerar que as células encontram-se presentes no material, não sobrando muitas no fundo do poço para a contagem. Quando levada para o MEV, podemos visualizá-las facilmente.

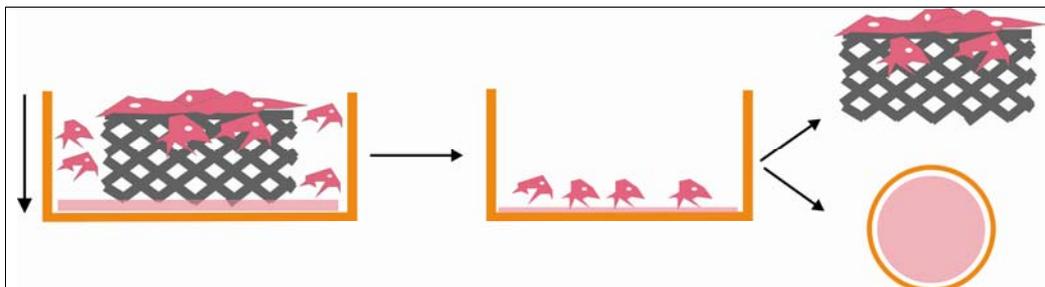


Figura 49 - Meio de Cultura após a retirada do material

Fonte: Releitura do desenho do meio de cultura com o material estudado (Making tissue engineering scaffolds work, v. 5, p. 29-40, 2003)

Ao compararmos os resultados de citotoxicidade e microscopia de varredura verificamos que de acordo com o modo de cultivo das células com as amostras, a interação das células com o material foi influenciada pelo tipo de agente espumante.

As amostras que apresentaram melhor viabilidade foram aquelas que pela técnica de MEV, possuíam células entre os poros ou em divisão celular, cobrindo o material. Importante ressaltar que as células como demonstrado no desenho esquemático estavam inicialmente em suspensão e após 24h já se encontravam interagindo com o material, as células que encontram-se fora da superfície da amostra, tiveram proliferação normal como constatado nos gráficos de citotoxicidade, nos quais observa-se um aumento proporcional da atividade celular em relação ao controle.

5 Conclusão

Foram produzidas com sucesso amostras em aço inoxidável 316L sinterizadas, utilizando pressão de compactação 286,5 MPa com densidades relativas de 0,3 e 0,5 utilizando o processo de metalurgia do pó e agentes espumantes carbonato e bicarbonato de amônio.

Micrografias obtidas pelo MEV das amostras com 50% e 70% de porosidade com carbonato e de bicarbonato de amônio, demonstraram que as amostras exibiram estrutura celular aberta com poros interconectados. As amostras produzidas com 70% de porosidade apresentaram poros maiores e mais homogêneos em tamanho e distribuição. Já as amostras, produzidas com 50% de porosidade, apresentaram-se mais heterogêneas, tanto em tamanho quanto em distribuição, contendo poros maiores e poros menores distribuídos ao seu redor.

Já em tamanho de poros, segundo a literatura estudada, quanto maior o tamanho do poro do material, maior a taxa do crescimento celular, a amostra produzida com 70%, utilizando como agente espumante o carbonato de amônio, apresentou duas distribuições de poros, uma na faixa de 200 a 1.000 μm (com moda em 350 μm) e outra na faixa de 20 a 200 μm com moda em 50 μm . Diante deste fator, foi a amostra que obteve melhor resultado diante da cultura de células: em 48 h de incubação as células desenvolveram-se e após 72 h já haviam sido aderidas e espalhadas no material.

Ao compararmos os resultados de citotoxicidade e microscopia de varredura verificamos que de acordo com o modo de cultivo das células com as amostras, a interação das células com o material foi influenciada pelo tipo de agente espumante e tamanho dos poros.

Vale ressaltar que os fibroblastos, em contato com as amostras, houve adesão, proliferação, migração e viabilidade celular nos intervalos de cultura estudados, porém em menores proporções do que os controles e que o material não liberou nenhuma substância tóxica que atrapalhou o crescimento das células.

A técnica empregada e as amostras produzidas apresentam viabilidade para aplicações em implantes ortopédicos.

Referências

ANTUNES, A. R. **Caracterização do comportamento frente a corrosão de um aço inoxidável austenítico para aplicações biomédicas com revestimentos PVD de TiN, TiCN e DLC**, 2006. 309 f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Materiais) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

ARAÚJO, T. L. de; COUTO, A. A. Estudo do aço inoxidável aplicado como implante ortopédico. **Revista Mackenzie (on-line)**, p.1-20, Maio, 2004. Disponível em: <http://www4.mackenzie.com.br/fileadmin/Graduacao/EE/Revista_on_line/aco_inoxidavel.pdf>. Acesso em: 16 de out. 2007.

BARBANTI, H. S.; DUEK, R. A. E. Polímeros bioreabsorvíveis na engenharia de tecidos. **Polímeros: Ciência e Tecnologia.**, v.15, p.13-21, 2005.

BLACKWOOD, J. D. Biomaterials: Past Successes and future problems. **Corrosion Reviews.**, n.21, p.97-124, 2003.

BANNON, B. P.; MILD, E. E. **Titanium alloys for biomaterial application: an overview. Titanium Alloys in Surgical Implants.** Local: ASTM, 1983. p. 7-15. (ASTM STP 796)

BOYAN, B. D.; HUMMERT, T. W.; DEAN, D. D.; SCHWARTZ, Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. **Biomaterials**, v.17, n.2, p.137-146. 1996.

BOSCHI, A. O. O que é necessário para que um material possa ser considerado biomaterial. In: CONGRESSO ANUAL DA ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE METALURGIA E MATERIAIS, 50.; Agosto 1-4, 1995, São Pedro. **Anais...** São Paulo: ABM, 1996. v.6, p.43-53.

BLACK, J. **Biological performance of materials fundamentals of biocompatibility.** New York: Marcel Dekker, 1992.

BURNY, F.; DONKERWOLDKE, M.; MUSTER, D. Biomaterials education: a challenge for medicine and industry in the late 1990s. **Revista Materials science and engineering**, v. A199, p. 53-59, 1995

CALLISTER JR, D. W. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução.** Rio de Janeiro, LTC, 2003. 589p.

CHAPIRO, A. Radiation chemistry in the field of biomaterials. **Revista Radiation Physics Chemistry**, Britain, v. 46, n. 2, p. 159-160, 1995.

CHIAVERINI, V. **Metalurgia do pó**. 4ª ed. São Paulo: Associação Brasileira de Metalurgia e Materiais, 2001. 326 p.

CRAIGHEAD, H. G.; JAMES, C. D.; TURNER, A. M. P. Chemical and topographical patterning for directed cell attachment. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v.5, n.2-3, p.177-184, 2001.

CRAIGHEAD, H. G.; JAMES, C. D.; TURNER, A. M. P. Chemical and topographical patterning for directed cell attachment. **Current Opinion in Solid State & Materials Science**, v.5, n.2-3, p.177-184, 2001.

DEE, K. C.; ANDERSEN, T. T.; BIZIOS, R. Design and function of novel osteoblast-adhesive peptides for chemical modification of biomaterials. **Journal of Biomedical Materials Research**, v.40, n.3, p.371-377. 1998.

DEWIDAR, M. M.; KHALIL, A. K.; LIM, K. J. Processing and mechanical properties of porous 316L stainless steel for biomedical applications. **Transactions of Nonferrous Metals Society of China**, v.17, n.3, p.468-473, 2007.

DIAS, C. R.; KISAKI, Y.; NETO, U. A.; NETO, B. F.; TARRAGÔ, R.; SCHWARTSMANN, R. C. Estudo experimental da reação tecidual óssea ao titânio Ti6Al4V recoberto com hidroxiapatita. **Rev. Bras. Ortop.**, v.28, n.6, p. 407-412, 1993.

GENTIL V. **Corrosão**, 3ª ed, Rio de Janeiro: LTC, 1994. 453 p.

GIBSON, J. L. Biomechanics of cellular solids. **Journal of Biomechanics**. v.38, p. 377-399, 2005.

GRADZKA-DAHLKE, M.; DABROWSKI, R. J. DABROWSKI, B. Characteristic of the porous 316 stainless steel for the friction elemento of prosthetic joint. **WEAR**, v. 263, n. 7-12 p.1023-1029, 2007.

HELMUS, M.N.; TWEDEN, K., Materials selection, Encyclopedic Handbook of Biomaterials and Bioengineering. Part A: **Materials**, v.1, p. 27– 59, 1995.

HOEPPENER, D. W.; CHANDRASEKARAN, V. Fretting in orthopaedic implants: a review. **WEAR**, v.173, p.189-197, 1994.

HUME–ROTHER, Y. W. **Estrutura das ligas de ferro**. São Paulo: Edgard Blücher, 1968.

KHAN, M. A.; WILLIAMS, R. L.; WILLIAMS, D. F. In-vitro corrosion and wear of titanium alloys in the biological environment. **Biomaterials**, v. 17, p. 2117-2126, 1996.

KANETAKE, N.; KOBASHI, M. Innovative processing of porous and cellular materials by chemical reaction, **Scripta Materialia.**, v.54, p.521-525, 2005.

KAWACHI, Y. E.; BERTRAN, A. C.; REIS, R. R.; ALVES, L. O. Biocerâmicas: Tendências e perspectivas de uma área interdisciplinar, **Química Nova**, v.23, p.518-522, 2000.

KUMARI, T. V.; VASUDEV, U.; KUMAR, A.; MENON, B. Cell surface interactions in the study of biocompatibility. **Trends in biomaterials and artificial organs** , v.15, n.2, p.37-41. 2002.

LAUFFENBURGER, D. A.; HORWITZ, A. F. Cell migration: A physically integrated molecular process. **Cell**, v.84, n.3, p.359-369. 1996.

LOBO, O. A.; ANTUNES, F. E.; PALMA, S. B. M.; SOARES-PACHECO, C.; TRAVA-AIROLDI, J. V.; CORAT, J.E. Biocompatibility of multi-walled carbon nanotubes grown on titanium and silicon surfaces. **Materials Science & Engineering**, v. p.532 – 538, 2007.

LONG, H. J. R. M. Review titanium alloys in total joint replacement – a materials science perspective. **Biomaterials**, v.19, p.1621 – 1639, 1998.

MARTINES, S. N. **Avaliação do processo de morte celular após terapia fotodinâmica**, 2003. 73 f. Dissertação Mestrado em Engenharia Biomédica) – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos, 2003.

MOURA, J. M.; FIGUEIREDO, M. M. Aplicação das Técnicas de Picnometria de Gás e de Porosimetria de Mercúrio à Caracterização da Madeira de E. globulus, **Silva Lus.**, Lisboa v.10, n.2, p.207-216, dez. 2002.

MÜLLER, R.; ABKE, J.; SCHNELL, E.; MACIONCZYK, F.; GBURECK, U.; MEHRL, R.; RUSZCZAK, Z.; KUJAT, R.; ENGLERT, C.; NERLICH, M.; ANGELE, P. Surface engineering of stainless steel materials by covalent collagen immobilization to improve implant biocompatibility. **Biomaterials**, v. 26, n.34, p.6962-6972, 2005.

PADILHA, F. A.; GUEDES, C. L. **Aços Inoxidáveis Austeníticos**. São Paulo: Hemus, 1994. 169 p.

PARK B. J.; BRONZINO D. J. **Biomaterials principles and applications**. Florida: Boca Raton, 250p, 2000.

PARK. C.; NUTT. R. S. Anisotropy and strain localization in steel foam. **Materials Science and Engineering: A**; v. 299, n.1, p.68-74, 2000a.

PARK. C.; NUTT. R. S. Effects of process parameters on steel foam synthesis. **Materials Science and Engineering: A**; v. 297, n.1, p.62-68, 2000c.

PARK. C.; NUTT. R. S. PM synthesis and properties of steel foams. **Materials Science and Engineering: A**, v.288, n. 1, p.111-118, 2000b.

PARK. C.; NUTT. R. S. Strain rate sensitivity and defects in steel foam. **Materials Science and Engineering: A**, v.323, p.358-366, 2001.

PRADO DA SILVA, M. H. **Recobrimento de Titânio com HA: Desenvolvimento do processo de decomposição eletrolítica e caracterização biológica in vitro**, 1999. 166f. Tese (doutorado) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1999.

SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, T. J. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication Technology to the production of tissue engineering scaffolds. **European Cells and Materials**, v.5, p.29-40, 2003.

SADER, S. M.; FERREIRA, M.; DIAS, L. M. Preparação e Caracterização de Estruturas porosas de Poli (3-hidroxobutirato). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.16, p.12-18, 2006.

SCHROEDER, A.; SUTTER, F.; KREKELER, G. **Implantologia dental**. São Paulo: Panamericana, 1994.

SCHNEIDER, G. S. **Obtenção e caracterização da liga Ti-13Nb-13Zr para aplicação como biomaterial**, 2001. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear – Aplicações) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

SELIGSON, D.; MEHTA, S.; MISHRA, A. K.; FEIZGERALD, T.J.; CASTLEMAN, D. W.; JAMES, A. H.; VOOR, M. J.; BEEN, J.; NAWAB, A. In vivo study os stainless steel and Ti-13Nb-13Zr bone plates in a sheep model. **Clinical Orthopedics and Related Research**, n. 343, p. 213-223, 1997.

SILVER, H. F. **Biomaterials, medical devices and tissue engineering: an integrated approach**. London, Chapman & Hall, 303f, 1994.

SUMITA, M.; HANAWA, T.; TEOH, H. S. Development of nitrogen-containing nickel-free austenitic stainless steels for metallic biomaterials – review. **Materials Science and Engineering: C.**, v.24, n. 6-8, p.753-760, 2004.

VAN VLACK L. W. **Princípios de Ciências dos Materiais**. São Paulo: Edgard Blücher, 241, 2002.

VILLAMIL, V. F. R.; ARANHA, H.; AFONSO, A. C. L. M.; MERCADANTE, T. M.; AGOSTINHO, L. M. S. Aços inoxidáveis em implantes ortopédicos: fundamentos e resistência à corrosão. **Rev. Bras. Ortop.**, v.37, n.11/12, 2002.

WEBB, P.A., ORR, C. **Analytical Methods in Fine Particle Technology**. USA: Micromeritics Instrument Corporation, 1997. 301 p.

WEN, E.C.; MABUCHI, M.; YAMADA, Y.; SHIMOJIMA, K., CHINO, Y., ASAHINA, T. Processing of biocompatible porous Ti and Mg. **Scripta Materialia.**, v.45, p.1147-1153, 2001.

WEN, E.C.; YAMADA, Y.; HODGSON. P. D. Fabrication of novel TiZr alloy foams for biomedical applications. **Materials Science and Engineering.**, v.26, p.1439-1444, 2005.

WILLIAMS, D. F. Biofuncionality and biocompatilily. **Medical and Dental Materials**. New York: VCH, 1992.

WILLIAMS, D. F. On the biocompatibility of high technology materials. In: Williams, M.; Nichols, M.F.; Zingg, W. (ed.).**Biomedical Materials**. Pennington, New Jersey 1986, v.55, p. 117–126, 1986.

WILLIAMS, D. F. The science and applications of biomaterials. **Advances in Materials Technology Monitor**, v.1, n.2, p.1-10, 1994.