

Avaliação da biocompatibilidade do compósito aço/filme bioativo SiO₂-CaO para aplicação biomédica

(Biocompatibility evaluation of SiO₂-CaO/stainless steel composite bioactive film for biomedical application)

S. R. Federman¹, H. S. Mansur², E. F. B. Stancioli³, W. L. Vasconcelos²

¹Instituto Nacional da Propriedade Industrial - INPI, Av. Amazonas 1909, Belo Horizonte, MG 30180-092

²Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais, UFMG, R. Espírito Santo 35, s. 206, Centro, Belo Horizonte

³Laboratório de Microbiologia de Microrganismos Intracelulares - LABMIC/ICB, UFMG, Belo Horizonte, MG
federman@inpi.gov.br

Resumo

Foi obtido um filme bioativo sol-gel do sistema SiO₂-CaO através da mistura de precursor de silício (TEOS - tetraetil ortossilicato), precursor de cálcio (nitrato de cálcio tetrahidratado) e álcool em meio ácido. Após a mistura, a solução serviu para revestir o aço inoxidável através do método de imersão empregando baixa velocidade de emersão. O compósito obtido foi então submetido a tratamento térmico para densificação do filme a 400 °C durante 1 h. A biocompatibilidade do compósito foi avaliada através de dois métodos no sistema in vitro: a) solução concentrada similar ao fluido fisiológico - SFC 1,5 - e b) cultura de células. Imagens de microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia de energia dispersiva comprovaram a precipitação de precursor da hidroxiapatita na superfície do filme bioativo após exposição à solução SFC durante 3 semanas. Imagens de microscopia eletrônica de varredura confirmaram aderência, crescimento e espalhamento celular na superfície do filme bioativo sol-gel após 24 h de cultivo celular, empregando células VERO (ATCC CCL-81), sugerindo que o compósito é um material potencialmente aplicável nas áreas de medicina e odontologia. Resultados obtidos com o ensaio de viabilidade celular através de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-YL)-2,5-difeniltetrazolio] indicaram total ausência de toxicidade na interface filme sol-gel/células VERO.

Palavras-chave: revestimento, filme bioativo, biocompatibilidade, SFC, cultura de célula.

Abstract

Sol-gel film in the SiO₂-CaO system was prepared via reacting silicate precursor (TEOS - tetraethyl orthosilicate), calcium precursor (tetrahydrated calcium nitrate), alcohol in an acidic medium. After mixing, the coating was deposited on stainless steel by dip-coating technique at a low withdraw speed. After deposition, the composite was submitted to heat treatment, in air, at 400 °C for 1 h. The composite biocompatibility has been analyzed by in vitro studies using two methods: a) concentrated simulated body fluid - SBF 1.5 - and b) cell culture. A scanning electron microscopy and energy dispersive spectrometer (SEM and EDS) analysis revealed the formation of hydroxyapatite precursor layer on bioactive film surface after 3 weeks into SBF solution. SEM analysis shows the adhesion, proliferation and spreading of cells on sol-gel derived bioactive film surface after 24 h of cellular culture, using VERO cells (ATCC CCL-81). Viability cellular essays with MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] indicated no cytotoxicity in sol-gel film/VERO cells interface. Results suggested that this composite is an attractive material to be used in clinic field.

Keywords: coating, bioactive film, biocompatibility, SBF, cell culture.

INTRODUÇÃO

As informações dos órgãos de saúde indicam que o século XXI vai caracterizar-se, entre outras coisas, pelo aumento da longevidade da população mundial devido a uma série de fatores entre eles, uma alimentação adequada, medicamentos mais eficientes e lazer. Acoplado a essa crescente longevidade, vem a constatação de que o número de pessoas portadoras de doenças ósseas também tem crescido. O *stress* vivido nas grandes metrópoles igualmente tem dado sua contribuição para a expansão da quantidade de

acidentes de trabalho e trânsito, o que, conseqüentemente, tem aumentado o número de pessoas com a estrutura óssea comprometida [1, 2]. A substituição parcial ou total desses ossos danificados tem sido possível através da utilização de materiais metálicos (entre eles, o aço inoxidável) que possuem excelentes propriedades mecânicas e elevada resistência à corrosão. O aço inoxidável tem sido empregado na consolidação de fraturas permitindo a correção de falhas ósseas e alongamento de osso sob a forma de pinos, hastes e parafusos. Nesse caso, após a solução do problema ósseo, geralmente, esses dispositivos são retirados do organismo,

que continua a exercer suas funções normalmente [3, 4]. Entretanto, apesar dessas vantagens, os materiais metálicos apresentam como principais inconvenientes o fato de não resistirem ao ambiente altamente corrosivo do corpo humano, não integrarem quimicamente com o tecido vivo, além de induzirem a formação de uma cápsula fibrosa em torno do implante [5-7]. Um outro material empregado na substituição de órgãos ou tecido é o cerâmico, devido à sua ótima integração com o tecido vivo, e sua excelente estabilidade química no ambiente do corpo humano. Todavia, devido à sua fragilidade, seu uso tem sido restrito a órgãos não muito requisitados mecanicamente [2, 8-9]. Esses materiais – metais e cerâmicas – apresentam vantagens que devem ser mantidas e desvantagens, que devem ser eliminadas. Por isso, uma das soluções propostas para esse impasse tem sido o revestimento do material metálico com cerâmica, ressaltando as vantagens dos dois materiais [2, 10].

O processo sol-gel que se baseia nas reações de hidrólise e condensação formando uma estrutura tridimensional permite a obtenção de material cerâmico empregando baixas temperaturas, produtos mais homogêneos, além de obter subprodutos – água e álcool – que não agredem ao meio ambiente [2, 11].

Afirmar que um material é adequado para ser empregado clinicamente não significa dizer que ele será seguro ao ser implantado. Por isso, antes de ser utilizado clinicamente, é imprescindível que sua biocompatibilidade seja analisada. De uma forma geral, essa análise é realizada através de dois métodos: o *in vitro* e o *in vivo* [8, 12]. Inicialmente são realizados os testes *in vitro* e, dependendo dos resultados, posteriormente, são realizados os testes *in vivo*. Para a realização desses últimos devem ser observados os cumprimentos de procedimentos definidos em normas éticas. Os testes *in vitro* mais utilizados são através do líquido celular que simula o fluido corpóreo – por exemplo, o SFC – e o teste de cultura de célula [13-16].

Nesse trabalho a bioatividade do compósito, formado pelo filme do sistema binário $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ revestindo o aço inoxidável, foi avaliada através do método *in vitro*, empregando as técnicas: (a) solução SFC 1,5, no sentido de verificar a precipitação de fosfato de cálcio na superfície do filme e, (b) cultura de célula, com o objetivo de investigar o efeito citotóxico na interface filme bioativo / células no que tange a multiplicação e adesão celular.

MATERIAIS E MÉTODO

Amostras de aço inoxidável da série ABNT 400, cortadas sob a forma de disco, foram lixadas até 600 mesh, lavadas com detergente neutro, água deionizada, desengraxadas com acetona e, posteriormente, seguiram para imersão em acetona aplicando ultra-som e secas em atmosfera ambiente. As amostras preparadas foram revestidas com a solução sol-gel obtida através da mistura do precursor de sílica (TEOS), do precursor de cálcio (nitrato de cálcio tetrahidratado) e álcool em solução ácida, empregando barras magnéticas

[17]. A solução obtida foi preparada de modo a apresentar relação molar TEOS:nitrato de cálcio = 1:0,08 e TEOS:H₂O = 4. O substrato foi, então, revestido com a solução obtida através do método de imersão empregando velocidade de imersão na faixa de 3 cm/min a 5 cm/min, de modo a obter um filme fino e sem defeitos. Os compósitos obtidos após o revestimento foram densificados a 400 °C durante 1 h, após o qual foram deixados resfriar ao ar, obtendo-se, visualmente, filmes aderentes e sem defeitos. Posteriormente, as amostras seguiram para os ensaios da investigação da biocompatibilidade.

SFC 1,5

As amostras permaneceram em solução SFC 1,5 [18] durante 3 semanas a 37 °C. Após esse período elas foram retiradas da solução, lavadas com água, secas e a superfície metalizada com carbono para análise em microscópio eletrônico de varredura (JEOL modelo JSM 6360 LV) com aceleração de 15 kV. A composição química elementar do revestimento foi obtida através de EDS (Thermo Noran modelo Quest) com aceleração de 10 kV.

Cultura de células

Após o revestimento com o filme binário, as amostras foram esterilizadas com óxido de etileno durante 72 h e colocadas em placa de cultura de tecido de 96 poços. As células VERO (ATCC CCL-81 – célula epitelial aderente de rim de macaco – *Cercopithecus aethiops* – monkey, African green) foram cultivadas em “Meio Mínimo de Eagle” (MME) suplementado com 2 mM L-glutamina, sais de Earle, 0,1 mM de aminoácidos não essenciais e 1,0 mM de piruvato de sódio, 10% de soro fetal bovino - SFB - com adição de antibióticos (penicilina, estreptomicina e fungizona). As amostras semeadas com as células VERO foram tamponadas com solução de Tris-HCl 0,2 M e pH 6,5. Após o tamponamento foram lavadas com água miliQ (estéril), seguido de adição de MME sem suplementação e, finalmente, mantidas em atmosfera contendo 5% de CO₂, durante aproximadamente 30 min a 37 °C. Em seguida, foram semeadas 50.000 células em 100 µL de suspensão em MME suplementado com L-glutamina e 10% de SFB na superfície das amostras. Depois da semeadura as amostras retornaram à estufa de CO₂ (5%) permanecendo por 24 h a 37 °C. Para manter a estrutura celular as amostras foram fixadas com solução de glutaraldeído durante 16 h a 37 °C. Posteriormente, o glutaraldeído foi aspirado e a desidratação crescente da amostra foi realizada em solução etanólica (30, 50, 70 e 100%) por cerca de 30 min à temperatura ambiente. Finalmente, as amostras foram metalizadas com ouro e seguiram para a análise no microscópio eletrônico de varredura.

Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular foi realizado com o

reagente MTT, que se baseia na redução do sal MTT, a cristais azuis de formazan no interior da mitocôndria através de ação enzimática [5, 16, 19]. Consequentemente, apenas as células viáveis podem metabolizar o sal de MTT. Após 20 h de cultivo a placa contendo as células VERO na superfície dos compósitos teve o sobrenadante descartado. O meio foi repostado com MME fresco (suplementado com L-glutamina e 10% de SFB) e adição de MTT. A placa de cultura de tecidos foi levemente agitada para permitir a dissolução dos cristais. O meio de cultura contendo as células e sem a amostra revestida foi empregado como controle celular no sentido de alcançar a viabilidade máxima com o MTT.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A micrografia obtida por microscopia eletrônica de varredura do compósito constituído de aço inox revestido com filme fino sol-gel do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ seco a 400°C e que ficou exposto ao SFC 1,5 durante 3 semanas a 37°C está na Fig. 1. É nítida a morfologia uniforme do precipitado presente na superfície do revestimento, composta de inúmeras partículas diminutas e esféricas, características da presença de fosfato de cálcio. Igualmente, na micrografia menor no canto superior esquerdo, verifica-se a imagem de microscopia eletrônica de varredura da superfície do filme fino bioativo recobrindo o substrato, antes do teste com SFC. Percebe-se claramente, a ausência de qualquer precipitado. O espectro de EDS mostrado na Fig. 2 (maior) confirma a presença de precipitado de fosfato de cálcio na superfície do filme binário após as 3 semanas de exposição ao SFC 1,5, através dos picos relativos do fósforo e do cálcio. Contudo, esse fosfato de cálcio apresentando razão molar Ca/P próximo de 0,5 ainda não é a hidroxiapatita mas, seu um precursor, uma vez que, a hidroxiapatita apresenta uma razão molar igual a 1,67 [1, 2]. A literatura tem demonstrado que muitas vezes, inicialmente precipita

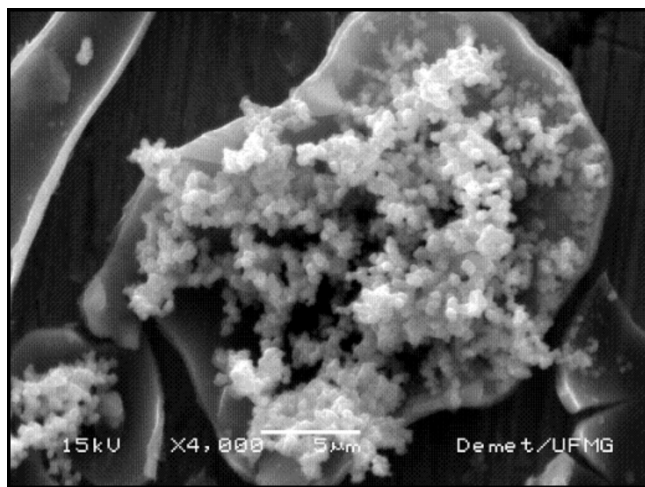


Figura 1: Imagem de microscopia eletrônica de varredura do filme bioativo em SFC 1,5 durante 3 semanas e, no campo superior, imagem de MEV antes do teste com SFC.

[Figure 1: SEM micrograph of bioactive film in SBF 1.5 during 3 weeks and, on left corner, SEM image before SBF test.]

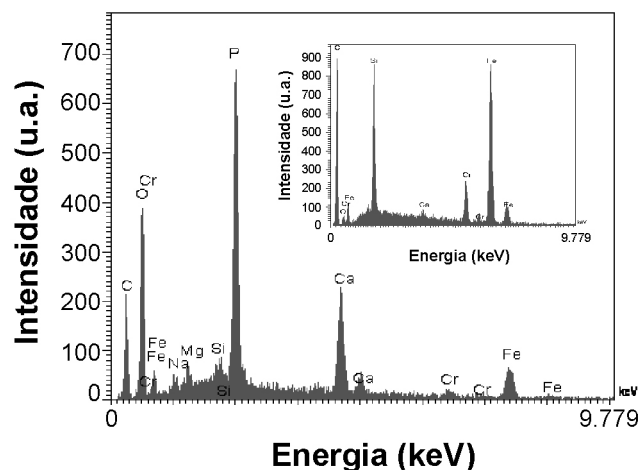


Figura 2: EDS do filme bioativo em SFC 1,5 durante 3 semanas e, no canto superior, EDS antes do teste com o SFC.

[Figure 2: EDS spectra of bioactive film in SBF 1.5 during 3 weeks and, on superior right corner EDS spectra before SBF.]

o precursor para depois então, quando existe uma saturação de fosfato de cálcio em solução, precipitar a forma mais estável, hidroxiapatita [20].

Ainda no espectro maior da Fig. 2 é possível observar além da presença dos picos do Mg e Na – provenientes do SFC – a intensidade reduzida do pico relativo ao silício em relação ao do P e do Ca e até mesmo, em relação aos picos do substrato - Fe e Cr. A redução na intensidade desse pico é justificada pelo fato de que no momento em que o revestimento constituído de $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ entra em contato com a solução fisiológica, inicia-se o processo de dissolução do revestimento liberando silício para o meio e permitindo a precipitação de fosfato de cálcio na superfície do revestimento. Esta observação é endossada pela literatura [11, 21] que demonstra a possibilidade de ocorrer a perda quase total do revestimento quando são empregados longos períodos de imersão em SFC. O resultado mostrado na Fig. 2 (maior) deixa claro que não foi verificada a presença de hidroxiapatita estequiométrica mesmo após longa exposição do compósito em solução concentrada de SFC durante 3 semanas. Esse resultado é explicado pelo fato do filme desse trabalho, apresentar uma composição percentual molar de 92% de Si e 8% de Ca. A literatura [10, 22] esclarece que composições de filmes contendo teor de silício superior a 60%, não produzem hidroxiapatita mesmo quando imersas em SFC por período superior a 4 semanas, produzindo apenas uma camada de fosfato de cálcio com razão molar Ca/P inferior a 1,67. Por outro lado, o espectro de EDS relativo ao compósito antes da exposição ao SFC 1,5 mostrado na figura menor, no canto superior direito da Fig. 2, confirma a ausência de qualquer precipitado de fosfato de cálcio na superfície do filme bioativo, enfatizando apenas a presença dos picos do filme (Si e Ca) e do substrato (Fe e Cr).

A morfologia das células VERO, obtida por microscopia eletrônica de varredura, aderidas à superfície do substrato de aço inoxidável após 24 h de cultura, é mostrada nas Figs. 3 e 4. A adesão celular é um dos pré-requisitos para

a proliferação e diferenciação celular antes da formação do tecido. A análise morfológica mostrada na Fig. 3, evidencia o aspecto arredondado das células já apresentando prolongamentos citoplasmáticos que buscam ancoragem em várias direções, sugerindo um bom espalhamento e adesão celular na superfície do filme bioativo. A micrografia da Fig. 4 ressalta o conjunto de várias células aderidas à superfície do filme, enfatizando a união de várias projeções citoplasmáticas e, conseqüentemente, de várias células, demonstrando a biocompatibilidade do filme desenvolvido.

A adesão celular a uma superfície inicia-se através de uma adesão preliminar, caracterizada por ligações fracas, passando pelo espalhamento celular que favorece a formação de ligações fortes entre a célula e o substrato [23]. Assim, uma análise das Figs. 3 e 4 permite a comprovação da biocompatibilidade do filme sol-gel binário densificado a 400 °C durante 1 h, uma vez que, as células VERO semeadas diretamente sobre a superfície da amostra, apresentaram-se

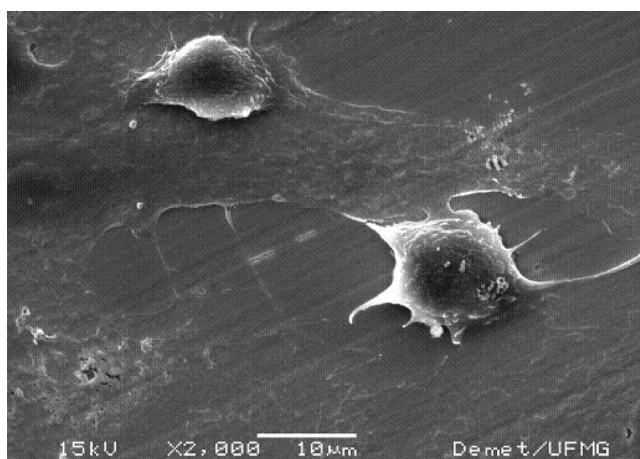


Figura 3: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de células aderidas à superfície do filme binário.

[Figure 3: SEM micrograph of adhered cells on binary film surfaces.]

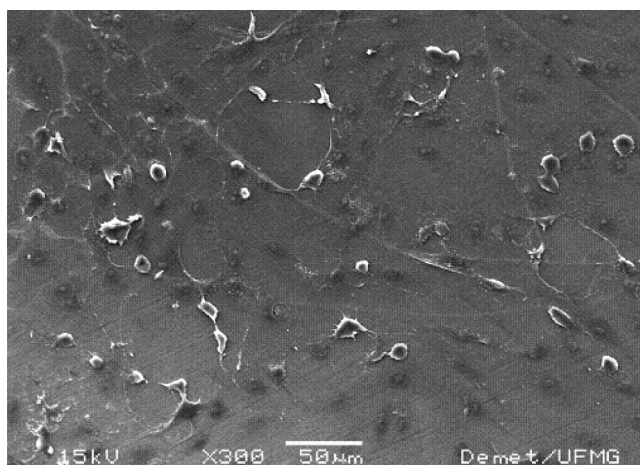


Figura 4: Imagem de microscopia eletrônica de varredura de células aderidas à superfície do filme binário, visão ampliada.

[Figure 4: SEM micrograph of adhered cells on binary film surfaces, expanded vision.]

perfeitamente aderidas ao substrato.

Os resultados do ensaio de viabilidade celular através do MTT são mostrados na Fig. 5. Na Fig. 5a, referente ao controle celular, é possível observar a presença de inúmeros precipitados escuros (cristais de metilformazan - MTT) no interior do citoplasma das células – seta –, as quais, estão em grande número no campo fotografado.

Com relação á Fig. 5b, é importante esclarecer, inicialmente, que a área escura na parte esquerda refere-se à superfície da amostra revestida com o filme binário sol-gel seco a 400 °C durante 1 h que, sendo constituída de aço inox não permite a passagem do feixe do microscópio utilizado na análise. Por sua vez, a parte clara no lado direito da mesma Fig. 5b, se refere à área compreendida entre a amostra e a parede do poço da placa de cultura de tecidos (lembrando que a amostra apresenta um diâmetro menor do que o do poço da placa). É interessante lembrar que apenas as células metabolicamente normais produzem esse precipitado escuro. Na Fig. 5b, além da presença dos precipitados de metilformazan - seta, observa-se, também, as células em monocamada fechada na borda do poço e em crescimento sobre as amostras. Muito embora a visualização da presença dos precipitados escuros não seja possível na superfície da amostra (área escura) da Fig. 5b, é perfeitamente previsível a presença desses precipitados também na parte escura da amostra. Se não houvessem esses precipitados na parte clara, seria um forte indício da ausência de células metabolicamente viáveis no ambiente da superfície do revestimento, sugerindo a presença de atividade citotóxica do material analisado. O ensaio de viabilidade celular da amostra revestida com o filme bioativo sol-gel mostrada na Fig. 5b comparado com o padrão do controle celular comprovou que a amostra analisada não apresentou qualquer efeito tóxico para as células, permitindo seu crescimento. Esse resultado comprova a biocompatibilidade do composto constituído de aço inox revestido com filme sol-gel $\text{SiO}_2\text{-CaO}$.

A viabilidade celular do aço inox da série 400 sem o revestimento do filme sol-gel do sistema $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ empregando as células VERO é mostrada na Fig. 5c. Igualmente, é evidente a presença dos precipitados de metilformazan em sua superfície – seta. Entretanto, comparando-se as fotografias mostradas nas Figs. 5b e 5c, observa-se que o revestimento do aço inox com o filme binário, objeto desse trabalho, acrescentou um diferencial superior em relação ao aço sem o revestimento quanto à proliferação celular. Está bastante nítido que, a quantidade de células aderidas à superfície revestida foi muito maior na amostra revestida com o filme binário. Na superfície revestida com o filme bioativo, as células estavam em maior número e tamanho, haja vista que foi suficiente um aumento de 100x na resolução do equipamento para visualizar a qualidade das células aderidas à superfície do revestimento; por outro lado, foi necessário um aumento de 400x na resolução do equipamento utilizado para ressaltar a presença das células aderidas à superfície do aço inox sem o revestimento do filme sol-gel.

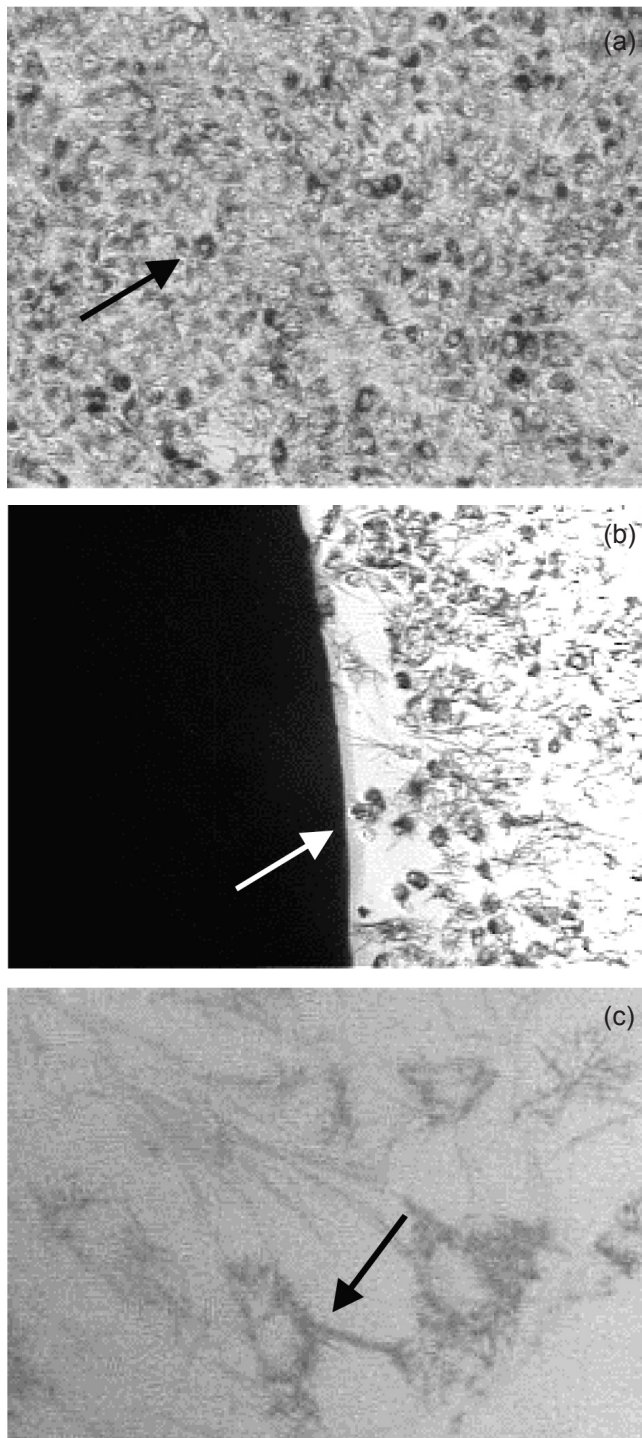


Figura 5: Viabilidade celular através do MTT sendo: (a) controle com aumento de 100x; (b) amostra com revestimento de filme binário com aumento de 100x e, (c) substrato sem revestimento com aumento de 400x.

[Figure 5: Cellular viability by MTT where: (a) cellular control with expanded vision 100x; (b) sample with binary coating with expanded vision 100x and, (c) substrate with expanded vision 400x.

A citotoxicidade da sílica em relação a um grande número de células já é comentada pela literatura [24, 25]. Sendo que, essa toxidez é proveniente dos grupos silanol presentes

na superfície da sílica que, em contato com a água geram radicais livres que têm um papel importante na toxidez [24]. Assim, um outro ponto a se destacar nesse trabalho é que muito embora o filme sol-gel obtido, $\text{SiO}_2\text{-CaO}$, constituído de grande teor de sílica - 92% de Si e 8% de CaO - os resultados comprovaram ausência de citotoxicidade no meio de cultura e, como consequência, a biocompatibilidade dos filmes utilizados, sugerindo seu potencial em aplicações clínicas.

A princípio os resultados mostrados nas Figs. 1 e 2 (SFC) e Figs. 3 a 5 (cultura de células) podem parecer conflitantes uma vez que, no primeiro foi sugerida a bioatividade através da precipitação de fosfato de cálcio e no segundo, tal comprovação foi confirmada através da adesão e crescimento celular na superfície do revestimento. Como foi dito anteriormente, SFC é uma solução acelular, ou seja, durante o teste não ocorre nenhuma reação biológica na interface filme/solução de SFC. Por outro lado, o teste com células, ainda que de linhagem simples como é o caso das células VERO, ocorrem reações biológicas na interface revestimento/células, razão pela qual, o teste realizado com células mostrou-se mais adequado e seguro na comprovação da biocompatibilidade no filme cerâmico que revestiu o aço inox da série 400.

CONCLUSÕES

O resultado obtido com a solução SFC 1,5 foi a precipitação do precursor da hidroxiapatita, sugerindo a bioatividade do filme $\text{SiO}_2\text{-CaO}$ que reveste o aço inoxidável. Por outro lado, o ensaio de cultura de célula, comprovou não apenas a biocompatibilidade do filme binário, através da aderência, espalhamento e proliferação celular na superfície do filme, como também a biocompatibilidade do aço inoxidável da série 400 empregado uma vez que, também, foram encontradas células aderidas a sua superfície. Ficou evidente, porém, a superioridade acrescentada pelo revestimento com o filme sol-gel na superfície do aço inox, com respeito à aderência, espalhamento e proliferação celular. Também foi possível concluir que o ensaio de viabilidade celular empregando MTT mostrou total ausência de toxicidade na interface aço inox / filme binário sol-gel. Assim, os resultados apresentados deixam claro o forte indicativo de ausência de toxidez no meio de cultura e, consequentemente, o potencial clínico do revestimento ora desenvolvido.

AGRADECIMENTOS

À FAPEMIG/CNPq/CAPES pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

- [1] E. Y. Kawachi, C. A. Bertran, R. R. dos Reis, O. L. Alves, Química Nova **23**, 4 (2000) 518-522.
- [2] M. Vallet-Regí, J. Chem. Soc., Dalton Trans., The Royal Society of Chemistry (2001) 97-108.

- [3] P. C. Weaver, J. W. Mast, K. A. Mayo, B. R. Bolhofner, D. Little, US Patent 6623486 (2003).
- [4] H. M. Wotton III, US Patent 2006/0212035 (A1) (2006).
- [5] S. Saragapani, P. D. Calvert, US Patent 6129928 (2000).
- [6] M. M. Beloti, J. M. D. A. Rollo, A. Itman Filho, A. L. Rosa, J. Appl. Biomater. Biomechanics **2** (2004) 162-168.
- [7] A. Durán, A. Conde, A. Goed, A. Gómez Coedo, T. Dourdo, C. Garcia, S. Ceré, J. Mater. Chem. **14** (2004) 2282-2290.
- [8] L. Nicolodi, E. Sjölander, K. Olsson, K. Biocompatible ceramics – an overview of application and novel materials, disponível em: <www.google.com>. Acesso: 25/11 (2004).
- [9] H. S. Azevedo, I. B. Leonor, C. M. Alves, R. L. Reis, Mater. Sci. Eng. C **25** (2005) 169-179.
- [10] E. Saiz, M. Goldman, J. M. Gomez-Vega, A. P. Tomsia, G. V. Marshall, S. J. Marshall, Biomater. **23** (2002). 3749-3756.
- [11] I. Izquierdo-Barba, F. Conde, N. Olmo, M. A. Lisarbe, M. A. Garcia, M. Vallet-Regí, J. Sol-Gel Sci. Techn. **26** (2003) 1179-1182.
- [12] J. K. M. F. Daguano, C. Santos, S. O. Rogero, Anais IV Cong. Lat. Am. Órg. Artif. Biomater., Caxambu, MG (2006).
- [13] R. L. Oréfice, L. L. Hench, A. Brennan, J. Braz. Chem. Soc. **11**, 1 (2000) 78-85.
- [14] A. L. Andrade, P. Valério, A. M. Goes, M. F. Leite, R. Z. Domingues, J. Non-Crystalline Sol. **352**, 32-35 (2006) 3508-3511.
- [15] H. S. Costa, M. M. Pereira, G. I. Andrade, E. F. B. Stancioli, H. S. Mansur, Mater. Res. **10**, 1 (2007) 27-29.
- [16] M. H. Santos, P. Valerio, A. M. Goes, M. F. Leite, L. G. D. Heneine, H. S. Mansur, Biomedical Mater. **2** (2007) 135-141.
- [17] S. R. Federman, D. C. L. Vasconcelos, W. L. Vasconcelos, Pedido Patente BR 0506229-2 (15/12/2005).
- [18] Y. Yan, Y. Han, Surface & Coatings Technology **201** (2007) 5692-5695.
- [19] F. Denizot, R. Lang, J. Immunological Method **89** (1986) 271-277.
- [20] H. Zhang, Y. Yan, S. Li, Mater. Res. **6**, 1 (2002) 111-115.
- [21] R. Sun, M. Li, Y. Lu, A. Wang, Mater. Charact. **56** (2006) 250-254.
- [22] L. L. Hench, J. Wilson, An introduction to bioceramics, US World Scientific, Florida, EUA (1993) 386.
- [23] D. L. Clapper, US Patent 5512474 (1996).
- [24] Y. Mao, N. D. Lambert, N. Whittakeer, U. Saffiotti, Environmental Health Perspectives **102**, suppl. 10 (1994).
- [25] R. Cooper, E. Tsang, J. Lewington, US Patent 7214505 (2007).
- (Rec. 03/09/2008, Ac. 14/11/2008)